

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE  
UFR D'INFORMATIQUE, ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE  
ET AUTOMATIQUE

en vue de l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE  
Spécialité : Micro et Nano Technologies  
Acoustique et Télécommunications

**CONCEPTION, FABRICATION ET  
CARACTERISATION DE SOURCES  
D'ELECTRONEBULISATION MICRO ET  
NANOFLUIDIQUES EN TECHNOLOGIE SILICIUM**

par

**CEDRIC DESCATOIRE**  
Ingénieur ISEN

Soutenu le 18 Décembre 2009 devant la commission d'Examen :

<b>Président</b>	V. SENEZ	<i>Directeur de recherche au CNRS – IEMN, Villeneuve d'Ascq</i>
<b>Rapporteurs</b>	A. M. HAGHIRI	<i>Directrice de recherche au CNRS – LPN, Marcoussis</i>
	C. BERGAUD	<i>Directeur de recherche au CNRS – LAAS, Toulouse</i>
<b>Examinatrice</b>	A. E. ASHCROFT	<i>Professeur – University of Leeds UK</i>
<b>Directeur de la thèse</b>	L. BUCHAILLOT	<i>Directeur de recherche au CNRS – IEMN, Villeneuve d'Ascq</i>
<b>Co-Directeur de la thèse</b>	S. ARSCOTT	<i>Chargé de recherche au CNRS – IEMN, Villeneuve d'Ascq</i>



*« Le progrès en sciences provient toujours d'une combinaison de pensées décousues et de pensées rigoureuses... cette combinaison est notre outil le plus précieux »*

*Gregory Bateson, Vers une écologie de l'esprit*



# Remerciements

Les travaux de thèse présentés dans ce mémoire ont été réalisés à l'IEMN (Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie) dirigé par Monsieur Alain CAPPY, plus particulièrement au sein du Département ISEN (Institut Supérieur de l'Electronique et du Numérique), dirigé par Monsieur Didier STIEVENARD. A ce titre, je tiens à les remercier pour m'avoir accueilli au sein de leurs locaux.

Je remercie Monsieur Vincent SENEZ, Directeur de Recherche CNRS, responsable du groupe BIOMEMS, qui a accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie également Madame Anne-Marie HAGHIRI, Directrice de Recherche CNRS au LPN (Laboratoire de Photonique et de Nanostructures), et Monsieur Christian BERGAUD, Directeur de Recherche CNRS au LAAS (Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes) pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en ayant bien voulu accomplir la lourde tâche de rapporteur.

Je tiens également à remercier sincèrement Dominique COLLARD, Directeur du LIMMS (Laboratory of Integrated Micro Mechatronic Systems) d'avoir éveillé en moi un intérêt pour les MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) lorsque j'ai suivi ses cours d'introduction sur ce fabuleux domaine durant ma formation d'ingénieur à l'ISEN.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Lionel BUCHAILLOT, Directeur de Recherche CNRS, responsable du groupe NAM6 (ex Microsystèmes Silicium) et Directeur de cette thèse, pour son suivi, pour la confiance, l'autonomie et la grande liberté de choix et d'actions qu'il m'a accordées dans l'organisation et les orientations de ce travail de thèse.

Je remercie plus particulièrement mon co-Directeur de thèse, Steve ARSCOTT, Chargé de Recherche CNRS, qui est à l'origine de ce sujet. Merci pour avoir largement contribué à ma formation et m'avoir fait partager ta grande expérience en microfluidique. Ton enthousiasme

a été une grande source de motivation. J'ai vivement apprécié ton dynamisme, tes innombrables conseils et suggestions, ta sincérité, le temps que tu as passé à encadrer ces travaux, même si tu aurais voulu en consacrer un peu plus si tu n'avais pas été aussi accaparé par le projet SHARP. Et enfin, merci de m'avoir stimulé pour développer une collaboration pour la spectrométrie de masse, écrire des articles, participer à des conférences et ainsi me permettre de découvrir de nouveaux pays comme l'Angleterre, la Suisse et les Etats-Unis.

Grand merci à Bernard LEGRAND, Chargé de Recherche CNRS et membre de l'équipe NAM6, pour la pertinence de ses remarques lors de l'élaboration du procédé de fabrication.

Je ne saurais oublier tout ceux qui sont dans l'ombre derrière les projecteurs : le personnel des salles blanches de l'IEMN. Vous avez contribué à ce travail en participant de près ou de loin à la réalisation de certaines étapes de mes procédés de fabrication et sans vous ce travail n'aurait pu aboutir. Je pense en particulier à David TROADEC pour toutes les heures qu'il a passé devant son FIB afin de façonner mes dispositifs. Michel MULLER, Marc FRANCOIS et Yves DEBLOCK pour leur grande expérience en lithographie électronique et la patience dont ils ont fait preuve pour réaliser tous mes essais. Pascal TILMANT pour ses conseils très précieux en lithographie optique. Patricia LEFEBVRE et Jérôme DELVA pour les multiples dépôts d'oxyde et de polysilicium très longs. Annie FATTORINI et André LEROY pour mes dépôts métalliques. Christophe BOYAVAL pour son expertise et sa dextérité à prendre de beaux clichés au Microscope Electronique à Balayage. Denis TONDELIER et Dominique DERESMES pour les images au Microscope à Force Atomique. Je n'oublie pas Elisabeth DELOS pour son aide précieuse à la mise en place du banc de tests pour la réalisation des caractérisations courant-tension.

Merci à tous pour avoir été à mon service et de vous être investis quotidiennement afin de mettre à ma disposition des équipements de qualité et tout ce dont j'avais besoin pour faire en sorte que tout aille pour le mieux dans la réalisation de ce travail.

Certains résultats de ce travail ont nécessité une collaboration avec Alison E. ASHCROFT, responsable du spectromètre de masse à Leeds au Astbury Centre for Structural Molecular Biology. Je la remercie pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de la thèse, pour sa disponibilité et la patience dont elle a fait preuve lors de la caractérisation des dispositifs en spectrométrie de masse.

Merci aussi à tous les autres membres de l'équipe, passés et présents, pour les discussions constructives et leur contribution à l'ambiance de travail chaleureuse et conviviale.

Merci à toutes les autres personnes non citées ci-dessus que j'ai croisées au cours de ces années en salle blanche, dans les couloirs de l'IEMN, ou encore à l'occasion de la pause déjeuner, pour le partage de leur savoir et les moments agréables que l'on a vécus. Je tiens à distinguer plus particulièrement Sophie BARBET et François VAURETTE, mon partenaire de musculation (avec qui j'avais pu retrouver le summum de ma forme !), pour leur soutien et amitié très précieuse.

Il me reste à remercier toute ma famille en particulier mes parents, mes grands-parents et mon frère. Je voudrais exprimer ici toute ma gratitude à mes parents pour leur amour, leurs encouragements, leur patience, leur soutien moral et matériel. Merci d'avoir toujours été à mes côtés quand j'en avais besoin, merci de m'avoir apporté tout ce dont j'avais besoin, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous dédie cette thèse et vous décerne le titre des meilleurs parents du monde.



## ***RESUME***

La protéomique, c'est-à-dire l'étude de la structure tridimensionnelle des protéines codées par le génome et des modifications qu'elles subissent, sous l'influence de l'environnement, des maladies et des médicaments, suscite un grand intérêt pour la communauté scientifique. La compréhension des changements dans l'expression des protéines est un enjeu important car ils pourraient être utilisés comme un indicateur biologique pour la détection des maladies et l'évaluation des effets thérapeutiques d'un médicament. Mais à ce jour, peu d'entre elles ont été caractérisées, leur nombre considérable nécessitant des analyses plus rapides, par le développement de dispositifs compatibles avec l'automatisation et intégrant de nombreuses fonctions : les laboratoires sur puce (LOC). La spectrométrie de masse apparaît comme la technique d'analyse la plus puissante pour les recherches en protéomique. Elle repose sur l'ionisation d'un liquide émis par une source d'électronébulisation sous forme de fines gouttelettes recueillies par un spectromètre qui procède à l'identification des protéines présentes. Cependant, les sources actuelles souffrent de nombreux inconvénients: dimensions mal contrôlées, incompatibilité avec l'automatisation et les LOC. Dans ce contexte, les micro et nanotechnologies ont été mises en œuvre pour la fabrication en masse peu coûteuse de nouvelles sources miniaturisées en silicium, intégrables dans un LOC. Les caractérisations montrent qu'elles offrent une meilleure sensibilité et une étude approfondie de l'émission des gouttelettes est proposée afin de mieux contrôler l'électronébulisation en vue d'autres applications comme l'écriture directe par nanolithographie.

## ***ABSTRACT***

Proteomics, i.e. study of three-dimensional structure of proteins encoded by genome and their alterations under the influence of environment, diseases and drugs, is of great interest for the scientific community. Understanding of changes in proteins expression is an important challenge as they can be used as a biological indicator for illnesses and drug therapeutic effects estimation. But nowadays, only few of them have been characterized, their considerable number requiring faster analysis, with the development of devices compatible with automation and integrating numerous functions: lab on a chip (LOC). Mass spectrometry appears to be the most powerful tool for proteomics researches. It relies on ionisation of a liquid by an electrospray source emitting tiny droplets collected by a mass spectrometer which carries out proteins identification. However, usual sources suffer from numerous drawbacks:

poor control of dimensions, incompatibility with automation and LOC. In this context, we have made use of micro and nanotechnologies for new low cost miniaturized silicon sources mass fabrication, integrable in LOC. Characterizations show that these sources are more sensitive and a thorough study of droplets emission is suggested in order to enhance electro spraying control with the aim of other applications as direct writing by nanolithography.

**Mots-clés :** microfluidique, biopuce, spectrométrie de masse avec ionisation électrospray, protéomique, lithographie par faisceau d'électrons, gravure par plasma, microfabrication.

# Tables des matières

INTRODUCTION.....	13
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	24
<b>CHAPITRE 1.....</b>	<b>31</b>
<b>COUPLAGE DES SYSTEMES MICROFLUIDIQUES A UN SPECTROMETRE DE MASSE : ETAT DE L'ART</b>	
<i>Resume</i> .....	31
INTRODUCTION .....	32
1- MATERIAUX ET PROCEDES DE FABRICATION UTILISES AFIN DE REALISER DES PUCES MICROFLUIDIQUES .....	34
2- EVOLUTION DES SOURCES D'IONISATION.....	35
2-1 Sources d'ionisation constituées par la sortie d'un microcanal ouvert sur la tranche d'un substrat.....	35
2-2 Sources d'ionisation constituées par l'insertion d'un capillaire.....	47
2-3 Sources d'ionisation micro-fabriquées.....	62
2-3-1 Fabrication série de puces comportant des sources d'ionisation intégrées .....	63
2-3-1-1 Sources en polycarbonate .....	63
2-3-1-2 Sources en PMMA.....	66
2-3-1-3 Sources en PET.....	70
2-3-2 Fabrication parallèle de puces comportant des sources intégrées.....	72
2-3-2-1 Sources en nitrure de silicium.....	72
2-3-2-2 Sources en parylène.....	73
2-3-2-3 Sources en PDMS.....	75
2-3-2-4 Sources en Zeonor .....	76
2-3-2-5 Sources en polyimide.....	78
2-3-2-6 Contexte de l'étude à l'ITEMN.....	80
2-3-2-7 Sources en Silicium.....	85
CONCLUSION .....	92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	93
<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>99</b>
<b>CONCEPTION ET REALISATION DES MICRO ET NANO-SOURCES D'ELECTRONEBULISATION</b>	
<i>Resume</i> .....	99
INTRODUCTION .....	100
1- REGLES DE CONCEPTION ET FONCTIONNEMENT DES SOURCES D'ELECTRONEBULISATION .....	101
1-1 Géométrie et matériau de la source .....	101
1-2 Remplissage spontané des sources.....	105
2- VOIES TECHNOLOGIQUES EXPLORÉES POUR LA FABRICATION DES MICRO ET NANO-SOURCES D'ELECTRONEBULISATION .....	106
2-1 Fabrication par gravure ionique réactive (RIE) chlorée .....	106
2-1-1 Micro-sources .....	106
2-1-2 Nano-sources .....	111

2-2 Fabrication par gravure ionique réactive profonde (DRIE).....	123
2-2-1 Micro-sources .....	123
2-2-2 Nano-sources .....	134
CONCLUSION .....	138
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	142
<b>CHAPITRE 3.....</b>	<b>147</b>
<b>CARACTERISATION DES SOURCES D'IONISATION PAR ELECTRONEBULISATION</b>	
<i>Resume</i> .....	147
INTRODUCTION .....	148
1- CARACTERISATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE .....	149
1-1 Sources commerciales en verre borosilicaté .....	157
1-2 Résultats obtenus pour les micro-sources .....	173
1-3 Résultats obtenus pour les nano-sources .....	180
1-3-1 Nano-source 1 : largeur du canal 200nm .....	180
1-3-2 Nano-source 2 : largeur du canal 50nm.....	182
1-3-3 Nano-source 3 : largeur du canal 100nm .....	186
2- CARACTERISATION DU NEBULISAT PAR MICROSCOPE A FORCE ATOMIQUE (AFM).....	189
2-1 Protocole expérimental.....	189
2-2 Détermination de la taille des gouttelettes .....	194
2-3 Estimation du débit de la source.....	195
2-4 Estimation de la valeur de la tension et du champ électrique d'électronébulisation.....	197
CONCLUSION .....	203
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	204
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>207</b>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	218
<b>LEXIQUE.....</b>	<b>219</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>223</b>
1- MATERIAUX ET TECHNOLOGIES DE FABRICATION .....	223
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	225
2- APPLICATIONS DU FIB.....	233
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	237
3- SCRIPTS DES SIMULATIONS SOUS MAPLE .....	237
4- PROCEDE DE FABRICATION AU MASQUEUR ELECTRONIQUE DES NANO-SOURCES.....	239
5- LISTE DES PUBLICATIONS .....	249

# Introduction

Ces cents dernières années ont été marquées par un développement technologique sans précédent grâce à l'apparition d'une science nouvelle : l'électronique. Fleming en est l'initiateur avec l'invention, en 1904, du premier composant : la diode, qui permet le redressement du courant alternatif dans un tube à vide [Fle 04]. Il faudra ensuite attendre un peu plus de quarante ans avant que le fruit du travail de William Schokley et de son équipe ne révolutionne ce domaine en donnant naissance, en 1947, à un composant étrange, sorte d'araignée à trois pattes, capable de remplir des fonctions diverses : le transistor (prix Nobel en 1956) [Bar 50]. L'arrivée de ce petit composant de faible consommation marque le départ de la course à la miniaturisation. Afin de résoudre les problèmes d'assemblage posés par les transistors, de gros efforts technologiques sont alors entrepris et les premières technologies planaires voient le jour sous la houlette de Jack Kilby, qui en 1958, associe sur un support en germanium des résistances et des condensateurs connectés entre eux : le premier circuit intégré est né (prix Nobel en 2000) [Kil 64].

Dès les années 70, ces technologies sont mises au service du développement d'un nouveau type de dispositifs : les microsystèmes. Le premier en son genre ayant vu le jour est un accéléromètre utilisé comme capteur de déclenchement d'airbag qui équipe aujourd'hui la majeure partie du parc automobile mondial. Depuis, ce nouveau domaine a suscité bon nombre de recherches et trouvé de nombreuses applications comme par exemple les micro-miroirs pour les vidéoprojecteurs ou encore les micro-interrupteurs pour les télécommunications, etc.

Si le 20<sup>ème</sup> siècle a été celui de la microélectronique, le 21<sup>ème</sup> siècle sera certainement celui des nanosciences. En effet, d'autres domaines tels que la chimie, la biologie et la médecine héritant de ces nouvelles technologies de micro-fabrication, ne sont pas en reste et n'échappent pas à cette course effrénée à la miniaturisation comme en témoigne le nombre faramineux de publications mondiales dans les revues scientifiques de référence (Analytical Chemistry, Electrophoresis, Chemical Review, Nature, Science, Journal of Mass Spectrometry, Biochemistry Journal, Journal of Chromatography, Cellular and Molecular Life

Sciences...) et l'apparition du premier système miniaturisé d'analyse de gaz par chromatographie (Cf. lexique) sur un substrat de silicium en 1979 : c'est le début de la microfluidique [Ter 79]. Il faudra ensuite attendre dix ans pour voir l'émergence du premier laboratoire sur puce en 1990 [Man 90]. Dans le même temps, la microfluidique commence à investir notre vie quotidienne sans que l'on ne s'en aperçoive forcément avec l'application la plus familière : l'impression à jet d'encre qui révolutionne l'impression à domicile. Depuis, l'évolution des technologies en microfluidique afin de développer des outils d'analyse chimique et biologique pour les sciences du vivant et la médecine reflète celle de l'industrie microélectronique dans la conquête du dispositif "plus petit, plus rapide et moins cher" [Ver 00] [Lau 01] [Rey 02 a] [Rey 02 b] [Kri 01]. Cet engouement s'explique par le succès des méthodes analytiques au format capillaire (électrophorèse (Cf. lexique), chromatographie...) qui a conduit à miniaturiser davantage les dispositifs afin d'améliorer la sensibilité et la résolution des analyses. Par ailleurs, la course au séquençage du génome humain, rapidement suivi par le protéome ont rendu nécessaire le développement d'outils d'analyse à haut débit hautement parallélisables.

Le terme protéome d'origine anglo-saxonne a été inventé en 1994 par Mark Wilkins de l'Université de Macquarie à Sydney pour décrire l'ensemble des protéines (Cf. lexique) exprimées dans une cellule, une partie d'une cellule (membranes) ou un groupe de cellules (organe, organisme, groupe d'organismes) dans des conditions données et à un moment donné [Wil 96 a]. Alors que les gènes codent les instructions, les protéines les exécutent pour assurer le fonctionnement cellulaire. En effet, la plupart des fonctions biologiques sont accomplies par les protéines et pour comprendre comment les cellules et notre organisme fonctionnent, il faut étudier les protéines mises en jeu, ce qu'elles font et comment elles interagissent entre elles. Cette nouvelle discipline appelée protéomique ou étude du protéome inclut l'identification, la caractérisation et la quantification de l'ensemble des protéines exprimées par le génome (Cf. lexique) durant la vie d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme ainsi que la compréhension de l'influence des maladies et des médicaments sur l'expression des protéines. Ce domaine intéresse donc de plus en plus la communauté scientifique afin de mieux comprendre le fonctionnement cellulaire à partir de l'expression protéique.

La protéomique est devenue un outil indispensable pour la recherche médicale que ce soit à des fins thérapeutiques, pour établir un diagnostic ou la recherche sur les cellules. De

nombreux projets sur le protéome consistent à générer des bases de données incluant des cartographies de protéines de plasma humain, d'urine, de liquide cébrospinal et des tissus comme les seins, le cœur, la vessie, etc. Les applications biomédicales sont le développement de nouveaux médicaments, la détection de troubles neurologiques, de troubles infectieux, de troubles cardiaques ou encore des cancers.

En effet, la plupart des médicaments exercent leurs effets sur les protéines. Lorsqu'une lésion spécifique génétique est identifiée, le changement résultant dans la structure, la fonction ou l'expression de la protéine est mis en évidence de telle manière qu'un médicament pour corriger de telles aberrations soit conçu [Dru 00].

Au niveau neurologie, le diagnostic neuropathologique de la maladie de Creutzfeld-Jakob ne peut se faire actuellement que par autopsie du cerveau post mortem. L'objectif est donc la recherche d'un diagnostic et de tests de dépistage qui pourraient être utilisés avant la mort. Ainsi, l'analyse du liquide cébrospinal a permis de révéler deux protéines désignées par "p130" et "p131" dont la présence pourrait être utilisée pour distinguer la maladie de Creutzfeld-Jakob et les autres types de démence avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 99% [Har 86].

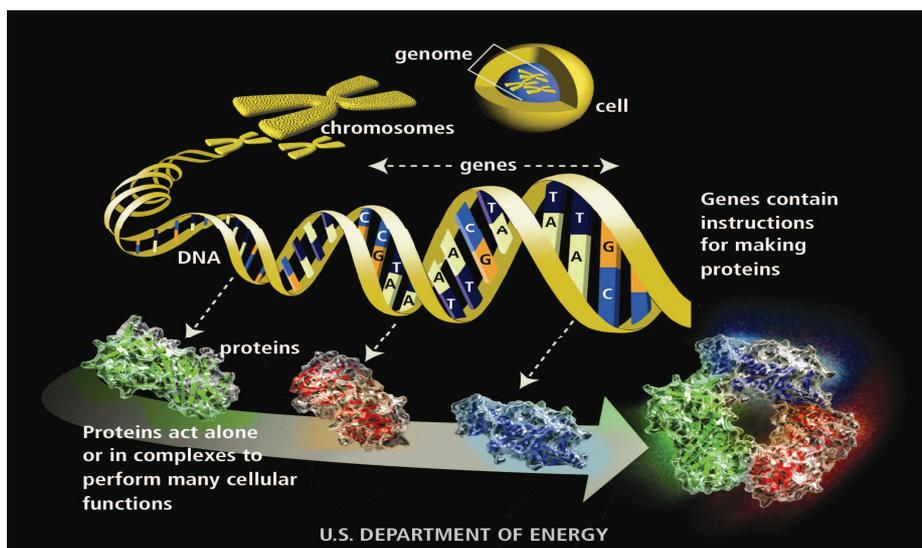
Concernant les maladies infectieuses, l'objectif de la plupart des études est la recherche de nouveaux marqueurs de diagnostic, d'antigènes (Cf. lexique) pour les vaccins. La bactérie responsable de la tuberculose est probablement le micro-organisme le plus étudié. La tuberculose continue en effet de tuer plus de deux millions de personnes par an, par conséquent une priorité internationale est d'améliorer le diagnostic et de développer un vaccin plus efficace. Le vaccin communément appelé BCG a une efficacité allant de 0% dans le sud de l'Inde à 70% au Royaume-Uni. Des groupes de recherche ont donc mené des études sur des animaux pour développer un vaccin efficace en caractérisant les protéomes des micro-bactéries, en particulier les protéines secrétées [And 95] [Wel 98] et après plusieurs tests sur le corps humain, plusieurs des antigènes identifiés lors de ces études ont maintenant été incorporés dans les vaccins [Orm 99].

Les problèmes cardiaques sont une des principales causes de mortalité dans les pays développés. Les pathologies du dysfonctionnement cardiaque sont encore mal connues, mais une approche basée sur la protéomique visant à caractériser tous les changements dans l'expression des protéines lors des défaillances ou maladies cardiaques pourrait permettre de comprendre le mécanisme cellulaire impliqué dans les dysfonctionnements cardiaques avec des nouveaux marqueurs de diagnostic et de nouvelles opportunités thérapeutiques. Une

centaine de protéines ont été identifiées et les études montrent que l'expression de ces protéines est significativement différente et leur nombre diminue dans un cœur malade comparé à un cœur sain [Cor 98] [Kne 94] [Ple 97].

Enfin pour terminer, une multitude d'études basées sur les protéines pour la recherche concernant les cancers [Ala 00], comme par exemple celui de la vessie [Ost 97] [Cel 99], ont été menées et ont permis d'identifier les marqueurs tumoraux qui sont utilisés actuellement afin d'établir un diagnostic [Sel 90].

Cependant, la nature versatile du protéome rend ces études complexes comparées à celles ayant permis de réaliser la cartographie du génome. En effet, si le génome est plus ou moins stable dans les cellules d'un organisme, le protéome lui est dynamique et varie temporellement et spatialement en réponse à des stimuli internes et externes provoqués par les interactions biochimiques avec le génome, l'environnement, les médicaments et les maladies [Tye 03] (Figure 1).



**Figure 1** : Représentation des interactions entre le protéome et le génome.

De ce fait, la taille et la complexité du protéome est bien plus importante que celle du génome. Si le nombre total de gènes chez l'homme n'est pas connu, il a été estimé entre 20 000 et 25 000 [Pea 03] et des études préliminaires montrent que chacun de ces gènes peut être à l'origine de la production de trois à six protéines différentes, ce qui signifie que le

nombre de protéines produites serait compris entre 60 000 et 150 000 et le nombre de protéines modifiées entre 500 000 [Wil 96 b] et plus de 2 000 000 [Spe 03]. Ainsi, la plupart des protéines sont encore à ce jour inconnues.

L'identification et la caractérisation des protéines peuvent être réalisées en utilisant la spectrométrie de masse dont les prémices remontent aux études de Thomson [Tho 13] et de son étudiant Aston [Ast 33] au début du siècle dernier. Il s'agit d'une technique utilisée afin de déterminer la composition d'un échantillon grâce à un spectre de masse généré par un spectromètre. Elle repose sur le processus d'électronébulisation qui permet de produire à partir d'une solution des gouttelettes de liquides microscopiques électriquement chargées et contenant des biomolécules sous l'application d'un champ électrique élevé [Fig 01]. C'est un phénomène étudié par la communauté scientifique depuis plus d'une centaine d'années maintenant.

Depuis sa découverte au milieu du 18<sup>ème</sup> siècle, l'atomisation électrostatique d'un liquide est passée du stade de curiosité scientifique au stade d'outil incontournable pour la recherche en protéomique et a donné lieu en passant à de nombreuses applications dans d'autres domaines tels que : la peinture, l'impression, la génération de nanoparticules [Kru 98] ou de points quantiques et le dépôt de fins films de matériaux inorganiques, organiques ou biologiques [Che 96] [Hoy 96] [Thu 92] [Mor 98] [Mor 99] [Uem 04].

Dès 1600, l'effet de l'électricité sur un liquide a été abordé par Gilbert qui a noté qu'une gouttelette d'eau au repos adoptait une forme conique à proximité d'ambre ayant été frotté [Gil 00].

En 1745, dans ses expériences menées avec des liquides électrisés, Bose a noté qu'un liquide s'écoule plus rapidement sous l'influence de l'électricité [Bos 45].

Nollet a conclu que l'électricité accélère l'écoulement des liquides à travers les capillaires, cet effet devenant plus important avec la réduction du diamètre du capillaire. En 1753, il a publié ses observations expérimentales menées avec un montage reprenant les composants basiques de l'électronébulisation moderne [Nol 53].

En 1879, Lord Rayleigh a été le premier scientifique à étudier l'effet de l'électricité sur les gouttes d'eau en vue d'applications en météorologie [Lor 79]. Dès 1882, il a décrit l'instabilité d'une gouttelette de liquide chargée [Lor 82].

Par la suite, d'autres scientifiques se sont intéressés aux comportements des gouttes d'eau dans les orages. La rupture des gouttes est l'une des raisons de la séparation des charges

dans les nuages conduisant à la formation des éclairs dans les orages. Zeleny a été le premier à dépeindre la richesse du phénomène d'électronébulisation en 1914 à l'Université du Minnesota. Lors de ses premiers travaux de recherche, Zeleny a introduit un liquide dans un capillaire en verre ayant un diamètre de 500 $\mu\text{m}$  et soumis à une tension élevée et une faible pression. Il a étudié les effets du liquide et du gaz environnant. Son premier compte rendu présente une analyse complète du comportement du nébulisat en fonction de la tension appliquée et de la pression du liquide [Zel 14]. Par la suite, il a identifié les gouttelettes de liquide chargées comme étant à l'origine du courant mesuré au niveau de la contre-électrode [Zel 15]. Deux ans plus tard, il présente les premières photos instantanées de l'équilibre entre les forces hydrodynamiques et les forces électriques à l'extrémité d'un capillaire [Zel 17].

En 1941, la première application de l'électronébulisation est brevetée par Harold Ransburg. Il s'agit du procédé de dépôt de peinture par voie électrostatique qui a rencontré un succès immédiat dans l'industrie automobile [Ran 41].

Dans les années 60, la production de systèmes de propulsion spatiaux basés sur l'électronébulisation a été à l'origine de recherches intenses. La capacité des propulseurs à délivrer des poussées de l'ordre de quelques micro-Newtons est nécessaire pour le contrôle des petits satellites et mener à bien les missions spatiales pour lesquelles un positionnement très précis des engins spatiaux est requis.

En 1961, Edward Law a introduit l'électronébulisation pour les pesticides afin d'améliorer l'efficacité des épandages et ainsi réduire les effets néfastes pour l'environnement.

Quelques années plus tard, en 1964, Taylor [Tay 64] a été le premier à donner une description analytique de l'électronébulisation. D'autres l'ont suivi des années plus tard [Gáñ 97] [Har 00] [Kel 78] [Har 98].

Un an plus tard, l'impression électrostatique à jet d'encre a été introduite par Sweet en 1965 pour l'enregistrement des ondes sur les oscillographes [Swe 65].

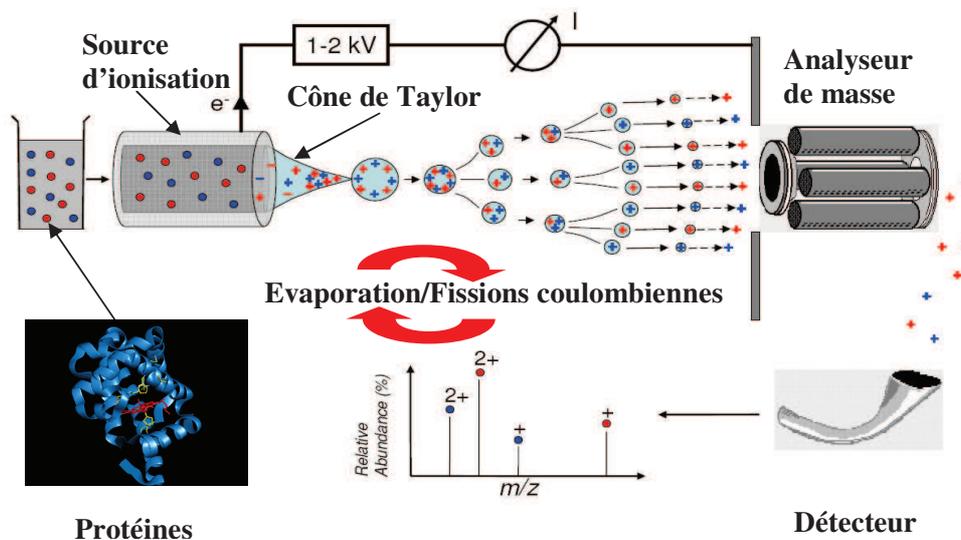
A la fin des années 60, à l'Université de Northwestern, Dole a été le premier à générer par électronébulisation un faisceau moléculaire de macro-ions à partir d'une solution de macromolécules en utilisant une aiguille hypodermique en acier inoxydable ayant un diamètre de 200 $\mu\text{m}$  [Dol 68].

En 1983, Bellan a suggéré d'électronébuliser le carburant dans le moteur diesel des voitures. La réduction de la taille des gouttelettes injectées permet d'améliorer l'efficacité de la combustion et réduire la formation de suie qui encrasse les moteurs [Bel 83].

Ce n'est que dans le milieu des années 80 que le groupe de Fenn à l'Université de Yale, a couplé l'électronébulisation à la spectrométrie de masse en utilisant des aiguilles hypodermiques en acier inoxydable ayant un diamètre de 100 $\mu$ m (prix Nobel en 2002) [Yam 84 a] [Yam 84 b] [Fen 89].

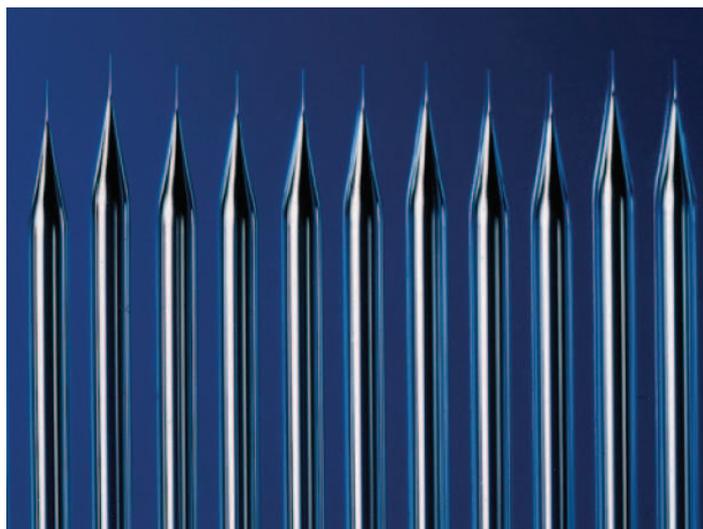
Dans les années 90, le concept de nano-électronébulisation a été introduit par Wilm et Mann qui ont utilisé des sources en forme d'aiguille à base de silice ayant un diamètre de 1 à 10 $\mu$ m permettant des débits de 25 à 100nL.min<sup>-1</sup> [Wil 94].

Ces évolutions ont révolutionné le domaine de la spectrométrie de masse par ionisation reposant sur le principe d'électronébulisation en permettant l'analyse structurale de masses moléculaires pratiquement illimitées [Aeb 03 a]. Cela en fait la technique la plus puissante pour l'identification, la caractérisation et le séquençage des protéines et peptides [Tye 03] [Aeb 03 b] [Aeb 01] [Ber 02] [Pen 01] [Fig 03] [And 00]. En effet, les études sont menées sur de petites quantités d'échantillons biologiques obtenues après des étapes d'extraction et de traitement et par conséquent, nécessitent des techniques d'analyse très sensibles. La spectrométrie de masse par électronébulisation répond à ce critère de sensibilité [Wil 96]. De plus, elle se montre particulièrement intéressante pour travailler avec des échantillons de protéines car c'est une méthode d'ionisation douce caractérisée par une faible tension de fonctionnement ( $\sim$ 1-2kV) et un bas débit (nL.min<sup>-1</sup>). Elle est donc parfaitement appropriée à l'étude de ces grosses biomolécules puisqu'il s'agit d'un procédé non destructif permettant une analyse de macromolécules non fragmentées. En effet, les substances restent biologiquement actives après l'électronébulisation si le courant reste inférieur à 500 nA. La solution échantillon est introduite dans une source constituée d'un long tube capillaire effilé en verre ou en métal. L'échantillon est ionisé en appliquant une tension entre le revêtement conducteur de la source contenant le liquide et l'entrée d'un spectromètre de masse. Cette tension entraîne à l'extrémité du capillaire la formation d'un cône de Taylor dont la base est déterminée par le diamètre externe de la source étant donné sa nature hydrophile (métal, verre) [Tay 64]. Lorsqu'au sommet du cône de Taylor le champ électrique atteint une valeur critique, les forces électrostatiques deviennent plus importantes que la tension de surface du liquide résultant en l'émission de petites gouttelettes électriquement chargées (nébulisat) [Lor 82]. Après l'émission des gouttelettes, une succession d'étapes d'évaporation des solvants et de fissions coulombiennes s'enchaînent, donnant naissance à des biomolécules chargées en phase gazeuse. Les ions sont ensuite séparés en fonction de leur ratio masse sur charge ( $m/z$ ) dans l'analyseur de masse et le détecteur enregistre leur abondance relative (Figure 2).



**Figure 2 :** Représentation schématique du procédé de spectrométrie de masse par ionisation reposant sur le principe d'électronébulisation.

La forme et le procédé de fabrication des sources utilisées dans le monde entier comme interface standard pour les analyses en spectrométrie de masse par électronébulisation n'ont pas été changés depuis plus de dix ans. Ces sources sont produites par chauffage, étirement et rupture d'un tube capillaire en verre ou en silice afin d'en effiler l'extrémité puis recouvertes d'un revêtement conducteur. De telles techniques donnent des sources présentant un orifice de sortie ayant un diamètre de l'ordre de 1 à  $10\mu\text{m}$  [Wil 94] [Wil 96] [Val 95] [Val 96] (Figure 3).



**Figure 3 :** Photo de sources d'ionisation commerciales standard fabriquées par chauffage, étirement et rupture d'un tube capillaire de verre.

Cependant, ces sources capillaires présentent un certain nombre de faiblesses. Tout d'abord, le procédé de fabrication n'est pas très bien contrôlé et conduit par conséquent à la production de sources peu robustes, dont les dimensions ne sont pas reproductibles pouvant se refléter dans la qualité des analyses par modification des conditions expérimentales. En effet, lors de son utilisation, la source est d'abord chargée avec l'échantillon en utilisant une micropipette. Afin de permettre l'analyse de l'échantillon, elle est ensuite placée devant l'entrée du spectromètre de masse sur laquelle l'extrémité est cassée résultant en un profil irrégulier de l'orifice et des dimensions aléatoires [McL 98]. Cette méthode d'ouverture de l'extrémité de la source est un procédé hasardeux non reproductible entraînant un débit non calibré de l'échantillon [Fen 00]. Cet inconvénient peut être réduit en incluant une étape de micro-usinage laser, cette technique permettant d'améliorer la reproductibilité et la qualité des sources. Cependant, cette opération n'est pas envisageable sur un grand nombre de sources et entraîne un accroissement du coût de fabrication de celles-ci. Le micro-usinage laser n'est donc pas utilisé de manière systématique dans les laboratoires pour les analyses. Un deuxième inconvénient est la détérioration du revêtement conducteur au point d'application de la tension élevée lors de l'utilisation [Fen 00] [Nil 01]. Différentes améliorations concernant la qualité des sources ont été proposées dans la littérature. Des revêtements plus stables ont été mis en œuvre mais ces améliorations ne résolvent pas le manque de reproductibilité des conditions d'analyse [Bar 99] [Gos 91] [Kri 95]. Un troisième inconvénient de ces sources en forme d'aiguille est leur géométrie qui impose un processus entièrement manuel pour le chargement de l'échantillon et nécessite par conséquent des personnes expérimentées pour la préparation des analyses [McL 98]. En effet, l'analyse peut être affectée par la présence d'éventuelles bulles d'air qui entraîne la perte du signal. Ces sources se montrent donc incompatibles avec l'automatisation des analyses, cruciale pour la protéomique. Ensuite, ces sources n'étant pas compatibles avec la production de masse, c'est-à-dire la fabrication de plusieurs dispositifs sur un seul support, leur coût de production reste relativement élevé. Enfin, elles présentent de faibles possibilités d'intégration avec les laboratoires sur puce car elles ne sont pas compatibles avec les microtechnologies employées lors de la fabrication des microsystèmes [Mog 04].

Face à l'ensemble de ces problèmes et à l'accroissement rapide du nombre d'échantillons à analyser, la communauté scientifique a été amenée à développer de nouveaux dispositifs d'analyse à haut débit automatisables [Tye 03] [Aeb 03 a]. Ainsi, l'utilisation des microtechnologies afin de fabriquer des microsystèmes d'analyse totale ou laboratoires sur puce est apparue comme étant la clé du problème [Rey 02 a] [Aur 02] [And 03] [Fig 01]

[Vol 99] [Aeb 03 a] [Sho 90] [Van 93] [Ric 97]. Ces dispositifs miniaturisés présentent un grand intérêt car ils nécessitent peu de manipulations, les étapes de traitements préalables à l'analyse (dessalage, chromatographie...) pouvant être intégrées avec la source sur le système [Mar 03] [Lio 03]. En plus de l'automatisation, la réduction des dimensions permet également d'augmenter la cadence des analyses grâce à l'utilisation de plus petits volumes de réactifs et à la parallélisation des analyses [Fig 00] [Gue 00] [Mou 01] [Kha 02]. D'autre part, le coût de revient des analyses est amoindri grâce à la réduction de la consommation et des contaminations des échantillons.

Ainsi, l'utilisation des microtechnologies afin d'améliorer le processus de fabrication des sources d'ionisation s'est rapidement développée [Gri 02] [Lin 99]. Les principaux avantages des sources micro-usinées par rapport à leurs homologues en borosilicate sont en terme de fabrication: (i) la production sur un même support de sources reproductibles de grande qualité prêtes à l'emploi en grande quantité [Xue 97] [Liu 00], ce dernier point est particulièrement important en terme de coût [Man 01], (ii) une compatibilité avec les laboratoires sur puce grâce au choix de la géométrie et à la richesse des matériaux, concepts et procédés envisageables afin de permettre leur intégration avec d'autres composants microfluidiques (ex : colonne de chromatographie) [McC 00] [Har 93] [Jac 95] [Boo 02] [Ros 02]. Les avantages en terme de performances sont : (i) de meilleures conditions d'analyse, (ii) une plus grande sensibilité de détection, (iii) une réduction du volume des échantillons et des réactifs consommés liée à la géométrie éliminant les volumes morts et à la diminution de la taille de la source à des dimensions microniques ou submicroniques améliorant l'efficacité d'ionisation [Rey 02 a] [Kha 02] [Lau 01] , (iv) une reproductibilité d'une analyse à l'autre, (v) une compatibilité avec la robotisation grâce à une géométrie adaptée, (vi) la possibilité de disposer de systèmes complexes portables.

Un certain nombre de sources microfabriquées ont déjà été décrites dans la littérature. Elles sont constituées de différents matériaux et résultent de procédés technologiques variés. Cependant, il ne s'agit que de prototypes de laboratoire, parmi celles-ci, aucune n'apparaît comme l'interface d'électronébulisation idéale satisfaisant à tous les critères exigés par la protéomique permettant d'envisager une commercialisation et une utilisation massives. Par conséquent, le développement de nouveaux outils compatibles avec l'utilisation de la robotique est indispensable afin de pouvoir mener la multitude d'analyses par spectrométrie de masse permettant de faire progresser la recherche en protéomique [Aeb 03 a]. Ainsi, à

l'heure actuelle, la fabrication par la voie des microtechnologies d'interfaces d'électronébulisation fiables présentant des performances similaires ou meilleures que les aiguilles usuelles à base de silice reste un défi majeur, que ce soit d'un point de vue scientifique ou technologique.

Ce travail de thèse porte donc sur des développements dans le domaine de la microfluidique avec la conception et la mise en œuvre de sources d'ionisation intégrables avec les laboratoires sur puce dédiés à une analyse à haut débit d'échantillons protéomiques (peptides (Cf. lexique), protéines, etc.) par spectrométrie de masse reposant sur une ionisation par électronébulisation. Il a été réalisé à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL) au sein de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN, UMR CNRS 8520) dans l'équipe "Microsystèmes Silicium" devenue "NAM6".

Nous proposons une nouvelle approche de ce problème par le développement de sources d'ionisation microfabriquées présentant des géométries originales fonctionnant dans des conditions de nano-électronébulisation, c'est-à-dire dans le pire cas sous l'application d'une tension de l'ordre de 1kV et avec des solutions de concentration de l'ordre de  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ . La fonction basique de cette source est d'amener une solution test contenant des macromolécules non identifiées vers une pointe qui, sous l'application d'une tension élevée, générera un nébulisat de macromolécules ionisées contenues dans des gouttelettes qui seront accélérées vers l'entrée d'un spectromètre de masse afin d'être analysées. L'idée essentielle est le chargement de l'échantillon en utilisant l'action capillaire dans un micro et/ou nanocanal. La réduction de la taille de l'extrémité de la source est un point essentiel afin d'améliorer les performances en spectrométrie de masse, la dimension de celle-ci étant directement liée à la sensibilité de l'analyse par la taille des gouttelettes qu'elle génère [Wil 96] [Val 95] [Em 94] [Gal 93] [Wil 94]. La miniaturisation d'objets macroscopiques existants ne suffit pas car les échelles micronique et submicronique présentent des différences avec l'échelle macroscopique d'un point de vue de la physique. En effet, certains principes ne sont plus valables à aussi petite échelle et il faut tenir compte d'autres phénomènes qui deviennent prépondérants comme par exemple les phénomènes de surfaces dus au rapport surface-volume élevé. Or, ce domaine est mal connu surtout dans les systèmes nanofluidiques qui en sont pour l'instant aux balbutiements de la recherche [Mog 04]. L'enjeu de ce travail repose donc ici sur la manipulation de liquides à très petite échelle de l'ordre du micron voire de quelques dizaines ou centaines de nanomètres.

Le premier chapitre de la thèse retrace l'état de l'art du développement des interfaces d'électronébulisation pour la spectrométrie de masse en technologie microsysteme afin de nous positionner et permettre le choix d'un dispositif original dans le chapitre suivant.

Le deuxième chapitre présente le fonctionnement physique de la source suivi d'une description détaillée des différentes architectures des structures et des voies technologiques mises en œuvre pour leur fabrication.

Le troisième chapitre sera consacré à la présentation des caractérisations expérimentales par spectrométrie de masse et à l'étude de la cartographie de la trace laissée par le nébulisat sur une surface.

Pour terminer, les conclusions et perspectives seront tirées de cette étude afin de proposer de nouvelles orientations sur le sujet.

## Références bibliographiques

R. Aebersold and D. R. Goodlett, "Mass spectrometry in proteomics", *Chem. Rev.*, vol. 101, pp. 269-295, 2001.

<sup>a</sup> R. Aebersold and M. Mann, "Mass spectrometry-based proteomics", *Nature*, vol. 422, pp. 198-207, 2003.

<sup>b</sup> R. Aebersold, "A mass spectrometric journey into protein and proteome research", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 14, pp. 685-695, 2003.

A.A. Alaiya, B. Franzen, G. Auer and S. Linder, "Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification", *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 1210-1217, 2000.

P. Andersen, A. B. Andersen, A. L. Sorensen and S. Nagai, "Recall of long-lived immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in mice", *J. Immunol.*, vol. 154, pp. 3359-3372, 1995.

J. S. Andersen and M. Mann, *FEBS Lett.*, vol. 480, pp. 25-31, 2000.

H. Anderson and A. Van den Berg, "Microfluidic devices for cellomics: a review", *Sens. Actuators B*, vol. 92, pp. 315-325, 2003.

F. W. Aston, "Mass spectra and isotopes", *Arnold*, London, 1933.

## INTRODUCTION

P. A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyes and A. Manz, *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 2637-2652, 2002.

J. Bardeen et al., "Three-electrode circuit element utilizing semiconductive materials", *U.S. Patent 2 524 035*, 1950.

D. R. Barnidge, S. Nilsson, K. E. Markides, H. Rapp and K. Hjort, "Metallized sheathless electrospray emitters for use in capillary electrophoresis orthogonal time-of-flight mass spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 13, pp. 994-1002, 1999.

J. Bellan, *Comb. Flame.*, vol. 51, pp. 117-119, 1983.

S. J. Berger, S. W. Lee, G. A. Anderson, L. Pasa-tolic, N. Tolic, Y. Shen, R. Zhao and R. D. Smith, "High-throughput global peptide proteomic analysis by combining stable isotope amino acid labelling and data-dependent multiplexed-MS/MS", *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 4994-5000, 2002.

T. D. Boone, Z. Hugh Fan, H. H. Hooper, A. J. Ricco, H. Tan and S. Williams, *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 78A-86A, 2002.

G. M. Bose, *Phil. Trans.*, vol. 43, pp. 419-421, 1745.

J.E. Celis, P. Celis, M. Ostergaard et al, "Proteomics and immunohistochemistry define some of the steps involved in the squamous differentiation of the bladder transitional epithelium: a novel strategy for identifying metaplastic lesions", *Cancer. Res.*, vol. 59, pp. 3003-3009, 1999.

C. H. Chen, E. M. Kelder, P. J. vanderPut and J. M. Schoonman, *J. Mater. Chem.*, vol. 6, pp. 765, 1996.

J.M. Corbett, H. J. Why, C. H. Wheeler et al, "Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis", *Electrophoresis*, vol. 19, pp. 2031-2042, 1998.

M. Dole, L. L. Mach, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice, "Molecular beams of macroions", *J. Chem. Phys.*, vol. 49, pp. 2240-2247, 1968.

B.J. Druker and N.B. Lydon, "Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia", *J. Clin. Invest.*, vol. 105, pp. 3-7, 2000.

M. E. Emmett and R. M. Caprioli, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 5, pp. 605-613, 1994.

B. Feng and R. D. Smith, "A simple nanoelectrospray arrangement with controllable flow rate for mass analysis of submicroliter protein samples", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 11, pp. 94-99, 2000.

J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, "Electrospray ionization for mass spectrometry of large molecules", *Science*, vol. 246, pp. 64-71, 1989.

- D. Figeys and D. Pinto, "Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences", *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 330A-335A, 2000.
- D. Figeys and D. Pinto, "Proteomics on a chip: promising developments", *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 208-216, 2001.
- D. Figeys, "Proteomics in 2002: a year of technical development and wide-ranging applications", *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 2891-2905, 2003.
- J. A. Fleming, "Instrument for converting alternating electric currents into continuous currents", *U.S. Patent 803 684*, 1904.
- D. C. Gale and R. D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 7, pp. 1017-1021, 1993.
- A. M. Gáñan-Calvo, *Phys. Rev. Lett.*, vol. 79, pp. 217, 1997.
- W. Gilbert, *de Magnete*, book 2, chapter 2 (translated by P. F. Mottelay), 1600.
- C. A. Goss, D. H. Charych, M. Majda, "Application of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane as a molecular adhesive in the fabrication of vapour-deposited gold electrodes on glass substrates", *Anal. Chem.*, vol. 63, pp. 85-88, 1991.
- P. Griss, J. Melin, J. Sjodahl, J. Roeraade and G. Stemme, "Development of micromachined hollow tips for protein analysis based on nanoelectrospray ionisation mass spectrometry", *J. Micromech. Microeng.*, vol. 12, pp. 682-687, 2002.
- G. Guetens, K. van Cauwenberghe, G. de Boeck, R. Mes, U. R. Tjaden, J. van der Greef, M. Highley, A. T. van Oostrerom and E. A. de Bruijn, "Nanotechnology in bio/clinical analysis", *J. Chromatogr. B*, vol. 739, pp. 139-150, 2000.
- M.G. Harrington, C.R. Merrill, D.M. Asher and D.C. Gajdusek, "Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease", *N. Eng. J. Med.*, vol. 315, pp. 279-283, 1986.
- D. J. Harrison, P. G. Glavina and A. Manz, *Sens. Actuators B*, vol. 10, pp. 107-116, 1993.
- R. P. A. Hartman, D. J. Brunner, J. C. M. Marijnissen and B. Scarlett, *J. Aerosol. Sci.*, vol. 29, S997, 1998.
- R. P. A. Hartman, D. J. Brunner, D. M. A. Camelot, J. C. M. Marijnissen and B. Scarlett, *J. Aerosol. Sci.*, vol. 31, pp. 65, 2000.
- B. Hoyer, G. Sorensen, N. Jensen, D. B. Nielsen, B. Larsen, *Anal. Chem.*, vol. 68, pp. 3840, 1996.
- S. C. Jacobson, A. W. Moore and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, vol. 67, pp. 2059-2063, 1995.
- A. J. Kelly, *J. Appl. Phys.*, vol. 49, pp. 2621, 1978.

## INTRODUCTION

- J. Khandurina and A. Guttman, "Bioanalysis in microfluidic devices", *J. Chromatogr. A*, vol. 943, pp. 159-183, 2002.
- J. S. Kilby, "Miniaturized electronic circuits", *U.S. Patent 3 138 743*, 1964.
- M. Knecht, V. Regitz-Zagrosek, K. P. Pleissner et al, "Characterization of myocardial protein composition in dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis", *Eur. Heart J.*, vol. 15 (supplD), pp. 37-44, 1994.
- M. S. Kriger, K. D. Cook and R. S. Ramsey, "Durable gold coated fused silica capillaries for use in electrospray mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 67, pp. 385-389, 1995.
- M. Krishnan, V. Namasivayam, R. Lin, R. Pal and M. A. Burns, "Microfabricated separation and reaction systems", *Curr. Opin. Biotech.*, vol. 12, pp. 92-98, 2001.
- F. E. Kruis, H. Fissan and A. Peled, *J. Aerosol. Sci.*, vol. 29, pp. 511, 1998.
- T. Laurell, J. Nilsson, G. Marko-Varga, *Trends Anal. Chem.*, vol. 20, pp. 225-231, 2001.
- L. Lin and P. Pisano, "Silicon processed micro-needles", *IEEE J. Micromech. Sys.*, vol. 8, pp. 78-84, 1999.
- N. Lion, T. C. Rohner, L. Dayon, I. L. Arnaud, E. Damoc, N. Youhnovski, Z. Y. Wu, C. Roussel, J. Jossierand, H. Jensen, J. S. Rossier, M. Przybylski and H. H. Girault, *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 3533-3562, 2003.
- H. Liu, C. Felten, Q. Xue, B. Zhang, P. Jedrzejewski, B. L. Karger and F. Foret, *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 3303-3310, 2000.
- Lord Rayleigh, *Proc. Roy. Soc. London*, vol. 28, pp. 406-409, 1879.
- Lord Rayleigh, *Phil. Mag.*, vol. 14, pp. 184, 1882.
- A. Manz, N. Graber and H. M. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing", *Sens. Actuators B*, vol. 1, pp. 244-248, 1990.
- A. Manz and J. C. T. Eijkel, "Miniaturization and chip technology. What can we expect?", *Pure Appl. Chem.*, vol. 73, pp. 1555-1561, 2001.
- G. Marko-Varga, J. Nilsson and T. Laurell, *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 3521-3532, 2003.
- T. McCreedy, *Trends Anal. Chem.*, vol. 19, pp. 396-401, 2000.
- F. W. McLafferty and G. A. Valaskovic, "Electrospray ionisation source and method of using the same", *US Patent 5 788 166*, 1998.
- K. B. Mogensen, H. Klank and J. P. Kutter, "Recent developments in detection for microfluidic systems", *Electrophoresis*, vol. 25, pp. 3498-3512, 2004.

V. N. Morozov, T. Y. Morozova and N. R. Kallenbach, "Atomic force microscopy of structures produced by electrospraying polymer solutions", *International journal of mass spectrometry*, vol. 178, pp. 143, 1998.

V. N. Morozov and T. Y. Morozova, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 415, 1999.

S. Mouradian, "Lab-on-a-chip: applications in proteomics", *Curr. Opin. Biol.*, vol. 6, pp. 51-56, 2001.

S. Nilson, M. Svedberg, J. Petterson, F. Bjoerefors, K. Markides and L. Nyholm, "Evaluations of the stability of sheathless electrospray ionization mass spectrometry emitters using electrochemical techniques", *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 4607-4616, 2001.

J. A. Nollet, *Recherches sur les causes particulières des phénomènes électriques*, 1753.

I.M. Orme, "New vaccines against tuberculosis: the status of current research", *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, vol. 13, pp. 169-185, 1999.

M. Ostergaard, H. H. Rasmussen, H. V. Nielsen et al, "Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation", *Cancer Res*, vol. 57, pp. 4111-4117, 1997.

H. Pearson, *Nature*, vol. 423, pp. 576, 2003.

J. Peng and S. P. Gygi, "Proteomics: The move to mixtures", *J. Mass. Spectrom.*, vol. 36, pp. 1083-1091, 2001.

K.P. Pleissner, P. Soding, S. Sander et al, "Dilated cardiomyopathy associated proteins and their presentation in a www accessible two-dimensional gel protein database", *Electrophoresis*, vol. 18, pp. 802-808, 1997.

H. Ransburg, *U.S. Patent 2 247 963*, 1941.

<sup>a</sup> D. R. Reyes, D. Iossifidis, P-A. Auroux and A. Manz, "Micro total analysis systems: 1. Introduction, theory and technology", *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 2623-2636, 2002.

<sup>b</sup> D. R. Reyes, D. Iossifidis, P-A. Auroux and A. Manz, "Micro total analysis systems: 2. Analytical standard operations and applications", *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 2637-2652, 2002.

M. Richter, A. Prak, J. Naundorfeberl, H. Leeuwis, P. Woias and A. Steckenborn, "A chemical micro-analysis system as a micro-fluid system demonstrator", *Proceedings of the Transducers*, Chicago, IL, USA, pp. 303-306, 1997.

J. Rossier, F. Reymond and P. E. Michel, *Electrophoresis*, vol. 23, pp. 858-867, 2002.

S. Sell, "Cancer markers of the 1990s: comparison of the new generation of markers defined by monoclonal antibodies and oncogene probes to prototypic markers", *Clin. Lab. Med.*, vol. 10, pp. 1-37, 1990.

## INTRODUCTION

S. Shoji, S. N. Akagaawa and M. Esashi, "Micropumps and sample injector for integrated chemical analysis systems", *Sens. Actuat.*, A21, pp. 189-192, 1990.

D. W. Speicher, "Current challenges in proteomics: mining low abundance proteins and expanding protein profiling capacities", *16<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference*, Edinburgh, 31 August – 5 September, 2003.

R. G. Sweet, *Rev. Sci. Instr.*, vol. 36, pp. 131-136, 1965.

G. Taylor, *Proc. R. Soc. London*, Ser. A, vol. 280, pp. 383, 1964.

S. C. Terry, J. H. Jerman and J. B. Angell, *IEEE Trans. Elect. Dev.*, ED-26, pp. 12, 1979.

J. J. Thomson, "Rays of positive electricity and their applications to chemical analysis", *Longmans Green*, London, 1913.

T. Thundat, R. J. Warmack, D. P. Allison and T. L. Ferrel, *Ultramicroscopy*, vol. 42, pp. 1083, 1992.

M. Tyers, and M. Mann, "From genomics to proteomics", *Nature*, vol. 422, pp. 193-197, 2003.

I. Uematsue, H. Matsumoto, K. Morota, M. Minagawa, A. Tanioka, Y. Yamagata and K. Inoue, "Surface morphology and biological activity of protein thin films produced by electrospray deposition", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 269, pp. 336, 2004.

G. A. Valaskovic and F. W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 7, pp. 1270-1272, 1996.

B. H. Vander Schoot, S. Jeanneret, A. Vanden Berg and N. F. de Rooij, "Modular set-up for a miniaturized chemical analysis system", *Sens. Actuat. B*, vol. 15, pp. 211-213, 1993.

S. Verpoorte, *Trends Anal. Chem.*, vol. 19, pp. 350-351, 2000.

J. Voldman, M. Gray and M. A. Schmidt, "Microfabrication in biology and medicine", *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 1, pp. 401-425, 1999.

K. Weldingh, I. Rosenkrands, S. Jacobsen et al, "Two-dimensional electrophoresis for analysis of Mycobacterium tuberculosis culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins ", *Infect. Immun*, vol. 66, pp. 3492-3500, 1998.

<sup>a</sup>M. R. Wilkins, C. Pascali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez et al., *Biotechnology*, vol. 14, pp. 61-65, 1996.

<sup>b</sup>M.R. Wilkins, J.C. Sanchez, K.L. Williams and D.F. Hochstrasser, "Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects", *Electrophoresis*, vol. 17, pp. 830-838, 1996.

M. S. Wilm and M. Mann, "Electrospray and Taylor-cone theory, Does beam of macromolecules at last", *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes*, vol. 136, pp. 167-180, 1994.

## INTRODUCTION

M. S. Wilm and M. Mann, "Analytical properties of the nanoelectrospray ion source", *Anal. Chem.*, vol. 68, pp. 1-8, 1996.

Q. Xue, F. Foret, Y. M. Dunayevskiy, P. M. Zavracky, N. E. McGruer and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, vol. 69, pp. 426-430, 1997.

<sup>a</sup> M. Yamashita and J. B. Fenn, "Electrospray ion source: another variation on the free-jet theme", *J. Phys. Chem.*, vol. 88, pp. 4451-4459, 1984.

<sup>b</sup> M. Yamashita and J. B. Fenn, "Negative ion production with the electrospray ion source", *J. Phys. Chem.*, vol. 88, pp. 4671-4675, 1984.

J. Zeleny, *Phys. Rev.*, vol. 3, pp. 69-91, 1914.

J. Zeleny, *Proc. Camb. Phil. Soc.*, vol. 18, pp. 71-83, 1915.

J. Zeleny, *Phys. Rev.*, vol. 10, pp. 1-6, 1917.

# Chapitre 1

## Couplage des systèmes microfluidiques à un spectromètre de masse : Etat de l'Art

### *Résumé*

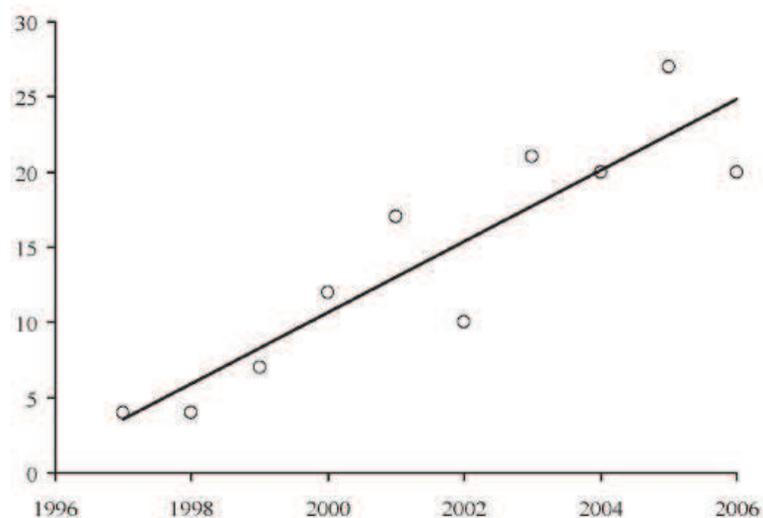
Ce chapitre présente un aperçu couvrant la période de 1997 à 2007 de l'état de l'art concernant le couplage des dispositifs microfluidiques à un spectromètre de masse grâce à une interface constituée par une source d'ionisation par électronébulisation. Un certain nombre de systèmes tirés de la littérature y sont décrits. Ils sont constitués de différents matériaux (verre, polymère, nitrure de silicium, silicium...), et résultent de procédés technologiques variés (gravure humide, gravure sèche, photolithographie, ablation laser,...). Ces dispositifs peuvent être répartis en trois catégories en fonction de la nature de l'interface utilisée entre le laboratoire sur puce et le spectromètre de masse : (i) l'interface est constituée par la section de sortie d'un microcanal, (ii) l'interface est une source standard insérée dans un microcanal, (iii) l'interface consiste en une structure en forme de pointe usinée à l'extrémité d'un microcanal. Cependant, après analyse, ils présentent tous des inconvénients, en particulier ils ne

fonctionnent pas réellement en régime de nanoélectronébulisation. En effet, la tension d'ionisation nécessaire est souvent supérieure à 1kV. Ils n'apportent donc par conséquent pas de solution satisfaisante à la problématique posée par les recherches en protéomique qui nécessitent des interfaces peu coûteuses, très sensibles, pouvant être produites en masse et automatisables afin de pouvoir faire face à la demande croissante d'analyses indispensables à l'étude du protéome.

## Introduction

Un grand nombre de publications concernant les systèmes d'analyses microfluidiques couplés à un spectromètre de masse sont apparues au cours de ces dix dernières années. Les premières revues incluent celles de Karger [**Xue 97 a**], [**Xue 97 b**] et Ramsey [**Ram 97**]. Plus récemment, des articles se concentrant sur les domaines d'application de la spectrométrie de masse microfluidique tels que la protéomique (Cf. lexique) [**Lio 03 a**] [**Fre 06**], l'analyse des glucides [**Zam 05**] et les analyses multiplexées [**For 06**] ont été publiés, attestant de la croissance rapide de la recherche et du développement de ce domaine de la microfluidique. Lazar a publié une vaste revue à ce sujet en 2006 [**Laz 06**]. Sung en a écrit une autre en choisissant de se focaliser sur les micro-dispositifs couplés à un spectromètre de masse en 2005 [**Sun 05**].

La Figure I.1 présente le nombre de publications sur ce sujet en fonction de l'année de publication. Ce graphique montre que l'intérêt pour ce sujet a toujours grandi progressivement. Les publications de cette figure décrivent les nouveaux designs et procédés de fabrication des puces et sources de nébulisation. Des produits commerciaux d'Advion Biosciences, Agilent et Phoenix S&T ont été introduits sur le marché et ont eu un grand succès pour une large gamme d'échantillons.



**Figure I.1 :** *Nombre de publications relatives au couplage de puces microfluidiques à un spectromètre de masse par ionisation par électronébulisation en fonction de l'année de publication [Kos 07].*

Les publications utilisant les puces d'Advion Biosciences sont nombreuses, mais traitent plus de l'application que des modifications apportées à la puce elle-même. Seules les premières publications sont par conséquent incluses dans la Figure I.1. Un aperçu des publications concernant l'utilisation des puces d'Advion Bioscience est par ailleurs donné dans la revue de Zhang [Zha 04]. Mais si celles-ci avaient été incluses, on aurait observé sur la figure I.1 une courbe exponentielle.

La première partie de ce chapitre présente succinctement les procédés de fabrication et les matériaux les plus couramment utilisés pour faire des puces microfluidiques. La seconde partie, présente les premières approches qui ont été adoptées afin de coupler les puces à un spectromètre de masse en nébulisant un liquide à partir de la tranche du substrat jusqu'aux derniers développements qui intègrent totalement les émetteurs dans le procédé de fabrication.

# 1- Matériaux et procédés de fabrication utilisés afin de réaliser des puces microfluidiques

La communauté microfluidique a adopté un certain nombre de procédés de micro-fabrication de salle blanche utilisés dans l'industrie du semi-conducteur depuis le début des années 60 afin d'usiner plusieurs types de matériaux pour la fabrication de puces. Ces procédés ont été optimisés pour le silicium qui est le matériau de choix pour les composants électroniques tels que les transistors et bien d'autres. Par conséquent, parmi les premiers dispositifs microfluidiques, nombreux sont ceux qui consistaient en des canaux microfluidiques de silicium. Cependant, les mêmes techniques basiques de photolithographie ont également été utilisées avec succès pour la micro-structuration des surfaces de verre et de quartz, aussi bien que pour la réalisation de micro-canaux directement dans de la résine photosensible. Durant la première décennie (1990-2000) de recherche concernant les laboratoires sur puce, l'intérêt du verre comme substrat pour les applications microfluidiques a rapidement grandi. En effet, ce matériau est chimiquement inerte, a des propriétés de surface bien définies et peut être utilisé afin de générer un écoulement électro-osmotique (Cf. lexique). La popularité du silicium est en baisse à cette période en large partie parce qu'il n'est pas compatible avec l'utilisation d'importants champs électriques pour la génération d'écoulements électro-osmotiques. Cependant, le silicium continue d'être utilisé pour les applications employant des écoulements contrôlés par une pression ou des micro-structures complexes pour lesquelles les techniques de fabrication n'existent pas avec d'autres matériaux. Advion Bioscience a par exemple sur le marché une puce ESI (Electro Spray Ionization) en silicium constituée d'un réseau de micro-sources [**Advion Bioscience**]. Les substrats en plastique ont récemment gagné en popularité. Agilent a introduit une puce ESI en polyimide (Cf. lexique) réalisée par ablation laser [**Agilent**]. Phoenix S&T a une puce ESI sur le marché faite en polypropylène (Cf. lexique) par moulage par injection [**Phoenix S&T**]. Les tables I.1 et I.2 en annexe présentent un aperçu de tous les matériaux qui ont été utilisés pour réaliser des sources d'électronébulisation et les technologies employées pour le micro-usinage respectivement. La table I.2 en annexe distingue les approches technologiques qui nécessitent une salle blanche de celles pouvant en faire abstraction.

Plusieurs méthodes sont apparues dans la littérature pour coupler une puce microfluidique à un spectromètre de masse en utilisant l'électronébulisation comme technique d'ionisation. Elles peuvent être réparties en trois types d'approches. La première approche, apparue à la fin des années 90, est monolithique avec un nébulisat généré directement à partir de canaux microfluidiques ouverts sur la tranche d'une puce. Bien que cette approche soit simple, la position du nébulisat sur le côté de la puce est difficile à contrôler. Afin de surmonter ce problème, de nombreux groupes ont adopté une seconde approche qui implique l'insertion directe de capillaires en silice à l'extrémité des canaux de la puce afin d'être utilisés comme source d'électronébulisation. Cette approche s'avère techniquement difficile à réaliser. C'est pourquoi les chercheurs ont développé une troisième approche consistant à intégrer les sources dans le procédé de fabrication de la puce.

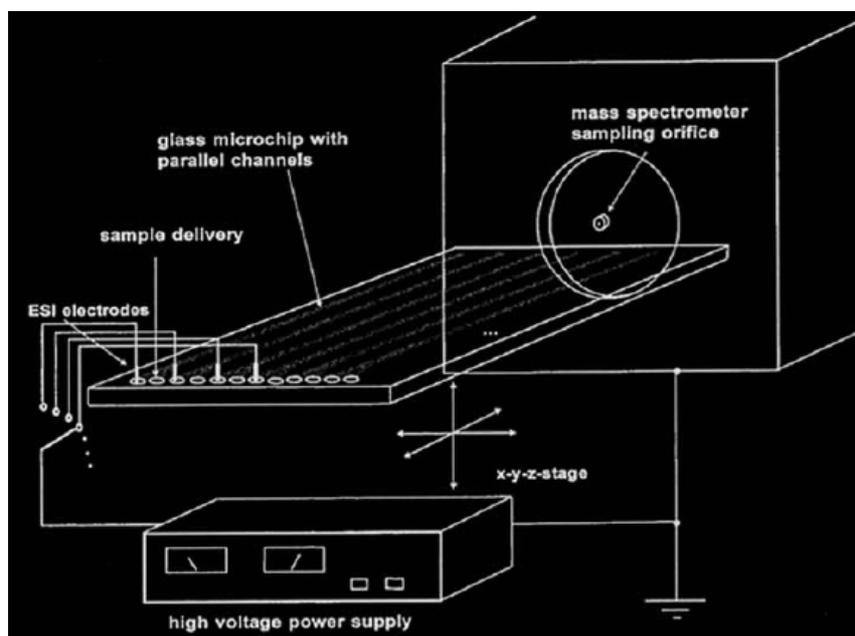
Ces trois générations de sources sont décrites dans ce chapitre à l'aide d'exemples tirés de la littérature. Les avantages et inconvénients de chaque approche seront examinés.

## 2- Evolution des sources d'ionisation

### 2-1 Sources d'ionisation constituées par la sortie d'un microcanal ouvert sur la tranche d'un substrat

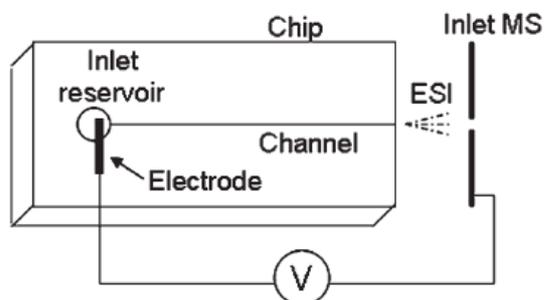
Les premiers groupes à explorer les possibilités de couplage des dispositifs microfluidiques d'analyses avec la spectrométrie de masse sont ceux de Karger de l'Institut Barnett de Boston [Xue 97 b] et Ramsey du Laboratoire National d'Oak Ridge [Ram 97]. Ces deux groupes ont présenté à peu près en même temps, des puces microfluidiques permettant l'ionisation par électronébulisation à partir de la sortie d'un canal.

Le groupe de Karger était en avance sur la plupart des autres groupes parce qu'en plus de coupler des puces à un spectromètre de masse, il a été le premier à fabriquer des puces avec des canaux multiples à partir desquels différents échantillons peuvent être analysés. Il a proposé un dispositif sur du verre constitué de neuf canaux microfluidiques permettant de mener des analyses [Xue 97 b]. Ce dispositif ayant des canaux de 60 $\mu$ m de large et 25 $\mu$ m de profondeur (Figure I.2) a été réalisé en utilisant les techniques standard de photolithographie, dépôt de métaux, gravure chimique humide et scellement thermique.



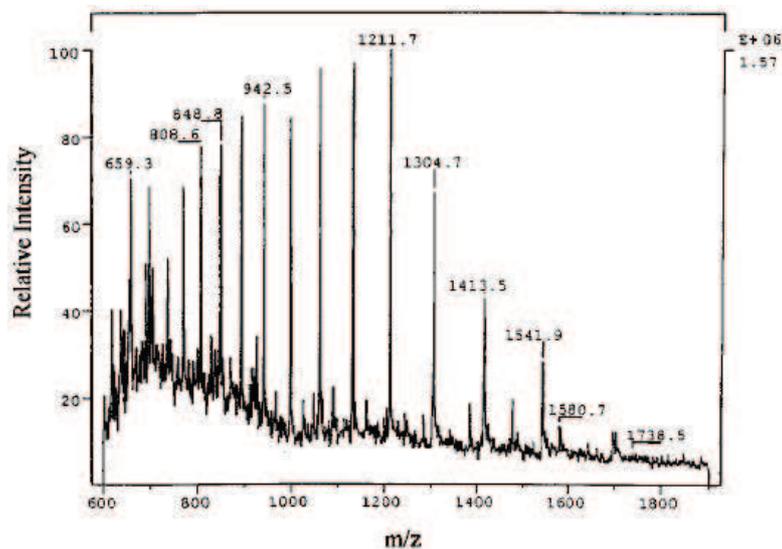
**Figure I.2 :** Vue schématique de l'interface ESI de Karger [Xue 97 b]. Chacun des neuf canaux comporte deux puits d'entrée. Un puits contient l'échantillon et peut être connecté à une pompe à seringue qui fournit un débit de 100-200nL.min<sup>-1</sup>. Le second puits contient le tampon et peut être connecté à une source haute tension par l'intermédiaire d'une électrode de platine. Les ports de sortie de la micro-puce sont alignés avec l'orifice du spectromètre de masse en utilisant une table de translation dans les trois directions.

Le nébulisat est généré directement à partir de la tranche de la puce en utilisant une pompe à seringue externe afin de générer un écoulement contrôlé par une pression ayant un débit de 100 à 200nL min<sup>-1</sup> et en appliquant une tension de 4.2kV à l'aide d'une électrode de platine. L'orifice du canal de sortie est placé à une distance comprise entre 3 et 8mm de l'entrée du spectromètre de masse. Le schéma de la configuration électrique est montré Figure I.3.



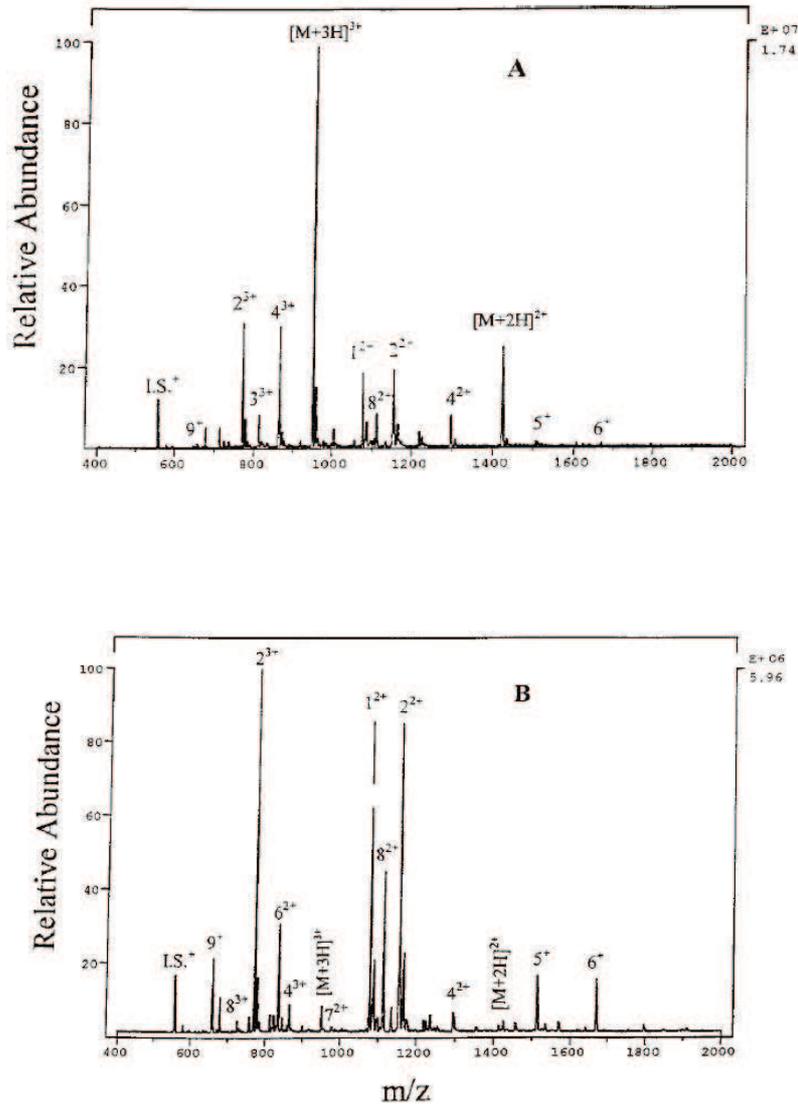
**Figure I.3 :** Vue schématique de la configuration électrique pour la génération d'un spray à partir de l'ouverture d'un canal. La tension est appliquée entre le réservoir et l'entrée du spectromètre de masse [Xue 97 b].

En l'absence d'une structure en pointe, l'un des principaux problèmes avec ce type de dispositif, est que le liquide quittant le canal microfluidique a tendance à s'étaler spontanément sur l'ensemble de la tranche de la puce, rendant difficile la formation du nébulisat. Les liquides hydrophiles (Cf. lexique) ayant un petit angle de contact avec le verre ont donc tendance à mouiller facilement ce type de surface. Afin d'empêcher ce phénomène, la surface a été traitée chimiquement en la recouvrant avec un agent hydrophobe (Cf. lexique), le n-octyltriacétoxyasilane. Moyennant cette modification, de la myoglobine (Cf. lexique) ayant une concentration aussi faible que  $60\text{nmol.L}^{-1}$  a pu être détectée par spectrométrie (TSQ-700 triple quadruple mass spectrometer Finnigan Instruments, San Jose, CA, USA) (Figure I.4).



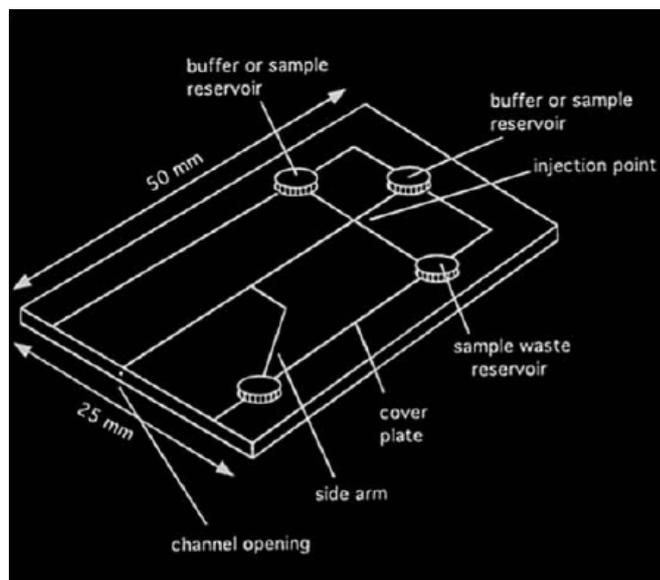
**Figure I.4 :** Spectre de masse obtenu pour une solution de  $60\text{nmol.L}^{-1}$  de myoglobine dans 75% de méthanol et 0.1% d'acide acétique avec un débit de  $200\text{nL.min}^{-1}$  et une tension de  $4.3\text{kV}$  [Xue 97 b].

