



**HAL**  
open science

# Étude et caractérisation d'un micro-échangeur de chaleur : application à la biologie cellulaire

Jérémy Cramer

► **To cite this version:**

Jérémy Cramer. Étude et caractérisation d'un micro-échangeur de chaleur : application à la biologie cellulaire. Thermique [physics.class-ph]. 2012. dumas-01065863

**HAL Id: dumas-01065863**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01065863>**

Submitted on 18 Sep 2014

**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.

**CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS**

**PARIS**

---

**MEMOIRE**

**Présenté en vue d'obtenir**

**Le DIPLOME D'INGENIEUR CNAM**

**SPECIALITE : ENERGETIQUE**

**OPTION : Machines et Moteurs**

**Par**

**Jérémy CRAMER**

---

**Etude et caractérisation d'un micro-échangeur de chaleur :  
Application à la biologie cellulaire.**

**Soutenu le 21/05/12**

---

**JURY**

**PRESIDENT : DESCOMBES Georges (Professeur).**

**MEMBRES : PERHILLON Christelle (Maitre de conférences).**

**TOUSSAINT Michel (Ingénieur de recherche).**

**PAOLETTI Anne (Directrice de recherche).**

**PLECIS Adrien (Industriel).**

*Je voudrais avant tout et surtout dédier ce mémoire d'ingénieur à ma sœur.*

*C'est vrai, le « sha » a plusieurs vies et la donne aussi...*

## Remerciements :

Je tiens particulièrement à remercier tous ceux qui m'ont fait partager une partie de leur vie...

De la rue Henri Kratz à la rue Lhomond, en passant par la rue Conté...

Par où commencer l'histoire du remerciement ?!

Peut-être par hier.

1920, voilà ou plutôt voici un peu de TUNISIE. Et puis, de l'autre côté welcome to USA. Enfermé ou libéré, on résiste comme on peut, on fait de son mieux...On attend Liberté. La France, les femmes, la méiose... ça vous cause ?!

Le piano, l'harmo et les asticots...

Les années 50, Villemomble, Le Houlme...On se rapproche, mais, mais il faut attendre. Encore...

Paris, le jardin des tuileries. L'histoire d'un bulldozer travailloman persévérant et d'une fourmie rêveuse persévérante aussi. La méiose ?! Affirmatif...

1979, premier décollage... d'un finalement, gros « sha » ... Le caractère ?! No comment...

1983, aujourd'hui c'est mon tour. Autour de quoi ?! L'orbite peut-être...

Depuis le début, et jusqu'ici il y a toujours mes trois compères. Le chemin des 4 tours «laissez moi dormir de toute façon y a que des ruines... », La rue du chouquet « Le mobil bien sûr ! » Et Vandrimare « Une petite chambre, d'immenses souvenirs ». Certainement monsieur ! Ces trois là, c'est jusqu'au bout !

Peu de temps après, dans la fameuse rue Henri Kratz voici ma voisine préférée. Ou plutôt ma famille voisine préférée. Ce n'est pas si loin la Guadeloupe...Mais une de ses parties nous manque...

Journal du monde 95, Fleury sur Andelle, Guy de Maupassant, LE professeur ; Pendant qu'on égorge, brûle et détruit en Afghanistan « Tous les hommes naissent libres et égaux en droit et en devoir » Le français, la CULTURE G ! Je sais ...c'est trop tard pour le remercier ?!! Pourtant...

Les rencontres importantes, les amis et les amies aussi. Qui va me couper les cheveux alors ?! A oui... je n'ai plus de cheveux, les derniers doivent être restés au bar du home...

1997 à Charleval assis sur son typhoon déjà : « Tu sais, moi je cherche autre chose... » Comment ça ?! Voyage au bout de l'envie...

Objectif : Galilée... Pour un gars de la vallée le plateau c'est un peu trop haut....Qu'importe plus qu'une amitié, une nouvelle sœur j'y ai trouvé !

Alors j'ai « pensées » à.... Blaise Pascal bien sûr ! Là-bas y a un mec comme ça. De Limesy qu'il habite, lui.

Rue Henri Kratz, le tier-kar ! y a du monde le soir de partout, de Bonsecours, de Romilly, et de Pîtres aussi...même la grange aux loups est dans la place...la tchuss rider... à mort !

Rencontre d'un deuxième type : Margency 95. Six pieds sous terre, tu frère et soeur encore...

Bon les gars, il est 23h, je rentre parce que demain je « S ». Un seul rêve en tête.

Et puis il y a Septembre 2001... il pleut à Dieppe. Silence.

Une AX de Grainville passe me prendre...Désolé mais Amiens c'est loin.

Mont Saint Aignan 2002 : En Mesures Physiques on mesure le temps...Rdv amphi pour Défi force pure...

De retour de la Réunion ? Comen y lé ??!

Ces années là « la puissance motrice du feu » nous propulse sur les circuits, avec devinez qui ?!

Vous y voyez plus clair ?!

MCI : La Bretagne ! La ferme du nord et le chalet où il fait toujours beau...

La haute volta, Thomas Sankara et Blaise Compaoré, Le Burkina Faso, « Au pays des ~~hommes~~ femmes intègres...»

Devinez ce qu'on fait au BDC ?! On garde le moral et ....

Soisy sous Montmorency continue à danser ?! Parfait !

Il y a les oiseaux, la nature et l'incertitude sur le futur : « Eco-logis des solutions pour votre habitation le bien être pour notre planète... »

Rue des canadiens, Honda, Roue arrière en CBR, et vertèbres lombaires... CRT : Feu !

Aux platines ? Le DJ ?! Affirmatif ! Le frangin ?! Egalement, la famille je te dis...

Oui, je sais, je partage mon box avec une Yamaha...Mais « une » c'est rare n'est-ce pas ?!

Marx Dormoy, la semaine de 4 heures et le premier principe... Chaleur ~~Travail~~ Bonheur. Pour ça mon gars faut prendre de la hauteur ;) )

La Java, le Point éphémère, et la porte d'Italie... « En moyenne » qu'est-ce que t'en dit ?!

La réunion, les sans modèles, le Mod 5 et la 25ème heure... A moins d'une métamorphose « *Video meliora provoquo, detoria sequor* ».

Et aujourd'hui ?! Une partie de ma vie, depuis peu, je repeins, en Lapis Lazuli ...

***J'ai lu cela dans un livre de thermodynamique :***

***Ce qui fait finalement une vie réussie, c'est de pouvoir la partager...***

## Remerciements bis :

Je tiens tout d'abord à remercier l'**Abbé GREGOIRE**, Fondateur « éclairé et éclairant » du Conservatoire National des Arts et Métiers. Plus de 200 ans sont passés depuis et le CNAM continue « *d'éclairer l'ignorance qui ne connaît pas et la pauvreté qui n'a pas les moyens de connaître* »...

Je tiens également à remercier les descendants opérationnels de l'abbé Grégoire au Conservatoire National des Arts et Métiers : Madame **PERILHON Christelle** et Monsieur **DESCOMBES Georges** respectivement Maître de conférences, responsable des enseignements de machines et professeur des universités, responsable des enseignements de moteurs.

Je tiens singulièrement à remercier mes camarades de classe, cnameurs professionnels, j'ai nommé : Vincent Domergue, Jérémy Honoré, Gilles Ramdenee, et Samuel Travert. Merci à vous.

Je tiens naturellement à remercier toute l'**équipe TRAN/PAOLETTI** au sein de l'UMR144. Merci d'avoir tous œuvrés pour permettre et faciliter mon intégration. Je tiens à remercier particulièrement BOUHLEL Iméne pour sa bonne humeur diffusée au quotidien, CARLIER-GRYKORN Frédérique pour son engagement sans failles, DILELLO Loredana pour sa spontanéité, GUZMAN-VENDRELL Merce pour sa singularité, JI Liang pour son courage, RINCON Sergio pour sa gentillesse, SCHEFFLER Kathleen pour sa détermination.

Je tiens également à remercier les « anciens » : MAYEUX Adeline pour son amitié (un jour, toi aussi tu finiras le CNAM...), VELVE CASQUILLAS Guilhem le père de ce projet ;), LABAN Kimberly pour son énergie débordante, DUMONT Julien pour sa simplicité.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidées à réaliser ce travail, LE BERRE Mael (pour...Tout), JANVORE Julie pour son efficacité, GOGENDEAU Delphine pour sa

patience, RUNGE Jean-Baptiste pour ses conseils éclairés, HASSAN-ZAHRAEE Ali mon référent Matlab, PLECIS Adrien pour son humanité, CARPIS Nicolas pour tout ses tricks (Fidji is just imageJ), TERRIAC Emmanuel pour ses conseils et discussions « pas d'accord ».

Je tiens également à remercier COUDREUSE Damien pour sa vision singulière de la science et ses adresses à Hawaii.

Merci à toute l'équipe d'imagerie et plus particulièrement merci à RENAUD Olivier, LEROY Olivier et PIOLOT Tristan.

Je tiens finalement à remercier **Anne** pour sa considération et ses conseils, et **Phong** pour son enthousiasme scientifique, la confiance qu'il m'a apportée, et pour son soutien dans mes projets futurs.



## Table des Matières :

|  |    |
|--|----|
| Remerciements :  | 3  |
| Remerciements bis :  | 6  |
| Table des Matières :   | 8  |
| Préambule :  | 12 |
| INTRODUCTION GENERALE :  | 14 |
| CHAPITRE 1 :   | 16 |
| Contexte, But et Motivations de l'étude :                                      | 16 |
| 1.1 Contexte institutionnel.   | 16 |
| 1.2 Laboratoire d'accueil.   | 17 |
| 1.3 Contexte de l'étude : Pourquoi contrôler la température des cellules ?     | 17 |
| 1.4 Introduction à la miniaturisation:   | 19 |
| 1.4.1 Qu'est-ce que la Microfluidique ?  | 20 |
| 1.5 Etat de l'art des dispositifs microfluidiques de contrôle de température : | 20 |
| 1.7 Cahier de charges fonctionnelles :   | 21 |
| 1.7.1 Liste des Fonctions Principales et des contraintes :                     | 22 |
| 1.8 Conclusion :   | 24 |
| CHAPITRE 2 :   | 25 |
| Présentation et Fabrication du dispositif :                                    | 25 |
| 2.1 Première partie : L'échangeur de chaleur.                                  | 25 |
| 2.2 Seconde Partie : L'enceinte de déposition.                                 | 26 |
| 2.3 Assemblage des deux parties amovibles :                                    | 27 |
| 2.3 Dispositif expérimental complet :  | 29 |
| 2.3.1 Eléments indépendants.   | 29 |
| 2.3.2 Fonctionnement du dispositif expérimental :                              | 31 |
| 2.4 Fabrication du dispositif :  | 33 |

|  |    |
|--|----|
| 2.4.1 Un peu d'histoire :  | 33 |
| 2.4.2 Le transfert de motif : La photolithographie.                          | 34 |
| 2.4.3 Première étape : Réalisation d'un masque en quartz.                    | 35 |
| 2.4.4 Seconde étape : Fabrication d'un moule réutilisable.                   | 35 |
| 2.4.5 Troisième Etape : Moulage PDMS.  | 36 |
| 2.4.6 Quatrième étape : Collage Plasma.                                      | 38 |
| 2.4.7 Contrôle Qualité :   | 39 |
| 2.5 Résumé des points importants - Conclusion :                              | 39 |
| CHAPITRE 3 :   | 41 |
| Etude expérimentale : Caractérisation Thermique et Validation Biologique.    | 41 |
| 3.1 Buts et Motivations.   | 41 |
| 3.2 Caractérisation Thermique du dispositif de contrôle de température.      | 41 |
| 3.2.1 Solution technique et technologique pour la mesure de la température : | 42 |
| 3.2.2 Motif de dépôt métallique et méthode de mesure 4 points :              | 43 |
| 3.2.3 Etalonnage des pistes métalliques et dispositif expérimental complet.  | 45 |
| 3.2.4 Résultats : Dépendance du débit sur la température du dispositif.      | 47 |
| 3.2.5 Résultats : Décalage entre la consigne et la mesure.                   | 50 |
| 3.2.6 Dynamique de changement de température au sein du dispositif.          | 52 |
| 3.2.7 Changement périodique de température au sein du dispositif :           | 54 |
| 3.3 Conclusion sur la caractérisation thermique du Dispositif :              | 55 |
| 3.4 Etude Expérimentale : Validation biologique.                             | 56 |
| 3.4.1 Rappels élémentaires de biologie cellulaire.                           | 57 |
| 3.4.2 Contrôle de la dynamique des microtubules :                            | 57 |
| 3.4.3 Contrôle des microtubules de <i>S.Pombe</i> par choc thermique :       | 58 |
| 3.4.4 HeLa : Cellule humaine cancéreuse.                                     | 61 |
| 3.5 Mutants thermosensibles :  | 64 |

|  |    |
|--|----|
| 3.5.1 Qu'est-ce qu'un mutant thermosensible ? .....                              | 64 |
| 3.5.2 Mutant thermosensible chez la levure <i>S.Pombe</i> : .....                | 65 |
| 3.5.3 Mutant Thermosensible chez les embryons de ver de <i>C.elegans</i> . ..... | 67 |
| 3.6 Conclusion de la validation biologique : .....                               | 70 |
| CHAPITRE 4 : .....   | 72 |
| Analyse Energétique du dispositif : .....  | 72 |
| 4.1 Régime Permanent : .....   | 72 |
| 4.1.1 Objet d'étude. ....  | 72 |
| 4.1.2 Objectif : .....   | 72 |
| 4.1.3 Quantité d'énergie disponible.....   | 72 |
| 4.1.4 Flux de chaleur nécessaire.....  | 73 |
| 4.1.5 Gradient de température : .....  | 79 |
| 4.2 Conclusion du régime permanent : .....                                       | 80 |
| 4.3 Analyse énergétique en régime variable : .....                               | 81 |
| 4.3.1 Objet d'étude. ....  | 81 |
| 4.3.2 Objectif.....  | 81 |
| 4.3.3 Bilan thermique : Méthode.....   | 82 |
| 4.3.4 Calcul du nombre de Biot : .....   | 83 |
| 4.3.5 Méthode des capacités thermiques : .....                                   | 84 |
| 4.4 Régime variable : Conclusion. ....   | 85 |
| CHAPITRE 5 : .....   | 86 |
| Conclusion générale et Perspectives : .....                                      | 86 |
| 5.1 Conclusion scientifique et technique.....                                    | 86 |
| 5.2 Conclusion personnelle. ....   | 88 |
| 5.3 Perspectives personnelles. ....  | 88 |
| Bibliographie : .....  | 90 |

Liste des figures : ..... 92

RESUME ..... 95

SUMMARY ..... 95

## Préambule :

A travers l'étude des turbomachines et des moteurs, durant la formation d'ingénieur en énergétique effectuée au Conservatoire National des Arts et Métiers, nous avons principalement étudié les disciplines suivantes : Mécanique des fluides, Thermodynamique, Transfert thermique, et de façon plus générale toutes les compétences nécessaires à la compréhension et à l'optimisation de la **conversion de l'énergie** des machines produisant un service de transformation énergétique, et, ce, dans un contexte de raréfaction des sources primaires d'énergie et de réduction de leur impact sur l'environnement. Nous avons donc été fortement sensibilisés aux notions de travail mécanique, de chaleur, de température et d'écoulement des fluides.

Le projet scientifique et technique présenté, visant à la publication d'un article scientifique, porte principalement sur l'étude, la réalisation et l'optimisation d'un échangeur de chaleur miniaturisé. Le service énergétique rendu par cet échangeur miniaturisé est destiné au contrôle précis de la température d'un échantillon biologique. Un échangeur de chaleur est globalement un dispositif technologique permettant de transférer de l'énergie thermique d'un premier fluide (quel qu'il soit) vers un second fluide et, ce, sans les mélanger. Notre échangeur de chaleur est, en première approche, constitué de deux compartiments très proches mais étanches l'un vers l'autre, où les échanges thermiques sont optimisés. Un flux permanent de liquide préalablement thermalisé traverse un premier compartiment. Le second compartiment, composé d'un volume de liquide statique, reçoit ou libère de la chaleur en réaction à l'influence du premier compartiment. Cet échange de chaleur s'opère entre les deux compartiments jusqu'à équilibre des températures. Ce projet requiert donc principalement les compétences d'un spécialiste des transferts d'énergie.

La température est l'un des facteurs clés du fonctionnement cellulaire. Son contrôle précis et rapide permet de nouvelles approches pour comprendre et décrire de nombreux mécanismes cellulaires. Aujourd'hui aucun dispositif commercial ne répond aux exigences d'un contrôle rapide de température adapté à l'étude d'organismes biologiques. Pourtant, un tel système se

révélerait d'un grand intérêt en biologie. C'est donc naturellement qu'un laboratoire de biologie cellulaire a sollicité les compétences et connaissances d'un étudiant ingénieur en énergétique pour conduire ce projet et répondre au mieux au cahier des charges fixé par les besoins en biologie. Le professeur Phong TRAN, Directeur de recherche à l'Institut CURIE (Paris) et à l'université de Pennsylvanie (Philadelphie), m'a ainsi engagé pour effectuer une étude, réaliser et optimiser un échangeur de chaleur miniaturisé, valider son fonctionnement biologique puis enfin valoriser les résultats obtenus sous la forme d'un article scientifique. L'ensemble de cette activité a donc pour but d'être publié dans un article scientifique international.

Pourquoi ?

La publication de cette technologie dans une revue scientifique internationale, soumise au contrôle exigeant d'un comité de lecture, participera à la diffusion internationale de cette nouvelle technologie. Cette première publication, centrée sur la technologie, est nécessaire pour l'utilisation future de ce dispositif dans le cadre d'autres publications essentiellement centrées sur des problématiques biologiques.

## INTRODUCTION GENERALE :

L'énergétique est une science physique pluridisciplinaire ayant globalement pour objet, l'énergie. Cette science est principalement centrée sur la production, la transformation et l'utilisation de l'énergie. Mot communément utilisé, la définition du concept d'énergie en science physique reste néanmoins difficile à appréhender. Définie « ésotériquement » comme, *la grandeur mesurant la capacité d'un système à changer l'état d'un autre système avec lequel il entre en interaction*, l'énergie, exprimée en joule, est en quelque sorte une grandeur universelle permettant de quantifier des interactions entre des phénomènes différents.

Pour illustrer ce propos, utilisons un cas d'école de la conversion naturelle de l'énergie. Le rayonnement lumineux solaire, source d'énergie principale, est, via le processus de photosynthèse, capté par les plantes pour produire des glucides (source d'énergie utilisable directement par les organismes biologiques). Pour ce faire, cette réaction biochimique de photosynthèse doit également capter du dioxyde de carbone ainsi que de l'eau, et libère en outre de l'oxygène.

Cet exemple touche au cœur des problématiques soulevées par l'énergétique :

- avec tout d'abord, la notion d'équivalence entre l'énergie lumineuse (Rayonnement solaire) et l'énergie chimique constituée par les glucides (sucre) ;
- ensuite, la problématique soulevée par le mode de transformation et l'efficacité de cette conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique ;
- Puis finalement, les quantités de ressources nécessaires (Dioxyde de carbone et eau) pour la réalisation d'une telle transformation, ainsi que l'émission de substances dans l'environnement (ici l'oxygène).

Bien entendu, toutes transformations sont soumises à des lois physiques. L'une des disciplines fondamentales enseignées au cours de ce cursus d'ingénieur s'appelle la thermodynamique. La thermodynamique est fondamentalement la science des transformations de l'énergie. Elle décrit les lois fondamentales sur lesquelles, jusqu'ici, repose le fonctionnement de l'univers [1]. Elle

traite des interactions entre tous les phénomènes de natures différentes (électrique, mécanique, chimique, thermique etc), et a pour objet de prévoir l'évolution et les transformations des systèmes qui en sont le siège [2].

S'appliquant depuis tous temps à domestiquer l'énergie, l'homme, en créant des machines sophistiquées, tels que des moteurs à combustion interne jusqu'ici nécessaires à la propulsion mécanique des véhicules, s'efforce d'optimiser toutes les technologies fabriquées [3].

La multitude des formes d'énergie et de leurs emplois ainsi que la capacité de cette discipline à prévoir et quantifier l'évolution de systèmes font de l'énergétique une science intervenant dans de nombreux domaines « à priori » sans point de convergence : Environnement, Politique, Technologie, Climat, Urbanisme, Transport, Santé.

C'est dans le cadre d'un projet d'énergétique au sein de l'Institut CURIE, centre de recherche de référence dans le domaine de l'oncologie et de la lutte contre le cancer, que j'ai réalisé ce stage de fin d'étude d'ingénieur CNAM. Cette étude s'inscrit dans une démarche de conduite de projet d'ingénierie avec un livrable final. L'objectif consiste en l'optimisation, la caractérisation et la validation d'un nouveau dispositif de contrôle de température rapide destiné aux études en biologie cellulaire. L'objectif pédagogique de ce stage est de conduire et de réaliser en autonomie totale l'ensemble de cette étude jusqu'à la publication scientifique des résultats de ces travaux dans une revue scientifique internationale.

Il a donc exigé l'apprentissage de nombreuses compétences scientifiques et techniques pour être mené à bien.



# CHAPITRE 1 :

## Contexte, But et Motivations de l'étude :

### 1.1 Contexte institutionnel.

L'Institut CURIE est une fondation associant un centre de recherche fondamentale européen en cancérologie et deux établissements hospitaliers. Composé de plus de 80 équipes de recherche, au sein de 15 unités associées au CNRS, à l'INSERM et à des universités, ses travaux, notamment pluridisciplinaires, rassemblent des biologistes, des chimistes, des physiciens, des bio-informaticiens et des médecins.

J'ai réalisé mon projet de fin d'étude d'ingénieur dans le centre de recherche fondamentale, au sein de l'Unité Mixte de Recherche 144 (Compartiment et dynamique Cellulaire) dirigée par Bruno GOUD. L'UMR 144 héberge plusieurs équipes et notamment le groupe "Architecture du cytosquelette et morphogénèse cellulaire" codirigé par Phong TRAN et Anne PAOLETTI. Les travaux actuels de l'équipe se focalisent sur l'architecture du cytosquelette et la morphogénèse cellulaire.

