

Formulations pour la microfluidique

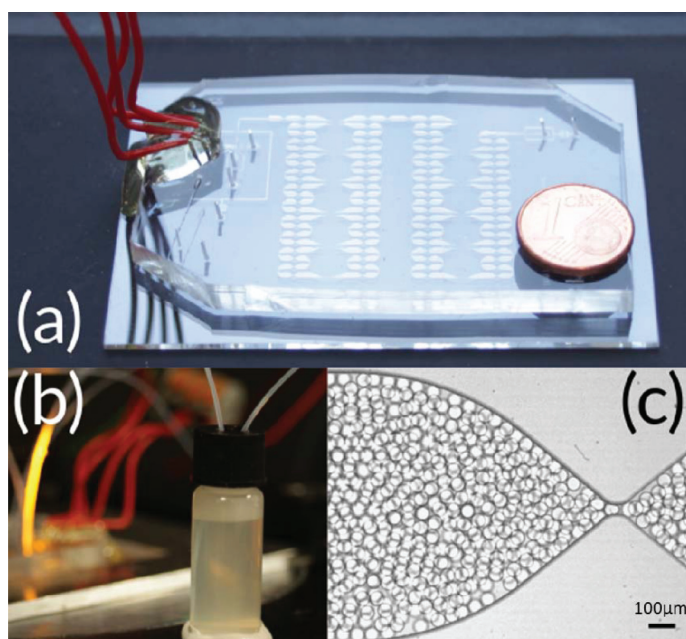


Figure 1 - (a) Puce microfluidique en PDMS et verre pour la manipulation de fluides dans des canaux microfabriqués (photo J.-C. Baret, Univ. Bordeaux, CNRS, CRPP). (b) Émulsion collectée après production. (c) Flot d'une émulsion d'eau dans huile fluorée stabilisée par des tensioactifs dans un microcanal. La taille des gouttes est d'environ 50 microns (photo T. Beneyton, Univ. Bordeaux CNRS, CRPP ; échelle 100 µm).

La microfluidique est la science et la technologie des systèmes manipulant les fluides à l'échelle microscopique. Cette technologie est basée sur la conception de microcanaux aux dimensions plus petites que la taille d'un cheveu [1-2] (typiquement une centaine de microns). Ainsi, des réseaux complexes de canaux peuvent être assemblés dans des systèmes de la taille d'une carte bancaire (figure 1a), conduisant à la réalisation de véritables laboratoires sur puces utilisables pour la miniaturisation d'expériences en biologie ou en chimie et l'automatisation de procédés [3]. Lorsque deux liquides non miscibles sont forcés à s'écouler dans un même canal, on observe la formation de gouttes qui se propagent ensuite dans les canaux. Ces gouttes peuvent être collectées sous la forme d'une émulsion (figure 1b) ou manipulées pendant leur écoulement dans les canaux (figure 1c) et leur contenu analysé, en particulier en utilisant des techniques d'analyses optiques par fluorescence (figure 2a). L'ensemble des technologies développées pour la production, la manipulation et l'analyse de ces gouttes et de leur contenu constitue la microfluidique en gouttes (« droplet-based microfluidics »), qui est devenue une branche de la microfluidique extrêmement active au cours de ces quinze dernières années [3]. La raison est simple : une goutte d'eau dans l'huile peut être vue comme un microcompartiment utilisable comme un analogue miniaturisé d'un microréacteur chimique, d'un puit de plaque de microtitration ou d'une boîte de Pétri. La taille de ces microréacteurs (typiquement une dizaine de microns) est parfaitement adaptée à l'encapsulation de cellules individuelles (cancéreuses, souches...) (figure 2b). La microfluidique en gouttes est donc aujourd'hui utilisée dans de nombreuses applications, en particulier pour l'analyse de cellules individuelles, le criblage cellulaire ou le diagnostic moléculaire [3].