Plus tard, l'analyse par spectrométrie de masse (TSQ-700 triple quadruple mass spectrometer Finnigan Instruments, San Jose, CA, USA) de la digestion tryptique (Cf. lexique) de la méliittine (Cf. lexique) (concentration initiale de  $0.01\text{mg.mL}^{-1}$ ) réalisée dans les réservoirs de cette puce a été conduite par cette même équipe [Xue 97 a] démontrant ainsi la possibilité d'intégrer la digestion des protéines sur une micro-puce avec une détection par spectrométrie de masse. Les spectres obtenus en fonction du temps de digestion sont montrés Figure I.5.



**Figure I.5 :** Spectres de masse obtenus après (A) 10mins et (B) 40mins de digestion tryptique de la melittine ayant une concentration initiale de  $0.01\text{mg.mL}^{-1}$  avec un débit de  $200\text{nL.min}^{-1}$ . [Xue 97 a].

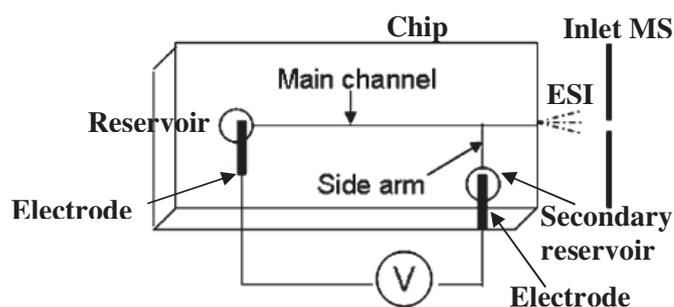
Ramsey a quant à lui proposé un dispositif constitué de canaux de  $10\mu\text{m}$  de profondeur et  $60\mu\text{m}$  de large réalisés dans du verre en utilisant les techniques standard de micro-usinage (photolithographie, gravure chimique humide, dépôts de couches minces) dans lesquels le pompage s'effectue de façon électro-osmotique [Ram 97]. La puce comporte un canal principal avec une sortie sur la tranche de la puce où le nébulisat est généré (Figure I.6).



**Figure I.6 :** Diagramme de la sortie du canal pour le pompage indirect induit par écoulement électro-osmotique. Une tension de 6 et 2kV est appliquée sur le réservoir d'échantillon et le réservoir secondaire respectivement. L'ouverture du canal où le nébulisat est généré est maintenue à une tension de 4.8kV [Ram 97].

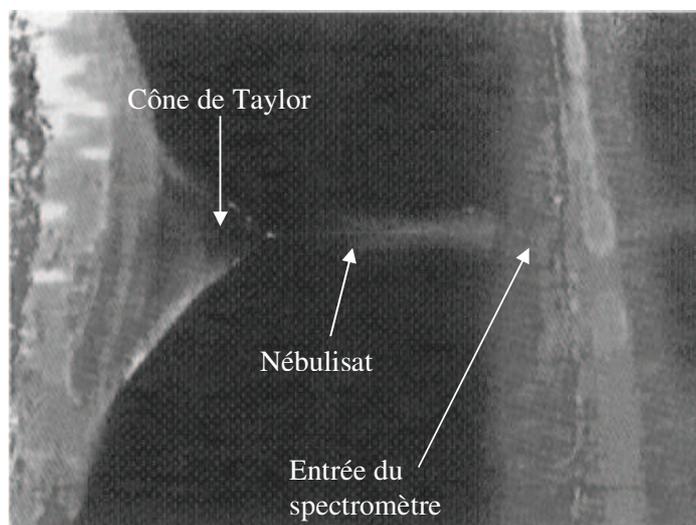
Un canal secondaire est connecté au canal principal près de la sortie. Un courant ionique suffisamment important afin d'induire un écoulement électro-osmotique dans le canal principal est généré le long des canaux en appliquant une différence de potentiel de 4kV entre le réservoir d'entrée et le réservoir secondaire en utilisant des fils de platine. L'écoulement électro-osmotique dans le canal secondaire est supprimé par un revêtement de polymère (polyacrylamide) qui augmente la viscosité de la surface et réduit le potentiel zeta des parois de verre (Cf. lexique). Le réservoir secondaire ne peut par conséquent pas recevoir tout l'écoulement électro-osmotique généré dans le canal principal, ce qui entraîne une augmentation de pression à l'intersection du canal principal et du canal secondaire. Le canal secondaire est plus long que le reste du canal principal jusqu'à la sortie et a donc une plus grande résistance d'écoulement. Cela, combiné à la différence de capacité d'écoulement des deux canaux, engendre un écoulement contrôlé par la pression vers la sortie du canal sur la tranche de la puce. Cet écoulement est suffisamment important pour obtenir un courant d'électronébulisation constant.

Une vue schématique de la configuration électrique est donnée Figure I.7.



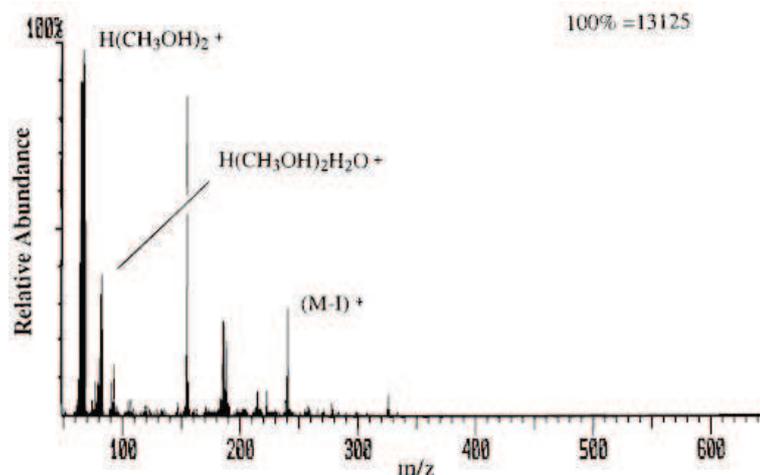
**Figure I.7 :** Vue schématique de la configuration électrique pour la génération d'un spray à partir de l'ouverture d'un canal. La tension est appliquée entre le réservoir et le canal secondaire au bout du canal principal pouvant servir de canal de séparation [Ram 97].

Comme pour le dispositif de Karger, afin d'éviter l'étalement de la solution échantillon et faciliter la formation du nébulisat, la tranche de la puce est recouverte d'une couche hydrophobe (Immunopen Calbiochem. LaJolla, CA, USA). L'orifice est placé à une distance comprise entre 3 et 5mm de l'entrée d'un spectromètre de masse à trappe d'ions (Finnigan MAT ITMS San Jose, CA modifié). La Figure I.8 montre une photo du cône de Taylor et du nébulisat émergeant de l'orifice de sortie.



**Figure I.8 :** Photographie du cône de Taylor et du nébulisat généré à partir d'une solution de 60% d'eau et 40% de méthanol [Ram 97].

Un spectre de masse obtenu par l'ionisation d'une solution de  $10\mu\text{mol.L}^{-1}$  d'iodure de tétrabutylammonium (Cf. lexique) à partir du micro-dispositif est montré Figure I.9.

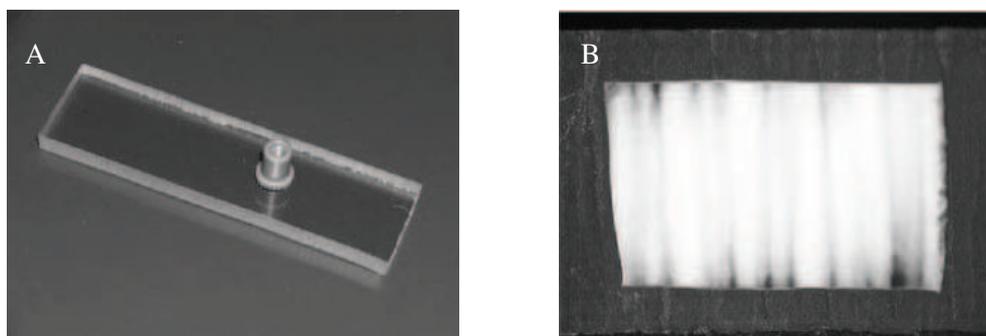


**Figure I.9 :** Spectre de masse obtenu à partir d'une solution de  $10\mu\text{mol.L}^{-1}$  d'iodure de tétrabutylammonium (dans 60% d'eau et 40% de méthanol) sur une période de 2 secondes [Ram 97].

Bien que la fabrication de ces puces émettant un nébulisat à partir d'un orifice situé sur leur tranche soit relativement simple, plusieurs inconvénients font que cette approche se révèle incompatible avec bon nombre d'applications. Tout d'abord, les liquides hydrophiles ont un faible angle de contact avec le verre qui est lui-même hydrophile et ont par conséquent tendance à s'étaler le long de la tranche en verre du dispositif. On retrouve également ce problème dans le cas des liquides hydrophobes qui mouillent les dispositifs hydrophobes faits en plastique. Cela fait qu'il est difficile de prévoir la position exacte à partir de laquelle le nébulisat va être généré, augmente le volume du cône de Taylor et compromet la réalisation de réseaux de sources denses faiblement espacées. Ensuite, les petits objets pointus, tels que les éclats de matériau du substrat laissés sur la tranche de la puce au cours de la fabrication, subissent d'importants champs électriques localement comme l'a souligné Rohner [Roh 01]. De plus, le volume total de liquide mouillant la tranche de la puce est relativement important et peut agir comme un volume mort pouvant influencer les performances des puces de séparation de protéines (Cf. lexique). Afin d'éviter l'étalement des liquides hydrophiles, nous avons vu que des revêtements hydrophobes pouvaient être employés mais ils se sont montrés instables dans le temps. En effet, la durée d'utilisation des dispositifs utilisant ces revêtements ne peut excéder 5 minutes car au-delà la couche est endommagée [Xue 97 a] [Xue 97 b]. Les revêtements ne sont pas non plus une solution pour les problèmes de mouillage rencontrés lors de la séparation de protéines sur puce réalisée avec des mélanges de solvants ayant des polarités différentes. De plus, les canaux sont relativement larges (20-50 $\mu\text{m}$ ) comparés aux

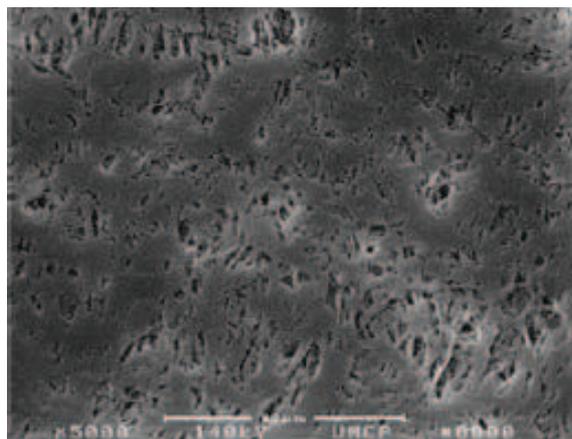
capillaires standards (1-2 $\mu\text{m}$ ), ce qui nécessite des débits plus élevés mais ce n'est pas toujours possible et cela augmente la quantité d'échantillon utilisée.

Wang de l'Université du Maryland a proposé une approche possible afin de remédier à quelques uns des problèmes en fermant la sortie des canaux microfluidiques avec une membrane de polytétrafluoréthylène (PTFE) poreuse par scellement thermique [Wan 04]. Ces canaux trapézoïdaux (120  $\mu\text{m}$  de large en haut, 80 $\mu\text{m}$  de large en bas et 30 $\mu\text{m}$  de profondeur) sont imprimés dans un substrat en polycarbonate par gaufrage à chaud à l'aide d'un moule réalisé par photolithographie et gravure humide d'un substrat de silicium. Ensuite, les canaux sont fermés par scellement thermique d'un substrat en polycarbonate dans lequel des trous ont été percés pour les accès électriques et fluidiques. Une fois l'assemblage terminé, l'ensemble est scié afin de définir l'extrémité des sources. Puis la membrane de 50 $\mu\text{m}$  d'épaisseur de PTFE ayant une porosité de 70% et des pores de 0.22 $\mu\text{m}$  est fixée à la sortie des canaux en appliquant sur la membrane une force d'environ 40N pendant 10 secondes à l'aide d'une lame de verre, l'ensemble étant placé sur une plaque chauffante à 150°C. Enfin, une connexion capillaire est collée au niveau du réservoir afin d'alimenter le dispositif à l'aide d'une seringue et une électrode de platine assure le contact avec le liquide afin d'appliquer la tension nécessaire à l'obtention du nébulisat. La Figure I.10 montre le dispositif obtenu à l'issue de la fabrication.



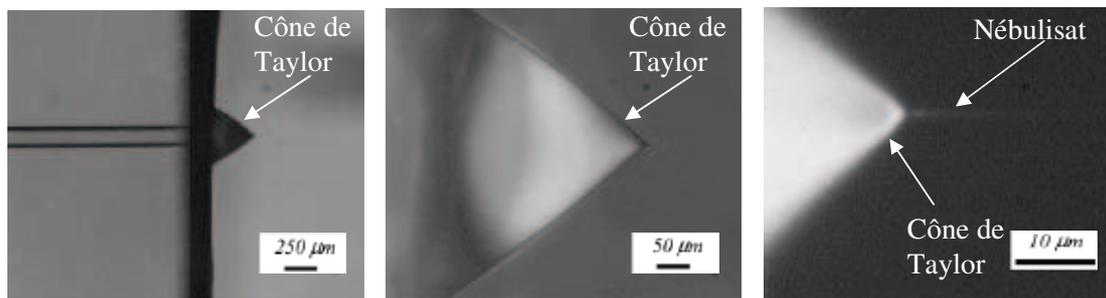
**Figure I.10 :** (A) Source d'électronébulisation constituée de polycarbonate et d'une membrane de PTFE. (B) Photo de la membrane de PTFE (2500 X 1500 X 50 $\mu\text{m}$ ) scellée sur la surface de sortie du dispositif [Wan 04].

Cette technique permet d'obtenir un nébulisat très stable à un débit exceptionnellement bas (80nL.min<sup>-1</sup>) grâce à la membrane poreuse qui procure une surface hydrophobe qui restreint la dispersion latérale du liquide à la sortie du canal et qui de plus à la faculté d'agir comme un réseau dense de sources (Figure I.11).



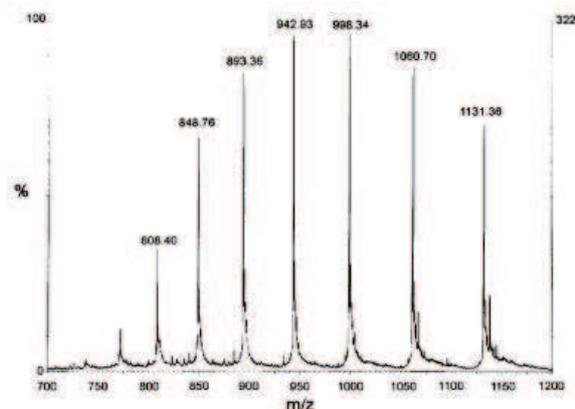
**Figure I.11** : Image au microscope électronique (SEM) de la surface de la membrane de PTFE [Wan 04].

La Figure I.12 montre des images optiques du cône de Taylor observé lorsque la source est placée à 2mm de la contre-électrode et pour une tension de 3.8kV.



**Figure I.12** : Images optiques du cône de Taylor établi à la sortie du micro-canal pour un débit de  $120\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ , à une distance de 2mm de la contre-électrode et une tension de 3.8kV [Wan 04].

Ce dispositif a été testé en spectrométrie de masse en utilisant de la myoglobine de concentration  $0.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans 50% d'eau, 49% de méthanol et 1% d'acide acétique. La source étant placée à 3mm de l'entrée du spectromètre de masse à temps de vol (Qtof Micro, Micromass), le nébulisat est obtenu pour une tension de 3.7kV. Le spectre obtenu est montré Figure I.13.

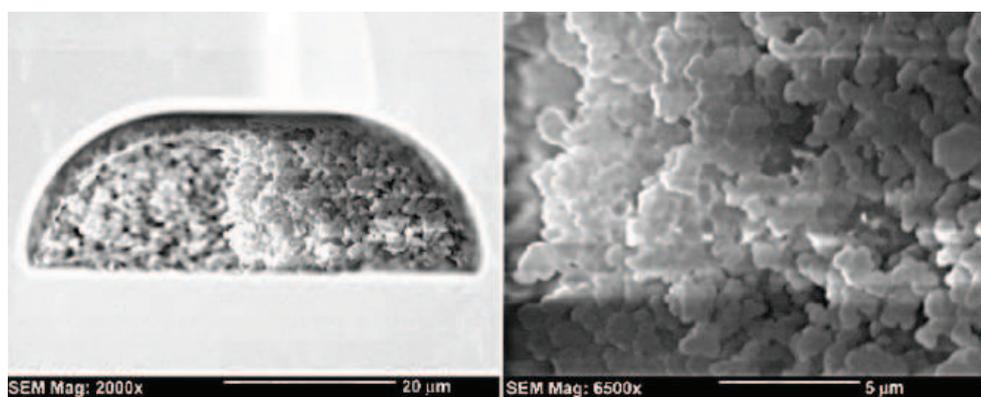


**Figure I.13 :** Spectre de masse d'une solution de myoglobine ( $0.5\text{mg.mL}^{-1}$ ) obtenu pour une tension de  $3.7\text{kV}$  et un débit de  $100\text{nL.min}^{-1}$  à partir d'une source en polycarbonate dont l'extrémité a été recouverte par une membrane de PTFE [Wan 04].

Bien que ce dispositif permette de confiner le cône de Taylor, sa fabrication reste assez critique, les canaux pouvant se boucher ou se déformer lors de l'étape de sciage.

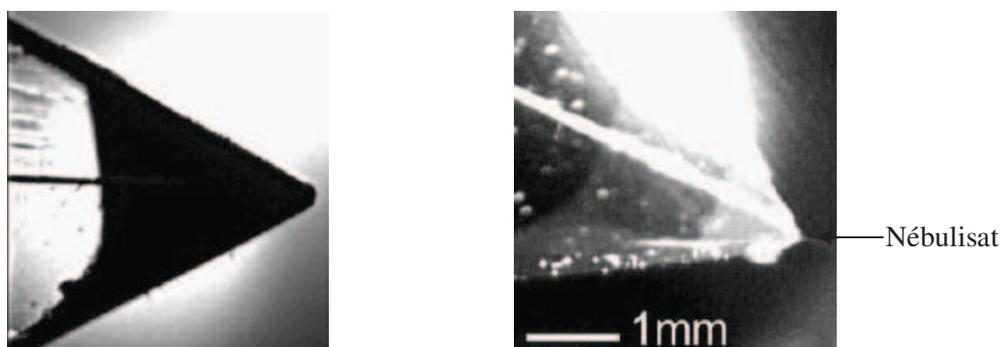
Basé sur une idée similaire, l'équipe de Koerner de l'Université de Kingston (Queen's University) au Canada a présenté une source de nanoélectronébulisation fabriquée en utilisant un monolithe de polymère poreux à l'extrémité d'un micro-dispositif de verre constitué de canaux de section semi-circulaire de  $50\mu\text{m}$  de large et  $20\mu\text{m}$  de profondeur [Koe 05]. Avant la fabrication du monolithe de polymère poreux, les parois des canaux subissent différents traitements chimiques. Ils sont d'abord traités avec une solution de méthacrylate de 3-(triméthoxysilyl) propyle afin de générer des sites d'ancrage pour le monolithe de polymère. Puis, ils sont lavés avec une solution d'hydroxyde de sodium de concentration  $1\text{mol.L}^{-1}$  pendant 30min avec un débit de  $1\mu\text{L.min}^{-1}$ . Ils sont ensuite rincés avec de l'eau pendant 30min puis avec une solution de silane constituée d' $1\text{mL}$  de méthacrylate de 3-(triméthoxysilyl) propyle dans  $20\text{mL}$  d'acide acétique ayant une concentration de  $5\text{mmol.L}^{-1}$  pendant 60min. Le dispositif est ensuite une nouvelle fois rincé pendant 30min dans un porophore (Cf. lexique) utilisé pour la préparation du monolithe de polymère qui consiste en un mélange de 10% d'eau et 90% d'un mélange de propan-1-ol (60%) et de 1,4-butanediol (40%). A cette étape, les micro-dispositifs peuvent être stockés dans ce mélange jusqu'à ce qu'ils soient utilisés. Un mélange de monomère constitué de 59.4% d'acrylate de butyle, 40% d'éthylène glycol diméthacrylate, 0.6% d'acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propane sulfonique et 0.5% (en ce qui concerne le poids du monomère) d'éther méthylbenzoïque est ensuite préparé. Une solution constituée du porophore (60%) et de ce mélange de monomère (40%)

est injectée dans le dispositif pendant 1 à 2min avant que celui-ci ne soit placé sous une lampe UV afin d'amorcer la réaction de polymérisation. Toutes les régions transparentes du micro-dispositif exceptée une zone de 10mm au centre sont recouvertes par un ruban opaque qui ne laisse pas passer les UV. Lorsque la polymérisation est terminée (1 à 2min), du porophore est mis en circulation dans le micro-dispositif pendant au moins 30min avant que celui-ci ne soit cassé en deux au milieu du monolithe de polymère poreux afin d'obtenir deux sources avec 5mm de monolithe de polymère à l'extrémité. Pour terminer, l'extrémité de la source est affinée par polissage mécanique afin d'obtenir une pointe. Le monolithe présentant des pores de taille adaptée (1 à 2 $\mu$ m) et une surface ayant des propriétés hydrophobes facilite la genèse d'un nébulisat stable et évite l'obstruction du dispositif grâce à la nature poreuse du matériau ; une multitude de trous permet l'écoulement d'un liquide (Figure I.14).



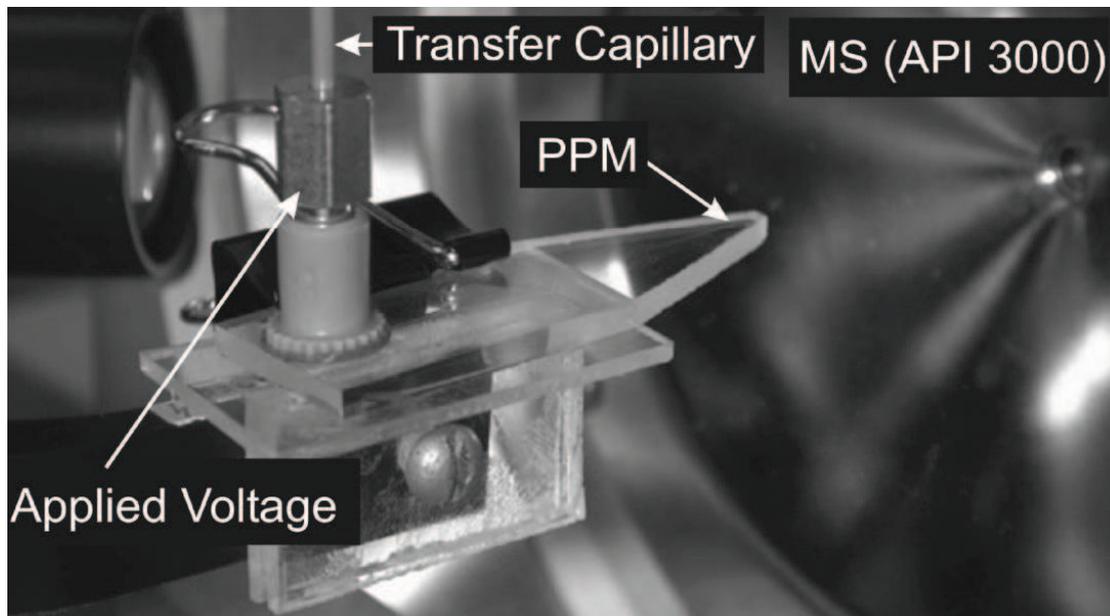
**Figure I.14 :** Image au microscope électronique du monolithe de polymère à l'extrémité du dispositif [Koe 05].

La Figure I.15 montre des images optiques du nébulisat observé lorsque la source est soumise à une tension de 3kV et un débit de 100nL.min<sup>-1</sup>.



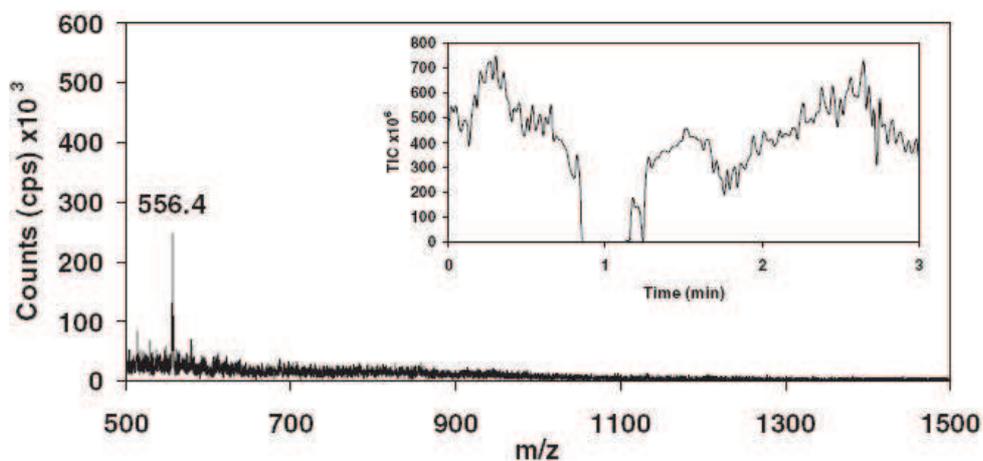
**Figure I.15 :** Photo montrant le nébulisat émanant de l'extrémité du dispositif. Le débit est de 100nL.min<sup>-1</sup> et la tension appliquée est de 3kV [Koe 05].

Les tests en spectrométrie ont été réalisés avec un spectromètre de masse à triple quadripôles (API 3000 MDS-Sciex, Concord, Canada) en plaçant la source à une distance comprise entre 2 et 5mm de l'entrée (Figure I.16).



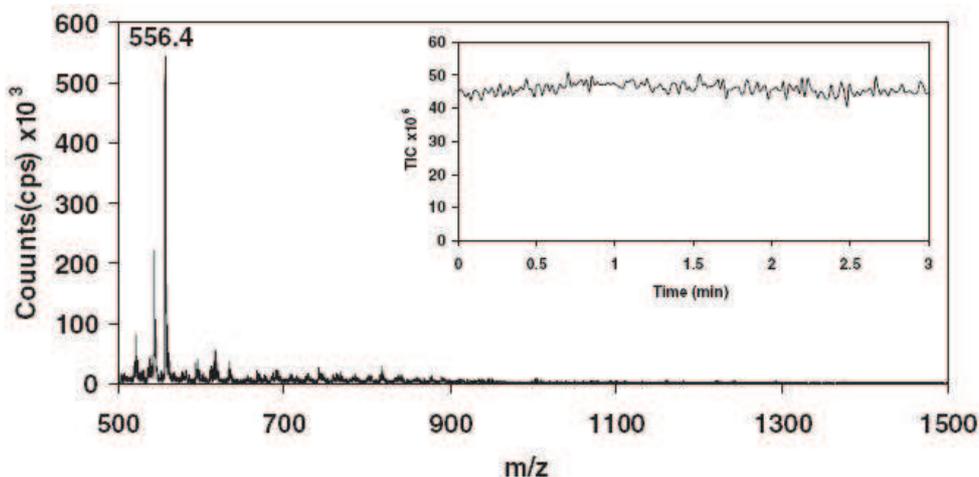
**Figure I.16 :** Photo de la source positionnée en face de l'entrée du spectromètre de masse [Koe 05].

La Figure I.17 présente le spectre de masse d'une solution de leucine-enképhaline ( $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ , 50% d'acétonitrile et 0.5% d'acide acétique) (Cf. lexique) résultant d'une source ne présentant pas de monolithe de polymère à son extrémité avec un débit de  $100\text{nL.min}^{-1}$  et en appliquant une tension de 3.5kV.



**Figure I.17 :** Spectre de masse d'une solution de leucine-enképhaline ( $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ , 50% d'acétonitrile et 0.5% d'acide acétique) obtenu pour une tension de 3.5kV et un débit de  $100\text{nL.min}^{-1}$  avec une source ne présentant pas de monolithe de polymère poreux à son extrémité. L'encart montre que le courant ionique total n'est pas stable [Koe 05].

La Figure I.18 présente le spectre de masse d'une solution de leucine-enképhaline ( $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ , 50% d'acétonitrile et 0.5% d'acide acétique) résultant d'une source présentant un monolithe de polymère à son extrémité avec un débit de  $100\text{nL.min}^{-1}$  et en appliquant une tension de 3kV.



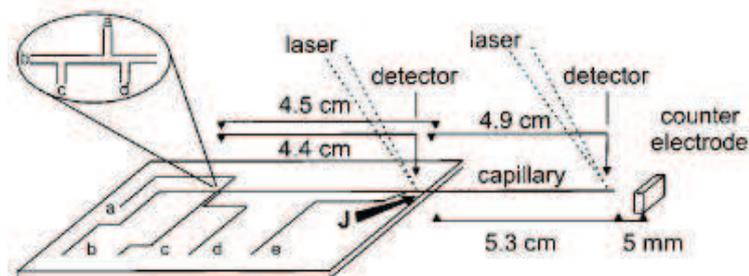
**Figure I.18 :** Spectre de masse d'une solution de leucine-enképhaline ( $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ , 50% d'acétonitrile et 0.5% d'acide acétique) obtenu pour une tension de 3kV et un débit de  $100\text{nL.min}^{-1}$  avec une source présentant un monolithe de polymère poreux à son extrémité. L'encart montre que le courant ionique total est très stable [Koe 05].

Ces résultats montrent que le monolithe de polymère placé à l'extrémité de la source procure un avantage indéniable. En effet en son absence, on constate une diminution non négligeable de la stabilité du spray ainsi que de la sensibilité et une tension plus importante est nécessaire. Néanmoins, ce type de dispositif nécessite de fastidieuses étapes de traitements des canaux afin d'obtenir le monolithe de polymère.

## 2-2 Sources d'ionisation constituées par l'insertion d'un capillaire

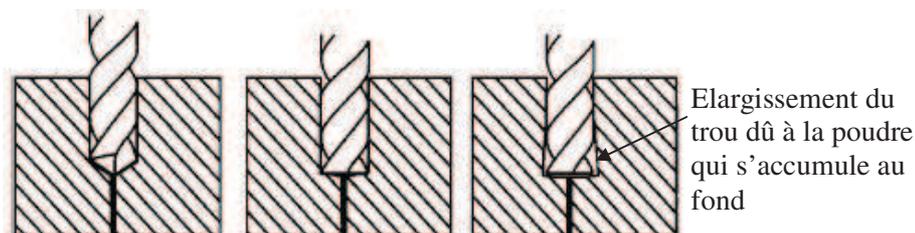
Afin de résoudre les problèmes se présentant lorsqu'un nébulisat est généré directement à partir de la sortie d'un canal sur la tranche d'une puce, plusieurs chercheurs ont connecté une source capillaire standard en silice à l'extrémité d'un canal microfluidique. Harrison de l'Université d'Alberta au Canada a été parmi les premiers à décrire cette nouvelle approche afin d'intégrer une source capillaire avec sa puce permettant de faire de l'électrophorèse (Cf. lexique) [Bin 99]. Son dispositif pour la séparation par électrophorèse

capillaire a été réalisé sur du verre et est constitué de canaux de  $13\mu\text{m}$  de profondeur et de  $300\mu\text{m}$  de large qui sont réduits à  $40\mu\text{m}$  2mm avant la jonction (Figure I.19).



**Figure I.19** : Puce en verre permettant de faire de l'électrophorèse [Bin 99].

Ces canaux sont réalisés en utilisant les techniques standard de micro-usinage (dépôt de métal, photolithographie et gravure humide). Des trous de  $200\mu\text{m}$  de diamètre sont ensuite percés sur la tranche de la puce en utilisant des forets en carbure de tungstène (Figure I.20).



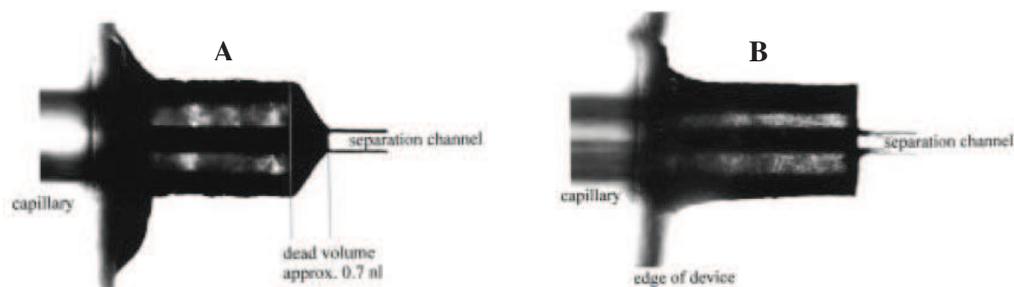
**Figure I.20** : Vue schématique du procédé de perçage des trous sur la tranche de la puce en verre. Les trous sont d'abord percés avec un foret pointu puis un foret avec une extrémité plate est utilisé afin d'aplanir le fond. Si on cherche à percer plus profond avec ce foret le trou s'élargit car la poudre de verre produite ne peut pas s'évacuer [Bin 99].

Afin d'éviter l'obstruction des canaux avec les particules de verre, ils sont d'abord remplis avec une colle (Crystal Bond 509) qui est éliminée après le perçage des trous en la chauffant jusqu'à son point de fusion ( $\sim 80^\circ\text{C}$ ) et en rinçant à l'acétone. Cette colle est aussi utilisée afin d'établir une connexion hermétique entre le capillaire ayant un diamètre externe de  $185\mu\text{m}$  et un diamètre interne de  $50\mu\text{m}$  et le canal de  $13\mu\text{m}$  de profondeur et  $40\mu\text{m}$  de large.

L'influence de la connexion sur les performances de l'électrophorèse capillaire, c'est-à-dire le nombre de plateaux obtenus (Cf. lexique), a été étudiée en réalisant la séparation d'un mélange d'acides aminés (Cf. lexique) marqués par fluorescence. Deux dispositifs ayant des

volumes morts différents au niveau de la jonction canal-capillaire dus à la géométrie des forets utilisés ont été étudiés. Un des dispositifs a été réalisé avec un foret pointu, l'autre avec le plat.

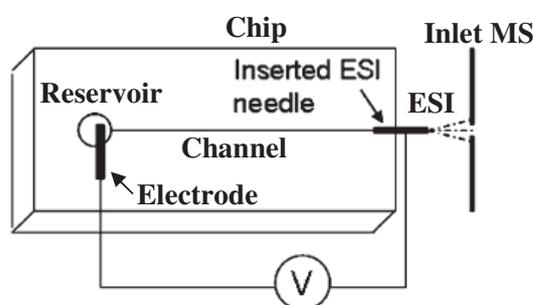
Lorsque le trou est percé avec le foret pointu, il résulte un volume mort de 0,7nL alors qu'avec le foret plat, le capillaire peut venir en butée sur le canal conduisant à un volume mort négligeable (Figure I.21).



**Figure I.21 :** Photos des capillaires de 185µm insérés dans le trou percé sur la tranche du dispositif. (A) trou percé avec un foret pointu, le volume mort au niveau du cône est de 0.7nL. (B) trou percé avec le foret plat, le capillaire est en butée sur l'extrémité du canal microfluidique supprimant ainsi le volume mort [Bin 99].

Dans le cas du dispositif présentant un volume mort, le nombre de plateaux obtenus lors de l'électrophorèse de l'isothiocyanate de fluorescéine-phénylalanine ( $0.1\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (Cf. lexique) dans de la morpholine ( $50\text{mmol.L}^{-1}$ ) (Cf. lexique) passe de 40 000 lorsque la détection par fluorescence est réalisée sur la puce à l'extrémité du canal microfluidique (c'est-à-dire sans prendre en compte le capillaire) à seulement 15 500 plateaux lorsque la détection se fait à l'extrémité du capillaire inséré, même si la longueur de séparation est presque doublée. Dans le cas du dispositif présentant un volume mort négligeable, de meilleurs résultats sont obtenus pour l'électrophorèse de l'isothiocyanate de fluorescéine-arginine ( $0.1\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (Cf. lexique) dans de la morpholine ( $50\text{mmol.L}^{-1}$ ). En effet, le nombre de plateaux obtenus à l'extrémité du capillaire inséré est de 117 000 contre 71 000 à l'extrémité du canal microfluidique, ce qui est conforme avec l'augmentation de la taille du système. Cette étude montre clairement que l'insertion d'une source d'électronébulisation dans le canal d'une puce nécessite une attention particulière. Cette même équipe a par la suite modifié cette puce en déposant une couche de monomère (BCQ : acryloylamino propyl triméthylammonium chloride) sur la paroi des canaux ainsi que la paroi intérieure du capillaire et un revêtement métallique (Or) sur l'extérieur du capillaire. Ces couches conduisent à de meilleures performances en terme d'efficacité de séparation et de détection, grâce au revêtement de BCQ diminuant l'adsorption

des analytes sur la silice et à l'or qui améliore la conduction pour l'application de la tension d'ionisation. Le diamètre de l'extrémité du capillaire est également ramené à 60 $\mu$ m (diamètre interne 15 $\mu$ m) à l'aide d'un laser et sa longueur à 3cm. Moyennant ces modifications, ils ont montré que le couplage de cette puce à un spectromètre de masse à triple quadripôles (PE/Sciex API 300), en utilisant une configuration électrique telle que celle présentée à la Figure I.22, constitue une méthode efficace pour la séparation et l'identification des peptides (Cf. lexique). Ils ont atteint une limite de détection de l'ordre de la nanomole (Table I.1), ce qui représente une amélioration d'un facteur 10 de la sensibilité du dispositif [Li 00 a] [Li 00 b].



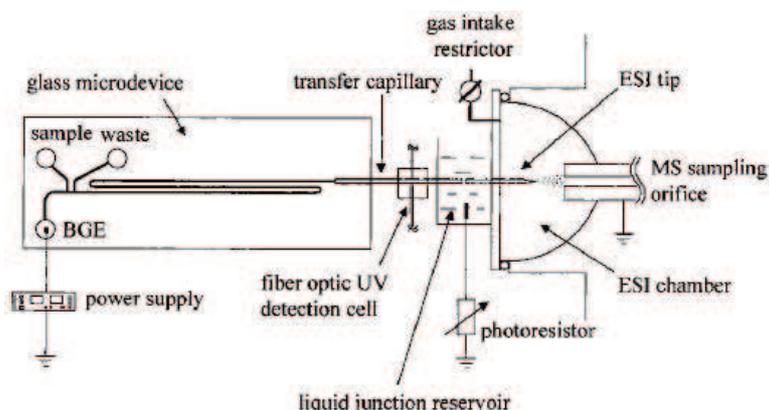
**Figure I.22 :** *Spray à l'aide d'un capillaire en silice inséré à l'extrémité d'un canal. La tension est appliquée entre le réservoir (-1.5kV) et le capillaire (2.7kV) [Li 00 a] [Li 00 b].*

**Table I.1 :** *Limites de détection obtenues pour différents peptides [Li 00 a].*

Peptides	Limite de détection (nmol.L <sup>-1</sup> )
Leu-enképhaline	3.2
LHRH (Luteinising Hormone Releasing Hormone) (Cf. lexique)	28.6
Somatostatine (Cf. lexique)	43.5
Angiotensine II (Cf. lexique)	20.3
Bradykinine (Cf. lexique)	17.6

Même si de bonnes performances sont obtenues, les précautions qui doivent être prises lors du procédé de fabrication afin de minimiser le volume mort entre le canal microfluidique et le capillaire qui y est inséré font que ce dispositif se prête mal à la fabrication en masse. De plus, les étapes de sciage et perçage après scellement thermique présentent un risque de boucher les canaux. Enfin, la colle utilisée afin de fixer le capillaire a tendance à ramollir au contact prolongé avec l'eau pouvant également conduire à l'obstruction de l'orifice.

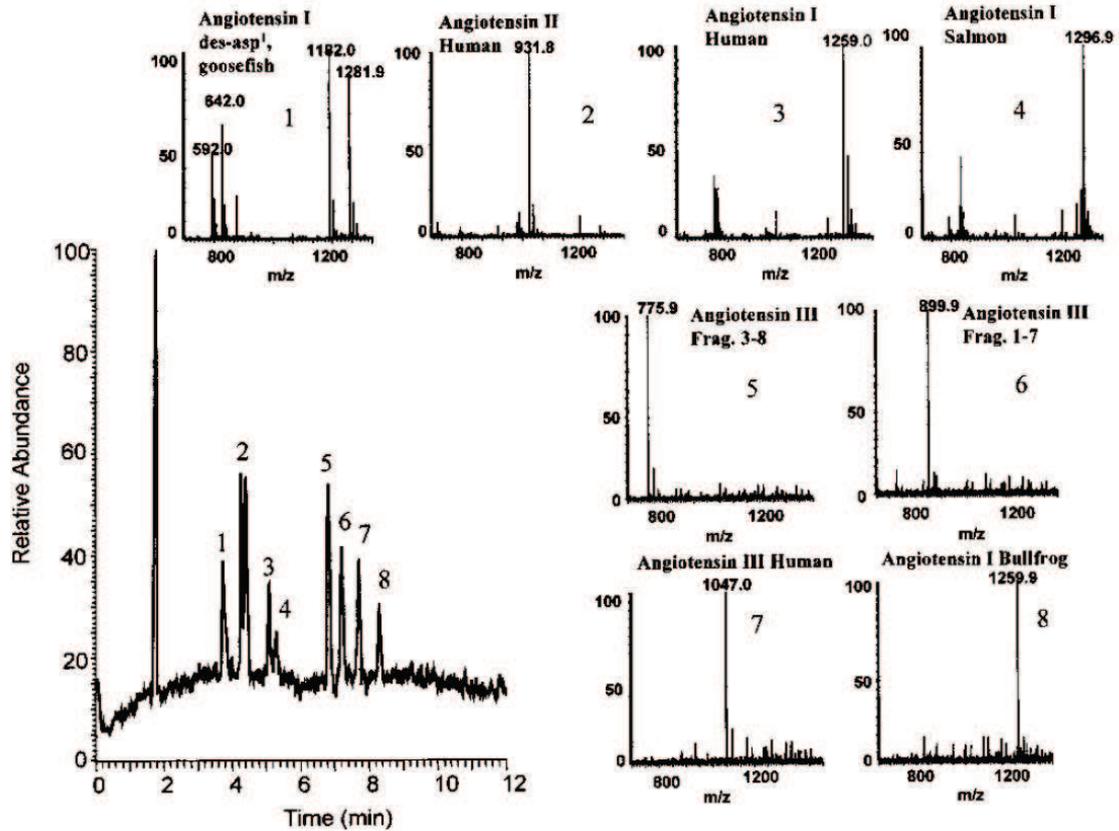
Une approche similaire afin de connecter un capillaire en silice à un micro-dispositif conçu pour la séparation électrophorétique a été utilisée par Zhang de l'Institut Barnett de Boston [Zha 99]. Le micro-dispositif est fabriqué à partir de verre de 1.1mm d'épaisseur par les techniques standard de photolithographie et de gravure chimique humide. Tout d'abord, deux substrats de verre constitués de structures identiques sont gravés à l'acide fluorhydrique. Le diamètre des canaux semi-circulaires d'entrée de l'échantillon et de séparation est de 75 $\mu$ m. Le diamètre du canal de séparation est par la suite élargi à 400 $\mu$ m sur environ la moitié de sa longueur (6.5mm) et des trous d'accès et d'alignement de 2mm sont percés avant que les deux substrats ne soient scellés thermiquement de manière à former des canaux circulaires. Le couplage à spectromètre de masse à trappe d'ions (Finnigan LCQ, San Jose, CA) est réalisé en utilisant une jonction liquide et un capillaire de transfert en silice (diamètre externe de 380 $\mu$ m, diamètre interne de 75 $\mu$ m) inséré et fixé avec de la colle époxy dans la cavité cylindrique de 400 $\mu$ m reliée au canal de séparation (Figure I.23).



**Figure I.23 :** Diagramme du micro-dispositif couplé au spectromètre de masse à trappe d'ions (Finnigan LCQ, San Jose, CA) par l'intermédiaire d'un capillaire de transfert et d'une jonction liquide [Zha 99].

Les parois du canal de séparation ainsi que celles du capillaire de transfert sont recouvertes par du polyacrylamide afin d'éviter l'adsorption.

La séparation d'un mélange de peptides (angiotensines) en utilisant ce dispositif est montrée Figure I.24.

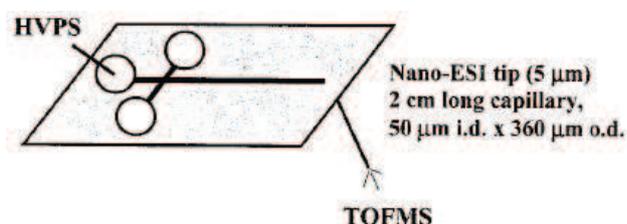


**Figure I.24 :** Séparation par électrophorèse capillaire d'un mélange de peptides (angiotensine) en utilisant le micro-dispositif de la figure I.23. La concentration de l'échantillon est de  $5\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour chaque peptide. La tension d'électronébulisation est de  $2\text{kV}$  [Zha 99].

La fixation du capillaire de transfert compliquant la fabrication conduisant à une augmentation du coût de production, ce type de dispositif est plutôt susceptible d'être employé dans un système modulaire complexe dans lequel il serait utilisé pour de nombreuses analyses avant d'être remplacé.

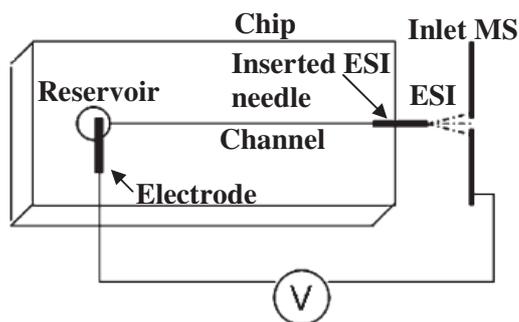
Toujours basés sur la même idée, d'autres dispositifs ont été réalisés par divers groupes mais diffèrent dans la façon d'insérer le capillaire et/ou d'appliquer le champ électrique.

Ainsi, Lazar du Laboratoire National d'Oak Ridge a présenté un dispositif permettant de réaliser une digestion protéolytique (Cf. lexique) en vue de l'identification de protéines. Le micro-dispositif constitué de canaux en verre (60µm de large et 20µm de profondeur) est fourni par la société Caliper Technologies Corp ([www.calipertech.com](http://www.calipertech.com)). Une nano-source (20 à 50µm de diamètre interne, 360µm de diamètre externe, 5µm de diamètre interne à l'extrémité, New Objective, Cambridge, MA) est insérée et collée perpendiculairement (E6000 adhesive, Eclectic Products) à la puce dans un trou percé dans le capot (Figure I.25).



**Figure I.25 :** Représentation schématique du micro-dispositif [Laz 01].

Le micro-dispositif couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (Sensar Corp., Provo, UT) est orienté verticalement de façon à placer l'extrémité de la source à 2-3mm de l'entrée. Afin de générer le nébulisat, une tension de 1.3-1.6kV est appliquée par l'intermédiaire d'une électrode en platine insérée dans le réservoir d'entrée comme montré sur la Figure I.26.



**Figure I.26 :** Nébulisat obtenu par insertion d'un capillaire en silice à l'extrémité d'un canal. La tension est appliquée entre le réservoir et l'entrée du spectromètre de masse [Laz 01].

Cette configuration électrique fonctionne correctement pour appliquer le potentiel d'électronébulisation, cependant, lorsqu'une séparation par électrophorèse capillaire est nécessaire, cette méthode ne fonctionne pas à cause de la limitation en courant imposée par le procédé d'électronébulisation (100nA soit un ordre de grandeur trop petit afin d'obtenir un écoulement électro-osmotique).

D'autres groupes ont donc opté pour appliquer le champ électrique entre le réservoir d'entrée et un capillaire en acier inoxydable.

Dans ce cadre, l'équipe de Figeys de l'Université de Washington à Seattle, a présenté un micro-dispositif fabriqué par le centre de micro-électronique d'Alberta (Edmonton, Canada) [Fig 97] [Fig 98 a] [Fig 98 b] [Fig 98 c]. Celui-ci est constitué de canaux (72 $\mu$ m de large, 30 $\mu$ m de profondeur) et de réservoirs (2mm x 2mm x 30 $\mu$ m de profondeur) gravés à l'acide fluorhydrique sur un substrat de verre (540 $\mu$ m d'épaisseur). Des électrodes en Or sont ajoutées au niveau de chaque réservoir, celles-ci sont reliées à des plots de contact afin d'appliquer les tensions. Un autre substrat de verre dans lequel des trous de 1.8mm de diamètre sont percés, afin d'avoir accès aux réservoirs, est scellé thermiquement. Ce dispositif est connecté à la source d'électronébulisation par l'intermédiaire d'un capillaire en silice de 12cm de long (diamètre externe 150 $\mu$ m, diamètre interne 75 $\mu$ m) utilisé comme pompe électro-osmotique. Ce capillaire traité avec du 3-aminopropylsilane, afin d'éviter l'adsorption, est collé d'un côté à la sortie du micro-canal et de l'autre côté, il est inséré dans un tube en acier inoxydable. La source d'électronébulisation constituée par un capillaire en silice de 3cm de long et 50 $\mu$ m de diamètre interne est insérée à l'autre extrémité de ce tube (Figure I.27).

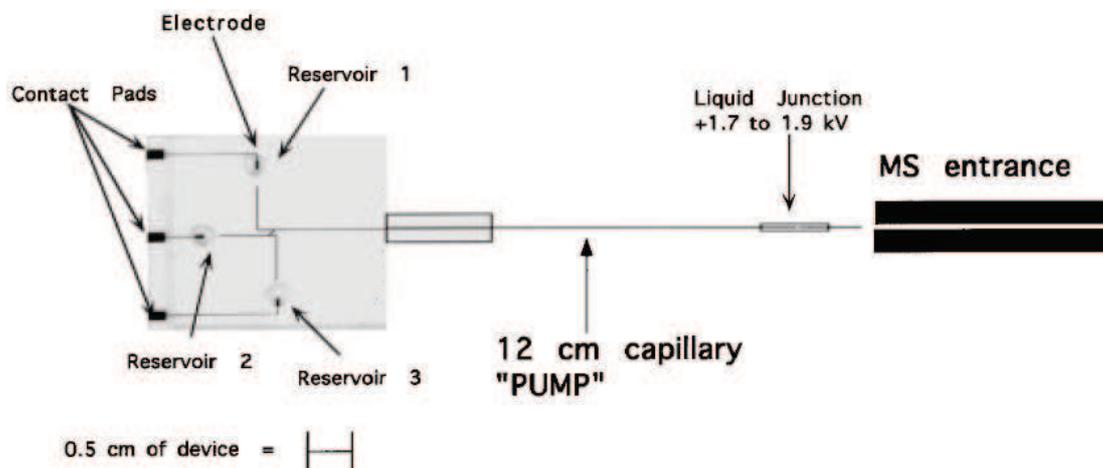
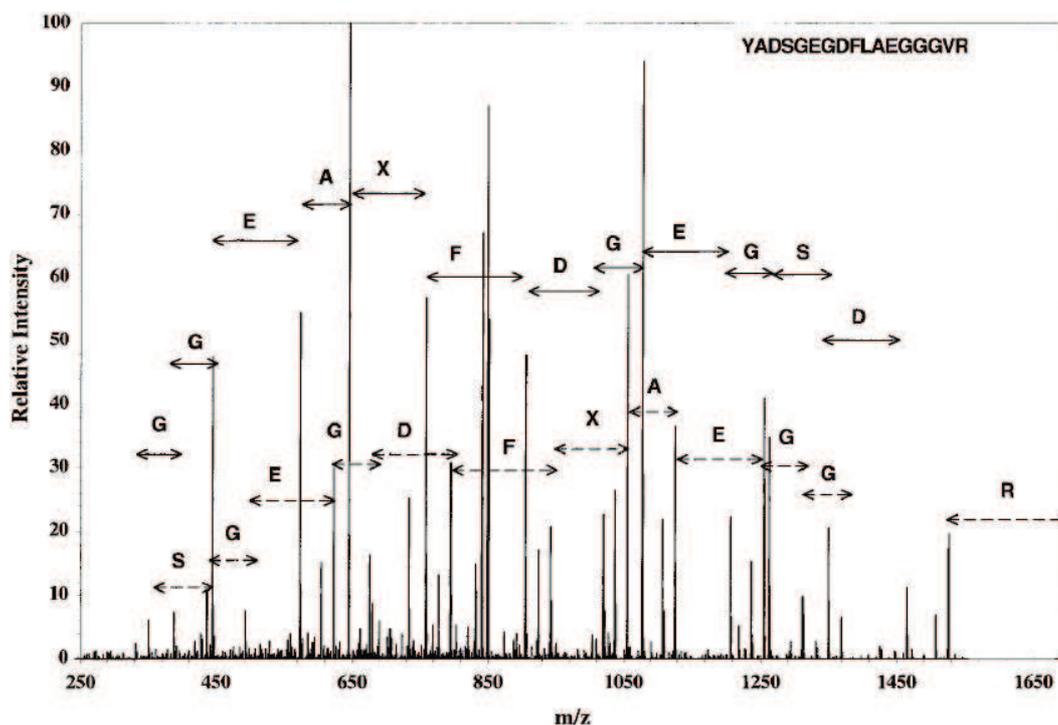


Figure I.27 : Illustration schématique du système d'analyse micro-fabriqué [Fig 97].

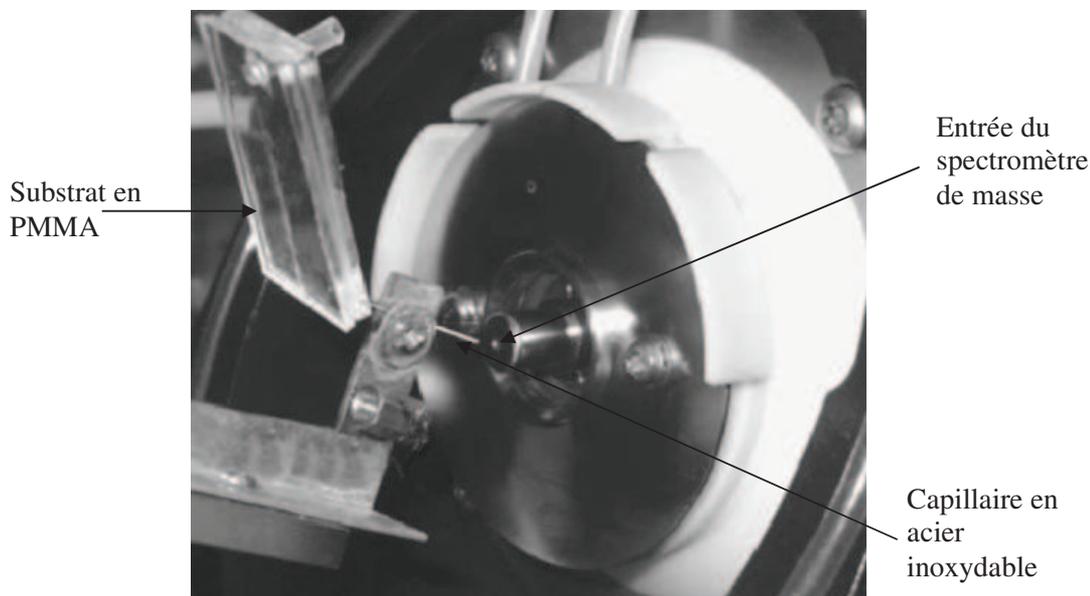
Afin de déterminer la sensibilité de détection de ce dispositif, une solution de fibrinopeptide A (Cf. lexique) avec des concentrations de plus en plus petites est introduite dans le réservoir 1 afin d'être analysée avec un spectromètre à trappe d'ions (LCQ Finnigan MAT, San Jose, CA). La Figure I.28 montre le spectre obtenu pour une concentration de  $33\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  qui constitue la limite de détection du système.



**Figure I.28 :** Spectre de masse obtenu pour une solution de fibrinopeptide A de concentration  $33\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  pour un débit de  $200\text{-}300\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$  en appliquant une tension de  $-5\text{kV}$  au niveau du réservoir et  $1.7\text{kV}$  sur le capillaire en acier inoxydable. La fragmentation de ce peptide donne deux types d'ions : les ions acylium (série d'ions B) représentés en pointillés et les ions amino (série d'ions Y) représentés en traits pleins [Fig 97].

Shui de l'Université Fudan à Shanghai en Chine a également utilisé cette technologie afin de coupler un micro-dispositif à un spectromètre à trappe d'ions (Esquire 3000, Bruker Daltonics, Germany) [Shu 03]. Il a percé un trou de  $400\mu\text{m}$  de diamètre à l'extrémité d'un canal ( $3\text{cm}$  de long,  $120\mu\text{m}$  de large,  $100\mu\text{m}$  de profondeur) réalisé dans un substrat en PMMA afin d'insérer et de fixer un capillaire en acier inoxydable à l'aide d'une colle époxy (Figure I.29). Ce capillaire ayant un diamètre externe et interne initial de  $400\mu\text{m}$  et  $100\mu\text{m}$

respectivement est pincé afin de réduire le diamètre interne à 30 $\mu$ m à son extrémité et ainsi réduire le cône de Taylor.

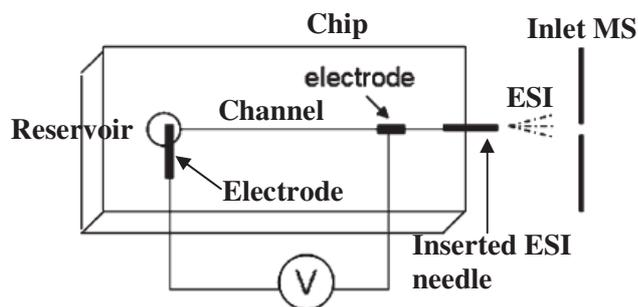


**Figure I.29 :** Photo du dispositif en PMMA couplé au spectromètre de masse par l'intermédiaire d'un capillaire en acier inoxydable [Shu 03].

Les performances de cette interface ont été démontrées par l'identification correcte d'une solution de 100ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> de myoglobine avec un débit de l'ordre de 100nL.min<sup>-1</sup> et une tension de 3kV.

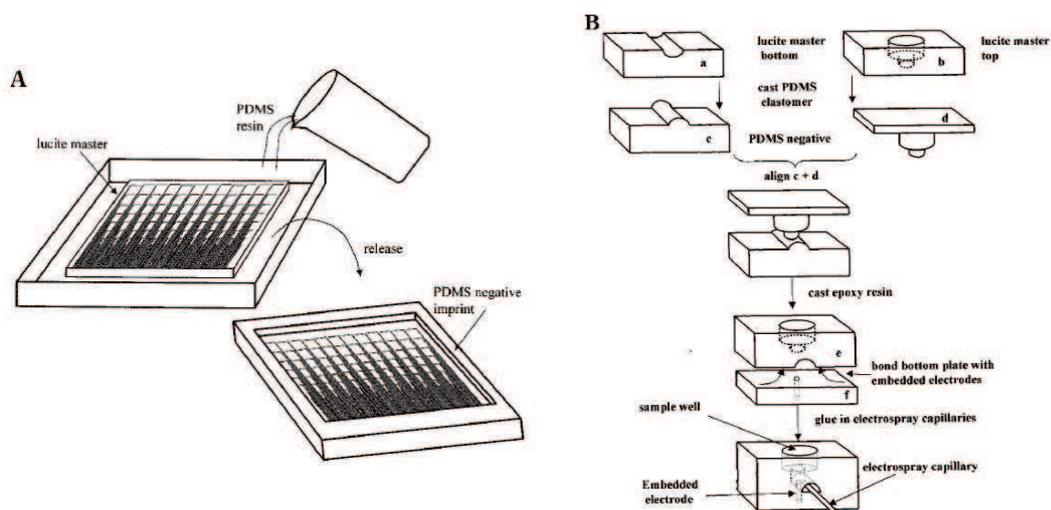
L'attrait pour ce type de capillaire par les chercheurs s'explique par leur facilité de fabrication, leur robustesse et leur durée de vie plus longue vis-à-vis des sources en silice qui sont fragiles et ont une durée de vie limitée par la dégradation de leur revêtement métallique. De plus, ils se montrent plus hydrophobes facilitant la formation d'un cône de Taylor plus petit qui tend à stabiliser le nébulisat.

L'équipe de Liu, de l'Institut Barnett de Boston, a adopté une autre approche afin d'appliquer la tension d'électronébulisation en utilisant des électrodes enterrées (Figure I.30).



**Figure I.30 :** *Spray à l'aide d'un capillaire en silice inséré à l'extrémité d'un canal. La tension est appliquée entre le réservoir et une électrode intégrée dans le canal microfluidique. [Liu 00].*

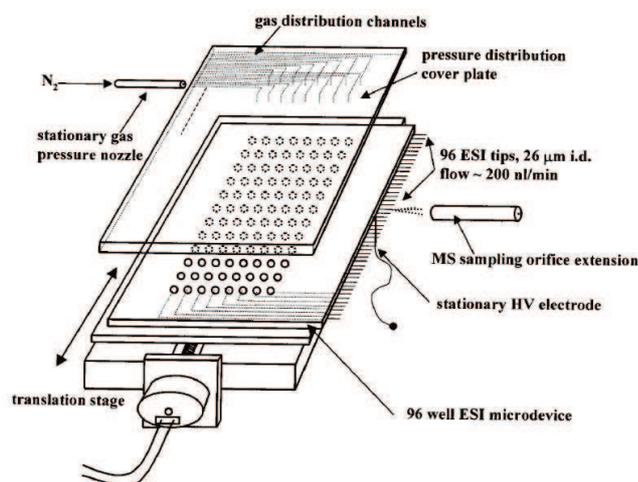
Il a développé un dispositif multi-sources (96) couplé à un spectromètre de masse. Chaque réservoir est connecté à un micro-canal indépendant lui-même relié à une source distincte. Le système est fabriqué par moulage d'une résine époxy (EpoFix, EMS, Ft. Washington, PA) comme montré sur la Figure I.31.



**Figure I.31 :** *Procédé de fabrication du dispositif à 96 puits. (A) Préparation d'un moule en PDMS utilisé pour structurer la résine époxy (EpoFix). (B) Des moules en plastique sont utilisés pour préparer ceux en PDMS (c, d). Après alignement, de la résine époxy est coulée afin d'obtenir la plaque avec les puits (e). Le même procédé est utilisé afin de préparer la plaque du dessous avec les électrodes (f) en utilisant de la résine époxy conductrice (Epo-Tek 415G). Pour terminer, les deux plaques ainsi que le capillaire sont collés. [Liu 00].*

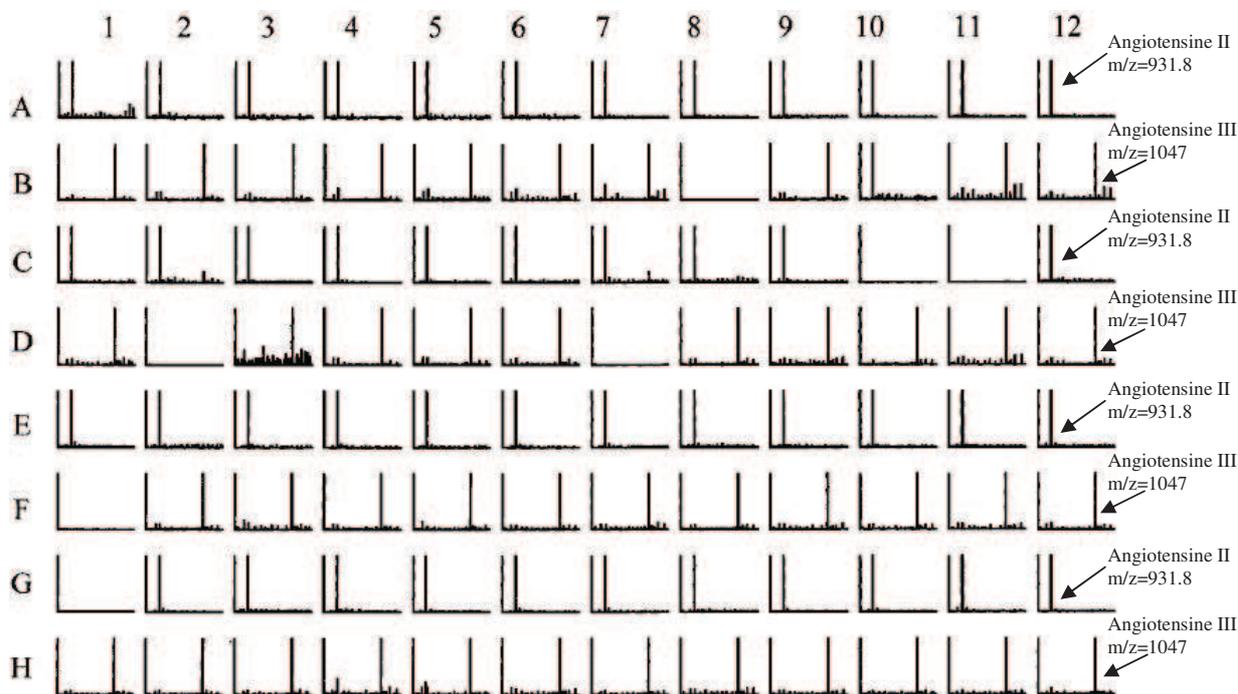
Des moules sont d'abord réalisés sur des plaques rectangulaires en plastique (Lucite S-A-R, Small Parts Inc., Miami Lakes, FL) à l'aide d'une fraiseuse numérique. Ensuite les moules obtenus sont placés dans une boîte en plastique et un silicone polymère (Silastic L-RTV silicone rubber kit, Dow Coming Corp., Midland, MI) est coulé afin d'obtenir de nouveaux moules (Figure I.31 A). La fabrication complète du dispositif est détaillée pour une seule source Figure I.31 B. Les moules *c* et *d* sont obtenus par le procédé décrit précédemment. Le moule *a* est constitué de 96 micro-canaux de forme semi-circulaire, de 300 $\mu$ m de diamètre et 3 à 10 cm de long, débouchant sur la tranche. Le moule *b* est constitué de 96 puits de 5mm de diamètre. Les moules *c* et *d* sont alignés afin de former une cavité qui est remplie avec de la résine (EpoFix). Après durcissement la partie en résine est collée à la partie du dessous *f* préparée également par moulage et comportant 96 électrodes (0.5mm de diamètre). Ces électrodes sont réalisées en résine époxy conductrice (Epo-Tek 415G, Epoxy Technology, Billerica, MA). Pour terminer, des capillaires en silice (2.5cm de long, 26 $\mu$ m de diamètre interne et 140 $\mu$ m de diamètre externe) sont insérés et collés à la sortie des canaux.

Les performances haut débit de ce système ont été démontrées en le couplant à un spectromètre à trappe d'ions (LCQ, Finnigan MAT, San Jose, CA) et en procédant à l'analyse de solutions d'angiotensines II et III déposées alternativement dans les 96 puits. Une tension de 4.5kV et une pression de 5psi sont appliquées de manière séquentielle à chaque puits une fois que sa source respective a été placée à 3mm de l'entrée du spectromètre de masse (Figure I.32).



**Figure I.32 :** *Vue éclatée du système. Le dispositif, constitué de 96 puits avec leurs canaux et sources d'électronébulisation individuels, est positionné en face de l'extension de l'orifice du spectromètre de masse grâce à une table de translation. L'analyse individuelle des échantillons est activée par la pressurisation séquentielle des puits par l'intermédiaire du capot et l'application de la tension d'électronébulisation grâce à l'électrode placée en dessous du dispositif [Liu 00].*

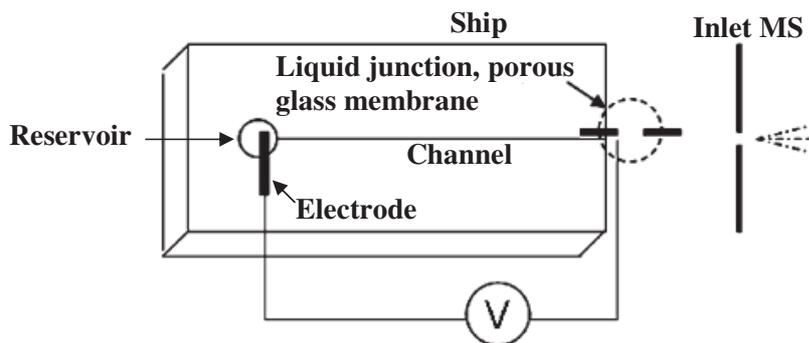
L'analyse des 96 peptides est réalisée en 480s soit 720 échantillons à l'heure (Figure I.33).



**Figure I.33 :** Spectres de masse des solutions d'Angiotensines II et III, pics à  $m/z=931.8$  et  $1047$  respectivement, déposées alternativement une ligne sur deux dans les puits et analysées séquentiellement. La concentration des deux peptides est de  $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Pour certains puits (exemple B8) aucun spectre n'a été obtenu en raison de l'obstruction des canaux [Liu 00].

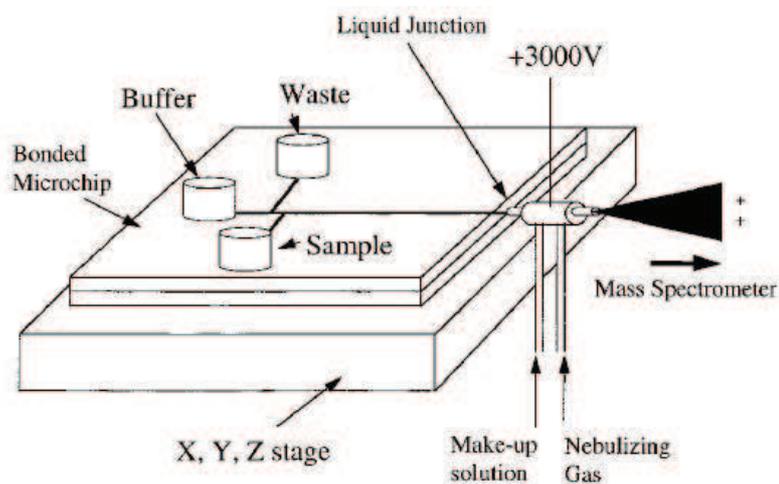
Le principal avantage de ce dispositif est d'éliminer les problèmes de contamination entre les différents échantillons, chaque source ayant son propre puits et canal. Cependant, même si contrairement à un fil, les électrodes enterrées présentent l'avantage de ne pas perturber l'écoulement et d'éviter les réactions chimiques pouvant entraîner la formation de bulles, la fixation manuelle des capillaires lors de la fabrication de ce dispositif ne permet pas d'envisager une production de masse et l'usage de la colle peut de plus conduire à l'obstruction des canaux comme on peut le voir sur la Figure I.33 où pour certains puits aucun spectre n'a été obtenu.

Une autre méthode pour appliquer la tension, consiste à utiliser une jonction liquide [Zha 00] [Zha 01] [Tac 03] [Den 01 a] [Den 01 b] [Cha 99] [Kam 01] [Tac 04] ou encore une membrane poreuse [Laz 00] [Laz 03] [Yue 05] (Figure I.34).



**Figure I.34 :** *Spray à l'aide d'une jonction liquide ou d'une membrane poreuse.*

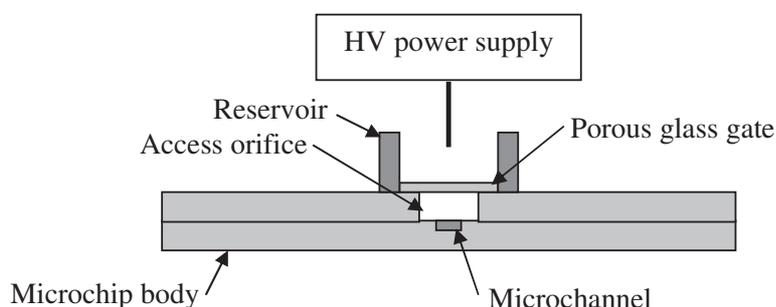
La plupart des jonctions liquides consistent à insérer un capillaire dans un dispositif et de le coupler à une source d'ionisation existante. L'avantage de la jonction liquide est de permettre une optimisation indépendante des conditions d'électronébulisation et de séparation des peptides. En effet, la composition du liquide dans la jonction (ex : 1% d'acide acétique, 50/50 : méthanol/eau) peut être ajustée afin de favoriser l'ionisation indépendamment de la solution à analyser (Figure I.35).



**Figure I.35 :** *Couplage d'une micro-puce à une source d'électronébulisation par l'intermédiaire d'une jonction liquide [Kam 01].*

La membrane poreuse quant à elle, permet d'éviter d'implémenter des électrodes dans le canal afin d'appliquer la tension d'électronébulisation, les électrodes en Or posant un certain nombre de problèmes. En effet, de nombreuses précautions doivent être prises durant

l'étape de nettoyage préalable au dépôt de l'Or. De plus, le procédé de scellement thermique du capot sur le dispositif fait que les électrodes ne sont pas homogènes, ce qui conduit à la formation de bulles dans le canal par hydrolyse de l'eau à la surface du métal perturbant la formation du cône de Taylor. Basée sur l'idée des sondes de pH, la membrane poreuse fait appel à la conduction des ions à travers une fine épaisseur de verre. Le verre réduit en couche mince présente en effet des pores très proches permettant le passage de petits ions mais pas de la solution. La tension d'électronébulisation est alors appliquée à la solution dans le microcanal directement à travers le verre à l'aide d'un fil de platine plongé dans une solution ionique contenue dans un réservoir évitant ainsi le contact direct métal/liquide (Figure I.36).



**Figure I.36 :** Dispositif mettant en œuvre une membrane poreuse afin d'appliquer la tension nécessaire à la nébulisation de la solution [Laz 03].

Cependant, ces approches nécessitent une étape manuelle de perçage et d'insertion du capillaire servant de source d'électronébulisation.

Le couplage d'émetteurs avec des canaux microfluidiques améliore de manière significative les performances de la spectrométrie de masse par électronébulisation comparé à un spray émis directement à partir de la tranche d'une puce. Cette approche a également permis de coupler des dispositifs microfluidiques à des sources d'ionisation commerciales. Cependant, plusieurs difficultés sont à souligner. Tout d'abord, des volumes morts néfastes aux performances de séparation sont facilement introduits lors du couplage bien qu'ils peuvent être évités en mettant en œuvre des procédés de perçage complexes et en utilisant de la colle [Bin 99]. Cependant, ces méthodes de perçage et l'insertion manuelle de capillaires ne sont pas un bon choix si le dispositif microfluidique doit être jetable et par conséquent bon marché à fabriquer. De plus, ces approches ont tendance à être vouées à l'échec. Nous avons pu en avoir un aperçu à travers l'approche de Liu présentant une puce composée de 96 puits

qui sont connectés individuellement à un canal microfluidique dans lequel est inséré manuellement un capillaire [Liu 00]. Bien que son travail soit un remarquable exemple d'analyse à haut débit, 7 sources sur 96 ne fonctionnaient pas. Cela est probablement dû à une erreur de manipulation lors de la procédure de collage. Enfin, la spectrométrie de masse par électronébulisation étant une méthode de détection très sensible, le choix des matériaux pouvant être mis en œuvre pour la fabrication des systèmes est limité. En particulier, la surface des canaux et les connexions étant exposées aux solvants organiques, la colle utilisée pour l'assemblage des canaux avec le capillaire peut libérer des composés qui perturbent le spectre de masse suivant les solvants utilisés constituant ainsi une source de contamination limitant la sensibilité du dispositif. C'est pourquoi la partie suivante présente une troisième approche afin de fabriquer des puces pour lesquelles la source d'électronébulisation est réalisée au cours des étapes du procédé de fabrication.

## 2-3 Sources d'ionisation micro-fabriquées

Comme vu précédemment, le principal problème qui se pose avec l'insertion manuelle d'aiguilles dans des canaux microfluidiques, est que cette technique ne se prête pas à la production en masse [Liu 00]. Deux approches ont permis de montrer qu'il était possible de fabriquer des puces complètement intégrées sur lesquelles le canal microfluidique et l'émetteur peuvent être réalisés simultanément pendant le même procédé de fabrication, éliminant ainsi les volumes morts. La première approche met en œuvre des technologies qui permettent la fabrication du canal microfluidique et de l'émetteur en une seule étape, une puce à la fois c'est-à-dire une production en série. Les exemples tirés de la littérature mettent en œuvre l'usinage par ablation laser. La seconde approche emploie les procédés de photolithographie qui permettent de fabriquer un grand nombre de structures en une seule étape et peuvent donc être utilisés pour réaliser de nombreuses puces simultanément c'est-à-dire une production de type parallèle.