*« La mission de l'unité mixte de recherche 144 est de comprendre la biogénèse des compartiments des cellules et les mécanismes moléculaires qui gouvernent les fonctions cellulaires normales..... pour comprendre la façon dont les fonctions normales se dérèglent au cours du développement des cancers, ainsi que pour identifier des nouvelles approches thérapeutiques ».*

Pour ce faire, de nombreuses approches expérimentales sont développées dont notamment des approches physiques et technologiques. C'est donc dans cette démarche que le Professeur TRAN m'a recruté au sein de son équipe de biologistes.

L'objet de ma mission était de développer un nouveau dispositif de contrôle rapide de température pour l'étude des fonctions cellulaires.

## 1.2 Laboratoire d'accueil.

Le laboratoire du professeur Phong TRAN et de la directrice de recherche Anne PAOLETTI est un laboratoire de biologie cellulaire. Initialement, l'ensemble de l'équipe était uniquement composé de biologistes allant du niveau master au post-doctorant.

Voulant exploiter les possibilités technologiques offertes par les procédés de micro fabrication, le professeur TRAN a engagé en 2008 un physicien au sein de son laboratoire. Celui-ci a mis en place l'ensemble du matériel nécessaire pour réaliser ces technologies micro-fabriquées. Il a ainsi assuré la fabrication et la mise au point de nombreux dispositifs pour la biologie cellulaire, dont notamment la fabrication de chambre permettant de perfuser des drogues, d'appliquer un stress mécanique aux cellules [4], et plus récemment un microcontrôleur de température [5].

Lors de mon arrivé à l'Institut CURIE, j'ai ainsi été formé par le docteur Guilhem VELVE-CASQUILLAS. Ce physicien post-doctorant avait notamment mis en place l'activité microfluidique du laboratoire de biologie du professeur TRAN.

## 1.3 Contexte de l'étude : Pourquoi contrôler la température des cellules ?

Comme tous les organismes vivants, la cellule, pour être maintenue en vie, doit, entre autre, nécessairement être dans les bonnes conditions de température. En fonction de la nature de l'organisme biologique étudié, les conditions de températures peuvent être différentes. De plus, de nombreux mécanismes cellulaires sont impactés dans leur dynamique interne par une variation de température. Les progrès en génie génétique ont permis de modifier des organismes sauvages pour rendre certaines de leurs fonctions conditionnelles. La dépendance à la température en est un exemple. C'est ce que l'on appelle les mutants thermosensibles. Que ce soit de façon constante ou en effectuant des variations, pouvoir contrôler de façon précise la température au sein des échantillons biologiques est donc nécessaire pour valider et reproduire toute expérience biologique. Pour ce faire, la plupart des microscopes sont équipés de système « macroscopique » de contrôle de température (Fig.1.1). Communément appelés chambre d'incubation, ces

dispositifs transparents de contrôle de température ont la particularité d'englober une grande partie du microscope dans le double but de thermaliser le microscope lui-même ainsi que les échantillons biologiques étudiés.



**Figure 1.1: Boîtes d'incubation montées sur des microscopes de taille différentes**  
[[www.solentsci.com](http://www.solentsci.com)]

Ces dispositifs de contrôle de température destinés à l'imagerie biologique sont robustes et relativement précis. Néanmoins, la taille de ces boîtes d'incubation ne permet pas un changement rapide de la température (environ 1 heure). De plus la gamme de la température est souvent comprise entre la température ambiante et des températures supérieures.

Pour remédier aux problématiques de vitesse de changement de température, une des solutions consiste à réduire fortement la taille des dispositifs de contrôles de température comme l'illustre en première approche l'équation 1.1 du temps caractéristique de diffusion à travers un matériau :

$$t_{cond} = \frac{L^2}{\alpha} \quad (1.1)$$

**Equation 1.1 : Un système avec une taille caractéristique 10 fois plus petite changera de température 100 fois plus vite.**

Avec,

$t_{cond}$  : Temps de diffusion caractéristique (s)

$L$  : Distance caractéristique (m)

$\alpha$  : Diffusivité thermique (coefficient de diffusion thermique) (m<sup>2</sup>/s)

#### **1.4 Introduction à la miniaturisation:**

La gamme des tailles moyennes des échantillons biologiques (cellule unique ou organisme multicellulaire) est de l'ordre d'un micromètre à un millimètre. Pour réaliser ce projet, nous avons donc utilisé les techniques de miniaturisation offertes par les procédés de micro fabrication [6].

### 1.4.1 Qu'est-ce que la Microfluidique ?

En première approche nous définirons la microfluidique comme la science et les techniques traitant des écoulements de fluides dans des microsystèmes artificiels mais également dans des microsystèmes naturels tels que dans les vaisseaux capillaires sanguins. La microfluidique s'intéresse donc à l'écoulement de fluide à l'échelle micrométrique, mais également aux techniques de fabrication de ces dispositifs micrométriques [7]. Malgré les faibles tailles caractéristiques étudiées par la microfluidique, cette science reste et demeure une science où le critère de continuité est vérifié (cf : le critère de Knudsen  $<1$ ).

### 1.5 Etat de l'art des dispositifs microfluidiques de contrôle de température :

De nombreux dispositifs microfluidiques de contrôle rapide de température destinés à la biologie cellulaire existent déjà. La plupart des technologies utilisent, pour thermaliser un échantillon biologique, l'effet joule. Un fin dépôt métallique (couche mince) est réalisé dans une enceinte où est situé l'échantillon biologique. La traversée d'un courant à travers le dépôt métallique produit par effet joule une augmentation rapide et précise de la température [8]. Néanmoins le facteur limitant de cette technique reste l'impossibilité de refroidir l'échantillon biologique. Pour dépasser ce facteur limitant, l'ancien post doctorant du laboratoire du Professeur Phong TRAN a mis au point un dispositif de contrôle rapide de la température fonctionnant dans une gamme physiologique de 5 à 45°C (Fig. 1.2). Le fonctionnement de ce dispositif repose sur la diffusion de la chaleur entre deux canaux microfluidiques très proches. Dans un premier canal, passe un liquide caloporteur thermalisé. En dessous de celui-ci, dans un second canal, est situé un échantillon biologique [9]. La chaleur est ainsi conduite à travers la paroi qui sépare les deux canaux. La principale limite de ce dispositif de contrôle de température réside dans l'obligation d'injecter l'échantillon biologique (cellule unique ou organisme multicellulaire) dans un micro canal. Dans la plupart des cas, l'injection peut dégrader l'intégrité de l'échantillon. Dans certain cas l'injection de cellules dans des canaux est tout simplement impossible.

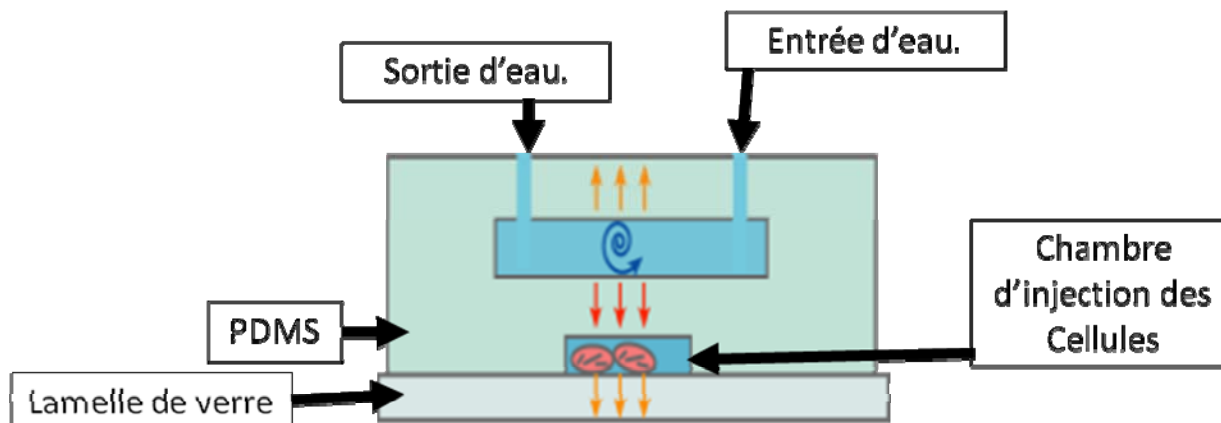


Figure 1.2: Dispositif de contrôle de température bi canal. Echelle non respectée

## 1.6 Le projet de fin d'étude d'ingénieur :

Le Professeur Phong TRAN m'a donc, de manière globale, confié le projet de fournir un nouveau dispositif de contrôle rapide de température adapté à la plupart des organismes biologiques étudiés en laboratoire de recherche, dans un format publiable dans une revue scientifique internationale.

M'appuyant sur une architecture de dispositif non publiée du précédent post doctorant, j'ai réalisé en autonomie totale, dans la continuité de ses études préliminaires, la conduite de l'ensemble des étapes nécessaires pour fournir un nouveau dispositif de contrôle rapide de température destiné à la biologie cellulaire.

## 1.7 Cahier de charges fonctionnelles :

Le cahier des charges fonctionnelles est défini comme « *un document formulant le besoin du client au moyen de fonctions détaillant les services rendus par le produit et les contraintes*

*auxquelles il est soumis ». Définir dans quel environnement un objet fonctionne et quelles fonctions il doit réaliser.*

L'une des difficultés majeures de ce projet était de bien comprendre l'ensemble des besoins et contraintes exprimés par une communauté de biologistes étudiant des organismes différents. Qui dit organismes différents, dit tailles différentes, formes différentes, milieux de culture différents, besoins et attentes différents.

Pour prendre la mesure d'une réalité multiple, complexe et agissant à plusieurs niveaux, il a été nécessaire que je sois formé, autant que faire se peut, à l'ensemble des activités connexes de la fonction réalisée.

J'ai donc appris les techniques de culture cellulaire, discuté et interagi avec de nombreux biologistes, réalisé mes propres expériences biologiques, assisté à toutes les présentations et séminaires de la communauté de l'Institut CURIE. Je me suis également concentré sur l'imagerie microscopique et son post-traitement. J'ai notamment pris des cours théoriques pour avoir une vision d'ensemble des différents types de microscope disponibles, de leurs spécificités mais aussi leurs limites.

En somme, pour appréhender au mieux les contraintes liées au dispositif de contrôle de température, j'ai tenté de m'immiscer dans la peau d'un biologiste tout en conservant mon prisme d'énergéticien.

### **1.7.1 Liste des Fonctions Principales et des contraintes :**

**Fonction principale :** Contrôler rapidement la température d'un échantillon biologique dans une gamme de température physiologique.

**Contrainte 1 :** S'adapter à différentes tailles d'échantillon.

**Contrainte 2** : Permettre l'observation via un microscope (transparence).

**Contrainte 3** : Respecter la distance de travail imposé par un objectif à immersion d'ouverture numérique importante (distance de travail faible).

**Contrainte 4** : Etre réutilisable plusieurs fois.

**Contrainte 5** : Etre facile à fabriquer.

**Contrainte 6** : Permettre un changement rapide de la température (inférieur à 10 secondes).

**Contrainte 7** : Limiter l'investissement supplémentaire à environ 2000 euros (utiliser le matériel disponible entre l'Institut CURIE et L'ENS).

**Contrainte 8** : Fonctionner dans une gamme de température physiologique pertinente.

**Contrainte 9** : Pouvoir déposer l'échantillon sans injection.

**Contrainte 10** : Pouvoir déposer un volume de milieu liquide (nutriments et stabilisateur de Ph) d'environ 2 $\mu$ L).

**Contrainte 11** : Assurer une bonne homogénéité de température dans les trois dimensions du système.

**Contrainte 12** : Connaître l'écart entre la température de consigne utilisateur et la température réelle reçue par l'échantillon.

**Contrainte 13** : Vérifier la non toxicité des matériaux utilisés.

**Contrainte 14** : Vérifier l'absence d'interactions biochimiques entre les milieux et le substrat.

**Contrainte 15** : Pouvoir réaliser des changements de la température périodiques et robustes dans la gamme précédemment définie.



## 1.8 Conclusion :

C'est donc à l'Institut CURIE, centre de recherche fondamentale sur le cancer que mon projet d'ingénieur a été réalisé. Intégré directement au sein d'une équipe de biologistes, j'ai été formé par l'ancien post-doctorant physicien du professeur TRAN. Au sein de ce laboratoire les installations nécessaires à la micro-fabrication avaient été mises en place quelques temps avant mon arrivée. Les précédentes études de l'équipe du professeur TRAN l'avaient conduit à identifier l'absence d'un dispositif de contrôle de température rapide adapté à la plupart des échantillons biologiques. C'est donc dans ce cadre, et suite au départ du post-doctorant, que j'ai été recruté. Pour réaliser un dispositif adaptable à la plupart des échantillons, je me suis appuyé sur une idée d'architecture déjà pensée par le précédent physicien. Je n'ai donc pas la paternité de ce dispositif.

Nous avons donc utilisé les méthodes de micro-fabrication pour réaliser un dispositif miniaturisé mais néanmoins facilement manipulable à la main.

Pour répondre au problème d'échantillons de tailles différentes, la nouveauté repose sur la géométrie variable du dispositif.

## CHAPITRE 2 :

### Présentation et Fabrication du dispositif :

#### 2.1 Première partie : L'échangeur de chaleur.

Notre enceinte thermostatée, dispositif nous permettant de contrôler la température des cellules, est composée de deux parties distinctes. La première partie, **l'échangeur de chaleur** (Fig.2.1), est composée d'une lamelle de verre fin ( $40\ \mu\text{m}$  d'épaisseur) d'une longueur de 40 mm et large de 24 mm. Sur cette lamelle de verre est collé un élastomère transparent (PDMS : Polydiméthylsiloxane) [10]. Sa fonction est de permettre un échange de chaleur par transfert convecto-conductif entre un liquide caloporteur et l'échantillon biologique situé en dessous de celui-ci. L'écoulement permanent d'un liquide, préalablement thermalisé, est réalisé à travers un réseau interne, le canal de contrôle de température microfluidique (Fig.2.2).

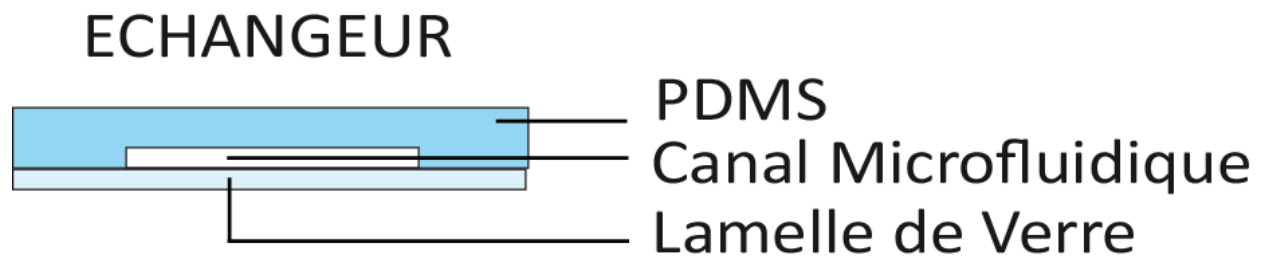


Figure 2.1: Schéma descriptif simplifié (vue en coupe) de la partie échangeur du contrôle de température.

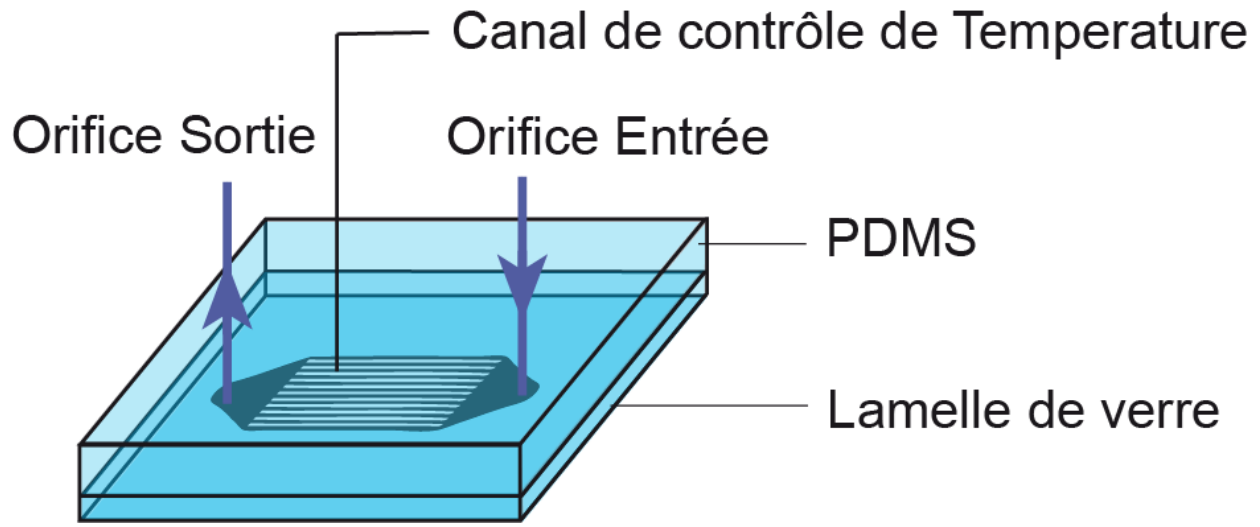
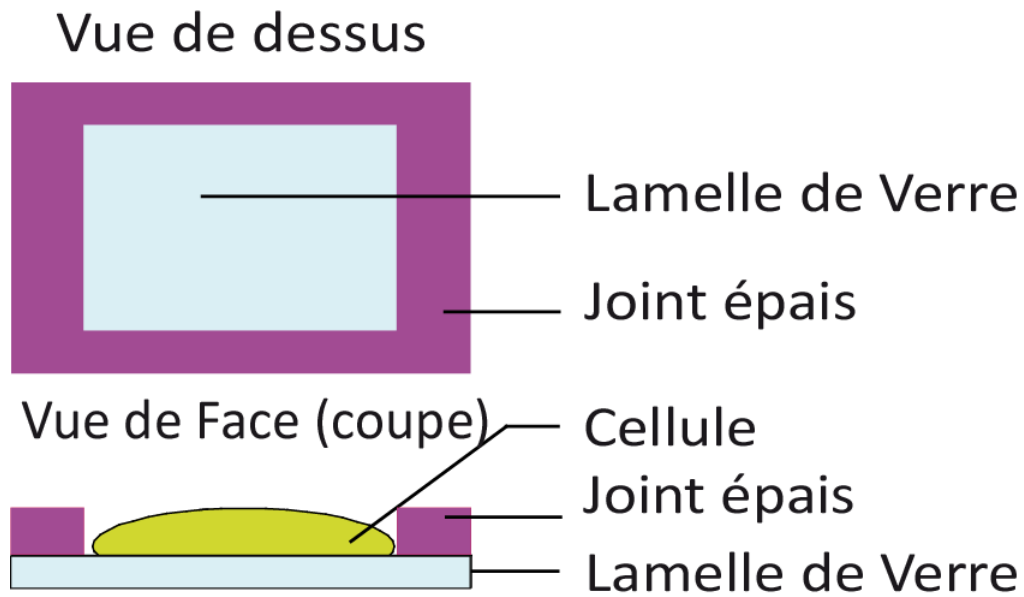


Figure 2.2: Schéma 3D de la partie échangeur du contrôle de température. Les Flèches correspondent aux orifices d'entrée et de sortie du liquide caloporteur.

## 2.2 Seconde Partie : L'enceinte de dépôt.

La seconde partie, **l'enceinte de dépôt** (fig.2.3), est simplement composée d'une lamelle de verre plus épaisse (190 $\mu$ m) mais de dimension identique (24\*40 mm). Sur cette lamelle de verre est collé un joint épais faisant office de mur périphérique étanche. C'est à l'intérieur de cette enceinte « à ciel ouvert » que l'échantillon biologique est déposé. *Le dépôt de l'échantillon sur la lamelle de verre permet de satisfaire la contrainte numéro 9 de notre cahier des charges fonctionnelles.*



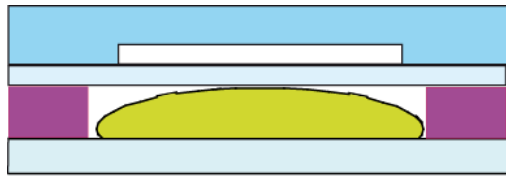
**Figure 2.3: Schéma descriptif de l'enceinte de dépôt du contrôle de température.**

Une fois l'échantillon déposé dans l'enceinte, on réunit les deux parties (échangeur + enceinte) en assemblant la partie échangeur sur l'enceinte de dépôt. Le joint faisant office de mur de protection périphérique empêche la cellule d'être écrasée. L'épaisseur du joint est facilement adaptable à la taille de l'échantillon grâce au caractère amovible de notre dispositif. *Cette dernière remarque permet de satisfaire la contrainte numéro 1 de notre cahier des charges : Adaptabilité à différentes tailles d'échantillons.*

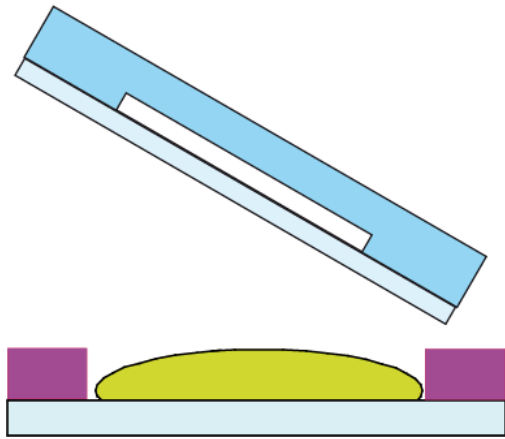
### 2.3 Assemblage des deux parties amovibles :

Une fois jointes, les deux parties indépendantes peuvent être facilement séparées (Fig.2.4). Cette architecture permet ainsi de réutiliser la partie échangeur après nettoyage.