Un outil d'analyse

La puissance de la technologie pour ces applications repose sur un ensemble de modules de production et de manipulation de

gouttes : production, incubation, réinjection, division, fusion, pico-injection, tri, etc. En bref, toutes les opérations élémentaires nécessaires dans les procédés chimiques ou les manipulations biologiques ont leur équivalent microfluidique. La taille des gouttes est contrôlable entre un et quelques centaines de microns et va être adaptée aux contraintes de l'expérimentateur. Ces modules de production miniaturisés permettent une manipulation à très haut débit : les cadences peuvent atteindre 1 000 à 10 000 gouttes analysées par seconde en routine. Cette technologie est donc un outil d'analyse puissant permettant par exemple d'obtenir des informations statistiques sur des populations d'objets avec une résolution allant jusqu'à la mesure de l'objet individuel, l'objet pouvant être un gène, une organelle, une cellule... [4]. La technologie microfluidique repose sur un haut degré d'intégration de systèmes. Des systèmes optiques d'analyse de fluorescence à haute vitesse doivent être couplés à des systèmes d'acquisition de données et de prises de décision en temps réels (avec des temps de réponse de l'ordre de la microseconde). Les systèmes microfluidiques eux-mêmes sont microfabriqués et intégrés en utilisant des technologies dérivées de la microfabrication en microélectronique.

Quelles formulations en microfluidique ?

La chimie et la physico-chimie ont un rôle majeur à jouer dans cette intégration pour la formulation de systèmes performants.

Mélanger de l'eau et de l'huile dans les canaux suffit à générer des gouttes. Toutefois, leur stabilité est transitoire et lors de la collision de deux gouttes, les gouttes fusionnent. Cette fusion est spontanée, c'est-à-dire qu'elle correspond à une diminution de l'énergie libre (ici liée à la surface) du système et empêche l'utilisation fiable des gouttes comme microréacteur, le réacteur étant instable. Pour stabiliser les gouttes et permettre leur manipulation, l'utilisation d'un tensioactif est indispensable. En microfluidique, le tensioactif a pour rôle premier de prévenir la coalescence des gouttes et de former une émulsion stable. Le tensioactif à l'interface forme une barrière cinétique à la coalescence des gouttes, soit en augmentant les interactions répulsives entre gouttes, soit en augmentant les temps de drainage des films liquides interstitiels par le changement des conditions aux limites hydrodynamiques (effet Marangoni) [5]. *In fine*, la fusion va être inhibée pendant un temps d'autant plus long que le tensioactif est efficace. Les contraintes de la microfluidique sur la formulation proviennent tout d'abord des petites dimensions des systèmes. La loi de Poiseuille des écoulements à petite dimension implique que la pression nécessaire pour déplacer un fluide à un débit fixé est proportionnelle à la viscosité du fluide. L'huile qui constitue la phase continue du système doit donc avoir une viscosité la plus faible possible pour permettre de déplacer les

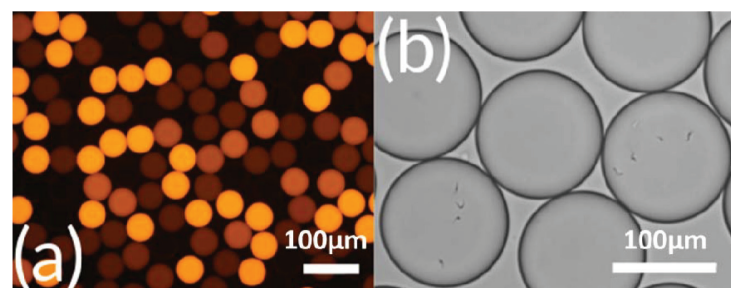


Figure 2 - (a) Cliché en fluorescence d'une émulsion de gouttes contenant différentes concentrations de molécules fluorescentes dans une puce microfluidique (photo T. Beneyton, Univ. Bordeaux, CNRS, CRPP ; échelle 100 µm). (b) Utilisation de gouttes pour l'encapsulation de microorganismes individuels, ici des trypanosomes (photo S. Oldenburg, Univ. Bordeaux, CNRS, CRPP ; échelle 100 µm).