Les dispositifs micro-fabriqués afin de délivrer des échantillons pour l'analyse en spectrométrie de masse par ionisation de la solution présentent de nombreux avantages :

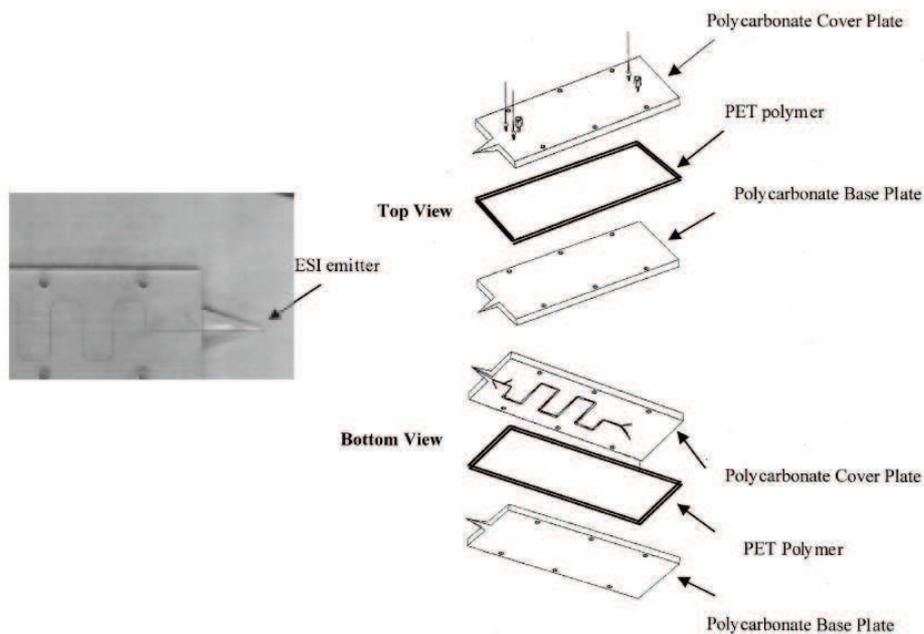
- leur fabrication peut être contrôlée précisément et leurs dimensions réduites vers une gamme inférieure au micron assurant une meilleure reproductibilité et sensibilité de l'analyse.

- ils permettent de s'affranchir des problèmes liés à l'utilisation de la colle et des volumes morts générés par l'insertion d'un capillaire.
- de petites quantités d'échantillon sont consommées.
- les interférences et contaminations introduites par l'expérimentateur sont minimisées.
- le potentiel pour le multiplexage d'échantillons a été démontré.
- plusieurs étapes d'analyse peuvent être réalisées.
- ils se montrent compatibles avec l'automatisation.

### 2-3-1 Fabrication série de puces comportant des sources d'ionisation intégrées

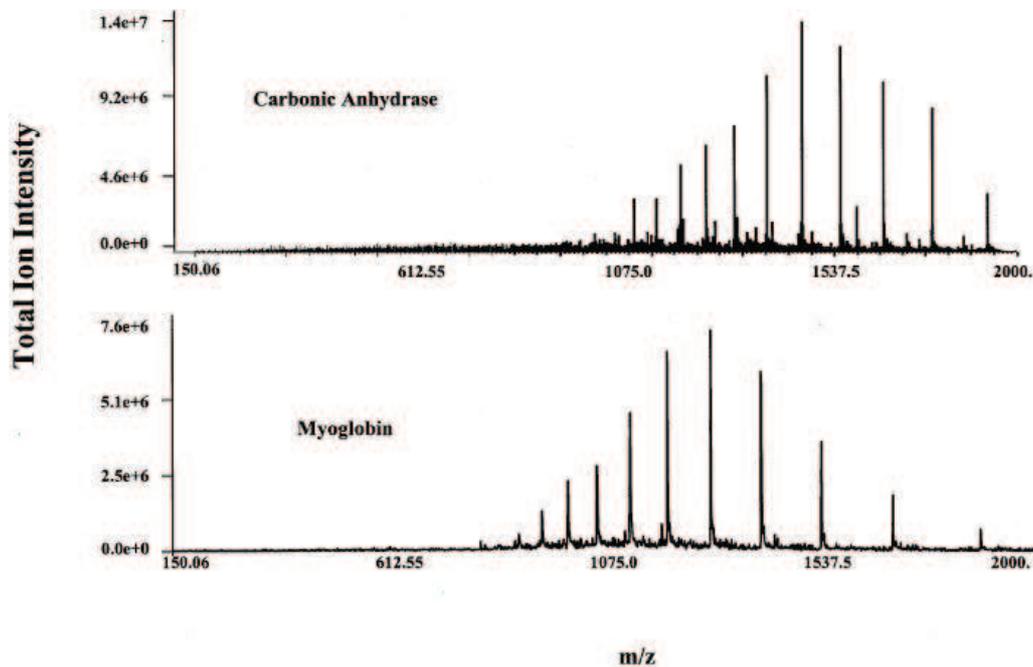
#### 2-3-1-1 Sources en polycarbonate

Wen du laboratoire de science moléculaire environnementale (état de Washington, Etats-Unis) a utilisé l'ablation laser afin de réaliser des sources intégrées sur un substrat de polycarbonate. Le micro-canal, en forme de serpentín afin de réaliser la séparation des protéines, fait 16cm de long, 30 $\mu$ m de large et 50 $\mu$ m de profondeur (Figure I.37).



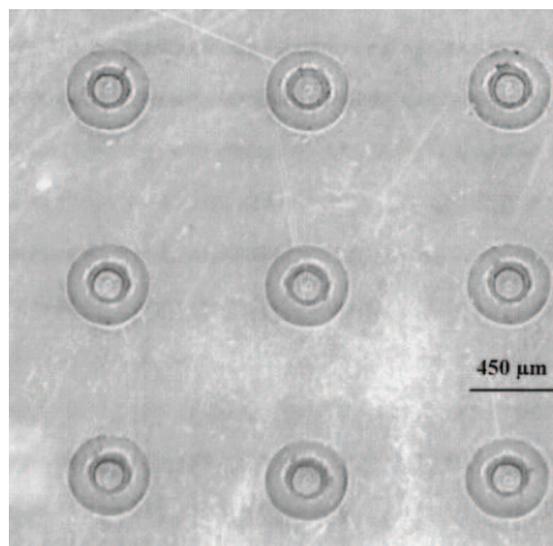
**Figure I.37 :** Photo de la source micro-fabriquée et vues éclatées montrant la construction du dispositif [Wen 00].

Les performances et la stabilité de ce dispositif ont été démontrées pour des mélanges de protéines en utilisant un spectromètre à trappe d'ions (LCQ Finnigan MAT, San Jose, CA) dont l'entrée est positionnée à 2-3mm du dispositif et en appliquant une tension de 2kV à l'aide d'électrodes en platine (Figure I.38).



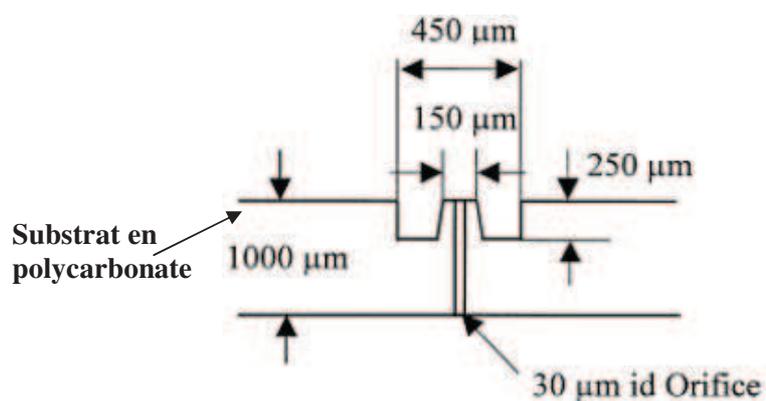
**Figure I.38** : Spectres de masse obtenus à partir d'un mélange d'anhydrase carbonique (Cf. lexique) et de myoglobine [Wen 00].

Tang du même laboratoire a utilisé cette technique par laser afin de percer des trous de 30µm à travers une couche de 1mm d'épaisseur de polycarbonate [Tan 01]. Un réseau de neuf sources d'électronébulisation en forme de lance semblables à celles en silicium présentées par Schultz (Advion BioSciences, New York, Etats-Unis) [Sch 00] est ainsi réalisé d'un côté du substrat (Figure I.39).



**Figure I.39** : Réseau de neuf sources d'électronébulisation en polycarbonate [Tan 01].

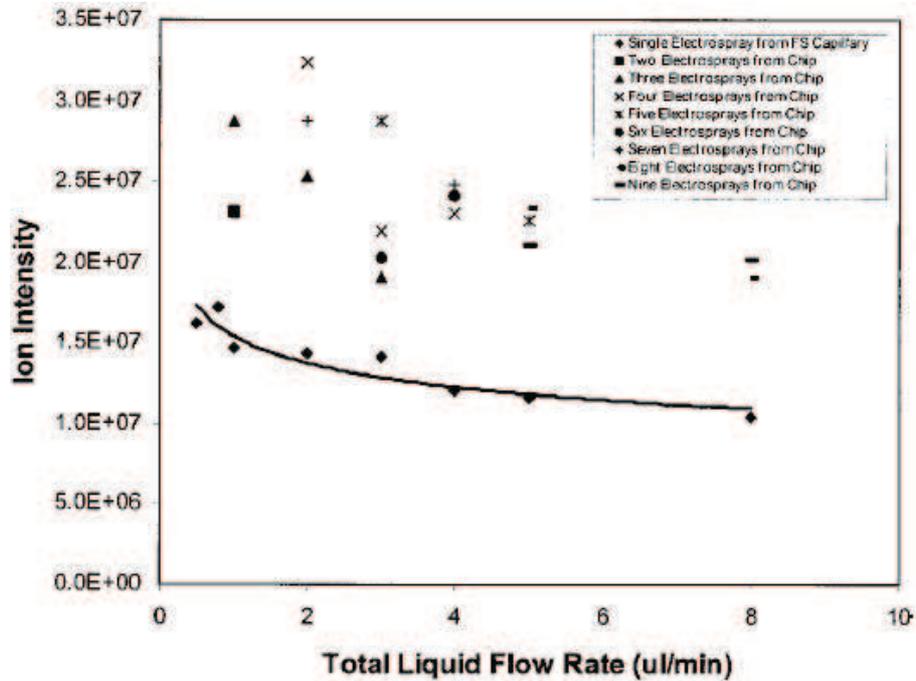
Ces sources sont alimentées en liquide de l'autre côté du substrat par un système de micro-seringues (Figure I.40).



**Figure I.40** : Dimensions des sources d'électronébulisation en polycarbonate [Tan 01].

Une augmentation de la sensibilité d'un spectromètre de masse à triple quadripôles (Sciex API 3000) d'un facteur 2 a été observée comparée à celle obtenue avec des capillaires standard en dirigeant simultanément les neuf cônes de Taylor vers l'entrée de celui-ci. Le

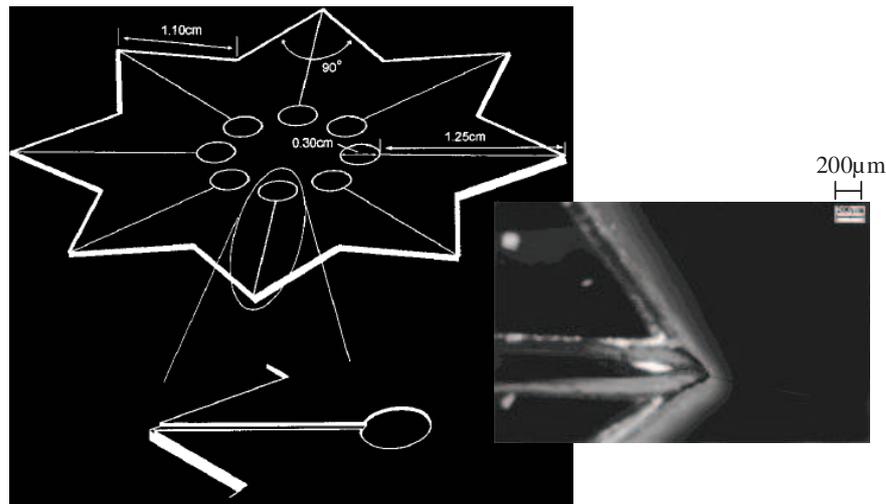
dispositif est placé à 5mm de l'entrée et une tension de 7kV est nécessaire afin d'obtenir des nébulisats stables (Figure I.41) [Tan 01].



**Figure I.41 :** Comparaison de la sensibilité en fonction du débit d'une solution de  $50\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de réserpine (Cf. lexique) dans un mélange eau /méthanol (50/50) et 1% d'acide acétique pour un capillaire en silice et plusieurs sources micro-fabriquées mises en service simultanément [Tan 01].

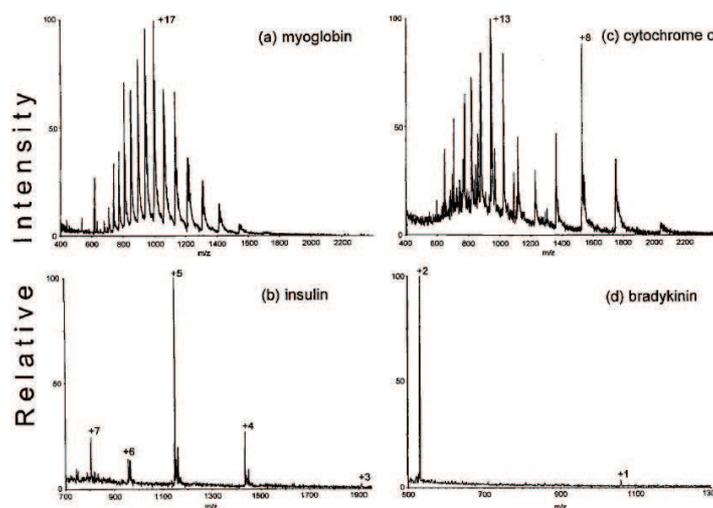
### 2-3-1-2 Sources en PMMA

Yuan à Taiwan (National Sun Yat-Sen University) a imaginé un dispositif en PMMA se présentant sous la forme d'une étoile à huit branches. Chaque branche correspond à une source d'électronébulisation indépendante (Figure I.42).



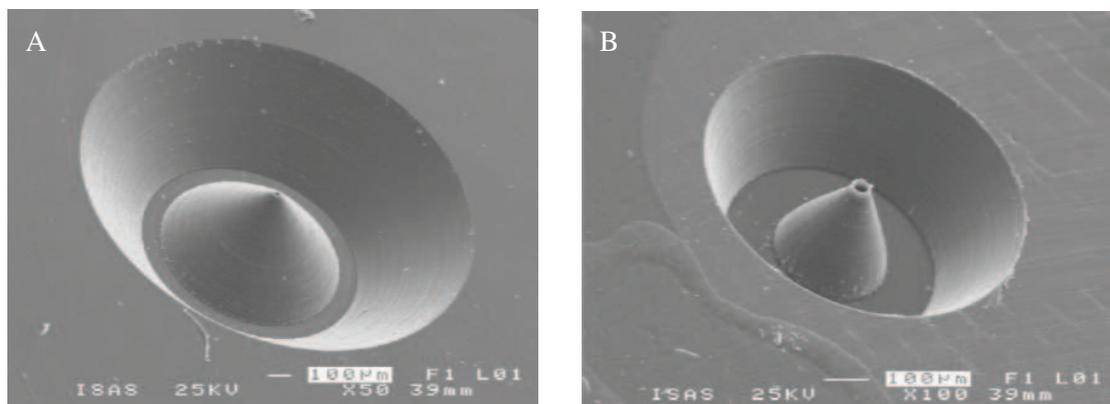
**Figure I.42 :** Dispositif microfluidique en PMMA en forme d'étoile présenté par Yuan [Yua 01].

Au centre de cette étoile, se trouvent les réservoirs d'entrée et la forme en pointe à l'extrémité des branches est utilisée comme source d'ionisation. Dans chaque branche, un canal de  $300 \times 376 \mu\text{m}$  relie le réservoir à la source. Le procédé afin de réaliser les canaux est assez grossier puisqu'il repose sur un usinage du matériau grâce à un couteau pointu. La tension nécessaire à l'obtention d'un nébulisat (4.8kV) est assez élevée en raison des dimensions importantes des canaux. Des spectres de peptides ayant une concentration de  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  ont tout de même pu être obtenus en plaçant l'extrémité de la source à 5mm de l'entrée d'un spectromètre de masse à quadripôle (PE Sciex API 1) (Figure I.43).



**Figure I.43 :** Spectres de masse obtenus avec le dispositif en forme d'étoile pour différents peptides ayant une concentration de  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  [Yua 01].

Schilling a fabriqué des sources dans ce même matériau mais en utilisant un procédé de fabrication beaucoup plus élaboré [Sch 04]. Elles sont produites à l'aide d'une machine à usiner (Primacon PMF 24, Allemagne). Des micro-forets ayant un diamètre de 30, 50 ou 100 $\mu\text{m}$  ainsi que des cutters en carbure avec un angle à l'apex de 60° et 90° (SPPW, Allemagne) sont utilisés. Les sources sont réalisées sur une feuille de PMMA, normalement utilisée comme capot pour les puces microfluidiques. Tout d'abord, un canal de 500 $\mu\text{m}$  de large et 300 $\mu\text{m}$  de profondeur est percé à l'arrière de la feuille de PMMA de 750 $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Ce canal est utilisé afin de connecter la source à une pompe externe par l'intermédiaire d'un capillaire. Ensuite, le canal de la source de 30, 50 ou 100 $\mu\text{m}$  de diamètre est percé sur la face avant en étant centré par rapport au canal de connexion réalisé auparavant. Ensuite le cutter permet de former un cône centré sur le trou percé. La rugosité de la surface et les arêtes sont réduites par étapes graduelles jusqu'à obtenir une profondeur de 250 $\mu\text{m}$  pour le cutter ayant un angle de 60° et de 450 $\mu\text{m}$  pour le cutter ayant un angle de 90°. A chaque étape une couche de 15 $\mu\text{m}$  est enlevée. Le foret est passé à nouveau dans les trous afin d'enlever les éclats. Les photographies de deux de ces sources au microscope électronique à balayage sont présentées Figure I.44.

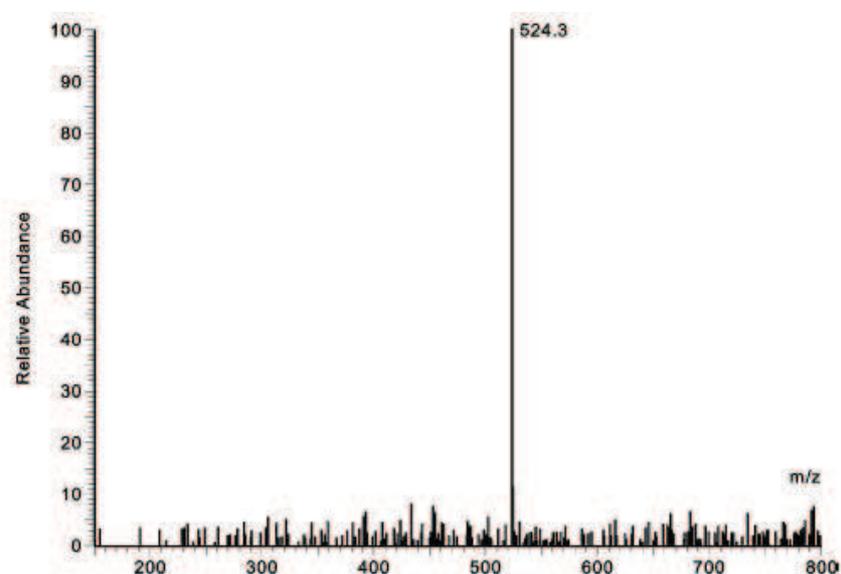


**Figure I.44** : Photographie au microscope électronique à balayage des sources micro-fabriquées en PMMA ayant un orifice interne de 30 $\mu\text{m}$  de diamètre. (A) L'angle à l'apex est de 90°. (B) L'angle à l'apex est de 60° [Sch 04].

Elles diffèrent par l'angle à l'apex qui est de 90° pour la première (Figure I.44 (A)) et 60° pour la deuxième (Figure I.44 (B)). Dans les deux cas, le trou percé a un diamètre de 30 $\mu\text{m}$ . Tandis que la source avec un angle de 90° a un cône de 900 $\mu\text{m}$  de diamètre et un diamètre total de 2000 $\mu\text{m}$  la source ayant un angle de 60° a un cône de 300 $\mu\text{m}$  de diamètre et un

diamètre total de 800 $\mu\text{m}$ . La vitesse de rotation de l'outil d'usinage doit être optimisée afin d'obtenir une rugosité minimale.

Ces sources ont été testées avec un spectromètre de masse à piège d'ions (LCQ Deca Thermo Finnigan, USA). La tension appliquée est comprise entre 1.6 et 4.5kV. Le contact électrique est assuré par une fine couche d'or à l'arrière de la source. Les meilleures performances sont obtenues avec la source ayant un angle de 60°. En effet, étant plus pointue, le diamètre du cône de Taylor est réduit conduisant à une meilleure stabilité du nébulisat. Le spectre obtenu avec le peptide MRFA (methionine-argenine-phenylalanine-alanine) dans de l'eau et en plaçant la source à 2mm de l'entrée du spectromètre est montré Figure I.45.

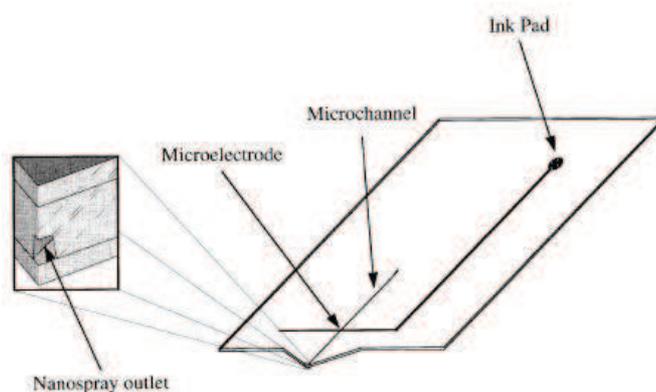


**Figure I.45** : Spectre de masse obtenu pour le peptide MRFA ayant une concentration de  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$  dans de l'eau avec 1% d'acide acétique pour la source en PMMA ayant un diamètre de 30 $\mu\text{m}$  et un angle à l'apex de 60° [Sch 04].

Ces émetteurs ont été utilisés pendant 6 heures sans signe de dégradation. Un autre aspect important afin de caractériser une interface ESI est le ratio signal sur bruit afin d'estimer la plus petite concentration de substance pouvant être détectée. Avec un rapport signal sur bruit de 3, la limite de détection pour le MRFA est de l'ordre de  $10^{-8}$  mol.L $^{-1}$ .

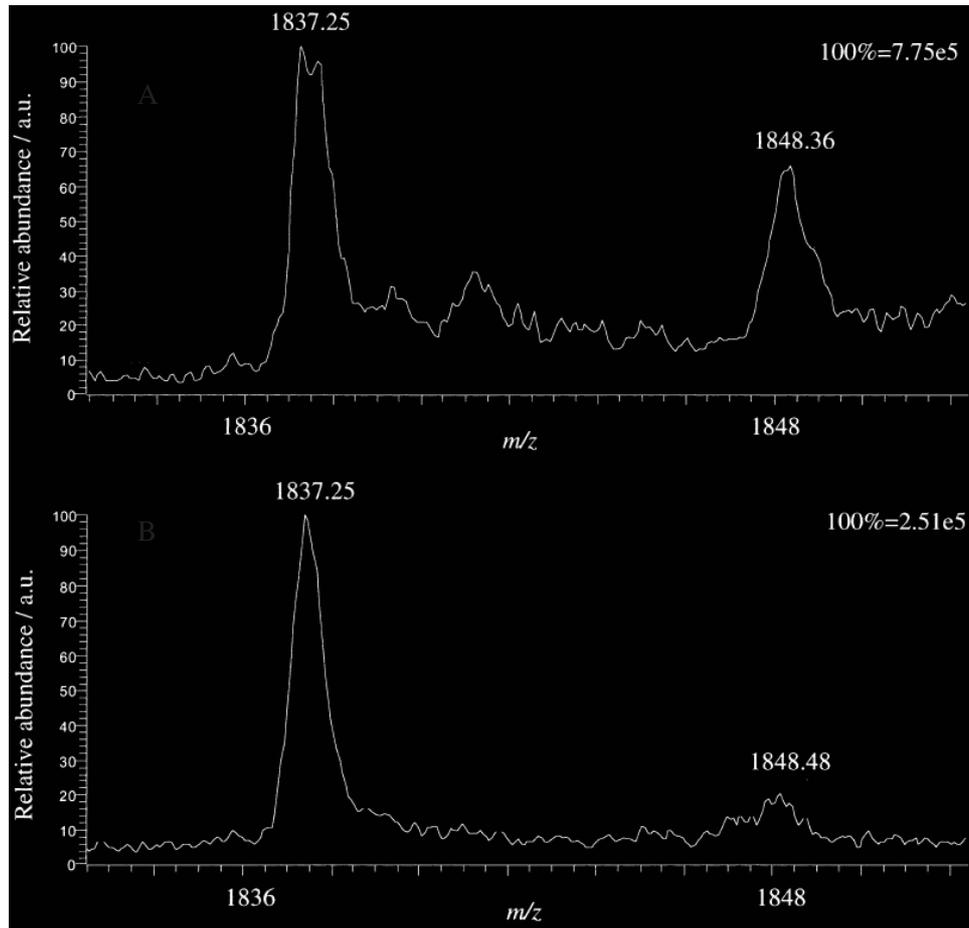
## 2-3-1-3 Sources en PET

Rohner, de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne en Suisse, a elle aussi utilisé l'ablation laser sur la surface d'un substrat de polyéthylène téréphtalate (PET) afin de faire des canaux microfluidiques. Le canal a une forme trapézoïdale de 35 $\mu$ m de large et 40 $\mu$ m de profondeur. Au cours de l'usinage, la forme en V de la source est définie [Roh 02]. Une électrode à encre de carbone est intégrée sur le dispositif afin d'appliquer la tension de 4kV pour l'électronébulisation (Figure I.46).



**Figure I.46 :** Représentation schématique de l'interface d'électronébulisation [Roh 02].

Par la suite, elle a montré que cette électrode pouvait être utilisée afin de marquer de manière électrochimique les résidus libres de cystéine (Cf. lexique) dans les protéines. Une oxydation électrochimique de p-hydroquinone (Cf. lexique) a été réalisée au niveau de l'électrode afin d'obtenir de la p-benzoquinone (Cf. lexique). Ce produit réagit avec les résidus libres de cystéine des protéines dans le micro-canal et a été correctement détecté en plaçant le dispositif à une distance comprise entre 1 et 4cm de l'entrée d'un spectromètre de masse à trappe d'ions (LCQ DUO Ion Trap, Finnigan, San Jose, USA) [Roh 02]. Cette méthode permet de déterminer le nombre et la position des résidus de cystéine dans les protéines. L'étude comparative montre que cette interface offre un meilleur rendement d'ionisation qu'une source classique (Figure I.47).



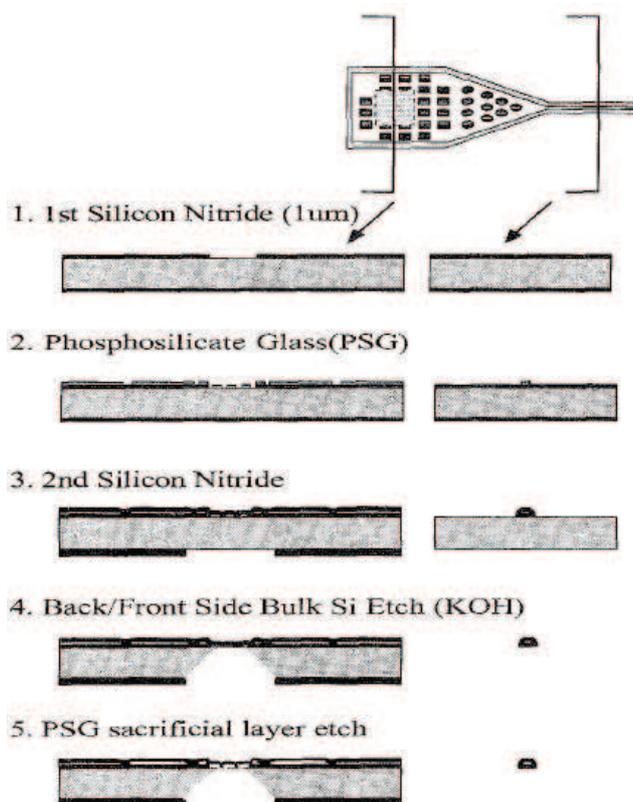
**Figure I.47 :** Spectres de masse d'une solution de  $\beta$ -lactoglobuline A (Cf. lexique) avec 5mM de *p*-hydroquinone ; (A) en utilisant la source micro-usinée en PET, (B) en utilisant une source classique [Roh 02].

En résumé, même si certains des dispositifs décrits précédemment ont des performances similaires voire supérieures aux sources classiques, leur procédé de fabrication mettant souvent en œuvre l'ablation laser ne permet pas d'envisager une production de masse d'où le développement d'autres procédés de fabrication en parallèle.

## 2-3-2 Fabrication parallèle de puces comportant des sources intégrées

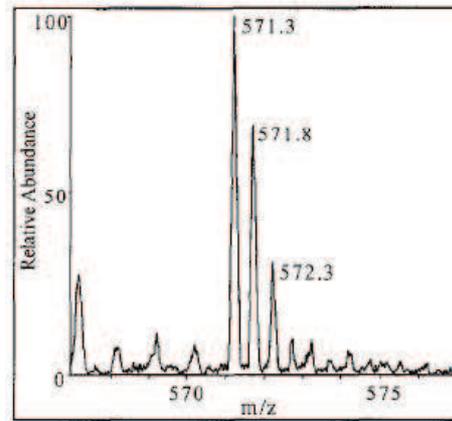
### 2-3-2-1 Sources en nitrure de silicium

Mimant les aiguilles conventionnelles, Desai, de l'Institut de Technologie de Californie, a présenté, en 1997, une source en nitrure de silicium réalisée par les technologies standard de micro-fabrication [Des 97]. Celle-ci présente un canal de  $2\mu\text{m}$  de large et  $1\mu\text{m}$  de profondeur et a une longueur de  $40\mu\text{m}$  (Figure I.48).



**Figure I.48 :** Etapes de fabrication de la micro-source réalisée en nitrure de silicium [Des 97].

Ce dispositif a été testé en analysant une solution de gramicidine S ( $4\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) (Cf. lexique) dans un mélange eau/méthanol (50/50) auquel est ajouté 1% d'acide acétique. Il est placé à une distance comprise entre 0.25 et 0.4mm de l'entrée du spectromètre à trappe d'ions (Finnigan Mat LCQ) et le spectre est obtenu pour une tension de 4kV (Figure I.49).

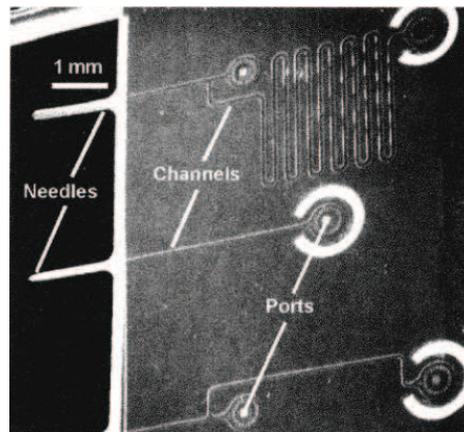


**Figure I.49 :** Spectre de masse de la gramicidine S obtenu avec une source micro-fabriquée en nitrure de silicium [Des 97].

Même si la sensibilité de ce dispositif est comparable à celle des sources conventionnelles, celui-ci souffre de la contamination par la résine époxy utilisée afin de coller le capillaire de transfert permettant d'alimenter la source. De plus la taille du canal est limitée par le temps de gravure de la couche sacrificielle en PSG (Phosphosilicate Glass) à l'acide fluorhydrique qui attaque en même temps le nitrure de silicium.

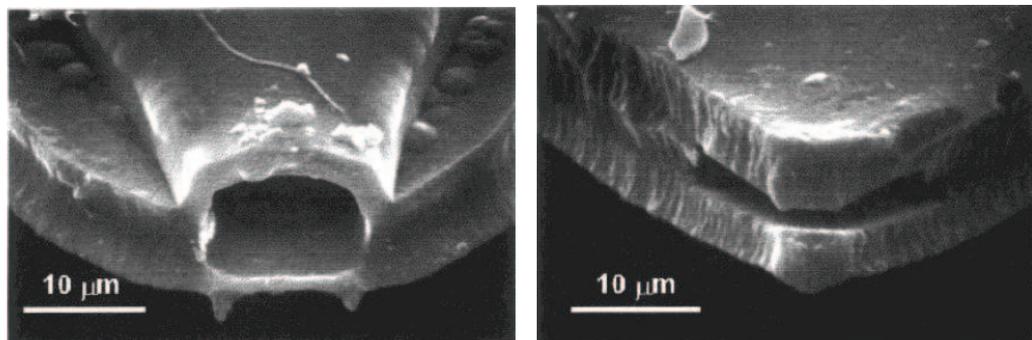
#### 2-3-2-2 Sources en parylène

La même équipe s'est intéressée à la fabrication de sources en parylène, matériau polymère photolithographiable [Lic 00]. Les dimensions des canaux sont 100 $\mu$ m de large pour 5 $\mu$ m de haut (Figure I.50).



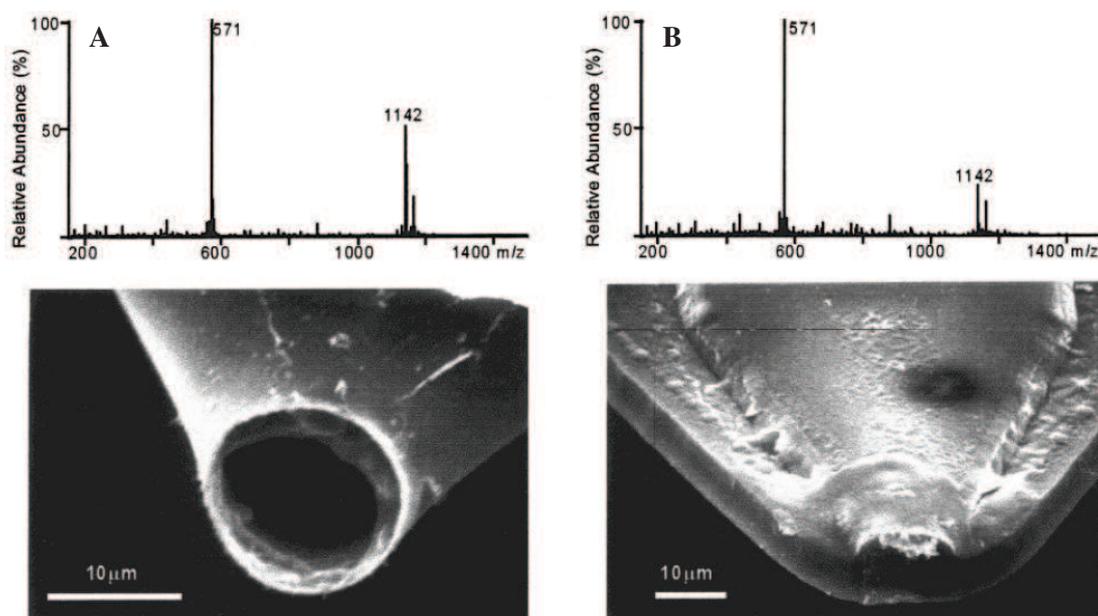
**Figure I.50 :** Image au microscope électronique des sources micro-fabriquées en parylène [Lic 00].

Ces sources présentent un orifice de sortie de section rectangulaire de  $5 \times 10 \mu\text{m}$  dont la forme peut être modifiée suivant le masque utilisé (Figure I.51).



**Figure I.51 :** Image au microscope électronique de l'extrémité des sources micro-fabriquées en parylène suivant le masque utilisé [Lic 00].

Des comparaisons ont été faites avec des capillaires de verre étirés de dimensions équivalentes (orifice de  $15 \mu\text{m}$ ). Les spectres obtenus sont similaires avec un niveau de bruit un peu plus élevé pour la source en parylène (Figure I.52).



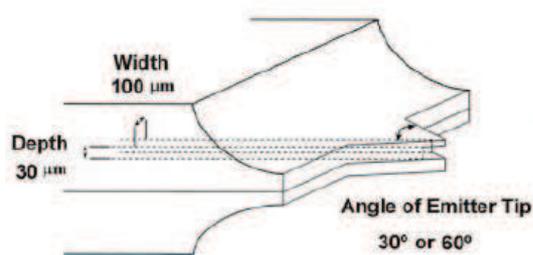
**Figure I.52 :** Comparaison des spectres de masse obtenus avec une solution de gramicidine S pour un capillaire en silice (A) et une source micro-fabriquée en parylène (B) [Lic 00].

La tension nécessaire à l'obtention du nébulisat est de l'ordre de 1.2-1.8kV lorsque la source est placée à 1mm de l'entrée d'un spectromètre à trappe d'ions (Finnigan, San Jose).

L'inconvénient du parylène est qu'il se déforme avec la chaleur dégagée par le capillaire d'entrée en métal du spectromètre de masse qui est chauffé.

### 2-3-2-3 Sources en PDMS

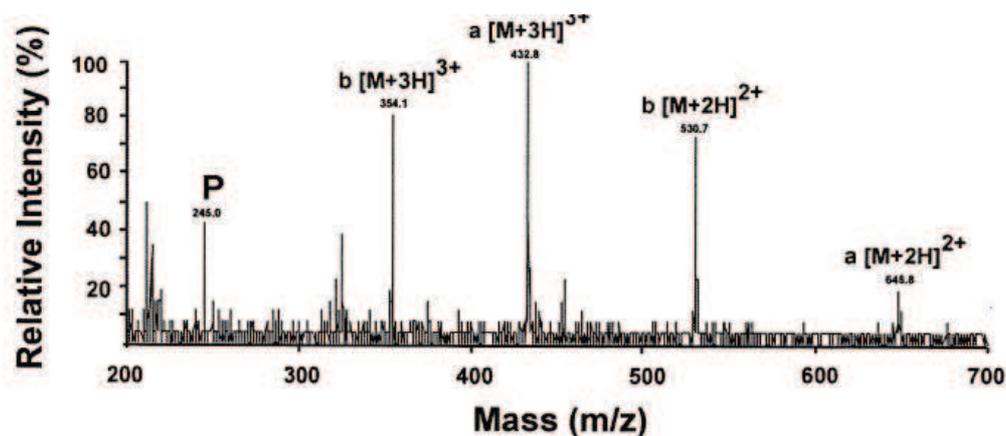
Kim de l'Université médicale de Caroline du Sud (Etats-Unis) a fabriqué une puce microfluidique en utilisant un autre matériau de la classe des plastiques, le PDMS (polydiméthylsiloxane), et la technique de photolithographie douce. Pour cela, un moule en SU-8 est d'abord réalisé sur un substrat de silicium. Ensuite, ce moule permet de structurer la partie supérieure de la source par pression sur une première couche de PDMS. La partie inférieure est structurée de la même façon sur une seconde couche de PDMS avec un autre substrat en silicium. Pour terminer, les deux parties sont scellées thermiquement (Figure I.53).



**Figure I.53 :** Schéma représentant la source micro-fabriquée en PDMS [Kim 01 a].

Les micro-canaux de 30 x 100µm et 4cm de long débouchent sur l'orifice de nébulisation présentant une section rectangulaire de mêmes dimensions.

Les performances de ce dispositif ont été évaluées à l'aide d'un spectromètre de masse à temps de vol (Mariner ESI-TOF-MS, PE Biosystems, Framingham, MA) et d'un mélange à différentes concentrations d'angiotensine I et de bradykinine dans une solution méthanol/eau (50/50) et 0.1% d'acide acétique. La limite de détection est évaluée à 1µmol.L<sup>-1</sup> lorsque le dispositif est placé à 10mm de l'entrée du spectromètre de masse et pour une tension de 2.7kV (Figure I.54).



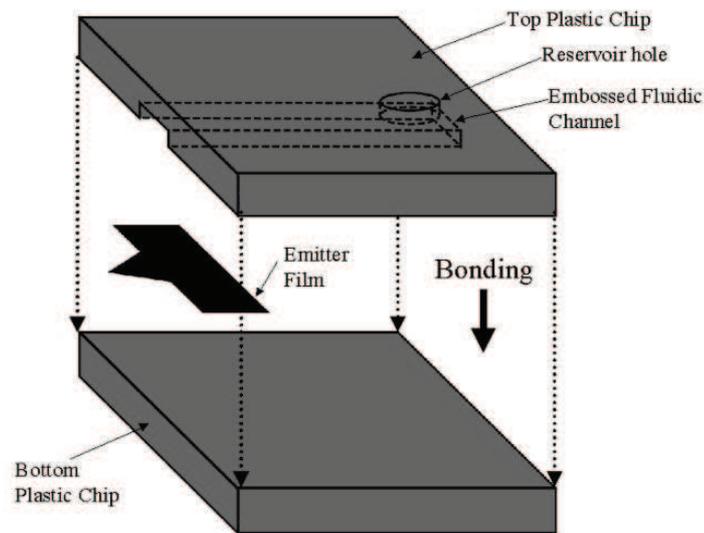
**Figure I.54** : Spectre de masse obtenu avec la source micro-fabriquée en PDMS pour un mélange d'angiotensine I et de bradykinine de concentration  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$  à un débit de  $1\mu\text{L.min}^{-1}$  [Kim 01 a].

La sensibilité de ces sources en PDMS est plus petite que celle des aiguilles en silice (limite de détection de  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$  au lieu de  $0.01\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) mais un nébulisat stable peut être maintenu pendant plus de 30 heures [Kim 01 a] [Kim 01 b] [Kim 01 c]. Cependant, même si le PDMS offre de nombreux avantages tels qu'un bas coût, des propriétés optiques permettant la détection par fluorescence, une fabrication simple et rapide, des précautions doivent être prises lors de son utilisation car lorsqu'il est exposé à des solvants organiques, de petits oligomères (Cf. lexique) et additifs peuvent être relâchés et perturber le spectre de masse. Cela n'a pas été observé par Chan qui a employé une solution contenant 10% de méthanol. Par contre, Huikko a noté l'apparition d'un bruit chimique important en portant le pourcentage de méthanol à 50%. Ce bruit chimique peut être réduit de manière significative en allongeant le temps de recuit du PDMS ; 72 heures à  $70^\circ\text{C}$  au lieu de 6 heures.

#### 2-3-2-4 Sources en Zeonor

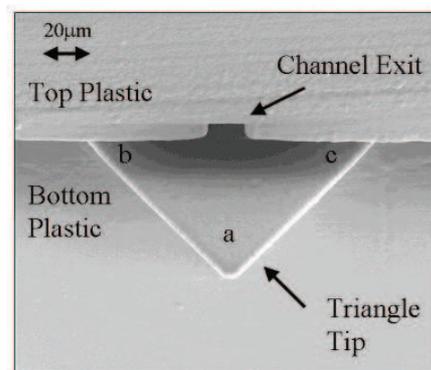
Kameoka de l'Université de Cornell (Etats-Unis) a présenté une puce comportant 4 sources d'électronébulisation. Ces sources de forme triangulaire, empêchent le liquide de s'étaler latéralement à la sortie des micro-canaux. Cette géométrie favorise la formation du cône de Taylor et fixe sa position. Ces canaux microfluidiques de  $20\mu\text{m}$  de large et  $10\mu\text{m}$  de profondeur sont fabriqués en utilisant un moule en silicium par gaufrage à chaud dans un polymère, le Zeonor, une résine polyoléfine (Cf. lexique) thermoplastique qui devient plus

populaire en microfluidique [Kam 02]. Le matériau utilisé pour les pointes est un film de parylène de  $5\mu\text{m}$  d'épaisseur déposé sur une surface de silicium et structuré par lithographie optique suivie d'une gravure avec un plasma d'oxygène. Le film est ensuite décollé de la surface de silicium dans de l'alcool isopropylique. Les films formés de cette manière sont hydrophiles. Ce film est ensuite intercalé entre les deux morceaux de Zeonor et collé thermiquement (Figure I.55).



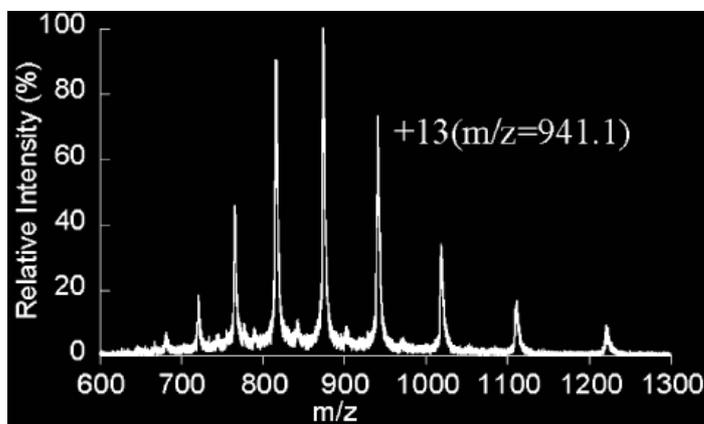
**Figure I.55 :** Procédé de fabrication des sources constituées de Zeonor et d'un film de parylène [Kam 02].

Une image au microscope électronique à balayage d'une des quatre sources est montrée Figure I.56.



**Figure I.56 :** Image au microscope électronique de l'extrémité de la source triangulaire [Kam 02].

Contrairement aux autres études, cette source ne comporte pas de canal jusqu'à son extrémité. Il faut donc que les deux angles de la pointe triangulaire à la sortie du canal (angle b et c sur la Figure I.56) soient plus petits que l'angle de contact de la solution avec le substrat. La tension nécessaire pour le maintien d'un spray stable est appliquée au niveau du réservoir connecté au canal microfluidique. Des cônes de Taylor et des courants d'ionisation stables ont été observés sans contamination entre les sources. Un spectre de masse (Figure I.57) pour le cytochrome C (Cf. lexique) de poulet à  $5\mu\text{mol.L}^{-1}$  dans une solution méthanol/eau (50/50) et 0.1% d'acide formique a été obtenu pour une tension de 2.5-3kV en plaçant la source à une distance comprise entre 8 et 12mm de l'entrée du spectromètre de masse à temps de vol (Mariner, PerSeptive Biosystems, Inc. Framingham, MA).

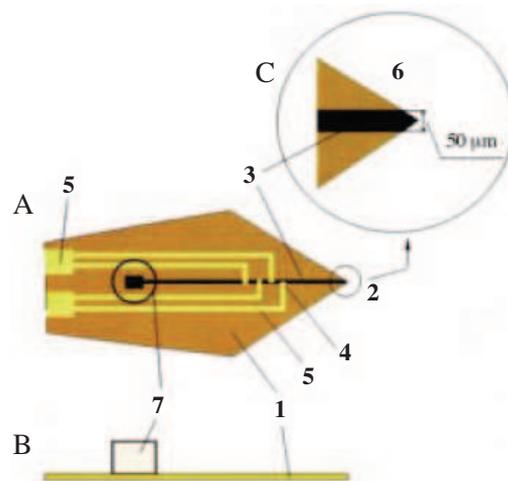


**Figure I.57 :** *Spectre de masse de cytochrome C de poulet [Kam 02].*

Plus récemment, ce même groupe a intégré des électrodes en Or sur le Zeonor afin de fournir la tension nécessaire à l'ionisation, mais celle-ci reste relativement élevée comparée au 1kV pour une source commerciale.

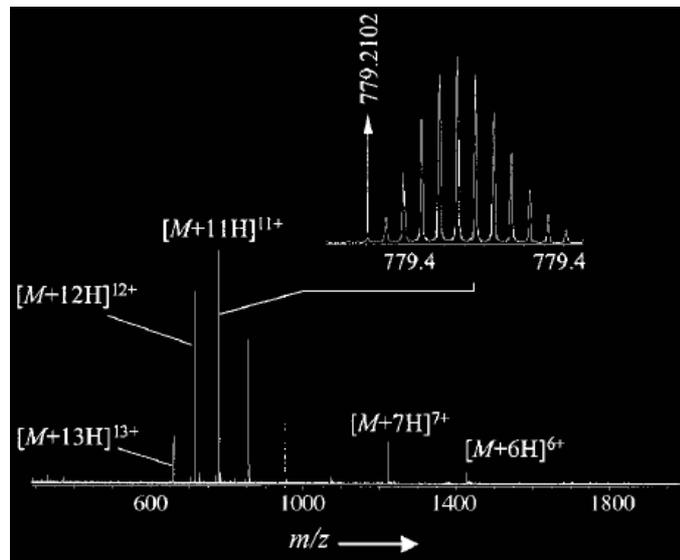
### 2-3-2-5 Sources en polyimide

Le polyimide, autre matériau de la classe des polymères relativement hydrophobe, a également été utilisé pour la fabrication de sources d'électronébulisation. Plusieurs auteurs ont démontré le micro-usinage du polyimide en utilisant l'ablation laser. Cependant, Rossier (DiagnoSwiss, Suisse) a structuré ce matériau par plasma. Cela présente l'avantage de pouvoir réaliser simultanément un grand nombre de dispositifs contrairement à l'ablation laser [Gob 02] [Lio 02] [Lio 03 b] [Lio 04] [Ros 03] (Figure I.58).



**Figure I.58** : Représentation schématique de la source en polyimide. (A) Vue de dessus du dispositif, (B) Vue latérale de la source, (C) Agrandissement montrant l'extrémité de la source. 1 : substrat en polyimide, 2 : sortie de la source, 3 : canal central, 4 : électrode d'application de la tension, 5 : contacts de l'électrode, 6 : extrémité pointue réalisée par plasma, 7 : réservoir de la source [Ros 03].

Ces sources placées à 1-2mm de l'entrée du spectromètre (7T Bruker Daltonik Apex II FTICR) et soumises à une tension de 1 à 2.3kV ont permis d'obtenir un spectre pour un échantillon d'ubiquitine bovine (Cf. lexique) (Figure I.59)



**Figure I.59** : Spectre de masse obtenu avec la source micro-fabriquée en polyimide pour l'ubiquitine bovine ( $0.02\text{mg.mL}^{-1}$  dans une solution à 3% d'acide acétique, eau/méthanol (50/50) [Ros 03].

### 2-3-2-6 Contexte de l'étude à l'IEMN

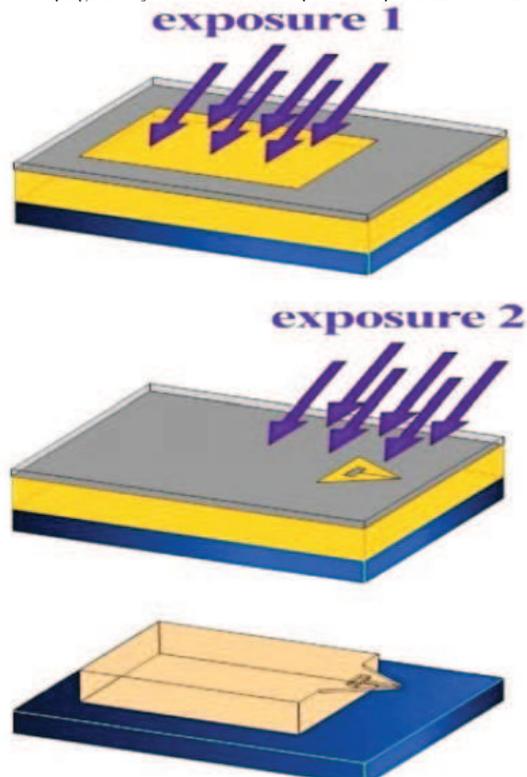
Dans le cadre de deux projets, une première étude concernant la conception de microsystèmes fluidiques dédiés à une analyse à haut débit d'échantillons protéomiques a été menée au sein de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) durant la thèse de Séverine Le Gac de 2001 à 2004.

Le premier projet, intitulé *Protéomique Intégrée* et faisant partie du programme de recherche *Réseau de Micro et Nano Technologies* (RMNT), a consisté au développement d'un microsysteme intégré pour une analyse d'échantillons protéiques par spectrométrie de masse reposant sur une ionisation par électronébulisation.

Le deuxième projet, issu du programme *GenHomme* du Ministère de l'Economie et des Finances, a fait l'objet de la constitution d'un consortium de recherche sous le nom de *BioChipLab* regroupant les laboratoires lillois (IEMN, LCOM), ceux de la région grenobloise (CEA-LETI, CEA-DSV) et Sanofi-Synthélabo comme meneur de projet. L'objectif de ce consortium était double avec la réalisation de deux dispositifs, l'un mettant en œuvre une ionisation de type MALDI et l'autre une ionisation de type ESI pour l'analyse par spectrométrie de masse en vue de l'identification et du dosage des substances étudiées.

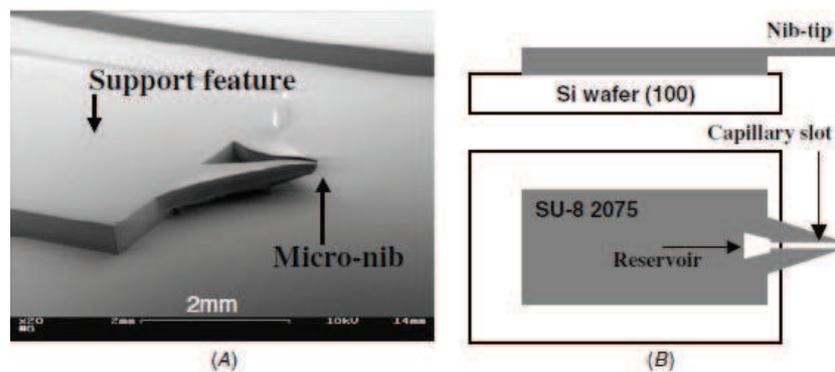
Ainsi des sources en résine SU-8 ayant une géométrie basée sur une structure ouverte ressemblant à un stylo plume ont été micro-fabriquées. La SU-8 se prête particulièrement bien pour la fabrication de masse car elle peut être structurée par photolithographie.

Une première série de prototypes a été réalisée reposant sur une technique de photolithographie à double exposition (Figure I.60) [**Le G 03 a**] [**Ars 04 b**].



**Figure I.60 :** Etapes de fabrication de la micro-source. Le second temps d'exposition est moins long que le premier. [Ars 04 b].

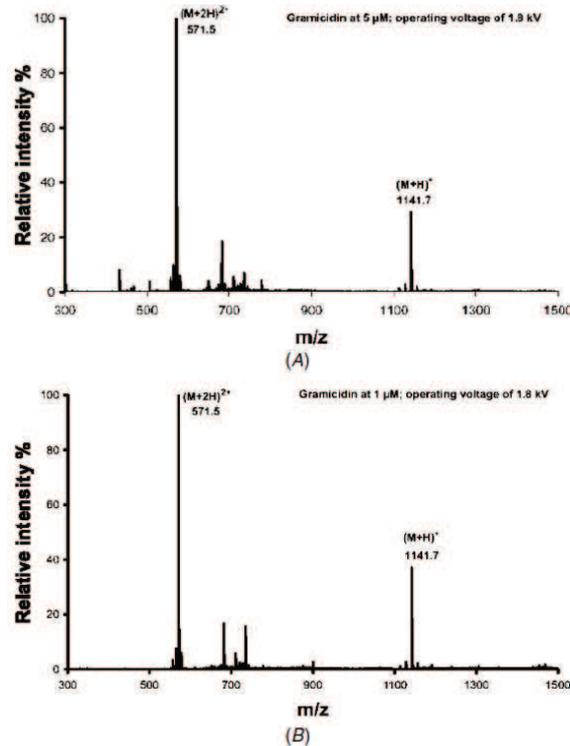
La source en SU-8 est réalisée sur une plaquette de silicium utilisée comme support. Cette structure comporte un réservoir et un micro-canal (Figure I.61).



**Figure I.61 :** (A) Image au microscope électronique de la source micro-fabriquée en SU-8. (B) Vues schématiques de la micro-source [Ars 04 b].

A la sortie, cette source de 500 $\mu$ m de long, présente une section de 20 $\mu$ m de largeur et 30 $\mu$ m d'épaisseur.

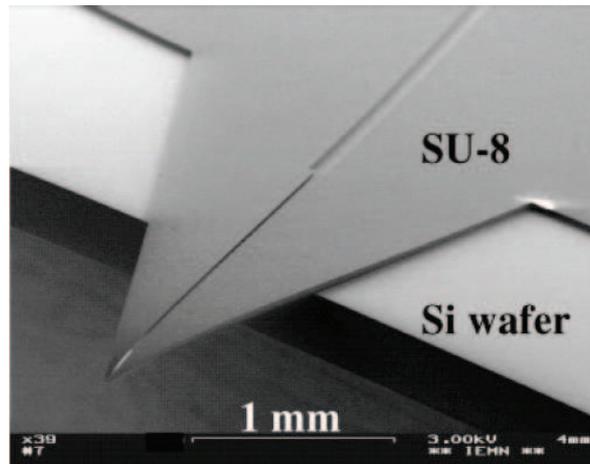
Cette source a été testée avec un spectromètre de masse à trappe d'ions (LCQ Deca XP<sup>+</sup> Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). L'échantillon qui doit être analysé (Gramicidine S) est déposé à l'aide d'une pipette dans le réservoir et s'écoule le long du canal. Des spectres de masse ont été enregistrés pour des concentrations en peptides aussi faibles que  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figure I.62).



**Figure I.62 :** (A) Spectre de masse obtenu avec une solution de gramicidine S à  $5\mu\text{mol.L}^{-1}$  et une tension de 1.8kV. (B) Spectre de masse obtenu pour une solution de gramicidine S à  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$  et une tension de 1.8kV [Ars 04 b].

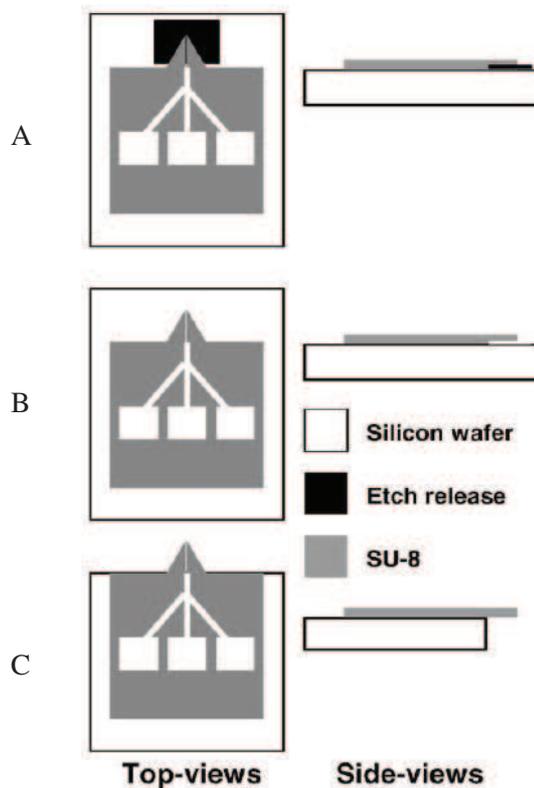
Ces prototypes ont permis de montrer que la SU-8 n'induisait pas de pollution chimique pour l'analyse en spectrométrie de masse.

Par la suite, une deuxième génération a été développée dont la principale modification réside dans l'ajout d'un micro-canal entre le réservoir d'entrée et la source et une largeur de sortie de la source réduite à 16 ou  $8\mu\text{m}$  afin de se rapprocher encore davantage des dimensions des sources standard (Figure I.63).



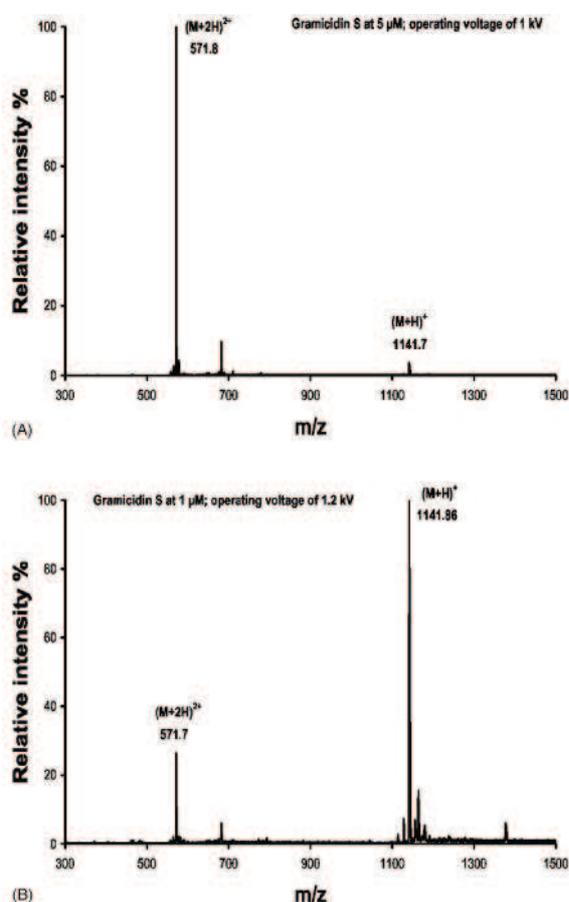
**Figure I.63 :** Image au microscope électronique d'une micro-source de deuxième génération en SU-8 [Ars 04 a].

Le procédé de fabrication est simple et s'effectue en trois étapes (Figure I.64).



**Figure I.64 :** Procédé de fabrication en trois étapes de la micro-source : (A) déposition d'une couche sacrificielle en Nickel puis d'une couche de SU-8 2035, (B) libération de la micro-source par gravure humide dans l'acide nitrique, (C) clivage du substrat de silicium [Ars 04 a].

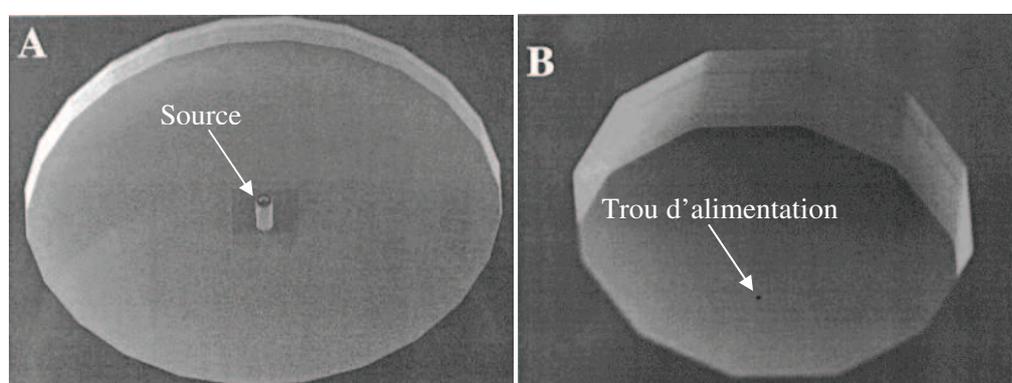
Les tests en spectrométrie de masse à trappe d'ions (LCQ Deca XP<sup>+</sup> Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) montrent que la source de 8 $\mu$ m de large présente de meilleures performances que celle de 16 $\mu$ m car la réduction des dimensions permet une meilleure ionisation [Ars 04 a] [Le G 03 b] (Figure I.65). Cependant, ce matériau impose des limitations au niveau de la réduction des dimensions au niveau de la photolithographie et ne permet pas de poursuivre la miniaturisation afin de se rapprocher encore davantage des dimensions des sources conventionnelles.



**Figure I.65 :** Spectres de masse obtenus avec (A) une source de 8 $\mu$ m de large (tension de 1kV, Gramicidine S à 5 $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>), (B) une source de 16 $\mu$ m de large (tension de 1.2kV, Gramicidine S à 1 $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>) [Ars 04 a].

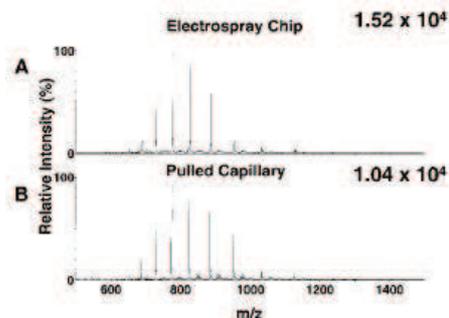
## 2-3-2-7 Sources en Silicium

Des réseaux de centaines d'émetteurs ont été fabriqués par Zhang (Advanced BioAnalytical Services, New York, Etats-Unis) en usinant du silicium par gravure profonde qui permet d'obtenir des structures ayant un grand rapport d'aspect [Sch 00]. Ces sources ont un diamètre externe de  $20\mu\text{m}$ , un diamètre interne de  $10\mu\text{m}$ , une profondeur de  $50\mu\text{m}$  pour un volume de  $25\text{pL}$ . Le substrat est aussi gravé en face arrière afin de pouvoir connecter des capillaires aux sources pour l'introduction des échantillons (Figure I.66).



**Figure I.66 :** Images au microscope électronique d'une source micro-fabriquée. (A) Source de  $10\mu\text{m}$  de diamètre interne,  $20\mu\text{m}$  de diamètre externe. (B) Réservoir de  $100\mu\text{m}$  de profondeur permettant d'alimenter la source par l'arrière du substrat [Sch 00].

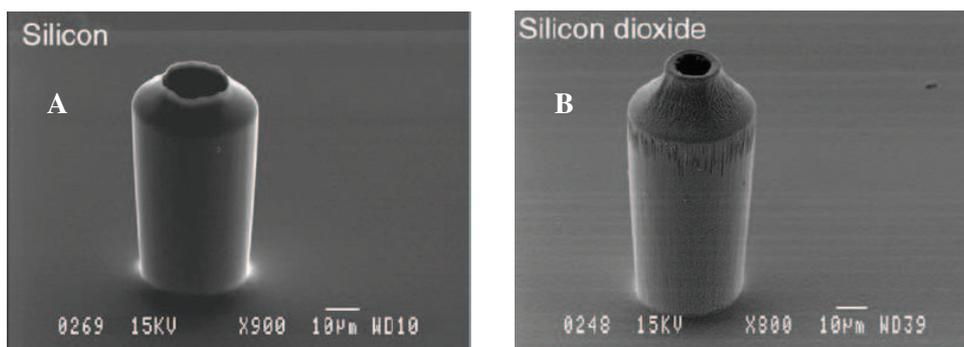
Les performances de ces sources en spectrométrie de masse à temps de vol (LCT, Manchester, UK) sont très bonnes avec un rapport signal sur bruit de 450 pour une solution de  $10\text{nM}$  de cytochrome C dans  $100\%$  d'eau à un débit de  $100\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$  et une tension d'ionisation de  $1.5\text{kV}$ . La sensibilité est de 1,5 à 3 fois plus grande comparée aux capillaires standard (dont le diamètre est ici de  $15\mu\text{m}$ ) et un courant d'ionisation plus stable est aussi obtenu. La durée de vie des émetteurs est de 8 heures en fonctionnement continu (Figure I.67).



**Figure I.67** : Spectres de masse obtenus à partir d'une solution de cytochrome C pour (A) une source micro-fabriquée en silicium et (B) un capillaire standard [Sch 00].

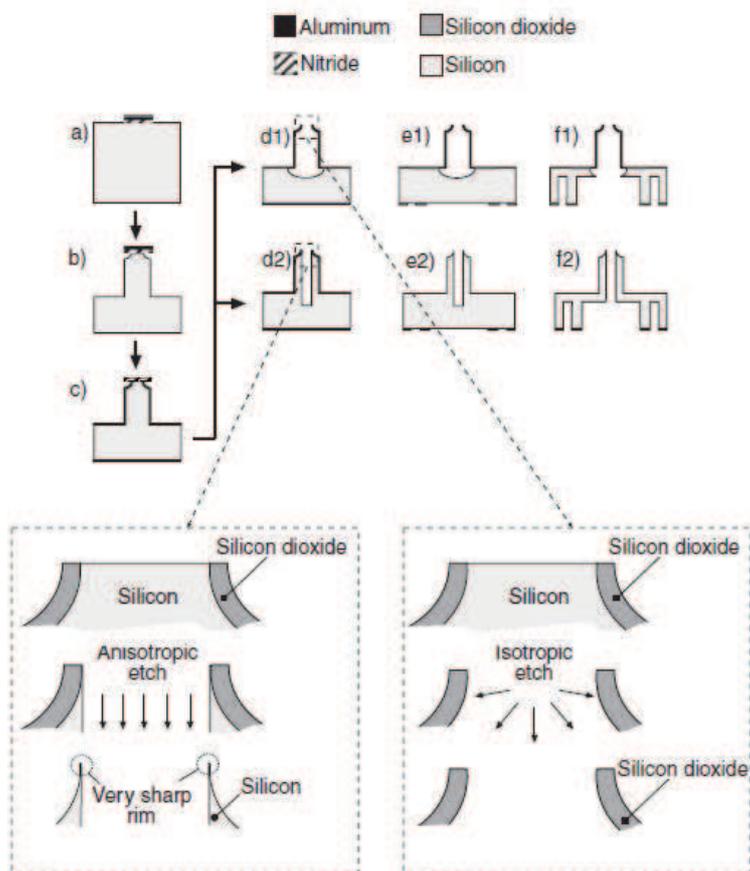
Ces sources ont servi de base pour une interface d'ionisation par électronébulisation pour la spectrométrie de masse comportant 100 de ces sources et commercialisée par Advion Bioscience [Adv].

Griss de l'Institut Royal de technologie en Suède, a décrit des structures voisines. Le matériau et le procédé de fabrication sont les mêmes. Cependant, ces sources présentent une différence au niveau de leur forme, leur extrémité va en se rétrécissant ayant pour conséquence de réduire la taille du cône de Taylor (Figure I.68) [Gri 01] [Gri 02].



**Figure I.68** : (A) Source en silicium de 18µm de diamètre interne, (B) Source en dioxyde de silicium de 10µm de diamètre interne [Gri 02].

Le procédé de fabrication de ces sources est présenté Figure I.69.



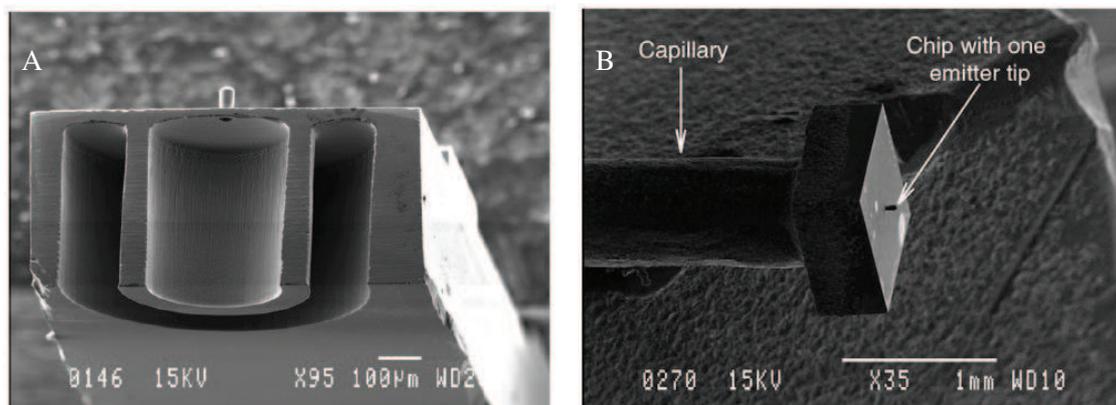
**Figure I.69 :** Procédé de fabrication des deux types de sources. Les étapes d1 à f1 correspondent à la fabrication des sources en dioxyde de silicium et les étapes d2 à f2 à celle des sources en silicium. [Gri 02].

Une couche de nitrure de silicium et d'aluminium sont déposées sur un substrat de silicium et structurées afin de produire un masque circulaire (Figure I.69 (a)). Par la suite, le silicium est gravé dans un plasma à couplage inductif (ICP) incluant les étapes suivantes : la couche de nitrure est sous-gravée de façon isotropique, une gravure anisotropique du silicium afin de l'enlever là où il n'est pas protégé par le masque afin de définir la longueur des sources (Figure I.69 (b)). La gravure isotropique définit le diamètre externe de l'émetteur. La gravure anisotropique est réalisée en utilisant le procédé Bosch. Après avoir enlevé l'aluminium une croissance d'oxyde thermique humide est réalisée. L'oxyde ne croît pas à l'apex de la micro-source car le silicium est protégé par le nitrure (Figure I.69 (c)). Le nitrure de silicium est ensuite supprimé par gravure ionique réactive dévoilant le silicium monocristallin à l'apex de la source alors que le corps de la source est encore recouvert par l'oxyde. L'oxyde sert de masque pour une gravure ICP postérieure qui peut être soit anisotropique (Figure I.69 (d2)) ou

isotropique (Figure I.69 (d1)). Après la gravure anisotropique, l'oxyde peut être retiré et on obtient l'émetteur en silicium schématisé sur la Figure I.69 (e2). Dans le cas d'une gravure isotropique, l'oxyde constitue l'émetteur lui-même, le cœur entier de l'émetteur en silicium est gravé (Figure I.69 (d1)). Dans les deux cas, le diamètre de l'ouverture et la longueur de l'émetteur sont définis par la durée de la première gravure isotropique et anisotropique respectivement et pas spécialement par le masque. De plus, le trou est auto-aligné avec le corps de l'émetteur sans recourir à une étape de photolithographie. L'auto-alignement et le contrôle de la géométrie par les paramètres du procédé aboutissent à une fabrication très flexible. Des réservoirs de liquide et un connecteur capillaire sont définis par photolithographie (Figure I.69 (e1, e2)) et des tranchées sont gravées par plasma à couplage inductif de manière anisotropique sur la face arrière du substrat (Figure I.69 (f1, f2)). Le substrat est ensuite coupé en puces ayant une surface de 1 mm<sup>2</sup> comportant un seul émetteur. Un émetteur typique en silicium est présenté Figure I.68 (A). La longueur de l'émetteur est de 70µm, le diamètre externe est de 38µm et le diamètre de l'orifice est de 18µm. Le bord de l'ouverture de l'émetteur est très pointu, de l'ordre du nanomètre.

Un émetteur typique en oxyde est présenté Figure I.68 (B). La longueur de l'émetteur est de 70µm, le diamètre externe est de 38µm et le diamètre de l'orifice est de 10µm. Le bord circulaire est défini par l'épaisseur de l'oxyde thermique et a une épaisseur de 1.5µm. Le bord de l'ouverture de l'émetteur est moins pointu comparé à celui de la version en silicium. Cependant, cela permet de réaliser un diamètre d'ouverture interne plus petit car la gravure isotropique n'est pas limitée par le rapport d'aspect.

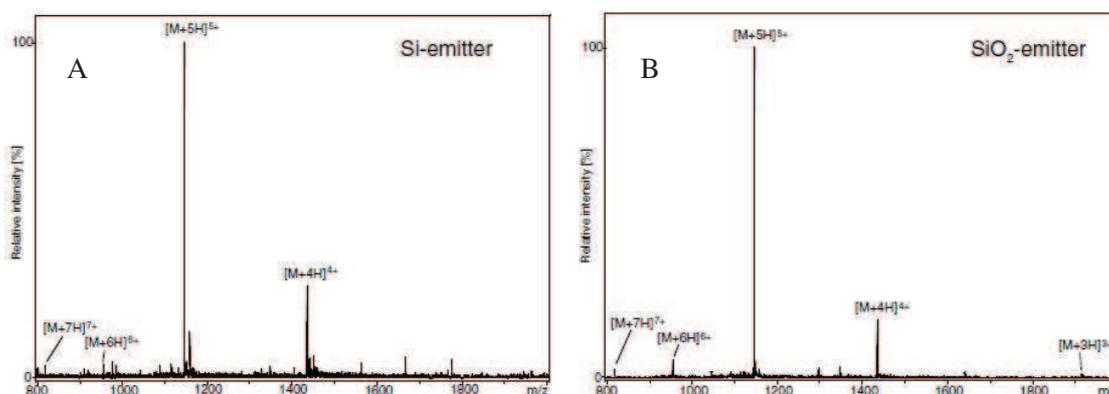
Un capillaire en silice fondu est assemblé à la puce en l'introduisant dans la tranchée prévue à



**Figure I.70 :** (A) Image au microscope électronique à balayage d'une source en coupe. La tranchée pour l'assemblage avec un capillaire est clairement visible. (B) Image au microscope électronique à balayage de la source connectée à un capillaire [Gri 02].

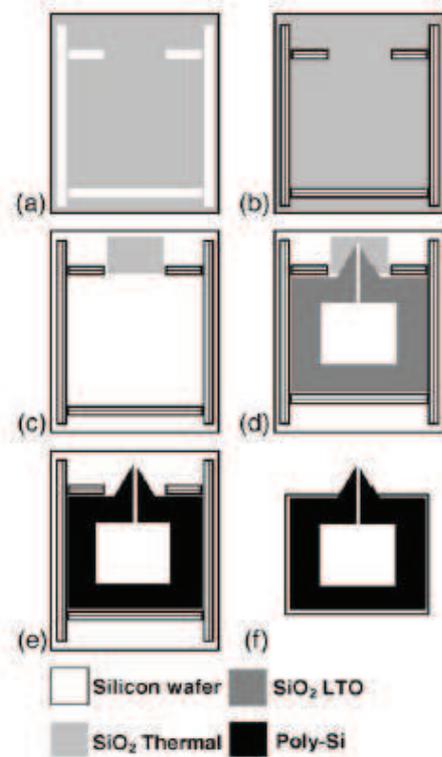
cet effet. Il est fixé par une goutte d'époxy sensible aux ultraviolets (Figure I.70)

Ces structures sont cependant fort complexes à fabriquer et les performances obtenues en termes de tension à appliquer sont médiocres, elles nécessitent une tension plus élevée que les sources conventionnelles. En effet, les tests en spectrométrie de masse à trappe d'ions (ESQUIRE, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) nécessitent une tension d'ionisation de 6kV pour les sources en silicium et de 3kV pour celles en SiO<sub>2</sub> (Figure I.71).



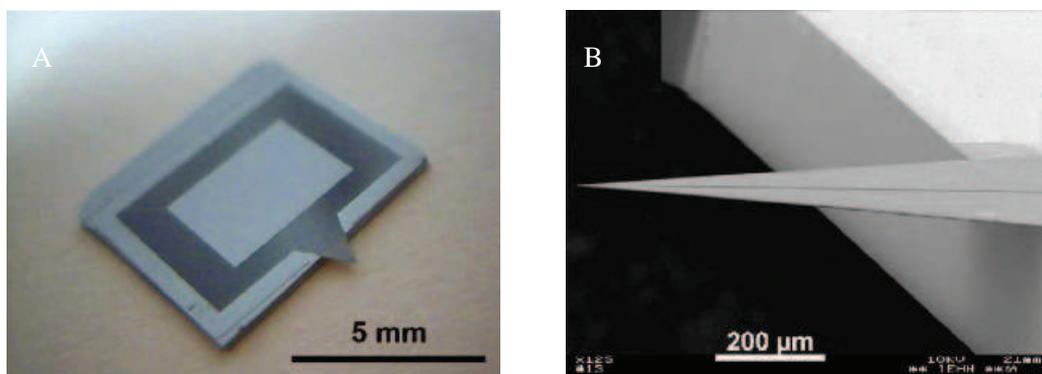
**Figure I.71** : Spectres de masse obtenus à partir d'une solution d'insuline à 10pmol.µL<sup>-1</sup> avec 1% d'acide acétique. (A) Une tension de 6kV est utilisée pour la source en silicium. (B) Une tension de 3kV est utilisée pour la source en SiO<sub>2</sub> [Gri 02].