*Je rappelle que la réutilisation du dispositif est inscrite (contrainte 4) dans notre cahier des charges fonctionnelles.*



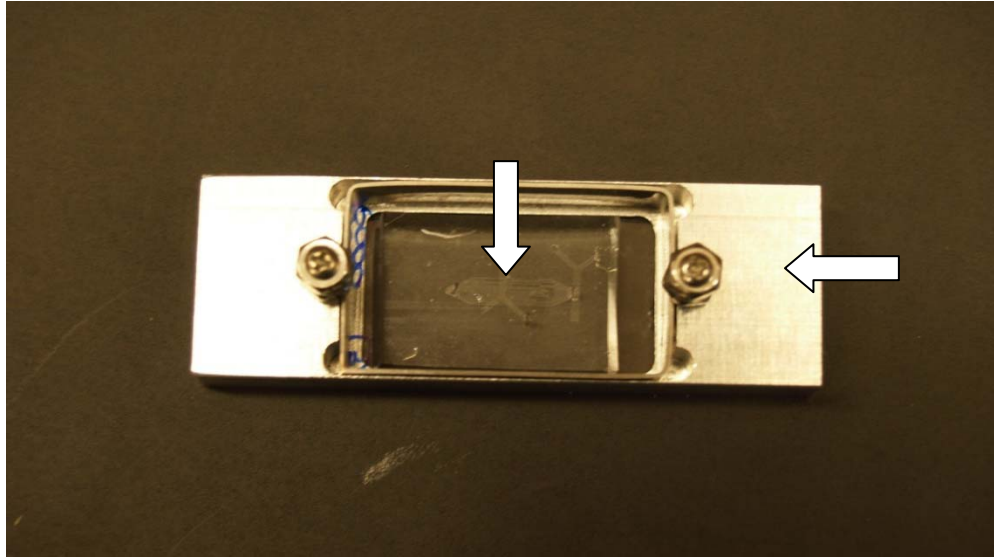
Assemblage



Disjoint

**Figure 2.4: Schéma simplifié des deux parties de l'enceinte de thermalisation. Ces deux parties sont amovibles.**

Pour maintenir en pression les deux parties jointes, celles-ci sont déposées dans un support en métal permettant également de les protéger contre d'éventuels chocs durant l'utilisation (Fig. 2.5).



**Figure 2.5: Photo du support en métal (Flèche horizontale). Il permet le maintien et la protection du dispositif de contrôle de température. Dispositif de contrôle de température transparent (Flèche verticale).**

## **2.3 Dispositif expérimental complet :**

Après s'être concentré sur le dispositif de thermalisation (échangeur + enceinte de déposition), nous allons maintenant présenter les éléments nécessaires au contrôle de la température d'un échantillon biologique. Le dispositif expérimental est composé de deux modules Peltier, d'un pousse seringue, d'un multimètre piloté par Matlab pour mesurer la température in situ, et enfin de pompes péristaltiques pour le refroidissement des modules Peltier.

### **2.3.1 Eléments indépendants.**

Pour assurer le déplacement du liquide caloporteur à travers les canaux, nous avons utilisé un **pousse seringue** programmable commercial (Fig.2.6) nous permettant de contrôler précisément des faibles débits ( $\mu\text{L/s}$ ).



Figure 2.6: Pousse seringue électronique permettant le déplacement et le contrôle volumique du liquide caloporteur à travers le dispositif. [Harvard Apparatus]

Pour mettre en température le liquide caloporteur, nous avons opté pour des **modules Peltier** (Warner Instrument). Ces modules ont une gamme de température de fonctionnement allant de 0°C à 50°C. (Fig.2.7).



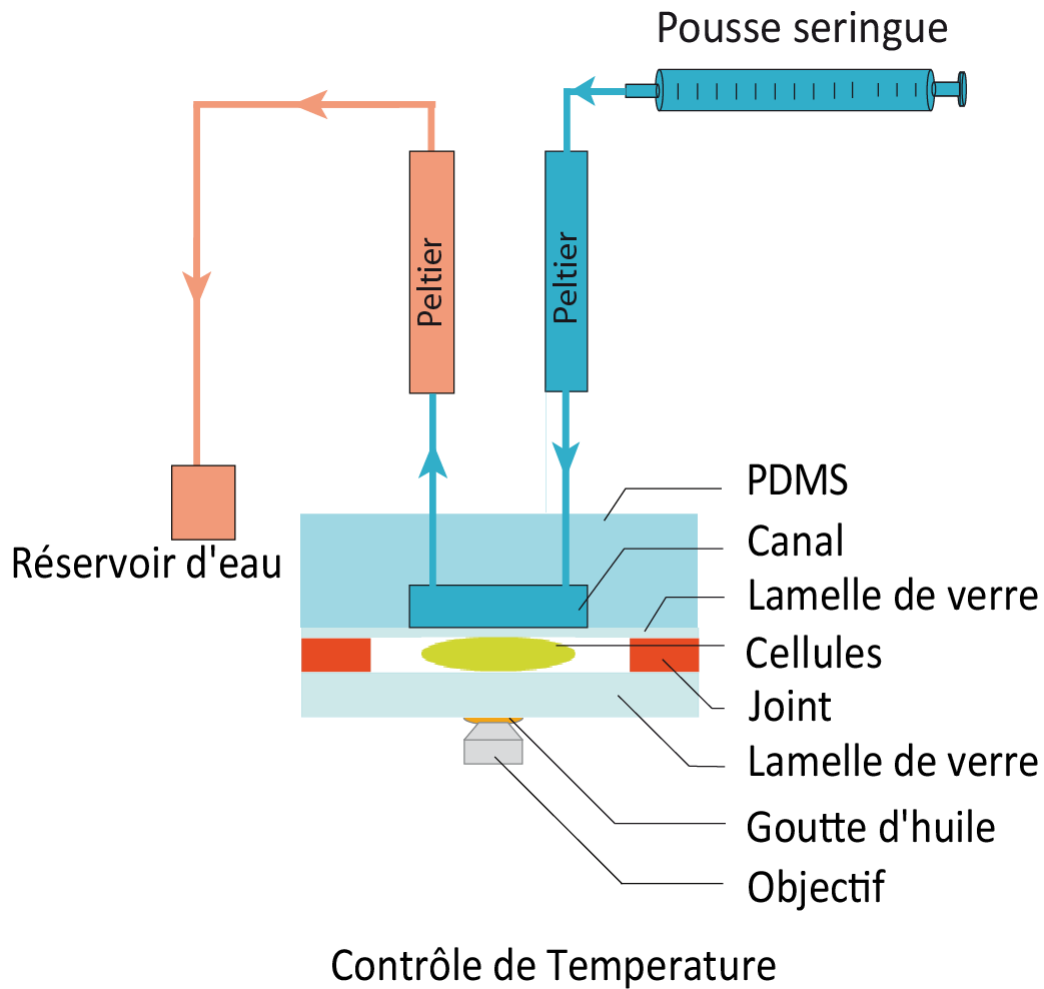
Figure 2.7: Module Peltier avec son interface de contrôle. Ces modules contrôlés en température permettent la chauffe ou le refroidissement d'un liquide caloporteur. [Warner Instrument]

### 2.3.2 Fonctionnement du dispositif expérimental :

Le fonctionnement du dispositif expérimental est réalisé grâce à l'ensemble des éléments connectés en série (Fig.2.8a).

Lorsque l'on pousse sur la seringue, le liquide traverse et se thermalise dans le module Peltier via une connectique fluidique interne au module. En sortie du premier Peltier, la température du liquide caloporteur est modifiée en fonction de la consigne imposée à ce dernier. Une seconde connectique fluidique relie le module Peltier à la partie échangeur de notre dispositif de contrôle de température. Le liquide caloporteur précédemment thermalisé pénètre ainsi dans l'échangeur. Traversant l'échangeur, le liquide caloporteur fournit ou absorbe de la chaleur au sein du dispositif. Le transfert thermique à travers la fine lamelle de verre, permet, par conduction, de changer rapidement la température des cellules du côté de l'enceinte de déposition étanche. Le liquide sort ensuite de l'échangeur pour pénétrer dans un second Peltier réglé à une température différente puis finit dans un bocal de rétention.

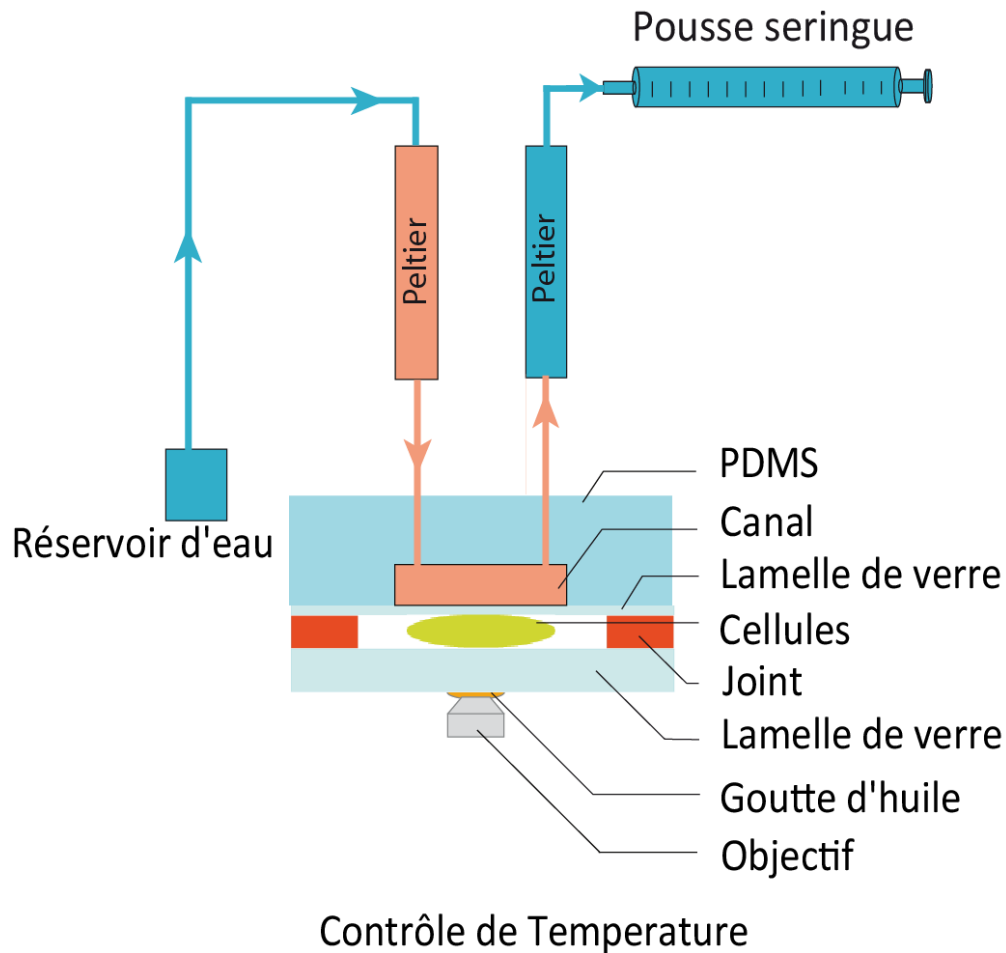




**Figure 2.8.a: En comprimant la seringue, le liquide caloporteur passe à travers le Peltier froid, dans l'échangeur, puis dans le Peltier chaud pour finir dans un bac de rétention.**

Cette disposition, deux modules Peltier en série réglés à deux températures différentes, permet en inversant le sens d'écoulement du liquide caloporteur (inverser le sens du pousse seringue) de rapidement changer la température au sein de l'échantillon pour deux températures distinctes (Fig.2.8.b).

*Je rappelle que la rapidité du changement de température est une contrainte (n°6) définie dans notre cahier des charges fonctionnelles.*



**Figure 2.8.b:** En tirant sur la seringue, le liquide sort du bac de rétention, est réchauffé dans le Peltier chaud, passe dans l'échangeur de chaleur, puis repasse dans le Peltier froid et vient compléter le volume de la seringue.

## 2.4 Fabrication du dispositif :

### 2.4.1 Un peu d'histoire :

Le fort investissement financier des années 60 dans l'électronique a permis l'avènement de l'industrie microélectronique. Transistors et autres microprocesseurs en sont les faire valoir. Les

techniques et méthodes de miniaturisation, globalement appelés techniques de micro fabrication, ont engendré dans les années 80 un nouveau domaine appelé la microfluidique. La microfluidique est une science s'intéressant aux écoulements de fluide dans des canaux artificiels à l'échelle micrométrique. Ses phénomènes et ses propriétés physiques sont aujourd'hui relativement bien connus. L'un des intérêts majeurs de la microfluidique est aujourd'hui de fournir de nouveaux outils de taille adaptée pour d'autres champs d'étude telle que la biologie cellulaire.

#### 2.4.2 Le transfert de motif : La photolithographie.

L'idée centrale de ce paragraphe est de présenter brièvement la technique qui nous a permis de réaliser des micros canaux dans le PDMS (Polymethylsiloxane). Le processus jouant un rôle central dans la technique de micro fabrication utilisée repose sur la **photolithographie**. La photolithographie est un processus permettant de transférer par illumination d'une résine photosensible un motif préalablement dessiné (L-Edit : logiciel de dessin). Pour réaliser une structure en trois dimensions sur un moule, on éclaire à travers un masque la résine (Fig. 2.9). Au niveau de la partie illuminée, la résine cristallise (résines dite négatives). La partie non illuminée est, quant à elle, soluble. Après illumination de la résine, il s'agit ainsi d'enlever la partie soluble de la partie cristallisée pour obtenir un motif en trois dimensions.

Cette méthode d'illumination d'une résine photosensible en passant par des motifs dessinés sur un masque permet de fabriquer des moules avec une résolution de l'ordre du micron.

*En toute rigueur, l'ensemble des étapes suivantes doivent être réalisées en salle blanche car les particules en suspensions, telle que les poussières, sont tout à fait à proscrire pour ce type d'opération.*

### 2.4.3 Première étape : Réalisation d'un masque en quartz.

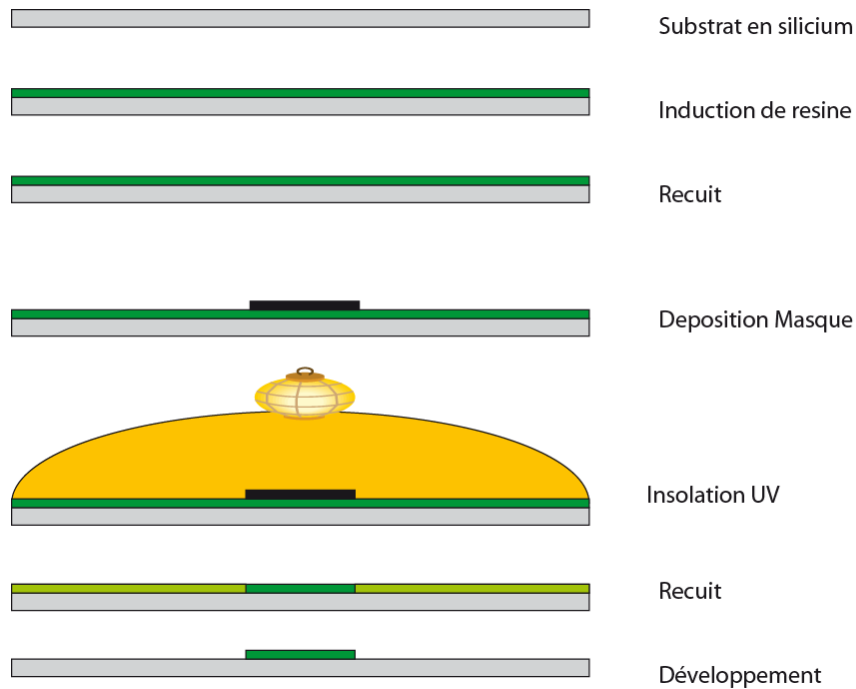
Pour ce faire, la première étape consiste à dessiner les motifs désirés. Le logiciel utilisé est L-Edit. Une fois le dossier informatique réalisé, nous avons fait fabriquer, par un industriel spécialisé, un masque en quartz avec différents motifs.

### 2.4.4 Seconde étape : Fabrication d'un moule réutilisable.

Nous utilisons en tant que substrat une galette de silicium de 10 cm de diamètre. Nous déposons une épaisseur contrôlée de résine photosensible grâce à une machine appelée tournette. Elle réalise une rotation contrôlée du substrat pour éjecter par force centrifuge la résine en surplus. Pour une résine donnée, un régime de rotation correspond une épaisseur de dépôt.

Après une étape de recuit servant à évaporer les solvants au sein de la résine, nous déposons, sur la résine, un masque avec les motifs souhaités.

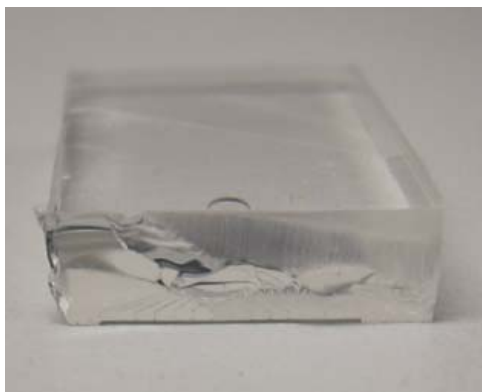
L'étape suivante consiste à insoler aux ultra-violets la résine à travers le masque. Pour les résines dites négatives comme celles utilisées, la partie exposée va se dissoudre dans un solvant tandis que la partie non insolée demeure complètement polymérisée. L'étape finale de développement permet de séparer la partie soluble du motif désiré. Le Résultat final est donc un moule en 3 dimensions avec des micros canaux dont la géométrie est parfaitement contrôlée grâce aux résines utilisées (Fig.2.9).



**Figure 2.9: Schéma explicatif de fabrication d'un moule via la méthode de Photolithographie.**

#### 2.4.5 Troisième Etape : Moulage PDMS

Une fois le moule réalisé, nous effectuons l'étape de moulage du PDMS (Polydiméthylsiloxane) sur ce dernier. Le PDMS utilisé est un élastomère silicone liquide transparent. L'ajout de réticulant (vulcanisation : ponts entre macromolécules) dans les bonnes concentrations, lui donne après cuisson, les propriétés mécaniques d'un élastomère solide (Fig.2.10).



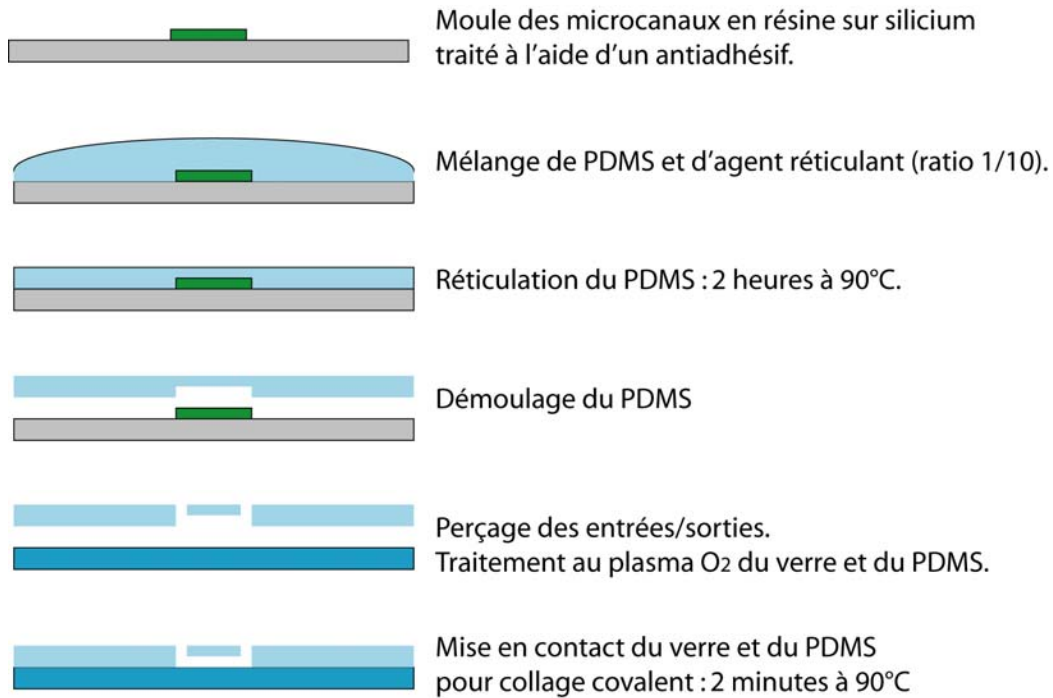
**Figure 2.10: Morceau de PDMS solide après vulcanisation.**

Imperméable aux liquides, sa structure reste néanmoins perméable aux gaz. Ses bonnes propriétés mécaniques, son aptitude à être moulé, son coût relativement faible, sa transparence et sa bonne biocompatibilité font de cet élastomère en silicone un candidat privilégié pour la réalisation de micro technologie dédiée aux champs d'étude biologique.

*Bien entendu, les nombreuses propriétés physico-chimiques et applications du PDMS ne sont pas détaillées ici. Le PDMS a fait l'objet et continue de faire l'objet de nombreuses recherches dans d'autres champs d'application notamment pour ses propriétés électriques [11].*

Lors du moulage, le PDMS liquide recouvre parfaitement les motifs structurés sur le moule. Après cuisson, le motif inverse est donc transféré sur le PDMS solide. Ce motif constitue ainsi un réseau de micro-canaux. Après démoulage, on perce verticalement une entrée et une sortie aux extrémités des canaux microfluidiques. (Fig.2.11).

La dernière étape consiste à fermer notre canal en canalisation (section fermée).



**Figure 2.11: Schéma simplifié du processus de fabrication d'un dispositif PDMS/Verre.**

#### 2.4.6 Quatrième étape : Collage Plasma

Pour fermer notre canal en Polydiméthylsiloxane (PDMS) en conduit, nous réalisons une soudure avec une lamelle de verre.

Le traitement des surfaces au plasma à oxygène permet globalement d'arracher des électrons aux premières couches atomiques des surfaces exposées. L'état d'activation électronique des surfaces persistant quelques temps après exposition, permet, lors de la mise en contact rapide des deux parties, de réaliser des liaisons électroniques covalentes. L'étanchéité entre le PDMS et la lamelle de verre est donc bien assurée. Cette canalisation étanche ainsi fabriquée permet l'écoulement d'un liquide caloporteur au sein du dispositif.