fluides à grande vitesse (contrainte de haut débit) tout en maintenant des pressions faibles (pour éviter les risques de fuites ou de destruction des systèmes). Une seconde contrainte vient des matériaux utilisés pour réaliser les puces (figure 1a). Un matériau très répandu, puisqu'il permet de réaliser des puces simplement dans les laboratoires, est un élastomère silicone, le polydiméthylsiloxane (PDMS). Sa facilité d'utilisation a un coût : sa faible compatibilité avec les solvants organiques. Le PDMS a tendance à gonfler en présence de certains solvants, ce qui endommage les structures. L'huile utilisée doit donc être peu visqueuse et compatible avec le PDMS. Enfin, dernières contraintes, les huiles organiques ou minérales ont en général une faible perméabilité aux gaz. Ainsi, des cellules encapsulées dans les gouttes peuvent se retrouver privées d'oxygène, entraînant leur mort. L'huile doit donc être le plus perméable possible aux gaz. Un effet opposé doit être toutefois obtenu pour les molécules organiques encapsulées dans la goutte : on veut un microréacteur étanche, c'est-à-dire garantissant que les molécules encapsulées restent dans le compartiment. Il faut donc contrôler le coefficient de partage eau/huile de chaque constituant et garantir un partitionnement en faveur de la phase aqueuse pour les molécules impliquées dans les réactions se produisant dans la goutte.

Les huiles fluorées : le mouton à cinq pattes de la microfluidique

Parmi les différentes huiles utilisées, sont à exclure les silicones (compatibilité avec le PDMS) et les hydrocarbures (extraction de molécules par partitionnement). Les huiles fluorées sont aujourd'hui les plus intéressantes et performantes [5]. La plupart des composés organiques y sont faiblement solubles et elles sont biocompatibles, avec une grande capacité de solubilisation des gaz ; elles sont en particulier utilisées comme des substituts sanguins artificiels [6], et sont compatibles avec le PDMS avec des viscosités de l'ordre de celle de l'eau. Les tensioactifs utilisés dans les formulations doivent donc être adaptés aux interfaces eau/huiles fluorées :

- On favorisera un tensioactif soluble dans l'huile et non dans l'eau pour éviter les interactions non contrôlées entre les tensioactifs et les constituants des tests à réaliser. Le rapport surface/volume devenant grand à petite échelle, l'adsorption de molécules à l'interface conduisant à la dénaturation de protéines peut réduire significativement leur activité biologique en diminuant la concentration de molécules actives dans le volume de la goutte [5]. Il est ainsi préférable d'avoir un tensioactif non chargé afin d'éviter les interactions électrostatiques avec les éléments biologiques encapsulés.

- En termes de stabilité, les gouttes peuvent être soumises à des conditions de température extrême. C'est le cas par exemple pour des applications en ddPCR (« droplet digital PCR ») utilisées en diagnostic moléculaire [7]. Les cycles de température utilisés (typiquement une vingtaine de cycles incluant des paliers de température de l'ordre de la minute à 60 et 95 °C) constituent une contrainte importante alors que l'activité interfaciale et les paramètres physico-chimiques du tensioactif sont eux-mêmes fondamentalement dépendants de la température.

- Enfin, le tensioactif lui-même influe sur les propriétés de l'équilibre thermodynamique du système, en particulier en modifiant les coefficients de partage (typiquement entre des valeurs de $\sim 10^{-3}$ - 10^{-1} , variant linéairement avec la concentration en tensioactif entre 0 et 5 % en masse) et favorisant ainsi les échanges de molécules organiques [8]. Une gamme de tensioactifs fluorés s'est finalement imposée permettant de garantir ces propriétés, par exemple à base de perfluoropolyéthers avec différentes têtes hydrophiles alcool,

acide, polyéthylène-oxyde... assurant ainsi le caractère amphiphile pour les interfaces eau/huiles fluorées. Autant que la structure, la pureté des molécules est importante, et des impuretés, même à l'état de traces, peuvent affecter les performances du système [9].