Plus tard, Le Gac et son équipe ont poursuivi leurs travaux initiaux en remplaçant la résine SU-8 par du polysilicium [Ars 05] [Bri 04] afin de miniaturiser davantage leurs sources. Ces sources ayant des dimensions initiales de 1.8 x 2µm ont été modifiées par des sources ayant des dimensions de 2.5 x 5µm car les premières ne permettaient pas un remplissage spontané par capillarité. Le procédé de fabrication est détaillé Figure I.72.



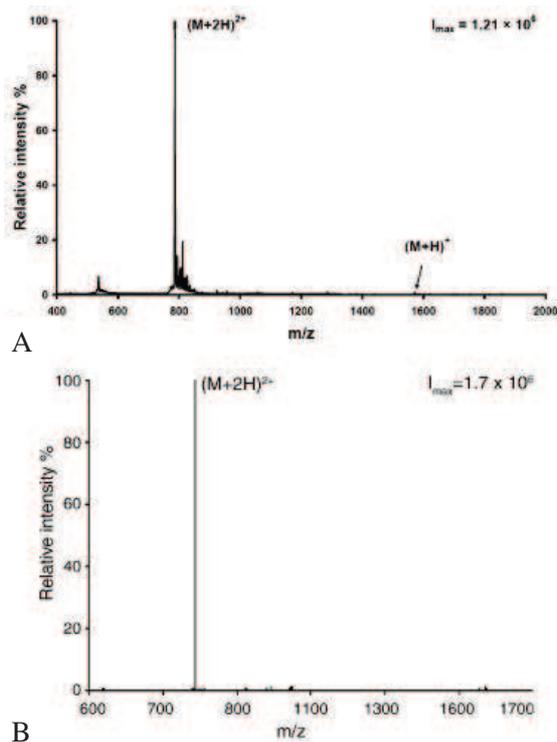
**Figure I.72 :** Procédé de fabrication des sources à base de polysilicium. (A) Dépôt et structuration de l'oxyde thermique. (B) Définition des lignes de clivage dans le substrat de silicium. (C) Structuration de la couche sacrificielle. (D) Gravure sèche du polysilicium. (E) Gravure de la couche sacrificielle. (F) Découpage des dispositifs [Ars 05].

La Figure I.73 présente une photographie ainsi qu'une image au microscope électronique à balayage de la source ainsi fabriquée.



**Figure I.73 :** (A) Photographie d'une source d'électronébulisation en polysilicium. (B) Image au microscope électronique à balayage de l'extrémité de cette source [Ars 05].

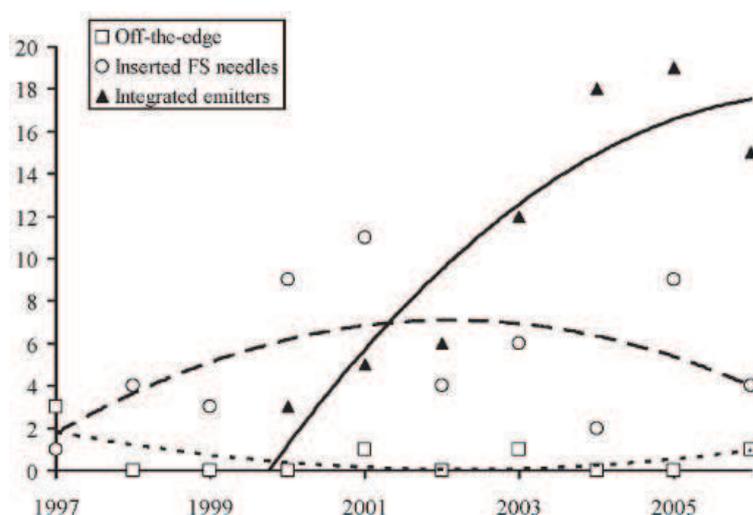
Celles-ci ont été caractérisées par spectrométrie de masse à trappe d'ions (LCQ Deca XP<sup>+</sup> Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) et montrent des performances exceptionnelles en ionisation. Même lorsque la composition du mélange est fortement aqueuse (90% d'eau) un rapport signal sur bruit élevé est obtenu (Figure I.74).



**Figure I.74 :** Spectres de masse obtenus pour une solution de Glu-Fibrinopeptide à  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$  (A) pour une source en polysilicium ayant un canal de  $2.5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  et une tension de  $1\text{kV}$ , (B) pour une source en polysilicium ayant un canal de  $1.8 \times 2\mu\text{m}$  et une tension de  $0.7\text{kV}$  [Ars 05].

## Conclusion

Les puces microfluidiques ont été couplées à la spectrométrie de masse depuis une dizaine d'années. Elles ont subi une nette évolution durant cette période, allant des nébulisats à partir de la tranche de celles-ci aux sources complètement intégrées en passant par l'insertion de capillaires en silice. Cette tendance est clairement montrée sur la Figure I.75, où le nombre de publications pour ces trois approches différentes est reporté en fonction de l'année de publication.



**Figure I.75 :** Nombre de publications sur les trois manières dont les puces d'électronebulisation microfluidiques ont été couplées à la spectrométrie de masse sur les dix dernières années.

Le nébulisat à partir de la tranche d'une puce est difficile à cause des désavantages invoqués plus haut.

Le nombre de sources employant des capillaires en silice insérés décroît également dû en partie à l'assemblage manuel requis afin de fabriquer ce type de dispositifs. Cette approche devrait néanmoins continuer à exister pendant de nombreuses années pour les études académiques, particulièrement pour les applications pour lesquelles les volumes morts ne sont pas cruciaux. De plus, cette technologie ne nécessite pas toujours de procédés de salle blanche coûteux et complexes. Cependant, pour d'autres applications telles que la séparation de protéines, cette approche est amenée à disparaître à cause des difficultés rencontrées afin de

réaliser des connexions sans fuites et sans volumes morts entre l'extrémité du canal microfluidique de séparation et l'aiguille.

Par contre, le nombre de publications traitant des émetteurs intégrés a rapidement progressé et est supposé continuer à s'accroître. Les premiers produits commerciaux sont apparus sur le marché et de nombreux autres devraient suivre confirmant ainsi la maturité du domaine. Un certain nombre d'études concernant les puces pour la spectrométrie de masse ont démontrées qu'il était possible d'obtenir de bonnes performances voire dans plusieurs cas des performances supérieures comparées à celles obtenues avec les techniques d'analyses conventionnelles. La microfluidique dépasse l'instrumentation conventionnelle lorsqu'il s'agit de vitesse, haut débit, consommation réduite d'échantillons et l'intégration de multiples fonctions d'analyses avec des volumes morts minimes ou inexistantes entre les différents éléments. Les microtechnologies permettent l'intégration des étapes de prétraitement et de purification sur une puce. La plupart des publications présentent des puces intégrant une ou deux fonctions. Cependant, de nouvelles plateformes comportant des fonctionnalités intégrées multiples sont supposées être développées avec un niveau de fiabilité suffisant de façon qu'elles ne soient plus que de simples outils de recherches pour quelques experts. Il y a donc encore fort à faire dans le domaine notamment au niveau des sources d'électronébulisation. Cet aspect est l'objet du chapitre suivant concernant la conception et la réalisation d'une nouvelle interface de spectrométrie de masse.

## Références bibliographiques

Advion Bioscience, [www.advion.com](http://www.advion.com).

Agilent, [www.agilent.com](http://www.agilent.com).

S. Akashi, K. Suzuki, A. Arai, N. Yamada, E. I. Suzuki, K. Hirayama, S. Nakamura and Y. Nishimura, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 20, pp. 1932-1938, 2006.

<sup>a</sup> S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier and C. Rolando, *Sens. Actuators B*, vol. 98, pp. 140-147, 2004.

<sup>b</sup> S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier and C. Rolando, *J. Micromech. Microeng.*, vol. 14, pp. 310-316, 2004.

S. Arscott, S. Le Gac and C. Rolando, *Sens. Actuators B*, vol. 106, pp. 741-749, 2005.

N. H. Bings, C. Wang, C. D. Skinner, C. L. Colyer, P. Thibault and D. J. Harrison, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 3292-3296, 1999.

M. Brinkmann, R. Blossey, S. Arscott, C. Druon, P. Tabourier, S. Le Gac and C. Rolando, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 85, pp. 2140-2142, 2004.

J. H. Chan, A. T. Timperman, D. Qin and R. Aebersold, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 4437-4444, 1999.

<sup>a</sup> Y. Deng, J. Henion, J. Li, P. Thibault, C. Wang and D. J. Harrison, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 639-646, 2001.

<sup>b</sup> Y. Deng, H. Zhang and J. Henion, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1432-1439, 2001.

A. Desai, Y. C. Tai, M. T. Davis and T. D. Lee, "A MEMS electro spray nozzle for mass spectrometry", *Proceedings of the Technical Digest of the International Conference on Solid-State Sensors and Actuators (Transducers'97)*, Chicago, IL, vol. 2, pp. 927-930, 16-19 June 1997.

D. Figeys, Y. Ning and R. Aebersold, *Anal. Chem.*, vol. 69, pp. 3153-3160, 1997.

<sup>a</sup> D. Figeys and R. Aebersold, *Anal. Chem.*, vol. 70, pp. 3721-3727, 1998.

<sup>b</sup> D. Figeys, S. P. Gygi, G. McKinnon and R. Aebersold, *Anal. Chem.*, vol. 70, pp. 3728-3734, 1998

<sup>c</sup> D. Figeys, C. Lock, L. Taylor and R. Aebersold, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 12, pp. 1435-1444, 1998.

F. Foret and P. Kussy, *Electrophoresis*, vol. 27, pp. 4877-4887, 2006.

S. L. S. Freire and A. R. Wheeler, *Lab Chip*, vol. 6, pp. 1415-1423, 2006.

V. Gobry, J. van Oostrum, M. Martinelli, T. C. Rohner, F. Reymond, J. S. Rossier and H. H. Girault, *Proteomics*, vol. 2, pp. 405-412, 2002.

P. Griss, P. Enoksson, H. K. Tolvanen-Laakso, P. Meriläinen, S. Ollmar and G. Stemme, "Micromachined electrodes for biopotential measurements", *J. Microelectromech. Syst.*, vol. 10, pp. 10-16, 2001.

P. Griss, J. Melin, J. Sjödaahl, J. Roeraade and G. Stemme, "Development of micromachined hollow tips for protein analysis based on nanoelectrospray ionization mass spectrometry", *J. Micromech. Microeng.*, vol. 12, pp. 682-687, 2002.

J. Kameoka, H. G. Craighead, H. Zhang and J. Henion, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1935-1941, 2001.

J. Kameoka, R. Orth, B. Llic, D. Czaplewski, T. Wachs and H. G. Craighead, *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 5897-5901, 2002.

<sup>a</sup> J. S. Kim and D. R. Knapp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 12, pp. 463-469, 2001.

- <sup>b</sup> J. S. Kim and D. R. Knapp, *J. Chromatogr. A*, vol. 924, pp. 137-145, 2001.
- <sup>c</sup> J. S. Kim and D. R. Knapp, *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 3993-3999, 2001.
- T. Koerner and R. D. Oleschuk, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, vol. 19, pp. 3279-3286, 2005.
- S. Koster and E. Verpoorte, "A decade of microfluidic analysis coupled with electrospray mass spectrometry: An overview", *Lab Chip*, vol. 7, pp. 1394-1412, 2007.
- I. M. Lazar, R. S. Ramsey, S. C. Jacobson, R. S. Foote and J. M. Ramsey, *J. Chromatogr. A*, vol. 892, pp. 195-201, 2000.
- I. M. Lazar, R. S. Ramsey and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1733-1739, 2001.
- I. M. Lazar, L. Li, Y. Yang and B. L. Karger, *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 3655-3662, 2003.
- I. M. Lazar, J. Grym and F. Foret, *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 25, pp. 573-594, 2006.
- <sup>a</sup> S. Le Gac, S. Arscott, C. Cren-Olivé and C. Rolando, *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, pp. 1259-1264, 2003.
- <sup>b</sup> S. Le Gac, S. Arscott and C. Rolando, *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 3640-3647, 2003.
- <sup>a</sup> J. Li, J. F. Kelly, I. Chernushevich, D. J. Harrison and P. Thibault, *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 599-609, 2000.
- <sup>b</sup> J. Li, C. Wang, J. F. Kelly, D. J. Harrison and P. Thibault, *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 198-210, 2000.
- L. Licklider, X. Q. Wang; A. Desai, Y. C. Tai and T. D. Lee, *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 367-375, 2000.
- N. Lion, V. Gobry, H. Jensen, J. S. Rossier and H. H. Girault, "Integration of a membrane-based desalting step in a microfabricated disposable polymer injector for mass spectrometric protein analysis", *Electrophoresis*, vol. 23, pp. 3583-3588, 2002.
- <sup>a</sup> N. Lion, T. C. Rohner, L. Dayon, I. L. Arnaud, E. Damoc, N. Youhnovski, Z. Y. Wu, C. Roussel, J. Jossierand, H. Jensen, J. S. Rossier, M. Przybylski and H. H. Girault, "Microfluidic systems in proteomics", *Electrophoresis*, vol. 24, Issue 21, pp. 3533-3562, 2003.
- <sup>b</sup> N. Lion, J. O. Gellon, H. Jensen and H. H. Girault, "On-chip protein sample desalting and preparation for direct coupling with electrospray ionization mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, vol. 1003, pp. 11-19, 2003.
- N. Lion, J. O. Gellon and H. H. Girault, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 18, pp. 1614-1620, 2004.
- H. Liu, C. Felten; Q. Xue, B. Zhang, P. Jedrzejewski, B. L. Karger and F. Foret, *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 3303-3310, 2000.

Phoenix S&T, [www.phoenix-st.com](http://www.phoenix-st.com).

R. S. Ramsey and J. M. Ramsey, "Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping", *Anal. Chem.*, vol. 69, Issue 6, pp. 1174-1178, 1997.

T. C. Rohner, J. S. Rossier and H. H. Girault, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 5353-5357, 2001.

T. C. Rohner, J. S. Rossier and H. H. Girault, *Electrochem. Commun.*, vol. 4, pp. 695-700, 2002.

J. S. Rossier, N. Youhnovski, N. Lion, E. Damoc, S. Becker, F. Reymond, H. H. Girault and M. Przybylski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 42, pp. 53-58, 2003.

M. Schilling, W. Nigge, A. Rudzinski, A. Neyer and R. Hergenröder, "A new on-chip ESI nozzle for coupling of MS with microfluidic devices", *Lab Chip*, vol. 4, pp. 220-224, 2004.

G. A. Schultz, T. N. Corso, S. J. Prosser and S. Zhang, "A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 4058-4063, 2000.

W. Q. Shui, Y. L. Yu, X. J. Xu, Z. Y. Huang, G. B. Xu, and P. Y. Yang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, pp. 1541-1547, 2003.

W. C. Sung, H. Makamba and S. H. Chen, *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 1783-1791, 2005.

Y. Tachibana, K. Otsuka, S. Terabe, A. Arai, K. Suzuki and S. Nakamura, "Robust and simple interface for microchip electrophoresis-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, vol. 1011, pp. 181-192, 2003.

Y. Tachibana, K. Otsuka, S. Terabe, A. Arai, K. Suzuki and S. Nakamura, *Journal of Chromatography A*, vol. 1025, pp. 287-296, 2004.

K. Tang, Y. Lin, D. W. Matson, T. Kim and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1658-1663, 2001.

Y. X. Wang, J. W. Cooper, C. S. Lee and D. L. DeVoe, "Efficient electrospray ionization from polymer microchannels using integrated hydrophobic membranes", *Lab Chip*, vol. 4, pp. 363-367, 2004.

J. Wen, Y. Lin, F. Xiang, D. W. Matson, H. R. Udseth and R. D. Smith, "Microfabricated isoelectric focusing device for direct electrospray ionization", *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 191-197, 2000.

<sup>a</sup> Q. F. Xue, Y. M. Dunayevskiy, F. Foret and B. L. Karger, "Integrated multichannel microchip electrospray ionization mass spectrometry: Analysis of peptides from on chip tryptic digestion of melittin", *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, vol. 11, Issue 12, pp. 1253-1256, 1997.

<sup>b</sup> Q. F. Xue, F. Foret, Y. M. Dunayevskiy, P. M. Zavracky, N. E. McGruer and B. L. Karger, "Multichannel microchip electrospray mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 69, Issue 3, pp. 426-430, 1997.

C. H. Yuan and J. Shiea, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1080-1083, 2001.

G. E. Yue, M. G. Roper, E. D. Jeffery, C. J. Easley, C. Balchunas, J. P. Landers and J. P. Ferrance, *Lab Chip*, vol. 5, pp. 619-627, 2005.

A. D. Zamfir, L. Bindila, N. Lion, M. Allen, H. H. Girault and J. Peter-Katalinic, *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 3650-3673, 2005.

B. Zhang, H. Liu, B. L. Karger and F. Foret, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 3258-3264, 1999.

B. Zhang, F. Foret and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 1015-1022, 2000.

B. Zhang, F. Foret and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 2675-2681, 2001.

S. Zhang and C. K. Van Pelt, *Expert Rev. Proteomics*, vol. 1, pp. 449-468, 2004.



# Chapitre 2

## Conception et réalisation des micro et nano-sources d'électronébulisation

### *Résumé*

Ce chapitre traite de la conception et de la fabrication de nouvelles sources d'électronébulisation micro-usinées utilisées comme interface afin de coupler un spectromètre de masse et un laboratoire sur puce dédié à l'analyse des protéines (Cf. lexique) dans le cadre des recherches menées dans le domaine de la protéomique (Cf. lexique). Tout d'abord, à partir des observations déjà rapportées dans la littérature et de l'étude du comportement d'un liquide dans une fente capillaire ouverte, les critères essentiels pour la conception de tels dispositifs sont mis en évidence. Afin d'assurer le fonctionnement de ces sources qui est régi par le remplissage spontané de leur fente capillaire, il est indispensable que le ratio largeur de la fente sur hauteur de la fente soit inférieur au cosinus de l'angle de contact que fait le liquide avec la paroi de la fente. Puis, un nouveau procédé pour la fabrication d'une première génération de micro-sources d'ionisation miniaturisées en polysilicium par gravure ionique

réactive à base de chlore est décrit. Ces sources sont constituées de deux cantilevers triangulaires qui forment une fente microfluidique de  $1\mu\text{m}$  de large et  $4\mu\text{m}$  de profondeur. Ce même procédé couplé à l'usinage par faisceau d'ions focalisés est ensuite employé afin de réaliser des nano-sources dont la plus petite présente une fente de  $50\text{nm}$  de large. Enfin, une étude mécanique et l'emploi de la gravure profonde à la place de la gravure ionique réactive conduisent au développement d'un nouveau procédé de fabrication qui est mis en oeuvre afin d'optimiser la réalisation technologique d'une deuxième génération de micro et nano-sources.

## Introduction

Le recours aux techniques de microtechnologie pour la fabrication de sources d'électronébulisation est une alternative permettant de garantir le contrôle de la fabrication et peut laisser espérer une réduction des dimensions vers une gamme inférieure au micron, ces deux aspects allant de pair avec la reproductibilité et la qualité des analyses. Par ailleurs, la géométrie des sources issues des procédés de micro-fabrication peut être de type autre qu'un tube capillaire et adaptée à une manipulation non plus entièrement manuelle mais automatisable permettant l'usage des robots. Enfin, une source d'électronébulisation micro-usinée peut-être entièrement intégrée au procédé de fabrication d'un microsystème microfluidique complet qui intègre plusieurs fonctions incluant les différentes étapes préalables à l'analyse par spectrométrie de masse : préparation des échantillons, réactions chimiques, séparation... Cela permet de s'affranchir des problèmes liés à l'usage de la colle, des problèmes de volumes morts et surtout des faiblesses inhérentes aux sources standard. Il ressort de l'analyse bibliographique précédente que les interfaces d'électronébulisation micro-fabriquées proposées ne répondent pas ou en partie aux besoins actuels dans le domaine de l'analyse suite à l'essor de la protéomique. Nous tentons ici d'apporter une nouvelle réponse à ce problème par la conception et la fabrication de sources d'ionisation micro-fabriquées originales qui fonctionnent dans les conditions de nanoélectronébulisation, c'est-à-dire sous l'application d'une tension de l'ordre de  $1\text{kV}$ , un débit inférieur à  $1\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  et des solutions de concentration de l'ordre de  $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

A la lumière des constatations tirées de la littérature et de l'étude du remplissage spontané d'une fente capillaire par un liquide, la première partie de ce chapitre présente les règles de base à l'origine de la conception de ces sources justifiant les choix en ce qui

concerne le dimensionnement et la nature des matériaux utilisés. La seconde partie, décrit les différentes approches technologiques qui ont été adoptées afin de fabriquer ces dispositifs.

## 1- Règles de conception et fonctionnement des sources d'électronébulisation

### 1-1 Géométrie et matériau de la source

La fonction basique de la source est d'amener un liquide contenant des macromolécules non-identifiées vers une pointe sur laquelle sera appliquée une tension élevée permettant l'émission de gouttelettes microscopiques chargées contenant les biomolécules vers l'entrée d'un spectromètre de masse réalisant leur analyse.

La description du processus d'électronébulisation donnant naissance aux ions en phase gazeuse n'est pas triviale. En effet, tous les mécanismes sous-tendant ce phénomène sont encore mal connus et font l'objet de nombreux débats [Tay 64] [Gañ 97] [Ars 04] [Har 00]. Tout ce qui a été montré, c'est que la taille de la sortie du capillaire, le débit et la composition du solvant ont une influence considérable sur les spectres obtenus mais aucune loi d'échelle n'a été établie pour l'ionisation par électronébulisation et la plupart des avancées sur le sujet sont basées sur des lois empiriques et des approches à tâtons. De ce fait, la réalisation d'une interface microfluidique n'est pas aisée bien que les progrès en microtechnologie offrent de nombreuses possibilités au niveau de la taille, de la forme et des matériaux pouvant être utilisés. Il est donc important de comprendre quels sont les paramètres qui influencent de manière notable la formation d'un nébulisat stable à partir d'un micro-canal afin d'en déduire des règles de conception simples pouvant être adoptées pour la fabrication de sources miniaturisées potentiellement plus performantes que les sources commerciales capillaires.

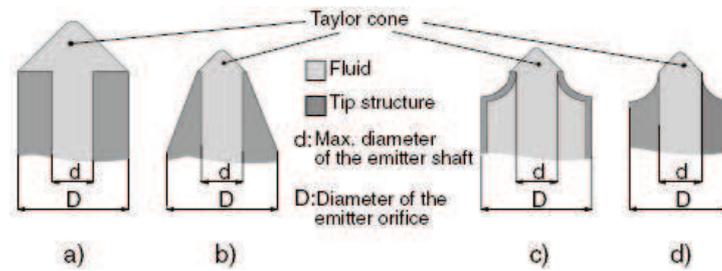
Lorsque l'on conçoit une nouvelle interface afin de réaliser un couplage avec un spectromètre de masse, il est important de s'intéresser aux aspects suivants : la taille, la forme, le débit, le bruit chimique introduit par les matériaux utilisés lors du procédé de fabrication, la compatibilité avec les solvants, l'effet mémoire en cas d'exposition à un même échantillon pendant de longues périodes, la stabilité, la sensibilité et l'efficacité d'ionisation.

Tout d'abord, la réduction du diamètre interne des sources d'électronébulisation conduit à un meilleur rendement d'ionisation grâce à un débit plus faible et au diamètre initial des gouttelettes générées qui est plus petit améliorant ainsi la sensibilité de l'analyse [Rey 02].

Cette miniaturisation permet également une diminution de la tension d'ionisation. En effet, la tension nécessaire à l'établissement du nébulisat peut être ramenée dans la plage 600-1500V au lieu de 3000-4000V, ce qui permet de positionner la source plus près de l'entrée du spectromètre de masse. Ainsi, une émission stable peut être obtenue pour une large gamme de débits et de solvants sans l'utilisation d'un nébulisateur de gaz. Par ailleurs, le nombre d'ions générés introduits dans le spectromètre est augmenté. La consommation d'échantillons est ainsi réduite et un couplage avec les techniques de nano-chromatographie (Cf. lexique) liquide grâce au bas débit est envisageable.

Schilling a aussi montré que la diminution du diamètre interne de la source permet de réduire de manière considérable la quantité de méthanol utilisée comme modificateur organique afin d'obtenir un nébulisat stable [Sch 04]. En effet, tandis qu'une source de 30 $\mu$ m génère un nébulisat reproductible avec une solution aqueuse pure, une source de 100 $\mu$ m nécessite l'addition d'au moins 5% de méthanol afin d'obtenir un cône de Taylor et de 30% de méthanol pour obtenir un courant total d'ionisation stable. L'emploi d'un modificateur organique additionnel ou d'autres substances permettant de réduire la tension de surface afin de maintenir un nébulisat peut fortement influencer l'efficacité de la séparation. C'est pourquoi une source ne nécessitant aucun modificateur est souhaitable.

La forme des sources est également d'une importance capitale. Les structures en forme de pointe imitant la forme géométrique des nano-sources d'électronébulisation à hautes performances, faites de capillaires étirés en silice, fournissent une géométrie idéale pour les émetteurs [Val 95]. En effet, une pointe effilée offre une surface moins importante empêchant ainsi l'accumulation du solvant et l'excès de liquide est éliminé par le gradient du champ électrique. De plus, une source plus pointue conduit à un diamètre externe effectif du cône de Taylor plus petit et par conséquent à un nébulisat plus stable [Sch 04] [Zha 99]. L'équipe de Griss [Gri 02] l'a bien montré en développant deux types d'émetteurs (Figure II.1). On voit clairement que plus la sortie du canal a un bord pointu, plus la taille du cône de Taylor est réduite à un minimum relatif à son diamètre, la base du cône de Taylor ne mouillant pas une surface plus large que la section du canal de sortie comme illustré Figure II.1.



**Figure II.1 :** Comparaison schématique du cône de Taylor généré par un champ électrique suivant la géométrie de la source : (A) source à l'extrémité plate, (B) source capillaire en silice, (C) et (D) sources micro-fabriquées. Pour le même diamètre de l'orifice  $d$ , le diamètre du cône de Taylor est aussi grand que le diamètre externe  $D$  dans le cas d'une source plate (A) ou peut être réduit à  $d$  dans les autres cas [Gri 02].

Par ailleurs, la forme de la source a aussi une influence sur le champ électrique. Un émetteur plus pointu conduit à un champ électrique de plus grande force, ce qui signifie que de plus faibles tensions peuvent être utilisées à efficacité d'ionisation égale. Cela a été mis en évidence par Griss qui a réduit l'angle à l'apex de sa source de  $90^\circ$  à  $60^\circ$  [Gri 02].

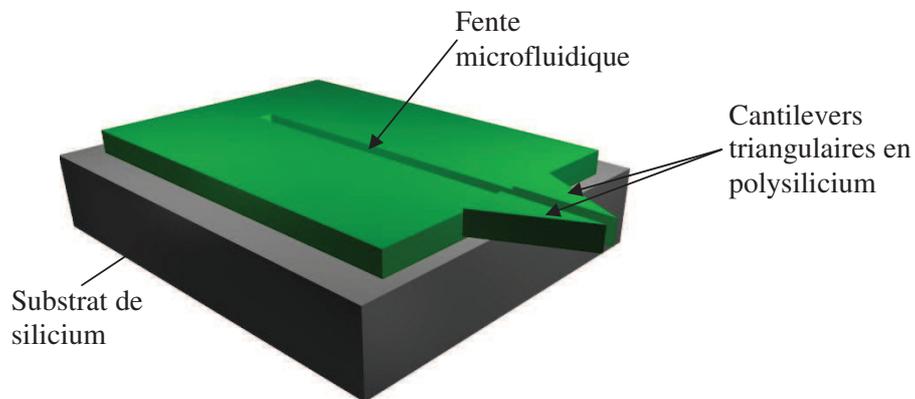
La longueur des sources est un autre paramètre critique pour la génération du nébulisat. Elle permet d'isoler la goutte de liquide initiale de l'extrémité de la source et empêche le liquide de s'étendre partout. Lorsque la longueur des sources est inférieure à dix microns, aucun nébulisat n'est observé dû au problème de mouillage similaire à celui de la génération d'un nébulisat à partir d'un bord plat. Ce problème lié à la tension de surface a déjà été rapporté [Xue 97].

Enfin pour terminer, la géométrie de la source doit être choisie afin de permettre son intégration avec d'autres composants microfluidiques (ex : colonne de chromatographie) mais aussi rendre possible son utilisation avec des robots standards pour l'automatisation des analyses.

Le concept d'une source en polysilicium basée sur une fente capillaire plutôt qu'un tube capillaire a déjà été validé lors d'une étude précédente [Ars 04]. Cependant, nous proposons ici d'optimiser leur fabrication et d'en améliorer les performances en poursuivant leur miniaturisation à des dimensions bien inférieures à celles des tubes capillaires de 1 à  $5\mu\text{m}$  de diamètre. Pour cela, nous nous sommes tournés vers les microtechnologies silicium. Ces technologies ont été largement utilisées pour la fabrication de microsystèmes électromécaniques (MEMS) [Bus 98] [How 83 a] [How 83 b] et commencent aujourd'hui à être employées par la communauté microfluidique [Ber 02]. Le polysilicium polycristallin

non dopé ( $10^{14} \text{ cm}^{-3}$ ) est suffisamment conducteur pour nos applications qui utilisent des tensions continues. De plus, il offre des avantages tels qu'une intégration facile, une grande reproductibilité et une fabrication de grande précision nécessaire à la descente en échelle des dimensions de la fente capillaire. Enfin, contrairement aux polymères, il ne génère pas de bruit chimique pouvant perturber les analyses.

L'interface envisagée ici est constituée d'un substrat de silicium servant de support et d'une couche de silicium polycristallin dans laquelle sont définis de longs cantilevers triangulaires rigides qui forment une fente microfluidique destinée à amener le liquide jusqu'à l'extrémité de la source (Figure II.2).



**Figure II.2 :** Schéma d'une source d'électronébulisation en polysilicium constituée par deux cantilevers triangulaires suspendus formant une fente microfluidique.

D'un point de vue mécanique, la déflexion d'une telle structure est déterminée par : (i) la longueur totale, (ii) la largeur, (iii) l'épaisseur, (iv) le module d'Young et (v) le moment de torsion dû aux contraintes internes. Le polysilicium pour ces longues structures en pointe est un excellent choix [Guc 85] [Luc 97] [Bur 03]. En effet, le module d'Young du polysilicium déposé par vapeur chimique à basse pression (LPCVD) a été mesuré comme étant compris entre 120GPa et 200GPa, ce qui se traduit par une quasi absence de contraintes dans le matériau et garantit la planéité de la partie libre de la source surplombant le substrat [Sha 97] [Mai 95] [Sha 98]. Toutefois, ces propriétés mécaniques dépendent fortement des conditions pendant et après le dépôt [Sha 97]. En effet, des contraintes internes minimales peuvent être obtenues si les conditions pendant et après le dépôt sont optimisées [Guc 85] [Mai 95] [Che 01] [Zha 98] [Yan 00] [Guc 89]. Des contraintes résiduelles (en compression) de l'ordre de 200MPa ont été mesurées dans une couche de  $2\mu\text{m}$  de polysilicium déposée sur un oxyde

thermique [Che 01]. Cependant, ces contraintes peuvent être pratiquement réduites à zéro après un recuit à haute température [Che 01].

Enfin, d'un point de vue microfluidique, le polysilicium est un matériau hydrophile : l'angle de contact pour une goutte d'eau est de 60°. Cette propriété combinée à la géométrie planaire de ces sources rend plus facile le chargement et permet d'envisager une automatisation simple des analyses avec un robot qui déposerait une goutte de liquide sur la fente capillaire alimentant la source par remplissage spontané grâce aux forces capillaires. De plus, comparé aux tubes capillaires, la structure ouverte limite les problèmes de bulles d'air.

## 1-2 Remplissage spontané des sources

Nous rappelons ici les résultats de l'étude théorique menée dans notre laboratoire concernant le remplissage capillaire dans des fentes rectangulaires de taille micrométrique afin d'adopter une procédure de conception rationnelle pour miniaturiser les sources d'électronébulisation permettant leur intégration dans les laboratoires sur puce [Bri 04].

Soit une fente capillaire de longueur  $L$ , de largeur  $w$  et de hauteur  $h$ . L'absorption spontanée d'un liquide par une fente capillaire est, en plus des paramètres géométriques, contrôlée par les angles que forme le liquide avec les parois de la fente  $\theta_f$  et avec la surface supérieure et inférieure de la fente  $\theta_s$ . On suppose ici que l'angle de contact dans la fente  $\theta_f$  et sur les surfaces au dessus et en dessous de la fente  $\theta_s$  sont égaux ( $\theta_f = \theta_s = \theta$ ). L'équilibre mécanique de l'interface liquide-air doit satisfaire l'équation de Laplace [De G 03] :

$$2\gamma_{la}M = P_l - P_a \text{ où } M = \frac{(c_1 + c_2)}{2} \quad (1)$$

reliant la tension de surface  $\gamma_{la}$  et la courbure  $M$  de l'interface liquide-air à la différence de pression entre le liquide et l'air. Ici,  $c_1$  et  $c_2$  correspondent aux deux principales courbures de cette interface. L'équilibre des forces générées par les tensions de surface qui s'exercent entre les trois phases liquide  $l$ , vapeur  $a$  et solide  $s$  est donné par l'équation de Young-Dupré :

$$\gamma_{la} \cos \theta = \gamma_{as} - \gamma_{ls} \quad (2)$$

L'absorption du liquide dans la fente se produit quand un pont de liquide allongé avec une pression de Laplace négative peut se former dans la fente. Après avoir atteint l'extrémité de la fente, cette pression devient nulle. La position d'équilibre du liquide est déterminée de manière numérique par minimisation de l'énergie d'interface. Le résultat montre que le remplissage spontané se produit si la condition suivante est vérifiée :

$$\frac{w}{h} < \cos \theta \text{ où } \theta < 90^\circ \quad (3)$$

Compte tenu des remarques précédentes, les dimensions retenues pour la fente microfluidique sont de 2mm pour la longueur, 1 $\mu$ m (limite de résolution pour la lithographie optique) pour la largeur et 4 $\mu$ m pour la hauteur afin d'assurer le remplissage spontané.

Nous avons tenté de simuler le remplissage spontané d'une fente capillaire par éléments finis à l'aide du logiciel COMSOL afin de vérifier si cette condition était encore valable à l'échelle nanométrique. Malheureusement, nous avons été confrontés aux limitations du logiciel qui ne nous a pas permis d'appliquer correctement les conditions aux limites notamment au niveau des interfaces liquide-air.

## 2- Voies technologiques explorées pour la fabrication des micro et nano-sources d'électronébulisation

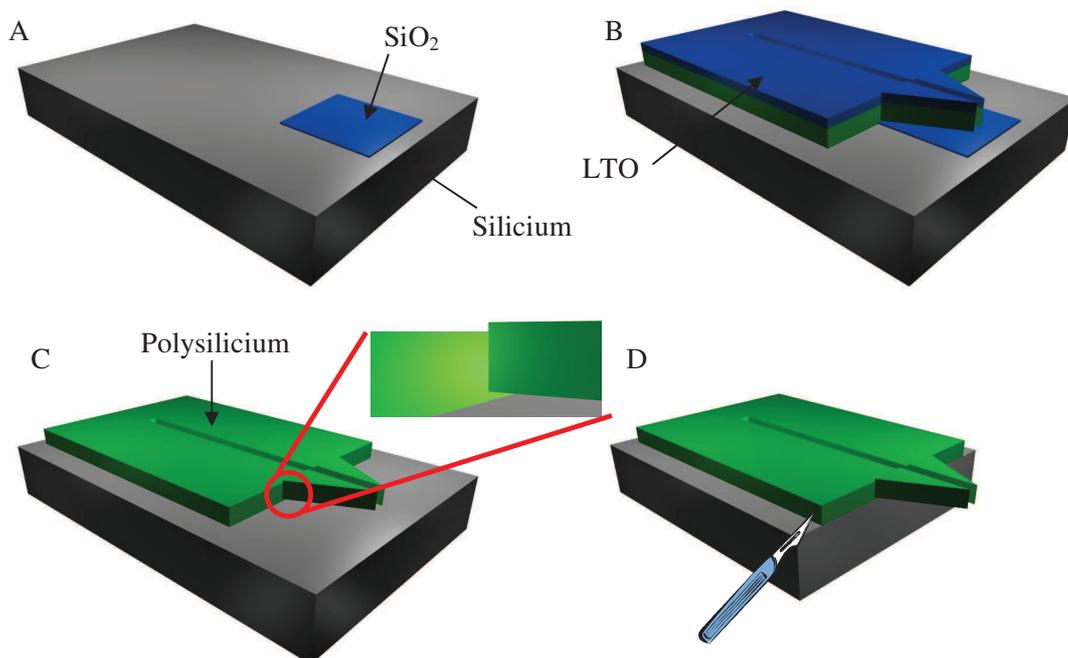
### 2-1 Fabrication par gravure ionique réactive (RIE) chlorée

#### 2-1-1 Micro-sources

Une source est composée des éléments suivants : un substrat de silicium de 380 $\mu$ m d'épaisseur et une couche de polysilicium non dopé dans laquelle sont définis : une fente capillaire de 2000 $\mu$ m de long, 1 $\mu$ m de large et 4 $\mu$ m de profondeur et deux cantilevers triangulaires qui dépassent horizontalement du bord du substrat de silicium de plusieurs centaines de microns (~100 à 1000 $\mu$ m) permettant un couplage simple entre la puce et l'entrée du spectromètre de masse (Figure II.2). La fonction de la fente est d'amener le liquide

jusqu'aux cantilevers encastrés libres. Les cantilevers triangulaires qui constituent la source en forme de pointe ont une longueur pouvant aller jusqu'à  $1000\mu\text{m}$  et une épaisseur de  $4\mu\text{m}$ , c'est-à-dire un rapport d'aspect pouvant aller jusqu'à 250, l'angle à la pointe est de  $53^\circ$ . La fente capillaire ayant pour dimensions  $1\mu\text{m}$  de large et  $4\mu\text{m}$  de haut présente un rapport d'aspect de 4. Ces dimensions ont été choisies afin d'obtenir une fente dont la section a une surface ( $wh$ ) de l'ordre de celle des sources à base de tube capillaire [Wil 94].

La Figure II.3 décrit le procédé de micro-fabrication à base de silicium développé pour la confection de ces micro-sources d'électronébulisation. Ce procédé comprend les étapes suivantes : (i) dépôt d'une couche sacrificielle, (ii) dépôt de polysilicium peu contraint, transfert des motifs par photolithographie et gravure ionique réactive (RIE) puis pour terminer (iii) libération par gravure de la couche sacrificielle, clivage et séchage.

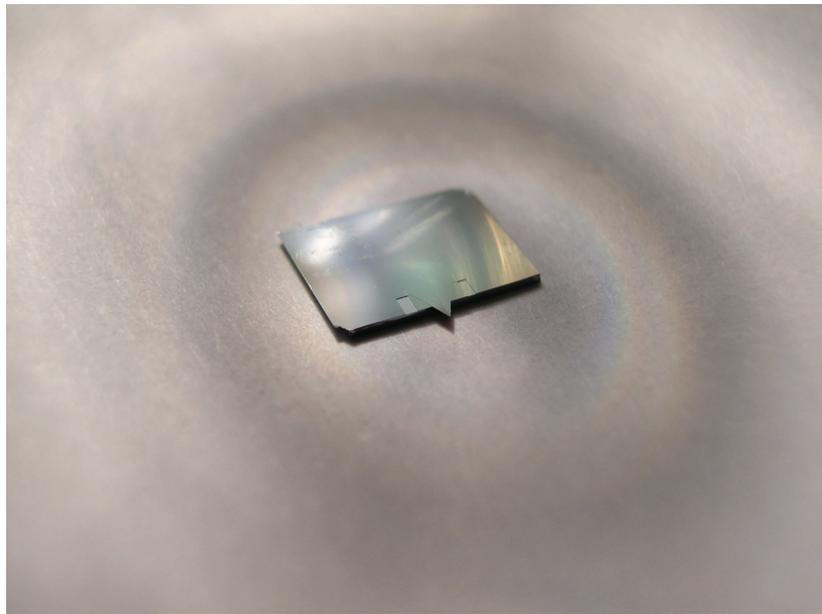


**Figure II.3 :** Schémas des étapes de micro-fabrication : (A) Une couche sacrificielle de  $\text{SiO}_2$  est définie sur le substrat de silicium, (B) Définition de la fente microfluidique par gravures sèches au  $\text{CHF}_3/\text{CF}_4$  du masque en  $\text{SiO}_2$  puis du polysilicium LPCVD au  $\text{Cl}_2/\text{He}$ , (C) Libération de la fente microfluidique par gravure humide du  $\text{SiO}_2$  dans le  $\text{HF}$  (le zoom montre le décrochement dans le polysilicium entre l'extrémité et le corps de la source dû à la couche sacrificielle), (D) Clivage du substrat au scalpel.

Un jeu de deux masques a été conçu en utilisant le logiciel *Cadence* afin de fabriquer les sources. Les masques qui comportent un total de 25 sources (réseau de 5 x 5) ont été réalisés en utilisant un nanomasqueur (EBP G5000+, Leica, VA, USA).

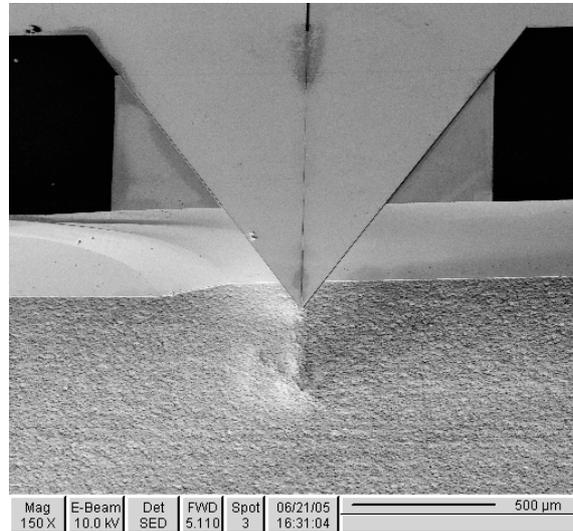
Un substrat de silicium 3 pouces dopé au phosphore (type n,  $5-10 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ) d'orientation cristalline (1 0 0) est employé pour la fabrication des structures. Tout d'abord, une croissance d'oxyde thermique ( $\text{SiO}_2$ ) de 200nm est réalisée par oxydation sèche dans un four par dépôt chimique en phase vapeur à basse pression (LPCVD). Cet oxyde sert de couche sacrificielle afin de libérer les cantilevers de la surface du substrat de silicium. Cette couche est structurée en forme de mesa par photolithographie et gravure humide dans une solution tamponnée (BOE 7 :1 /  $\text{NH}_4\text{F}$  : HF). La vitesse de gravure est de l'ordre de  $80\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$  (Figure II.3 A). Puis, une couche de polysilicium non dopé de  $4\mu\text{m}$  d'épaisseur est déposée par LPCVD par décomposition thermique du silane ( $\text{SiH}_4$ ) à une température de  $585^\circ\text{C}$ , une pression de 200mTorr et un débit de 80sccm. Dans ces conditions, la vitesse de dépôt du polysilicium est estimée à  $4.7\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Afin de minimiser les contraintes internes, un recuit haute température à  $1050^\circ\text{C}$  est réalisé pendant 60 minutes [Mai 95]. Une couche de dioxyde de silicium basse température (LTO) de  $0.8\mu\text{m}$  d'épaisseur est ensuite déposée sur le polysilicium par LPCVD ( $\text{SiH}_4$ : 70sccm,  $\text{O}_2$ : 150sccm,  $\text{N}_2$ : 25sccm) à une température de  $420^\circ\text{C}$  et une pression de 150mTorr. La vitesse de dépôt est de  $21\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Le LTO a plutôt été choisi par rapport à l'oxyde thermique afin d'éviter l'oxydation du polysilicium. Cette couche est utilisée comme masque durant le transfert des motifs afin de définir les cantilevers dans la couche de polysilicium. Elle est structurée par photolithographie (résine photosensible S1818) et par gravure ionique réactive au  $\text{CF}_4/\text{CHF}_3$ . La vitesse de gravure du LTO et de la résine S1818 durant une gravure ionique réactive ( $\text{CF}_4$ : 40sccm,  $\text{CHF}_3$ : 40sccm, puissance : 125W, pression : 50mTorr) sont respectivement de  $26\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$  et  $35\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Ainsi, afin d'obtenir une résolution inférieure à  $2\mu\text{m}$  pour la fente capillaire, l'épaisseur nécessaire de la résine S1818 est de  $1.6\mu\text{m}$ . Après avoir enlevé la résine S1818 par plasma oxygène, les cantilevers sont définis dans le polysilicium à l'aide d'une gravure ionique réactive à base de chlore (MDC-Trion, AZ, USA) (Figure II.3 B). Les paramètres pour cette gravure sont les suivants :  $\text{Cl}_2$ : 4sccm, He : 8sccm, puissance : 200W, pression : 100mTorr. La vitesse de gravure du polysilicium est de l'ordre de  $110\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ . La vitesse de gravure du LTO est quant à elle de l'ordre de  $11\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ . L'image au microscope électronique à balayage montre que les flancs des structures obtenues présentent une bonne verticalité (Figure II.7). En effet, les gravures chlorées sont connues pour la réalisation de structures à grand rapport d'aspect

qui sont nécessaires ici afin de produire l'effet capillaire souhaité. C'est une gravure anisotrope grâce aux produits de gravure  $\text{SiCl}$ ,  $\text{SiCl}_2$  et  $\text{SiCl}_3$  qui se redéposent sur les flancs, créant ainsi une couche de passivation permettant d'obtenir des profils verticaux. Les cantilevers triangulaires sont libérés de la surface du substrat de silicium par gravure humide de la couche sacrificielle d'oxyde thermique présente sous les cantilevers en polysilicium (Figure II.3 C). Une solution d'acide fluorhydrique ( $\text{HF}/\text{H}_2\text{O}$  : 50/50) a été utilisée pour cette étape car la sélectivité entre le  $\text{SiO}_2$  et le polysilicium est très élevée pour les solutions concentrées en HF [Buh 97]. Enfin, les sources sont découpées en clivant le substrat à l'aide d'un scalpel le long des axes préférentiels suivant le plan (1 0 0) du silicium (Figure II.3 D). Un problème qui est fréquemment rencontré pendant la fabrication de telles structures est la stiction durant la phase de séchage suivant la gravure de la couche sacrificielle. Ce problème est d'autant plus important lorsque de grands rapports d'aspect sont nécessaires, comme c'est le cas ici. Dans le but de résoudre ce problème, nous réalisons l'étape de clivage en milieu liquide ( $\text{H}_2\text{O}$  ou isopropanol) en plaçant une goutte de liquide sur le cantilever avant le clivage. La figure II.4 montre une photographie de la source ainsi fabriquée.



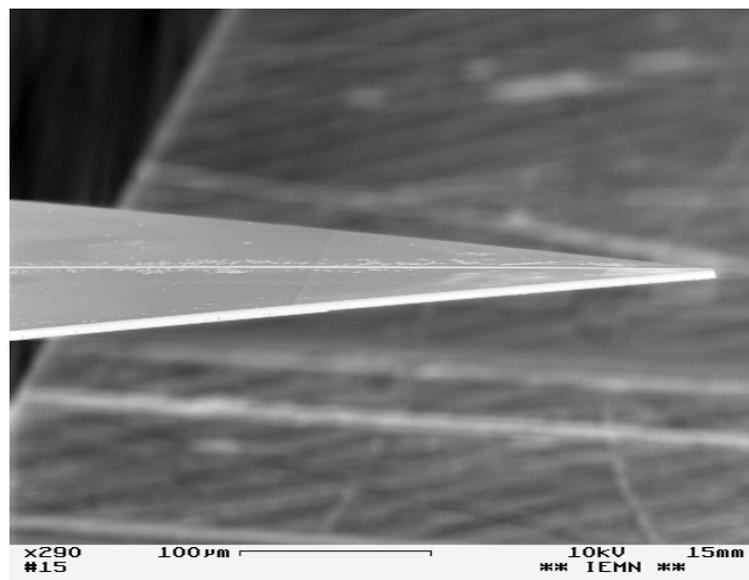
**Figure II.4** : Photographie d'une micro-source d'électronébulisation en polysilicium.

La longueur des sources est variable (100 $\mu\text{m}$  à 1000 $\mu\text{m}$ ) dépendant de l'étape de clivage (Figure II.5).



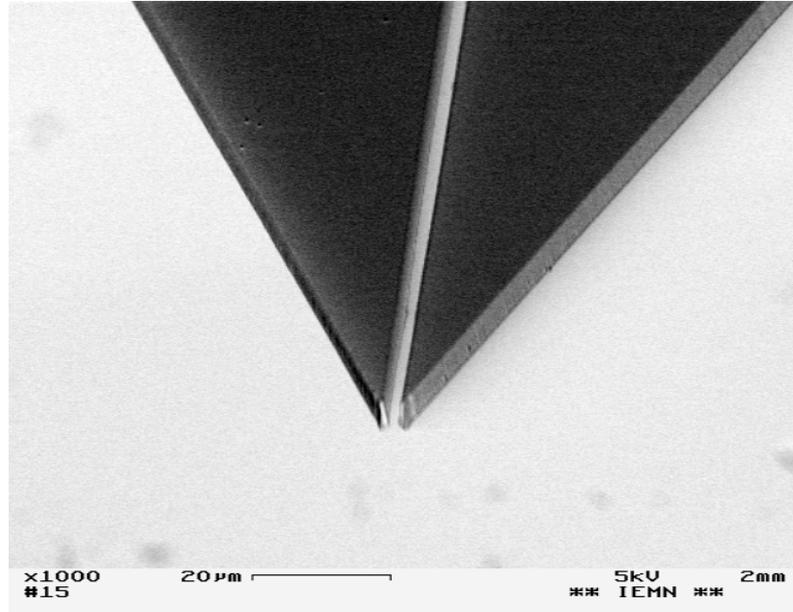
**Figure II.5 :** Image au microscope électronique à balayage d'une micro-source d'électronébulisation en polysilicium montrant que la longueur de la source dépend de l'étape de clivage du substrat.

La Figure II.6 montre une image au microscope électronique à balayage qui révèle que les structures produites sont bien planaires, résultant de la minimisation des contraintes internes du polysilicium grâce à l'étape de recuit à haute température à la suite du dépôt.



**Figure II.6 :** Image au microscope électronique à balayage montrant la planéité d'une micro-source en polysilicium.

La Figure II.7 montre une image de l'extrémité de la micro-source. On peut noter que l'uniformité du dépôt de polysilicium se reflète par le fait que les dimensions de la fente sont préservées sur la totalité de la longueur des cantilevers.



**Figure II.7 :** Image au microscope électronique à balayage de l'extrémité d'une micro-source d'électronébulisation en polysilicium.

### 2-1-2 Nano-sources

A partir des micro-sources précédentes la possibilité d'aller plus loin en réduisant les dimensions à l'échelle nanométrique a été démontrée. Un dispositif est dit nanofluidique lorsqu'une partie de ce dispositif contient un volume de liquide en 3 dimensions où au moins une dimension est de l'ordre du nanomètre. Ces nouveaux dispositifs nanofluidiques appelés nano-sources sont constitués d'une fente capillaire nanofluidique couplée à une fente capillaire microfluidique. La fente capillaire microfluidique est réalisée comme précédemment par gravure ionique réactive (RIE) tandis que la fente nanofluidique est réalisée en employant une gravure à faisceau d'ions focalisés (FIB). La fente capillaire microfluidique a une longueur de 2mm, une largeur de  $1\mu\text{m}$  et une profondeur de  $4\mu\text{m}$ , c'est-à-dire un volume de quelques picolitres. La plus petite fente nanofluidique réalisée a une longueur de  $3\mu\text{m}$ , une largeur de 50nm et une profondeur de 300nm, c'est-à-dire un volume de quelques dizaines d'attolitres.

Comme pour les micro-sources, la fente microfluidique est constituée de deux cantilevers triangulaires en polysilicium dépassant du bord d'un substrat de silicium. La fente nanofluidique est définie à l'extrémité d'un des deux cantilevers. Le principal problème ici est le remplissage spontané et le couplage fluidique entre une fente capillaire microfluidique et une fente capillaire nanofluidique qui lui est orthogonale. On peut définir les dimensions suivantes pour la fente microfluidique : la longueur ( $L_m$ ), la hauteur ( $h_m$ ) et la largeur ( $w_m$ ) tandis que la fente capillaire nanofluidique a les dimensions  $L_n$ ,  $h_n$  et  $w_n$ . Les dimensions des fentes capillaires ont été choisies en utilisant les règles de conception exposées auparavant qui restent valables pour des dimensions de quelques dizaines de nanomètres [Bri 04] [Sob 00] [Chu 71] [Tas 04]. Ainsi pour avoir un remplissage spontané dans les deux fentes capillaires, l'équation :

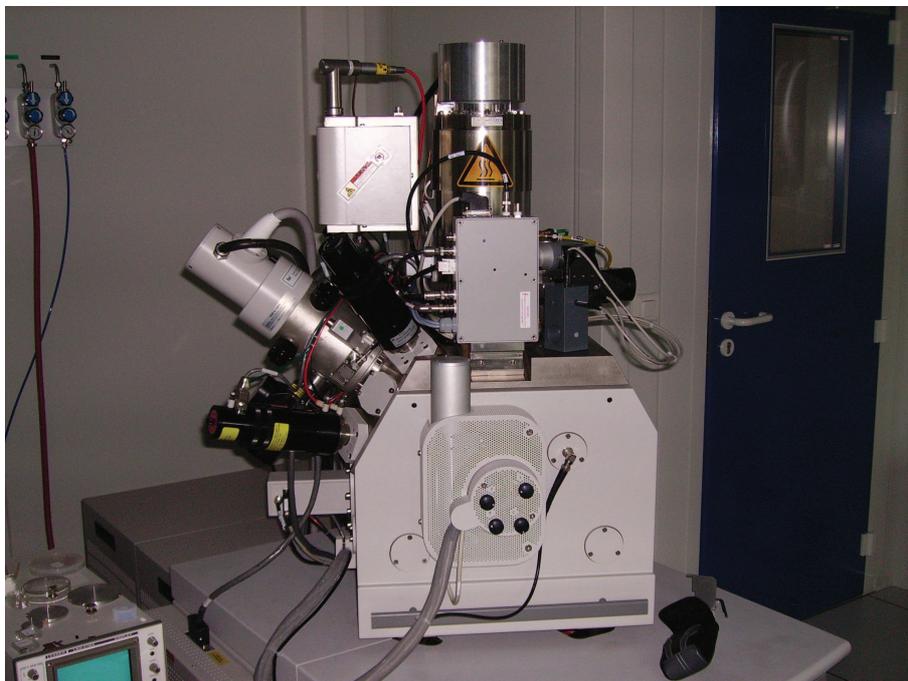
$$w_{m,n} < h_{m,n} \cos(\theta_c) \quad (4)$$

doit être vérifiée sur la longueur totale des deux fentes. Dans notre situation, le remplissage spontané aura lieu si l'angle de contact du liquide est inférieur à  $60^\circ$  sur le polysilicium. De plus, il doit y avoir un recouvrement entre les deux fentes capillaires afin d'assurer le couplage entre les deux fentes. Cela est réalisé par un chevauchement de  $1\mu\text{m}$  de long.

La fabrication du dispositif est divisée en deux parties : (i) la fabrication de la partie microfluidique de la nano-plume et (ii) la fabrication de la partie nanofluidique. La fabrication de la partie microfluidique de la source est réalisée en utilisant exactement les mêmes techniques que celles développées dans la partie précédente pour les micro-sources. On en rappelle ici les étapes. Une croissance de  $200\text{nm}$  de  $\text{SiO}_2$  thermique est réalisée sur un substrat de silicium de type n. Cette couche est structurée par photolithographie et gravure humide dans une solution tamponnée (BOE 7 : 1 /  $\text{NH}_4\text{F}$  : HF) afin de former une couche sacrificielle. Une couche de  $4\mu\text{m}$  de silicium polycristallin est ensuite déposée par les techniques LPCVD. Après un recuit haute température à  $1050^\circ\text{C}$  pendant 1 heure sous Argon pour minimiser les contraintes internes [Mai 95], cette couche est structurée par une gravure ionique réactive chlorée ( $\text{Cl}_2/\text{He}$ ) afin de former la fente capillaire microfluidique. Cela est réalisé par transfert de masque mettant en œuvre une photolithographie et une couche de  $0.8\mu\text{m}$  d'oxyde basse température (LTO) déposée par LPCVD. La couche sacrificielle est éliminée par gravure humide à l'acide fluorhydrique ( $\text{HF}/\text{H}_2\text{O}$  : 50/50) afin de libérer les

cantilevers triangulaires de la surface du substrat de silicium. Le découpage des sources permet de faire dépasser ces cantilevers du bord du substrat de silicium d'une longueur définie par le clivage opéré perpendiculairement aux structures suspendues.

Suite à ces étapes de micro-fabrication, une gravure avec un faisceau d'ions focalisés est employée afin de définir la partie nanofluidique. Nous avons utilisé un faisceau d'ions focalisés à base de gallium ayant une résolution de 6nm couplé à un microscope électronique à balayage doté d'une source Schottky à émission de champ (Strata DB 235 DualBEAM FIB/SEM) (Figure II.8).



**Figure II.8 :** Photographie du FIB (Strata DB 235 Dual Beam FIB/SEM) utilisé afin d'usiner les nano-sources d'électronébulisation.

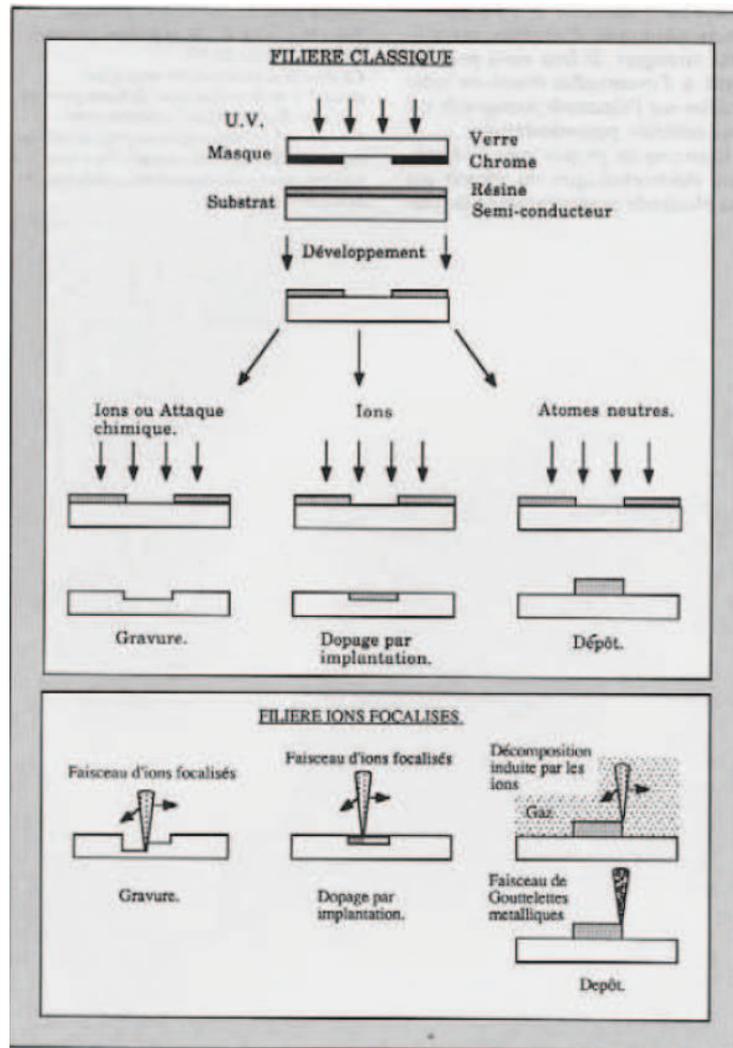
La grande résolution de cette machine en fait un candidat idéal pour la fabrication de nos dispositifs. C'est une technique très puissante pour la structuration de matériau à l'échelle sub-micronique sans avoir recours aux techniques de photolithographie.

Le processus d'interaction entre les ions, dont l'énergie est comprise entre  $10^3$  et  $10^4$ eV, et un solide, se traduit par des modifications de la topographie, de la cristallographie ou des propriétés électroniques de la cible. La fabrication de dispositifs micro-électroniques

fait largement appel à ces effets ; la gravure sèche et le dopage par implantation d'impuretés sont les exemples les plus connus d'applications des faisceaux d'ions larges.

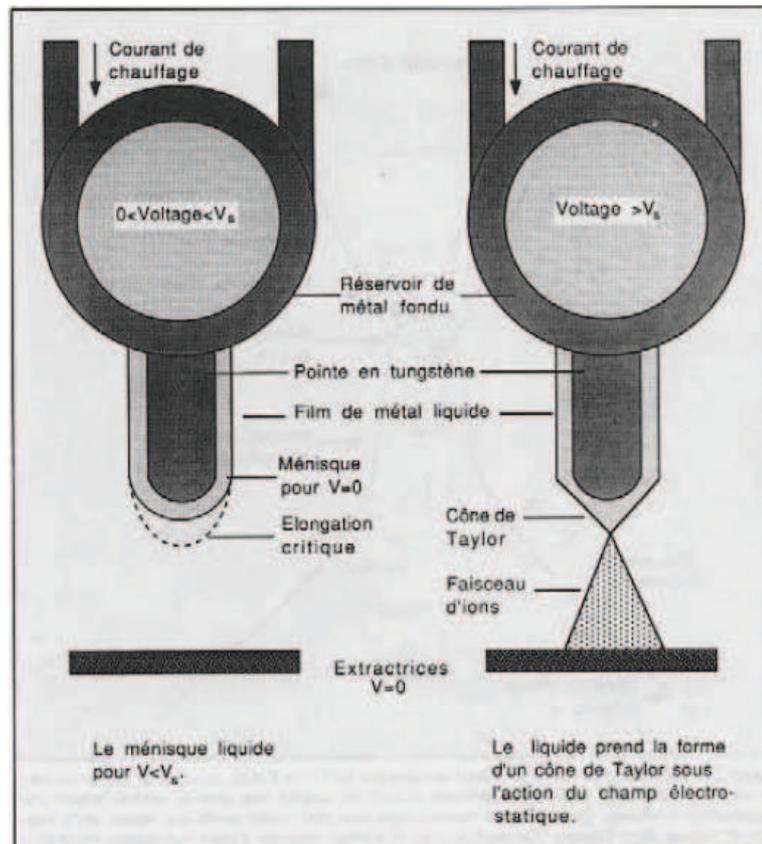
Les faisceaux d'ions focalisés, plus connus sous le sigle anglais FIB (Focused Ion Beam), ouvrent de nouvelles perspectives puisqu'ils permettent ces modifications au niveau local par simple déplacement d'une fine sonde sur la cible ; d'où un moyen d'intervention extrêmement souple. Le développement de ces techniques a pu se faire grâce à la mise au point de sources d'ions aux caractéristiques étonnantes : les sources d'ions à métal liquide (SIML). Ainsi, en 1973 un groupe de chercheurs des laboratoires Hughes Research proposa de s'affranchir de l'étape de masquage assez lourde, afin de réaliser des opérations essentielles telles que la gravure ou le dopage, en faisant appel à l'écriture directe par faisceau d'ions focalisés.

Lorsqu'un ion incident percute la surface d'un solide, il transfère de l'énergie aux noyaux atomiques. Si celle-ci est supérieure à l'énergie de liaison, un premier atome déplacé est créé, entrant en collision avec d'autres, distribuant l'énergie à ses voisins via une cascade de collisions, dont le rayon typique est 10nm. La dissipation d'énergie a lieu à la fois par les interactions coulombiennes dites "nucléaires" (relatives aux noyaux écrantés), électroniques et par échange de charges. Si l'énergie transmise à un atome de surface possède une action normale supérieure à l'énergie de sublimation, l'atome de surface est arraché. C'est l'idée de la filière sans masque décrite Figure II.9 qui présente des avantages considérables tels que la possibilité, en choisissant une loi de balayage appropriée, de moduler la dose suivant les direction  $xy$ , d'où l'accès à des structures 3D par érosion ou à des profils d'implantation à variation latérale de dopage.



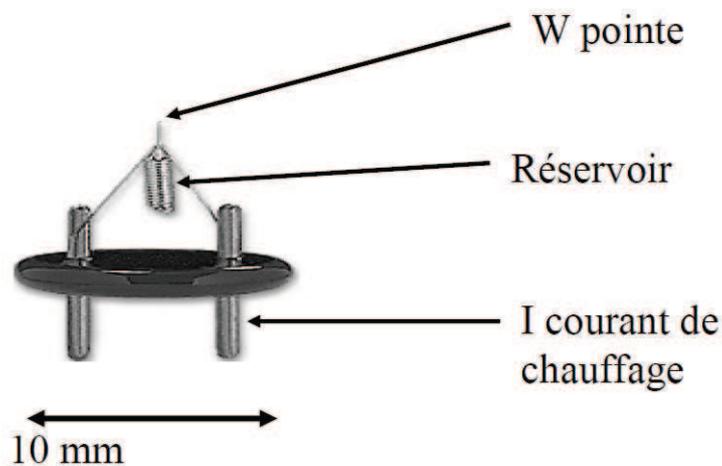
**Figure II.9 :** La filière technologique conventionnelle fait appel aux techniques de masquage à l'aide de résines. Les faisceaux d'ions focalisés simplifient considérablement les opérations de gravure et de dopage et permettent une modulation latérale de la dose. Les deux méthodes possibles de dépôt sont la décomposition locale d'un gaz organométallique sous impact ionique, ou le dépôt direct d'amas métalliques chargés focalisés [Sud 88].

Cependant, en 1973, les performances des sources d'ions ne permettaient pas de transporter dans une sonde ionique micronique ou sub-micronique assez de courant pour envisager des applications réalistes en micro-fabrication. Les sources d'ions à métal liquide ont radicalement changé cette situation. Le principe d'une telle source est décrit Figure II.10.



**Figure II.10 :** Comportement d'un ménisque liquide conducteur sous un champ électrique et principe d'une source d'ions à métal liquide [Sud 88].

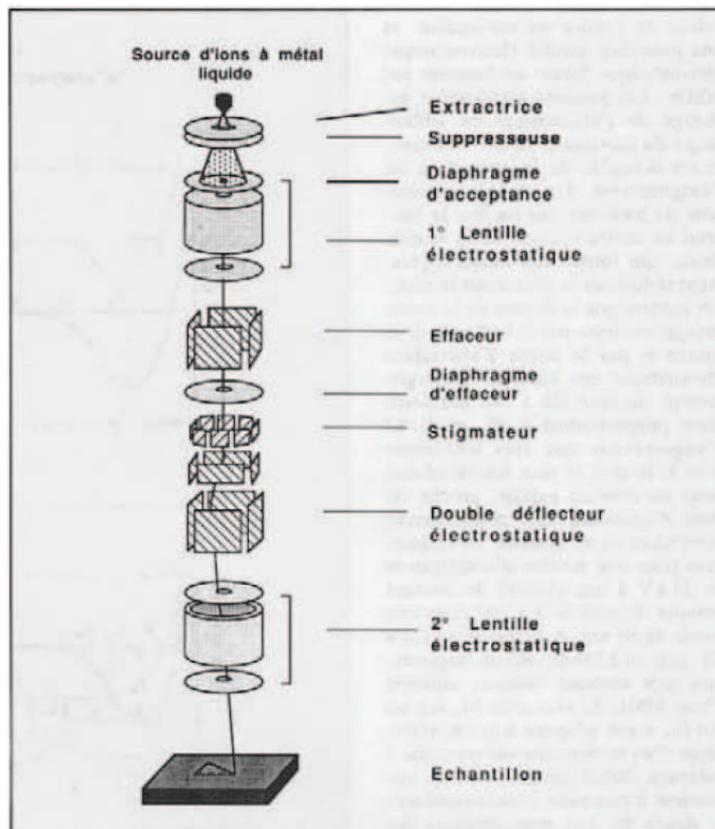
Le métal utilisé, généralement du gallium car il est relativement facile d'obtenir des ions gallium, est contenu dans un creuset réfractaire et porté à son point de fusion par effet Joule afin de mouiller une pointe de tungstène (Figure II.11).



**Figure II.11 :** Photographie d'une source d'ions à métal liquide. [FEI].

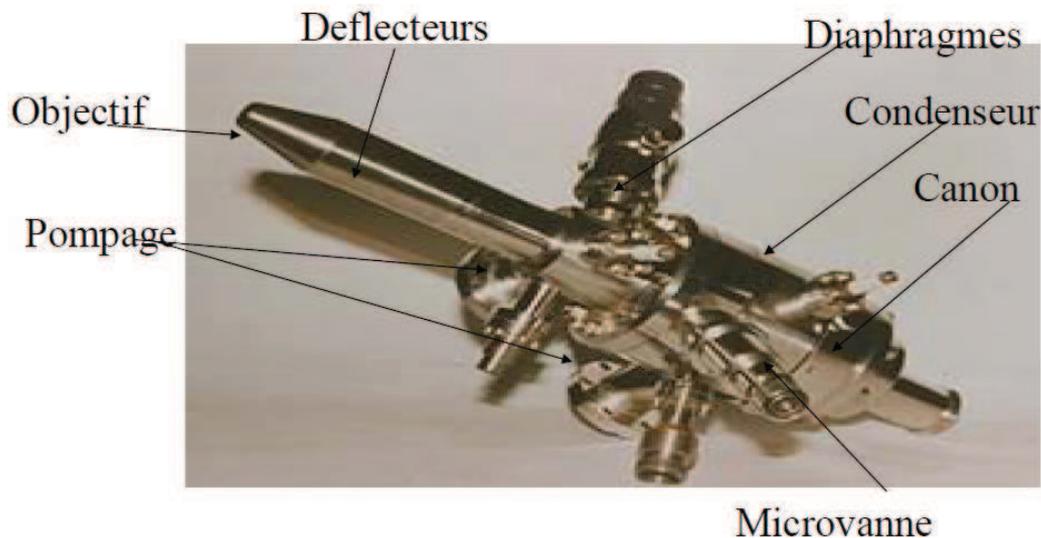
Un ménisque liquide recouvre l'apex de la pointe. Son équilibre est décrit par la minimisation de son énergie de surface, d'où la forme d'équilibre pseudo-sphérique représentée. Portons maintenant la pointe à un potentiel positif par rapport à une électrode placée en regard, le ménisque s'étire en un fin jet de liquide, point de départ de l'émission ionique par effet de champ des atomes de gallium. Le champ électrique qui règne à l'extrémité du jet liquide atteint  $10^{10} \text{ V.m}^{-1}$ . Les ions extraits de la source sont accélérés à une énergie comprise entre 1 et 50keV et sont ensuite focalisés par un système optique.

Au niveau optique, l'instrument destiné à la focalisation d'un faisceau d'ions présente bien des analogies avec la colonne d'un microscope électronique à balayage (MEB). La différence essentielle est l'emploi exclusif de lentilles électrostatiques dont les propriétés focalisatrices sont indépendantes du rapport charge sur masse, critère indispensable avec un faisceau d'ions non filtré. La Figure II.12 présente le fonctionnement du système optique.



**Figure II.12 :** Schéma d'une colonne ionique focalisée à deux lentilles électrostatiques sans séparateur de masse [Sud 88].

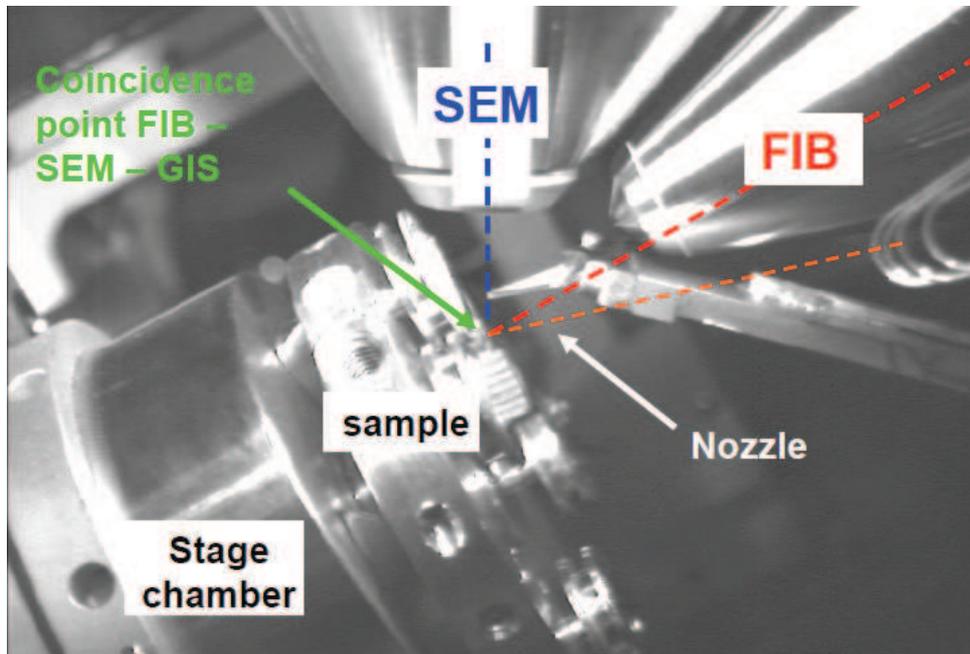
Une électrode portée à une dizaine de kV permet d'extraire les ions de la source d'ions à métal liquide qui sont collimatés une première fois par l'ouverture d'un collecteur. Un diaphragme d'entrée limite l'angle d'acceptance du système optique à une valeur de l'ordre du milliradian et une première lentille électrostatique dissymétrique forme un faisceau parallèle. Un premier quadripôle est chargé de l'effacement ou "blanking" du faisceau et de son centrage et un octupôle de la correction de l'astigmatisme. Un double quadripôle de balayage fait osciller le faisceau au centre optique de la lentille finale, qui forme une image légèrement réduite de la source sur la cible. La tache de focalisation du faisceau d'ions a un diamètre de quelques nanomètres. La Figure II.13 montre la photo d'une colonne ionique focalisée.



**Figure II.13 :** Photographie d'une colonne ionique focalisée à deux lentilles électrostatiques [Ors].

Ainsi le FIB (Focused Ion Beam) est un instrument scientifique qui ressemble au microscope électronique à balayage (MEB). Mais là où le MEB utilise un faisceau d'électrons focalisés pour faire l'image d'un échantillon, le FIB utilise un faisceau d'ions focalisés, généralement du gallium. Cependant contrairement au MEB, l'imagerie au FIB est destructive. En effet, lorsque des ions de gallium d'énergie élevée sont projetés sur un échantillon, ils pulvérisent les atomes de la surface de l'échantillon. En même temps, les atomes de gallium sont implantés dans les premiers nanomètres de la surface de l'échantillon qui est ainsi amorphisé. C'est pourquoi le FIB est plus utilisé comme outil de micro-

fabrication pour usiner la matière à l'échelle micrométrique ou nanométrique que pour la microscopie. Pour les FIB dédiés à la micro-fabrication, il existe toujours une possibilité de visualiser l'échantillon usiné par microscopie à balayage, avec une détection d'électrons secondaires, comme dans la microscopie électronique à balayage. Ce peut être tout simplement la sonde ionique qui est utilisée pour générer les électrons secondaires émis sous l'impact des ions, on parle alors de microscopie ionique à balayage dite MIB, ou bien, la même chambre sous vide peut être dotée d'une colonne électronique ou plus généralement, la colonne FIB est montée en accessoire sur un microscope électronique à balayage (MEB). On parle alors de Dual Beam. Les axes optiques des colonnes ionique et électronique sont mécaniquement et électriquement amenés à se croiser juste au niveau de l'échantillon (Figure II.14).