Cet assemblage représente la partie échangeur de chaleur de notre système de contrôle de température. (Fig.2.12).



**Figure 2.12: Vue en coupe de la partie échangeur du contrôle de température.**

#### **2.4.7 Contrôle Qualité :**

Dans le but de pouvoir reproduire le dispositif, et pour vérifier la bonne fabrication du moule, une méthode de contrôle est mise en place. Ce contrôle est réalisé à l'aide d'un profilomètre. Il mesure la micro géométrie du motif réalisé en surface de la galette de silicium.

#### **2.5 Résumé des points importants - Conclusion :**

Trois points importants ont été énoncés dans ce chapitre.

**L'architecture du dispositif** est le premier point. Le choix architectural du dispositif en deux parties amovibles confère au système son caractère novateur et publiable. Il permet de répondre aux contraintes 1, 4, 9, respectivement : l'adaptabilité géométrique, la possibilité de réutiliser la partie échangeur, le fait de pouvoir déposer un échantillon au sein du dispositif.



**Le couplage des éléments du dispositif expérimental complet** et leurs fonctions est le second point présenté dans ce chapitre. Le changement de température s'effectue en inversant le sens du liquide caloporteur. Ce liquide est thermalisé en permanence par deux modules Peltier à deux températures différentes. Cet arbitrage réalisé sur le couplage des éléments a pour but de répondre à la contrainte numéro 6 exigeant un changement rapide de la température.

**La Méthode de fabrication du dispositif microfluidique** est le troisième point de ce chapitre. Celle-ci est dérivée des méthodes de fabrication de microélectronique. La photolithographie est le processus central de cette méthode. Elle permet le transfert et la fabrication de motif en trois dimensions par illumination et solvataion d'une résine photosensibles. Le moule ainsi réalisé sera le support permanent et réutilisable de nombreux dispositifs fabriqués en PDMS. La facilité de fabrication de ce type de dispositif, répond au critère numéro 5 du cahier des charges fonctionnelles.

Définissant une architecture fixe, reproductible et adaptable à différents échantillons biologiques, nous avons également réalisé, sur cette base, des mesures expérimentales des phénomènes énergétiques au sein du dispositif.

## CHAPITRE 3 :

# Etude expérimentale : Caractérisation Thermique et Validation Biologique.

### 3.1 Buts et Motivations.

Quantifier les performances thermiques et temporelles, en mesurant celles-ci, pour caractériser notre système, voilà le premier volet de cette étude expérimentale.

Le second temps de cette étude expérimentale vient valider biologiquement le service énergétique rendu par le système. C'est donc par des observations biologiques que nous avons définitivement validé son bon fonctionnement sous le prisme de « l'exigence biologique ». De surcroît, asseyant un peu plus l'utilité future de ce système, nous avons, lors de nos présentations, suscité l'intérêt de nouveaux utilisateurs. Ceci s'est traduit par de nouvelles collaborations venant ainsi étoffer la nature des échantillons biologiques présentés.

### 3.2 Caractérisation Thermique du dispositif de contrôle de température.

L'objectif de cette caractérisation thermique du dispositif de contrôle de température est, tout d'abord, de réaliser des mesures expérimentales des **performances thermiques et temporelles**. Pour ce faire deux configurations distinctes ont été définies :

*Configuration 1* : Sans contact entre la lentille du microscope et le dispositif.

*Configuration 2* : Avec contact entre la Lentille du microscope et le dispositif (lentille dite à immersion).

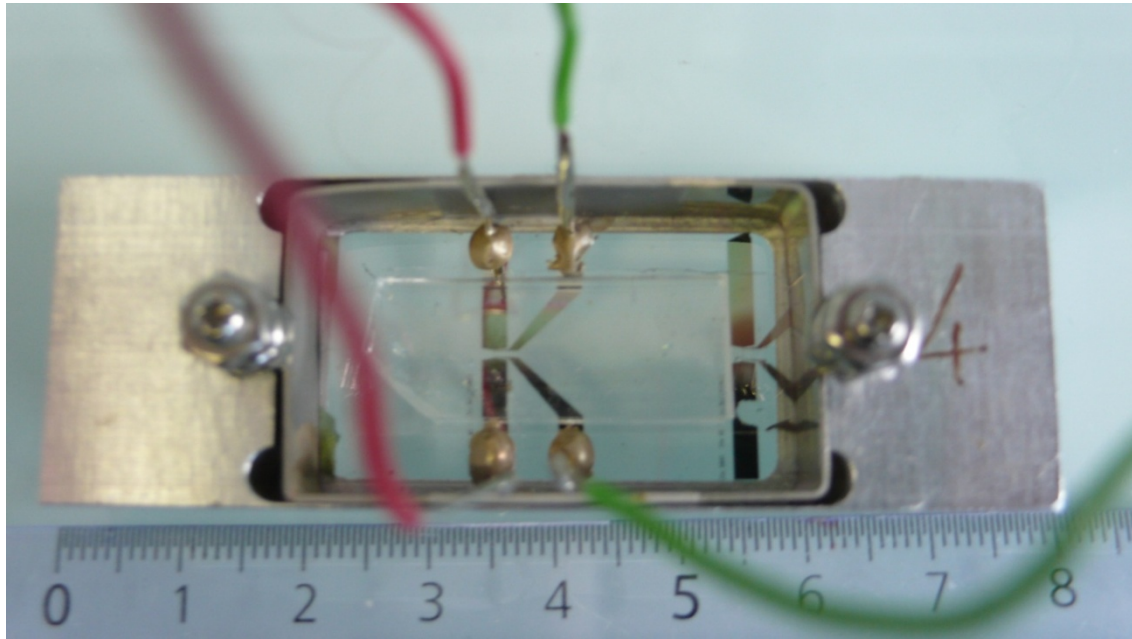
Nous avons utilisé ces deux types d'objectifs dont le grossissement et la distance de travail (distance maximale à laquelle un objectif peut réaliser la mise au point) différent pour répondre aux différentes caractéristiques des échantillons observés.

### 3.2.1 Solution technique et technologique pour la mesure de la température :

Le service final rendu par ce dispositif est le contrôle rapide de la température d'un échantillon biologique. L'objet de la mesure est donc la température de l'échantillon biologique. Pour ce faire, nous avons opté pour une mesure de température où le contact direct avec l'échantillon biologique est réalisable. Compte tenu des moyens économiques et technologiques à notre disposition nous avons opté pour un dépôt de **couches minces métalliques** en surface de l'enceinte de thermalisation (Fig.3.1). Cette méthode de mesure est particulièrement judicieuse pour notre application car l'épaisseur du dépôt des couches minces métalliques est de 60 nm au total. La précision de la température est de l'ordre du dixième de degré et, de plus, due à sa faible épaisseur, la dynamique de mesure de température (temps de réponse) est inférieure à la dynamique de changement de température de notre système.

Ce dépôt de couches minces métalliques est communément appelé résistance dépendante en température (RTD). La résistance électrique de ces pistes métalliques augmente avec la température. L'utilisation d'un dépôt de platine est favorable dans notre application car la variation de la résistance électrique du platine est linéaire dans la gamme de température mesurée (de 0°C à 50°C).

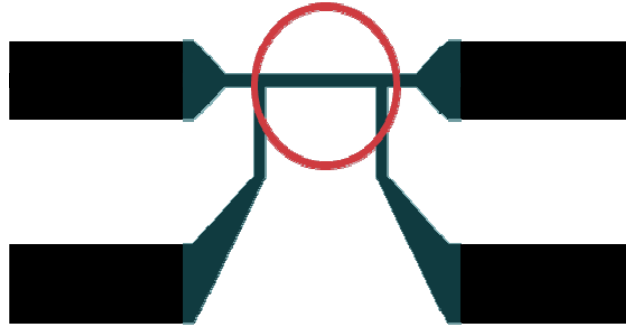
La réalisation d'un dépôt de platine n'est pas directe sur du verre. Les propriétés d'adhésions du platine sur du verre étant mauvaise, il faut, dans un premier temps, réaliser un « dépôt d'accroche » en titane de 5 nanomètres, puis un dépôt de platine de 50 nanomètres et enfin un dépôt de Chrome de 5 nanomètres. Cette dernière couche métallique est également déposée sur le motif de platine pour ses propriétés d'adhésion avec un dépôt de diélectrique qui isole électriquement et chimiquement la piste de l'environnement extérieur.



**Figure 3.1 : Motif de dépôt de platine sur lamelle de verre visible par transparence à travers l'échangeur en PDMS (graduation en cm).**

### **3.2.2 Motif de dépôt métallique et méthode de mesure 4 points :**

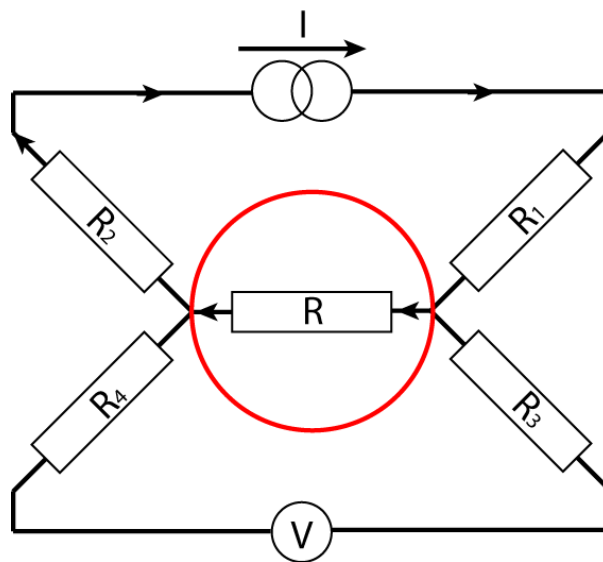
Pour mesurer la température d'un échantillon biologique de l'ordre du micromètre nous avons utilisé une méthode permettant des mesures locales et fiables de la température. Cette méthode est appelée **mesure de température quatre points**. Pour ce faire un motif de piste spécifique doit être réalisé (Fig.3.2).



**Figure 3.2: Motif d'une piste métallique spécifique pour réaliser une mesure 4 points. Le cercle rouge désigne la partie du motif où la résistance est mesurée.**

Cette méthode de mesure de résistance nécessite un générateur de courant et un voltmètre.

Conformément au schéma électrique ci-dessous (Fig.3.3), on injecte un courant constant et de très faible intensité (pour éviter l'échauffement de la résistance  $R$ ) dans une première boucle du circuit. Le voltmètre situé aux extrémités de  $R$  est considéré comme une résistance infinie (courant nul dans la boucle du voltmètre). La résistance  $R$  du platine évoluant de façon linéaire avec la variation de température (Fig.3.4), on mesure ainsi la variation de tension aux bornes de  $R$ .



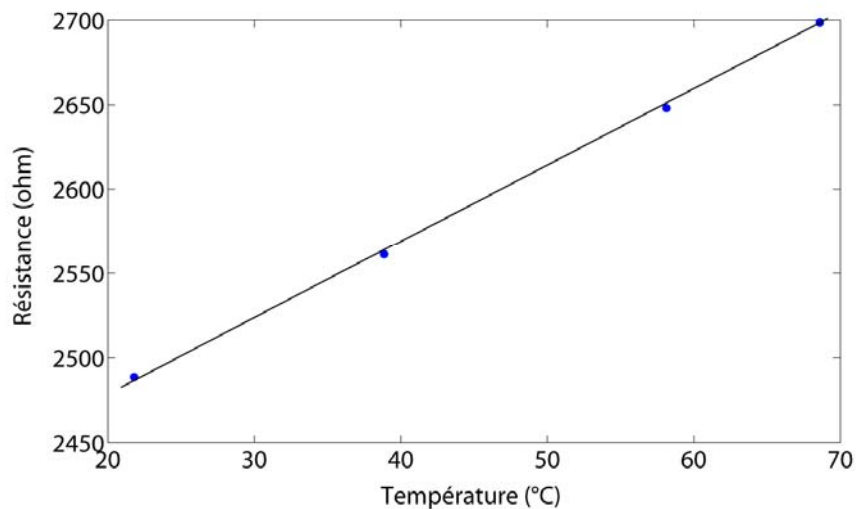
**Figure 3.3: Schéma électrique équivalent à une mesure de température 4 points.**

En appliquant la loi des mailles on définit l'équation (3.1):

$$U = R_3 \times 0 + R \times I + R_4 \times 0 \quad (3.1)$$

$$U = R \times I$$

Connaissant la Tension  $U$  et le courant  $I$  nous pouvons calculer  $R$  sans tenir compte des résistances  $R_3$  et  $R_4$ . Après l'étalonnage de la piste de platine avec une Pt 100 (Thermomètre à résistance de platine), nous pouvons finalement déduire la température dans la zone considérée.

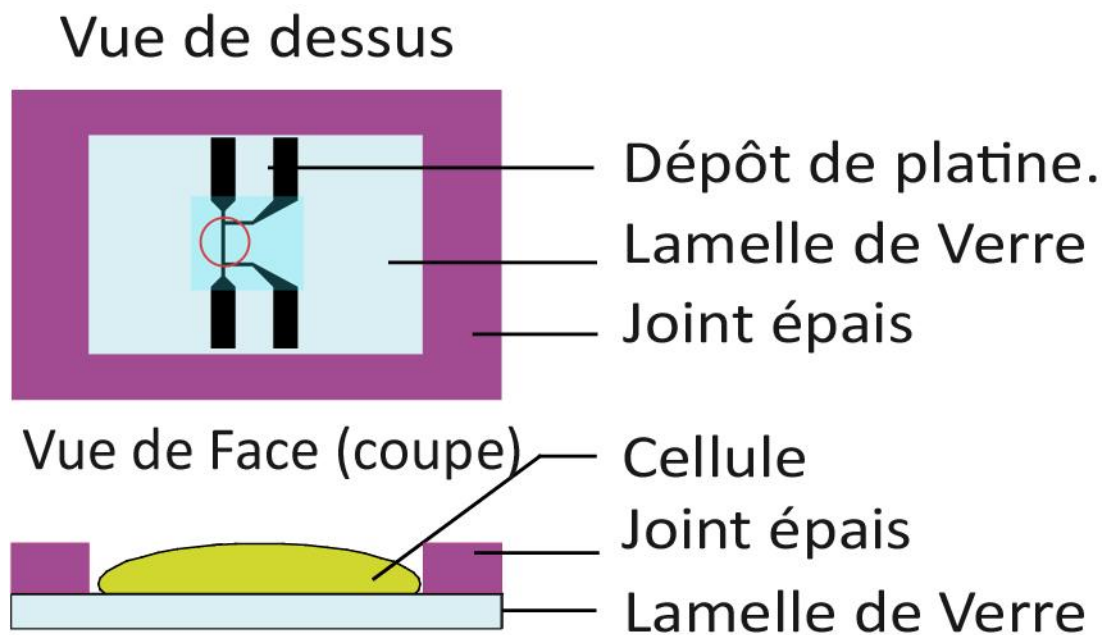


**Figure 3.4: Exemple de corrélation de la résistance métallique (Cr/Pt/Ti) en fonction de la température.**

### 3.2.3 Etalonnage des pistes métalliques et dispositif expérimental complet.

Après fabrication des dépôts de platine sur la lamelle de verre officiant comme enceinte de déposition (Fig. 3.5), chaque piste de platine est étalonnée grâce à une sonde de température étalon. Bien que les méthodes et techniques de dépôt mince de métaux soient précises, il faut néanmoins caractériser et calibrer chaque nouvelle électrode pour avoir une mesure de température suffisamment précise (0.1°C).

Pour réaliser et enregistrer cette calibration nous avons donc, en plus d'une source de courant et d'une mesure de tension, utilisé une Pt 100 pour une mesure directe de la température. L'ensemble de cette chaîne d'acquisition a été synchronisé grâce à l'utilisation du logiciel Matlab. Une fois le programme réalisé, nous avons mesuré pour chaque électrode la résistance tout en réalisant une mesure parallèle de température via cette sonde de platine étalon certifiée précise au centième de degré. Bien entendu l'ensemble de ces mesures ont été réalisées dans des enceintes fermées, pour différents niveaux de température, et avec des temps de mesure suffisamment longs pour considérer le régime comme permanent.



**Figure 3.5 : En noir, dépôt de platine sur la lamelle de verre permettant la mesure de température en dessous de l'échantillon biologique.**

### 3.2.4 Résultats : Dépendance du débit sur la température du dispositif.

Comme nous pouvons le prévoir par le calcul, le débit traversant notre système de contrôle de température influence directement la quantité de chaleur échangeable au sein de notre dispositif. Par conséquent le niveau de température mesuré est à son tour influencé.

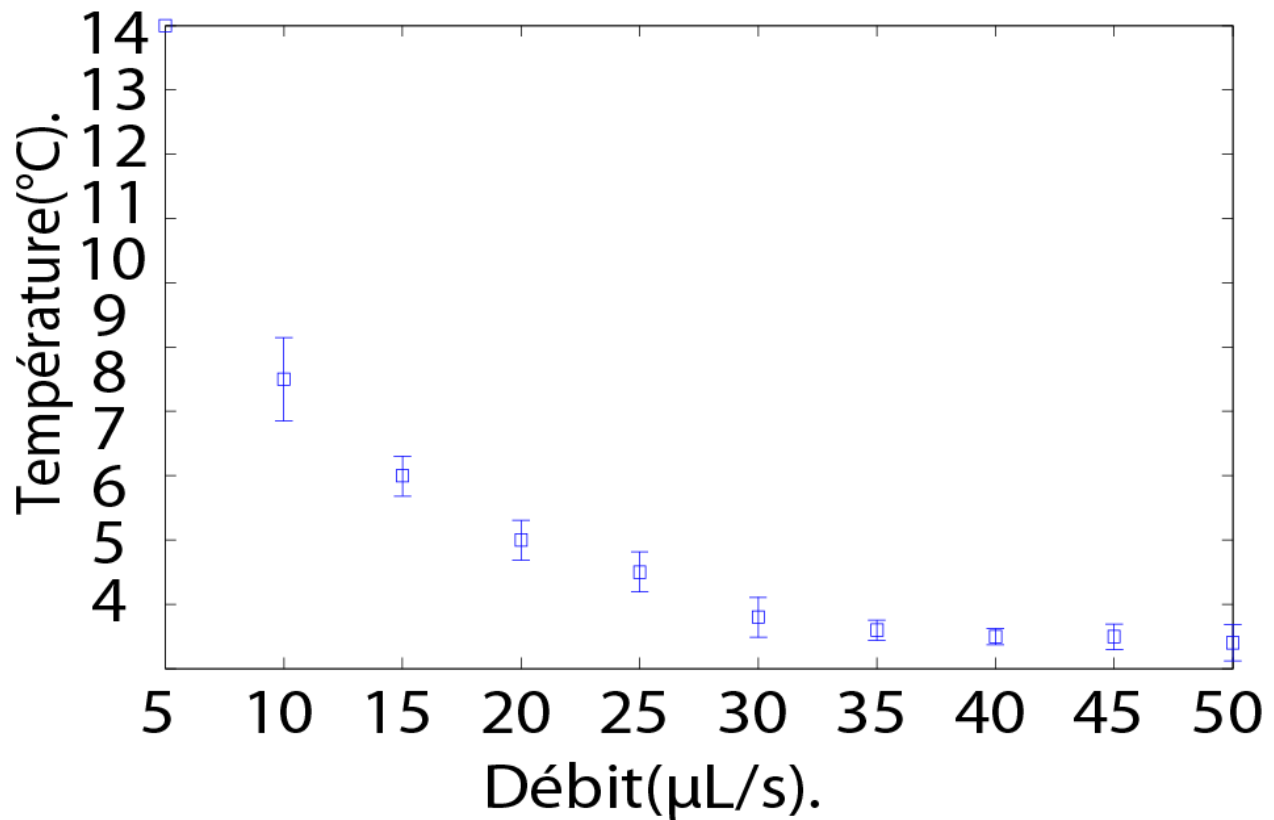
#### **Protocole expérimental A (Matériels et Méthodes) :**

Pour réaliser cette expérience nous avons fixé la température de consigne à 0°C sur notre Module Peltier. Cette première courbe d'évolution de la température en fonction du débit de liquide caloporteur a été réalisée sans objectif à immersion.

#### **Résultat expérimental A et Discussions:**

Nous vérifions bien la forte influence du débit sur la température du dispositif. Au-delà de 30 $\mu$ L/s, nous observons un plateau de stabilisation de la température. Pour des débits supérieurs à 35 $\mu$ L/s les températures atteintes sont de l'ordre de 3 degrés Celsius (Fig.3.6).