Si ces formulations huiles fluorées/tensioactifs fluorés sont aujourd'hui adaptées à un grand nombre d'applications (analyse de la cellule unique, PCR en gouttes, encapsulation de bactéries...), l'évolution des technologies et les besoins liés à de nouvelles applications permettront encore d'améliorer les performances de ces molécules tensioactives ou de développer des stabilisateurs alternatifs (nanoparticules, gels...) [8]. La translation des résultats de recherche sur ces formulations vers leur industrialisation est également une nécessité pour garantir un approvisionnement suffisant en formulations performantes aux développeurs émergents d'instruments basés sur la microfluidique. C'est dans cette optique par exemple que la startup Emulseo [10], fondée en Région Nouvelle-Aquitaine en 2018, commercialise FluoSurf, un tensioactif fluoré, et développe des solutions de formulations de hautes performances (biocompatibles, reproductibles, stables en conditions extrêmes) pour l'industrialisation de procédés microfluidiques. Aujourd'hui, la technologie microfluidique est de plus en plus utilisée dans le monde, et bien que la consommation de tensioactif au cours d'une analyse soit inférieure au gramme, les besoins des utilisateurs sont de plus en plus croissants. Ainsi Emulseo a rapidement optimisé sa production dès sa création afin de répondre à un volume de commande de presque 500 g. Ce qui reste très modeste en comparaison des volumes prévus pour les années à venir et incite Emulseo à anticiper d'autres améliorations de sa capacité de production, tout en conservant un haut niveau de qualité essentiel pour les applications des utilisateurs (chercheurs en laboratoire, utilisateurs d'équipements microfluidiques). En effet, la qualité et la fiabilité de FluoSurf en font un produit très apprécié pour des applications telles que la PCR digitale (amplification de l'ADN dans des microcompartiments) ou l'isolation et l'analyse de cellules uniques (bactéries, levures, microorganismes...).

Les auteurs remercient l'European Research Council (ERC PoC), la Région Nouvelle-Aquitaine, SATT AST (Aquitaine Science Transfert), AQUITI Gestion, Unitec et Bpifrance, pour leur soutien à la création d'Emulseo.

[1] G.M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature*, **2006**, *442*, p. 368-373, <https://doi.org/10.1038/nature05058>

[2] Les aventures microfluidiques du projet Lutécium, <https://explore.psl.eu/fr/tags/le-projet-lutetium>

[3] L'énergie de la vie tient dans une goutte, *Science et Vie*, fév. **2015**, *1169*, p. 42-58, www.science-et-vie.com/technos-et-futur/l-energie-de-la-vie-tient-dans-une-goutte-48511

[4] A. Huebner *et al.*, Microdroplets: a sea of applications?, *Lab. Chip*, **2008**, *8*, p. 1244-1254, <http://doi.org/10.1039/B806405A>

[5] J.-C. Baret, Surfactants in droplet-based microfluidics, *Lab. Chip*, **2012**, *12*, p. 422-433, <https://doi.org/10.1039/C1LC20582J>

[6] J.G. Riess, M.P. Krafft, Advanced fluorocarbon-based systems for oxygen and drug delivery, and diagnosis, *Artif. Cell. Blood Sub.*, **1997**, *25*, p. 43-52, <https://doi.org/10.3109/10731199709118896>

[7] D. Pekin *et al.*, Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics, *Lab. Chip*, **2011**, *11*, p. 2156-2166, <https://doi.org/10.1039/c1lc20128j>

[8] P. Gruner *et al.*, Stabilisers for water-in-fluorinated-oil dispersions: key properties for microfluidic applications, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2015**, *20*, p. 183-191, <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2015.07.005>

[9] P. Gruner *et al.*, Controlling molecular transport in minimal emulsions, *Nat. Comm.*, **2016**, *7*, art. 10392, <https://doi.org/10.1038/ncomms10392>

[10] www.emulseo.com

Cette fiche a été préparée par **Florine MAES** (maes@emulseo.com) et **Jean-Christophe BARET** (jean-christophe.baret@u-bordeaux.fr ; Université de Bordeaux, CNRS, CRPP, UMR 5031, Pessac), co-fondateurs et respectivement CEO et conseiller scientifique d'Emulseo. Les fiches « Un point sur » sont coordonnées par un comité éditorial mené par Jean-Pierre FOULON (jpfoulon@wanadoo.fr). Elles sont regroupées et en téléchargement libre sur www.lactualitechimique.org/spip.php?rubrique11.