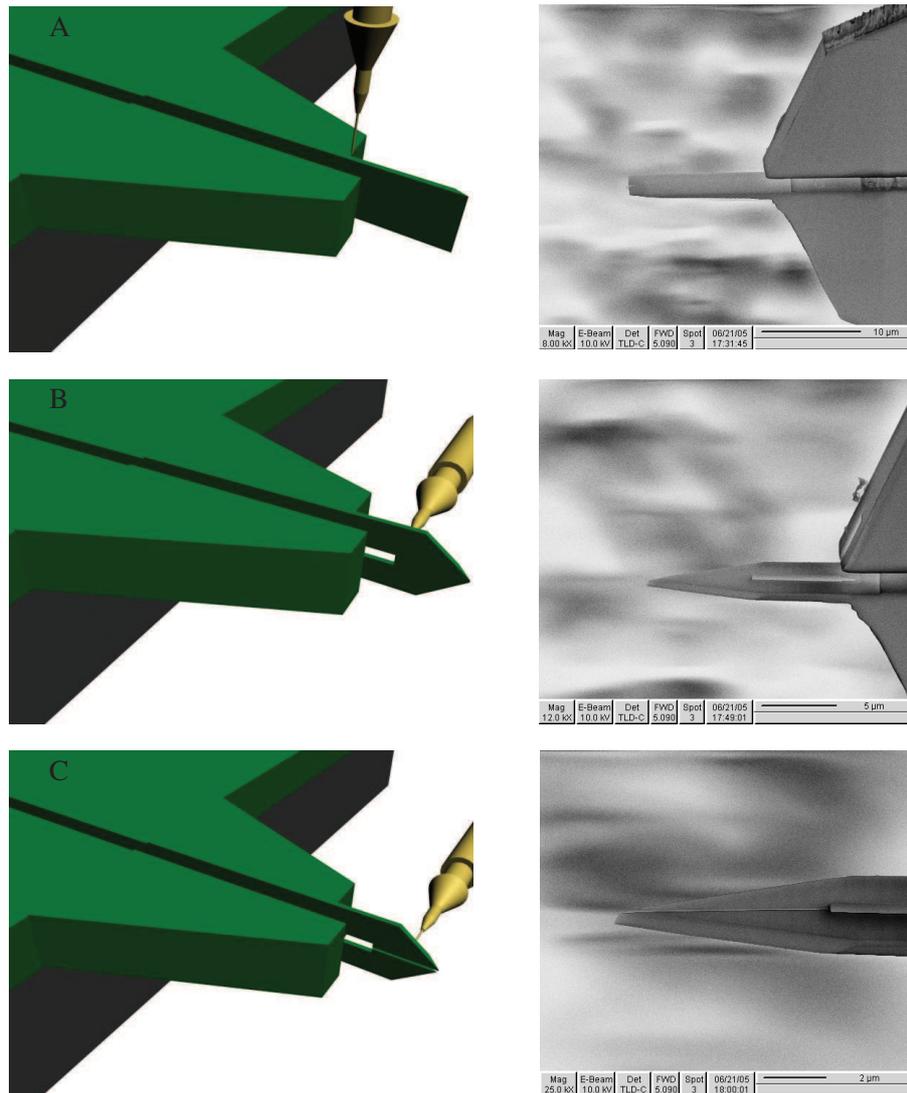
**Figure II.14 :** *Vue de l'intérieur de la chambre d'un FIB Dual Beam. La colonne électronique est verticale et la colonne ionique oblique. Le croisement des faisceaux a lieu sur l'échantillon fixé sur le porte-objet.*

Le mode d'imagerie MIB est alors destiné au réglage de tous les paramètres relatifs à l'optique ionique. Le MEB permet quant à lui d'observer les effets locaux de l'interaction ion-matière in-situ en temps réel. On peut donc localiser la région à irradier, suivre la dynamique de l'interaction, choisir le moment où l'irradiation doit être suspendue et enfin contrôler immédiatement si la modification du substrat est celle que l'on attendait. Les FIB modernes

du début du XXI<sup>ème</sup> siècle produisent facilement sur un échantillon des dizaines de nanoampères (typiquement 50nA) avec une sonde de quelques nanomètres (typiquement 7nm). A titre d'exemple, des vitesses d'érosion de l'ordre du micron cube à la minute ont été mesurées en usinant du GaAs avec un faisceau d'ions gallium normal à la cible de 20keV et de 0.2µm de diamètre, transportant un courant de 160pA.

Le faisceau d'ions focalisés a tout d'abord été utilisé pour la fabrication dans le domaine de l'électronique [Wag 86] généralement pour l'ajustement des dispositifs lorsque la résolution de la photolithographie standard par ultraviolet n'était pas suffisante (Cf. Applications du FIB en Annexes). Par la suite, cette technique a été employée pour le micro-usinage [Gam 90] de divers objets non électroniques comme des micro-engrenages [Ish 90] ou encore des sources d'électronébulisation à base de tubes capillaires [Kom 03]. Cette méthode suscite également un intérêt grandissant pour la fabrication des microsystèmes [Rey 01]. Récemment, des canaux nanofluidiques ont été réalisés en utilisant un faisceau d'ions focalisés [Can 04]. Cependant, bien que le faisceau d'ions focalisés ne soit pas applicable pour la production de masse, l'avantage est qu'il constitue un outil puissant pour le prototypage rapide des dispositifs nanométriques [Khi 04].

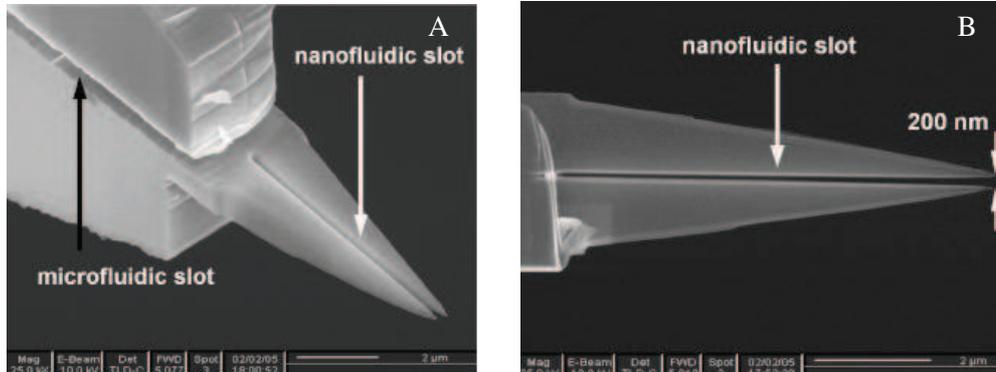
La figure II.15 montre les différentes phases de fabrication de la partie nanofluidique de la source. Tout d'abord, le dispositif constitué de la fente capillaire microfluidique est chargé dans la machine de telle sorte que le faisceau d'ions Gallium soit perpendiculaire à la surface des cantilevers triangulaires. Deux morceaux de cantilevers sont supprimés en gravant les 4µm de polysilicium ; la vitesse de gravure est estimée à 0.5µm.min<sup>-1</sup> pour un courant du faisceau d'ions de 3nA. Pour cette valeur de courant, la taille du spot est de 60nm. De cette façon, une lame mesurant 1µm x 15µm x 4µm est constituée sur l'un des deux cantilevers (Figure II.15 A). Dans ce cas, une haute résolution n'est pas nécessaire, un faisceau d'énergie élevée est donc utilisé afin d'enlever rapidement le grand volume de matière. A ce stade, le décalage de 1µm entre les deux cantilevers est défini ce qui permettra à la fente capillaire microfluidique de recouvrir la future fente nanofluidique. Cette lame est ensuite affinée à une épaisseur de 600nm en utilisant un courant plus faible afin d'avoir une meilleure résolution (50pA, vitesse de gravure de l'ordre de 0.9µm.min<sup>-1</sup>, taille du spot 15nm).



**Figure II.15 :** Schémas et images au microscope électronique à balayage des étapes de nano-fabrication au FIB : (A) Suppression de l'extrémité de l'un des deux cantilevers et affinage de l'autre cantilever afin d'obtenir une lame, (B) Usinage de la lame en forme de pointe, (C) Définition de la fente nanofluidique.

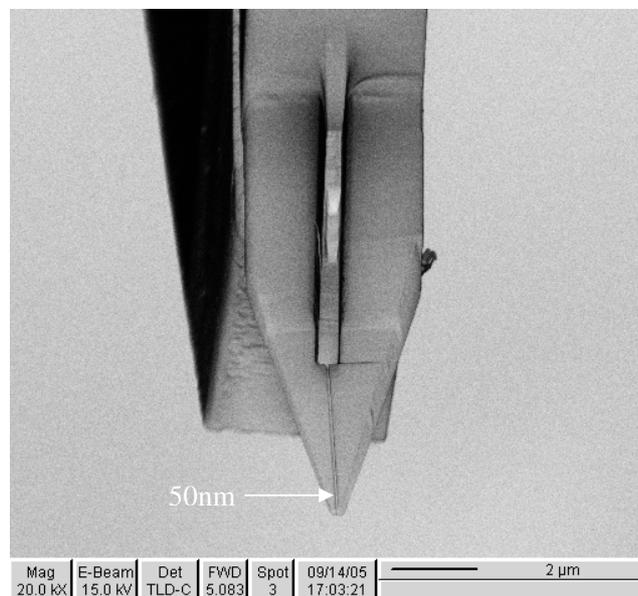
Par la suite, l'échantillon est tourné dans la machine de telle manière que le faisceau d'ions soit perpendiculaire à la lame et une pointe est définie en gravant la lame de 600nm d'épaisseur avec un courant de 50pA (Figure II.15 B). Enfin, la fente nanofluidique est réalisée avec un courant de 1pA (taille du spot 6nm) (Figure II.15 C). La Figure II.16 (A) montre une image au microscope électronique à balayage de l'extrémité de la nano-source. Les dimensions du nanocanal sont 100nm x 600nm tandis qu'à l'extrémité il a une section de 200nm x 100nm (Figure II.16 B). On voit donc que même en réduisant l'énergie des ions afin d'améliorer la résolution, le nanocanal a toujours tendance à s'élargir. Cet effet est encore

plus flagrant à plus haute énergie et est dû à la nature Gaussienne du faisceau qui a plus d'un effet sur les parties les plus fines du matériau.



**Figure II.16 :** (A) Image au microscope électronique à balayage de la nano-source. (B) Agrandissement montrant l'extrémité du dispositif [Des 05 a].

Le volume de liquide contenu dans le canal nanofluidique est plus petit que 1 femtolitre. Le canal microfluidique présente quant à lui une section de  $1 \times 4 \mu\text{m}$  et une longueur de 2mm, ce qui représente un volume de quelques picolitres. La surface de la section à l'extrémité de la source est de  $0.02 \mu\text{m}^2$ , ce qui est 200 fois plus petit que pour les micro-sources développées auparavant [Ars 05].



**Figure II.17 :** Image au microscope électronique à balayage de la plus petite nano-source usinée au FIB. L'extrémité comporte un canal nanofluidique de 50nm [Des 05 b].

La plus petite nano-source réalisée par ce procédé comporte un nano-canal de 50nm de large, ce qui constitue la dimension ultime pour la miniaturisation, la taille des protéines étant d'une dizaine de nanomètres (figure II.17).

L'inconvénient de la gravure chlorée est que sa réussite dépend très fortement de la propreté de la chambre du réacteur et du substrat, sans quoi, un phénomène de micromasquage entraîne l'apparition de silicium noir (les reliefs formés en surface par les particules parasites font que celle-ci ne réfléchit plus la lumière). C'est pourquoi un autre procédé a été développé par la suite.

## 2-2 Fabrication par gravure ionique réactive profonde (DRIE)

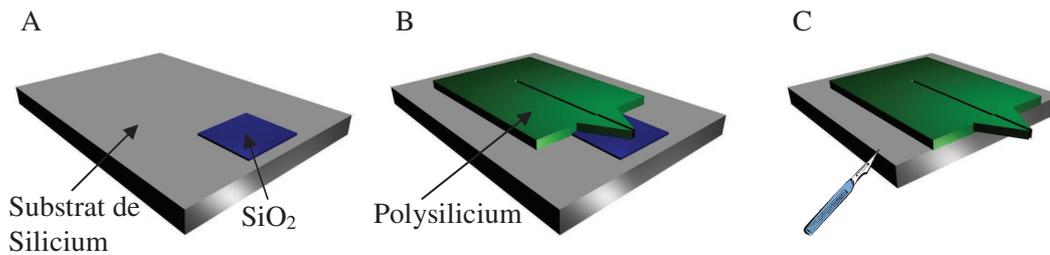
### 2-2-1 Micro-sources

Des sources microfluidiques en polysilicium ont ensuite pu être réalisées par un autre procédé grâce à l'acquisition d'un bâti de gravure profonde (Surface Technology System STS, UK) par le laboratoire (Figure II.18).



**Figure II.18** : Photographie du bâti de gravure profonde (Surface Technology System STS, UK) utilisé pour la fabrication de sources d'électronébulisation.

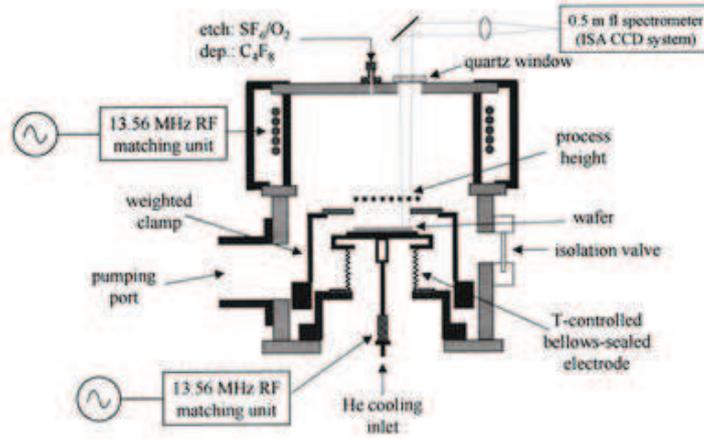
Ces micro-sources présentent une géométrie similaire à celles développées auparavant. Elles comportent deux cantilevers triangulaires définissant une fente capillaire microfluidique. La Figure II.19 montre le procédé de fabrication de ces micro-sources.



**Figure II.19** : Schémas des étapes de micro-fabrication avec le procédé Bosch (Surface Technology System STS, UK) : (A) Couche sacrificielle en SiO<sub>2</sub>, (B) source en polysilicium après gravure profonde, (C) Clivage du substrat de silicium.

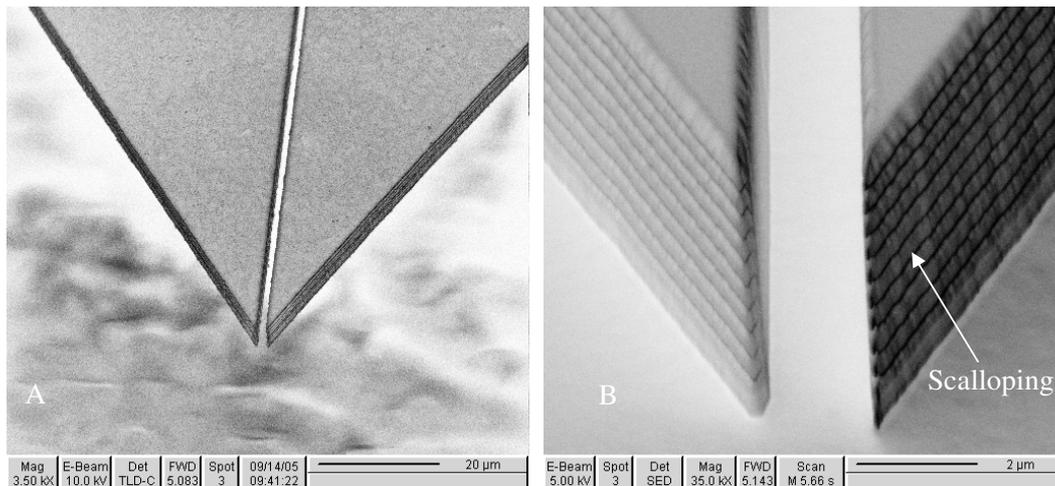
Tout d'abord, une croissance d'oxyde thermique (SiO<sub>2</sub>) de 200nm est réalisée par oxydation sèche du substrat de silicium à 1100°C. Cet oxyde est utilisé comme couche sacrificielle lors de la libération des sources du substrat de silicium (figure II.19 A). Ensuite, une couche de 5µm d'épaisseur de polysilicium non dopé est déposée sur le substrat par un procédé de dépôt en phase vapeur à basse pression (LPCVD) (figure II.19 B). La vitesse de dépôt du polysilicium est d'environ 4.7nm.min<sup>-1</sup>. Afin de minimiser les contraintes dans le polysilicium, une étape de recuit à haute température (1050°C) pendant une heure est employée [Mai 95]. La définition de la micro-source est accomplie non plus par une gravure chlorée mais en utilisant une gravure profonde. Le SF<sub>6</sub> est largement utilisé pour les gravures sèches du silicium et du polysilicium. Pour cette gravure profonde, l'isotropie est contrôlée par le procédé Bosch qui alterne des étapes de gravure avec un mélange d'hexafluorure de soufre (SF<sub>6</sub>) associé à de l'oxygène (O<sub>2</sub>) et de passivation, c'est-à-dire le dépôt d'une très fine couche de polymère à base de fluorocarbonate grâce à un plasma d'octafluorocyclobutane (C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>) qui protège les flancs pendant la gravure. D'où l'apparition de petites marches sur les flancs appelées scalloping (Figure II.21 B). On obtient toutefois de cette manière une gravure anisotropique qui permet d'avoir des flancs quasi verticaux [Lär 92] [Ash 00] [STS]. Pendant la gravure le substrat est refroidi par un flux d'Hélium (Figure II.20). La vitesse de gravure du polysilicium est estimée à 90nm.s<sup>-1</sup>. Pour terminer, la couche sacrificielle est éliminée par gravure humide dans une solution d'acide fluorhydrique (HF/H<sub>2</sub>O :50/50). Le substrat est

ensuite rincé à l'eau désionisée et clivé sans être séché afin d'éviter les problèmes de stiction lors de la libération de l'extrémité des sources du substrat de silicium (Figure II.19 C).



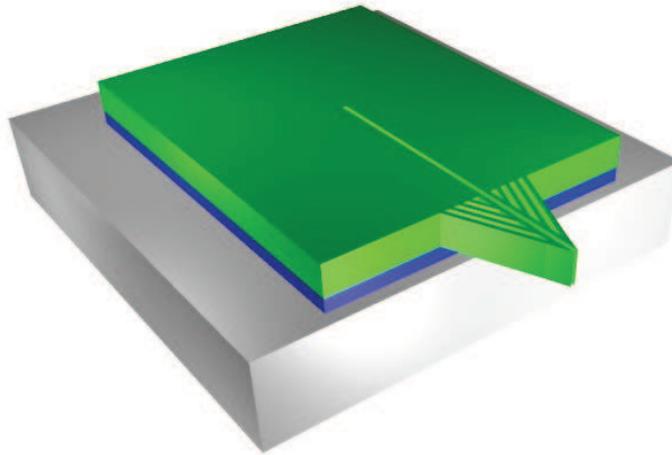
**Figure II.20 :** Réacteur du bâti de gravure profonde (Surface Technology System STS, UK) utilisé pour la fabrication de sources d'électronébulisation.

La Figure II.21 montre une image au microscope électronique à balayage d'une micro-source typiquement obtenue en utilisant cette technologie. Le dispositif comporte un canal microfluidique de section  $1.5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ . La longueur des cantilevers de forme triangulaire libérés est d'environ  $500\mu\text{m}$ .



**Figure II.21 :** (A) Image au microscope électronique à balayage d'une micro-source réalisée par le procédé Bosch. (B) Zoom sur l'extrémité de la source avant libération. La section a pour dimensions  $1.5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ .

Bien qu'il permette de fabriquer des micro-sources adaptées et de réduire le temps de gravure du polysilicium d'un facteur 49 ( $90\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$  au lieu de  $110\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ ), ce procédé présente toujours un inconvénient. Le temps de libération des dispositifs dans la solution d'acide fluorhydrique est relativement long (4 heures). Une autre géométrie a donc été développée afin de faciliter la libération du dispositif. Il s'agit de diminuer la surface de polysilicium sous laquelle l'acide fluorhydrique doit pénétrer en remplaçant les cantilevers solides par des cantilevers constitués de bras (Figure II.22).



**Figure II.22 :** *Vue schématique d'une micro-source d'électronébulisation dont les cantilevers sont constitués de bras afin de faciliter la libération du dispositif.*

Cette micro-source est toujours constituée d'une simple fente capillaire de hauteur  $h$ , de largeur  $w$  et de longueur  $L$ . Les dimensions approximatives de la puce sont de  $5\text{mm} \times 1\text{cm}$ , les cantilevers triangulaires dépassent du bord de la puce de  $1.5\text{mm}$ . Les règles de conception des microsystèmes et de la microfluidique ont été couplées afin d'assurer la rigidité des structures en tenant compte des forces capillaires générées par l'introduction d'un liquide. Comme vu précédemment, le liquide test contenant les biomolécules remplit spontanément la fente capillaire en mouillant progressivement ses parois sur toute sa longueur si certaines dimensions sont respectées [Ars 06], c'est-à-dire le ratio  $w/h$  doit être inférieur au cosinus de l'angle de contact que le liquide forme avec les parois de la fente microfluidique. Les dimensions de la fente capillaire étant  $w=1\mu\text{m}$  de large et  $h=5\mu\text{m}$  de haut, l'angle de contact du liquide doit être inférieur à  $78^\circ$ . Les micro-sources précédentes étaient constituées de deux

cantilevers triangulaires monoblocs déposés sur un bloc de dioxyde de silicium structuré par photolithographie et gravure humide. Ici, l'optimisation du procédé de fabrication par l'emploi de la technologie silicium sur isolant (SOI) nécessite l'utilisation de cantilevers triangulaires constitués de bras afin de réduire le temps de fabrication (Figure II.22). L'incorporation de ces bras implique que la rigidité des cantilevers doit être assurée en appliquant les principes de conception des MEMS.

Les dimensions microscopiques de la fente microfluidique font que les forces de surface seront plus importantes que les forces volumiques [Isr 91] [Cap 99]. Lorsqu'un ménisque de liquide se forme entre deux parties mobiles, les forces capillaires peuvent être suffisamment importantes pour attirer et coller ces parties ensemble, ce phénomène connu sous le nom de stiction est souvent irréversible. Il a été largement étudié [Mab 97] [Van 02] [Van 03] [Ali 04] et bien que certains l'ont utilisé de manière avantageuse afin de verrouiller des microstructures [Aga 01], dans la plupart des cas la stiction doit être évitée au cours de la fabrication et du fonctionnement des MEMS [Mul 93] [Lee 97]. Dans le cas des micro-sources, on s'attend à ce que les forces capillaires agissent sur la fente microfluidique durant son utilisation. Les cantilevers consistent en des poutres de largeur réduite de façon à assurer la libération par gravure en un temps minimal de l'ordre de quelques minutes et par conséquent réduire le coût de production. C'est pourquoi une attention toute particulière doit être apportée à la conception de ces micro-structures. Un compromis est nécessaire afin d'assurer à la fois un temps de libération court et une raideur suffisante de la structure constituée par ces poutres. L'objectif de la conception mécanique du dispositif est (i) d'assurer la rigidité des cantilevers et (ii) d'éviter lors de l'introduction d'un liquide toute variation de la largeur de la fente ou plus important encore la stiction de la fente microfluidique qui rendrait la micro-source inutilisable.

La force capillaire agissant sur les parois de la fente microfluidique est calculée en utilisant la pression capillaire qui est donnée par l'équation de Young-Laplace [De G 03]:

$$P_{cap} = 2\gamma \cos \theta_c / (w - \Delta w) \quad (5)$$

où  $\gamma$  est la tension de surface du liquide,  $\theta_c$  l'angle de contact que le liquide fait avec les parois de la fente,  $w$  la largeur initiale de la fente et  $\Delta w$  la variation de la largeur de la fente due à l'effet des forces capillaires. On peut supposer que le mouillage est quasi-total. En effet, la

valeur de  $\theta_c$  pour différents mélanges d'eau et de méthanol couramment employés en spectrométrie de masse a été mesurée (Table II.1).

**Table II.1** : Valeurs mesurées de l'angle de contact de divers mélanges méthanol-eau sur du polysilicium [Leg 07].

MeOH:H <sub>2</sub> O	Wetting contact angle ( $\theta_c$ ) $\pm$ 5°	
	Polysilicon as-grown <sup>a</sup>	Polysilicon HF clean <sup>b</sup>
vol:vol 0:100	30°	55°
10:90	19°	48°
20:80	14°	44°
30:70	10°	37°
40:60	7°	30°
50:50	5°	26°

<sup>a</sup> 5  $\mu$ m thick as-grown LPCVD polysilicon stored in a cleanroom environment for 1 week following deposition.

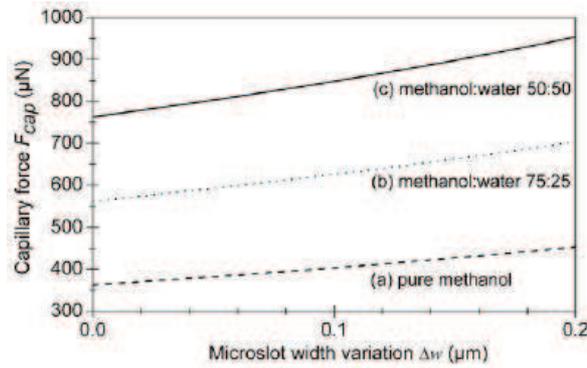
<sup>b</sup> Directly following an HF acid (50%)-based clean.

D'après ces mesures, on voit que pour une concentration en méthanol supérieure à 20%, l'angle de contact sur le polysilicium est inférieur à 15°. Les mesures ont été effectuées par un Digidrop (EWS, GBX, France).

La force agissant sur les parois de la fente microfluidique est donnée par l'équation suivante :

$$F_{cap} = P_{cap} A \approx 2\gamma A / (w - \Delta w) \quad (6)$$

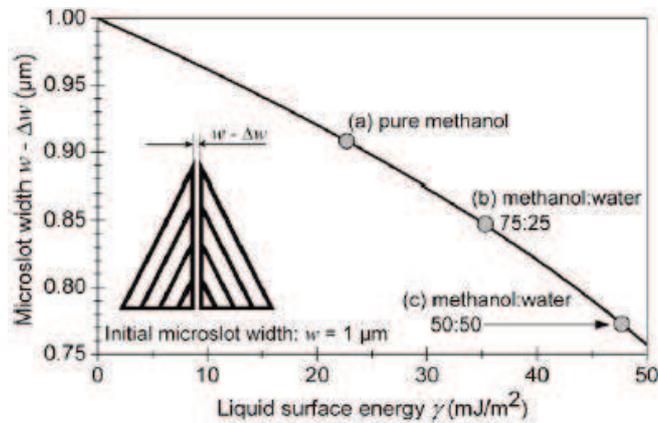
où  $A$  est la surface de la fente microfluidique en contact avec le liquide. La fente microfluidique étant parfaitement symétrique, le déplacement de chacun des côtés est égal à  $\Delta w/2$ . La longueur de la fente microfluidique étant de 1600 $\mu$ m et l'épaisseur de la couche structurelle de silicium étant de 5 $\mu$ m, la surface  $A$  est de 8000 $\mu$ m<sup>2</sup>. Initialement la fente microfluidique a une largeur de 1 $\mu$ m. La Figure II.23 montre la valeur de la force capillaire s'exerçant sur une paroi de la fente microfluidique, pour des liquides ayant différentes valeurs de tension de surface [De G 03].



**Figure II.23 :** Force capillaire s'exerçant sur un côté de la fente microfluidique en fonction de la variation de la largeur de la fente  $\Delta w$  calculée à partir de l'équation (6). La longueur de la fente est de  $1600\mu\text{m}$  et son épaisseur  $5\mu\text{m}$  et sa largeur initiale  $1\mu\text{m}$ . (a) Force lorsque la fente est remplie avec du méthanol ( $\gamma=22.7\text{mJ.m}^{-2}$ ). (b) Force lorsque la fente est remplie avec un mélange méthanol/eau : 75/25 ( $\gamma=35.2\text{mJ.m}^{-2}$ ). Force lorsque la fente est remplie avec un mélange méthanol/eau : 50/50 ( $\gamma=47.7\text{mJ.m}^{-2}$ ) [Leg 07].

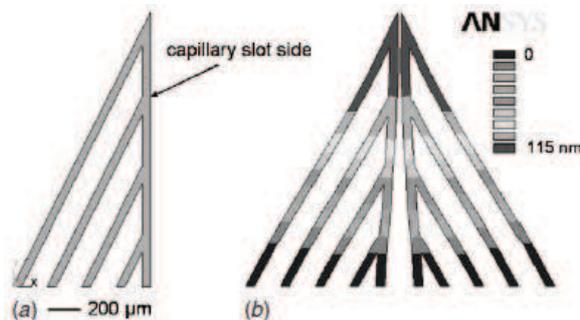
On voit que la force capillaire est typiquement de l'ordre de 0.3 à 1mN. L'évaluation de cette force capillaire est le point de départ de la conception de la micro-source. De plus, afin d'éviter la stiction et d'obtenir une variation minimale de la largeur de la fente, la force de restitution mécanique de la structure doit être supérieure à la force capillaire agissant sur les parois de la fente microfluidique lors de l'alimentation par un liquide. En d'autres mots, la raideur des poutres de suspension doit être suffisamment élevée afin de générer une force de restitution mécanique supérieure à la force capillaire dès qu'une variation de la largeur de la fente microfluidique est engendrée par la présence d'un liquide. La variation de largeur de la fente tolérée a été fixée à 25% de sa valeur initiale, c'est-à-dire 250nm. La Figure II.23 montre que la force capillaire agissant sur la fente est inférieure à 1mN pour les liquides considérés. Ainsi, la force de restitution mécanique de la structure doit être de l'ordre de 1mN pour un déplacement d'une paroi de la fente capillaire  $\Delta w/2$  de 125nm afin d'être supérieure à la force capillaire. La constante de raideur des poutres de suspension doit donc être de l'ordre de  $8\text{kN.m}^{-1}$ . Dans ces conditions, la stiction de la structure ne sera pas possible lors du remplissage de la fente microfluidique par un liquide. Un équilibre mécanique sera atteint conduisant à une variation de la largeur de la fente inférieure à 25%. La largeur des poutres de la structure a été fixée à  $50\mu\text{m}$ , ce qui apparaît comme un bon compromis pour un procédé de fabrication optimisé impliquant un temps de libération minimal par gravure. Un calcul analytique direct afin d'évaluer la constante de raideur de la structure n'étant pas simple, une méthode de calcul par éléments finis (FEM) a été employée afin de déterminer le

comportement mécanique de la structure. ANSYS<sup>TM</sup> a été utilisé afin d'obtenir la déformation de la micro-structure lorsqu'une pression est appliquée sur les parois de la fente microfluidique. La constante de raideur de la micro-structure est extraite à partir de ces données. Concernant les propriétés du silicium polycristallin, le coefficient de Poisson et le module d'Young sont respectivement de 0.28 et 170GPa. De nombreuses configurations de la micro-structure ont été testées en faisant varier le nombre de poutres ou bras. La Figure II.24 montre la structure à 4 bras retenue qui répond aux spécifications.



**Figure II.24 :** Largeur de la fente microfluidique en fonction de l'énergie de surface du liquide alimentant la source. La courbe est obtenue à partir de l'équilibre entre la force capillaire calculée à partir de l'équation (6) et la force de restitution mécanique calculée à partir des simulations par éléments finis [Leg 07].

Lorsqu'une force de 1mN est appliquée à la paroi de la fente microfluidique, ce qui correspond à une pression de 0.125MPa, la valeur maximale du déplacement d'un côté de la fente est de 115nm soit une variation de largeur de 230nm comme montrée sur la Figure II.25.



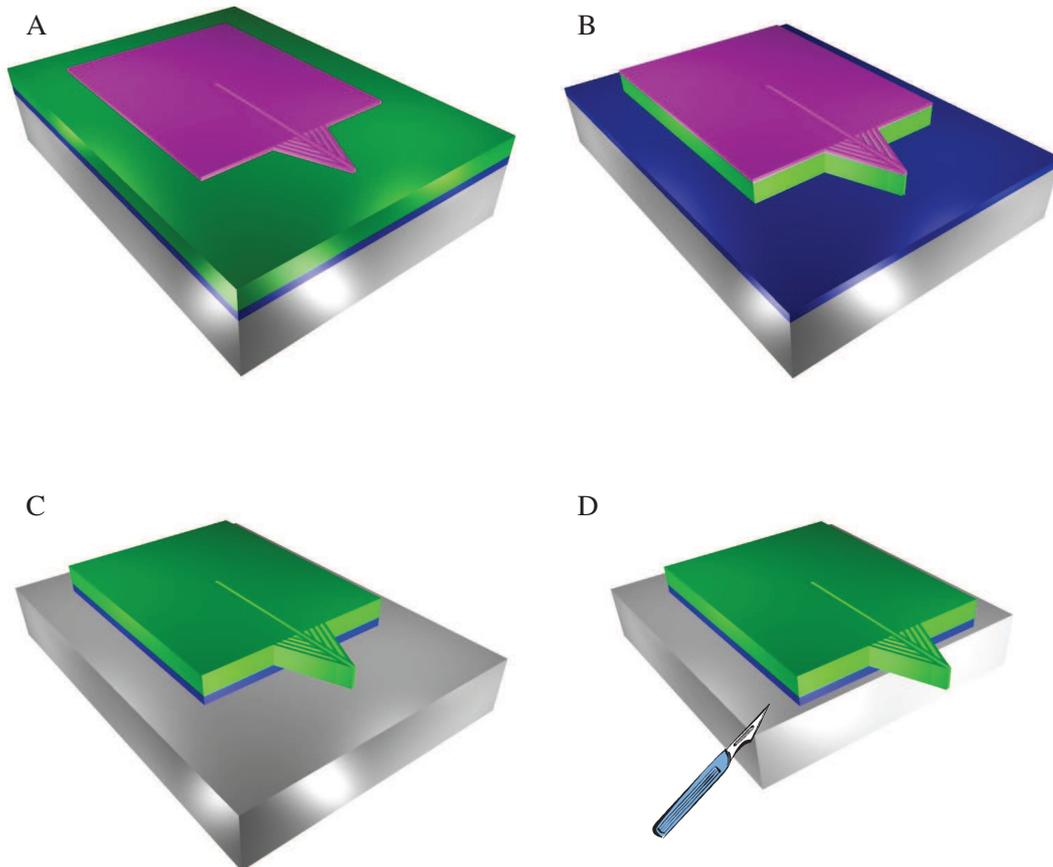
**Figure II.25 :** (a) Géométrie de la micro-source utilisée pour la modélisation avec ANSYS<sup>TM</sup>. La source étant symétrique seule la moitié du dispositif est représentée. (b) Déformation pour une pression de 0.125MPa appliquée sur le côté de la fente capillaire. L'amplitude de la déformation a été exagérée pour une meilleure visualisation [Leg 07].

La largeur de la fente microfluidique ne varie donc pas de plus de 25% (250nm) comme attendu. Ces valeurs permettent de déterminer la valeur de la constante de raideur de la micro-structure qui est de l'ordre de  $8.7\text{kN.m}^{-1}$ , répondant ainsi aux spécifications. Ces résultats supposent que les parois de la fente se déplacent parallèlement afin de calculer la force capillaire. Les simulations par éléments finis avec ANSYS<sup>TM</sup> montrent que le déplacement de la paroi de la fente microfluidique n'est pas uniforme (Figure II.25 (b)) et que la fente microfluidique se déforme continuellement sous l'effet de la force capillaire. Par conséquent, la variation de la largeur de la fente microfluidique est légèrement surestimée.

Ces micro-sources sont fabriquées en utilisant la technologie silicium sur isolant (SOI). Les substrats SOI deviennent populaires pour la fabrication des MEMS. Ces substrats ont été fabriqués à l'IEMN. Tout d'abord une croissance d'oxyde thermique de  $1\mu\text{m}$  est réalisée par LPCVD sur un substrat de silicium 3 pouces. Ensuite, une couche de  $5\mu\text{m}$  de polysilicium non dopé est déposée sur l'oxyde par décomposition du silane ( $\text{SiH}_4$ ). Enfin, afin de minimiser les contraintes internes un recuit haute température est réalisé.

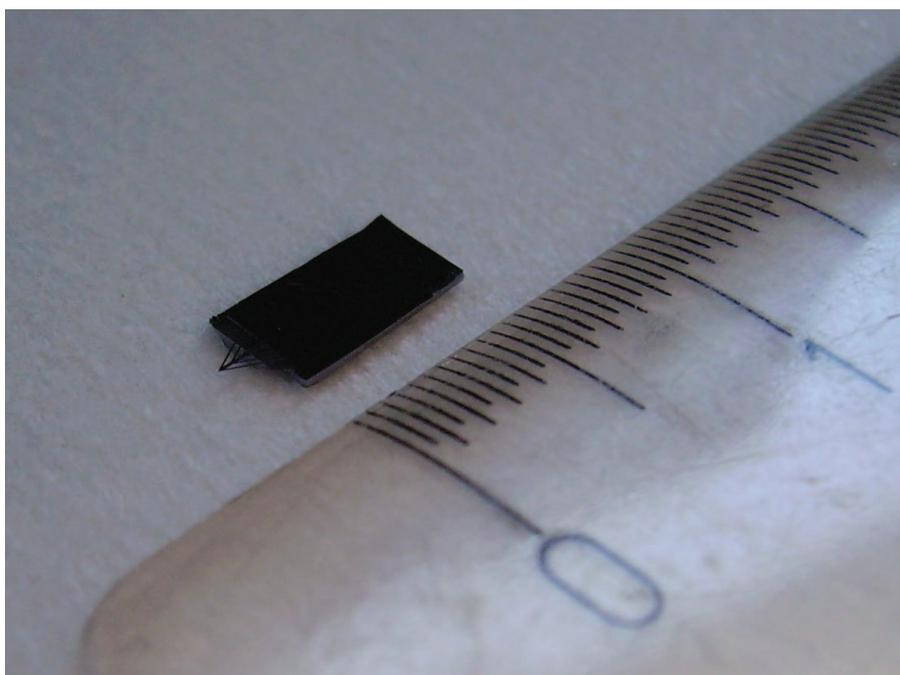
Le procédé de fabrication optimisé ne nécessite que quatre étapes : photolithographie, gravure sèche, gravure humide et découpage comme montré sur la Figure II.26. Pour commencer une couche de résine photosensible (S1805, Shipley Microposit, UK) est déposée sur la surface de polysilicium. Cette résine est structurée par photolithographie en utilisant un masque optique (Figure II.26 A). Les micro-sources sont définies dans la couche de  $5\mu\text{m}$  de polysilicium en employant un procédé de gravure de silicium avancé (ASE<sup>TM</sup>) [Mc A 01] [Lär 92] basé sur un cycle de gravure à l'hexafluorure de soufre ( $\text{SF}_6$ ) et un cycle de passivation à l'octafluorocyclobutane ( $\text{C}_4\text{F}_8$ ). Ce procédé est réalisé dans un bâti de gravure profonde (DRIE : Deep Reactive Ion Etching) par un plasma à couplage inductif (ICP) conçu par la société Surface Technology Systems (STS, UK). Le procédé de gravure profonde est sélectif vis-à-vis du dioxyde de silicium et s'arrête une fois que le polysilicium est gravé et que l'oxyde du substrat SOI est apparent (Figure II.26 B). Après dérésinage, les cantilevers triangulaires sont libérés de la surface du substrat SOI en sous-gravant la couche d'oxyde sous les bras qui constituent le dispositif (Figure II.26 C). Cette étape de libération est réalisée par gravure humide à l'acide fluorhydrique ( $\text{HF}/\text{H}_2\text{O}$  : 50/50) qui montre une très grande sélectivité entre le polysilicium et l'oxyde [Buh 97]. L'ajout de ces ouvertures par rapport aux procédés précédents permet une réduction importante du temps de sous-gravure nécessaire afin de libérer les cantilevers de la surface du substrat. L'étape de libération est terminée au bout de 15min, c'est-à-dire plus de dix fois plus vite que pour les procédés précédents avec

des cantilevers monoblocs. La vitesse de sous-gravure de l'oxyde est estimée à  $28\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Après un rinçage à l'eau désionisée, les cantilevers sont rendus libres en clivant simplement le substrat de silicium suivant les plans (1 0 0) avant de les sécher (Figure II.26 D).



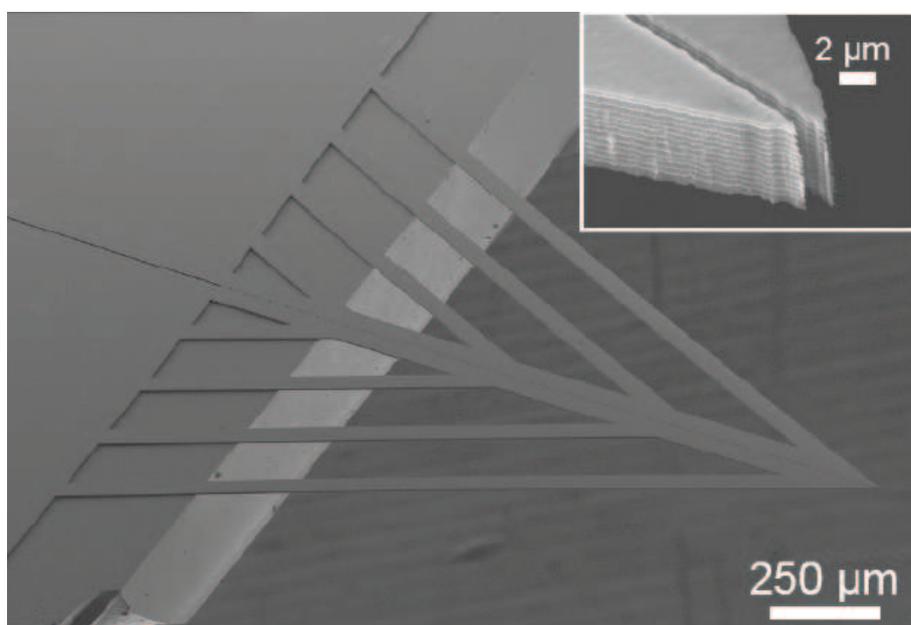
**Figure II.26 :** Schémas des étapes de micro-fabrication : (A) Photolithographie, (B) Définition de la micro-source par gravure profonde, (C) Libération par gravure humide du  $\text{SiO}_2$  dans le HF, (D) Clivage du substrat au scalpel.

La Figure II.27 montre une photographie d'une micro-source réalisée par ce procédé optimisé.



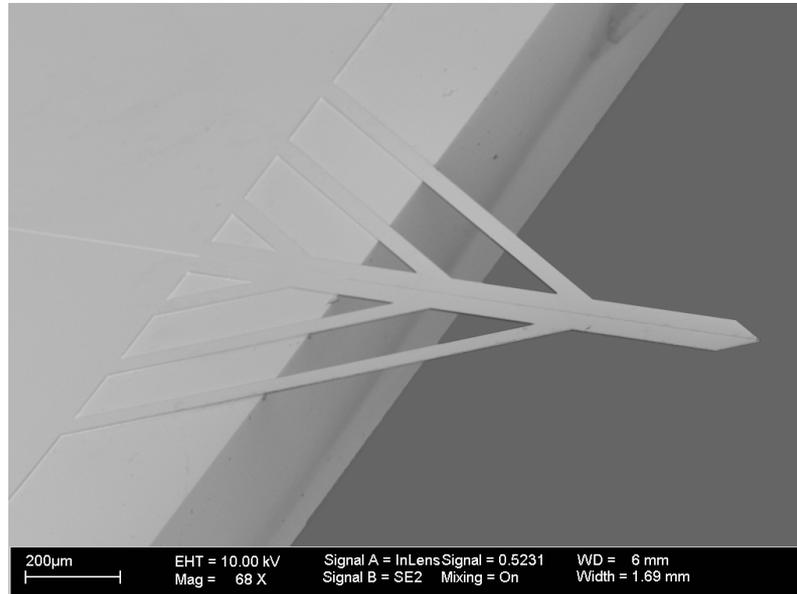
**Figure II.27 :** Photographie de la micro-source à 4 bras.

La Figure II.28 montre une image au microscope électronique à balayage de cette micro-source.



**Figure II.28 :** Image au microscope électronique à balayage de la micro-source à 4 bras. L'encart montre un zoom de l'extrémité.

Sur le même principe, des micro-sources ne comportant que 3 bras, 2 bras ou 0 bras ont également été fabriquées. La Figure II.29 présente par exemple une micro-source à 3 bras.

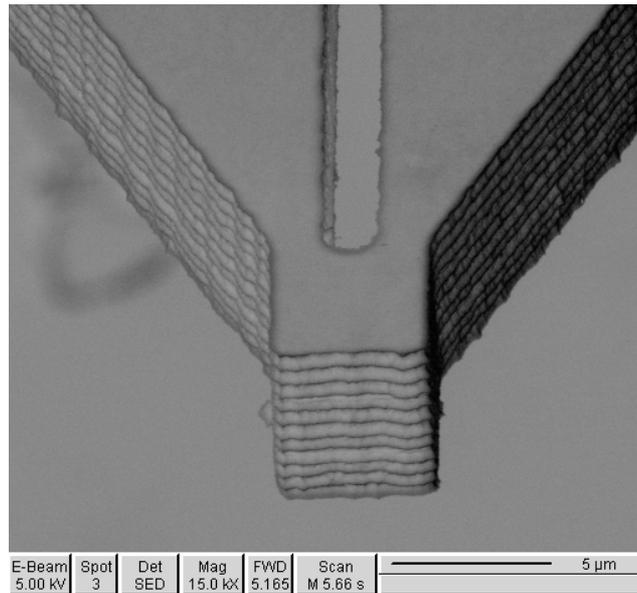


**Figure II.29 :** Image au microscope électronique à balayage d'une micro-source à 3 bras.

Ainsi, ce procédé permet une production de masse peu coûteuse de sources d'électronébulisation micro-usinées.

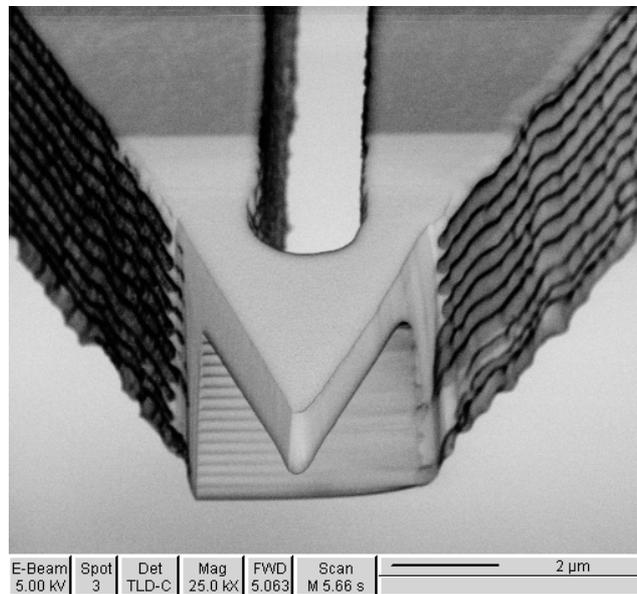
### 2-2-2 Nano-sources

A partir des travaux sur les micro-sources d'électronébulisation précédentes, un faisceau d'ions focalisés (FIB) a de nouveau été employé afin de réduire les dimensions de la fente capillaire pour fabriquer des nano-sources. La fabrication de ces nano-sources se fait aussi sur un substrat SOI et repose exactement sur le même procédé de fabrication que les micro-sources précédentes à savoir une photolithographie, une gravure profonde pour définir la source et le micro-canal, une gravure humide à l'acide fluorhydrique pour libérer les structures et le découpage par clivage du substrat. La seule chose qui diffère est l'extrémité de la source qui est constituée par un bloc de polysilicium de  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  destiné à être usiné par faisceau d'ions focalisés afin de réaliser le nano-canal. La Figure II.30 montre une image au microscope électronique à balayage de la source juste avant l'usinage au FIB.



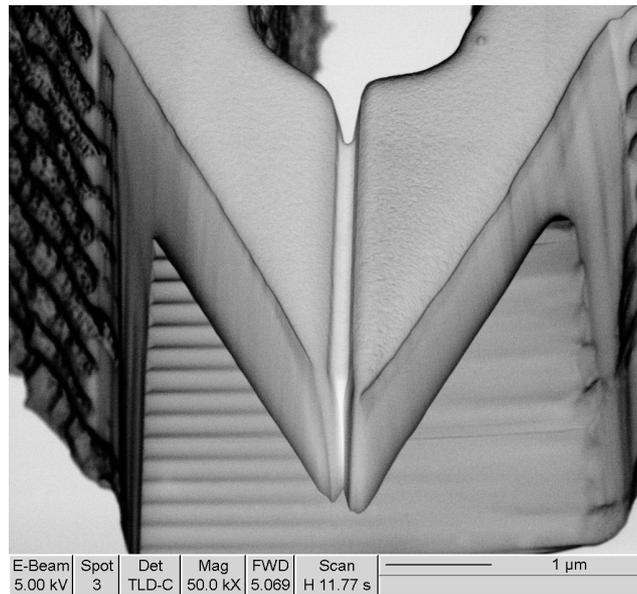
**Figure II.30 :** Image au microscope électronique à balayage d'une nano-source juste avant l'usinage au FIB du bloc de polysilicium de  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ .

Une fois introduite dans le FIB, le bloc de polysilicium est usiné en forme de pointe (Figure II.31).



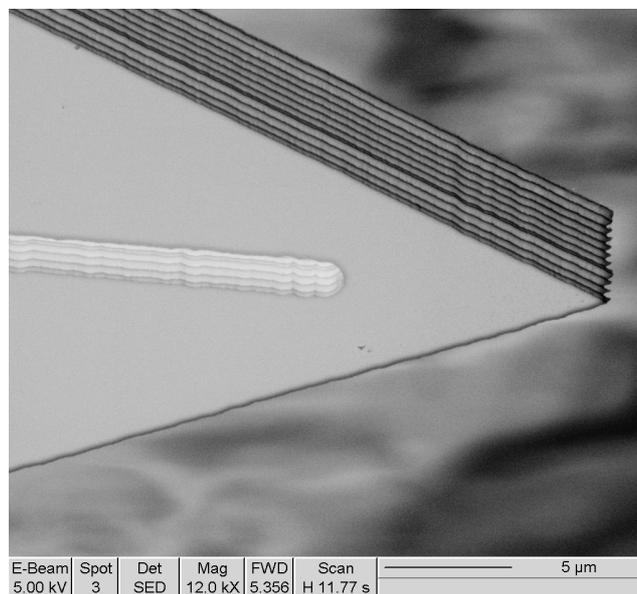
**Figure II.31 :** Image au microscope électronique à balayage de l'extrémité d'une nano-source après l'usinage au FIB du bloc de polysilicium de  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  en forme de pointe.

Enfin, le nano-canal est défini de la fente capillaire microfluidique jusqu'à l'extrémité de la pointe (Figure II.32).



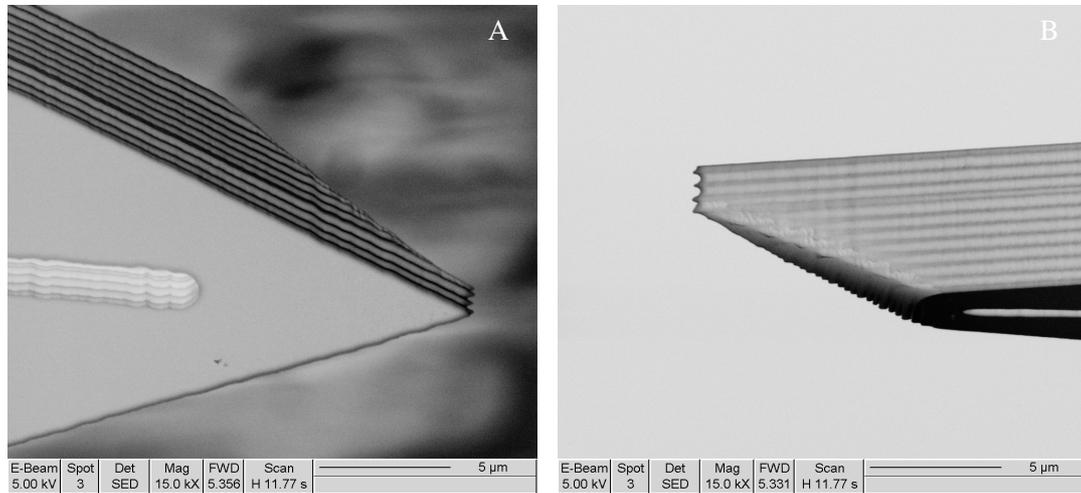
**Figure II.32 :** Image au microscope électronique à balayage de l'extrémité d'une nano-source après l'usinage au FIB du nano-canal de 160nm de large.

L'inconvénient de ce type de topologie est qu'il n'est pas évident de centrer la pointe par rapport au micro-canal. Une modification du masque a donc été apportée de manière à ce que la pointe soit définie directement lors de la gravure profonde (Figure II.33).

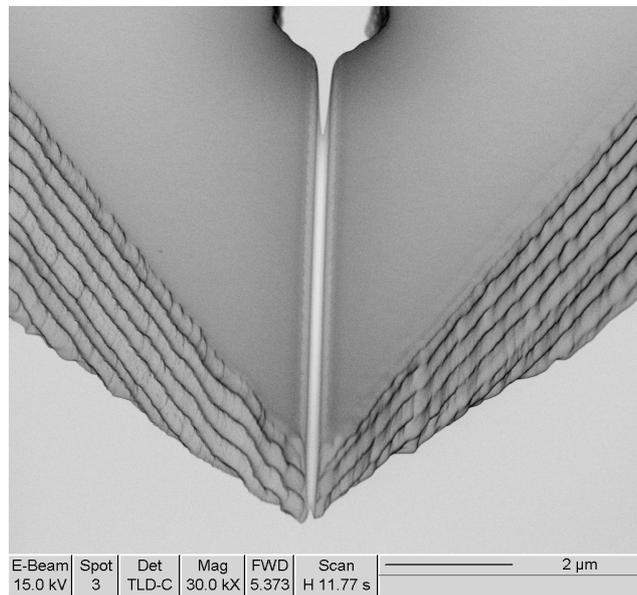


**Figure II.33 :** Image au microscope électronique à balayage de l'extrémité d'une future nano-source. La pointe est définie directement par gravure profonde.

Ainsi, il ne reste plus qu'à usiner au FIB l'extrémité en forme de biseau (Figure II.34) puis à définir le nano-canal (Figure II.35).



**Figure II.34 :** Images au microscope électronique à balayage de l'extrémité d'une future nano-source. La pointe est usinée au FIB en forme de biseau. (A) Vue face avant, (B) Vue de profil.



**Figure II.35 :** Image au microscope électronique à balayage de l'extrémité d'une nano-source après définition au FIB du nano-canal de 200nm de large.

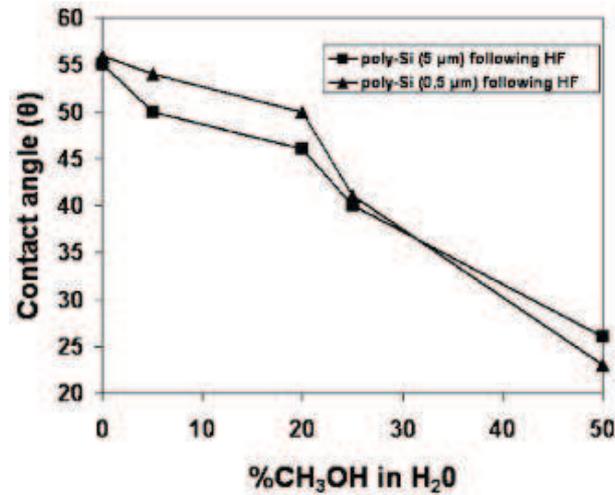
De nombreuses voies technologiques ont été explorées afin de fabriquer des micro et nano-sources d'électronébulisation. Cependant chacune d'elles a ses avantages et ses inconvénients. Compte tenu de l'épaisseur de polysilicium à graver, de la sensibilité à la propreté de la chambre du réacteur et du temps de gravure, la gravure chlorée a été abandonnée au profit de la gravure profonde. Toutefois, si toutes les précautions sont prises, elle reste une approche intéressante pour des faibles épaisseurs de polysilicium car elle permet de faire des gravures anisotropes de qualité. L'avantage indéniable de la gravure profonde est la rapidité du procédé pour graver des épaisseurs importantes de polysilicium. Par contre, comme on l'a vu précédemment, lors de la fabrication, l'alternance des cycles de passivation et de gravure entraîne un scalloping et laisse un dépôt de polymère sur les parois des fentes. Ceci peut être évité en utilisant un procédé de gravure non switché qui fait l'objet de développements dans le cadre d'une autre thèse dans notre équipe visant à fabriquer une sonde AFM exploitant un micro-résonateur.

## Conclusion

Des micro et nano-sources intégrables présentant des topologies originales et variées basées sur l'idée d'une fente capillaire ont été fabriquées. Dans tous les cas, ces sources sont constituées de deux cantilevers triangulaires parallèles formant une fente capable de se remplir d'un liquide par force capillaire. Ces cantilevers sont en polysilicium faiblement contraint déposé par les techniques LPCVD et fabriqués par lithographie et gravure ionique réactive chlorée ou gravure profonde avec le procédé Bosch. Dans un premier temps monoblocs, ces cantilevers ont par la suite été constitués de bras afin de faciliter la libération des structures. Le procédé de fabrication sur substrat SOI ne nécessite que 4 étapes : (i) une photolithographie sans alignement, (ii) une gravure sèche, (iii) une gravure humide et (iv) un découpage. De cette manière, le temps de fabrication a été optimisé de manière considérable de différentes façons : (i) des substrats SOI commerciaux peuvent être utilisés, (ii) les étapes ont été simplifiées, (iii) la durée des étapes de gravure a été minimisée (le temps de gravure sèche est réduit d'un facteur 40 et le temps de gravure humide d'un facteur 10). Après élimination de la couche sacrificielle et clivage, les cantilevers sont extrêmement planaires et dépassent de plusieurs centaines de microns (100 à 1600 $\mu\text{m}$ ) du bord du substrat de silicium.

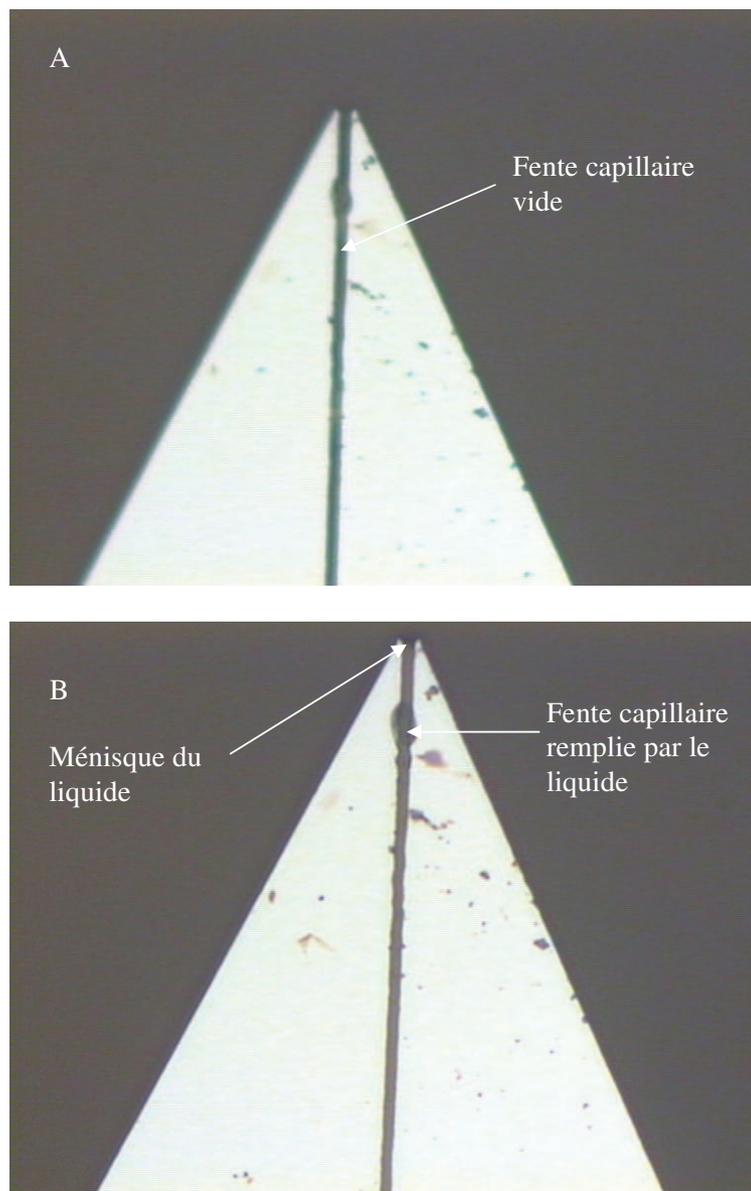
Par rapport aux micro-sources, les nano-sources ne nécessitent qu'une étape supplémentaire par une approche top-down mettant en œuvre les techniques d'usinage par faisceau d'ions focalisés afin de définir le nano-canal et la géométrie de l'extrémité de la source. Les possibilités de nano-fabrication afin de produire des fentes capillaires très étroites (~50nm) ont été démontrées en utilisant cette méthode. Les sources à métal liquide ont donc donné naissance à une nouvelle technologie pour la micro-fabrication : les sondes ioniques focalisées constituent un véritable outil d'usinage sub-micronique. Cependant, à cause de sa lenteur relative, il est difficile d'imaginer que cette filière à faisceaux d'ions focalisés, sans masque, puisse un jour se substituer radicalement à la filière classique au niveau des applications industrielles, pour lesquelles une production de masse et la réduction des coûts sont les paramètres essentiels. En effet, au temps requis pour les étapes de photolithographies et gravures classiques, il faut ajouter jusqu'à 3 heures par composant pour la partie réalisée au FIB. De plus, cette étape nécessite l'intervention d'un opérateur très habile, les dimensions sont difficilement contrôlables et il n'est pas possible d'obtenir deux sources strictement identiques. Cependant, la faculté de réaliser rapidement des prototypes, les possibilités d'intervention à une phase quelconque de la filière technologique, la facilité de réalisation de composants spéciaux, ou personnalisés, font des faisceaux d'ions focalisés un outil d'intervention irremplaçable. Toutefois, comme on le verra en perspectives, dans le cadre d'une production de masse le FIB peut-être remplacé par une approche mettant en œuvre un masqueur électronique.

Enfin, nous avons vu que les dimensions de la fente de la source et que la composition du liquide test déterminent l'absorption du liquide dans la fente capillaire. Des tests microfluidiques ont été réalisés afin d'évaluer le remplissage de la fente capillaire par un liquide test. L'absorption spontanée du liquide test dans la fente capillaire est déterminée uniquement par les dimensions de celle-ci ( $w$  et  $h$ ) et l'angle de contact statique ( $\theta$ ) de la solution sur les parois de la fente. La figure II.36 montre les angles de contact ( $\theta$ ) mesurés pour différentes solutions sur une surface de polysilicium déposé par LPCVD.



**Figure II.36 :** Angle de contact de différentes solutions eau/méthanol/acide formique sur le polysilicium LPCVD.

La solution et les concentrations choisies sont celles qui sont couramment employées lors des analyses en spectrométrie de masse. Ces solutions sont préparées en mélangeant de l'eau désionisée, du méthanol (CH<sub>3</sub>OH) et de l'acide formique (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La proportion d'eau par rapport au méthanol évolue de 100% à 50% par contre le pourcentage d'acide formique est maintenu constant à 0.1%. Les angles de contact sont mesurés par dépôt automatique d'une gouttelette de volume fixe (0.5μL) sur la surface de polysilicium grâce à un DigiDrop (EWS, GBX, Lyon, France). Afin d'évaluer l'influence de l'épaisseur de la couche de polysilicium, les mesures ont été faites sur une couche de 0.5μm et une autre de 5μm après les avoir nettoyées à l'acide fluorhydrique (HF/H<sub>2</sub>O : 50/50) pendant 1 minute. L'angle de contact varie de 55° à 25° lorsque la concentration en eau est réduite de 100% à 50%. L'épaisseur de la couche a finalement un effet peu important sur l'angle de contact (<5°). Avec un rapport d'aspect de 4, la fente se remplit spontanément quelque soit la composition du mélange. La figure II.37 montre une photo au microscope optique d'une micro-source avant et après remplissage spontané.



**Figure II.37 :** Photographies au microscope optique d'une micro-source : (A) Avant remplissage par un liquide, (B) Après remplissage spontané par un mélange eau/méthanol : 50/50.

Toutefois, l'observation du remplissage spontané est simple si au moins deux des dimensions du dispositif sont de l'ordre du micron, comme dans le cas des micro-sources. Par contre, cette observation devient beaucoup plus difficile voire impossible lorsque la largeur et la hauteur du canal sont de l'ordre du nanomètre alors que la longueur est de quelques microns. En effet, l'observation microscopique d'un ménisque de liquide peut être réalisée

tant que la longueur et la largeur sont de grandes dimensions devant la hauteur, c'est-à-dire pour une hauteur d'une dizaine de nanomètres, une largeur de quelques microns et une longueur de l'ordre du millimètre [Tas 04]. Les sources nanofluidiques ne remplissent pas du tout ces conditions puisque la largeur et la hauteur ont toutes les deux des dimensions nanométriques. Le seul moyen de savoir si elles sont fonctionnelles est de passer par d'autres méthodes de caractérisation qui font l'objet du chapitre suivant.

## Références bibliographiques

V. Agache, E. Quévy, D. Collard and L. Buchaillot, "Stiction-controlled locking system for three-dimensional self-assembled microstructures: theory and experimental validation", *Appl. Phys. Lett.*, vol. 79, pp.3869-3871, 2001.

S. M. Ali, J. M. Jennings and L. M. Phinney, "Temperature dependence for in-use stiction of polycrystalline silicon MEMS cantilevers", *Sensors Actuators A*, vol. 113, pp.60-70, 2004.

S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier and C. Rolando, *Sens. Actuators B*, vol. 98, pp. 140-147, 2004.

S. Arscott, S. Le Gac and C. Rolando, "A Polysilicon Nanoelectrospray-Mass Spectrometry Source Based on a Microfluidic Capillary Slot", *Sensors and Actuators B*, vol. 106, pp.741-749, 2005.

S. Arscott, M. Gaudet, M. Brinkmann, A. E. Ashcroft and R. Blossey, "Miniaturized sources for electrospray mass spectrometry", *J. Phys.: Condens. Matter*, vol. 18, pp. S667-S690, 2006.

H. Ashraf, J. K. Bhardwaj, S. Hall, J. Hopkins, I. Johnston, S. McAuley, G. Nicholls, L. Atabo, M. E. Ryan and S. C. Watcham, "Advances in deep anisotropic silicon etch for MEMS", *National Conference On Sensors and Microsystems*, The Italian Association of Sensors and Microsystems, Italy, 2000.

J. W. Berenschot, N. R. Tas, T. S. J. Lammerink, M. Elwenspoek and A. van den Berg, "Advanced sacrificial poly-Si technology for fluidic systems", *J. Micromech. Microeng.*, vol. 12, pp.621-624, 2002.

M. Brinkman, R. Blossey, S. Arscott, C. Druon, P. Tabourier, S. Le Gac and C. Rolando, "Microfluidic design rules for capillary slot-based electrospray sources", *Appl. Phys. Lett.*, vol. 85, pp.2140-2142, 2004.

J. Buhler, F. P. Steiner and H. Baltes, "Silicon dioxide sacrificial layer etching in surface micromachining", *J. Micromech. Microeng.*, vol. 7, R1-R13, 1997.

T. P. Burg and S. R. Manalis, "Suspended microchannel resonators for biomolecular detection", *Appl. Phys. Lett.*, vol. 83, pp. 2698-2700, 2003.

J. M. Bustillo, R. T. Howe and R. T. Muller, "Surface micromachining for microelectromechanical systems", *Proc. IEEE*, vol. 86, pp.1552-1574, 1998.

D. M. Cannon, B. R. Flachsart, M. A. Shannon, J. V. Sweedler and P. W. Bohn, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 85, pp. 1241, 2004.

B. Capella and G. Dietler, "Force-distance curve by atomic force microscopy", *Surf. Sci. Rep.*, vol. 34, pp.1-104, 1999.

L. Chen, J. Miao, L. Guo and R. Lin, "Control of stress in highly doped polysilicon multi-layer diaphragm structures", *Surf. Coat. Technol.*, vol. 141, pp. 96-102, 2001.

N. V. Churav, V. D. Sobolev and Z. M. Zorin, *Special discussion on thin liquid films and boundary layers* (New York: Academic), pp. 213-220, 1971.

P-G. De Gennes, F. Brochard-Wyart and D. Quere, *Capillarity and Wetting Phenomena: Drops, Bubbles, Pearls, Waves*, (New York: Springer), 2003.

<sup>a</sup> C. Descatoire, D. Troadec, L. Buchaillet, A.E. Ashcroft and S. Arscott, "A nanofluidic electrospray source fabricated using focused ion beam etching", *Proceedings of  $\mu$ TAS 2005 9<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, Boston, Massachusetts, USA, October 9-13, 2005, vol. 1, pp.241-243.

<sup>b</sup> C. Descatoire, D. Troadec, A.E. Ashcroft, L. Buchaillet and S. Arscott, "Nanomachined electrospray ionisation tips", *Nanotech 2005 9<sup>th</sup> Annual European Conference on Micro & Nanoscale Technologies for the Biosciences*, Montreux, Switzerland, November 15-17, 2005, Appendice A1.

FEI Company, [www.fei.com](http://www.fei.com).

K. Gamo and S. Namba, *Microelectron. Eng.*, vol. 11, pp. 403, 1990.

A. N. Gáñan-Calvo, *Phys. Rev. Lett.*, vol. 79, pp. 217, 1997.

P. Griss, J. Melin, J. Sjödaahl, J. Roeraade and G. Stemme, "Development of micromachined hollow tips for protein analysis based on nanoelectrospray ionization mass spectrometry", *J. Micromech. Microeng.*, vol. 12, pp. 682-687, 2002.

H. Guckel, T. Randazzo and D.W. Burns, "A simple technique for the determination of mechanical strain in thin films with applications to polysilicon", *J. Appl. Phys.*, vol. 57, pp. 1671-1675, 1985.

H. Guckel, J. J. Sniegowski, T. R. Cristenson, S. Mohny and T. F. Kelly, "Fabrication of micromechanical devices from polysilicon films with smooth surfaces", *Sens. Actuators.*, vol. 20, pp. 117-122, 1989.

R. P. A. Hartman, D. J. Brunner, D. M. A. Camelot, J. C. M. Marijnissen, J. Haneveld and B. Scarlett, *J. Aerosol. Sci.*, vol. 31, pp. 65, 2000.

<sup>a</sup> R. T. Howe and R. S. Muller, "Polycrystalline silicon micromechanical beams", *J. Electrochem. Soc.*, vol. 130, pp.1420-1423, 1983.

<sup>b</sup> R. T. Howe and R. S. Muller, "Stress in polycrystalline and amorphous silicon thin films", *J. Appl. Phys.*, vol. 54, pp.4674-4675, 1983.

T. Ishitani, T. Ohnishi and Y. Kawanami, *Japan. J. Appl. Phys.*, vol. 29, pp. 2283, 1990.

J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, (London: Academic), 1991.

S. Khizroev and D. Litvinov, *Nanotechnology*, vol. 15, R7, 2004.

R. Kometani, T. Morita, K. Watanabe, K. Kanda, Y. Haruyama, T. Kaito, J. Juita, M. Ishida, Y. Ochiai and S. Matsui, *Japan. J. Appl. Phys.*, vol. 42, pp. 4107, 2003.

F. Lärmer and A. Schilp, "Method for anisotropically etching silicon", *German Patent*, DE4241045, 1992.

Y. I. Lee, K. H. Park, J. Lee, C. S. Lee, H. J. Yoo, C. J. Kim and Y. S. Yoon, "Dry release for surface micromachining with HF vapour-phase etching", *J. Microelectromech. Syst.*, vol. 6, pp.226-233, 1997.

B. Legrand, A. E. Ashcroft, L. Buchaillet and S. Arscott, "SOI-based nanoelectrospray emitter tips for mass spectrometry: a coupled MEMS and microfluidic design", *J. Micromech. Microeng.*, vol. 17, pp.509-514, 2007.

S. Lucas, K. Kis-Sion, J. Pinel and O. Bonnaud, "Polysilicon cantilever beam using surface micromachining technology for applications in microswitches", *J. Micromech. Microeng.*, vol. 7, pp. 159-161, 1997.

R. Maboudian and R. T. Howe, "Critical review: adhesion in surface micromachined structures", *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 15, pp.1-20, 1997.

D. Maier-Schneider, J. Maibach, E. Obermeier and D. Schneider, "Variations in Young's modulus and intrinsic stress of LPCVD-polysilicon due to high-temperature annealing", *J. Micromech. Microeng.*, vol. 5, pp.121-124, 1995.

S. A. McAuley, H. Ashraf, L. Atabo, A. Chambers, S. Hall, J Hopkins and G. Nicholls, "Silicon micromachining using a high density plasma source", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 34, pp.2769-2774, 2001.

G. T. Mulhern, D. S. Soane and R. T. Howe, "Supercritical carbon dioxide drying of microstructures", *Proc. 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Solid-State Sensors and Actuators (Transducers'93)*, Yokohama, Japan, 7-10 June pp.296-299, 1993.

Orsay Physics, [www.orsayphysics.com](http://www.orsayphysics.com)

D. R. Reyes, D. Iossifidis, P-A. Auroux and A. Manz, "Micro total analysis systems: 1. Introduction, theory and technology", *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 2623-2636, 2002.

S. Reyntgens and R. Puers, *J. Micromech. Microeng.*, vol. 11, pp. 287, 2001.

M. Schilling, W. Nigge, A. Rudzinski, A. Neyer and R. Hergenröder, "A new on-chip ESI nozzle for coupling of MS with microfluidic devices", *Lab Chip*, vol. 4, pp. 220-224, 2004.

W. N. Sharpe Jr., B. Yuan, R. Vaidyanathan and R. L. Edwards, "Measurement of Young's modulus, Poisson's ratio and tensile strength of polysilicon", *Proceedings of the 10<sup>th</sup> IEEE International Workshop on Microelectricalmechanical Systems*, Nagoya, Japan, pp. 424-429, 1997.

W. N. Sharpe Jr., S. B. Brown, G. C. Johnson and W. Knauss, "Round-robin tests of modulus and strength of polysilicon", *Microelectromechanical Structures for Materials Research*, San Francisco, CA, pp. 57-65, 1998.

V. D. Sobolev, N. V. Churav, M. G. Velarde and Z. M. Zorin, *J. Colloid. Interface Sci.*, vol. 222, pp. 51, 2000.

STS : [www.stsystems.com](http://www.stsystems.com)

P. Sudraud and G. B. Assayag, *Images de la Physique*, supplément au vol. 71 du Courrier du CNRS, pp. 84-92, 1988.

N. R. Tas, J. Haneveld, H. V. Jansen, M. Elwenspoek and A. van den Berg, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 85, pp. 3274, 2004.

G. Taylor, *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, vol. 280, pp. 383, 1964.

G. A. Valaskovic, N. L. Kelleher, D. P. Little, D. J. Aaserud and F. W. McLafferty, "Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 67, pp. 3802-3805, 1995.

M. W. van Spengen, R. Puers and I. De Wolf, "A physical model to predict stiction in MEMS", *J. Micromech. Microeng.*, vol. 12, pp.702-713, 2002.

M. W. van Spengen, R. Puers and I. De Wolf, "The prediction of stiction failures in MEMS", *IEEE Trans. Device Mater. Reliab.*, vol. 3, pp.167-172, 2003.

H. A. Wagner and F. Fritz, "Rapid thermal annealing of polysilicon thin films", *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 4, pp. 181, 1986.

M. S. Wilm and M. Mann, "Electrospray and Taylor-cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?", *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, vol. 136, pp.167-180, 1994.

Q. F. Xue, F. Foret, Y. M. Dunayevskiy, P. M. Zavracky, N. E. McGruer and B. L. Karger, "Multichannel microchip electrospray mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 69, Issue 3, pp. 426-430, 1997.

J. Yang, H. Kahn, A. Q. He, S. M. Phillips and A. H. Heuer, "A new technique for producing large-area as-deposited zero-stress LPCVD polysilicon films: the multipoly process", *IEEE J. Microelectromech. Syst.*, vol. 9, pp. 485-494, 2000.

X. Zhang, T. Y. Zhang, M. Wong and Y. Zohar, "Rapid thermal annealing of polysilicon thin films", *J. Microelectromech. Syst.*, vol. 7, pp. 356-364, 1998.

B. Zhang, H. Liu, B. L. Karger and F. Foret, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 3258-3264, 1999.

# Chapitre 3

## Caractérisation des sources d'ionisation par électronébulisation

### *Résumé*

Ce chapitre présente, les caractérisations qui ont été réalisées sur les sources d'électronébulisation fabriquées en utilisant les différentes voies technologiques décrites dans le chapitre précédent. Tout d'abord, une première série de tests en spectrométrie de masse avec des sources commerciales permet d'évaluer l'impact des différents paramètres (tension d'ionisation, composition de la solution, etc...) sur les spectres obtenus et de déterminer le seuil de sensibilité de ces sources. Il ressort de cette étude que la concentration minimale de protéine (Cf. lexique) pouvant être détectée est de  $500\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . Puis, une deuxième série de tests menée sur les micro et nano-sources réalisées par les microtechnologies montre que la réduction des dimensions permet un gain en sensibilité par rapport aux sources classiques. En effet, il apparaît que le seuil de détection obtenu pour les micro-sources est de  $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  tandis qu'il est de  $10\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  pour les nano-sources. Pour terminer, à partir de l'étude de la

trace laissée par un nébulisat sur une surface, un modèle permettant d'extraire des données clefs du phénomène d'électronébulisation est proposé.

## Introduction

Dans le domaine de la protéomique (Cf. lexique), face au grand nombre d'échantillons à caractériser, les systèmes d'analyses biochimiques miniaturisés connaissent un essor considérable. Une démonstration de la force de ces dispositifs est leur capacité à intégrer plusieurs fonctions incluant la préparation des échantillons, les réactions chimiques, la séparation et la détection réduisant ainsi le nombre de manipulations. Cependant, les performances de ces systèmes sont limitées au niveau de la détection. Cette limitation concerne la sensibilité de la méthode de détection qui doit être compatible avec la manipulation de très faibles concentrations en analyte. Dans un premier temps, la plupart des systèmes de détection mettaient en œuvre des techniques optiques. La méthode la plus couramment utilisée était la détection laser par fluorescence. Cette méthode était particulièrement bien adaptée aux premiers dispositifs qui étaient réalisés sur des substrats de verre ou de quartz car ils génèrent un bas niveau d'auto-fluorescence. Cependant, le changement des matériaux utilisés afin de poursuivre la miniaturisation, l'appareillage lourd (laser, photomultiplicateur, lentilles, etc.), l'étape de traitement supplémentaire de l'échantillon afin de coupler l'analyte à un fluorophore, la demande d'une cadence d'analyse plus élevée, des limites de détection plus basses et la réduction des coûts suggèrent de trouver des stratégies et techniques alternatives afin d'atteindre ces nouveaux objectifs. Afin de répondre à cette nouvelle demande, la spectrométrie de masse s'est révélée être une méthode de détection compatible avec de tels dispositifs. En effet, les débits générés dans les micro-dispositifs sont du même ordre de grandeur ( $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ - $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) qu'en spectrométrie de masse [Wilm 1996]. De plus, cette technique de détection est particulièrement bien adaptée à l'analyse de polymères biologiques, tels que les protéines, les oligonucléotides (ADN) et les polysaccharides (Cf. lexique), surtout depuis l'introduction de la technique d'ionisation "douce" par électronébulisation qui permet le transfert des grosses biomolécules en phase gazeuse sans traitement préalable [Yam 84 a] [Yam 84 b] [Men 88] [Fen 89]. Ce mode d'ionisation donne assez d'énergie à la molécule pour l'électronébuliser sans provoquer sa fragmentation, permettant de connecter un système de chromatographie (Cf. lexique) en

amont. L'électronebulisation est donc particulièrement intéressante pour coupler un système microfluidique à une analyse par spectrométrie de masse.