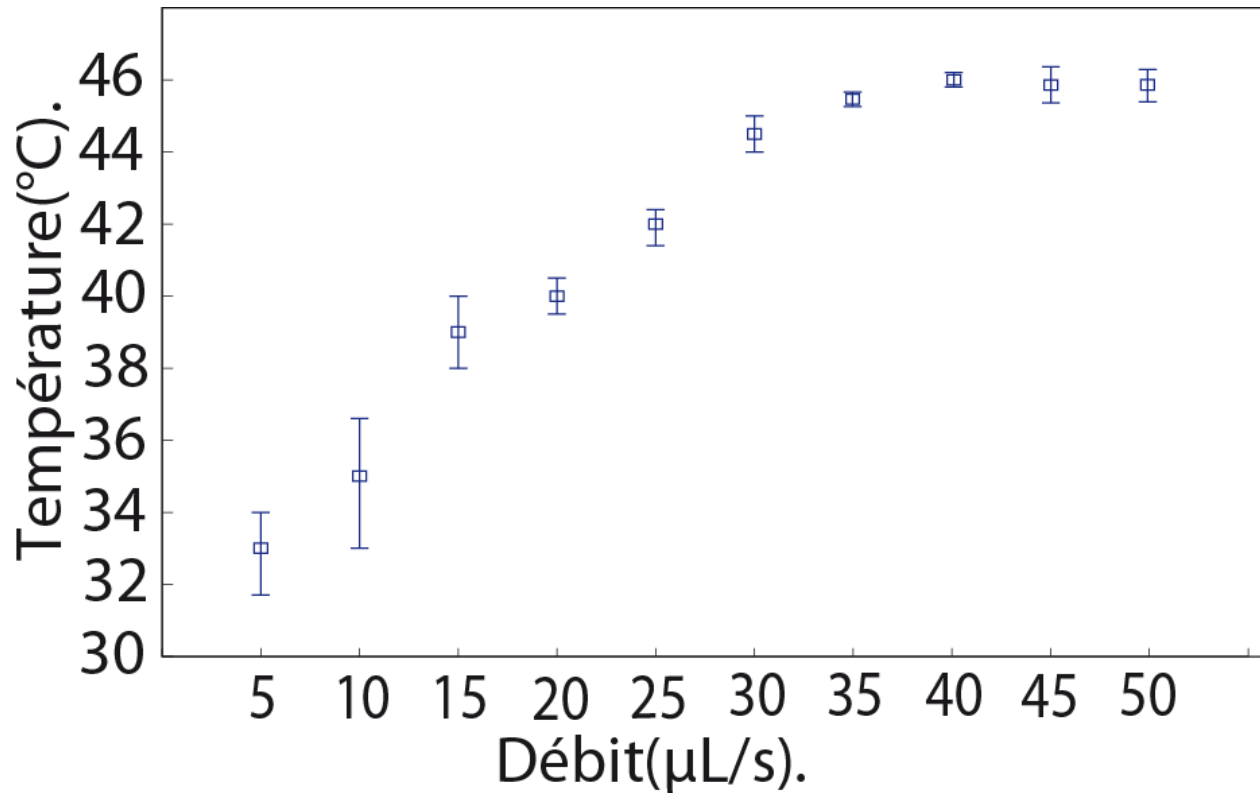
**Figure 3.6: Tracé de la température du dispositif en fonction du débit traversant le Module Peltier pour une température de consigne à 0°C.**

### **Protocole expérimental B (Matériels et Méthodes) :**

Pour réaliser cette seconde expérience nous avons fixé la température de consigne à 50°C sur notre Module Peltier. Cette seconde courbe d'évolution de la température en fonction du débit de liquide caloporteur a été réalisée sans objectif à immersion.

### **Résultat expérimental B et Discussions:**

Nous vérifions également la forte influence du débit sur la température du dispositif. Au-delà de trente microlitres par seconde, nous observons le même phénomène de plateau de stabilisation de la température. Pour des débits supérieurs à 35μL/s les températures atteintes sont de l'ordre de 46 degrés Celsius (Fig.3.7).



**Figure 3.7: Tracé de la température du dispositif en fonction du débit traversant le Module Peltier pour une température de consigne à 50°C.**

Nous avons également réalisé les deux mêmes études avec un objectif à immersion en contact avec notre dispositif. Outre les niveaux de température atteints, le phénomène de plateau de température est atteint pour les mêmes valeurs de débit. Conséquence de ce résultat expérimental, nous avons utilisé pour l'ensemble de nos expériences suivantes un débit constant de 35μL/s quelle que soit la température de consigne.

### 3.2.5 Résultats : Décalage entre la consigne et la mesure.

Comme nous l'avons observé dans les résultats précédent et tel que les calculs le prédisent en tendance (Cf : chap4), il y a un décalage de température entre la consigne du module peltier et la température mesurée au sein de l'échantillon.

L'objectif de cette expérience est donc de quantifier le décalage sur l'ensemble de la gamme de température étudiée. Cette mesure a été réalisée dans deux configurations, avec et sans objectif à immersion, pour caractériser le comportement du dispositif dans les deux applications.

#### **Protocole expérimental C (Matériels et Méthodes) :**

Lors de cette expérience, la température ambiante est de 23°C. Le débit de liquide caloporteur est fixé à 35µL/s. Le temps d'attente avant la mesure sur chaque point est d'une minute. La courbe bleue est réalisée sans objectif à immersion. La courbe marron est réalisée avec objectif à immersion (après mise en température ambiante de celui-ci) en contact avec le dispositif (Fig.3.8).

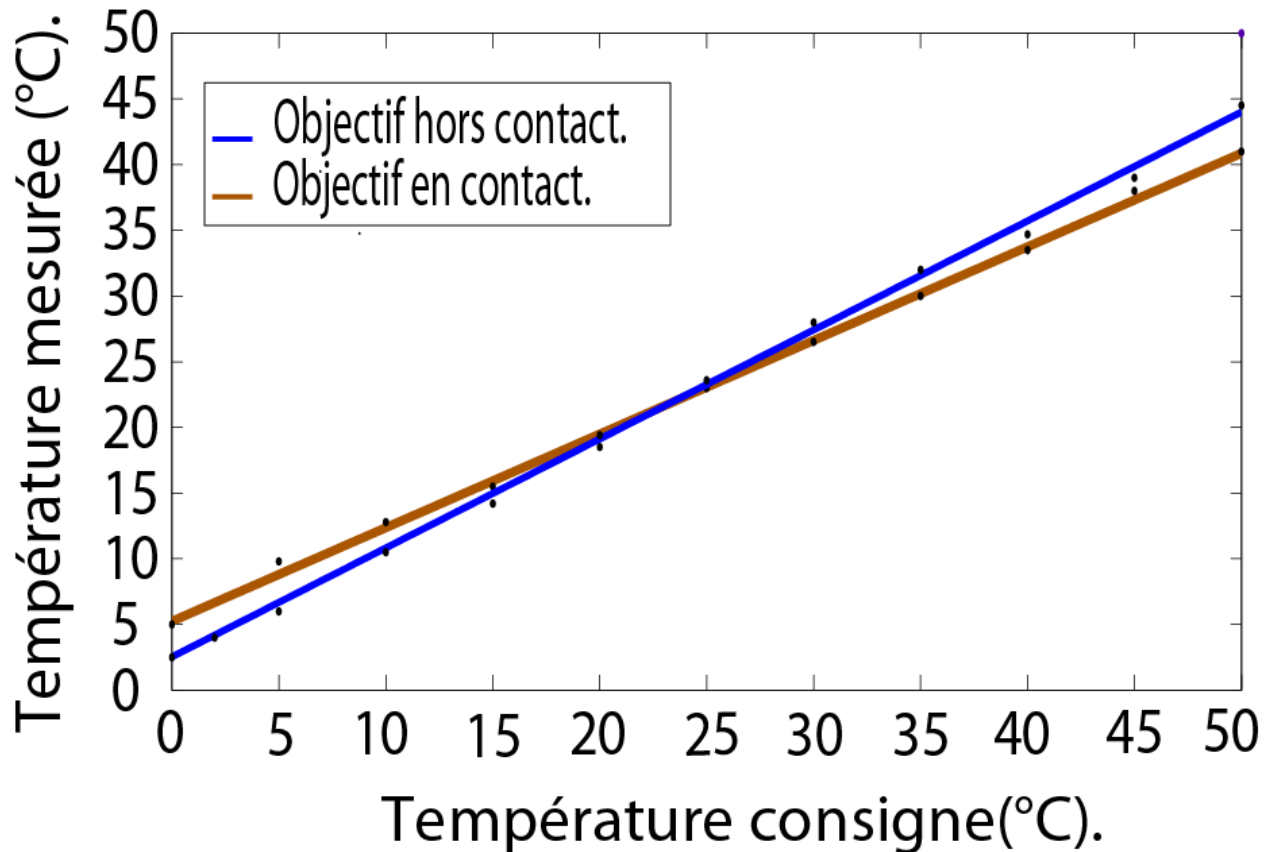
#### **Résultat expérimental C et Discussions:**

Dans les deux configurations, pour une consigne de température égale à la température ambiante soit 23°C, il n'y a pas de décalage de la température au sein du dispositif.

Au niveau des deux extremums de température l'influence des pertes de chaleur est plus importante qu'au niveau des températures intermédiaires.

Dans les deux configurations nous observons donc un décalage influencé par l'écart de la consigne vis-à-vis de la température ambiante. Le coefficient directeur est différent pour chaque configuration respectivement avec et sans objectif en contact.

En comparant les deux configurations on visualise bien le « coût » thermique de l'objectif sur le niveau des températures (2 à 3°C). Néanmoins cette influence est inférieure aux pertes liées à l'environnement (3 à 5°C).



**Figure 3.8 : Correspondance entre température consigne Peltier et température mesurée au sein du dispositif. En bleu, l'objectif est hors contact. En marron, l'objectif est en contact avec le dispositif.**

En conclusion de cette deuxième caractérisation thermique sur les écarts entre consigne et mesure interne au sein du dispositif, nous notons deux tendances :

- L'écart de température entre la consigne et la mesure évolue de façon linéaire à l'écart avec la température ambiante pour les deux configurations.

- Cet écart (coefficient directeur) augmente avec la mise en contact d'un objectif. Celui-ci se comportant comme un consommateur important d'énergie.

Néanmoins, les résultats de ces expériences nous permettent de valider dans les deux configurations, le critère numéro 8 de notre cahier des charges. « Fonctionnement dans une gamme de température physiologiquement pertinente ».

### 3.2.6 Dynamique de changement de température au sein du dispositif.

Nous avons précédemment caractérisé les débits nécessaires pour atteindre les performances maximales en température au sein du dispositif. Nous avons également mesuré les pertes de température entre consigne et mesure et, ce, pour deux configurations avec et sans objectif.

Nous allons maintenant nous concentrer sur l'un des aspects dynamiques du système. Nous allons mesurer le délai minimal nécessaire pour changer de température dans la gamme complète de 5°C à 45°C.

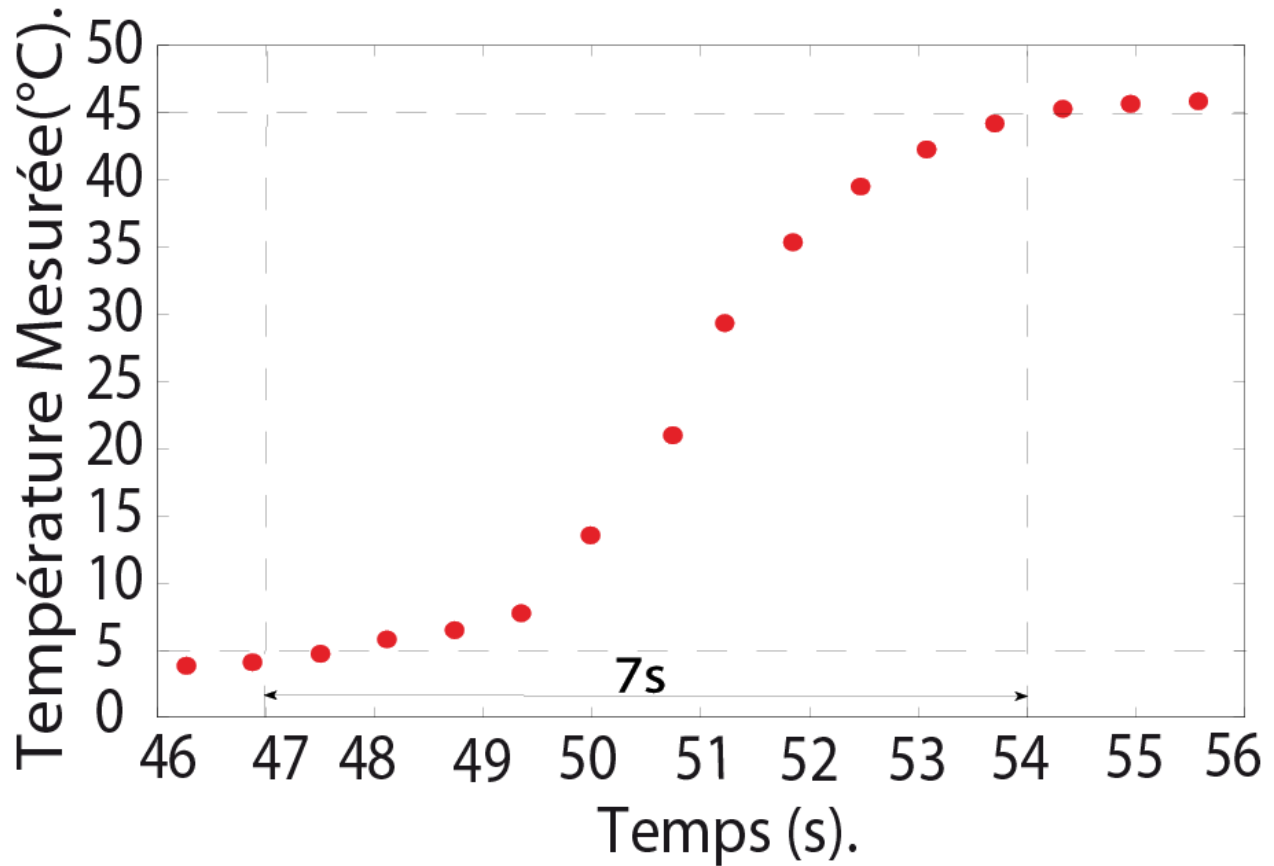
#### **Protocole expérimental D (Matériels et Méthodes) :**

Lors de cette expérience, la température ambiante est de 25°C. Le débit de liquide caloporteur est fixé à 35µL/s. Le premier dispositif peltier a pour consigne 50°C. Le second dispositif Peltier a pour consigne 0°C. Le changement brutal de température s'effectue en inversant le sens du liquide caloporteur via un pousse seringue électronique. Cette mesure est effectuée sans objectif à immersion.

#### **Résultat expérimental D et Discussions :**

Dans le cas des extremums de température, le délai maximal pour passer de 5°C à 45°C est de 7 secondes. La température du liquide étant déjà thermalisée au sein de deux différents modules

Peltier nous nous affranchissons de temps de régulation des dispositifs. Le chemin fluide entre Peltier et puce étant très court et le débit suffisamment grand, le changement de température est quasiment instantané lors de l'inversion du sens du pousse seringue (Fig.3.9).



**Figure 3.9: Evolution de la température en fonction du temps. Objectif hors contact: Le délai nécessaire pour passer de 5°C à 45°C est de 7 secondes.**

### 3.2.7 Changement périodique de température au sein du dispositif :

La dernière expérience réalisée pour caractériser l'aspect dynamique de notre dispositif de contrôle de température est une variation périodique de la température.

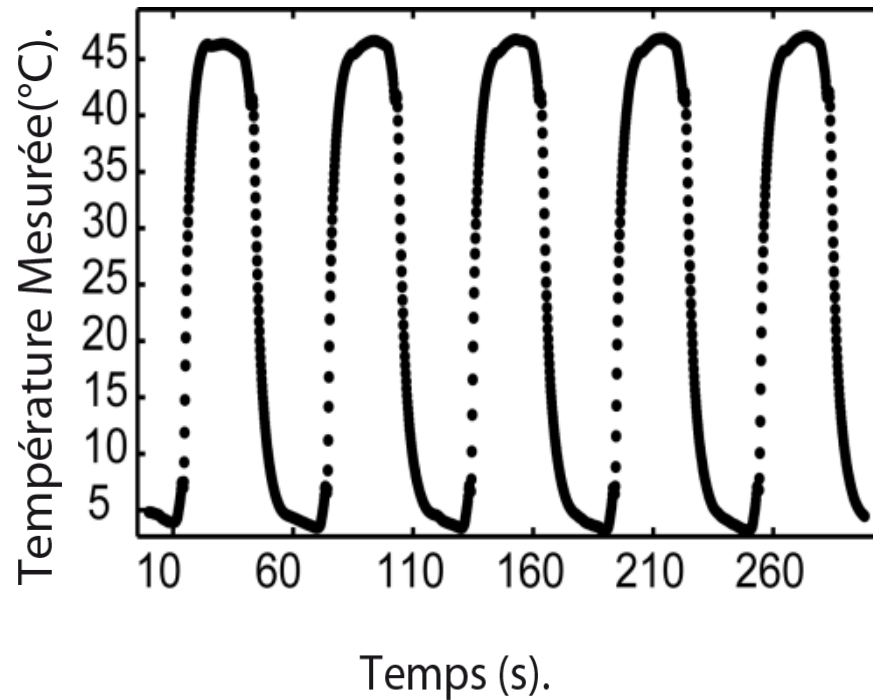
#### **Protocole expérimental E (Matériels et Méthodes):**

Lors de cette expérience, la température ambiante est de 20°C. Le débit de liquide caloporteur est fixé à 35µL/s. Le premier dispositif peltier a pour consigne 50°C. Le second dispositif Peltier a pour consigne 0°C. Le changement brutal de température s'effectue en inversant périodiquement le sens du liquide caloporteur via un pousse seringue électromécanique. La fréquence de changement de température dirigée par le pousse seringue est de 30 secondes. Cette expérience est réalisée sans objectif à immersion.

#### **Résultat expérimental E et Discussions :**

Nous observons sur la figure 3.10 que la durée d'une période n'excède pas une minute. Les extremums de température atteints sont toujours de 5°C et 45°C. Pour cette fréquence de changement de température, nous ne sommes pas limités par l'aspect capacitif du système (Filtre passe bande). La gamme de température reste donc inchangée.

De plus la rapidité du changement de température demeure constante. Cette dernière courbe démontre ainsi deux aspects fondamentaux de la robustesse de notre contrôle de température.



**Figure 3.10 : Courbe périodique de changement de température mesurée au sein du dispositif.**

### **Conclusion :**

Par cette dernière courbe expérimentale nous fournissons des éléments supplémentaires venant caractériser notre système de contrôle de température en fonctionnement périodique.

Cette courbe de variation périodique de la température nous permet ainsi de satisfaire le critère numéro 15 de notre cahier des charges fonctionnelles. « **Contrainte 15** : Pouvoir réaliser des changements périodiques de la température robuste dans la gamme précédemment définie ».

### **3.3 Conclusion sur la caractérisation thermique du Dispositif :**

Grâce aux techniques de miniaturisation disponibles et réalisables au sein du laboratoire de microfluidique du Professeur Yong CHEN à l'Ecole Normale Supérieure, nous avons intégré un capteur de température précis pour conduire l'ensemble de nos expériences de caractérisations



thermiques. Nous avons ainsi, sous plusieurs aspects (gamme de température, délai de changement, écart à la consigne) caractérisé les performances thermiques de notre dispositif et apporté des éléments de réglages aux futurs utilisateurs.

Bien entendu lors d'utilisation courante du dispositif, pour satisfaire la contrainte numéro 5 de facilité de fabrication, le capteur de température ne sera pas intégré.

Le reste du second volet de résultats expérimentaux a donc été réalisé sans capteur intégré de température au sein de notre dispositif.

### 3.4 Etude Expérimentale : Validation biologique.

Dans cette deuxième partie de l'étude expérimentale, nous nous sommes attachés à démontrer par diverses expériences, sur différents organismes cellulaires, la validité biologique de notre système de contrôle de température rapide.

Qu'entendons-nous par validation biologique ?

De façon très synthétique, nous résumerons la validité biologique par « **développement normal** des échantillons au sein de notre dispositif + influence observable de la température sur l'échantillon biologique (**phénotype**) ».

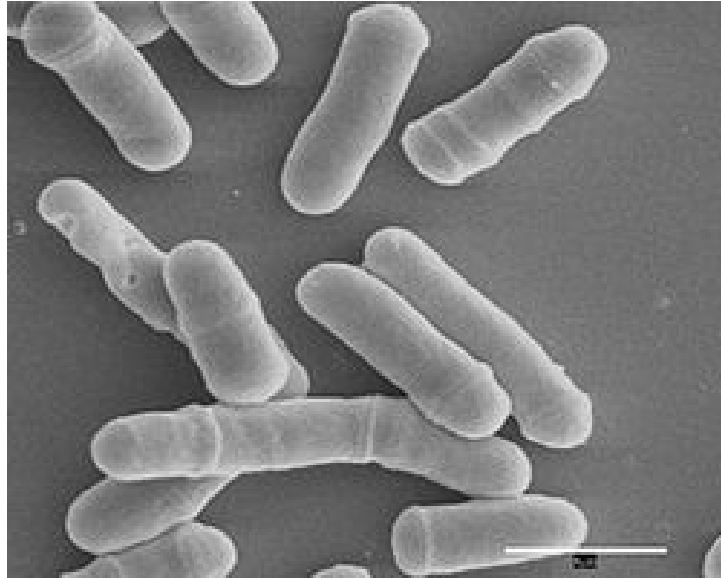
La contrainte principale (numéro 1) de notre cahier des charges est l'adaptabilité géométrique de notre dispositif aux différentes tailles d'échantillons biologiques. De plus, les contraintes numéros 13 et 14 de notre cahier des charges nous rappellent également de vérifier l'absence d'interactions physiques et biochimiques entre le substrat et ces différents organismes. L'enjeu de cette validation biologique est donc double. Il faut démontrer l'aptitude du dispositif à s'adapter à différentes sortes d'échantillons biologiques (taille, milieu de culture, etc...) sans induire d'artefacts, et, de façon concomitante, observer le caractère opérationnel d'un changement de température sur ces mêmes échantillons à tailles et milieux de cultures variables.

### 3.4.1 Rappels élémentaires de biologie cellulaire.

La cellule est le niveau élémentaire d'organisation du vivant. La cellule est un compartiment autonome dans laquelle se trouve une myriade d'éléments et de mécanismes nécessaires à la vie. Nous pouvons envisager, en première approche, le fonctionnement d'une cellule à celui d'une ville. Bien qu'ayant des finalités différentes, cette analogie entre cellule et ville n'est pas tout à fait incongrue. Tout comme la ville, la cellule définit une zone dans laquelle une forte densité d'éléments y est concentrée. Tout comme une ville, ce compartiment est influencé et influence son environnement extérieur. Tout comme le centre historique d'une ville, la majorité des cellules (eucaryote) ont un noyau où sont localisés les chromosomes abritant l'ADN, patrimoine « historique » et stable de la vie. Tout comme une ville, la cellule a ses propres centrales d'énergie, que sont les mitochondries ou encore les chloroplastes. Tout comme dans une ville, la cellule a plusieurs réseaux de transports nécessaires à son activité telle que les microtubules l'illustrent.

### 3.4.2 Contrôle de la dynamique des microtubules :

L'organisme modèle que nous avons utilisé pour réaliser une première validation biologique est nommé *Schizosaccharomyces pombe*. Cet organisme unicellulaire eucaryote est une levure en forme de bâtonnet de 7 à 14  $\mu\text{m}$  de long et d'environ 4  $\mu\text{m}$  de diamètre (Fig.3.11). Les raisons majeures du succès de ce microorganisme en forme de bâtonnets comme candidat d'études biologiques approfondies, résident dans sa relative simplicité, dans le fait qu'il soit facile à cultiver (robuste) et qu'il se reproduise assez rapidement (3 à 4 heures).