Après avoir rappelé le fonctionnement d'un spectromètre de masse et la manière d'interpréter un spectre, la première partie de ce chapitre présente les caractérisations effectuées par spectrométrie de masse. Les limites de fonctionnement des capillaires standards commerciaux sont éprouvées. Puis, la limite de détection de chacune de nos sources micro-fabriquées est déterminée afin de se positionner par rapport à celle obtenue pour les sources commerciales classiques et vérifier que la réduction de la taille de l'extrémité de la source à l'échelle nanométrique permet d'améliorer les performances de la spectrométrie de masse.

La seconde partie, présente l'analyse par microscope à force atomique de la trace laissée par le nébulisat d'une micro-source d'électronebulisation sur une surface. A partir de cette étude, un modèle permettant d'obtenir des informations sur le processus d'ionisation par électronebulisation (taille des gouttelettes, débit, etc...) a été développé.

## 1- Caractérisation par spectrométrie de masse

Durant ces vingt dernières années, la spectrométrie de masse a joué un rôle très important en biologie et constitue aujourd'hui la méthode la plus sensible pour la caractérisation des biomolécules [Gri 01]. Elle mesure avec une grande sensibilité le ratio masse sur charge ( $m/z$ ) des ions en phase gazeuse. Un spectromètre de masse est constitué d'une source d'ionisation produisant les ions à partir de l'échantillon ; d'un ou plusieurs analyseurs de masse afin de séparer les ions en fonction de leurs ratios  $m/z$ , d'un détecteur pour enregistrer le nombre d'ions émergeant du dernier analyseur et d'un ordinateur qui traite les données afin de produire les spectres de masse et contrôler l'instrument par rétroaction (Figure III.1).

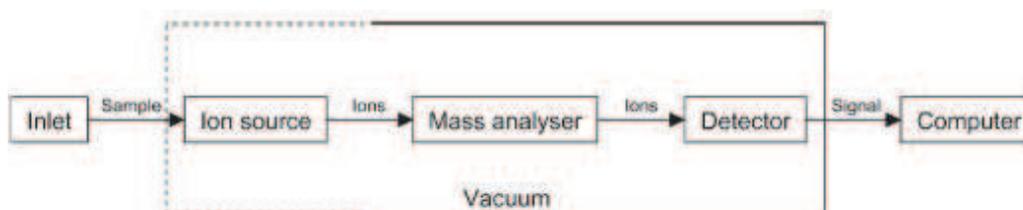
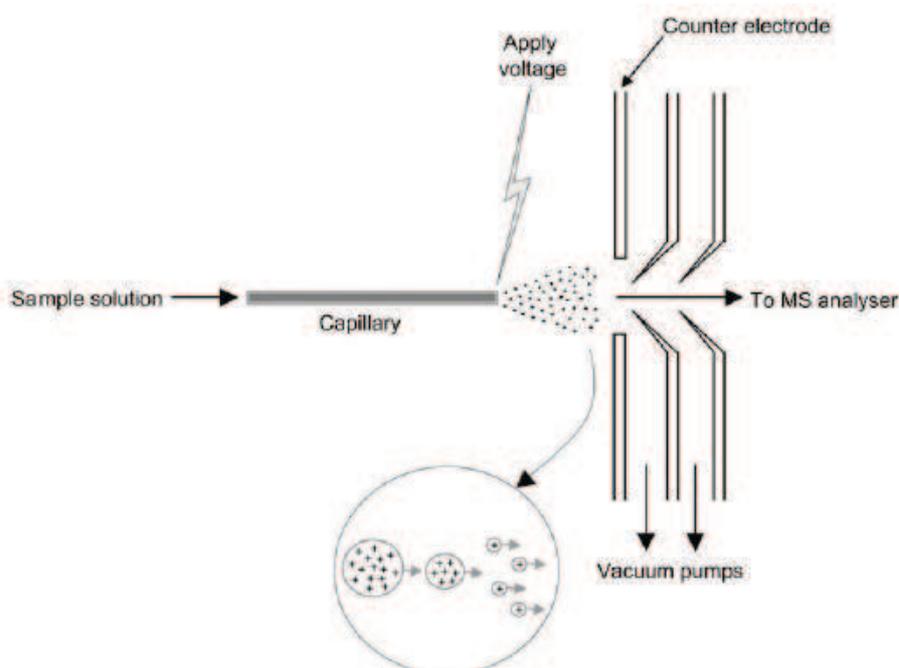


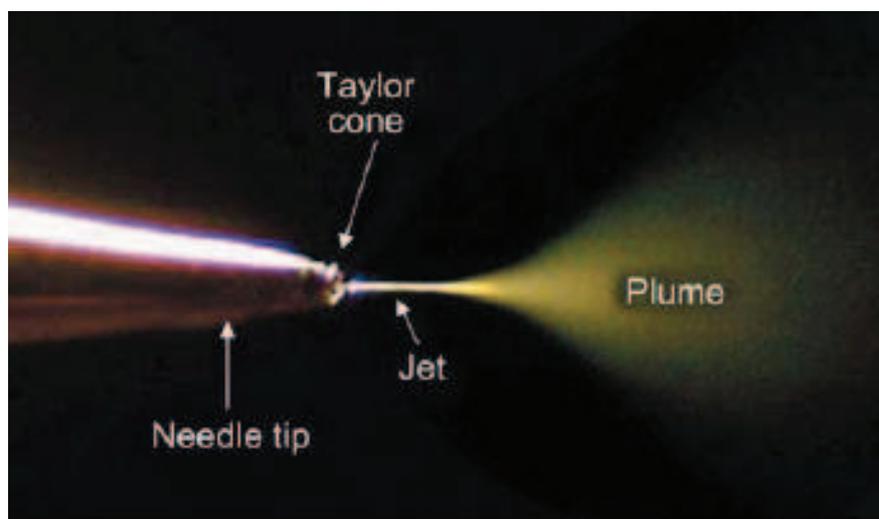
Figure III.1 : Diagramme d'un spectromètre de masse [Lan 05].

La génération de macro-ions par électronébulisation a été démontrée par Dole en 1968 [Dol 68] mais c'est le groupe de Fenn à l'Université de Yale qui a appliqué pour la première fois l'électronebulisation à la spectrométrie de masse [Yam 84 a] [Yam 84 b]. L'électronebulisation fait passer les ions de la phase liquide à la phase gazeuse à pression atmosphérique. Ces ions sont échantillonnés dans le système de vide du spectromètre de masse à travers une série d'ouvertures séparant les sections de vide successives (Figure III.2).



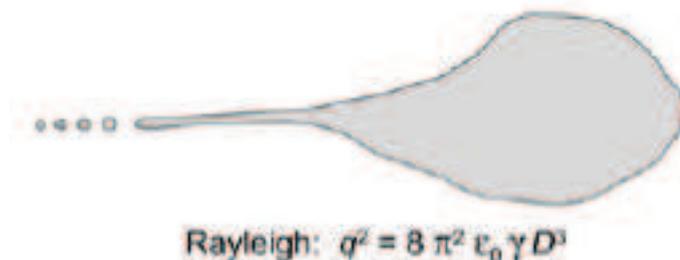
**Figure III.2 :** Diagramme schématique d'une interface d'électronebulisation et du procédé d'électronebulisation [Lan 05].

Le mécanisme impliqué dans la production des ions en phase gazeuse par électronebulisation n'est pas entièrement compris [Gas 97]. La solution échantillon s'écoule à bas débit ( $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$  -  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) dans un tube capillaire sur lequel une tension élevée est appliquée (1 à 6kV). La solution s'écoulant dans le capillaire subit le champ électrique établi entre le capillaire et la contre-électrode. En supposant qu'une tension positive soit appliquée au niveau du capillaire, les ions en solution chargés positivement s'accumulent à la surface de l'extrémité du liquide qui s'étire et adopte alors une forme conique connue sous le nom de cône de Taylor (Figure III.3).



**Figure III.3 :** Observation du phénomène d'électronébulisation au microscope optique. Lorsque le liquide commence à sortir de l'aiguille, il se charge et adopte une forme conique connue sous le nom de cône de Taylor. A l'extrémité de ce cône, le liquide s'étire pour former un filament qui devient instable et se brise en un brouillard de fines gouttelettes chargées. Les gouttelettes étant chargées, elles se repoussent mutuellement et couvrent une grande surface [New].

Lorsqu'on force le liquide à supporter une charge électrique plus importante, le cône s'étire et forme un filament qui, lorsque la tension de surface devient plus petite que la force électrostatique appliquée, produit des gouttelettes chargées positivement de diamètre inférieur à  $10\mu\text{m}$  via un processus de bourgeonnement. Les gouttelettes se dirigent vers la contre-électrode qui est portée à une charge inverse à la leur. En se dirigeant vers l'électrode, elles passent à travers un capillaire chauffé ( $180\text{-}270^\circ\text{C}$ ) ou un rideau d'azote chauffé afin de permettre au solvant de s'évaporer. La densité de charge électrique à la surface des gouttelettes s'accroît à mesure que la taille de celles-ci diminue. La gouttelette se déforme en forme de larme et, au moment où la répulsion électrostatique est supérieure à la tension de surface connue sous le nom de limite de Rayleigh, elle explose en émettant des particules encore plus petites (Figure III.4).



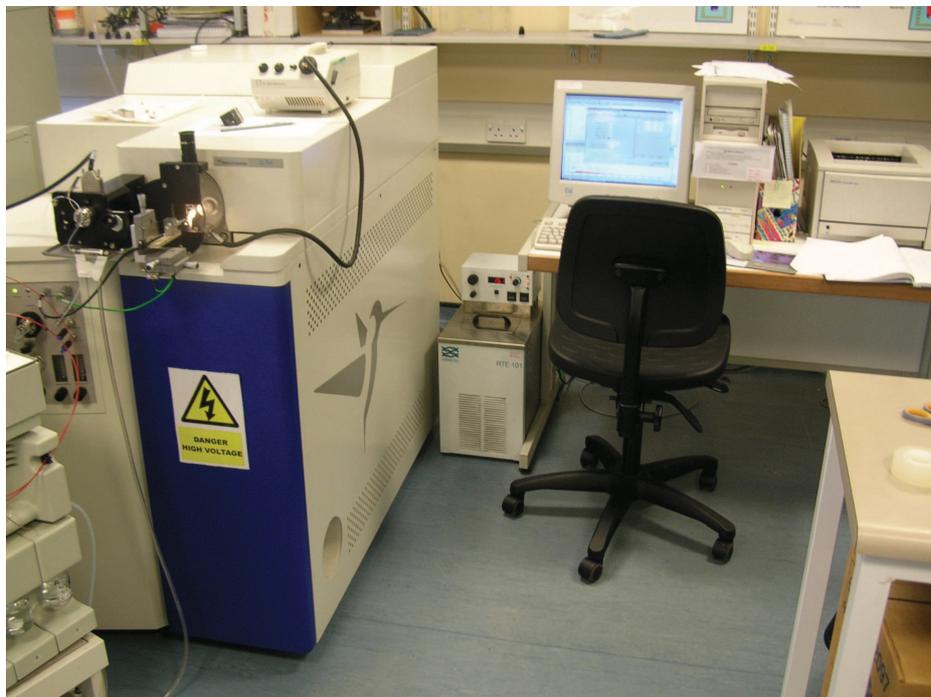
**Figure III.4 :** Dessin de la décomposition d'une gouttelette dans une source d'électronébulisation [Hof 03]. Le point critique auquel la tension de surface de la gouttelette devient inférieure à la répulsion électrostatique des charges de la surface est connu sous le nom de stabilité limite de Rayleigh :  $q$  = charge ;  $\epsilon_0$  = permittivité du vide ;  $\gamma$  = tension de surface et  $D$  = diamètre de la gouttelette sphérique considérée.

En fonction de la taille initiale de la gouttelette, les particules émises peuvent être soit des gouttelettes plus petites qui répètent le processus soit des ions de surface solvatés. A pression atmosphérique, les collisions avec les gaz environnant désolvatent rapidement ces ions qui deviennent quasi-moléculaires ou multichargés [Wil 98]. Un autre mécanisme pour la production des ions en phase gazeuse a été proposé dans lequel l'émission des ions est supposée provenir de petites gouttelettes hautement chargées, la force à l'origine de la formation des ions étant la répulsion entre l'ion et les autres charges sur la gouttelette [Tho 79] [Iri 76]. L'importance relative de ces deux mécanismes proposés reste le sujet des recherches et débats actuels [Gas 97]. La condition préalable pour la production d'ions sous forme gazeuse par électronébulisation est la possibilité d'ioniser l'analyte en solution. Si plusieurs sites ionisables sont présents, des ions multi-chargés seront générés.

Les informations obtenues à partir d'une expérience d'ionisation sont déterminées par les conditions de fonctionnement et les spécifications de l'analyseur de masse. L'analyseur de masse est le moyen par lequel les ions sont séparés et détectés, les paramètres clés pour l'évaluation des performances comprennent la résolution de masse, la précision de masse, la gamme de masse, la sensibilité et la possibilité d'en utiliser plusieurs en parallèle (MS/MS ou  $MS^n$  ou  $n = 2, 3, 4, \dots$ ). Il existe quatre types d'analyseurs de masse utilisés actuellement pour la recherche en protéomique : à trappe d'ions, à temps de vol (TOF : Time Of Flight), à

quadripôle et à transformée de Fourier à résonance cyclotronique ionique (FTICR : Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance). Ils sont différents en termes de conception et de performances et peuvent être utilisés seuls ou ensemble en tandem afin de tirer profit de leurs différents avantages.

Les caractérisations des différentes sources sont menées dans le cadre de ces travaux sur un spectromètre de masse à temps de vol muni d'un quadripôle à accélération orthogonale (Waters UK Ltd., Manchester, UK). La Figure III.5 présente une photo du spectromètre utilisé.



**Figure III.5 :** *Spectromètre de masse à temps de vol (Water UK Ltd., Manchester, UK).*

L'analyse par temps de vol est basée sur le principe suivant : un potentiel d'accélération  $V$  donne à un ion de charge  $z$  une énergie égale à  $zV$ , qui peut être assimilée à l'énergie cinétique de l'ion d'où :

$$zV = \frac{mv^2}{2} \quad (1)$$

où  $m$  est la masse et  $v$  la vitesse.

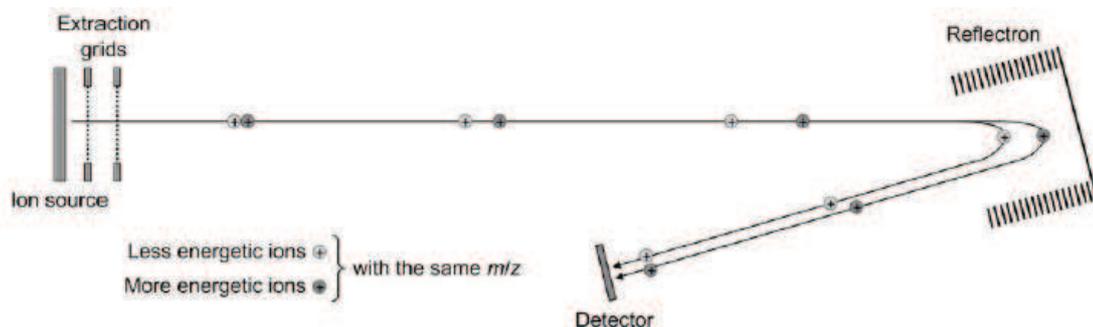
Si tous les ions sont accélérés avec le même potentiel, les ions de masses différentes ayant la même charge se déplacent à des vitesses différentes. Or :

$$v = \frac{d}{t} \quad (2)$$

où  $v$  est la vitesse,  $d$  la distance et  $t$  le temps. Par conséquent l'équation (1) peut s'écrire :

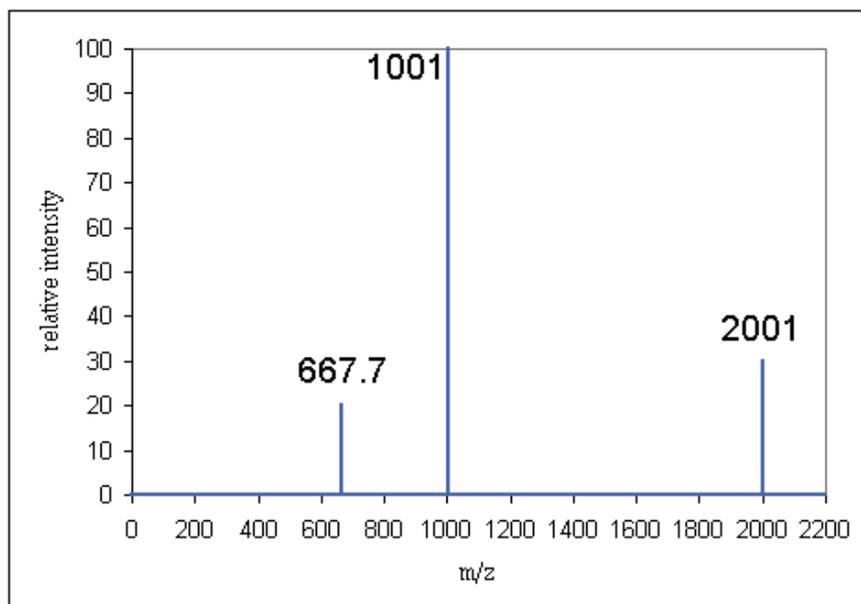
$$\frac{m}{z} = \frac{2Vt^2}{d^2} \quad (3)$$

Ainsi, les ions de masses différentes ne mettent pas le même temps afin de parcourir la même distance. Les ratios masse sur charge sont déterminés en mesurant le temps mis par les ions pour se déplacer entre la source et le détecteur. La résolution de masse est affectée par les petites variations du temps de vol et les facteurs qui créent une distribution des temps de vol parmi les ions ayant le même ratio  $m/z$  conduisent à une résolution de masse médiocre. Deux méthodes sont utilisées pour compenser la distribution temporelle (temps de formation de l'ion), spatiale (emplacement de formation de l'ion) et cinétique (énergie de formation de l'ion). En introduisant un retard entre la formation de l'ion et l'extraction des ions de la source, de vastes distributions spatiale et temporelle peuvent être évitées. Ceci est connu sous le nom de délai d'extraction. Les ions se développent d'abord dans une région de la source où ne règne pas de champ, ensuite après un certain délai (nanosecondes à microsecondes), une impulsion de tension est appliquée afin d'extraire les ions de la source. La deuxième technique consiste à utiliser des miroirs d'ions, ou réflectrons qui compensent les variations de la distribution d'énergie. Le réflectron crée un champ retardateur qui dévie les ions et les renvoie dans le tube de vol. Plus l'ion a d'énergie, plus il pénètre en profondeur dans le champ retardateur du réflectron avant d'être dévié. Ainsi un ion ayant plus d'énergie aura une trajectoire de vol plus longue et arrivera au niveau du détecteur au même moment que les ions de même masse ayant moins d'énergie. Un diagramme schématique de l'analyseur à temps de vol avec un réflectron est montré Figure III.6.



**Figure III.6 :** Composants constituant un analyseur à temps de vol avec un réflectron [Lan 05].

Le détecteur contrôle le courant ionique, l'amplifie et transmet le signal à l'ordinateur qui traite les données et les enregistre sous la forme d'un spectre de masse. Le spectre de masse est constitué de pics correspondant aux ions multichargés de type  $[M+nH]^{n+}$  qui se forment par protonation des sites basiques ;  $M$  étant la masse moléculaire de la molécule analysée,  $n$  le nombre de charges portées par cette molécule ionisée et  $H$  la masse d'un proton qui est de 1.008Da. Le spectre représente sur l'axe des ordonnées l'abondance relative des espèces (en %) en fonction de leur ratio  $m/z$  sur l'axe des abscisses (Figure III.7).



**Figure III.7 :** Exemple d'un spectre de masse simplifié.

L'abondance relative ou intensité relative correspond au courant reçu par le détecteur et indique par conséquent le nombre d'ions qui arrivent dessus : plus le courant est grand, plus il y a d'ions. Le plus grand pic du spectre est appelé pic de base et correspond à une abondance relative de 100%. Dans l'exemple Figure III.7, le pic de base apparaît à  $m/z=1001$ .

A partir de ce spectre, la masse moléculaire  $M$  de l'échantillon peut-être déterminée simplement à partir de deux pics successifs puis comparée aux bases de données, dans lesquelles la masse est déterminée à partir de la formule brute en utilisant les masses atomiques, afin d'identifier la protéine. En effet, si les ions apparaissant à  $m/z=2001$  ont une charge  $n$  alors ceux à  $m/z=1001$  ont une charge  $n+1$  et on peut écrire:

$$2001 = \frac{M + nH^+}{n} \quad (4)$$

$$1001 = \frac{M + (n+1)H^+}{n+1} \quad (5)$$

On peut donc calculer l'état de charge  $n$  en supprimant la masse molaire  $M$  de la façon suivante:

$$n(2001) - nH^+ = (n+1)1001 - (n+1)H^+ \quad (6)$$

D'où :

$$n(2001) = n(1001) + 1001 - H^+ \quad (7)$$

Ainsi :

$$n = \frac{(1001 - H^+)}{2001 - 1001} \quad (8)$$

Le nombre de charges pour les ions à  $m/z=2001$  est donc  $n=1$  et pour les ions à  $m/z=1001$  il est de  $n=2$ . Connaissant la valeur du nombre de charges  $n$  on peut déterminer la masse moléculaire de l'échantillon grâce à l'équation (4) :

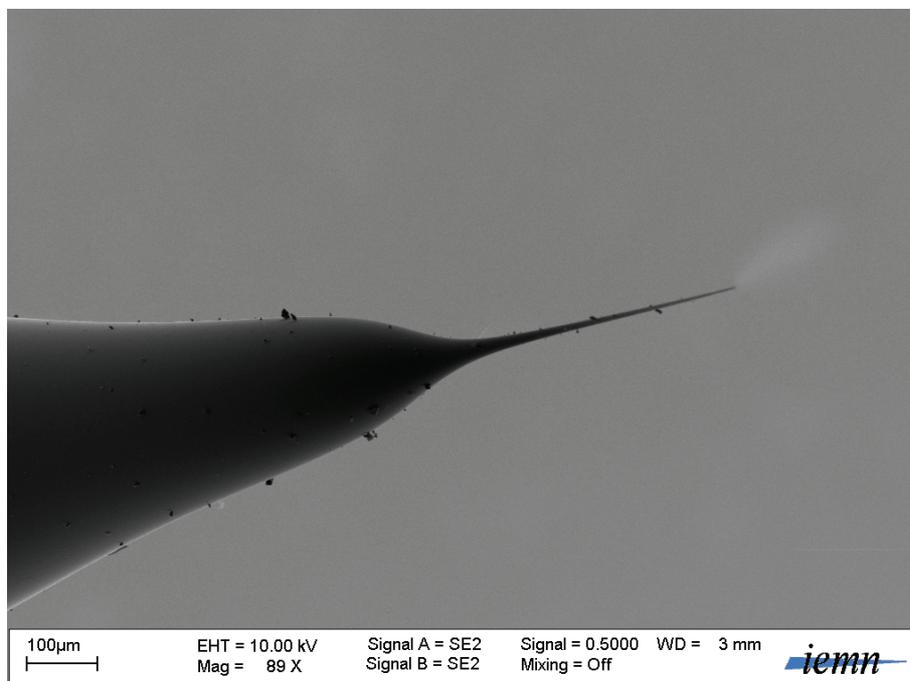
$$2001 = M + H^+ \quad (9)$$

Finalement la masse moléculaire de l'analyte est  $M=2000$ .

Dans notre cas, le spectromètre à temps de vol a été préféré aux autres car l'entrée de ce spectromètre se prêtait mieux à l'introduction de nos dispositifs et qu'une pièce standard a pu être usinée afin d'être utilisée comme support pour la fixation de nos sources. Nous allons présenter dans la suite les résultats obtenus.

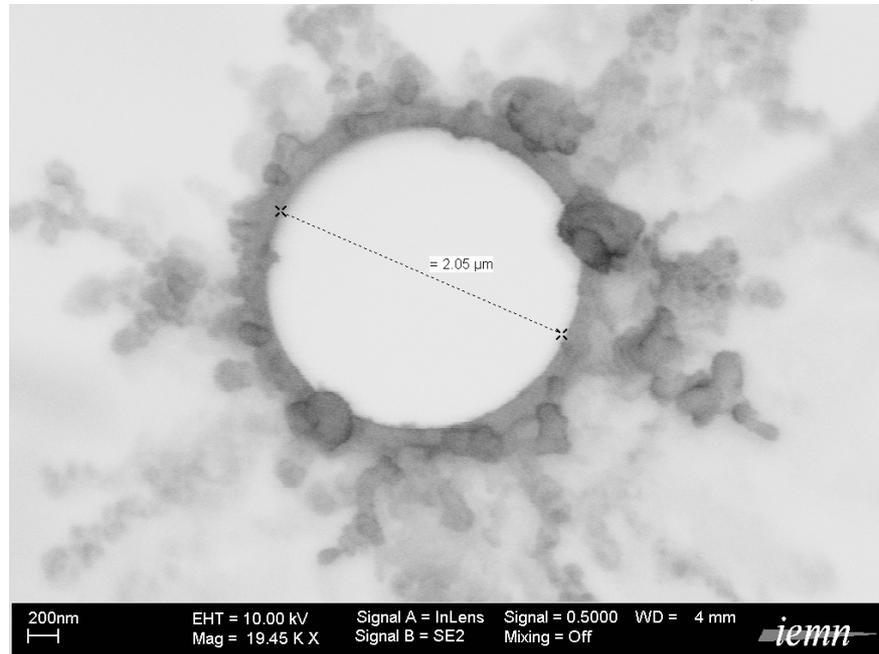
### 1-1 Sources commerciales en verre borosilicaté

Les sources d'ionisation commerciales usuelles sont constituées d'un capillaire en verre borosilicaté dont l'extrémité est affinée par chauffage puis étirement. Ce capillaire est ensuite recouvert d'une fine couche de palladium et d'Or déposées par pulvérisation cathodique. La Figure III.8 montre une photo prise au microscope électronique à balayage des sources commerciales que nous avons utilisées pour faire les tests (fabricant : New Objective (diamètre externe du tube=1mm, diamètre interne du tube=580 $\mu$ m, longueur=5cm, diamètre interne à l'extrémité=2 $\mu$ m, débit=20 à 80nL.min<sup>-1</sup>) [Sci].



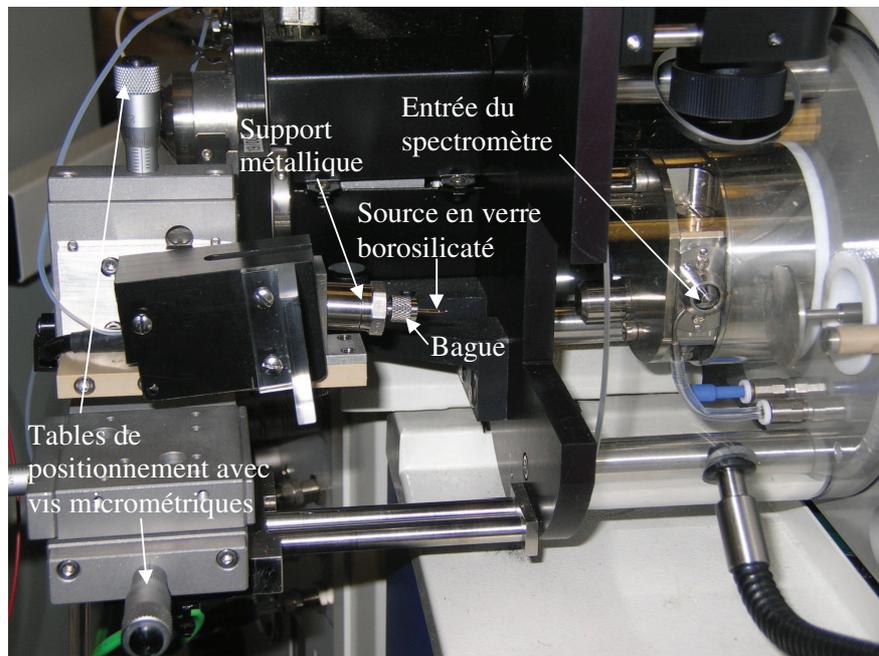
**Figure III.8 :** Image au microscope électronique d'une source en verre borosilicaté.

La Figure III.9 présente un zoom de l'extrémité de cette source vue de dessus permettant de mesurer le diamètre interne de l'ouverture. Ce diamètre est de l'ordre de  $2\mu\text{m}$ .



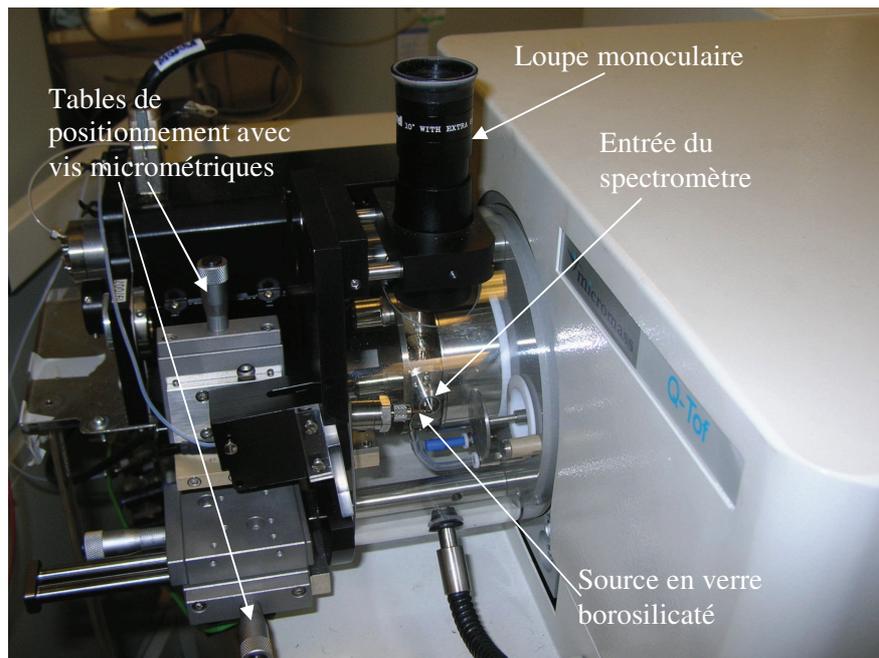
**Figure III.9 :** Image au microscope électronique de l'extrémité d'une source en verre borosilicaté. Le diamètre interne de l'ouverture est d'environ  $2\mu\text{m}$ .

Après avoir été chargée à l'aide d'une micro-seringue par la solution à analyser, la source est vissée sur son support métallique grâce à une bague (Figure III.10).



**Figure III.10 :** Photographie de la source capillaire en borosilicate montée sur son support après remplissage grâce à une micro-seringue avec la solution à étudier.

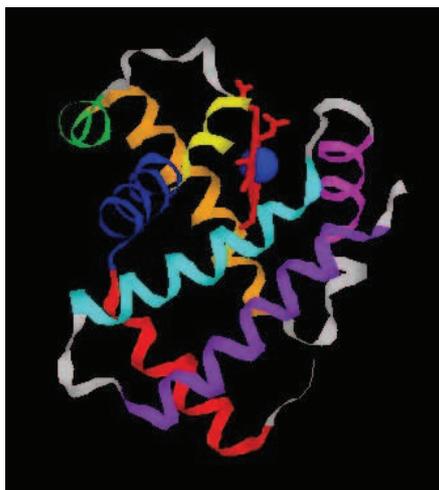
La source est ensuite poussée devant l'entrée du spectromètre de masse, une tension de 1kV est appliquée par l'intermédiaire du support et la position de celle-ci est ajustée dans les trois directions  $xyz$  grâce aux vis micrométriques de la table de déplacement jusqu'à l'obtention d'un nébulisat. Une loupe monoculaire montée au-dessus de l'entrée permet de contrôler le déplacement de la source et de visualiser son fonctionnement (Figure III.11).



**Figure III.11** : Photographie de la source capillaire en borosilicate placée juste devant l'entrée du spectromètre de masse.

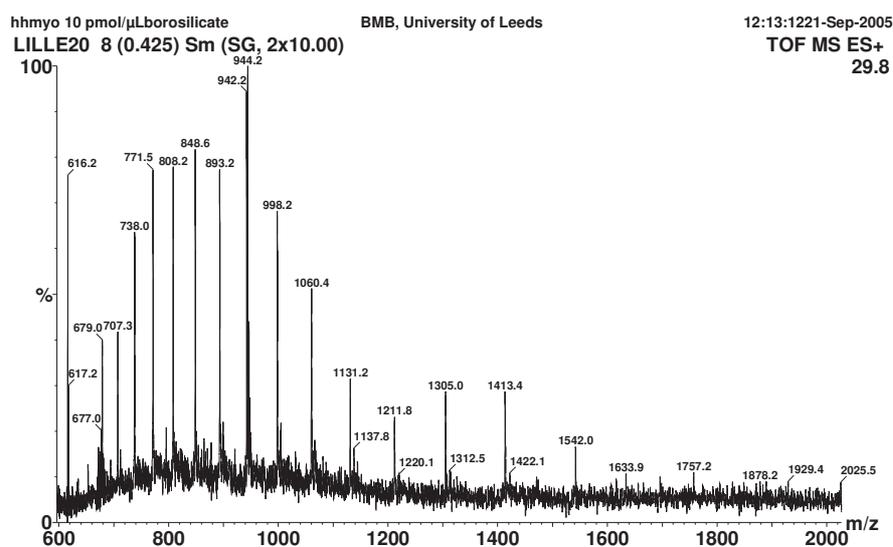
Ces tests préliminaires avec les sources commerciales ont permis d'établir la limite de détection de tels émetteurs, c'est-à-dire la concentration minimale de protéines pouvant être décelée par le spectromètre ainsi que la tension minimale d'ionisation. Ces tests ont été effectués avec des solutions de peptides (Cf. lexique) standard diverses.

Les premiers tests ont été menés avec une solution de myoglobine de cœur de cheval (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK) dont on a fait varier la concentration de  $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  à  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  et en appliquant une tension d'ionisation de 1kV. La myoglobine est une protéine des vertébrés formée d'une chaîne unique de 153 acides aminés (Cf. lexique), découverte en 1957 par John Kendrew. Elle est le transporteur intracellulaire principal de l'oxygène dans les tissus musculaires (Figure III.12). Sa masse moléculaire est de 16951.5Da.



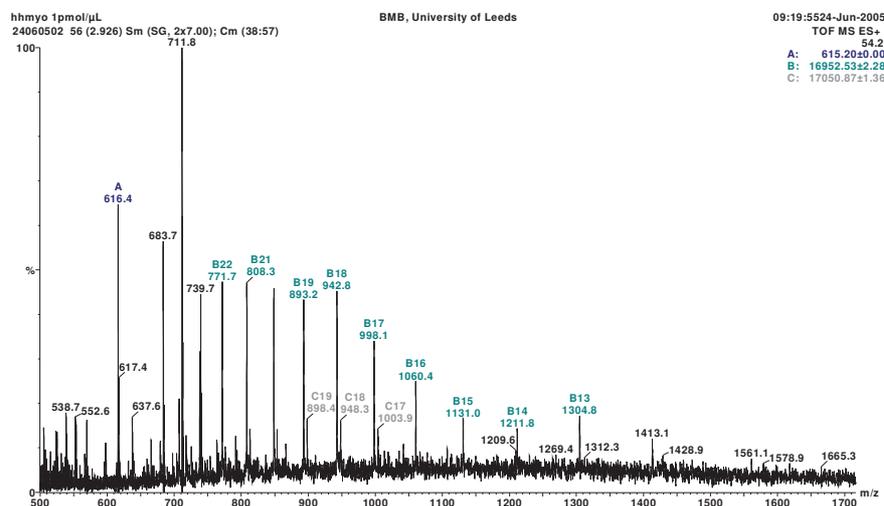
**Figure III.12 :** Représentation en 3 dimensions de la structure de la myoglobine de cœur de cheval.

La Figure III.13 présente le spectre de masse obtenu pour une concentration de  $10\text{pmol}.\mu\text{L}^{-1}$  de myoglobine (eau/méthanol : 50/50 + 0.5% d'acide formique) [Des 05 a] [Des 05 b]. Tous les solvants utilisés sont de qualité CLHP (chromatographie en phase liquide à haute performance) et sont fournis par Fisher Scientific, Loughborough, Leics. Le rôle de l'acide formique est de favoriser la protonation des sites basiques des molécules, ce qui permet d'obtenir un signal plus intense. Le rapport signal sur bruit est d'environ 7.



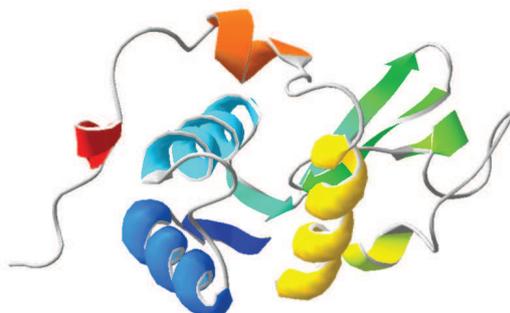
**Figure III.13 :** Spectre de masse obtenu avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de  $10\text{pmol}.\mu\text{L}^{-1}$  en myoglobine de cœur de cheval (tension d'ionisation 1kV).

La Figure III.14 présente le spectre de masse obtenu pour une concentration de  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de myoglobine (eau/méthanol : 50/50 + 0.5% d'acide formique). Le rapport signal sur bruit est d'environ 14.



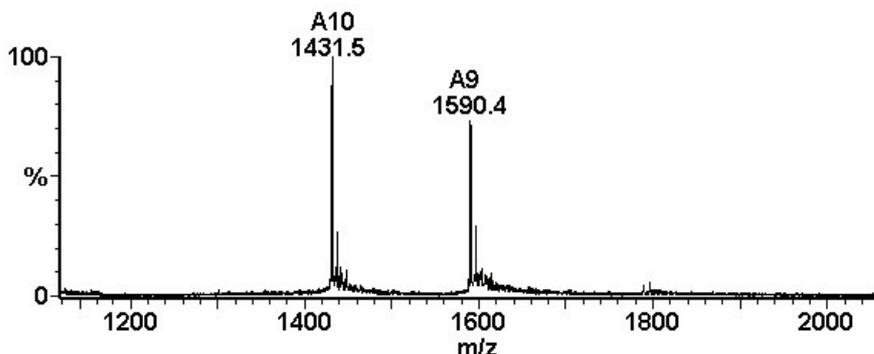
**Figure III.14 :** Spectre de masse obtenu avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en myoglobine de cœur de cheval (tension d'ionisation 1kV).

Le même test a été réalisé avec une autre protéine : le lysozyme de blanc d'œuf de poule. Le lysozyme est une protéine globulaire formée de 129 acides aminés, découverte par Alexander Fleming en 1922. Il s'agit d'une hydrolase (Cf. lexique) acide sécrétée par les granulocytes (Cf. lexique) et les monocytes (Cf. lexique). Elle détruit la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse des glycosaminoglycanes (Cf. lexique) la constituant. Cette propriété a incité certains auteurs à la qualifier d'antibiotique corporel. Sa masse moléculaire est de 14305Da (Figure III.15).



**Figure III.15 :** Représentation en 3 dimensions de la structure du lysozyme de blanc d'œuf de poule.

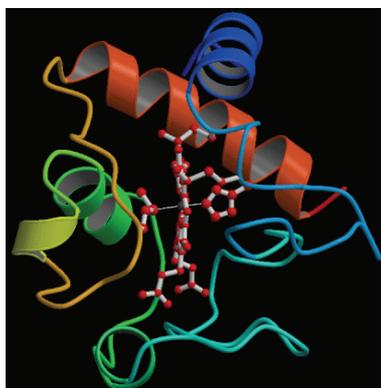
La Figure III.16 présente le spectre de masse obtenu pour une concentration de  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de lysozyme (eau/méthanol : 50/50 + 1% d'acide formique) et une tension de 1kV [Leg 07]. Le rapport signal sur bruit est de 50.



**Figure III.16 :** Spectre de masse obtenu avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en lysozyme de blanc d'oeuf de poule (tension d'ionisation 1kV).

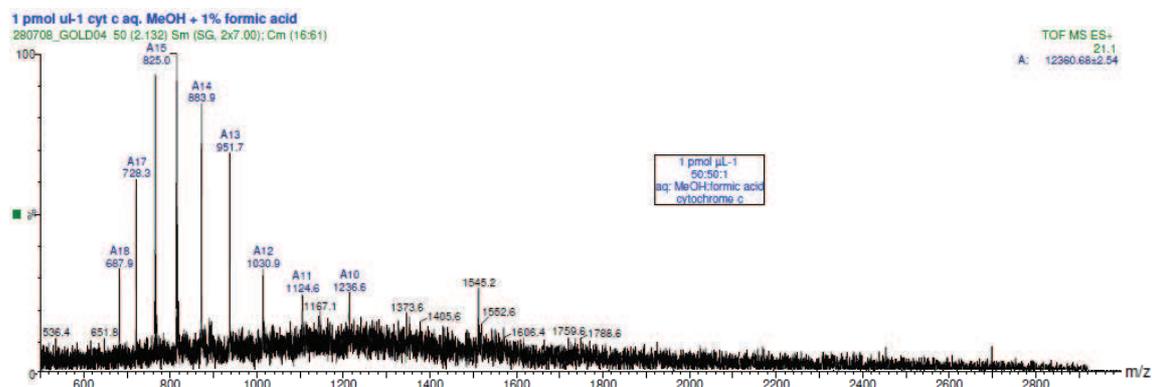
Ces premiers résultats ont montré que la concentration minimale pouvant être détectée est de  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , aucun spectre n'ayant été obtenu avec des concentrations plus faibles.

D'autres tests ont ensuite été réalisés avec un mélange complexe de peptides : le cytochrome C. Différents paramètres ont été modifiés afin de déterminer leurs influences sur les spectres obtenus. Le cytochrome C est une petite hémoprotéine (Cf. lexique) associée avec la membrane interne de la mitochondrie (Cf. lexique) que l'on trouve dans les plantes, les animaux et de nombreux organismes unicellulaires. C'est un composant essentiel de la chaîne respiratoire constitué de 11 peptides. Sa masse moléculaire est d'environ 12400Da (Figure III.17).



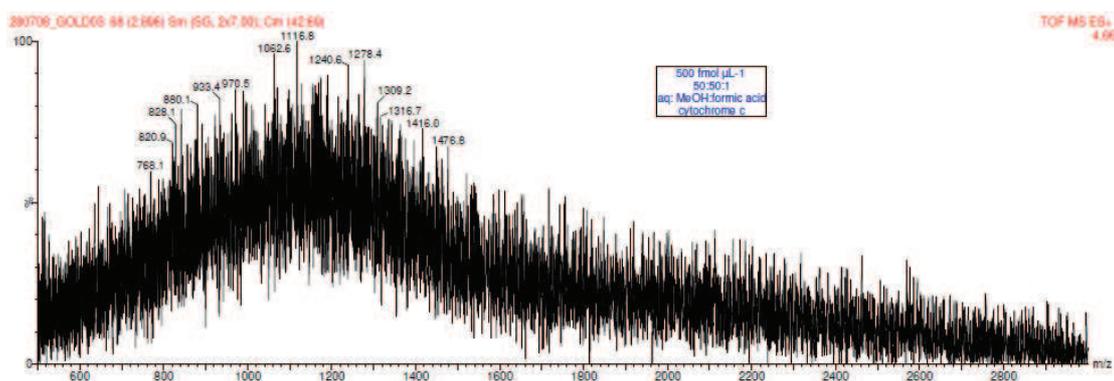
**Figure III.17 :** Représentation en 3 dimensions de la structure du cytochrome C.

Pour cela, l'échantillon pris comme référence est une solution de  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de cytochrome C (eau/méthanol : 50/50 + 1% d'acide formique). Le spectre obtenu avec cette solution pour une tension de 1kV est montré Figure III.18. Le rapport signal sur bruit est de 7.



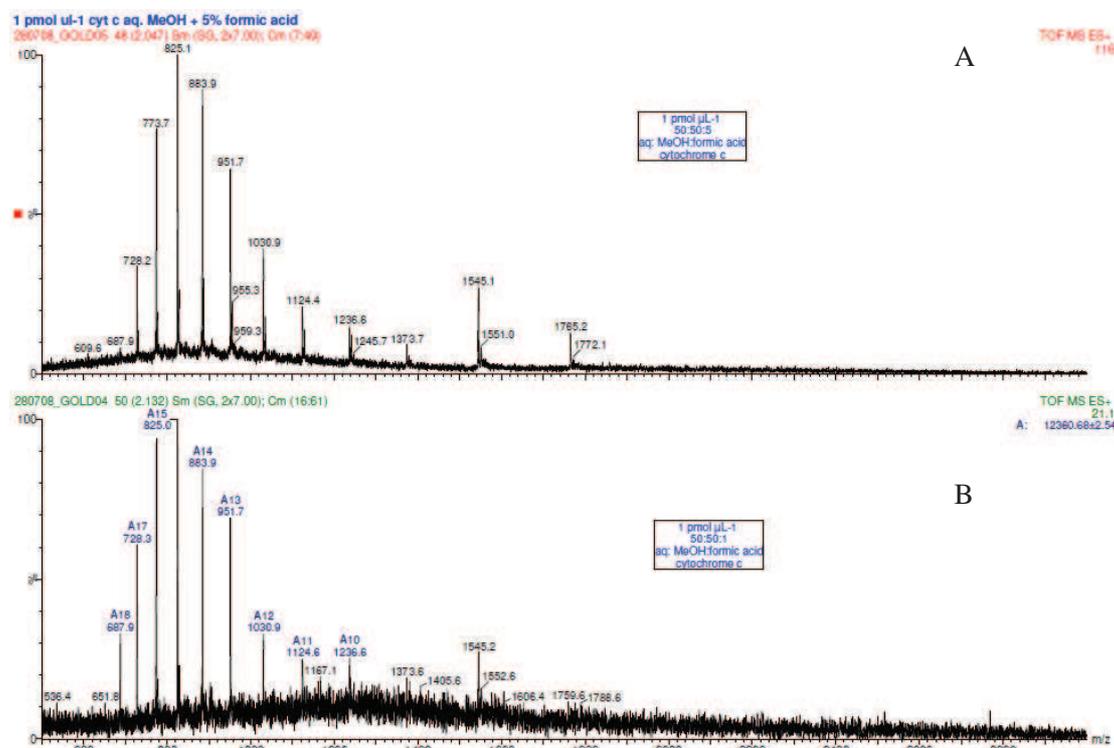
**Figure III.18 :** Spectre de masse obtenu avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C (tension d'ionisation 1kV).

La concentration de la solution a ensuite été réduite à  $500\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de cytochrome C (eau/méthanol : 50/50 + 1% d'acide formique). Le spectre obtenu Figure III.19 montre que le niveau de bruit est élevé et que la protéine n'est pas détectée à plus faible concentration que  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .



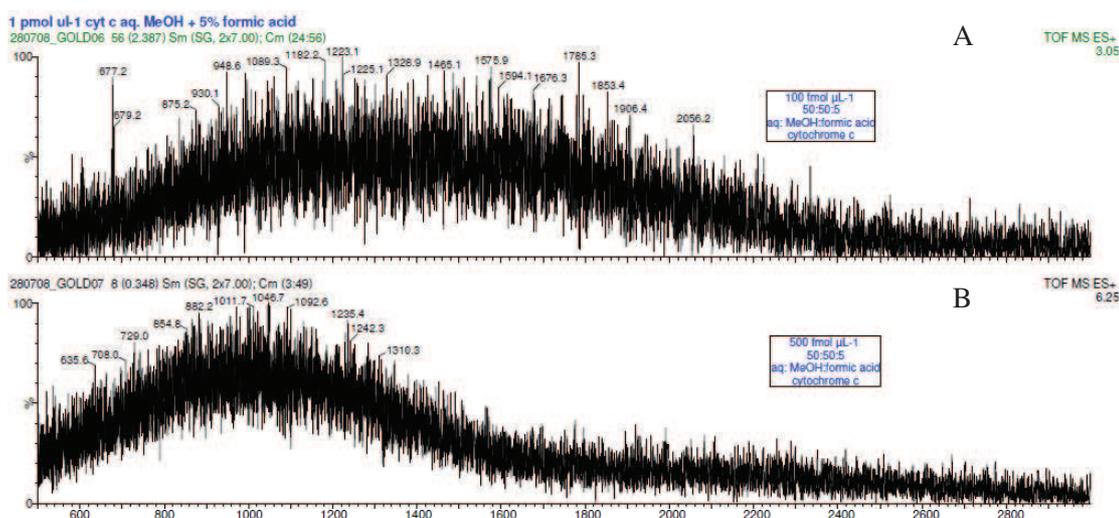
**Figure III.19 :** Spectre de masse bruité obtenu avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de  $500\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C (tension d'ionisation 1kV). La protéine n'est pas détectée.

L'influence de la concentration en acide formique de la solution a ensuite été expérimentée, en faisant passer celle-ci de 1% à 5% dans un premier temps. Les résultats montrent que l'augmentation légère de la concentration en acide améliore la sensibilité pour une solution à  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de cytochrome C, le spectre obtenu étant moins bruité qu'avec seulement 1% d'acide (rapport signal sur bruit de 10 au lieu de 7), l'acide favorisant la protonation de la molécule (Figure III.20).



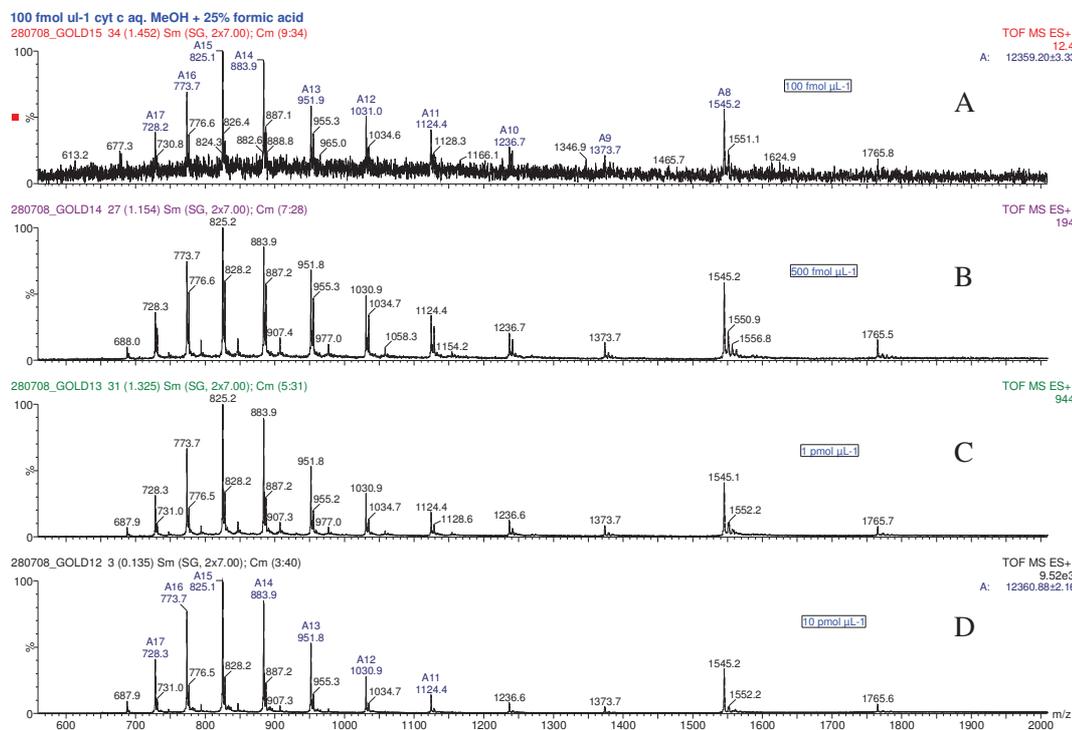
**Figure III.20 :** Spectres de masse obtenus avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C, auquel a été ajouté : (A) 5% d'acide formique et (B) 1% d'acide formique (tension d'ionisation  $1\text{kV}$ ).

Par contre, cette légère augmentation de la teneur en acide ne permet pas d'abaisser la concentration à partir de laquelle le cytochrome C est décelé. Comme le montre la Figure III.21, la protéine n'est pas détectée pour des concentrations de  $500\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  et de  $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .



**Figure III.21 :** Spectres de masse obtenus avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de : (A)  $100\text{fmol}.\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C et (B)  $500\text{fmol}.\mu\text{L}^{-1}$  auquel a été ajouté 5% d'acide formique (tension d'ionisation 1kV).

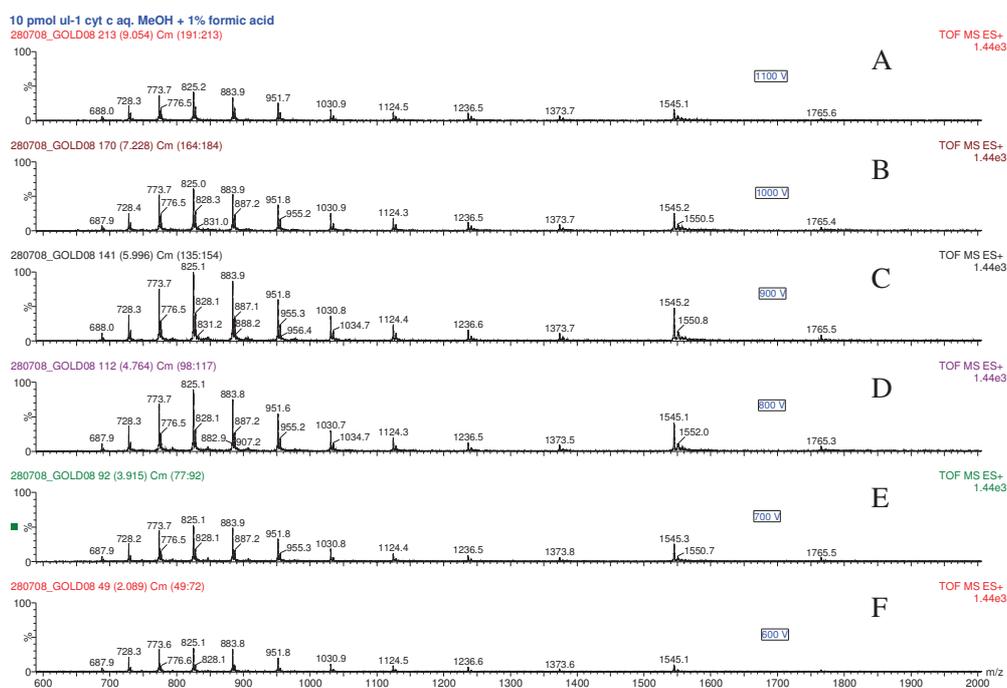
Dans les tests suivants, la concentration en acide formique a été portée à 25%. Cette forte augmentation d'acide a permis d'abaisser le seuil de détection à  $100\text{fmol}.\mu\text{L}^{-1}$  avec un rapport signal sur bruit de 5 (Figure III.22).



**Figure III.22 :** Spectres de masse obtenus avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte de concentration : (A)  $100\text{fmol}.\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C, (B)  $500\text{fmol}.\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C, (C)  $1\text{pmol}.\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C, (D)  $10\text{pmol}.\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C auquel a été ajouté 25% d'acide formique (tension d'ionisation 1kV).

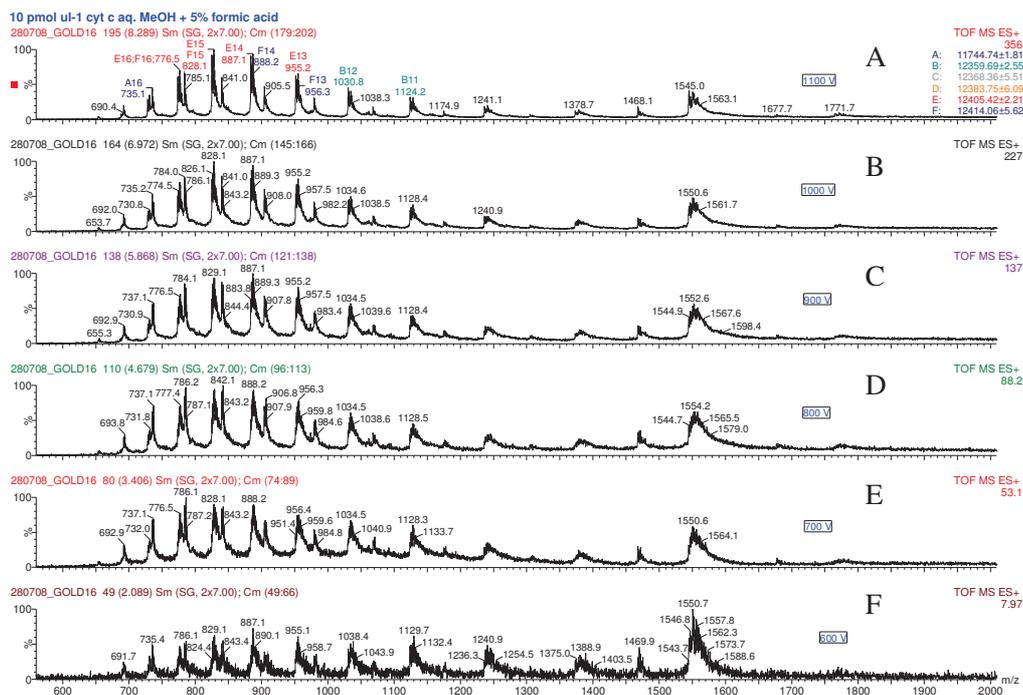
Cependant, même si elle permet de diminuer la concentration à partir de laquelle la protéine est détectée, cette forte teneur en acide n'est pas souhaitable pour les analyses car elle tend à dénaturer la protéine (désorganisation de la structure spatiale entraînant le dépliement de la chaîne polypeptidique par modification du pH entraînant un changement des charges portées par les groupes ionisables). En effet, la dénaturation provoque la perte d'activité, le changement des propriétés optiques et la modification de la solubilité pouvant conduire à l'agrégation et à la précipitation de la protéine.

Par la suite, le seuil de la tension à partir de laquelle un spectre est obtenu a été déterminé en utilisant une solution de concentration  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de cytochrome C (eau/méthanol : 50/50 + 1% d'acide formique) et en faisant varier la tension d'ionisation de 600 à 1.1kV (Figure III.23).



**Figure III.23 :** Spectres de masse obtenus avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C, 1% d'acide formique, pour une tension d'ionisation de : (A) 1.1kV, (B) 1kV, (C) 900V, (D) 800V, (E) 700V, (F) 600V.

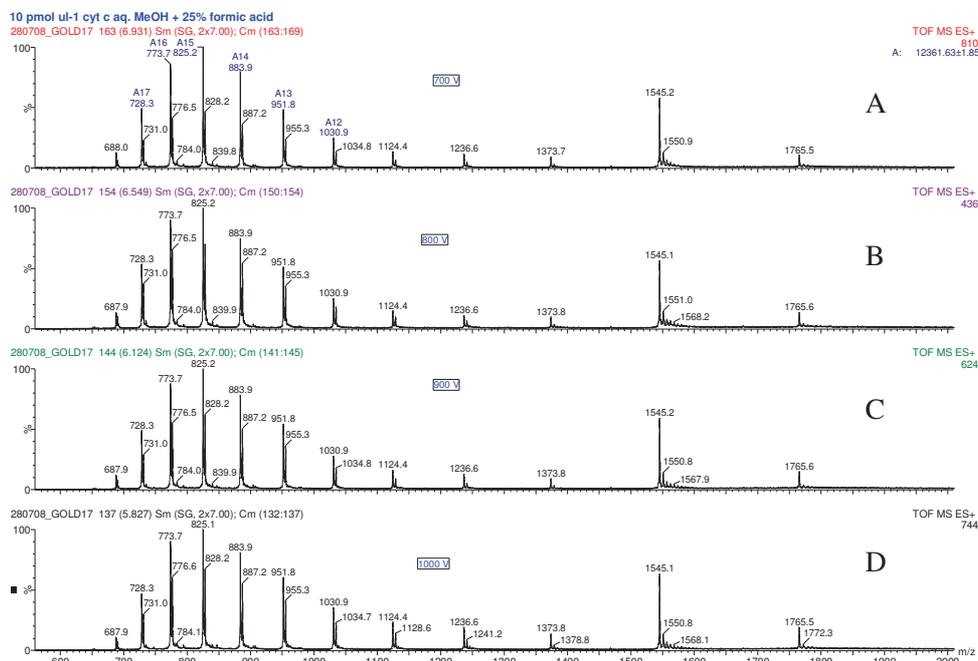
Ces résultats montrent que la protéine est détectable à partir d'une tension d'ionisation de 600V cependant l'intensité du spectre est plus faible que pour une tension plus élevée. La même expérience a été menée avec une solution de même concentration en cytochrome C (10pmol.µL<sup>-1</sup>, eau/méthanol : 50/50) mais avec 5% d'acide formique (Figure III.24).



**Figure III.24 :** Spectres de masse obtenus avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec 2µL d'analyte d'une concentration de 10pmol.µL<sup>-1</sup> en cytochrome C, 5% d'acide formique, pour une tension d'ionisation de : (A) 1.1kV, (B) 1kV, (C) 900V, (D) 800V, (E) 700V, (F) 600V.

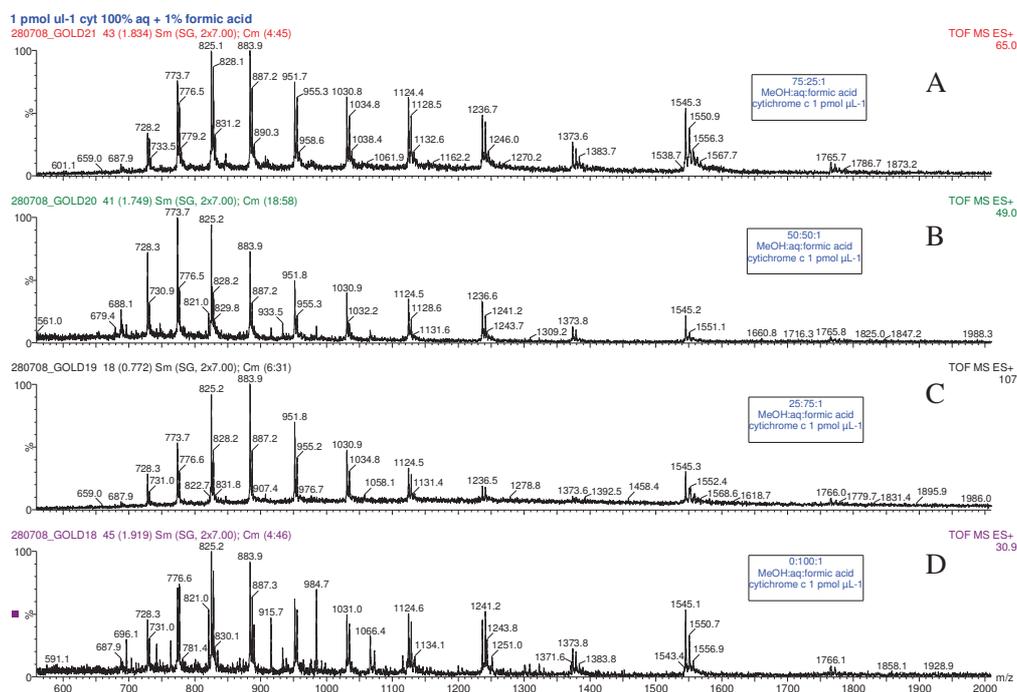
Les spectres montrent qu'une fois encore une tension d'ionisation de 600V est suffisante pour détecter le cytochrome C, cependant l'intensité du spectre est beaucoup plus faible que précédemment donc l'ajout léger d'acide formique ne permet pas de diminuer la tension d'ionisation.

L'augmentation de la concentration en acide formique à 25%, ne permet pas non plus d'abaisser la tension d'ionisation puisque le premier spectre est obtenu pour une tension de 700V (Figure III.25).



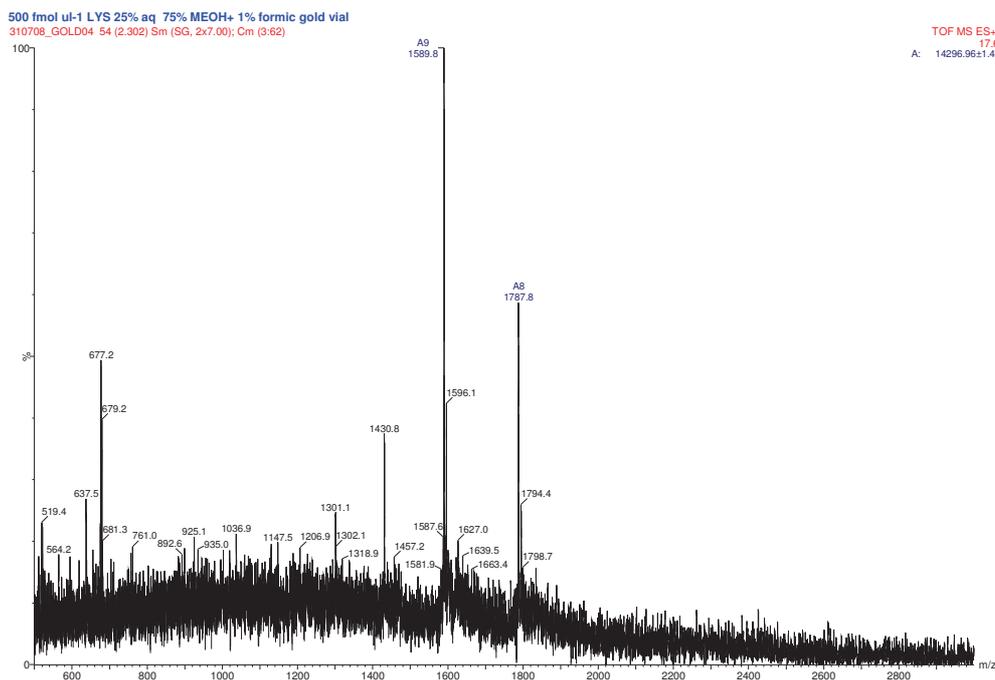
**Figure III.25 :** Spectres de masse obtenus avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C, 25% d'acide formique, pour une tension d'ionisation de : (A) 700V, (B) 800V, (C) 900V, (D) 1000V.

L'influence de la composition du mélange méthanol/eau sur la stabilité et l'efficacité du processus d'électrospray a été étudiée. Pour ce faire, diverses solutions de concentration  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C, 1% d'acide formique avec des proportions méthanol/eau égales à 75/25, 50/50, 25/75 ou encore 0/100 ont été testées. Les résultats présentés Figure III.26 montrent que le cytochrome C est aussi bien décelé quelque soit la composition du mélange.



**Figure III.26 :** Spectres de masse obtenus avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec  $2\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C, 1% d'acide formique, pour une composition méthanol/eau de : (A) 75/25, (B) 50/50, (C) 25/75, (D) 0/100 (tension d'ionisation 1kV).

Cependant, le méthanol étant plus volatil que l'eau, la volatilité relative de la solution augmente avec le volume de méthanol utilisé ce qui tend à améliorer la stabilité du signal et la sensibilité. En effet, les gouttelettes formées étant beaucoup plus volatiles sont plus facilement évaporées et ionisées, les ions peuvent donc être transférés de manière plus efficace de la phase liquide à la phase gazeuse. De plus, le méthanol étant moins visqueux que l'eau, les gouttelettes formées sont de plus petite taille. Ceci a pu être mis en évidence avec le lysozyme de blanc d'œuf de poule pour lequel le seuil de détection est descendu à  $500\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en utilisant une solution aqueuse composée de 75% de méthanol, 25% d'eau et 1% d'acide formique au lieu d'une solution composée de 50% de méthanol, 50% d'eau et 1% d'acide formique pour laquelle le seuil de détection était de  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (Figure III.27).



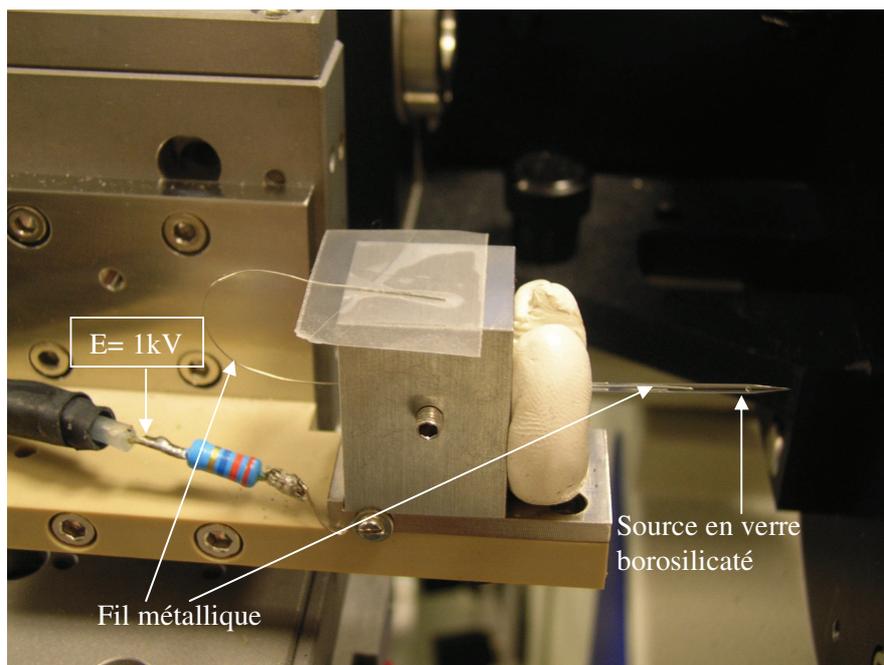
**Figure III.27 :** Spectre de masse obtenu avec une aiguille en verre borosilicaté chargée avec 2µL d'analyte d'une concentration de 500fmol.µL<sup>-1</sup> en lysozyme de blanc d'œuf de poule, 1% d'acide formique, pour une composition méthanol/eau de 75/25 (tension d'ionisation 1kV).

L'impact de la composition en méthanol et en eau du mélange sur la tension d'ionisation a également été évalué avec une solution de cytochrome C d'une concentration de 1pmol.µL<sup>-1</sup> à laquelle a été ajouté 1% d'acide formique. Les résultats obtenus (Table III.1) montrent que pour la solution composée exclusivement d'eau la tension à appliquer pour obtenir un spectre est plus importante (750V) que pour la solution dans laquelle il n'y a que 25% d'eau (600V) ce qui s'explique par le fait que plus il y a d'eau, plus la tension de surface du liquide est élevée, il faut donc un champ électrique plus important pour rompre le liquide.

**Table III.1 :** Valeurs de la tension d'ionisation en fonction des proportions en méthanol et en eau dans une solution de cytochrome C à 1pmol.µL<sup>-1</sup> avec 1% d'acide formique.

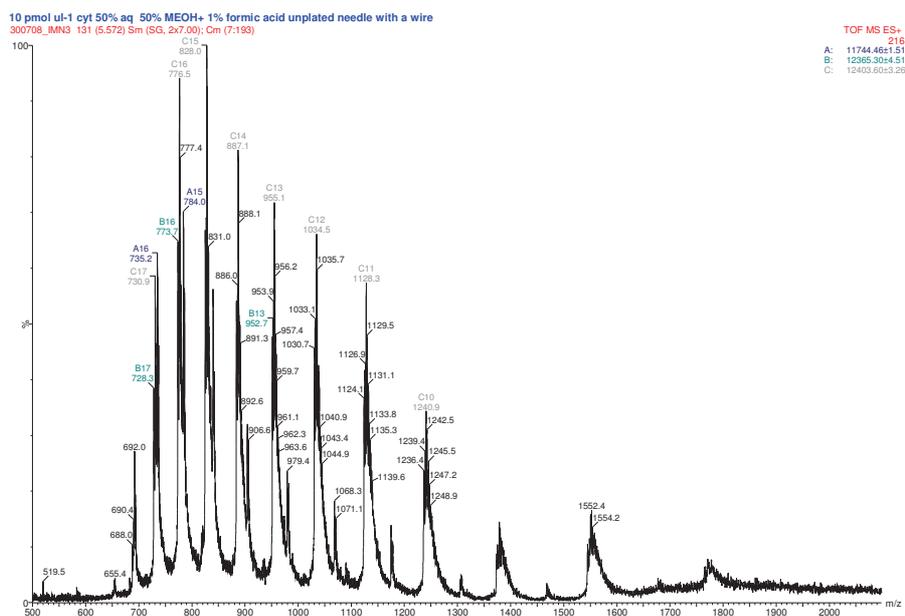
Pourcentage méthanol/eau (%)	Tension d'ionisation (V)
75/25	600
50/50	640
0/100	750

Enfin, des tests ont été menés avec des aiguilles en verre borosilicaté non recouvertes par une couche d'Or afin de s'assurer que la tension d'ionisation pouvait être transmise par l'intermédiaire d'un simple fil métallique plongé dans la solution à analyser (Figure III.28) ; configuration dans laquelle vont être effectués les tests avec les dispositifs micro-fabriqués.



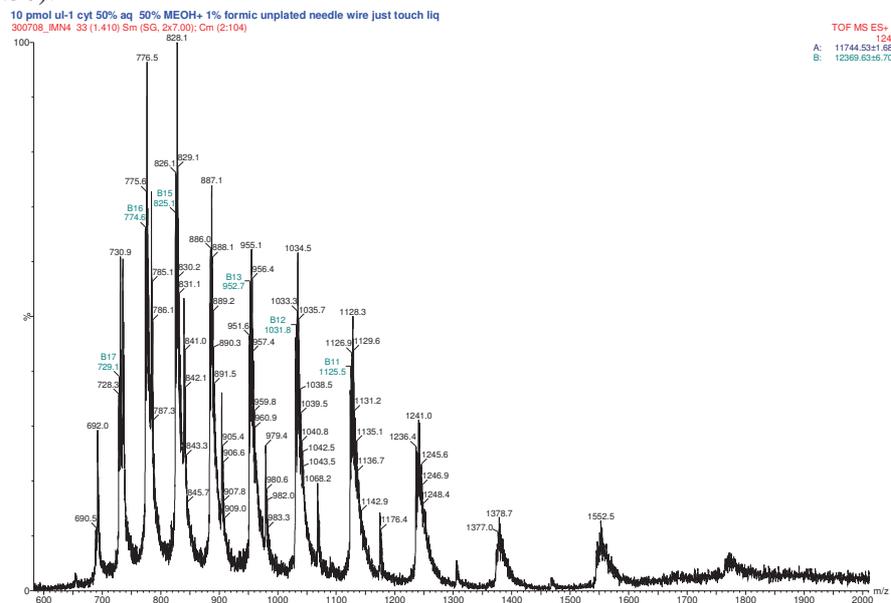
**Figure III.28** : Photographie du montage utilisé pour les tests avec l'aiguille en verre borosilicaté dépourvue de revêtement métallique. La source est maintenue en position grâce à de la pâte à fixer. La tension d'ionisation est appliquée par l'intermédiaire d'un fil métallique dont une extrémité est collée à l'aide d'un adhésif sur la pièce métallique où arrive le potentiel, l'autre extrémité étant insérée dans l'aiguille remplie de liquide.

La Figure III.29 présente le spectre obtenu lorsque le fil est inséré jusqu'au fond de l'aiguille pour une solution à  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de cytochrome C (eau/méthanol : 50/50 + 1% d'acide formique) pour une tension de 800V.



**Figure III.29** : Spectre de masse obtenu avec une aiguille en verre borosilicaté (non recouverte par un dépôt métallique) chargée avec 2 $\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de 10 pmol. $\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C (méthanol/eau : 50/50+1% d'acide formique), pour une tension d'ionisation de 800V appliquée à l'aide d'un fil métallique plongé dans la solution en l'introduisant jusqu'à l'extrémité de la source.

Un autre test a été effectué en introduisant le fil dans l'aiguille mais juste au bord du liquide (Figure III.30).



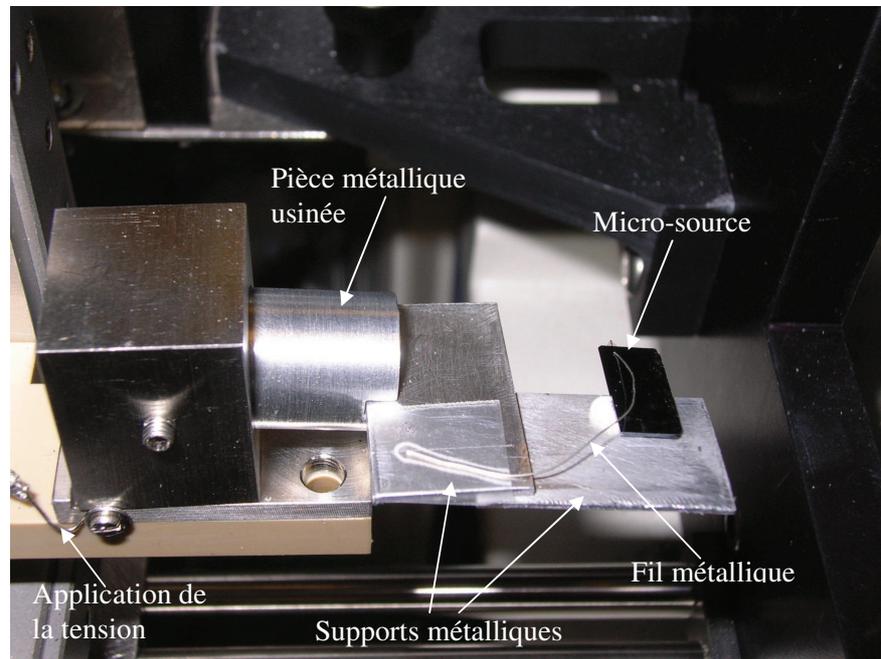
**Figure III.30** : Spectre de masse obtenu avec une aiguille en verre borosilicaté (non recouverte par un dépôt métallique) chargée avec 2 $\mu\text{L}$  d'analyte d'une concentration de 10 pmol. $\mu\text{L}^{-1}$  en cytochrome C (méthanol/eau : 50/50+1% d'acide formique), pour une tension de 600V appliquée à l'aide d'un fil métallique touchant juste le liquide en l'introduisant au bord de la source.

Ces résultats permettent de valider le mode d'application de la tension par l'intermédiaire d'un fil métallique pour les tests avec les dispositifs micro-fabriqués.

En conclusion, toutes ces expériences ont permis d'établir le seuil de sensibilité des aiguilles en verre borosilicaté (2 $\mu$ m de diamètre interne) en termes de concentration minimale de protéine pouvant être identifiée. Celle-ci est de 1pmol. $\mu$ L<sup>-1</sup> dans la plupart des cas mais peut être ramenée à 500fmol. $\mu$ L<sup>-1</sup> lorsqu'une solution composée de 75% de méthanol tendant à améliorer l'ionisation est employée. L'augmentation de la concentration en acide formique jusqu'à 25% permet d'atteindre un seuil de 100fmol. $\mu$ L<sup>-1</sup> mais n'est pas souhaitable car la protéine est dénaturée et perd donc ses propriétés. Les performances de ces sources ont également été évaluées en terme de tension d'ionisation minimale. Des spectres ont été obtenus à partir de 600V. Enfin, la transmission de cette tension par un simple fil métallique dans le cas d'une aiguille dépourvue d'un revêtement conducteur a été expérimentée. Ceci a permis de valider le montage qui sera utilisé par la suite pour les tests suivants avec les sources micro-fabriquées.

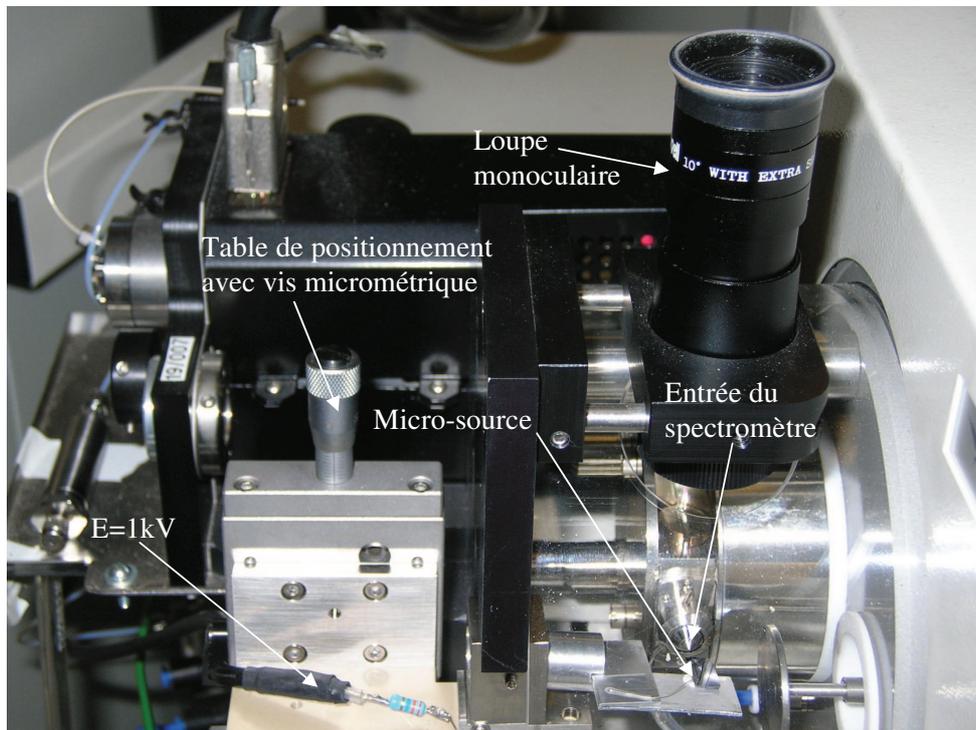
## 1-2 Résultats obtenus pour les micro-sources

La Figure III.31 montre le montage utilisé afin d'effectuer les essais en spectrométrie de masse avec les micro-sources réalisées par gravure profonde du silicium. La pièce d'origine de forme cylindrique utilisée pour maintenir les sources conventionnelles est ici remplacée par une pièce métallique qui a été usinée. Celle-ci présente également une partie cylindrique afin de pouvoir la fixer comme la pièce d'origine à l'aide d'une vis. L'extrémité du cylindre comporte une rainure et se prolonge par une partie plate permettant de caler des supports métalliques sur lesquels est collée la micro-source à l'aide de pâte à fixer. Les supports métalliques permettent de positionner correctement la micro-source en face de l'entrée du spectromètre. La tension est appliquée par l'intermédiaire d'un fil comme dans le cadre des tests réalisés avec les aiguilles en verre borosilicaté dépourvu d'un revêtement métallique.



**Figure III.31** : Photographie du montage utilisé pour les tests en spectrométrie de masse avec une source micro-fabriquée par gravure profonde du silicium.

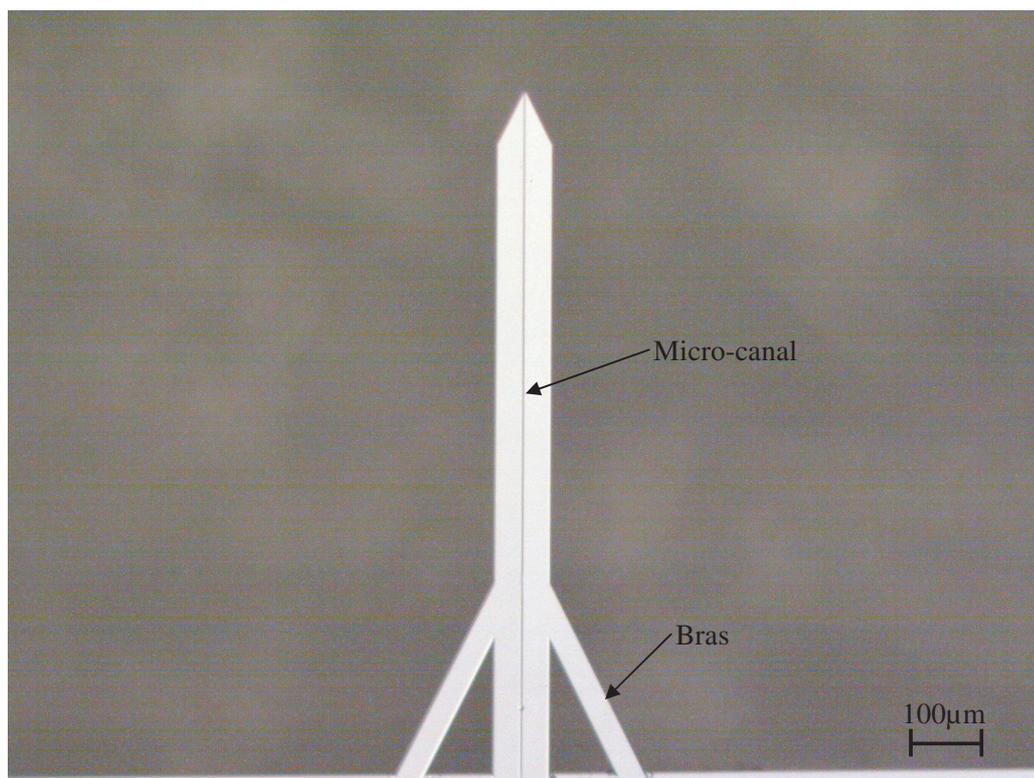
Une fois le montage terminé, le dispositif est chargé avec l'échantillon à analyser. Celui-ci est déposé à l'aide d'une micro-seringue au niveau de la fente qui se remplit par capillarité jusqu'à l'extrémité de la pointe. Comme pour les aiguilles, la source est ensuite poussée devant l'entrée du spectromètre de masse, une tension de l'ordre de 1kV est appliquée et la position de celle-ci est ajustée dans les trois directions  $xyz$  grâce aux vis micrométriques de la table de déplacement jusqu'à l'obtention d'un nébulisat. Une loupe monoculaire montée au-dessus de l'entrée permet de contrôler le déplacement de la source et de visualiser son fonctionnement (Figure III.32).



**Figure III.32 :** Photographie de la micro-source placée juste devant l'entrée du spectromètre de masse.

Notons que pour observer la formation d'un cône de Taylor, l'extrémité de la source doit être placée beaucoup plus près de l'entrée du spectromètre comparativement à une aiguille ce qui explique la position de celle-ci dans l'alignement de l'entrée au lieu d'être placée perpendiculairement à celle-ci, entraînant une modification des conditions d'ionisation par accroissement du débit de liquide.

La micro-source testée a été réalisée par gravure profonde du polysilicium (Cf. Chapitre 2) et ne comporte que 2 bras (Figure III.33).

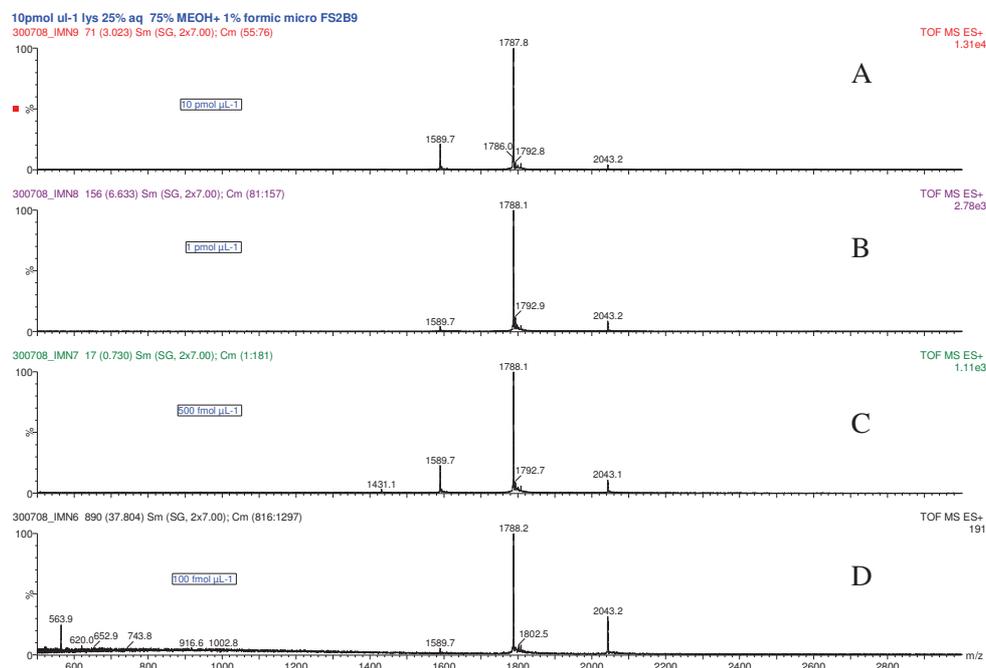


**Figure III.33** : Photo au microscope optique de la micro-source utilisée pour les tests de sensibilité en spectrométrie de masse.

La longueur de la structure est de l'ordre de 1.5mm. La largeur du canal micro-fluidique est de 1µm. Une couche de 10nm de SiO<sub>2</sub> PECVD a été déposée. Ce revêtement hydrophile a pour but de favoriser le remplissage spontané par capillarité du micro-canal.

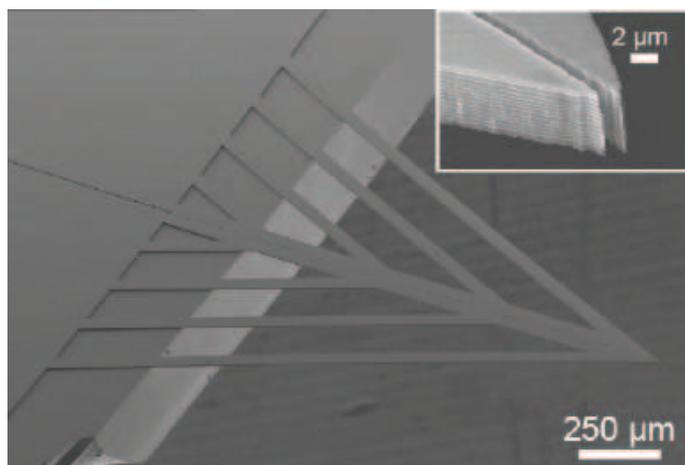
Comme pour les sources commerciales, des tests permettant d'établir la limite de détection de tels émetteurs ont été effectués avec une solution de lysozyme de blanc d'œuf de poule (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK) dont on a fait varier la concentration de 1fmol.µL<sup>-1</sup> à 10pmol.µL<sup>-1</sup> (eau/méthanol : 25/75 + 1% d'acide formique) en appliquant une tension d'ionisation de 1.2kV. Tous les solvants utilisés sont de qualité CLHP (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) et sont fournis par Fisher Scientific, Loughborough, Leics. Les spectres de masse ont été acquis pour un ratio masse sur charge (m/z) allant de 500 à 3000.

La Figure III.34 présente les spectres de masse obtenus pour une concentration de 10pmol.µL<sup>-1</sup>, 1pmol.µL<sup>-1</sup>, 500fmol.µL<sup>-1</sup> et 100fmol.µL<sup>-1</sup> de lysozyme.

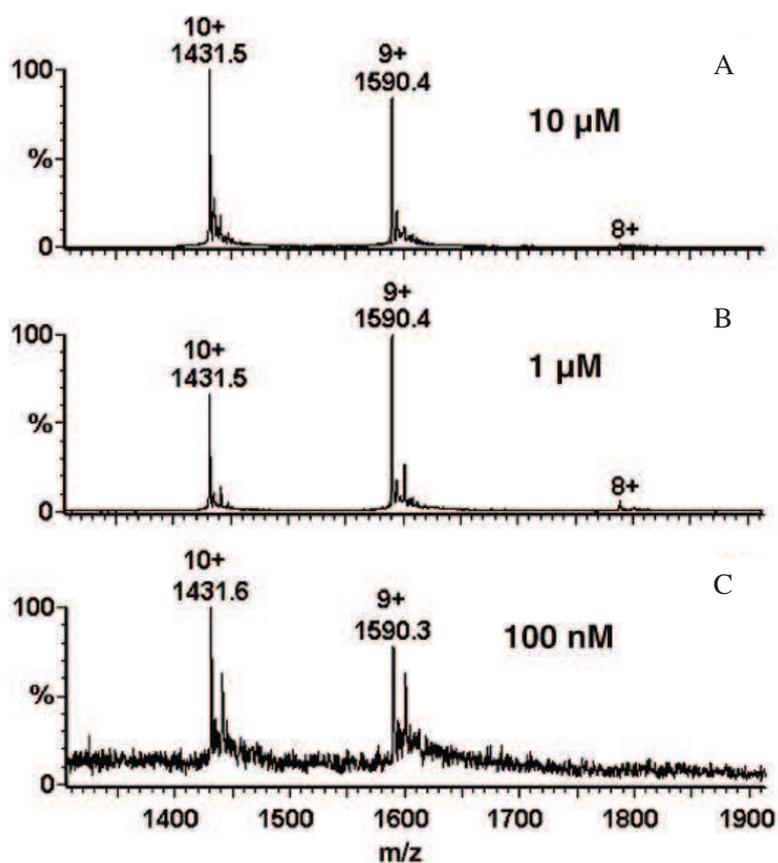


**Figure III.34 :** Spectres de masse obtenus avec une micro-source à 2 bras chargée avec une solution de lysozyme de blanc d'œuf de poule (eau/méthanol : 25/75 + 1% d'acide formique) de concentration : (A)  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , (B)  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , (C)  $500\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , (D)  $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (tension d'ionisation 1.2kV).

Les états de charges 7+, 8+ et 9+ et même 10+ pour le spectre à  $500\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  sont mis en évidence. Ces résultats ont montré que la concentration minimale de lysozyme pouvant être détectée est de  $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , aucun spectre n'ayant été obtenu avec des concentrations plus faibles, comme dans le cas d'une micro-source à 4 bras comportant un micro-canal de même dimension (Figures III.35 et III.36) [Ars 07] [Leg 07].



**Figure III.35 :** Image au microscope électronique à balayage de la micro-source à 4 bras testée en spectrométrie de masse. L'encart montre l'extrémité de la source [Leg 07].



**Figure III.36 :** Spectres de masse obtenus avec une micro-source à 4 bras chargée avec une solution de lysozyme de blanc d'œuf de poule (eau/méthanol : 50/50 + 1% d'acide formique) de concentration : (A)  $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , (B)  $1 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , (C)  $100 \text{ fmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (tension d'ionisation  $1 \text{ kV}$ ) [Ars 07].

Ces sources sont donc dix fois plus sensibles que celles développées par Le Gac en polysilicium (section  $2.5\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}$ ) dont le seuil de détection était de  $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  pour le Glu-fibrinopeptide B (Cf. lexique) [Ars 05 a]. De plus, le rapport signal sur bruit est meilleur que pour les sources commerciales.

Contrairement aux sources standard, le débit de l'échantillon ne peut pas être forcé de l'extérieur, le débit dans le spectromètre de masse est donné par l'émission par électronébulisation. Le débit minimum du nébulisat  $Q_0$  est donné par l'équation suivante [Gañ 05] :

$$Q_0 = \gamma \varepsilon_0 / \rho \kappa \quad (10)$$

où  $\gamma$  est l'énergie de surface de la solution ( $\sim 50\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ),  $\varepsilon_0$  est la permittivité du vide ( $8.85\times 10^{-12}\text{F}\cdot\text{m}^{-1}$ ),  $\rho$  la densité de l'échantillon ( $898\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) et  $\kappa$  la conductivité de la solution ( $0.26\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$ ). En utilisant les paramètres de l'échantillon (MeOH :H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :HCOOH v/v/v 50 :50 :1), le débit minimum est estimé comme étant inférieur à  $1\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$  ( $\sim 113\text{pL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Les spectres montrent clairement qu'un bon rapport signal sur bruit est obtenu même pour les concentrations les plus faibles en lysozyme (Table III.2).

**Table III.2 :** *Résumé des résultats obtenus pour les tests en sensibilité.*

Concentration	Ions comptabilisés	Rapport signal sur bruit
$100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	191	12
$500\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	1110	50
$1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	2780	100
$10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	13100	100

En conclusion, ces caractérisations ont permis d'établir le seuil de sensibilité des micro-sources réalisées par gravure profonde du silicium (orifice de section  $1\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}$ ). La concentration minimale de protéine pouvant être identifiée est de  $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  soit cinq fois

plus petite que pour les sources standard ( $500\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ). La tension d'ionisation minimale est de l'ordre de  $1\text{kV}$ , soit la tension qui est utilisée couramment pour les tests en spectrométrie de masse avec les aiguilles en verre borosilicaté. Le débit minimum théorique de ces micro-sources avec la solution utilisée est inférieur à  $1\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Cependant, attention, celui-ci n'est calculé qu'à partir des paramètres du liquide et ne fait en aucun cas intervenir la taille de la source. Nous verrons par la suite qu'il est un peu plus élevé en tenant compte de ce paramètre. Mais avant, nous allons déterminer la limite de détection des nano-sources.

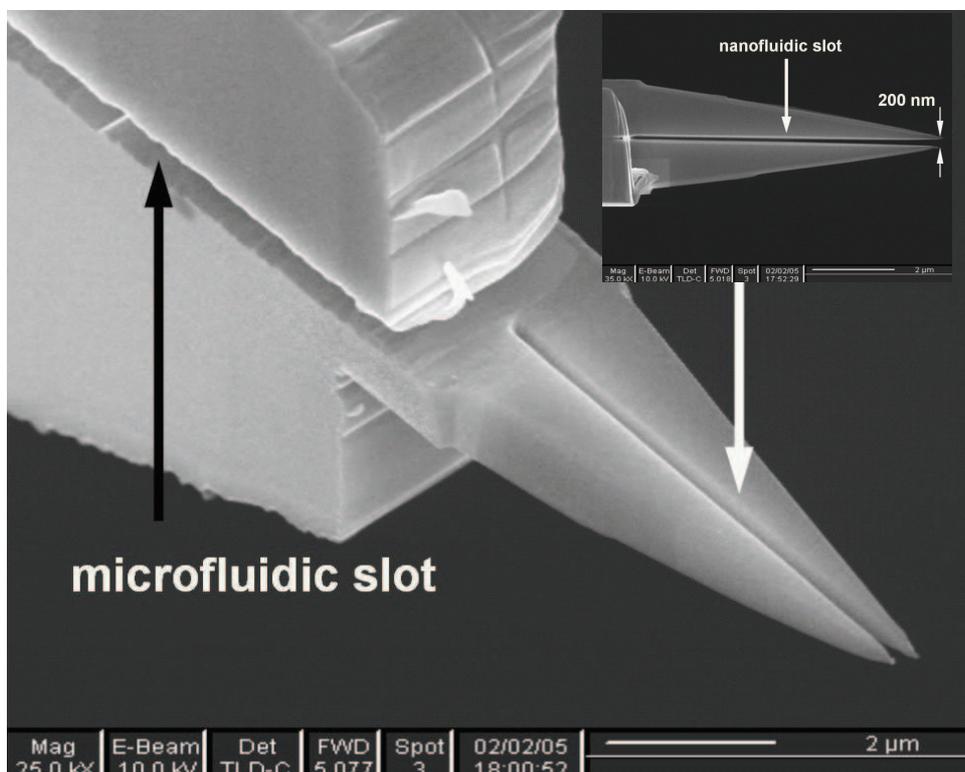
### 1-3 Résultats obtenus pour les nano-sources

Le montage utilisé afin d'effectuer les tests en spectrométrie de masse avec les nano-sources est identique à celui pour les micro-sources.

Une fois le montage terminé, le dispositif est chargé avec l'échantillon à analyser. Celui-ci est déposé à l'aide d'une micro-seringue au niveau de la fente qui se remplit par capillarité jusqu'à l'extrémité de la pointe. Comme pour les micro-sources, la nano-source est ensuite poussée devant l'entrée du spectromètre de masse, une tension de l'ordre de  $1\text{kV}$  est appliquée et la position de celle-ci est ajustée dans les trois directions  $xyz$  grâce aux vis micrométriques de la table de déplacement jusqu'à l'obtention d'un nébulisat. Une loupe monoculaire montée au-dessus de l'entrée permet de contrôler le déplacement de la source et de visualiser son fonctionnement.

#### 1-3-1 Nano-source 1 : largeur du canal $200\text{nm}$

Les premiers tests en spectrométrie de masse ont été réalisés avec une nano-source munie d'un nano-canal de  $200\text{nm}$  de large et présentant une topologie de type "orthogonale", c'est-à-dire que le canal nano-fluidique n'est pas dans le prolongement du canal micro-fluidique mais orthogonal à celui-ci (Figure III.37).



**Figure III.37** : Image au microscope électronique à balayage de la nano-source usinée au FIB pour les tests en spectrométrie de masse. L'encart présente un zoom sur l'extrémité qui comporte un canal nanofluidique de 100 x 200nm [Des 05 a].

La Figure III.38 présente le spectre de masse obtenu en utilisant cette nano-source pour une solution de  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de myoglobine de cœur de cheval (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK) (eau/méthanol : 50/50 + 0.5% d'acide formique). Tous les solvants utilisés sont de qualité CLHP (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) et sont fournis par Fisher Scientific, Loughborough, Leics.

L'analyse a été réalisée en déposant à l'aide d'une micro-pipette environ  $5\mu\text{L}$  de cette solution au niveau du canal micro-fluidique de  $1\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$  et en appliquant une tension de 1kV. Le signal a été moyenné sur une période de 3 secondes. Le rapport signal sur bruit est de 50.

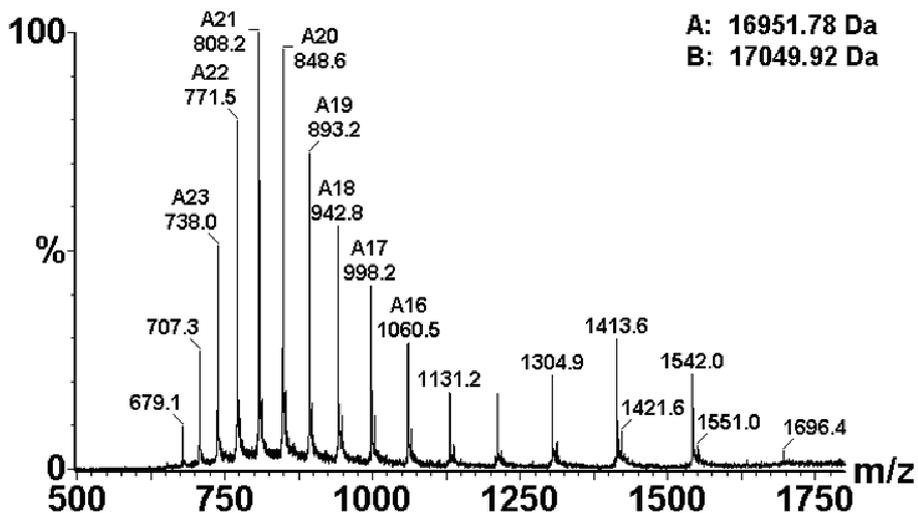


Figure III.38 : Spectre de masse obtenu en utilisant une nano-source chargée avec une solution de myoglobine de cœur de cheval (eau/méthanol : 50/50 + 0.5% d'acide formique) de concentration  $10\text{pmol}.\mu\text{L}^{-1}$  (tension d'ionisation 1kV) [Des 05 a].

### 1-3-2 Nano-source 2 : largeur du canal 50nm

La même expérience a été reproduite avec une nano-source présentant un canal nanofluidique plus étroit de 50nm de large au lieu de 200nm (Figure III.39) [Des 05 b].

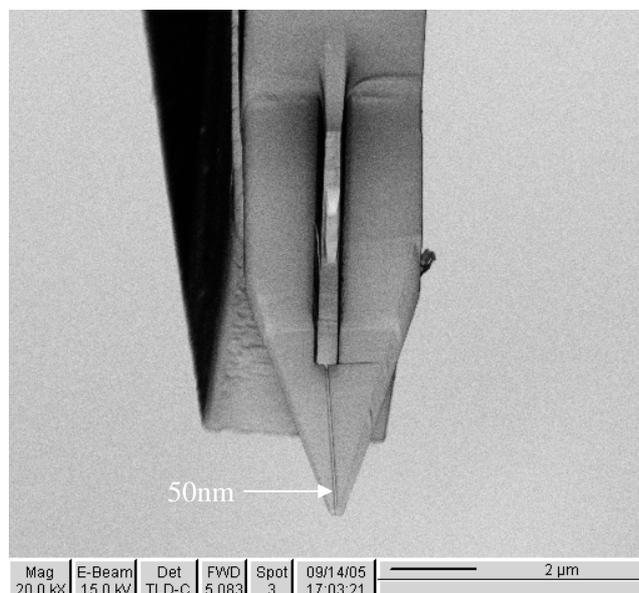
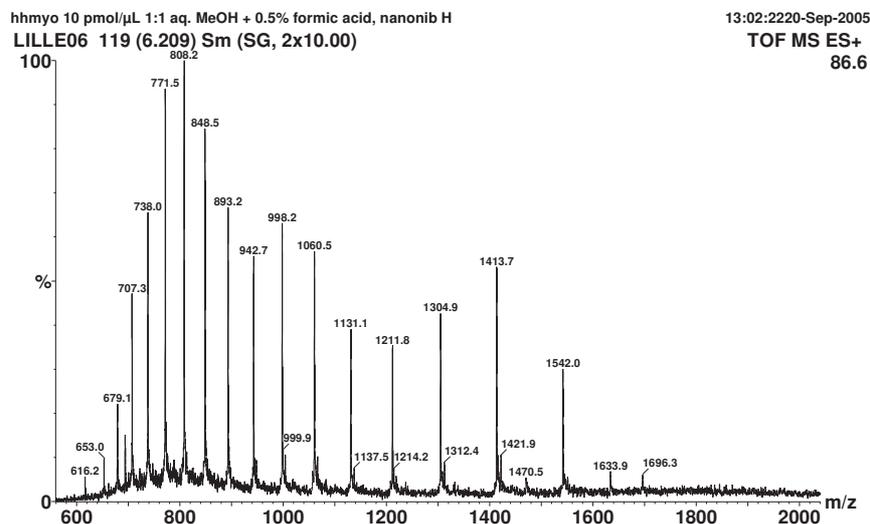


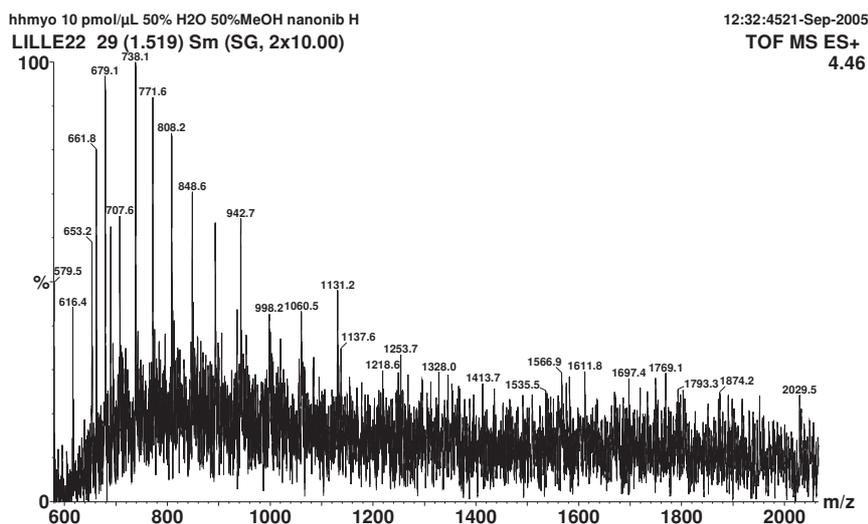
Figure III.39 : Image au microscope électronique à balayage de la nano-source usinée au FIB pour les tests en spectrométrie de masse. L'extrémité comporte un canal nanofluidique de 50nm [Des 05 b].

La Figure III.40 présente le spectre de masse obtenu en utilisant cette nano-source pour une solution de  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de myoglobine de cœur de cheval (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK) (eau/méthanol : 50/50 + 0.5% d'acide formique). Le rapport signal sur bruit est de 25.



**Figure III.40 :** Spectre de masse obtenu en utilisant une nano-source chargée avec une solution de myoglobine de cœur de cheval (eau/méthanol : 50/50 + 0.5% d'acide formique) de concentration  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (tension d'ionisation 1kV) [Des 05 b].

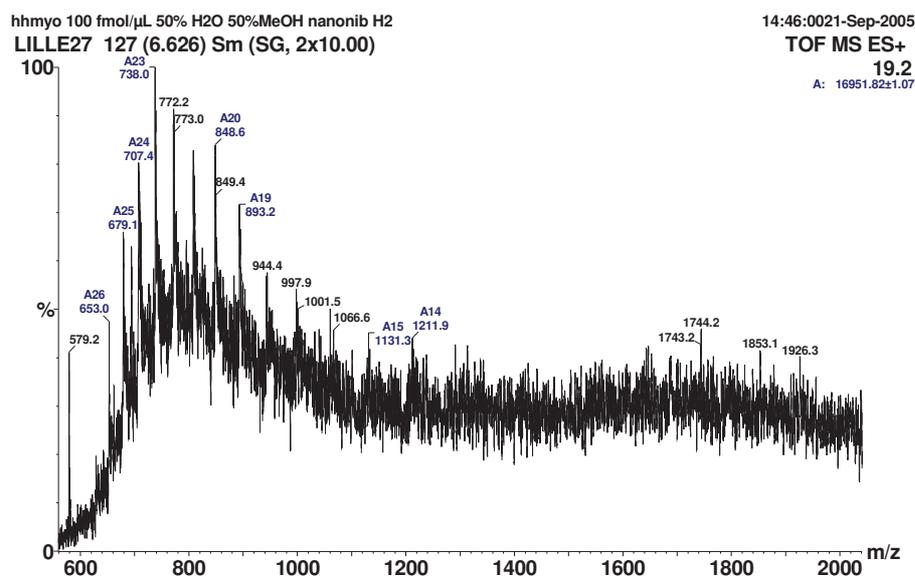
La robustesse de cette nano-source a été évaluée. Ainsi après plus de 20 utilisations, celle-ci ne se bouche pas immédiatement et fonctionne toujours comme le montre la Figure III.41, la myoglobine est bien identifiée.



**Figure III.41 :** Spectre de masse obtenu avec une nano-source usagée (plus de 20 utilisations) chargée avec une solution de myoglobine de cœur de cheval (eau/méthanol : 50/50 + 0.5% d'acide formique) de concentration  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (tension d'ionisation 1kV) [Des 05 b].

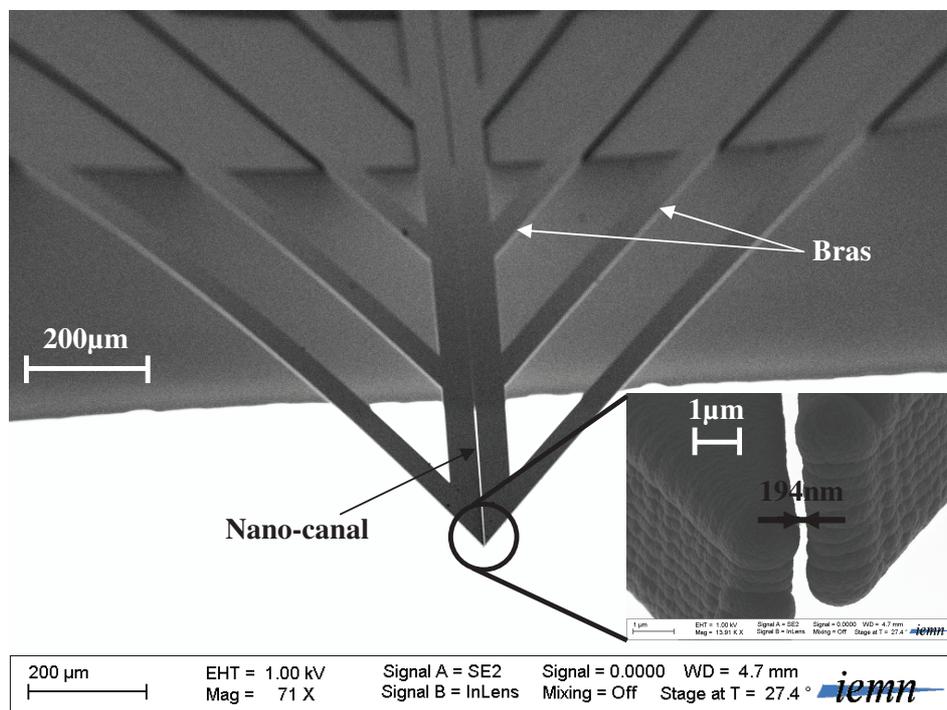
Néanmoins, le spectre obtenu est de moins bonne qualité que pour une source neuve, le bruit étant plus important, le rapport signal sur bruit est plus petit (de l'ordre de 5 au lieu de 25). Ceci peut s'expliquer par le fait que lors de l'assèchement de la source par consommation et évaporation de la solution analysée, des agrégats sont sûrement adsorbés sur les parois du nano-canal entraînant une obstruction partielle de celui-ci.

Ensuite, des tests permettant d'établir la limite de détection de tels émetteurs ont été effectués avec le même analyte dont on a fait varier la concentration de  $1\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  à  $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (eau/méthanol : 50/50 + 0.5% d'acide formique) en appliquant une tension d'ionisation de 1kV. Les résultats ont montré que la concentration minimale de myoglobine pouvant être détectée est de  $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , aucun spectre n'ayant été obtenu avec des concentrations plus faibles (Figure III.42). A cette concentration, le niveau de bruit est élevé (rapport signal sur bruit de 3).



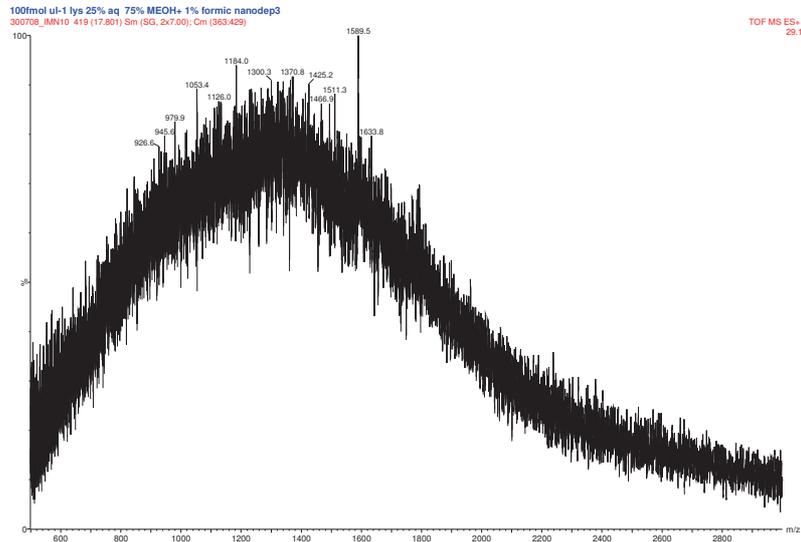
**Figure III.42 :** Spectre de masse obtenu avec une nano-source chargée par une solution de myoglobine de cœur de cheval (eau/méthanol : 50/50 + 0.5% d'acide formique) de concentration  $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (tension d'ionisation 1kV) [Des 05 b].

Ces caractérisations ont par la suite été réitérées avec une nano-source fabriquée par une voie technologique différente. Comme vu dans le chapitre précédent, celle-ci est obtenue à partir d'une micro-plume à 4 bras présentant un micro-canal de  $1.8\mu\text{m}$  dont la largeur est réduite par un dépôt de 700nm de dioxyde de silicium ( $\text{SiO}_2$ ) par PECVD. Le nano-canal obtenu par cette méthode présente une largeur d'environ 200nm (Figure III.43).



**Figure III.43 :** Image au microscope électronique à balayage de la nano-source testée en spectrométrie de masse et réalisée par un dépôt en phase vapeur de 700nm de SiO<sub>2</sub>. L'encart présente un agrandissement sur l'extrémité de cette source. La largeur du canal nanofluidique est de l'ordre de 200nm.

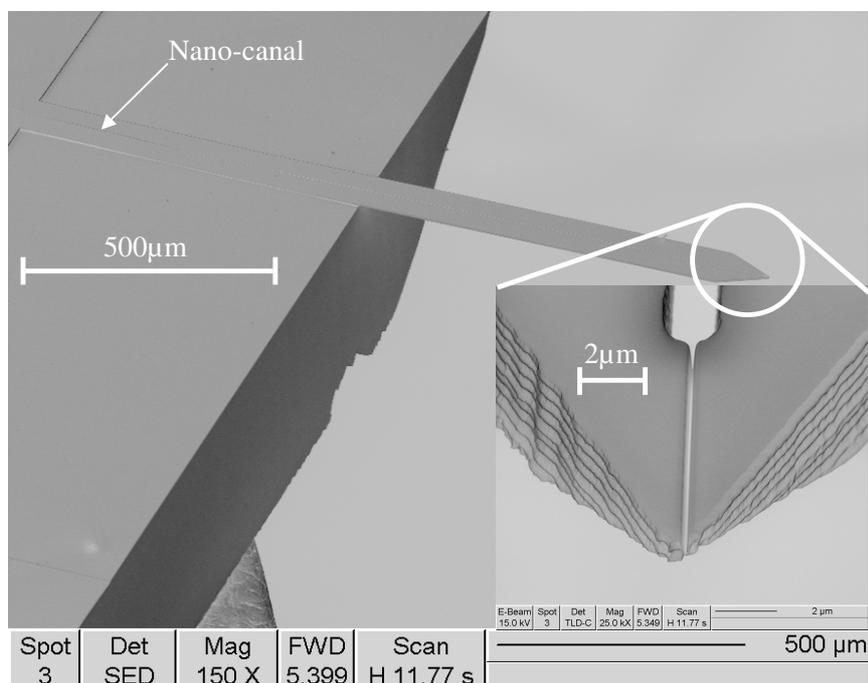
Une fois encore la limite de détection pour ce type de dispositif est de 100fmol.μL<sup>-1</sup> pour le lysozyme de blanc d'œuf de poule (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK) en appliquant une tension de 1.8kV. Cependant, bien que les dispositifs aient un nano-canal de la même dimension, le niveau de bruit est beaucoup plus élevé (Figure III.44) que pour la nano-source de type "orthogonale" et la myoglobine de cœur de cheval. Seul le pic à m/z=1589.5 apparaît sur le spectre. Ceci pourrait peut-être s'expliquer par la rugosité de la couche épaisse de dioxyde de silicium déposée à basse température qui piègerait le lysozyme sur les parois de la source (taille du lysozyme : 14.5Å) [Ham 04].



**Figure III.44 :** Spectre de masse obtenu avec une nano-source réalisée par dépôt chimique en phase vapeur de 700nm de SiO<sub>2</sub> et chargée avec une solution de lysozyme de blanc d'œuf de poule (eau/méthanol : 25/75 + 1% d'acide formique) de concentration 100fmol.μL<sup>-1</sup> (tension d'ionisation 1.8kV).

### 1-3-3 Nano-source 3 : largeur du canal 100nm

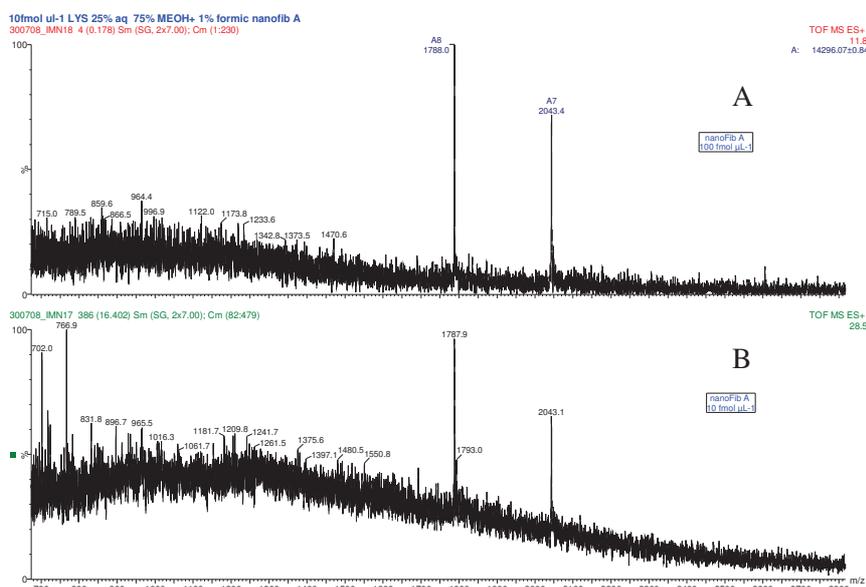
Un troisième type de source a été testé de la même façon. Il s'agit d'une nano-source usinée au FIB mais cette fois-ci, le nano-canal de 100nm est dans le prolongement du micro-canal de 1μm de large (Figure III.45).



**Figure III.45 :** Image au microscope électronique à balayage de la nano-source testée en spectrométrie de masse et réalisée par micro-usinage au FIB. L'encart présente un agrandissement sur l'extrémité de cette source. La largeur du canal nanofluidique est de l'ordre de 100nm.

Une couche de 10nm de SiO<sub>2</sub> PECVD a été déposée. Ce revêtement hydrophile a pour but de favoriser le remplissage spontané par capillarité du micro-canal et du nano-canal.

Les résultats obtenus montrent qu'avec ce type de nano-source le lysozyme de blanc d'œuf de poule peut-être identifié pour une concentration aussi faible que 10fmol.µL<sup>-1</sup> en appliquant une tension de 1.8kV (Figure III.46). Les spectres présentent deux pics à m/z=1788 et m/Z=2043. Plus la concentration diminue plus le rapport signal sur bruit est petit. Il est de 5 pour une concentration de 100fmol.µL<sup>-1</sup> et seulement de 2.5 pour une concentration de 10fmol.µL<sup>-1</sup>.



**Figure III.46 :** Spectres de masse obtenus avec une nano-source usinée au FIB chargée avec une solution de lysozyme de blanc d'œuf de poule (eau/méthanol : 25/75 + 1% d'acide formique) de concentration : (A)  $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , (B)  $10\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (tension d'ionisation 1.8kV).

En conclusion, ces expériences ont permis d'établir le seuil de sensibilité des nano-sources réalisées soit par FIB soit par un dépôt en phase vapeur de  $\text{SiO}_2$  PECVD présentant un nano-canal de 200nm, 100nm ou 50nm de large. La concentration minimale de protéine pouvant être identifiée est de  $10\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  soit cinquante fois plus petite que pour les sources standard ( $500\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) et dix fois plus petite que pour les micro-sources ( $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ). La réduction de la taille de l'extrémité de la source à l'échelle nanométrique a donc permis d'améliorer les performances de la spectrométrie de masse en termes de seuil de détection. Concernant la tension d'ionisation on reste dans la gamme de 1 à 1.8kV, soit une tension comparable ou légèrement supérieure à celle utilisée pour les tests en spectrométrie de masse avec les aiguilles en verre borosilicaté. Néanmoins, nous avons constaté que la tension de consigne est différente de la tension réelle. En effet, comme on le voit Figure III.28, il y a une résistance de  $33\text{M}\Omega$  entre le câble sur lequel arrive la tension de consigne et le support métallique. Ainsi, pour une tension de consigne de 1kV, la tension réelle appliquée sur la source (après la résistance) est d'environ 670V.

L'étude fondamentale de la nanofluidique en vue de l'émission et du contrôle de nanogouttelettes présente actuellement un intérêt majeur car elle pourrait être à la clé du développement de nouvelles technologies [Sal 05]. Ainsi, la détermination de la taille des gouttelettes du nébulisat en fonction de la taille et de la forme de la source peut s'avérer très utile étant donné qu'elle est directement liée à la sensibilité de l'analyse. En effet, plus les gouttelettes sont petites, plus efficace est l'ionisation des molécules. Ceci permettrait de mieux comprendre le phénomène d'électronébulisation en fonction de la géométrie et des propriétés d'une source en vue de leur perfectionnement. Cette étude fait l'objet de la suite de ce chapitre, dans laquelle nous proposons une méthode de caractérisation du nébulisat généré par une micro-source.

## 2- Caractérisation du nébulisat par microscope à force atomique (AFM)

Dans cette partie, des nano-gouttelettes de volume sub-attolitre ont pu être déposées à basse tension ( $<200$  V) sur une surface en utilisant une source micro-fabriquée constituée d'une fente capillaire microfluidique de section  $1.5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  définie par deux cantilevers triangulaires de  $500\mu\text{m}$  de long. Ces gouttelettes déposées par électronébulisation peuvent être de volume aussi petit que  $0.3 \pm 0.03 \text{ aL}$  et de diamètre  $83 \text{ nm} \pm 2.4 \text{ nm}$ . Elles sont déposées sur une surface, un substrat en silicium recouvert d'une couche de chrome déposée par pulvérisation cathodique. Sur cette surface, ces gouttelettes laissent une trace de l'ordre de  $190 \text{ nm}$  de diamètre. Ces valeurs ont été calculées en utilisant une méthode originale basée sur les observations au microscope à force atomique de la trace du nébulisat laissée par les gouttelettes chargées sur la surface de chrome [Des 06] [Des 07].

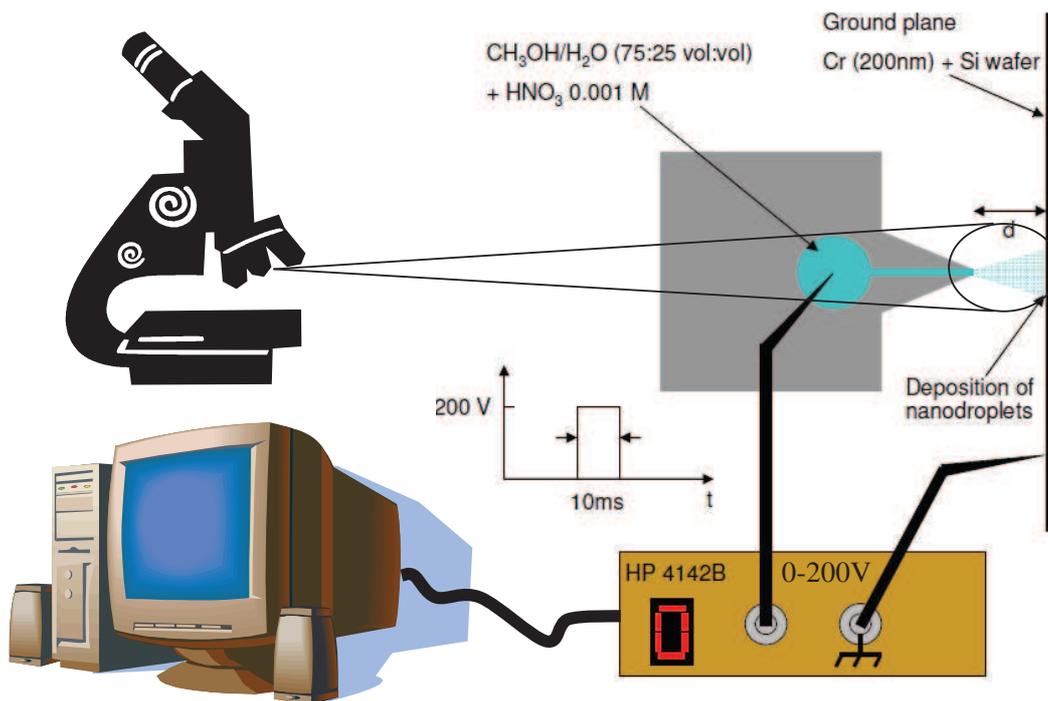
### 2-1 Protocole expérimental

Un mélange méthanol/eau désionisée/acide nitrique (concentration  $0.001 \text{ mol.L}^{-1}$ ) a été utilisé comme solution conductrice pour les tests d'électronébulisation. En suivant le raisonnement de Jurashek [Jur 99] et en utilisant les propriétés du mélange résumées dans la Table III.3, la conductivité de cette solution a été évaluée comme étant égale à  $50 \text{ mS}$ .

**Table III.3 :** *Résumé des propriétés du mélange.*

Paramètres	Valeurs
Concentration Acide nitrique HNO <sub>3</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )	0.001
Eau/méthanol : H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> OH (vol/vol)	25 :75
Energie de surface $\gamma$ (mJ.m <sup>-2</sup> )	30
Densité $\rho$ (kg.m <sup>-3</sup> )	844.1
Conductivité $\sigma$ (mS)	50
Angle de contact statique sur le chrome $\theta_c$ (°)	24.7±2

Le montage utilisé pour les mesures courant-tension pulsée (I-V) est décrit Figure III.47.



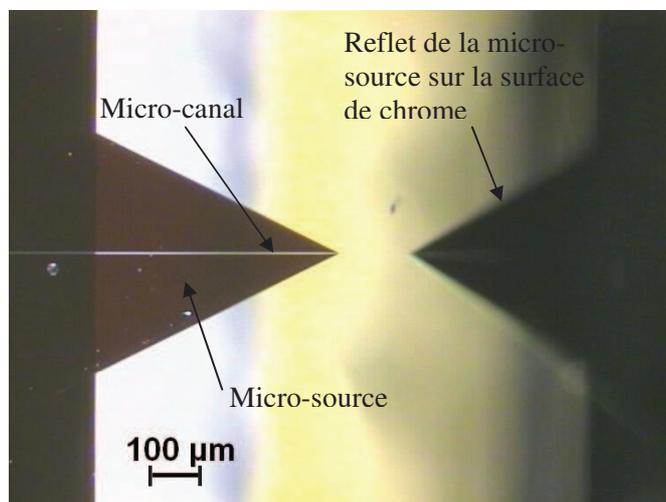
**Figure III.47 :** *Schéma expérimental utilisé pour les tests d'électronébulisation.*

La Figure III.48 montre une photographie de ce montage.



**Figure III.48 :** Photographie du banc de caractérisation utilisé pour les tests d'électronébulisation.

Les pulses de tension sont appliqués en utilisant une source de tension continue (modular DC source/monitor Hewlett Packard 4142B) pouvant délivrer une tension de 200V, un signal impulsionnel de 2ms minimum et présentant une limite de sensibilité en courant de 20fA. Le dispositif expérimenté est monté sur une table de positionnement elle-même montée sur un banc optique pour plus de stabilité. La distance  $d$  entre l'extrémité de l'émetteur et le plan de masse est contrôlée en utilisant un microscope optique placé au dessus du montage. Afin de fixer cette distance, le dispositif est amené à proximité du plan en utilisant son reflet sur la surface et grâce à la vis micrométrique de la table de positionnement. Cette distance est fixée à  $20\mu\text{m}\pm 2$  (Figure III.49).



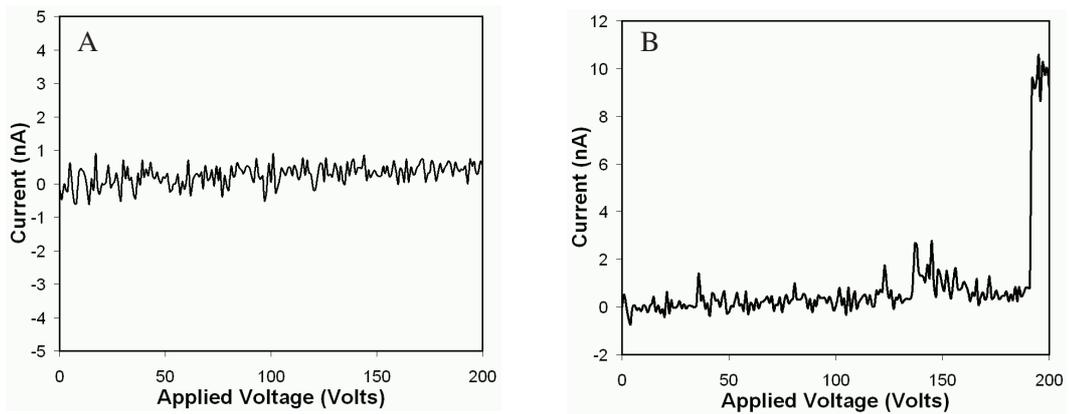
**Figure III.49** : Photo de l'émetteur placé juste devant la surface de chrome.

Cette très petite distance permet de réduire la tension d'ionisation à moins de 200V qui est la limite de notre alimentation. Si cette distance est réduite, des arcs électriques se forment.

Le plan de masse est constitué d'une couche de chrome de 200nm déposée par pulvérisation cathodique sur un substrat de silicium. Le chrome a été choisi car c'est un métal très réactif. Ce plan de masse est incliné d'un angle de  $10^\circ$  par rapport au dispositif afin de faciliter l'observation de son reflet sur la surface.

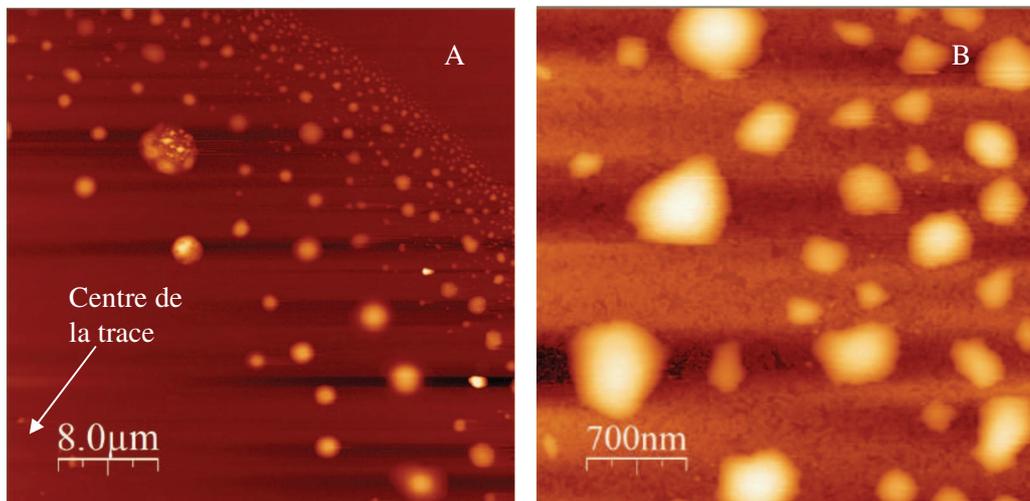
Afin d'appliquer la tension, une pointe métallique mobile est plongée dans la goutte de liquide qui est déposée au préalable sur la surface de la source à l'aide d'une micro-pipette.

Tout d'abord, le courant parasite  $I_p$  entre 100 et 200V avec un pas de  $2.2V.s^{-1}$  a été mesuré. Il est de l'ordre de 379pA (Figure III.50 A). L'électronébulisation est assurée en plaçant la source à la distance  $d$  et en faisant passer la tension de 0 à 200V jusqu'à ce qu'un courant d'électronébulisation  $I_s$  plus grand que  $I_p$  apparaisse (Figure III.50 B). Ensuite, la source est déplacée horizontalement d'environ  $200\mu m$  et un pulse de 200V est appliqué pendant 10ms. Ce processus est répété plusieurs fois le long de la surface.



**Figure III.50 :** *Caractéristiques courant-tension de la micro-source : (A).courant parasite, (B) courant d'électronébulisation.*

L'analyse de la surface au microscope à force atomique (AFM Digital Instruments Nanoscope Dimension 3000) en mode tapping permet d'observer la trace résultante du nébulisat (Figure III.51 A). Cette trace est constituée d'une multitude de taches laissées par l'impact des gouttelettes chargées ; ces taches sont de différentes tailles et sont plus claires que la surface de chrome. Les plus petites taches (Figure III.51 B) sont situées à la périphérie de la trace (en haut à droite de la Figure III.51 A).

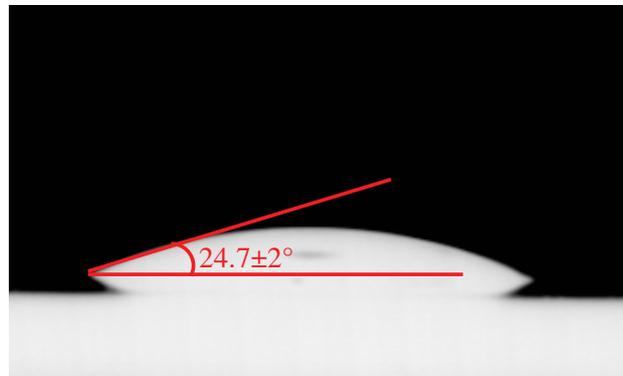


**Figure III.51 :** *Image au microscope à force atomique de la trace laissée par un nébulisat résultant de l'application d'un pulse de tension de 192V pendant 10ms sur la source : (A).vue globale de la trace, (B) agrandissement montrant les plus petites traces laissées par les gouttelettes chargées.*

## 2-2 Détermination de la taille des gouttelettes

En prenant une moyenne sur de nombreuses petites taches à partir d'agrandissements d'images à la périphérie de la trace (Figure III.51 B), le diamètre  $d_t$  moyen de ces taches a été estimé à 190nm.

Dans une première approximation, afin de calculer le diamètre de la goutte originelle électronébulisée  $d_d$  qui a laissé ces traces, une méthode simple de calcul de calotte sphérique a été utilisée en faisant l'égalité entre deux volumes : le volume de la gouttelette originelle est égal au volume de la calotte sphérique d'une gouttelette imaginaire sur la surface de chrome. Ainsi, à partir du diamètre de la trace  $d_t$  causée par l'impact des gouttelettes sur la surface de chrome et l'angle de contact macroscopique  $\theta_c$  du liquide sur une surface de chrome, le diamètre de la goutte originelle  $d_d$  peut être calculé. Cet angle de contact a été mesuré en utilisant une goutte macroscopique de ce liquide (Volume  $\sim 0.5\mu\text{L}$ ) sur une surface de chrome et un instrument de mesure d'angle de contact (Digidrop EWS, GBX, France). Celui-ci est de  $24.7\pm 2^\circ$  (Figure III.52).



**Figure III.52** : Photo de la goutte de liquide déposée sur la surface de chrome. L'angle de contact mesuré au Digidrop est de  $24.7\pm 2^\circ$ .

Le diamètre de la gouttelette originelle engendrant une trace sur la surface est donné par la formule suivante :

$$d_d = d_t \left[ \frac{2 - 3 \cos \theta_c + \cos^3 \theta_c}{4 \sin^3 \theta_c} \right]^{1/3} \quad (11)$$

En utilisant cette formule, le volume  $V_d$  et le diamètre  $d_d$  de la gouttelette originelle donnant naissance à une trace de 190nm sont respectivement  $0.3 \pm 0.03 \mu\text{L}$  et  $83 \pm 2.4 \text{ nm}$ .

Notons que les gouttelettes étant chargées lorsqu'elles percutent la surface de chrome, l'étalement de la gouttelette ne peut être complètement décrit par le simple modèle d'angle de contact considéré ici. Par conséquent, le diamètre calculé est probablement inférieur à 83nm en raison d'une réduction de la valeur de  $\theta_c$ . En effet, en utilisant ce modèle, c'est le diamètre maximal de la gouttelette qui est obtenu. Il est également possible que ces taches soient le résultat de l'explosion d'une seule gouttelette après l'émission en raison de l'instabilité de Rayleigh [Lor 82].

## 2-3 Estimation du débit de la source

Les quantités d'échantillons biologiques étant parfois disponibles qu'en très petites quantités et leur préparation étant coûteuse, il est intéressant de déterminer le débit de la micro-source afin de connaître la quantité d'échantillon consommée durant l'expérimentation. En supposant que le courant d'électronébulisation  $I_s$  durant le pulse est de 9.6nA, comme mesuré précédemment (Figure III.50 B), le débit  $Q$  peut être estimé en utilisant les lois de réduction d'échelle [Har 98] :

$$I_s \approx (\gamma Q \sigma)^{1/2} \quad (12)$$

où  $\gamma$  est l'énergie de surface du liquide ( $30 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) et  $\sigma$  est la conductivité de la solution test ( $50 \text{ mS}$ ). Ainsi durant le pulse de 10ms, le débit  $Q$  est de l'ordre de  $6.14 \times 10^{-14} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  soit  $3.68 \text{ nL.min}^{-1}$  ce qui indique qu'on se trouve en régime de nano-électronébulisation [Wil 94]. Par ailleurs, la valeur de ce débit a pu être déterminée d'une autre façon à partir de la Figure III.51 A en mesurant au microscope à force atomique la largeur de chaque tache laissée par le nébulisat dans un secteur de  $25^\circ$ . Puis l'équation (11) est utilisée afin de déterminer le volume de chacune des gouttelettes ayant donné naissance à ces taches. On additionne le volume de toutes ces gouttelettes afin d'obtenir le volume ( $4.3 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ ) correspondant au secteur de  $25^\circ$  par rapport à la trace entière du nébulisat. On détermine le volume pour la trace complète du nébulisat (pour  $360^\circ$ ). On obtient ainsi le volume d'échantillon consommé pendant le pulse de 10ms ( $6.14 \times 10^{-16} \text{ m}^3$ ). Le débit est alors de  $3.7 \text{ nL.min}^{-1}$ , ce qui est conforme avec le débit

déterminé à l'aide du courant d'électronébulisation ( $3.68\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Ce faible débit peut s'expliquer par le fait que le liquide est confiné uniquement dans la fente capillaire dû aux effets capillaires et à la faible énergie de surface du polysilicium pour un liquide donné. En effet, dans le cas des sources commerciales, le liquide a plus tendance à s'étaler sur l'ensemble de la pointe à cause de l'énergie de surface plus importante de la silice.

Pendant ce pulse, un volume de  $614\text{fL}$  est déposé sur la surface de chrome. Notons que ce volume correspond approximativement à 16% du liquide initialement dans la fente microfluidique ayant pour dimension  $1.5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$  ( $\text{Vol}_{\text{fente}} = 3.75\text{ pL}$ ).

A partir du débit, Hartman [Har 98] et Gañán-Calvo [Gañ 97] ont donné des solutions théoriques permettant de déterminer le diamètre des gouttelettes  $d_d$  émises par électronébulisation en fonction des paramètres du liquide  $\rho$ ,  $\gamma$  et  $\sigma$  et le courant d'électronébulisation  $I_s$  :

$$d_d^6 = \rho \varepsilon_0 Q^4 / I_s^2 \quad (13)$$

$$d_d^3 = 230.4 \gamma \varepsilon_0 Q^2 / I_s^2 \quad (14)$$

$$d_d^6 = 136.1 \pi^{-4} (\rho \varepsilon_0 Q^3 / \gamma \sigma) \quad (15)$$

A partir de ces équations et en utilisant les paramètres du liquide  $\sigma = 50\text{mS}$ ,  $\gamma = 30\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ,  $\rho = 844.1\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$  et  $\varepsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12}\text{F}\cdot\text{m}^{-1}$  la permittivité du vide, le diamètre théorique des gouttelettes  $d_d$  est compris entre  $34\text{nm}$  et  $136\text{nm}$ . Le diamètre déterminé précédemment à partir de la mesure des traces laissées par l'impact des gouttelettes ( $d_d = 83 \pm 2.4\text{nm}$ ) est bien de cet ordre de grandeur.

## 2-4 Estimation de la valeur de la tension et du champ électrique d'électronébulisation

La tension à partir de laquelle le nébulisat est obtenu peut être estimée en utilisant le modèle donné par Arscott [Ars 05 b]:

$$V_{on} = r_c \ln(4d / r_c)(\gamma / w\epsilon_0)^{1/2} \quad (16)$$

Celle-ci est comprise entre 120V et 208V en supposant que le rayon de l'extrémité de la source  $r_c$  est compris entre 0.5 $\mu$ m et 1 $\mu$ m, que la largeur de la fente microfluidique  $w$  est de 1.5 $\mu$ m, que la distance entre l'extrémité de l'émetteur et le plan de masse est de 20 $\mu$ m et en utilisant les propriétés du liquide (Table III.3). Encore une fois, la tension mesurée  $V_{on}=192$ V (Figure III.50 B) concorde avec les valeurs déterminées par le modèle.

Le champ électrique entre la pointe de la source et le plan de masse peut-être approximé par le champ électrique entre une ligne semi infinie de charges à une distance  $z_0$  d'un plan infini. Une solution a été donnée par Jones grâce à la méthode des images qui permet d'estimer le champ électrique en champ lointain à une distance suffisante du capillaire mais pas à l'extrémité même du capillaire. Les composantes du champ sont données par [Jon 71] :

$$E_r = \frac{\sigma}{4\pi\epsilon_0 r} \left( \frac{z_0 + z}{(r^2 + (z_0 + z)^2)^{3/2}} - \frac{z_0 - z}{(r^2 + (z_0 - z)^2)^{3/2}} \right) \quad (17)$$

$$E_z = \frac{-\sigma}{4\pi\epsilon_0} \left( \frac{1}{(r^2 + (z_0 + z)^2)^{3/2}} + \frac{1}{(r^2 + (z_0 - z)^2)^{3/2}} \right) \quad (18)$$

Le potentiel électrique obtenu par intégration est :

$$\phi = \frac{-\sigma}{4\pi\epsilon_0} \ln \left( \frac{(r^2 + (z_0 - z)^2)^{1/2} + (z_0 - z)}{(r^2 + (z_0 + z)^2)^{1/2} + (z_0 + z)} \right) \quad (19)$$

En pratique, la charge par unité de longueur n'est pas constante le long du capillaire. Afin d'estimer la charge sur le liquide émergeant du capillaire, la charge à l'extrémité de celui-ci est nécessaire. En supposant que  $r=r_c$  et  $z=z_0$  on a :

$$\phi = \phi_0 = \frac{\sigma}{4\pi\epsilon_0} \ln\left(\frac{(r_c^2 + 4z_0^2)^{1/2} + 2z_0}{r_c}\right) \quad (20)$$

En considérant que  $z_0 \gg r_c$  la charge est donnée par :

$$\sigma \approx \frac{4\pi\epsilon_0\phi_0}{\ln(4z_0/r_c)} \quad (21)$$

soit  $\sigma \approx 4.76 \times 10^{-9} \text{ C.m}^{-1}$  avec  $\epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$ ,  $\phi_0 = 200 \text{ V}$ ,  $z_0 = 20 \mu\text{m}$ ,  $r_c = 0.75 \mu\text{m}$ .

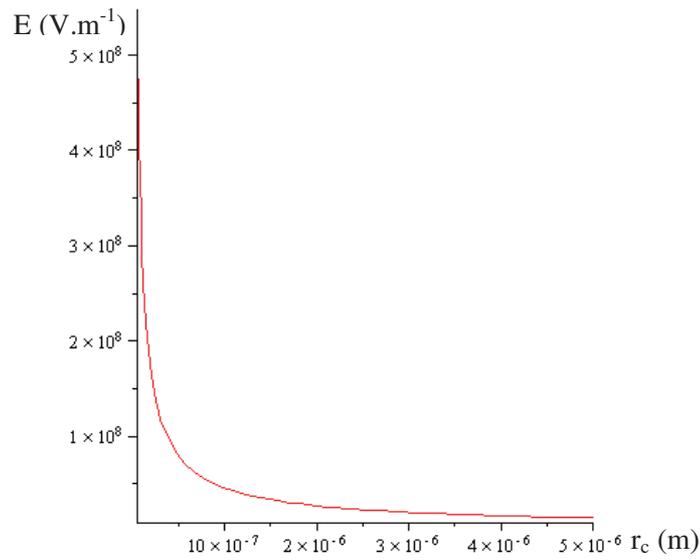
Le champ électrique à l'extrémité du capillaire est égal à :

$$|E_r| \approx |E_z| \approx \frac{\phi_0}{r_c \ln(4z_0/r_c)} \approx 57.1 \times 10^6 \text{ V.m}^{-1} \quad (22)$$

L'amplitude du champ électrique est par conséquent égale à :

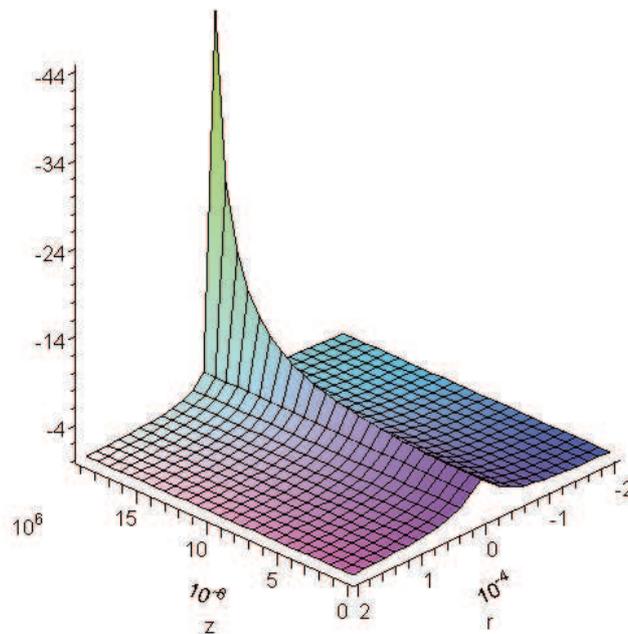
$$E_0 = |E| = \frac{\sqrt{2}\phi_0}{r_c \ln(4z_0/r_c)} = 80.76 \times 10^6 \text{ V.m}^{-1} \quad (23)$$

L'évaluation de ce champ électrique à l'aide de MAPLE en faisant varier le rayon de l'extrémité de la source  $r_c$  de 50nm à 5 $\mu\text{m}$ , montre que pour une même tension, plus la source est pointue plus la force du champ électrique augmente (Cf. Annexes) (Figure III.53).



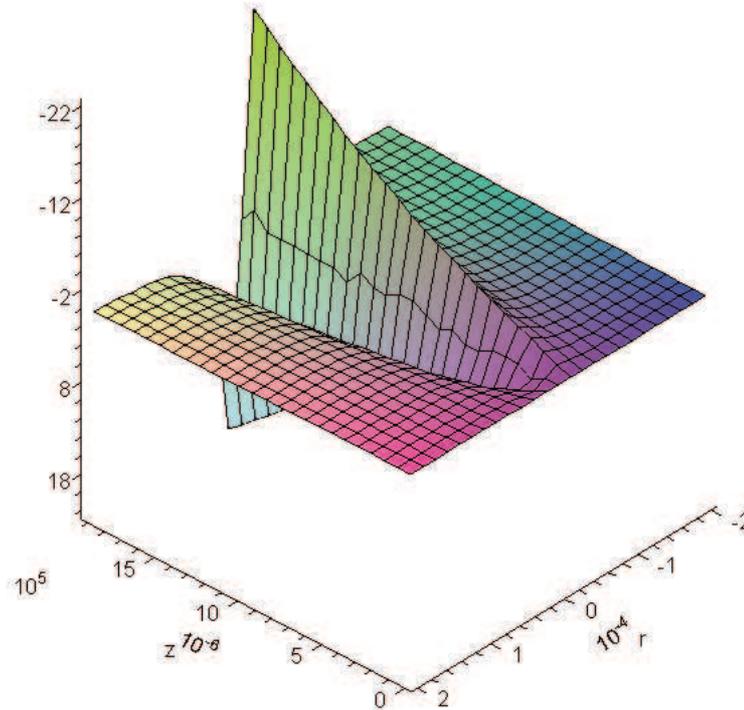
**Figure III.53 :** Champ électrique à l'extrémité de la source en fonction du rayon de l'extrémité de la source. Valeurs calculées pour une tension de 200V en faisant varier le rayon de la source de 50nm à 5 $\mu$ m.

La cartographie du champ électrique a été obtenue en implémentant le modèle dans MAPLE (Cf. Annexes). La Figure III.54 présente le champ électrique axial  $E_z$  entre l'extrémité de la source et le plan de masse.



**Figure III.54 :** Champ électrique axial ( $E_z$ ) entre l'extrémité de la source et le plan de masse.

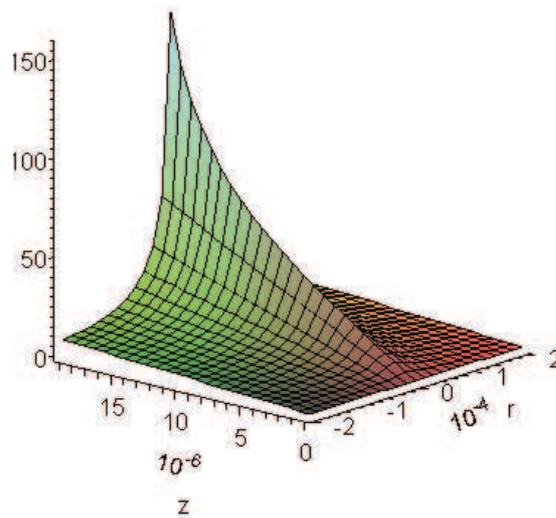
La Figure III.55 représente le champ électrique radial  $E_r$  entre l'extrémité de la source et le plan de masse.



**Figure III.55** : Champ électrique radial ( $E_r$ ) entre l'extrémité de la source et le plan de masse.

Le mouvement axial des gouttelettes est principalement dû au champ externe alors que leur mouvement radial est principalement contrôlé par le champ de charge d'espace dû aux interactions coulombiennes entre les gouttelettes chargées. D'après les Figures III.54 et III.55, on voit que sur l'axe du nébulisat, le champ externe atteint un maximum au voisinage du jet de liquide, décroît rapidement et atteint une asymptote. Le champ de charge d'espace axial a une valeur beaucoup plus faible (17% au plus). En dehors de l'axe, près de la zone où le jet se disperse en gouttelettes, le champ de charge d'espace est comparable ou même est plus important que le champ électrique externe. C'est dans cette région que les répulsions coulombiennes jouent un rôle crucial et cause la dispersion des gouttelettes.

La Figure III.56 représente le potentiel électrique  $\phi$  qui décroît de 200V à 0V de l'extrémité de la source vers le plan de masse.



**Figure III.56 :** *Potentiel électrique ( $\phi$ ) entre l'extrémité de la source et le plan de masse.*

Les équations (21) et (23) établissent un lien entre la force du champ électrique et la charge par unité de longueur :

$$\sigma = 2\pi r_c \sigma_s \quad (24)$$

La densité de charge surfacique est donnée par :

$$\sigma_s = \sqrt{2} \varepsilon_0 E_0 = 0.001 C.m^{-2} \quad (25)$$

On a donc :

$$\sigma = 2\pi r_c \sigma_s = 4.71 \times 10^{-9} C.m^{-1} \quad (26)$$

Ce qui est conforme avec le résultat obtenu plus haut avec l'approximation ( $4.76 \times 10^{-9} C.m^{-1}$ ). Lorsque la charge de la solution qui forme le cône de Taylor s'approche de la limite de Rayleigh, la pointe du cône de Taylor s'allonge formant un jet liquide. Une gouttelette se forme alors à partir d'une surface cylindrique et d'une surface plane, correspondant à la coupe du jet. En 1858, Page et Adams ont montré que la densité de charge

surfactive sur un hémisphère est égale à trois fois celle sur un plan, et celle sur un cylindre à deux fois celle sur un plan [Pag 58]. Ainsi, pour une sphère formée à partir d'un plan, la densité de charge surfactive est de l'ordre de :

$$q = 4\pi r_{\text{droplet}}^2 3\sigma_s = 12\sqrt{2}\pi\epsilon_0 r_{\text{droplet}}^2 E_0 \quad (27)$$

Pour une sphère formée à partir d'une surface cylindrique elle est de l'ordre de :

$$q = 4\pi r_{\text{droplet}}^2 1.5\sigma_s = 6\sqrt{2}\pi\epsilon_0 r_{\text{droplet}}^2 E_0 \quad (28)$$

Jones et Thong ont montré expérimentalement que la densité de charge surfactive d'une gouttelette formée à partir du jet se situe entre les deux et a pour expression [Jon 71] :

$$q = 9\sqrt{2}\pi\epsilon_0 r_{\text{droplet}}^2 E_0 \quad (29)$$

A partir de cette formule, la charge sur une gouttelette de 83nm est évaluée à 49aC. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue en utilisant l'expression donnée par De la Mora et Locertales [De l 94] :

$$q = 0.7 \left[ 8\pi (\epsilon_0 \gamma r_0^3)^{1/2} \right] \quad (30)$$

pour laquelle on obtient une charge de 76aC.