**Figure 3.11: Image de cellule *S.pombe*. [wikipédia]**

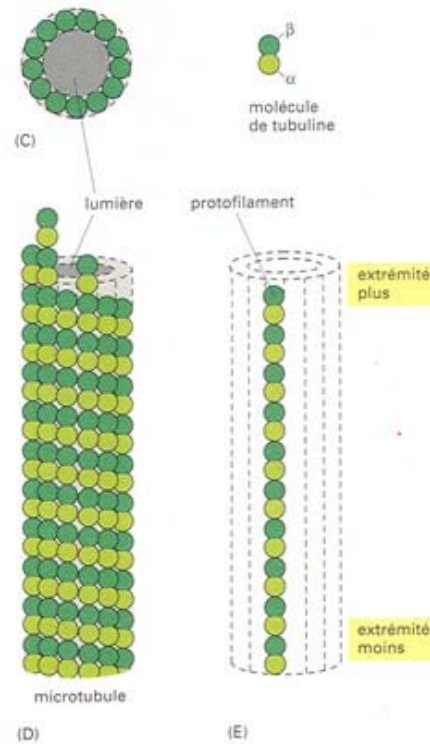
Mon laboratoire d'accueil à l'institut CURIE étudie principalement cet organisme. Deux thématiques sont globalement étudiées au sein de l'équipe TRAN/PAOLETTI : L'architecture du cytosquelette et la morphologie cellulaire. En première approche simplifiée, nous décrirons le cytosquelette comme la majeure partie des éléments assurant les fonctions mécaniques au sein de la cellule. Le cytosquelette est composé de trois principales structures. Les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. C'est sur ces derniers que nous nous sommes particulièrement concentrés.

### **3.4.3 Contrôle des microtubules de *S.Pombe* par choc thermique :**

Les microtubules ont plusieurs rôles au sein de la cellule. Ils assurent certaines fonctions de transport intracellulaire et exercent des forces mécaniques notamment durant la division cellulaire.

Les microtubules sont formés de petits tubes creux d'environ 20 nm de diamètre (Fig.3.12). Au sein de la cellule, ce polymère, est extrêmement dynamique. De façon périodique et alternative,

celui-ci s'allonge et se raccourcit au travers de phases respectivement appelées polymérisation et dépolymérisation. La dynamique de ces phases alternatives a notamment pour singularité d'être sensible à la température. Pour des températures proches de 6°C la dynamique des microtubules ralentie, pour finalement, après quelques minutes, s'arrêter de polymériser [12]. Ce comportement des microtubules à basse température est cependant réversible. Le retour à des températures plus élevées, réengage ces derniers dans leur dynamique normale.



**Figure 3.12: Schéma représentant un microtubule. Les microtubules sont constitués de molécules de tubuline assemblées sous forme de tubes. [Alberts 2005]**

L'objet de cette validation biologique est donc d'influencer la dynamique de polymérisation des microtubules en contrôlant la température de *S.pombe*.

### **Protocole expérimental F (Matériels et Méthodes) :**

Pour réaliser cette expérience nous avons déposé, au sein de notre dispositif sur un gel contenant des nutriments, 2μL de milieu contenant des cellules en croissance exponentielle. Ces cellules ont

la particularité d'avoir intégré une protéine fluorescente (Green Fluorescent Protein) au niveau des microtubules et du noyau. La température initiale du dispositif est de 25°C. Nous passons ensuite la température à 5°C au sein du dispositif. Ce changement de température entre 25°C et 5°C est réalisé plusieurs fois pour observer le comportement des microtubules.

### Résultat expérimental F et Discussions:

Comme nous pouvons l'observer dans la figure 3.13, Après quelques minutes à 5°C, les microtubules semblent complètement dépolymérisés (pas de signal visible). Lors du retour à 25°C, les microtubules réapparaissent progressivement.

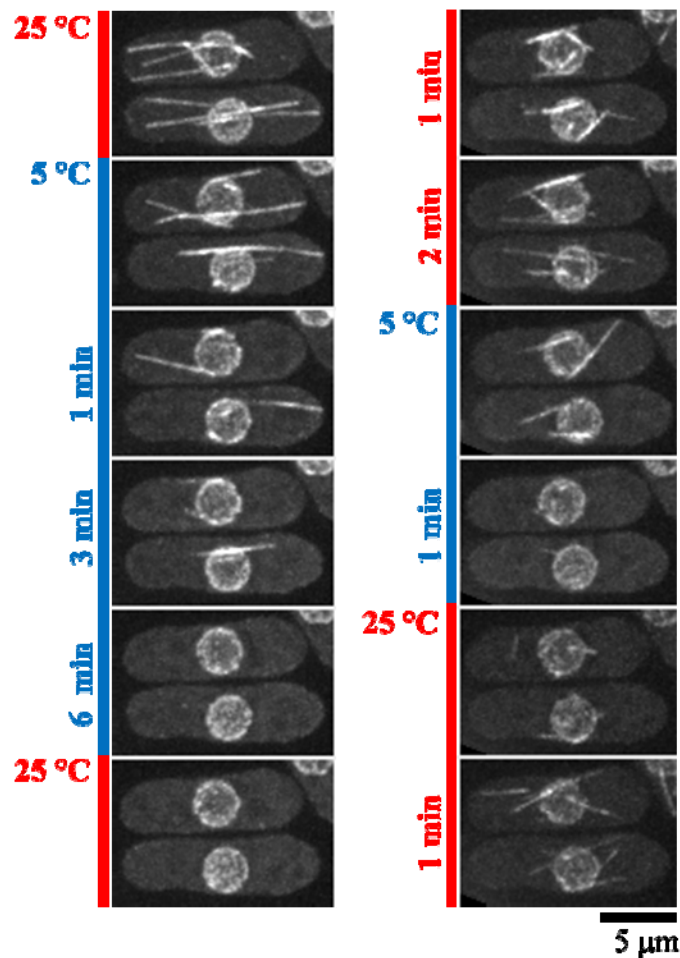


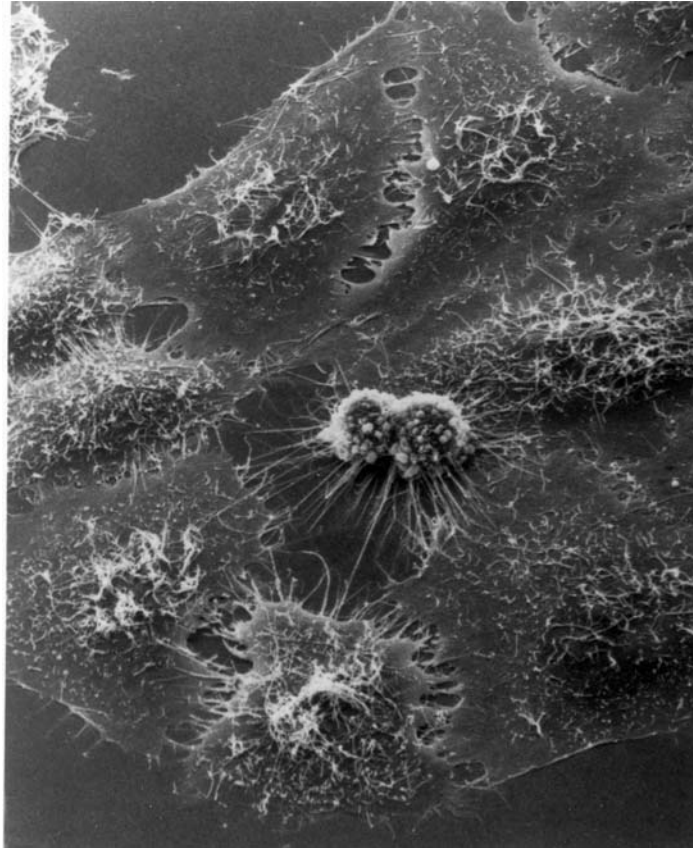
Figure 3.13: Dynamique des microtubules de *S.pombe*. En rouge, T=25°C. En Bleu T=5°C. Noyau et microtubules sont marqués en GFP.

## **Conclusion :**

Pour cette première expérience biologique au sein de notre contrôle de température, nous avons réalisé, avec un microscope muni d'un objectif à immersion, des images de la dynamique des microtubules chez *S.pombe*. En dépolymérisant complètement les microtubules de ce champignon de 4 $\mu$ m de large à une température de 5°C, nous démontrons donc l'aptitude de notre dispositif à thermaliser un échantillon biologique modèle lors d'une expérience au microscope électronique.

### **3.4.4 HeLa : Cellule humaine cancéreuse.**

Les cellules HeLa sont issues de cellules humaines (Fig.3.14). Plus précisément, les cellules HeLa sont une lignée de cellules cancéreuses prélevée en 1951 sur une femme (Henrietta Lacks) atteinte d'un cancer de l'utérus. Malgré la différence notable avec une cellule humaine normale, les facilités de culture offertes par ces cellules cancéreuses en font un modèle très largement utilisé dans les laboratoires de recherche en biologie.



**Figure 3.14: Cellule HeLa observée au microscope électronique. [Wikipédia]**

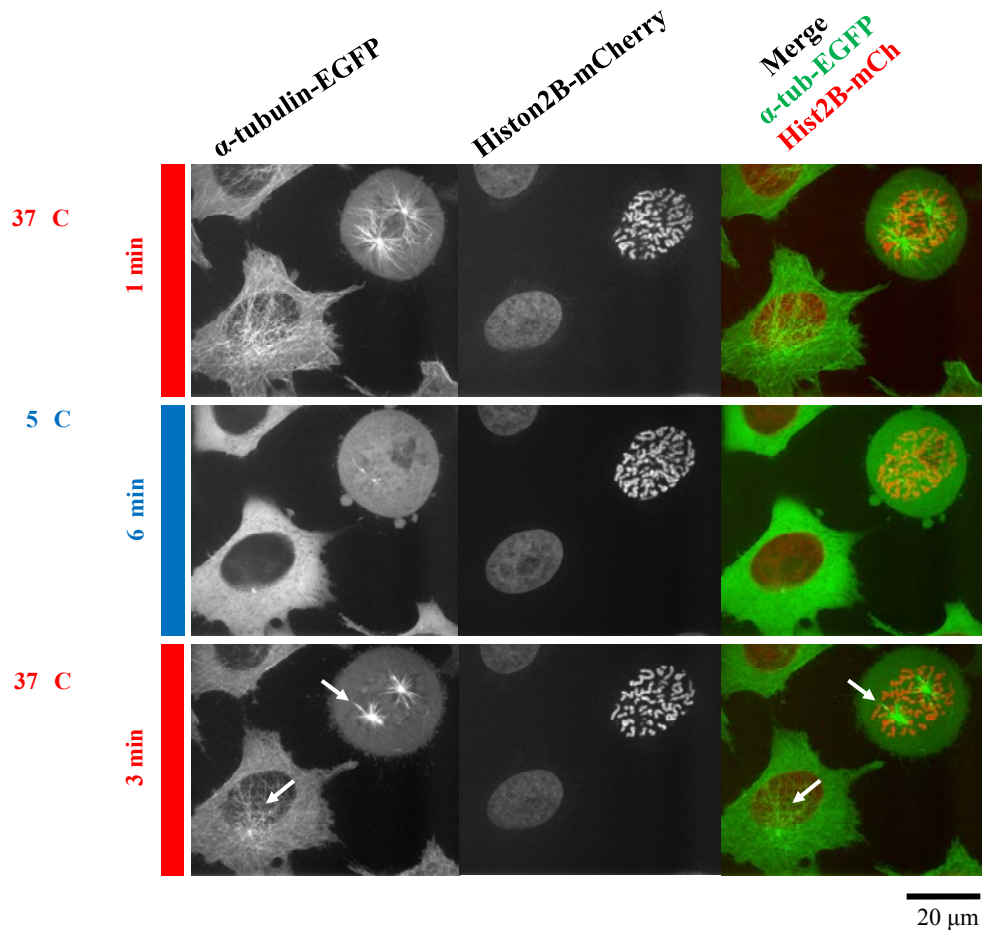
Les conditions de culture plus contraignantes et une plus grande fragilité nous ont fait également choisir ce modèle pour valider notre aptitude à contrôler la température en observant également la dynamique des microtubules.

#### **Protocole expérimental G (Matériels et Méthodes) :**

Pour réaliser cette expérience nous avons cultivé les cellules sur une lamelle de verre de 24\*40mm avec un joint assurant le rôle de mur d'enceinte. La GFP, protéine fluorescent dans le vert, a été fusionnée avec la tubuline pour visualiser directement celle-ci. Le noyau des cellules est visible grâce à la fusion des histones (certain niveau de compaction de l'ADN) avec un marqueur fluorescent dans le rouge appelé mCherry. La température initiale de notre dispositif est de 37°C. Nous changeons ensuite la température à 5°C au sein du dispositif.

## Résultat expérimental G et Discussions :

Comme nous pouvons l'observer à 37°C en vert dans la cellule de gauche (interphase) sur la figure 3.15, le réseau de microtubules est très net et dense. On observe, dans la cellule sphérique située à droite (en mitose), deux centres de microtubules en forme d'étoile (centrosome). Lorsque l'on passe à 5°C ce réseau filamentaire semble disparaître après quelques minutes et les formes d'étoiles (centrosomes) de la seconde cellule semblent éteintes. Lors du retour à 37°C, les microtubules réapparaissent progressivement et, ce, dans les deux cellules.



**Figure 3.15: Influence de la température sur les microtubules d'HeLa à 5°C. Première ligne : Température à 37°C. Deuxième ligne : température à 5°C Le réseaux de microtubules est totalement dépolymérisé. Troisième ligne : Retour à 37°C et repolymérisation des microtubules.**



## **Conclusion :**

En utilisant les cellules *HeLa* comme démonstrateur de validité dans notre système de contrôle de température, nous démontrons l'aptitude de notre dispositif à contrôler la température de cellules dont la fragilité est plus importante que celle de *S.pombe* et où l'injection dans des canaux est impossible. L'architecture en deux parties de notre dispositif permet donc bien d'un point de vue opérationnel, de cultiver les cellules sur une lamelle de verre, puis d'y ajouter notre échangeur sans endommager celles-ci.

## **3.5 Mutants thermosensibles :**

### **3.5.1 Qu'est-ce qu'un mutant thermosensible ?**

L'objectif global des recherches en biologie est de pouvoir comprendre et décrire l'ensemble des mécanismes et des fonctions cellulaires. Plus précisément, l'enjeu est d'identifier les fonctions, les localisations de chaque élément, définir leur structure et comprendre leurs mécanismes de régulation. Dans ce but, l'une des techniques développées et utilisées réside dans l'usage de mutations conditionnelles. Lorsqu'il est impossible de « supprimer » un gène essentiel pour étudier une fonction, on a recours aux mutations conditionnelles. C'est le cas des mutants thermosensibles.

Certaines fonctions cellulaires peuvent être altérées par un changement dirigé de température. A une température permissive, la cellule se comporte normalement et toutes les fonctions sont assurées. A température restrictive, une ou plusieurs fonctions de la cellule sont abrogées. Ce type de mutations conditionnelles est particulièrement pertinent dans les cas où la mutation est létale pour la cellule. Elle permet d'obtenir un grand nombre de cellules présentant cette mutation conditionnelle après division à température permissive. A température restrictive la cellule connaît alors un dysfonctionnement et présente un phénotype (singularité observable) particulier. L'intérêt majeur de ce type de mutants thermosensibles est de pouvoir localiser précisément l'implication et la fonction d'un gène ou encore le rôle d'une protéine dans le mécanisme cellulaire.

L'utilisation d'un système de contrôle variable et précis de la température est donc indispensable. De plus, la possibilité de changer rapidement la température de façon réversible permet d'étudier l'influence de la mutation en temps réel.

### 3.5.2 Mutant thermosensible chez la levure *S.Pombe* :

Pour notre troisième validation biologique nous avons donc décidé d'utiliser un mutant thermosensible de *S.pombe*. Celui-ci s'appelle *cdc25ts* [13]. Ce mutant permet une « désactivation » conditionnelle à 37°C et un comportement normal (type sauvage) à 25°C. La protéine *Cdc25* est une protéine essentielle pour l'entrée en mitose (division cellulaire). La fréquence de division chez *S.pombe* est d'environ 3 heures. Dans le cas d'un dysfonctionnement de la protéine *Cdc25*, les cellules ne peuvent pas se diviser et continuent à s'allonger au-delà de leur taille normale.

En contrôlant la température, nous pouvons arbitrairement empêcher les cellules d'entrer en mitose ou autoriser les cellules à se diviser.

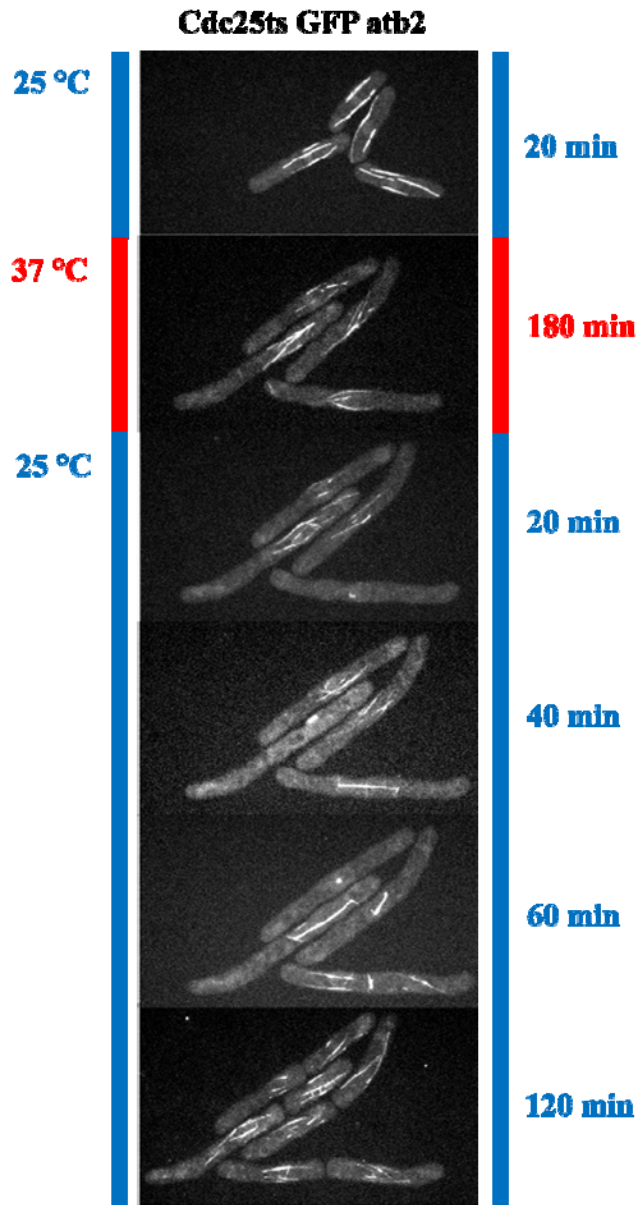
#### **Protocole expérimental H (Matériels et Méthodes):**

Pour réaliser cette expérience nous avons déposé au sein de notre dispositif, sur un gel contenant des nutriments, 2µL de milieu contenant des cellules en croissance exponentielle. Ces cellules ont la particularité d'avoir intégré une protéine fluorescente (Green Fluorescent Protein) au niveau des microtubules. La température initiale de notre dispositif est de 25°C. A 25°C, la protéine *Cdc25ts* se comporte comme une cellule normale et la division peut se réaliser. Après 20 minutes à 25°C nous passons la température à 37°C au sein du dispositif. Durant 3 heures (temps nécessaires au cycle complet) nous restons à la température restrictive de 37°C. Nous changeons enfin la température à 25°C pendant 1H30 environ.

#### **Résultat expérimental H et Discussions :**

Nous pouvons observer au bout de 3 heures à 37°C, que les cellules sont anormalement longues

(Figure 3.16). Ceci atteste de leur impossibilité d'entrer en division. La capacité de notre dispositif à contrôler précisément la température pendant 3 heures est donc bien validée. Lors du retour à la température permissive de 25°C, les cellules entrent de façon globalement synchronisée en mitose. Au bout d'une heure trente environ, toutes les cellules sont divisées. Ceci prouve la possibilité pour les cellules de se développer normalement au sein de notre dispositif.



**Figure 3.16: Mutant thermosensible *cdc25ts* de *S.pombe*. A 37°C la cellule ne peut se diviser. A 25°C les cellules entrent en division de façon synchronisée (les microtubules sont marqués en vert).**

## Conclusions :

En réalisant cette expérience de mutation conditionnée par la température sur le gène *cdc25* nous validons la capacité du dispositif à contrôler précisément la température d'un mutant thermosensible durant plusieurs heures. De plus, la durée de cette expérience atteste de la bonne santé des cellules au sein de notre dispositif.

### 3.5.3 Mutant Thermosensible chez les embryons de ver de *C.elegans*.

Nous avons réalisé une nouvelle expérience sur un mutant thermosensible d'un embryon de ver appelé *Caenorhabditis elegans* (Fig.3.17).



Figure 3.17 : *Caenorhabditis elegans*. Ver adulte transparent de 1 mm de long.

La taille de l'embryon de *C.elegans* est bien plus importante que *S.pombe*, environ 40 $\mu$ m de long sur 25 $\mu$ m d'épaisseur (Fig.3.18). Pour obtenir un embryon de ver au bon stade, il faut disséquer l'abdomen de celui-ci pour en extraire ses embryons.



**Figure 3.18 : Embryogenèse chez le ver *C.elegans*. [Wikipédia]**

L'intérêt de cette démonstration réside dans le fait de pouvoir contrôler la température d'un échantillon de cette taille et de cette relative fragilité (impossible à injecter dans un canal).

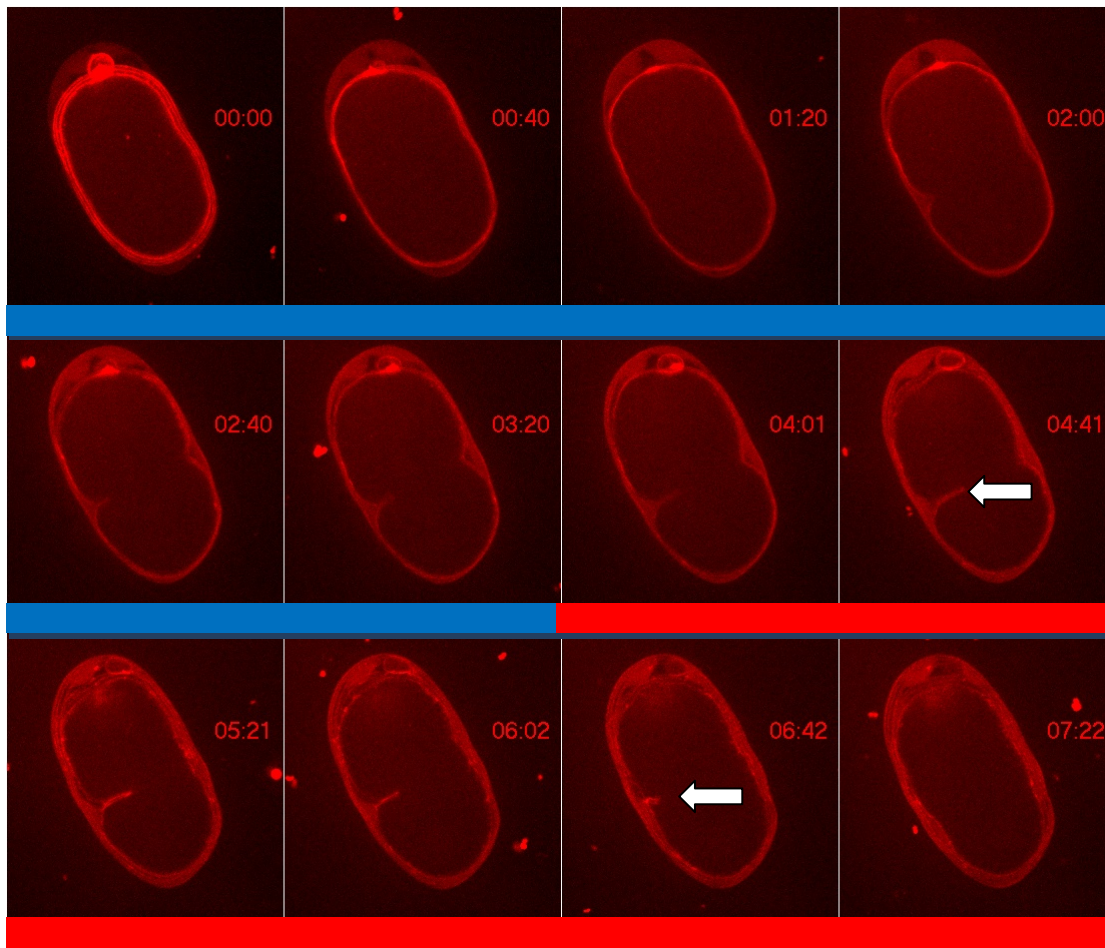
La mutation conditionnelle est située sur le gène *cyk-4* [14]. Ce gène est essentiel pour réaliser la séparation, en deux cellules filles, après la division (cytocinèse). *cyk-4* permet plus précisément de réaliser un sillon de clivage en deux cellules.

#### **Protocole expérimental I (Matériels et Méthodes):**

Après avoir disséqué l'abdomen du ver, nous avons extrait les embryons et nous les avons déposés sur la lamelle de verre (enceinte de déposition). La membrane cellulaire (Domaine PH) a, quant à elle, été marquée avec un marqueur fluorescent dans le rouge. La température initiale de notre dispositif est de 16°C (température permissive). Nous avons changé rapidement celle-ci à 25°C pendant la formation du sillon de clivage.

## Résultat expérimental I Discussions :

Comme nous pouvons l'observer sur la figure 3.19, dans les premières minutes le sillon de clivage se forme progressivement. Le changement soudain de température à 25°C après 4 minutes empêche le sillon de progresser. Dans les minutes suivantes le sillon partiellement formé avant la température restrictive, régresse puis disparaît complètement. Ce phénomène de régression du sillon empêche donc toute séparation des deux cellules filles.



**Figure 3.19: Ambrions thermo sensible de *C.elegans*. Après 4minutes on passe la température de 16°C (bande bleue) à la température restrictive de 25°C (bande rouge) le sillon de clivage se rétracte alors.**

## **Conclusion :**

Cette dernière validation biologique impliquant un embryon de ver nommé *C.elegans* nous permet de démontrer trois Points.

- La capacité du système à contrôler des échantillons de plus grande taille.
- Ce démonstrateur permet également de démontrer la capacité du système à ne pas induire de stress mécanique sur l'échantillon.
- Nous démontrons finalement l'aptitude du dispositif à changer rapidement la température de l'échantillon plus rapidement que le phénomène biologique (la formation d'un sillon de clivage est supérieure à 10 secondes).

## **3.6 Conclusion de la validation biologique :**

Nous voulions en définitive démontrer le caractère biologiquement « universel » de notre dispositif pour toucher le plus grand nombre d'utilisateurs.

Pour la première fois, un dispositif de contrôle de température rapide s'adapte aux principaux modèles biologiques utilisés en laboratoire de recherche. L'ensemble des démonstrations biologiques précédentes, réalisées avec un dispositif unique de contrôle rapide de température, s'adapte et fonctionne bien avec plusieurs tailles d'échantillons biologiques malgré les spécificités de manipulation requises pour chaque échantillon. La transparence et la compacité de notre dispositif autorise également l'utilisation d'un microscope à immersion (quel que soit le grossissement) avec des distances de travail et ouvertures numériques élevées.



Cette validation biologique a, en résumé, permis de répondre à l'ensemble des exigences suivantes définies par notre cahier des charges.

**Contrainte 1** : S'adapter à différentes tailles d'échantillon.

**Contrainte 2** : Permettre d'imager via un microscope (transparence).

**Contrainte 3** : Respecter la distance de travail imposé par un objectif à immersion avec une ouverture numérique de 1.4.

**Contrainte 4** : Etre réutilisable plusieurs fois.

**Contrainte 9** : Pouvoir Déposer l'échantillon sans injection.

**Contrainte 10** : Pouvoir déposer un volume de milieu liquide (nutriments et stabilisateur de Ph) d'environ 2 $\mu$ L.

**Contrainte 13** : Ne pas induire d'artefact (stress mécanique, etc).

**Contrainte 14** : Vérifier l'absence d'interaction biochimiques entre les milieux, l'échantillon biologique et le substrat.



## **CHAPITRE 4 :**

### **Analyse Energétique du dispositif :**

#### **4.1 Régime Permanent :**

##### **4.1.1 Objet d'étude.**

Le système étudié comprend le dispositif de contrôle de température et les connectiques fluidiques reliant le module Peltier au dispositif.

##### **4.1.2 Objectif :**

L'objectif de cette étude est d'estimer le gradient de température au niveau de l'échantillon. Nous réalisons cette étude dans le cas particulier d'une température ambiante de 25°C et d'une température de consigne de 50°C.

##### **4.1.3 Quantité d'énergie disponible.**

La première étape réalisée dans notre analyse énergétique du dispositif est de quantifier la puissance thermique théoriquement disponible en sortie du module Peltier (dispositif de conversion de courant électrique en chaleur par effet Peltier). Cette puissance thermique fournie par le module Peltier, est acheminée par l'écoulement du liquide caloporteur.

L'équation (4.1) décrit la puissance thermique apportée par le liquide caloporteur en sortie du module Peltier [15] :

$$\dot{Q} = \dot{q} \rho C_{eau} \Delta T \quad (4.1)$$

Avec,

$\dot{Q}$  : Puissance thermique (J/s).

$C_{eau}$  : Capacité calorifique du liquide caloporteur (eau) (J/Kg.K).

$\dot{q}$  : Débit volumique du liquide caloporteur ( $\mu\text{l/s}$ ).

$\Delta T$  : Différence de température entre le liquide caloporteur et l'extérieur (K).

$\rho$  : Masse volumique de l'eau ( $\text{Kg/m}^3$ ).

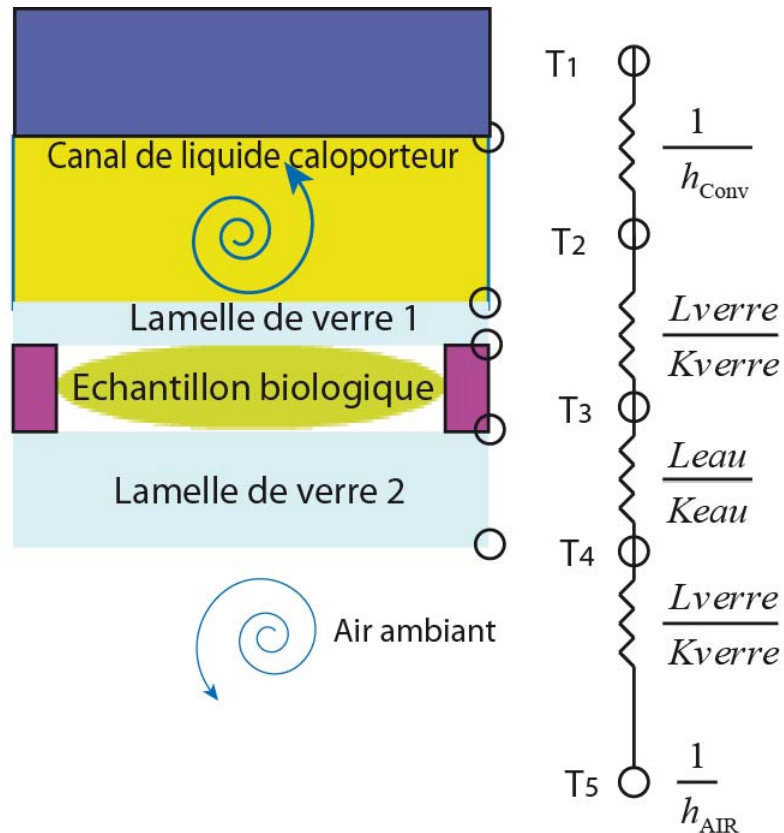
Pour un débit de 35  $\mu\text{l}$ , la quantité théorique disponible de puissance thermique (flux thermique) est de l'ordre de quelques watts.

#### 4.1.4 Flux de chaleur nécessaire.

##### **Influence de la partie basse du dispositif :**

Nous voulons estimer le flux de chaleur traversant la partie inférieure du dispositif (non prise en compte du PDMS au dessus du canal) et identifier les paramètres thermiques influençant ce flux de chaleur.

Pour ce faire, nous avons en régime permanent, traité les résistances thermiques du dispositif (Fig.4.2) de façon analogue à des résistances électriques [15].



**Figure 4.2 : Schémas hors échelle : vue de face en coupe des différents matériaux du dispositif de contrôle de température. Réseau électrique équivalent (résistance thermique) du transfert de chaleur 1D par conduction et convection en régime permanent (Tourbillons : mouvement de convection).**

**Hypothèses simplificatrices :**

- Régime permanent.
- Résolution analytique trois dimensions ramenées à une dimension (dimension des matériaux très petits dans l'axe y étudié, comparé aux deux autres dimensions).
- Les transferts radiatif ont été négligés (faible température) tout au long de cette étude.
- Le gradient de température choisi est de 25 °C, il a été défini au regard de la différence entre les extrêmes de température (0°C et 50°C) fournis par notre dispositif peltier et la température ambiante moyenne observée en salle de microscopie électronique.
- Différence de température nulle entre l'entrée et la sortie du canal.

L'équation 4.2 permet de calculer le flux thermique traversé au sein du dispositif [13]:

$$F = \frac{\Delta T}{\Sigma R} \times S = \frac{\Delta T}{\frac{1}{h_{eau}} + \frac{L_{verre1}}{K_{verre}} + \frac{L_{eau}}{K_{eau}} + \frac{L_{verre2}}{K_{verre}} + \frac{1}{h_{air}}} \times S \quad (4.2)$$

Avec,

$F$  : Flux thermique (W).

$\Delta T$  : Différence de température entre le liquide caloporteur et l'extérieur du système (K).

$\Sigma R$  : Somme des Résistances thermique du système ( $m^2 \cdot K / W$ ).

$L$  : Epaisseurs à traverser (m).

$K$  : Conductivité thermique (W/m.K).

$h$  : Coefficient de convection naturelle (W/m<sup>2</sup>.K).

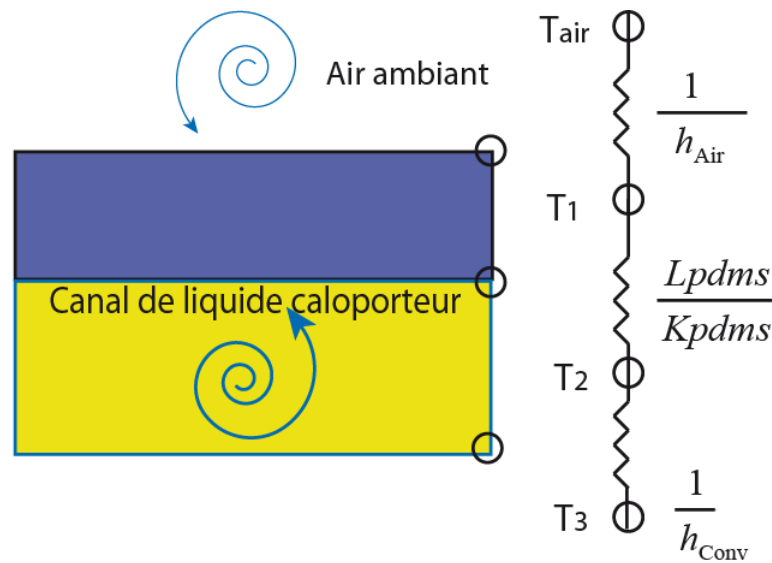
$S$  : Surface (m<sup>2</sup>).

### Résultat théorique :

Ramené à une surface de 1cm<sup>2</sup>, l'ordre de grandeur théorique du flux de chaleur traversant la partie basse du micro-échangeur de chaleur est de 25mW.

### Influence de la couche de PDMS au dessus des canaux :

Afin de connaître l'influence de la partie haute du dispositif (épaisseur de la couche de PDMS de 5 mm en contact avec le canal et l'extérieur) nous avons calculé le flux thermique (4.3) traversant cette partie en utilisant également l'analogie électrique (Fig. 4.3).



**Figure 4.3: Schémas hors échelle : vue de face en coupe partie haute (PDMS) du dispositif de contrôle de température. Réseau électrique équivalent (résistance thermique) du transfert de chaleur 1D par conduction et convection en régime permanent (Tourbillons : mouvement de convection).**

Le flux de chaleur traversant la couche supérieure de PDMS est donné par l'équation (4.3) :

$$F = \frac{\Delta T}{\Sigma R} \times S = \frac{\Delta T}{\frac{1}{h_{eau}} + \frac{L_{pdms}}{K_{pdms}} + \frac{1}{h_{air}}} \times S \quad (4.3)$$

Avec,

$F$  : Puissance thermique (W).

$K_{pdms}$  : Conductivité thermique du PDMS (W/m.K).

$\Delta T$  : Différence de température entre le liquide caloporteur et l'extérieur (K).

$L_{pdms}$  : Épaisseur de la couche de PDMS (m).

$h_{eau}$  : Coefficient de convection forcé de l'eau (W/m<sup>2</sup>.K).

$h_{air}$  : Coefficient de convection naturel de l'air (W/m<sup>2</sup>.K).

$S$  : Surface (m<sup>2</sup>).

### Résultat théorique :

Le flux théorique de chaleur traversant la partie haute (couche de PDMS) du micro-échangeur de chaleur est d'environ 200W. La puissance dissipée à travers 1 cm<sup>2</sup> (surface typique du réseau fluide) est donc de 20mW.

### **Influence des connectiques fluidiques:**

Les connectiques fluidiques sont des cylindres creux. Ils relient les modules Peltier à l'échangeur microfluidique. Via l'équation (4.4) Nous voulons estimer l'influence de la longueur du tube sur la quantité d'énergie dissipé.

$$F = \frac{\Delta T}{\frac{1}{h_i * 2\pi * R_{int} * L}} + 2\pi K L \frac{\Delta T}{\ln\left(\frac{R_{ext}}{R_{int}}\right)} + \frac{\Delta T}{\frac{1}{h_e * 2\pi * R_{ext} * L}} \quad (4.4)$$

Avec,

$F$  : Puissance thermique (W).

$K$  : Conductivité thermique du tube (plastique) (W/m.K).

$\Delta T$  : Différence de température entre le liquide caloporteur et l'extérieur (K).

$L$  : Longueur du tube (m).

$R_{ext}$  : Rayon extérieur du tube (m).

$R_{int}$  : Rayon intérieur du tube (m).

$h_i$  : Coefficient de convection forcé (W/m<sup>2</sup>.K).

$h_e$  : Coefficient de convection naturel (W/m<sup>2</sup>.K).

## Résultat théorique :

On suppose le gradient longitudinal de température comme négligeable devant le gradient radial. En régime permanent, pour une longueur de tube de 10 cm, le flux thermique théorique traversé au niveau des connectiques fluidiques est de 190mW.

### 4.1.5 Gradient de température :

Le calcul du gradient de température s'effectue pour un échantillon d'épaisseur de 100 $\mu$ m.

#### Calcul du gradient de température au sein de l'échantillon :

$$\Delta T = F \left( \frac{L_{verre1}}{K_{verre1}} \right) \quad (4.5)$$

#### Résultats théoriques :

A température ambiante de 25°C, quelle que soit la température du fluide caloporteur dans le canal, le gradient théorique calculé au sein de l'échantillon est **toujours inférieur à 0.04°C**.

Dans l'hypothèse d'un flux thermique 10 fois plus grand (conduisant à un décalage de température similaire à la présence d'un objectif en contact avec le dispositif) le gradient de température au sein de l'échantillon est **inférieur à 0.4 °C**.



## 4.2 Conclusion du régime permanent :

Pour des extrêmes de température, les résultats expérimentaux nous indiquent au minimum un décalage d'environ 5°C entre la consigne de température et la mesure. Nous avons donc voulu estimer le gradient de température au sein de l'échantillon biologique.

- Sans objectif à immersion en contact, quelle que soit la température du liquide caloporteur, le gradient de température au sein de l'échantillon est au maximum de 0.04°C. Comme le confirme les calculs des pertes au sein des connectiques fluidiques, la majorité des pertes de températures se situe globalement en amont de l'échantillon.
- Un décalage supplémentaire est mesuré lors de la présence d'un objectif à immersion en contact avec le dispositif. Les mesures expérimentales nous indiquent un décalage d'environ 3°C supplémentaires. Ces pertes sont donc directement imputables à la présence de l'objectif. Le contact de l'objectif génère un flux de chaleur traversé, dix fois plus grand. Au sein de l'échantillon biologique, le gradient de température correspondant est au maximum de 0.4°C. Cette valeur reste néanmoins acceptable pour réaliser des expériences de biologie cellulaire.

## 4.3 Analyse énergétique en régime variable :

### 4.3.1 Objet d'étude.

Le système étudié en régime variable se limitera à la lamelle de verre 1 intermédiaire et à l'épaisseur de l'échantillon (ici  $140\mu\text{m}$ ) (fig.4.2). Ce volume (lamelle+échantillon) est en contact avec le liquide caloporteur acheminé via les Modules Peltier. Il subit donc un changement de température brutal (conduction en régime variable) initié par la convection du liquide caloporteur.

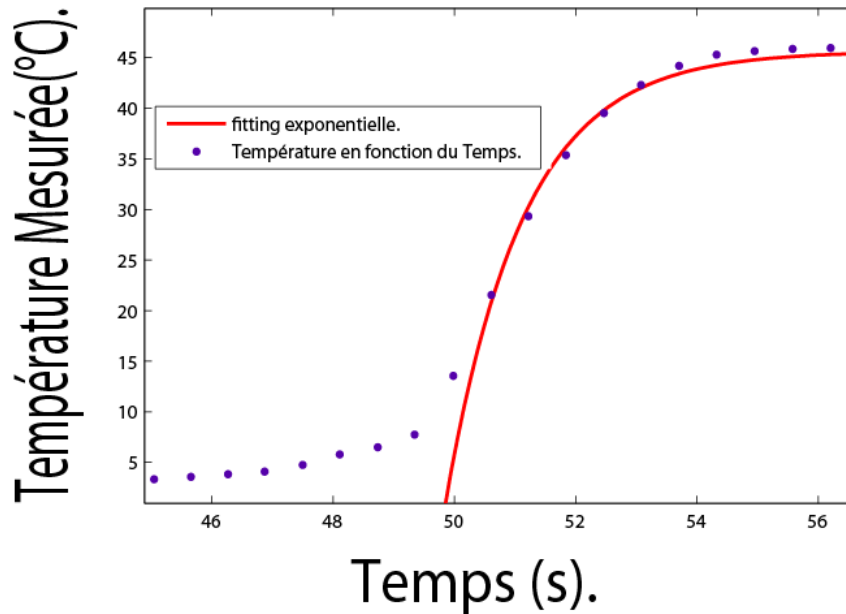
### 4.3.2 Objectif.

L'objectif de cette étude est d'estimer l'influence temporelle de la quantité de chaleur accumulé par l'épaisseur de la lamelle verre et par l'épaisseur de l'échantillon sur le délai total de changement de température du dispositif.

En s'appuyant sur les résultats expérimentaux nous avons estimé le temps caractéristique  $\tau_t$  (Temps caractéristique total du système) du système lors d'un changement brutal de température. Ce délai  $\tau_t$  est estimé à : 1.653 secondes (Fig.4.4). Par l'analogie électrique, ce délai s'apparente au temps de charge d'un condensateur. Il correspond dans notre cas au temps caractéristique de transition entre régime variable et régime permanent entre deux températures définies.

Pour avoir un ordre de grandeur de temps  $\tau_p$  ( $\tau$  partielle = Lamelle + échantillon), nécessaire à la pénétration de la chaleur en régime variable, nous avons calculé le temps nécessaire pour une épaisseur partielle (Lamelle+échantillon) de  $140\mu\text{m}$ .

Nous avons fait l'hypothèse suivante : Lamelle + échantillon = contact parfait.



**Figure 4.4:** En bleu : courbe de délai de changement de température entre 5°C et 45°C au sein du dispositif de contrôle de température. En rouge : Fit exponentielle permettant d’estimer le temps caractéristique  $\tau_t$  de changement de température du dispositif.

#### 4.3.3 Bilan thermique : Méthode

Le transfert de chaleur s’effectue via le liquide caloporteur (flux convectif) à travers la lamelle de verre (flux conductif) en régime transitoire jusqu’à atteindre le régime permanent. Pour cela, nous avons utilisé la méthode dite des « capacités thermiques » [15]. Cette méthode permet, sous certaines conditions, de simplifier les calculs en faisant l’approximation suivante :

- Dans un solide en régime transitoire, la température est uniforme en tous points.

Certaines conditions doivent être satisfaites pour utiliser cette méthode. La condition de validité est donnée par le calcul du nombre de Biot.

Nous avons donc calculé le nombre de Biot pour une épaisseur de milieu de 140  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.4 Calcul du nombre de Biot :

##### *Signification physique du nombre de Biot :*

Dans un problème convecto-conductif en régime variable, le calcul du nombre de Biot (4.5) nous donne une information sur la résistance thermique limitant l'écoulement de la chaleur entre la conduction et la convection.

Sur un milieu défini, il fait le rapport entre la résistance thermique conductive et la résistance thermique convective.

$$B_i = \frac{h e}{\lambda_m} \quad (4.6)$$

Avec :

**h** : coefficient de convection forcé (W/m<sup>2</sup>.K).

**e** : longueur caractéristique du milieu traversé (m).

**λ<sub>m</sub>** : Conductivité thermique moyenne entre verre et eau (W/m.K).

Si le nombre de Biot est inférieur à 1, c'est la résistance thermique convective qui limite l'écoulement de la chaleur.

Ceci est d'autant plus vrai lorsque l'épaisseur du milieu traversé est faible ou encore la conductivité du matériau est élevée.

Pour l'épaisseur utilisée dans notre calcul (140μm) le nombre de Biot est inférieur à 1.

La méthode de calcul simplifiée des capacités thermiques peut donc être appliquée avec une erreur acceptable en première approche.

#### 4.3.5 Méthode des capacités thermiques :

Le calcul du nombre de Biot  $< 1$  nous permet d'effectuer l'hypothèse simplificatrice suivante : On considère la température comme uniforme en tous points du milieu (mix lamelle+échantillon) pendant l'évolution de la température. Le gradient de température au sein de la lamelle de verre est donc négligé. Ce qui revient à écrire  $T(x,t)=T(t)$ . Conséquence directe d'une température considérée comme uniforme au sein du milieu à tout instant, le flux conductif de chaleur est impossible. Seul le flux convectif et le flux de chaleur stocké sont donc pris en compte dans le bilan d'énergie partiel :

$$-hS(T_s - T_o) = \rho CV \frac{dT}{dt} \quad (4.7)$$

Avec,

$h$  : Coefficient de transfert de chaleur par convection forcé ( $W/m^2.K$ ).

$S$  : Aire de la surface de contact liquide/solide ( $m^2$ ).

$T_s$  : Température de la surface du solide (K).

$T_o$  : Température du liquide caloporteur (K).

$\rho$  : Masse volumique ( $kg/m^3$ ).

$C$  : Chaleur spécifique ( $J/kg.K$ ).

$T$  : Température (K).

$t$  : Temps(s).

En intégrant l'équation (4.6) on obtient le résultat (4.7) suivant :

$$\frac{T-T_o}{T_i-T_o} = \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (4.8)$$

Avec,

$$\tau(S) = \frac{\rho C V}{h S} \quad (4.9)$$

#### Résultat théorique :

La valeur de  $\tau_p$  calculée pour l'épaisseur composite de 140 $\mu$ m est de 0,498 secondes.

Cette valeur représente trente pourcent de la valeur totale du temps caractéristique du système.

#### 4.4 Régime variable : Conclusion.

Nous avons calculé le temps caractéristique  $\tau_p$  d'une partie du dispositif (lamelle de verre intermédiaire + l'échantillon). Il correspond à l'inertie thermique du milieu considéré. Pour réaliser ce calcul nous avons utilisé une méthode analytique simplifiée valide dans les milieux dits thermiquement minces ( $Biot < 1$ ). Pour des transferts convecto-conductif, celle-ci suppose la température du milieu comme uniforme à chaque instant et permet de simplifier le bilan thermique en négligeant l'aspect conductif.

La valeur estimée est de trente pour cent du temps caractéristique total du système.

## CHAPITRE 5 :

### Conclusion générale et Perspectives :

#### 5.1 Conclusion scientifique et technique.

Réaliser, optimiser et publier dans un journal scientifique un nouveau dispositif microfluidique de contrôle rapide de température destiné aux échantillons biologiques. Voilà l'objet du projet d'ingénieur qui m'a été confié dans l'équipe des professeurs TRAN et PAOLETTI au sein de l'institut CURIE à Paris.

Pour ce faire plusieurs disciplines et techniques ont du être couplées : La thermique, la fabrication microfluidique, la photolithographie, la microscopie électronique, la biologie cellulaire, la communication orale et écrite en anglais. De nombreux logiciels ont également dû faire l'objet d'un apprentissage rapide : MATLAB logiciel de programmation permettant notamment de visualiser et d'exploiter des données graphiques, FEMLAB simulation multi-physique, L-EDIT logiciel de dessin industriel, METAMORPHE et IMAGE J traitement et analyse d'image, Adobe Illustrator pour la mise en forme de données graphiques.

Après avoir réalisé une preuve de concept rapide sur la fonctionnalité biologique du dispositif, nous avons vérifié, via un calcul simple, l'aspect théorique des transferts thermiques au sein de notre architecture et des matériaux utilisés.

Pour mesurer la température au sein de notre dispositif, au plus près des échantillons biologiques, nous avons réalisé un thermomètre en platine grâce aux méthodes de dépôt de couches minces.

L'utilisation d'une fine lamelle de verre entre liquide caloporteur et échantillon, l'optimisation des débits du liquide caloporteur, le design de l'échangeur de chaleur, les modules Peltier choisis nous permettent finalement de changer de température de 5° à 45°C en moins de 10 secondes.

Le choix architectural en deux parties amovibles (enceinte thermostatée et enceinte de déposition) accouplées d'un mur d'enceinte à géométrie variable, nous a permis d'ajuster notre

dispositif en fonction de la taille des échantillons biologiques étudiés (évitant ainsi toutes contraintes mécaniques et préservant celui-ci).

L'utilisation de matériaux transparents comme le PDMS et de lamelles de verre de microscopie classique nous a permis d'imager notre dispositif au microscope électronique et de réaliser les expériences biologiques sans interactions biochimiques de surface entre l'échantillon et le substrat de déposition.

Pour trois organismes biologiques modèles, la levure *S.pombe*, les cellules cancéreuses humaines *HeLa*, les embryons de ver *C.elegans*, nous avons validé la fonctionnalité de notre dispositif en réalisant des expériences de dépolymérisation de microtubules et en utilisant des mutants thermosensibles.

L'ensemble de ce projet est actuellement en cours de rédaction pour réaliser une publication dans une revue scientifique internationale. Le but étant de présenter cette nouvelle technologie à la communauté de chercheurs en biologie.

Suite à mes présentations et autres échanges j'ai récemment réalisé de nouvelles collaborations dont notamment une nouvelle mise au point du dispositif sur des embryons et des cerveaux de mouches (*Drosophile*).

S'appuyant sur le principe technologie de notre dispositif, une nouvelle entreprise d'innovation scientifique a déposé un brevet et a décidé de commercialiser d'ici peu un nouveau contrôleur de température intégrée pour la communauté des chercheurs en biologie.



## 5.2 Conclusion personnelle.

Après avoir réalisé un entretien de deux semaines à Philadelphie au sein du laboratoire du professeur TRAN, j'ai été recruté dans son second laboratoire à l'institut CURIE à Paris.

Après quelques mois de formation, j'ai très vite été en totale autonomie pour la conduite de mon projet. Grâce à la grande liberté d'entreprendre et à la confiance qui m'a été offerte par le professeur Phong TRAN, j'ai réussi à avancer pas à pas dans un environnement qui m'était alors totalement inconnu. Pour me former opérationnellement dans mes tâches, j'ai donc, étape par étape, sollicité différents interlocuteurs au sein de l'institut CURIE, mais également à l'extérieur, dont notamment à l'Ecole Normale Supérieure.

Ces nombreuses collaborations m'ont également été très profitables pour comprendre mon environnement et ses exigences.

Plus largement, durant ce mémoire réalisé à l'institut CURIE j'ai découvert le monde de la recherche qui m'était jusqu'ici totalement inconnu.

## 5.3 Perspectives personnelles.

A l'issue de ce stage d'ingénieur, des possibilités pour réaliser une thèse de doctorat m'ont été proposées. J'ai ainsi choisi de réaliser une thèse de doctorat via une convention industrielle de formation par la recherche (Dispositif CIFRE). Cette convention engage un doctorant, un laboratoire de recherche avec son école doctorale, mais également un industriel. Dans les semaines à venir je réaliserai alors un doctorat dans les laboratoires de Physico-chimie théorique et de Microfluidique de l'Ecole Normale Supérieure sous la codirection des professeurs BORGIS Daniel et CHEN Yong. L'industriel, impliqué à 50% et cofinçant la bourse de thèse, est une jeune entreprise d'innovation industrielle dénommé ELVESYS. Le sujet principal de ma thèse sera naturellement en rapport direct avec mon stage d'ingénieur.

Dans le cadre d'un projet ANR (Association Nationale de la recherche) et DGA (Direction Générale de l'Armement) de bio détection et d'amplification rapide d'agents pathogènes, je vais participer à la mise en place d'une plateforme de thermalisation d'échantillons biologiques ultra rapide. La technologie à mettre en place doit thermaliser très rapidement des échantillons biologiques dans le but d'amplifier et détecter l'ADN des cellules collectées. Cette technologie existe déjà. Elle s'appelle PCR (Réaction en Chaine par Polymérase). L'objet de ce projet est donc d'atteindre les limites temporelles pour amplifier et détecter le matériel génétique d'un agent pathogène.

Au-delà de la preuve de concept et du projet de recherche scientifique, ce projet suggère un fort potentiel de valorisation industrielle. Dans le cas favorable, nous pouvons dès lors envisager la fabrication industrielle d'un tel dispositif de détection. Il esquisse donc la possibilité future de créations d'entreprises à travers sa commercialisation.

## Bibliographie :

- [1] : ATKINS,P, 2010. *Les 4 grands principes qui régissent l'univers*. DE BOECK. 103p.
- [2] : PAPON.P, 1990. *Thermodynamique des états de la matière*. HERMAN.566p.
- [3] : CARNOT.S, 1824. *Réflexion sur la puissance motrice du feu, et sur les machines propres à développer cette puissance*. GAUTHIER.V. 102p
- [4] : TERRENA,C.R, TRAN P.T, 2008. Physical mechanisms redirecting cell polarity and cell shape. *C. Biology*, **18**, 1748-1753.
- [5] : VELVE CASQUILLAS.G, CHEN.Y, 2008. Disposable microfluidic temperature control for on chip cell studies. Proceedings of the 12<sup>th</sup> international Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences.( $\mu$ TAS).
- [6] : TABELLING.P, 2003. *Introduction à la microfluidique*. BELIN. 254p.
- [7] : TABELLING.P, 2003. Une introduction à la microfabrication. *Introduction à la microfluidique*. BELIN. 203-237 p.
- [8]: BRIDLE.H, JESORKA .A, 2008. On chip fabrication to add temperature control to a microfluidic solution exchange system. *Lab Chip*, **8**, 480-483.
- [9]: VELVE CASQUILLAS.G, TRAN P.T, 2011.Fast microfluidic temperature control for high resolution live cell imaging. *Lab Chip*, **11**, 484-489.
- [10] : CARETTE. L, POUCHOL. J.M, 2001. Silicones.*Techniques de l'ingénieur*, **A3475**, pp.1-18.
- [11] : NGUYEN. D, 2005. *Etude des propriétés électriques des élastomères silicones utilisés pour l'isolation électrique*. Thèse de Docteur es-Sciences, Université de Grenoble I, 186 p.
- [12] : ALBERTS.B, 2011.*Biologie moléculaire de la cellule*. BROCHE. 1600p.
- [13] : MORGAN.D, 2010. *Le cycle cellulaire*. DE BOECK. 293p.

[14]: CANMAN.J, BOWERMAN.B, 2008. Inhibition of Rac by the GAP Activity of centralspindlin is essential for cytokinesis. *Science*, **322**, 1543-1546.

[15] : INCROPERA.P, DE WITT.P,2002. Heat and mass transfer. WILEY. 981p.

## Liste des figures :

|  |    |
|--|----|
| <i>Figure 1.1: Boîtes d'incubation montées sur des microscopes de taille différentes [www.solentsci.com]</i> .....   | 18 |
| <i>Equation 1.1: Un système avec une taille caractéristique 10 fois plus petite changera de température 100 fois plus vite.</i> .....  | 19 |
| <i>Figure 1.2: Dispositif de contrôle de température bi canal. Echelle non respectée</i> .....   | 21 |
| <i>1.6 Le projet de fin d'étude d'ingénieur :</i> .....  | 21 |
| <i>Figure 2.1: Schéma descriptif simplifié (vue en coupe) de la partie échangeur du contrôle de température.</i> .....   | 25 |
| <i>Figure 2.2: Schéma 3D de la partie échangeur du contrôle de température. Les Flèches correspondent aux orifices d'entrée et de sortie du liquide caloporteur.</i> .....   | 26 |
| <i>Figure 2.3: Schéma descriptif de l'enceinte de déposition du contrôle de température.</i> .....   | 27 |
| <i>Figure 2.4: Schéma simplifié des deux parties de l'enceinte de thermalisation. Ces deux parties sont amovibles.</i> .....   | 28 |
| <i>Figure 2.5: Photo du support en métal (Flèche horizontale). Il permet le maintien et la protection du dispositif de contrôle de température. Dispositif de contrôle de température transparent (Flèche verticale).</i> .....                    | 29 |
| <i>Figure 2.6: Pousse seringue électronique permettant le déplacement et le contrôle volumique du liquide caloporteur à travers le dispositif. [Harvard Apparatus]</i> .....   | 30 |
| <i>Figure 2.7: Module Peltier avec son interface de contrôle. Ces modules contrôlés en température permettent la chauffe ou le refroidissement d'un liquide caloporteur. [Warner Instrument]</i> ....  | 30 |
| <i>Figure 2.8.a: En comprimant la seringue, le liquide caloporteur passe à travers le Peltier froid, dans l'échangeur, puis dans le Peltier chaud pour finir dans un bac de rétention.</i> .....   | 32 |
| <i>Figure 2.8.b: En tirant sur la seringue, le liquide sort du bac de rétention, est réchauffé dans le Peltier chaud, passe dans l'échangeur de chaleur, puis repasse dans le Peltier froid et vient compléter le volume de la seringue.</i> ..... | 33 |
| <i>Figure 2.9: Schéma explicatif de fabrication d'un moule via la méthode de Photolithographie.</i> .  | 36 |
| <i>Figure 2.10: Morceau de PDMS solide après vulcanisation.</i> .....  | 37 |
| <i>Figure 2.11: Schéma simplifié du processus de fabrication d'un dispositif PDMS/Verre.</i> .....   | 38 |
| <i>Figure 2.12: Vue en coupe de la partie échangeur du contrôle de température.</i> .....  | 39 |

|  |    |
|--|----|
| <i>Figure 3.1 : Motif de dépôt de platine sur lamelle de verre visible par transparence à travers l'échangeur en PDMS.</i> .....   | 43 |
| <i>Figure 3.2: Motif d'une piste métallique spécifique pour réaliser une mesure 4 points. Le cercle rouge désigne la partie du motif où la résistance est mesurée.</i> .....   | 44 |
| <i>Figure 3.3: Schéma électrique équivalent à une mesure de température 4 points.</i> .....  | 44 |
| <i>Figure 3.4: Exemple de corrélation de la résistance métallique (Cr/Pt/Ti) en fonction de la température.</i> .....  | 45 |
| <i>Figure 3.5 : En noir, dépôt de platine sur la lamelle de verre permettant la mesure de température en dessous de l'échantillon biologique.</i> .....  | 46 |
| <i>Figure 3.6: Tracé de la température du dispositif en fonction du débit traversant le Module Peltier pour une température consigne à 0°C.</i> .....  | 48 |
| <i>Figure 3.7: Tracé de la température du dispositif en fonction du débit traversant le Module Peltier pour une température consigne à 50°C.</i> .....   | 49 |
| <i>Figure 3.8 : Correspondance entre température consigne Peltier et température mesurée au sein du dispositif. En bleu, l'objectif est hors contact. En marron, l'objectif est en contact avec le dispositif.</i> .....   | 51 |
| <i>Figure 3.9: Evolution de la température en fonction du temps. Objectif hors contact: Le délai nécessaire pour passer de 5°C à 45°C est de 7 secondes.</i> .....   | 53 |
| <i>Figure 3.10 : Courbe périodique de changement de température mesurée au sein du dispositif.</i> .....   | 55 |
| <i>Figure 3.11: Image de cellule S.pombe. [wikipédia]</i> .....  | 58 |
| <i>Figure 3.12: Schéma représentant un microtubule. Les microtubules sont constitués de molécules de tubuline assemblées sous forme de tubes. [Alberts 2005]</i> .....   | 59 |
| <i>Figure 3.13: Dynamique des microtubules de S.pombe. En rouge, T=25°C. En Bleu T=5°C. Noyau et microtubules sont marqués en GFP.</i> .....   | 60 |
| <i>Figure 3.14: Cellule HeLa observée au microscope électronique. [Wikipédia]</i> .....  | 62 |
| <i>Figure 3.15: Influence de la température sur les microtubules d'HeLa à 5°C. Première ligne : Température à 37°C. Deuxième ligne : température à 5°C Le réseaux de microtubules est totalement dépolymérisé. Troisième ligne : Retour à 37°C et repolymérisation des microtubules.</i> ..... | 63 |

*Figure 3.16: Mutant thermosensible cdc25ts de S.pombe. A 37°C la cellule ne peut se diviser. A 25°C les cellules entrent en division de façon synchronisée (les microtubules sont marqués en vert). .....* 66

*Figure 3.17 : Caenorhabditis elegans. Ver adulte transparent de 1 mm de long.....* 67

*Figure 3.18 : Embryogenèse chez le ver C.elegans. [Wikipédia].....* 68

*Figure 3.19: Ambrions thermo sensible de C.elegans. Après 4minutes on passe la température de 16°C (bande bleue) à la température restrictive de 25°C (bande rouge) le sillon de clivage se rétracte alors. ....* 69

*Figure 4.2 : Schémas hors échelle vue de face en coupe des différents matériaux du dispositif de contrôle de température. Réseau électrique équivalent (résistance thermique) du transfert de chaleur 1D par conduction et convection en régime permanent (Tourbillons : mouvement de convection). ....* 74

*Figure 4.3: Schémas hors échelle vue de face en coupe partie haute (PDMS) du dispositif de contrôle de température. Réseau électrique équivalent (résistance thermique) du transfert de chaleur 1D par conduction et convection en régime permanent (Tourbillons : mouvement de convection). ....* 76

*Figure 4.4: En bleu : courbe de délai de changement de température entre 5°C et 45°C au sein du dispositif de contrôle de température. En rouge : Fit exponentielle permettant d'estimer le temps caractéristique  $\tau_t$  de changement de température du dispositif. ....* 82

Etude et caractérisation d'un micro-échangeur de chaleur : Application à la biologie cellulaire. Energétique, Température, Microfluidique, Transfert Thermique, Cellules. Mémoire d'Ingénieur C.N.A.M., Paris 2012.

## **RESUME**

L'objet de ce mémoire d'ingénieur consiste à réaliser un dispositif de contrôle de température rapide destiné à la biologie cellulaire et compatible avec l'utilisation d'un microscope électronique. Pour bénéficier de la rapidité des transferts thermiques offerts par les échelles micrométriques, nous avons réalisé un dispositif miniaturisé. La méthode de fabrication est empruntée aux techniques spécifiques de micro fabrication. Le principe de fonctionnement du dispositif repose sur la base d'un échangeur de chaleur. Le transfert d'énergie est réalisé grâce au mouvement permanent d'un liquide caloporteur à travers un canal étanche en contact avec un échantillon biologique. Nous avons fabriqué ce dispositif de contrôle de température avec des lamelles de verre et un élastomère en silicone appelé PDMS. Nous avons optimisé et caractérisé les performances thermiques et temporelles du dispositif grâce à la fabrication d'un thermomètre miniaturisé. Nous avons validé biologiquement notre système en imageant au microscope électronique l'activité cellulaire de mutants thermosensibles et de fluorophores intégrés dans différents échantillons biologiques. Pour diffuser le plus largement cette nouvelle technologie, nous sommes en cours de rédaction d'une publication dans un journal scientifique international. Le principe de base de ce dispositif a également fait l'objet d'un brevet dans le cadre d'une future valorisation industrielle de la recherche.

## **SUMMARY**

The aim of this engineer dissertation was to create a fast temperature control device designed for cellular biology, also compatible with the use of an electronic microscope. In order to take advantage of the fast thermal transfers as they happen on a micrometric scale, we created a miniaturized device. We borrowed the specific techniques of micro fabrication to create our method of fabrication. The device functions thanks to a heat exchanger. The transfer of energy is possible with the permanent movement of a liquid through a waterproof channel touching a glass cover slide and on the other part a biological sample. We created this fast temperature control system with glass as well as with a silicone named PDMS. What's more, we characterized the thermal and time capacities of this device, thanks to the creation of a miniaturized thermometer. Our system was biologically vouched for, by using an electronic microscope to produce imaging of the cell activity of thermosensitive mutants as well as of integrated marker in various biological cells. So that this new technology would become widespread, we are currently writing an article to be published in an international scientific newspaper. The main aspects of this device have besides been patented, for our research to be used by the industry in the future.

Key words: Energetic, Temperature, Microfluidic, Heat transfer, Cell.