Pour terminer, la Table III.4 résume l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude.

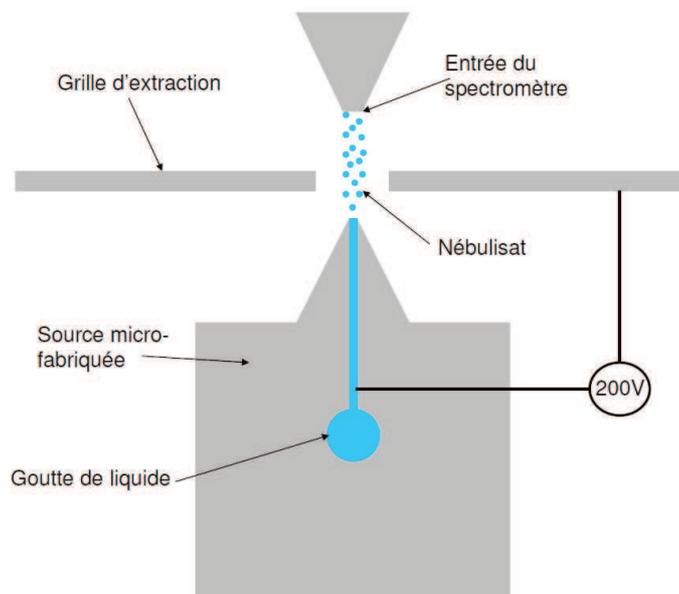
**Table III.4 : Résumé des résultats obtenus.**

Paramètres	Valeurs
Débit $Q$ (nL.min <sup>-1</sup> )	3.68
Diamètre de la gouttelette $d_d$ (nm)	83±2.4
Volume de la gouttelette $V_d$ (aL)	0.3±0.03
Courant d'électronébulisation $I_s$ (nA)	9.6
Tension d'ionisation $V_{on}$ (V)	192

## Conclusion

Dans ce chapitre, la sensibilité des micro et nano-sources d'électronébulisation micro-fabriquées en termes de concentration minimale de protéine pouvant être identifiée par spectrométrie de masse a été déterminée. On a ainsi pu se positionner par rapport aux performances des sources commerciales. En effet, les caractérisations ont montré que des spectres de bonne qualité (rapport signal sur bruit élevé) de protéines intactes peuvent être obtenus pour des concentrations aussi faibles que  $100\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  pour les micro-sources et  $10\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  pour les nano-sources, soit respectivement pour une concentration cinq fois et cinquante fois plus petite que pour les sources commerciales.

Les caractérisations courant-tension ont démontré que pour une micro-source comportant une fente capillaire de  $1.5\mu\text{m}$ , le courant d'électronébulisation ( $I_s$ ) est faible et inférieur à  $10\text{nA}$ , un très bas débit de  $3.7\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$  est obtenu au lieu des  $20\text{-}80\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$  pour les sources commerciales, les plus petites gouttelettes émises ont une taille de l'ordre de  $80\text{nm}$  et un volume de  $0.3\text{aL}$ . Enfin, une tension d'ionisation de  $192\text{V}$  au lieu de  $1\text{kV}$  pour les sources standard est suffisante pour obtenir un nébulisat. Cette diminution de la tension peut permettre d'envisager la fabrication de sources comportant une grille d'extraction intégrée par analogie avec un canon d'électrons à émission de champ (Figure III.57).



**Figure III.57** : Schéma d'une source comportant une grille d'extraction intégrée.

## Références bibliographiques

Advion Bioscience, [www.advion.com](http://www.advion.com).

<sup>a</sup> S. Arscott, S. Le Gac and C. Rolando, "A Polysilicon Nanoelectrospray-Mass Spectrometry Source Based on a Microfluidic Capillary Slot", *Sensors and Actuators B*, vol. 106, pp.741-749, 2005.

<sup>b</sup> S. Arscott and D. Troadec, "Electrospraying from nanofluidic capillary slot", *Appl. Phys. Lett.*, vol. 87, 134101, 2005.

S. Arscott, B. Legrand, L. Buchaillot and A.E. Ashcroft, "A silicon beam-based microcantilever nanoelectrosprayer", *Sensors and Actuators B*, vol. 125, pp.72-78, 2007.

J. F. de la Mora and I. G. Locortales, *J. Fluid Mech*, vol. 243, pp.561-574, 1994.

<sup>a</sup> C. Descatoire, D. Troadec, L. Buchaillot, A.E. Ashcroft and S. Arscott, "A nanofluidic electro spray source fabricated using focused ion beam etching", *Proceedings of  $\mu$ TAS 2005 9<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, Boston, Massachusetts, USA, October 9-13, 2005, vol. 1, pp.241-243.

<sup>b</sup> C. Descatoire, D. Troadec, A.E. Ashcroft, L. Buchaillot and S. Arscott, "Nanomachined electro spray ionisation tips", *Nanotech 2005 9<sup>th</sup> Annual European Conference on Micro & Nanoscale Technologies for the Biosciences*, Montreux, Switzerland, November 15-17, 2005, Appendice A1.

C. Descatoire, L. Buchaillot and S. Arscott, "Silicon-based nanofluidic devices for the handling of liquids at attolitre volumes", *E-MRS (European Materials Research Society) Spring Meeting*, Nice, France, May 29-June 2, 2006.

C. Descatoire, L. Buchaillot and S. Arscott, "Sub-attolitre nanodroplet deposition using a silicon-based nanoelectrospray emitter tip", *Materials Science & Engineering C*, Vol. 27, Issues 5-8, pp. 1491-1495, September 2007.

M. Dole, L. L. Mach, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice, "Molecular beams of macroions", *J. Chem. Phys.*, vol. 49, pp. 2240-2247, 1968.

J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, "Electrospray ionization for mass spectrometry of large molecules", *Science*, vol. 246, pp. 64-71, 1989.

A. M. Gañán-Calvo, "Cone-Jet analytical extension of Taylor's electrostatic solution and the asymptotic universal scaling laws in electro spraying", *Phys. Rev. Lett.*, vol. 79, pp.217-220, 1997.

S. J. Gaskell, "Electrospray: principles and practice", *J. Mass. Spectrom.*, vol. 32, pp. 677-688, 1997.

- W. J. Griffiths, A. P. Jonsson, S. Liu, D. K. Rai and Y. Wang, "Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry", *Biochemistry J.*, vol. 355, pp. 545-561, 2001.
- V. Hamon, "Influence de la pression sur la dynamique du lysozyme en solution, par simulation numérique et diffusion de neutrons", *Thèse*, 2004.
- R. P. A. Hartman, D. J. Brunner, J. C. M. Marijnissen and B. Scarlett, *J. Aerosol. Sci.*, vol. 29, pp.S977-S978, 1998.
- E. de Hoffmann and V. Stroobant, "Mass spectrometry: Principles and applications", *Wiley*, Chichester, 2003.
- J. V. Iribarne and B. A. Thompson, "On the evaporation of small ions from charged droplets", *J. Chem. Phys.*, vol. 64, pp. 2287-2294, 1976.
- A. R. Jones and K. C. Thong, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 4, pp.1159-1166, 1971.
- R. Juraschek, T. Dulcks and M. Karas, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 10, Issue 4, pp.300-308, 1999.
- C. S. Lane, "Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences", *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, pp. 848-869, 2005.
- B. Legrand, A.E. Ashcroft, L. Buchaillot and S. Arscott, "SOI-based nanoelectrospray emitter tips for mass spectrometry: a coupled MEMS and microfluidic design", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, pp.509-514, 2007.
- Lord Rayleigh, *Phila. Mag.*, vol. 14, pp.184-186, 1882.
- C. K. Meng, M. Mann and J. B. Fenn, "Electrospray ionization of some polypeptides and small proteins", *Proceedings of the 36<sup>th</sup> American Society for Mass Spectrometry Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Francisco, June, 1988.
- New Objective, [www.newobjective.com](http://www.newobjective.com).
- L. Page and N. I. Adams, *Principles of Electricity*, New York: Van Nostrand, pp.81, 1958.
- O. V. Salata, "Tools of nanotechnology", *Current nanoscience*, vol. 1, pp. 25, 2005.
- Scientific Instrument Services, <http://www.sisweb.com/lc/electrospray-tip.htm>
- B. A. Thompson and J. V. Iribarne, "Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure", *J. Chem. Phys.*, vol. 71, pp. 4451-4463, 1979.
- R. Willoughby, E. Sheehan and S. Mitrovich, "A global view of LC/MS: How to solve your most challenging analytical problems", *Global view*, Pittsburgh, 1998.
- M. S. Wilm and M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Process.*, vol. 136, Issue 2-3, pp.167-180, 1994.

M. S. Wilm and M. Mann, "Analytical properties of the nanoelectrospray ion source", *Anal. Chem.*, vol. 68, pp. 1-8, 1996.

<sup>a</sup> M. Yamashita and J. B. Fenn, "Electrospray ion source: another variation on the free-jet theme", *J. Phys. Chem.*, vol. 88, pp. 4451-4459, 1984.

<sup>b</sup> M. Yamashita and J. B. Fenn, "Negative ion production with the electrospray ion source", *J. Phys. Chem.*, vol. 88, pp. 4671-4675, 1984.

# Conclusion et Perspectives

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la problématique rencontrée en protéomique (Cf. Lexique) pour l'analyse massive des protéines (Cf. Lexique) dans le cadre de l'étude du protéome humain. Les défis de la protéomique sont d'identifier, quantifier et analyser les interactions et les modifications d'un grand nombre de protéines [Aeb 03]. Cependant, l'étude de la protéomique à l'aide de la spectrométrie de masse est une technologie naissante. En effet, l'instrumentation actuelle est loin d'être optimum en partie en raison de l'explosion des recherches en protéomique qui ne laissent pas le temps aux fabricants de développer des instruments parfaitement adaptés à l'analyse des protéines, en particulier des micro-systèmes d'analyses complets miniaturisés ( $\mu$ TAS) ou laboratoires sur puce (LOC) permettant des analyses en parallèle à haut débit afin de répondre à cette demande. D'autre part, les spectromètres de masse sont loin de la limite physique des quelques ions nécessaires à l'enregistrement d'un pic. Enfin, les sources d'ionisation par électronébulisation couramment utilisées sont constituées d'un capillaire en verre ou silice fondue en forme d'aiguille. Or, l'utilisation de telles sources ne se prête pas bien au couplage d'un micro-système avec un spectromètre de masse.

Le but de ce travail était donc de concevoir et de fabriquer une interface originale qui se présente sous la forme d'une source constituée par deux cantilevers triangulaires et reposant sur un mode d'ionisation par électronébulisation ainsi qu'un remplissage spontané par capillarité pour une analyse protéomique par spectrométrie de masse. L'intégration de la source sur un micro-système et sa fabrication à l'aide des microtechnologies constituent une alternative préférable ; les bas coûts du micro-usinage permettant la fabrication de systèmes d'analyses complets jetables évitant ainsi les contaminations entre les échantillons.

La première partie de cette étude a présenté les sources existantes développées au moyen de ces technologies afin d'en tirer le meilleur parti pour la conception de nos sources.

Dans la seconde partie, après une étude géométrique permettant de mieux appréhender les paramètres cruciaux pour garantir un bon fonctionnement, en particulier les dimensions de la fente capillaire afin d'assurer un remplissage spontané, plusieurs sources d'électronébulisation en polysilicium ont été fabriquées. Une première série de micro-sources basée sur un procédé de gravure à base de chlore a conforté notre idée. La deuxième série de micro-sources a conduit à une optimisation du procédé de fabrication en employant la technologie SOI et la gravure profonde par procédé Bosch. A partir des sources produites par ces deux voies technologiques, le prototypage rapide et la flexibilité apportés par l'utilisation d'un faisceau d'ions focalisés ont été employés afin de poursuivre la miniaturisation conduisant à la fabrication de nano-sources. Les possibilités de réaliser de très petites fentes capillaires (50nm) ont été démontrées. La Figure 1 retrace la miniaturisation de ces sources.

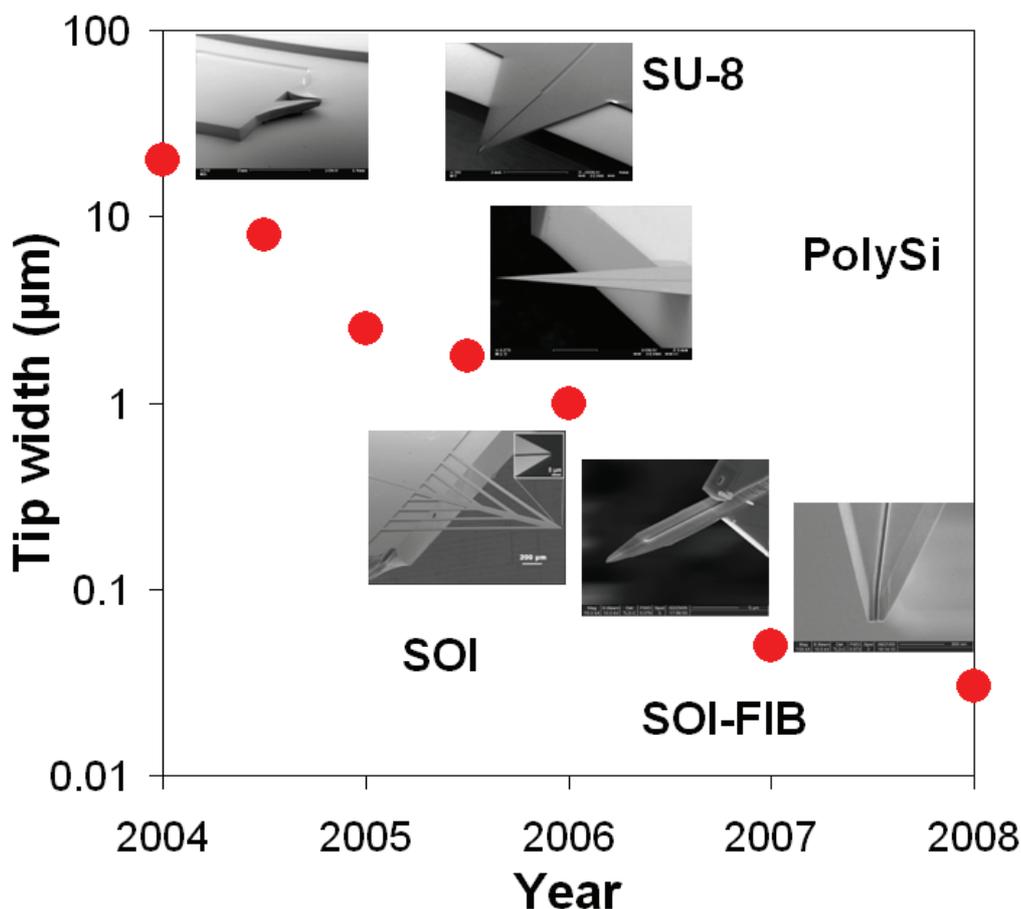
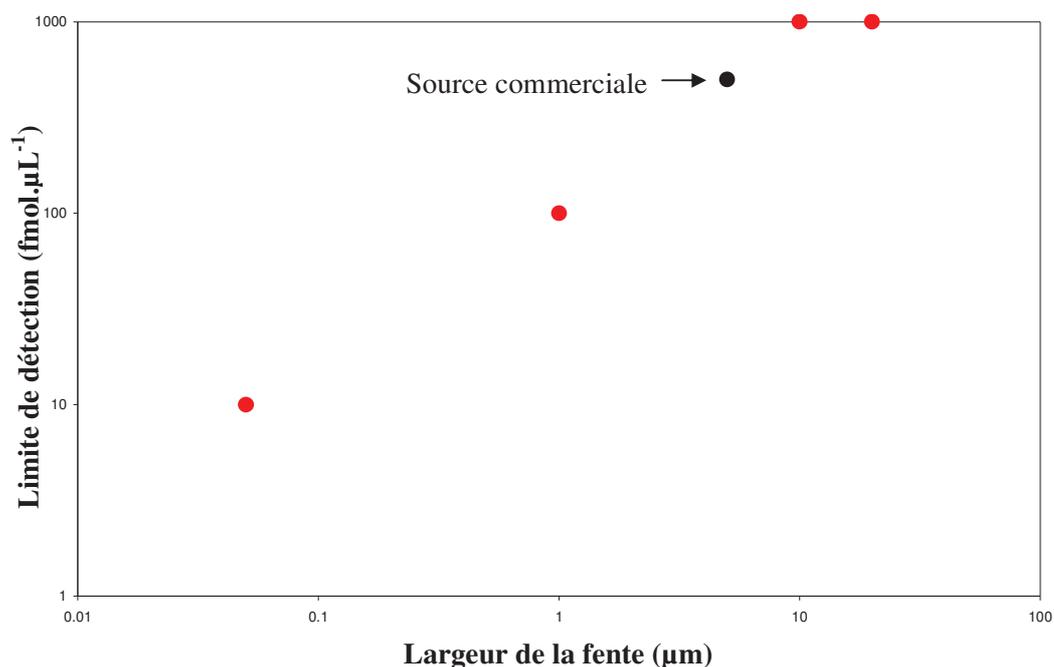


Figure 1 : Evolution des dimensions des sources d'électronébulisation au fil des années.

Dans un troisième temps, une fois la phase de fabrication terminée, ces sources ont été testées en spectrométrie de masse afin de valider leur fonctionnement et d'évaluer leurs performances. Ces sources ont été caractérisées en termes de concentration minimale de protéine pouvant être décelée à partir d'une solution. Les résultats montrent que la miniaturisation de ces sources à des dimensions proches du micron ou sub-microniques conduit à une amélioration spectaculaire de leurs performances en spectrométrie de masse (Figure 2).



**Figure 2 :** Evolution de la sensibilité des sources d'électronébulisation en fonction de la taille de la fente capillaire.

Pour terminer, la fin de ces travaux témoigne de la volonté d'étudier le phénomène d'électronébulisation. Pour cela, un modèle basé sur l'observation de l'impact laissé par un nébulisat sur une surface a été utilisé. Divers paramètres tels que le diamètre et le volume des plus petites gouttes émises, le débit, la tension d'ionisation, le volume d'échantillon consommé, la charge des gouttelettes, etc...ont pu être déterminés.

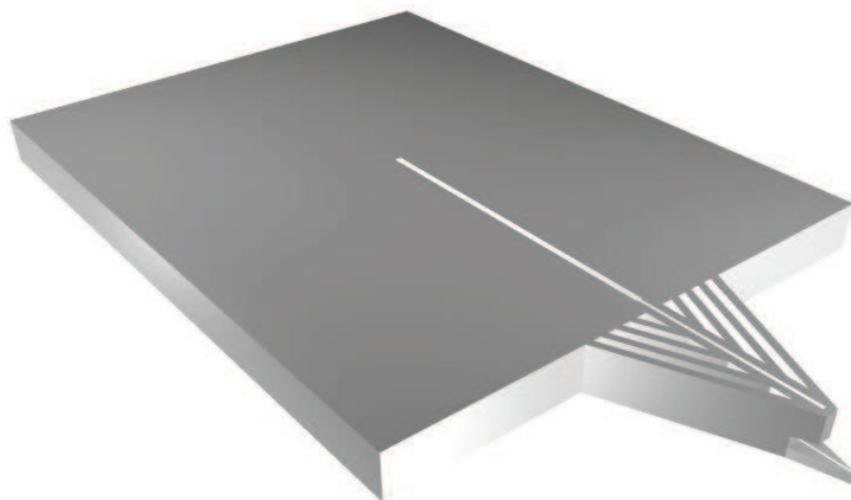
De telles sources présentent donc un grand intérêt puisqu'elles semblent offrir de meilleures capacités d'analyse en termes de sensibilité de détection des espèces. De plus, elles

devraient mieux se prêter à l'automatisation des analyses car leur géométrie ouverte les rend plus facile à charger avec la solution échantillon à analyser. En effet, cela s'explique par le fait que le chargement s'effectue simplement par le dépôt d'une goutte de la solution à analyser sur la surface de la source. Ces sources ne nécessitent pas non plus la rupture de leur extrémité sur l'entrée du spectromètre de masse avant de pouvoir être opérationnelles. Même si les résultats obtenus sont prometteurs, certaines améliorations doivent encore être apportées. Tout d'abord, la libération des sources par clivage du substrat au scalpel entraîne la destruction de certaines d'entre elles et conduit à une longueur aléatoire de celles-ci.

Ensuite, pour les nano-sources, l'usinage par faisceau d'ions focalisés présente des limites notamment en terme de temps. En effet, au temps requis pour les étapes de photolithographies et gravures classiques, il faut ajouter environ 3 heures par composant pour la partie réalisée au FIB. Cette méthode n'est donc intéressante que pour fabriquer quelques prototypes permettant d'effectuer les premiers tests mais n'est pas compatible avec une production de masse des dispositifs et une réduction des coûts. De plus, cette étape nécessite l'intervention d'un opérateur très habile, les dimensions ne sont pas facilement contrôlables et il n'est pas possible d'obtenir deux sources strictement identiques ce qui modifie les conditions d'ionisation lors des analyses en spectrométrie de masse.

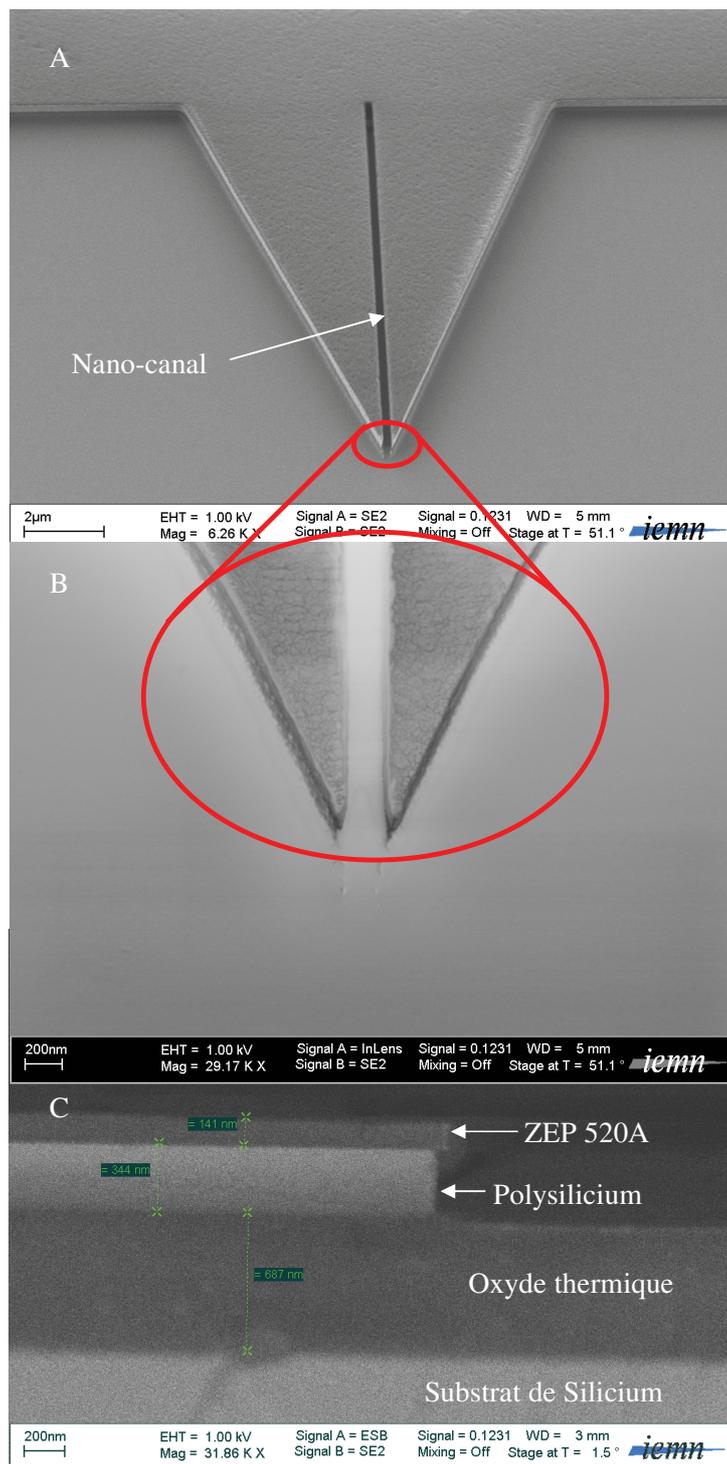
Enfin, les tests ont montré que le désavantage de la géométrie ouverte de ces sources est l'évaporation assez rapide de la solution échantillon une fois déposée sur le dispositif. Il pourrait être judicieux de prévoir un capot. Ainsi la surface de contact entre le liquide et l'air serait réduite afin de limiter l'évaporation de l'échantillon sans modifier la nature ouverte de l'extrémité de la source. L'alimentation de la source se ferait soit en amont du micro-système soit, dans le cadre d'une utilisation individuelle, de manière automatisée par un port d'entrée permettant de réaliser une connexion fluide entre la source et le robot délivrant la solution échantillon (Nanoport Upchurch Scientific) [**Upc**].

Afin d'apporter une réponse à ces problèmes, une nouvelle voie technologique a été explorée. Il s'agit de réaliser la partie nanofluidique par une approche employant un nano-masqueur électronique en remplacement du faisceau d'ions focalisés. La Figure 3 donne une vue schématique de ces nouvelles sources.



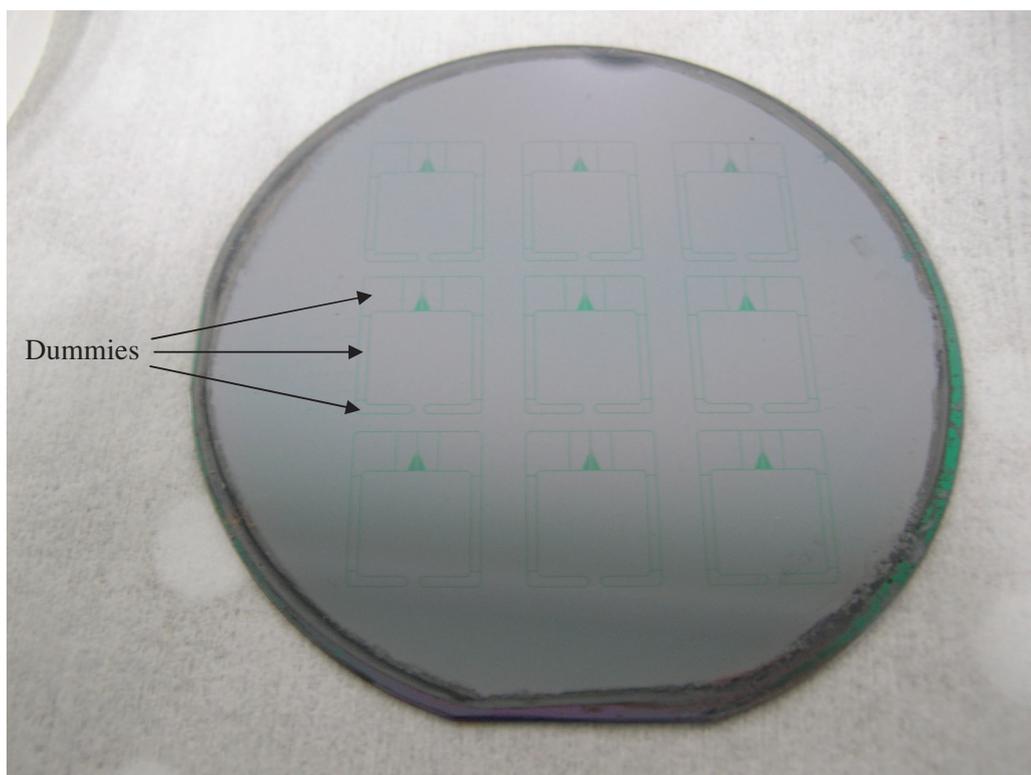
**Figure 3 :** *Vue schématique de la nano-source réalisée par lithographie électronique et gravure profonde.*

Le procédé de fabrication (Cf. procédé détaillé en Annexes) débute par une croissance d'oxyde thermique humide de  $1\mu\text{m}$  d'épaisseur sur un substrat de silicium de trois pouces. Cet oxyde constituera la couche sacrificielle. Une couche de  $300\text{nm}$  de polysilicium non dopé est déposée en phase vapeur à basse pression (LPCVD). Ce polysilicium est gravé sur la face arrière du substrat par gravure ionique réactive ( $\text{SF}_6/\text{O}_2$ ). En face avant, la partie nanométrique de la source est définie par une étape de masquage avec une résine électronique positive dénommée ZEP 520A (Zeonrex Electronic Chemicals) bien connue pour sa résistance aux gravures sèches. Puis, une gravure ionique réactive reposant sur le savant équilibre d'un mélange  $\text{SF}_6/\text{CHF}_3$  ainsi qu'une pression et une puissance permettant de graver le polysilicium de manière anisotropique est réalisée [Gri 97]. La Figure 4 présente les images au microscope électronique à balayage obtenues juste à la suite de cette gravure. Le nanocanal présente une largeur de  $200\text{nm}$ .



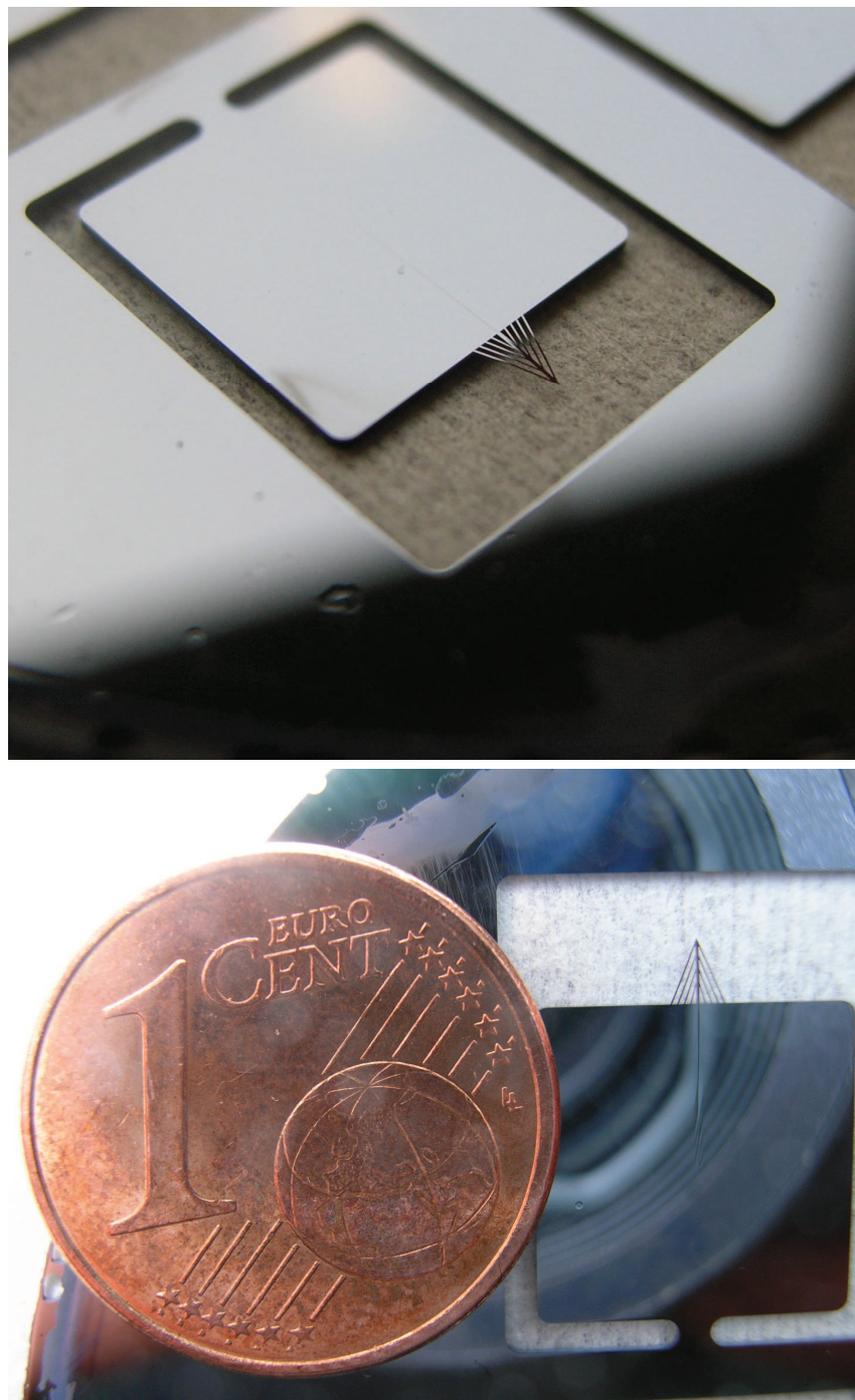
**Figure 4 :** (A) Image au microscope électronique à balayage de la partie nanométrique de la source juste après la gravure ionique réactive ( $SF_6 / CHF_3$ ). (B) Agrandissement sur l'extrémité du nano-canal qui présente une largeur de 200nm. (C) Vue en coupe montrant le flanc de gravure vertical du polysilicium. Le masque en ZEP 520A est encore présent sur le polysilicium.

Après dérésinage, une couche de 500nm de LTO est déposée par LPCVD. Elle est éliminée en face arrière avec l'oxyde thermique par gravure humide dans une solution tamponnée de BE7-1 et structurée en face avant par gravure ionique réactive ( $\text{CHF}_3/\text{CF}_4$ ) afin de protéger l'extrémité de la source avant le deuxième dépôt de polysilicium non dopé (LPCVD) de  $4\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les contraintes dans le polysilicium sont réduites grâce à une étape de recuit à haute température ( $1050^\circ$  pendant une heure). En face avant, la partie micrométrique de la source est définie par photolithographie classique (résine S1805) et gravure profonde (Procédé Bosch Surface Technology System STS, UK) du polysilicium. La gravure s'arrête sur l'oxyde thermique. En face arrière, une gravure profonde avec un masque d'aluminium permet de traverser le substrat jusqu'à l'oxyde thermique permettant un prédécoupage des sources évitant ainsi l'emploi d'un scalpel. L'utilisation de pièces perdues appelées "dummies" permet de réduire la surface des ouvertures pour assurer le maintien de la membrane constituée par la couche sacrificielle d'oxyde, qui est la seule restante à ce moment de la fabrication, afin d'éviter sa destruction par les contraintes et le flux d'hélium refroidissant le substrat lors de la gravure profonde (Figure 5).



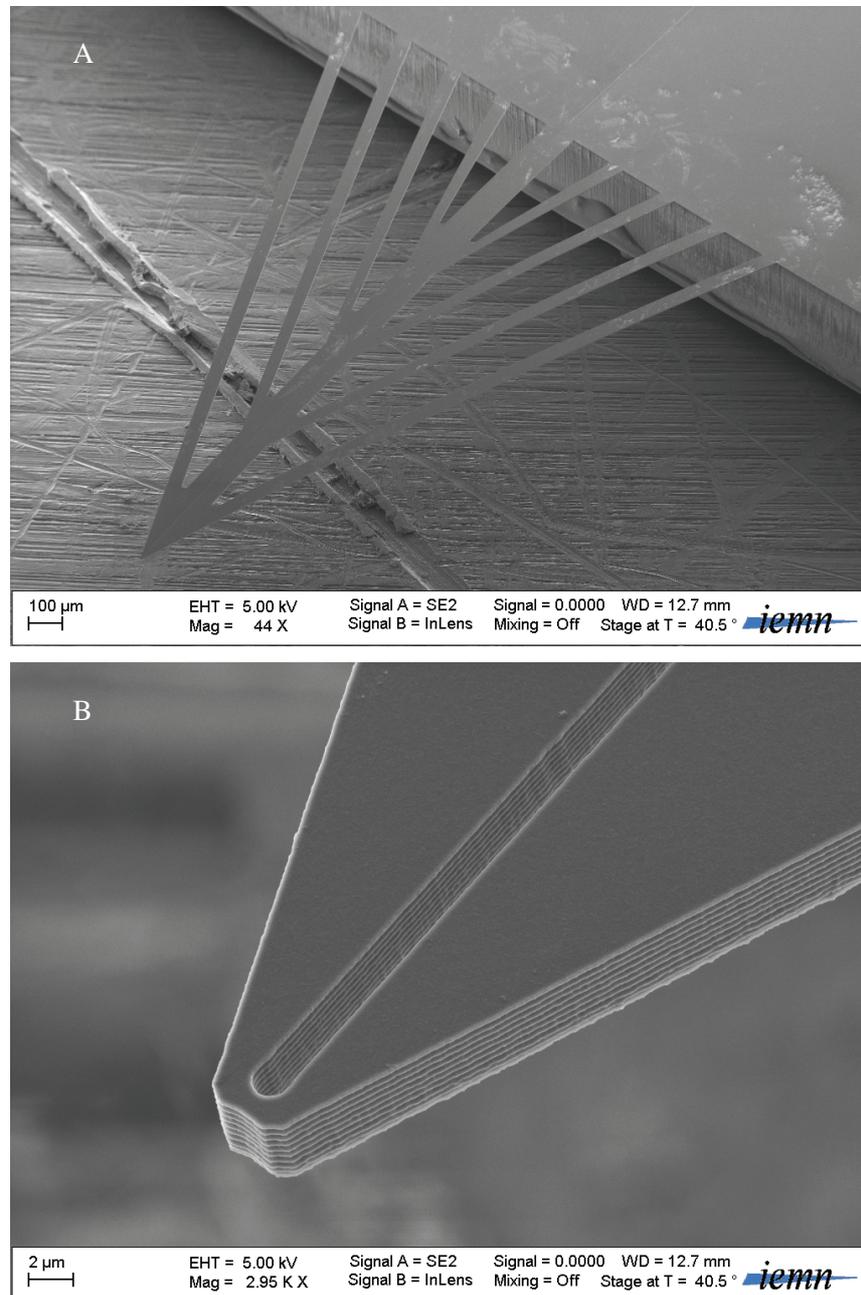
**Figure 5 :** Photographie du réseau de sources d'électronébulisation réalisées sur un substrat de silicium après gravure profonde. S'agissant d'un essai, la partie nanofluidique réalisée normalement avant par lithographie électronique n'est pas présente. On aperçoit les dummies qui maintiennent la couche sacrificielle d'oxyde.

Pour terminer, les dispositifs sont libérés par gravure humide de la couche sacrificielle en oxyde dans une solution d'acide fluorhydrique, les dummies se séparent alors des structures. Ainsi les sources sont prédécoupées (Figure 6).



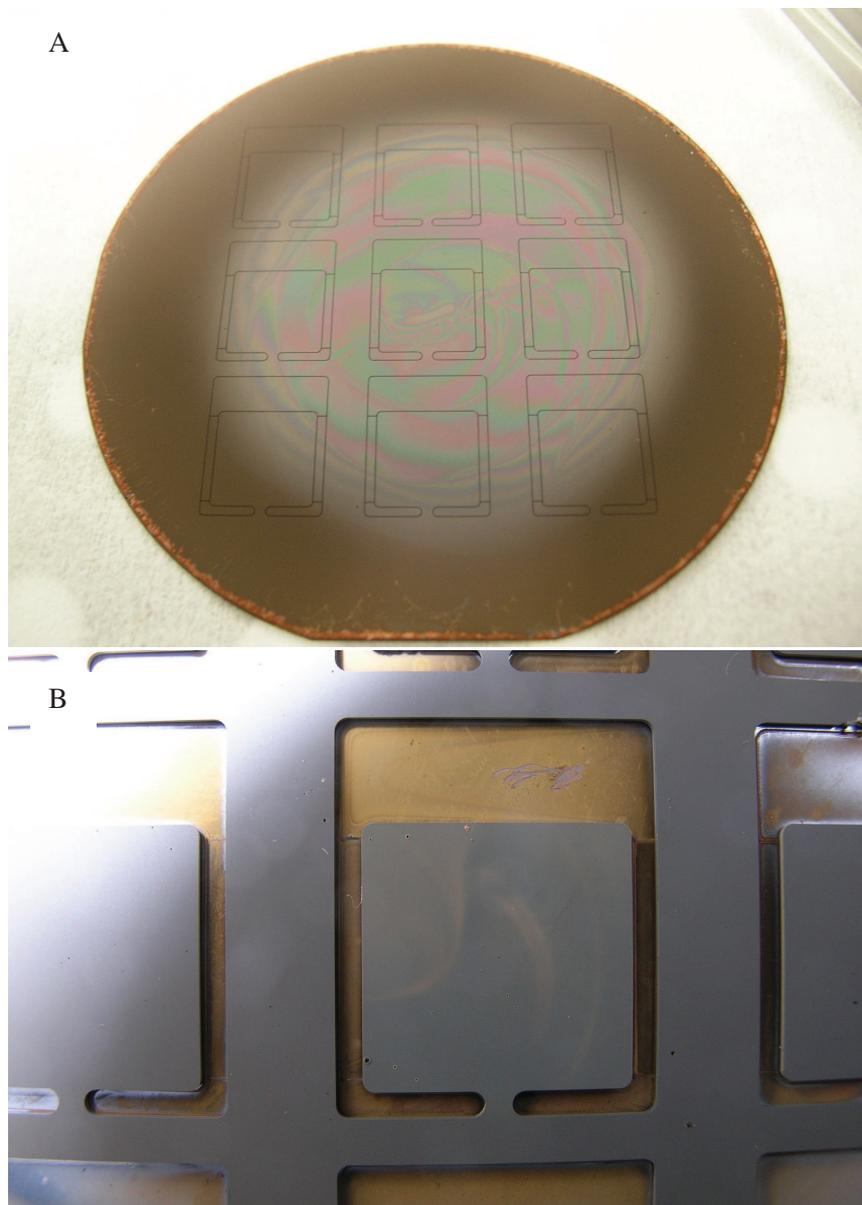
**Figure 6 :** Photographies d'une nano-source telle qu'elle serait réalisée par le procédé de fabrication. Ici, la source ne comporte pas la partie nanofluidique.

La Figure 7 présente des images au microscope électronique à balayage de l'extrémité des structures réalisées qui ne comportent pas la partie nanofluidique de la source.



**Figure 7 :** (A) Image au microscope électronique à balayage de la partie micrométrique de la source après la gravure profonde. (B) Agrandissement sur l'extrémité. La partie nanofluidique n'a pas été réalisée dans le cadre de cet essai. La largeur du microcanal est de l'ordre de 1.5µm.

Des capots qui auraient pu être assemblés par bonding ont également été réalisés séparément par gravure profonde d'un substrat de silicium (Figure 8).



**Figure 8 :** Photographies des capots réalisés en début de gravure profonde (A) et à la fin de la gravure profonde (B). Un autre substrat est utilisé comme support afin d'éviter que les dummies tombent dans le bâti de gravure.

Malheureusement, la conception, la mise au point de la lithographie électronique et du procédé de gravure anisotropique du polysilicium ayant nécessité un long travail, nous

n'avons pas pu terminer à temps la fabrication de ces sources et leur caractérisation en spectrométrie de masse dans le cadre de cette thèse.

La production d'interfaces reproductibles comme celles-ci pourrait permettre d'étudier de manière plus détaillée les mécanismes d'ionisation par électronébulisation en entreprenant des études systématiques de la relation existante entre la géométrie de la source et les données obtenues en spectrométrie de masse. Les conditions de fonctionnement optimales de telles sources sont loin d'être évidentes. En effet, même si c'est une technique très répandue, l'électronébulisation est de loin pas réellement comprise car c'est un procédé complexe combinant beaucoup de mécanismes en solution et en phase gazeuse à la croisée de nombreux domaines de recherche interdisciplinaires : physique, micro et nanofluidique, chimie, biologie [Gas 97]. L'hydrodynamique, l'électrostatique, l'évaporation doivent être prises en compte afin de garantir une description complète de l'émission des gouttelettes. C'est au prix d'une compréhension théorique plus aboutie de tous les phénomènes entrant en jeu que l'on pourra espérer concevoir un jour la source parfaite permettant de maîtriser totalement l'émission des gouttelettes et de révolutionner les recherches en protéomique. Cependant, c'est de loin le seul problème car même si chacun des spectres conduira à l'identification correcte de la protéine, un temps très long sera nécessaire à l'analyse du protéome complet puisqu'une expérience typique génère plus de 1000 spectres de masse en une heure. L'analyse et l'interprétation de volumes colossaux de données protéomiques sont aussi un problème majeur aujourd'hui. L'analyse manuelle des données est incompatible avec les milliers de spectres produits lors de l'expérimentation. Par conséquent, le développement d'outils d'analyse statistique des données protéomiques est crucial. Ce n'est que lorsque ces outils auront été standardisés et largement adoptés que les comparaisons de données générées dans différents laboratoires seront possibles. Le développement de ces outils pour la protéomique n'en est qu'aux balbutiements [Aeb 03]. Le système actuel de publication des travaux scientifiques ne se prête pas à la présentation des nombreuses données générées par les expériences de protéomique. Les tables de données sont souvent publiées en supplément du papier principal, et la discussion limitée à quelques conclusions tirées de ces données. De nouveaux moyens doivent être mis en place afin de faire paraître ces données et les rendre accessibles informatiquement.

Pour terminer, de manière plus générale, l'étude fondamentale de la nanofluidique en vue de l'émission et du contrôle de nanogouttelettes présente actuellement un intérêt majeur car elle pourrait être à la clé du développement de nouvelles technologies [Sal 05]. Par

exemple, de fins films de protéines pourraient être déposés et utilisés comme biocapteurs sur des biopuces [Uem 04]. Aussi, la possibilité d'utiliser les techniques d'électronébulisation pour l'écriture directe par nanolithographie a été évoquée [Fey 93] [Yin 05]. De nouvelles techniques comme celle-ci seront nécessaires afin de s'affranchir des limites de la lithographie liées à la longueur d'onde lorsqu'on s'écarte de la loi de Moore [Moo 65]. Afin de mettre en œuvre un tel procédé, il est probable que de nouveaux types d'émetteurs de taille nanométrique devront être développés avec une meilleure compréhension de la nanofluidique et des interactions entre les surfaces et les gouttelettes chargées émises par ces sources.

## Références bibliographiques

R. Aebersold and M. Mann, "Mass spectrometry-based proteomics", *Nature*, vol. 422, pp. 198-207, 2003.

R. Feynman, *J. Microelectromech. Syst.*, vol. 2, pp. 4, 1993.

S. J. Gaskell, "Electrospray: principles and practice", *J. Mass. Spectrom.*, vol. 32, pp. 677-688, 1997.

S. Grigoropoulos, E. Gogolides, A. D. Tserepi and A. G. Nassiopoulos, "Highly anisotropic silicon reactive ion etching for nanofabrication using mixtures of SF<sub>6</sub>/CHF<sub>3</sub> gases", *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 15, pp. 640-645, 1997.

G. E. Moore, *Electronics*, vol. 38, pp. 114, 1965.

O. V. Salata, "Tools of nanotechnology", *Current nanoscience*, vol. 1, pp. 25, 2005.

I. Uematsue, H. Matsumoto, K. Morota, M. Minagawa, A. Tanioka, Y. Yamagata and K. Inoue, "Surface morphology and biological activity of protein thin films produced by electrospray deposition", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 269, pp. 336, 2004.

Upchurch Scientific, [www.upchurch.com](http://www.upchurch.com).

L. Ying, A. Bruckbauer, D. Zhou, J. Gorelik, A. Schevchuk, M. Lab, Y. Korchev and D. Klenerman, "The scanned nanopipette: a new tool for high resolution bioimaging and controlled deposition of biomolecules", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 7, pp. 2859-2866, 2005.

# Lexique

**Acide aminé** : molécule organique possédant un squelette carboné et deux fonctions (une amine  $-NH_2$  et un acide carboxylique  $-COOH$ ). C'est l'unité structurale de base des protéines. Il mesure environ 100 picomètres.

**Angiotensine II** : chez l'être humain, l'angiotensinogène est un peptide de 485 acides aminés précurseur de l'angiotensine essentiellement produit et libéré dans la circulation par le foie. Lorsque la pression artérielle décroît au niveau des reins, ceux-ci produisent de la rénine qui va rompre la liaison peptidique de l'angiotensinogène pour libérer l'angiotensine I (10 acides aminés) qui a peu d'effet biologique. Son rôle principal est de se transformer en angiotensine II (8 acides aminés) sous l'action d'une enzyme de conversion provenant du foie. L'angiotensine II provoque une vasoconstriction intense (fermeture des vaisseaux) des artérioles périphériques à l'origine d'une hypertension artérielle (élévation de la tension artérielle). Dans l'organisme, l'angiotensine II est à son tour transformée en angiotensine III qui élève également la tension artérielle mais moins que la précédente.

**Anhydrase carbonique** : enzyme catalysant l'hydratation du  $CO_2$  pour former l'acide carbonique ( $H_2CO_3$ ).

**Antigène** : macromolécule naturelle ou synthétique, reconnue par des anticorps ou des cellules du système immunitaire et capable d'engendrer une réponse immunitaire.

**Bradykinine** : hormone peptidique fabriquée sous l'action d'une enzyme libérée dans la sueur qui agit sur les muscles lisses, dilate les vaisseaux sanguins et augmente la perméabilité des capillaires.

**$\beta$ -lactoglobuline A** : protéine du lait.

**Chromatographie** : technique d'analyse qualitative et quantitative de la chimie analytique dans laquelle l'échantillon contenant une ou plusieurs espèces est entraîné par un courant de phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique) le long d'une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, etc.). Chaque espèce se déplace à une vitesse propre dépendant de ses caractéristiques et de celles des deux phases.

**Cystéine** : acide aminé présent dans la plupart des protéines.

**Cytochrome C** : petite hémoprotéine associée avec la membrane interne de la mitochondrie que l'on trouve dans les plantes, les animaux et de nombreux organismes unicellulaires. C'est un composant essentiel de la chaîne respiratoire constitué de 11 peptides.

**Digestion protéolytique** : processus de dégradation des protéines.

**Digestion tryptique** : réalisée en utilisant la trypsine, une enzyme digestive du suc pancréatique qui a pour but de digérer les protéines.

**Ecoulement électro-osmotique :** passage d'un liquide au travers d'une paroi ou d'une membrane sous l'effet d'un champ électrique

**Electrophorèse :** technique de séparation d'espèces fondée sur le déplacement d'ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Du fait de leurs caractéristiques propres et en fonction des conditions de l'électrophorèse ces ions auront des vitesses de migration différentes, ils vont donc se séparer les uns des autres.

**Fibrinopeptide A :** substance libérée lors du processus de caillage du sang.

**Fibrinopeptide B :** substance libérée lors du processus de caillage du sang.

**Gène :** est une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui spécifie la synthèse d'une chaîne de polypeptides ou d'un acide ribonucléique (ARN) fonctionnel.

**Génome :** Ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce codé dans son ADN.

**Glycosaminoglycanes :** macromolécules formées de sucres, de peptides et de sels minéraux capables de fixer d'importantes quantités d'eau.

**Gramicidine S :** polypeptide utilisé comme antibiotique contre certaines bactéries et champignons.

**Granulocytes :** globules blancs qui détruisent les corps étrangers dans un organisme (phagocytose).

**Hémoprotéine :** encore appelée protéine à hème, il s'agit d'une protéine contenant un hème du groupe prosthétique, soit en lien covalent soit noncovalent à la protéine elle-même. Le fer dans l'hème est capable de subir oxydation et réduction. Les hémoprotéines peuvent intervenir dans le transport ou la fixation d'oxygène (hémoglobine, myoglobine, neuroglobine, cytoglobine et leghémoglobine), des catalyses (peroxydases), comme membranes de transport actives (cytochromes), ou lors du transfert d'électrons (cytochrome c).

**Hydrolase :** enzyme qui provoque et favorise l'hydrolyse (décomposition chimique d'une substance par l'eau).

**Hydrophile :** composé qui présente une affinité pour l'eau et qui absorbe l'eau.

**Hydrophobe :** composé qui montre une forte répulsion pour l'eau, qui repousse l'eau et qui est soluble dans les corps gras, mais insoluble dans l'eau.

**Iodure de tétrabutylammonium :** sel utilisé comme catalyseur dans certaines réactions chimiques

**Isothiocyanate de fluorescéine-arginine :** acide aminé marqué par un colorant fluorescent.

**Isothiocyanate de fluorescéine-phénylalanine :** acide aminé marqué par un colorant fluorescent.

**Leucine-enképhaline** : petit peptide ayant une action analgésique.

**LHRH (Luteinising Hormone Releasing Hormone)** : est un décapeptide produit par l'hypothalamus qui contrôle la sécrétion des hormones sexuelles.

**Mélicitine** : polypeptide principal constituant du venin d'abeille.

**Mitochondrie** : structure intracellulaire dont la taille est de l'ordre du micromètre. C'est dans les mitochondries que l'énergie fournie par les molécules organiques est récupérée puis stockée sous forme d'ATP.

**Monocytes** : ce sont les plus gros globules blancs. Ils ont un fort potentiel de phagocytose (destruction et digestion des corps étrangers).

**Morpholine** : composé chimique ayant les propriétés d'une base.

**Myoglobine** : protéine des vertébrés permettant le transport de l'oxygène dans les tissus musculaires.

**Oligomère** : molécule constituée d'un nombre fini de monomères.

**P-benzoquinone** : cétone utilisée comme accepteur de proton et agent oxydant.

**Peptide** : chaîne comportant moins de 50 acides aminés reliés par des liaisons peptidiques (liaison covalente entre un atome de carbone et un atome d'azote).

**P-hydroquinone** : composé organique aromatique utilisé comme agent réducteur.

**Plateaux** : en électrophorèse, le nombre de plateaux théoriques est exprimé par  $N=L^2 / \sigma^2$  où L est la longueur du capillaire et  $\sigma$  la variance du pic de l'espèce identifiée dont l'expression dépend en particulier du volume mort existant entre le capillaire et le micro-canal.

**Porophore** : substance qui, incorporée à une matière plastique, y produit des bulles gazeuses qui la transforment en masse spongieuse ou alvéolaire.

**Protéine** : macromolécule biologique composée par une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de 100 acides aminés.

**Protéomique** : science qui étudie les protéomes, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, tissu, organe ou organisme à un moment donné et sous des conditions données.

**Polyimide** : polymère présentant de très bonnes propriétés thermiques.

**Polyoléfine** : obtenu à partir d'hydrocarbures.

**Polypropylène** : polymère thermoplastique polyvalent et très répandu.

**Polysaccharides** : parfois appelés glycanes ou polysides, ils sont une forme de glucides appelés dans le langage courant des sucres bien qu'ils n'aient pas de pouvoir sucrant.

**Potentiel zeta :** l'arrangement des charges à l'interface solide-liquide auquel s'ajoute l'équilibre des contre-ions dans un liquide est communément appelé double couche électrique. La fine couche de contre-ions située proche de la surface solide chargée est appelée couche compacte. Les contre-ions à l'intérieur de cette couche sont immobiles à cause de la forte attraction électrostatique. Par contre, les contre-ions en dehors de cette couche sont mobiles. Cette partie est appelée couche de diffusion. Le potentiel zeta est le potentiel électrostatique à la limite entre la couche compacte et la couche de diffusion.

**Résérpine :** drogue antihypertensive et tranquillisante extraite des racines de certaines espèces de Rauwolfia, plantes tropicales et semi-tropicales.

**Somatostatine :** hormone sécrétée par l'hypothalamus et certaines cellules de l'estomac, de l'intestin et du pancréas ayant une action inhibitrice.

**Ubiquitine :** petite protéine (76 acides aminés) présente dans toutes les cellules eucaryotes dont la fonction principale est de marquer d'autres protéines en vue de leur destruction (protéolyse).

# Annexes

## 1- Matériaux et technologies de fabrication

**Table 1 :** Matériaux ayant été utilisés pour la fabrication de dispositifs ESI pour la spectrométrie de masse [Kos 07].

Matériaux	Références bibliographiques
Verre/Pyrex	[Laz 06], [Öst 04], [Kau 04], [Zha 00], [Zha 01], [Zha 99], [Xue 97 a], [Xue 97 b], [Wan 00], [Ram 97], [Pin 00], [Li 00 a], [Li 00 b], [Li 01 a], [Li 01 b], [Li 02], [Li 99 a], [Laz 03], [Laz 01], [Laz 00], [Laz 99], [Fig 98 a], [Fig 98 b], [Fig 98 c], [Fig 97], [Den 01 a], [Den 01 b], [Bin 99], [Raz 05], [Laz 02], [de B 05], [Koe 05], [Bri 05 a], [Yue 05], [Bri 05 b], [Mao 06], [Öst 06 a], [Öst 06 b], [Fra 06], [Spi 02], [Wan 04 a], [Li 99 b]
Quartz	[Tac 03], [Tac 04], [Aka 06]
PDMS (polydiméthylsiloxane)	[Kim 01 a], [Kim 01 b], [Kim 01 c], [Hui 03], [Cha 99], [Ian 05], [Tho 05], [Chi 02], [Dah 05 a], [Gao 01], [Sve 04], [Dah 05 b], [Lil 05], [Bed 06], [Jia 01], [Sun 03], [Saa 06], [Wu 06], [Lin 06]
PMMA (Polyméthacrylate de méthyle)	[Men 01], [Sve 03], [Che 01], [Bed 06], [Sch 04], [Yua 01], [Muc 04], [Wil 05], [Shu 03]
Polycarbonate	[Sve 03], [Wan 04 b], [Vro 00], [Xu 98], [Xia 99], [Wen 00], [Tan 01], [Gry 06], [Cha 00], [Mar 99]
Polyimide	[Yin 05], [For 05], [Niñ 05], [Gob 02], [Lio 02], [Lio 03], [Li 04], [Ros 03], [Zam 05], [Bin 04], [Van 04]
Polyester	[Jia 01], [Wen 00], [Roh 02], [Roh 01], [Rou 04 a], [Rou 04 b], [Roh 05], [Day 05], [Day 06], [Gob 02], [Lio 02], [Lio 03], [Lio 04], [Ros 03], [Zam 05], [Bin 04], [Do L 03], [Cha 05], [Ek 06]
Zeonor	[Ben 03], [Kam 02], [Kam 02], [Tan 03], [Yan 04], [Yan 05 a], [Yan 05 b], [Bed 06]
SU-8	[Ars 04 a], [Ars 04 b], [Le G 03 a], [Le G 03 b], [Le G 04], [Car 04], [Ars 03], [Tuo 05], [Le G 06], [Ars 06]
Silicium	[Öst 04], [Kau 04], [Öst 06], [Öst 06], [Fra

	[06], [Zha 03], [Van 02], [Van 03], [Sjö 03], [Sch 00], [Kap 03], [Gri 02], [Det 03], [Spi 02], [Cor 06], [Lic 00], [Ade 05]
Polysilicium	[Ars 05], [Bri 04]
Carbone vitreux	[Sse 04]
Résine	[Liu 00]
Parylène	[Lic 00], [Xie 05]
Dioxyde de silicium	[Sjö 03], [Gri 02]

**Table 2 :** *Technologies utilisées pour la fabrication de dispositifs ESI* [Kos 07].

\* Peut nécessiter des procédés en salle blanche

<b>Technologies de fabrication</b>	<b>Références bibliographiques</b>
En salle blanche	
Gravure à l'acide fluorhydrique	[Laz 06], [Öst 04], [Kau 04], [Zha 00], [Zha 01], [Zha 99], [Xue 97], [Xue 97], [Wan 00], [Tac 03], [Ram 97], [Pin 00], [Li 00], [Li 00], [Li 01], [Li 01], [Li 02], [Li 99], [Laz 03], [Laz 01], [Laz 00], [Laz 99], [Fig 98], [Fig 98], [Fig 98], [Fig 97], [Den 01], [Den 01], [Bin 99], [Raz 05], [Laz 02], [De B 05], [Koe 05], [Bri 05], [Yue 05], [Bri 05], [Mao 06], [Öst 06], [Öst 06], [Fra 06]
Gravure profonde	[Fra 06], [Zha 03], [Van 02], [Van 03], [Sjö 03], [Sch 00], [Kap 03], [Gri 02], [Det 03], [Spi 02], [Cor 06]
Exposition UV/ SU-8	[Ars 04], [Ars 04], [Le G 03], [Le G 03], [Le G 04], [Car 04], [Ars 03], [Tuo 05], [Le G 06], [Ars 06]
Photolithographie par rayon X	[Men 01]
Autres procédés MEMS	[Lic 00], [Ars 05], [Bri 04], [Xie 05], [Ade 05]
Anodisation électrochimique	[Sse 04]
Gravure anisotrope	[Öst 04], [Kau 04], [Lic 00], [Sve 03]
En dehors de la salle blanche	
Moule PDMS avec SU-8*	[Kim 01], [Kim 01], [Kim 01], [Hui 03], [Cha 99], [Ian 05], [Tho 05]
Moule PDMS avec capillaires, fils ou autres surfaces	[Chi 02], [Dah 05], [Gao 01], [Sve 04], [Dah 05], [Lil 05]
Gaufrage à chaud*	[Ben 03], [Che 01], [Kam 01], [Kam 02], [Tan 03], [Wan 04 b], [Yan 04], [Yan 05], [Yan 05], [Bed 06]
Gaufrage*	[Jia 01], [Vro 00]

Ablation laser	[Xu 98], [Xia 99], [Wen 00], [Yin 05], [Tan 01], [Roh 02], [Roh 01], [For 05], [Niñ 05], [Rou 04 a], [Rou 04 b], [Roh 05], [Day 05], [Day 06]
Gravure plasma*	[Gob 02], [Lio 02], [Lio 03], [Lio 04], [Ros 03], [Zam 05], [Bin 04]
Moulage par injection	[Sve 03], [Gry 06]
Impression laser	[do L 03]
Micro-usinage	[Sch 04], [Cha 05]
Autres techniques mécaniques	[Wan 04 a], [Yua 01], [Char 00]

## Références bibliographiques

S. Aderogba, J. M. Meacham; F. L. Degertekin, A. G. Fedorov and F. M. Fernandez, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 86, 203110, 2005.

S. Akashi, K. Suzuki, A. Arai, N. Yamada, E. I. Suzuki, K. Hirayama, S. Nakamura and Y. Nishimura, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 20, pp. 1932-1938, 2006.

S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier and C. Rolando, *Electron. Lett.*, vol. 39, pp. 1702-1703, 2003.

<sup>a</sup> S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier and C. Rolando, *Sens. Actuators B*, vol. 98, pp. 140-147, 2004.

<sup>b</sup> S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier and C. Rolando, *J. Micromech. Microeng.*, vol. 14, pp. 310-316, 2004.

S. Arscott, S. Le Gac and C. Rolando, *Sens. Actuators B*, vol. 106, pp. 741-749, 2005.

S. Arscott, M. Gaudet, M. Brinkmann, A. E. Ashcroft and R. Blossey, *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 18, pp. S677-S690, 2006.

M. F. Bedair and R. D. Oleschuk, *Anal. Chem.*, vol. 78, pp. 1130-1138, 2006.

S. Bennetton, J. Kameoka, A. Tan, T. Wachs, H. Craighead and J. D. Henion, *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 6430-6436, 2003.

L. Bindila, M. Froesch, N. Lion, Z. Vukelic, J. S. Rossier, H. H. Girault, J. Peter-Katalinic and A. D. Zamfir, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 18, pp. 2913-2920, 2004.

N. H. Bings, C. Wang, C. D. Skinner, C. L. Colyer, P. Thibault and D. J. Harrison, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 3292-3296, 1999.

A. R. de Boer, B. Bruyneel, J. G. Krabbe, H. Lingeman, W. M. A. Niessen and H. Irth, *Lab Chip*, vol. 5, pp. 1286-1292, 2005.

M. Brinkmann, R. Blossey, S. Arscott, C. Druon, P. Tabourier, S. Le Gac and C. Rolando, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 85, pp. 2140-2142, 2004.

<sup>a</sup> M. Brivio, A. Liesener, R. E. Oosterbroek, W. Verboom, U. Karst, A. van den Berg and D. N. Reinhoudt, *Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 6852-6856, 2005.

<sup>b</sup> M. Brivio, R. E. Oosterbroek, W. Verboom, A. van den Berg and D. N. Reinhoudt, *Lab Chip*, vol. 5, pp. 1111-1122, 2005.

J. Carlier, S. Arscott, V. Thomy, J. C. Fourier, F. Caron, J. C. Camart, C. Druon and P. Tabourier, *J. Micromech. Microeng.*, vol. 14, pp. 619-624, 2004.

J. H. Chan, A. T. Timperman, D. Qin and R. Aebersold, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 4437-4444, 1999.

Y. Z. Chang, M. W. Yang and G. J. Wang, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 383, pp. 76-82, 2005.

A. Chartogne, U. R. Tjaden and J. van der Greef, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 14, pp. 1269-1274, 2000.

S. H. Chen, W. C. Sung, G. B. Lee, Z. Y. Lin, P. W. Chen and P. C. Liao, "A disposable poly(methylmethacrylate)-based microfluidic module for protein identification by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry", *Electrophoresis*, vol. 22, Issue 18, pp. 3972-3977, 2001

C. H. Chiou, G. B. Lee, H. T. Hsu, P. W. Chen and P. C. Liao, "Micro devices integrated with microchannels and electrospray nozzles using PDMS casting techniques", *Sens. Actuator B-Chem.*, vol. 86, Issue 2-3, pp. 280-286, 2002.

T. N. Corso, C. K. Van Pelt, J. Li, C. Ptak and X. Huang, *Anal. Chem.*, vol. 78, pp. 2209-2219, 2006.

<sup>a</sup> A. P. Dahlin, S. K. Bergstrom, P. E. Andren, K. E. Markides and J. Bergquist, "Poly(dimethylsiloxane)-based microchip for two dimensional solid-phase extraction capillary electrophoresis with an integrated electrospray emitter tip", *Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 5356-5363, 2005.

<sup>b</sup> A. P. Dahlin, M. Wetterhall, G. Liljegren, S. K. Bergstrom, P. Andren, L. Nyholm, K. E. Markides and J. Bergquist, "Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry from a polymer modified poly(dimethylsiloxane) microchip with an integrated graphite electrospray tip", *Analyst*, vol. 130, pp. 193-199, 2005.

L. Dayon, C. Roussel, M. Prudent, N. Lion and H. H. Girault, *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 238-247, 2005.

L. Dayon, M. Abonnenc, M. Prudent, N. Lion and H. H. Girault, *J. Mass Spectrom.*, vol. 41, pp. 1484-1490, 2006.

<sup>a</sup> Y. Deng, J. Henion, J. Li, P. Thibault, C. Wang and D. J. Harrison, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 639-646, 2001.

- <sup>b</sup> Y. Deng, H. Zhang and J. Henion, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1432-1439, 2001.
- J. M. Dethy, B. L. Ackermann, C. Delatour, J. D. Henion and G. A. Schultz, *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 805-811, 2003.
- P. Ek, J. Sjö Dahl and J. Roeraade, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 20, pp. 3176-3182, 2006.
- D. Figeys, Y. Ning and R. Aebersold, *Anal. Chem.*, vol. 69, pp. 3153-3160, 1997.
- <sup>a</sup> D. Figeys and R. Aebersold, *Anal. Chem.*, vol. 70, pp. 3721-3727, 1998.
- <sup>b</sup> D. Figeys, S. P. Gygi, G. McKinnon and R. Aebersold, *Anal. Chem.*, vol. 70, pp. 3728-3734, 1998.
- <sup>c</sup> D. Figeys, C. Lock, L. Taylor and R. Aebersold, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 12, pp. 1435-1444, 1998.
- M. H. Fortier, E. Bonneil, P. Goodley and P. Thibault, "Integrated microfluidic device for mass spectrometry-based proteomics and its application to biomarker discovery programs", *Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 1631-1640, 2005.
- S. Franssila, S. Marttila, K. Kolari, P. Östman, T. Kotiaho, R. Kostianen, R. Lehtiniemi, C. M. Fager and J. Manninen, *J. Microelectromech. Syst.*, vol. 15, pp. 1251-1259, 2006.
- J. Gao, J. Xu, L. E. Locascio and C. S. Lee, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 2648-2655, 2001.
- V. Gobry, J. van Oostrum, M. Martinelli, T. C. Rohner, F. Reymond, J. S. Rossier and H. H. Girault, *Proteomics*, vol. 2, pp. 405-412, 2002.
- T. A. van de Goor, *PharmaGenomics*, pp. 20-22, July/August 2004.
- P. Griss, J. Melin, J. Sjö Dahl, J. Roeraade and G. Stemme, "Development of micromachined hollow tips for protein analysis based on nanoelectrospray ionization mass spectrometry", *J. Micromech. Microeng.*, vol. 12, pp. 682-687, 2002.
- J. Grym, M. Otevrel and F. Foret, *Lab Chip*, vol. 6, pp. 1306-1314, 2006.
- K. Huikko, P. Ostman, K. Grigoras, S. Tuomikoski, V. M. Tiainen, A. Soininen, K. Puolanne, A. Manz, S. Franssila, R. Kostianen and T. Kotiaho, "Poly(dimethylsiloxane) electrospray devices fabricated with diamond like carbon-poly(dimethylsiloxane) coated SU-8 masters", *Lab on a Chip*, vol. 3, pp. 67-72, 2003.
- J. M. Iannaccone, J. A. Jakubowski, P. W. Bohn and J. V. Sweedler, *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 4684-4690, 2005.
- Y. Jiang, P. C. Wang, L. E. Locascio and C. S. Lee, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 2048-2053, 2001.

- J. Kameoka, H. G. Craighead, H. Zhang and J. Henion, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1935-1941, 2001.
- J. Kameoka, R. Orth, B. Llic, D. Czaplewski, T. Wachs and H. G. Craighead, *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 5897-5901, 2002.
- J. T. Kapron, E. Pace, C. K. Van Pelt and J. D. Henion, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, pp. 2019-2026, 2003.
- T. J. Kauppila, P. Östman, S. Martilla, R. A. Ketola, T. Kotiaho, S. Franssila and R. Kostianen, *Anal. Chem.*, vol. 76, pp. 6797-6801, 2004.
- <sup>a</sup> J. S. Kim and D. R. Knapp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 12, pp. 463-469, 2001.
- <sup>b</sup> J. S. Kim and D. R. Knapp, *J. Chromatogr. A*, vol. 924, pp. 137-145, 2001.
- <sup>c</sup> J. S. Kim and D. R. Knapp, *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 3993-3999, 2001.
- T. Koerner and R. D. Oleschuk, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, vol. 19, pp. 3279-3286, 2005.
- S. Koster and E. Verpoorte, "A decade of microfluidic analysis coupled with electrospray mass spectrometry: An overview", *Lab Chip*, vol. 7, pp. 1394-1412, 2007.
- C. L. do Lago, H. D. T. da Silva, C. A. Neves, J. G. A. Brito-Neto and J. A. F. da Silva, *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 3853-3858, 2003.
- I. M. Lazar, R. S. Ramsey, S. Sundberg and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, vol. 71, Issue 17, pp. 3627-3631, 1999.
- I. M. Lazar, R. S. Ramsey, S. C. Jacobson, R. S. Foote and J. M. Ramsey, *J. Chromatogr. A*, vol. 892, pp. 195-201, 2000.
- I. M. Lazar, R. S. Ramsey and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1733-1739, 2001.
- I. M. Lazar and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 6259-6268, 2002.
- I. M. Lazar, L. Li, Y. Yang and B. L. Karger, *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 3655-3662, 2003.
- I. M. Lazar, J. Grym and F. Foret, *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 25, pp. 573-594, 2006.
- <sup>a</sup> S. Le Gac, S. Arscott, C. Cren-Olivé and C. Rolando, *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, pp. 1259-1264, 2003.
- <sup>b</sup> S. Le Gac, S. Arscott and C. Rolando, *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 3640-3647, 2003.
- S. Le Gac, C. Cren-Olivé, C. Rolando and S. Arscott, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, pp. 409-412, 2004.
- S. Le Gac, C. Rolando and S. Arscott, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 17, pp. 75-80, 2006.

<sup>a</sup> J. Li, P. Thibault, N. H. Bings, C. D. Skinner, C. Wang, C. Colyer and J. Harrison, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 3036-3045, 1999.

<sup>a</sup> J. Li, J. F. Kelly, I. Chernushevich, D. J. Harrison and P. Thibault, *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 599-609, 2000.

<sup>b</sup> J. Li, C. Wang, J. F. Kelly, D. J. Harrison and P. Thibault, *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 198-210, 2000.

<sup>a</sup> J. Li, T. L. Tremblay, P. Thibault, C. Wang, S. Attiya, and D. J. Harrison, *Eur. J. Mass Spectrom.*, vol. 7, pp. 143-155, 2001.

<sup>b</sup> J. Li, T. L. Tremblay, C. Wang, S. Attiya, D. J. Harrison and P. Thibault, *Proteomics*, vol. 1, pp. 975-986, 2001.

J. Li, T. LeRiche, T. L. Tremblay, C. Wang, E. Bonneil, D. J. Harrison and P. Thibault, "Application of microfluidic devices to proteomics research: identification of traced-level protein digests and affinity capture of target peptides", *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 1, pp. 157-168, 2002.

<sup>b</sup> W. Li, C. L. Hendrickson, M. R. Emmett and A. G. Marshall, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 4397-4402, 1999.

L. Licklider, X. Q. Wang; A. Desai, Y. C. Tai and T. D. Lee, *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 367-375, 2000.

G. Liljegren, A. P. Dahlin, C. Zettersten, J. Bergquist and L. Nyholm, *Lab Chip*, vol. 5, pp. 1008-1016, 2005.

P. Linberg, A. P. Dahlin, S. K. Bergström, S. Thorslund, P. E. André, F. Nikolajeff and J. Bergquist, "Sample pretreatment on a microchip with an integrated electrospray emitter", *Electrophoresis*, vol. 27, pp. 2075-2082, 2006.

N. Lion, V. Gobry, H. Jensen, J. S. Rossier and H. H. Girault, "Integration of a membrane-based desalting step in a microfabricated disposable polymer injector for mass spectrometric protein analysis", *Electrophoresis*, vol. 23, pp. 3583-3588, 2002.

N. Lion, J. O. Gellon, H. Jensen and H. H. Girault, "On-chip protein sample desalting and preparation for direct coupling with electrospray ionization mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, vol. 1003, pp. 11-19, 2003.

N. Lion, J. O. Gellon and H. H. Girault, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 18, pp. 1614-1620, 2004.

H. Liu, C. Felten; Q. Xue, B. Zhang, P. Jedrzejewski, B. L. Karger and F. Foret, *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 3303-3310, 2000.

X. L. Mao, I. K. Chu and B. C. Lin, *Electrophoresis*, vol. 27, pp. 5059-5067, 2006.

- P. M. Martin, D. W. Matson, W. D. Bennett, Y. Lin and D. J. Hammerstrom, *J. Vac. Sci. Technol. A*, vol. 17, pp. 2264-2269, 1999.
- Z. J. Meng, S. Z. Qi, S. A. Soper and P. A. Limbach, *Anal. Chem.*, vol. 73, Issue 6, pp. 1286-1291, 2001.
- A. Muck and A. Svatos, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 18, pp. 1459-1464, 2004.
- M. Niñonuevo, H. An, H. Yin, K. Killeen, R. Grimm, R. Ward, B. German and C. B. Lebrilla, *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 3641-3649, 2005.
- P. Östman, S. J. Marttila, T. Kotiaho, S. Franssila and R. Kostiainen, *Anal. Chem.*, vol. 76, pp. 6659-6664, 2004.
- <sup>a</sup> P. Östman, S. Jantti, K. Grigoras, V. Saarela, R. A. Ketola, S. Franssila, T. Kotiaho and R. Kostiainen, *Lab Chip*, vol. 6, pp. 948-953, 2006.
- <sup>b</sup> P. Östman, L. Luosujarvi, M. Haapala, K. Grigoras, R. A. Ketola, T. Kotiaho, S. Franssila and R. Kostiainen, *Anal. Chem.*, vol. 78, pp. 3027-3031, 2006.
- D. M. Pinto, Y. Ning and D. Figeys, *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 181-190, 2000.
- R. S. Ramsey and J. M. Ramsey, "Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping", *Anal. Chem.*, vol. 69, Issue 6, pp. 1174-1178, 1997.
- T. T. Razunguzwa, J. Lenke and A. T. Timperman, *Lab Chip*, vol. 5, pp. 851-855, 2005.
- T. C. Rohner, J. S. Rossier and H. H. Girault, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 5353-5357, 2001.
- T. C. Rohner, J. S. Rossier and H. H. Girault, *Electrochem. Commun.*, vol. 4, pp. 695-700, 2002.
- T. C. Rohner and H. H. Girault, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 19, pp. 1183-1190, 2005.
- J. S. Rossier, N. Youhnovski, N. Lion, E. Damoc, S. Becker, F. Reymond, H. H. Girault and M. Przybylski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 42, pp. 53-58, 2003.
- <sup>a</sup> C. Roussel, L. Dayon, H. Jensen and H. H. Girault, *J. Electroanal. Chem.*, vol. 570, pp. 187-199, 2004.
- <sup>b</sup> C. Roussel, L. Dayon, N. Lion, T. C. Rohner, J. Jossierand, J. Rossier, H. Jensen and H. H. Girault, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, pp. 1767-1779, 2004.
- V. Saarela, S. Franssila, S. Tuomikoski, S. Marttila, P. Östman, T. Sikanen, T. Kotiaho and R. Kostiainen, *Sens. Actuator B*, vol. 114, pp. 552-557, 2006.
- M. Schilling, W. Nigge, A. Rudzinski, A. Neyer and R. Hergenröder, "A new on-chip ESI nozzle for coupling of MS with microfluidic devices", *Lab Chip*, vol. 4, pp. 220-224, 2004.

- G. A. Schultz, T. N. Corso, S. J. Prosser and S. Zhang, "A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 4058-4063, 2000.
- W. Shui, Y. L. Yu, X. J. Xu, Z. Y. Huang, G. B. Xu, and P. Y. Yang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, pp. 1541-1547, 2003.
- J. Sjö Dahl, J. Melin, P. Griss, A. Emmer, G. Stemme and J. Roeraade, "Characterization of micromachined hollow tips for two-dimensional nanoelectrospray mass spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, pp. 337-341, 2003.
- V. Spikmans, S. J. Lane, B. Leavens, A. Manz and N. W. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 16, pp. 1377-1388, 2002.
- S. Ssenyange, J. Taylor, D. J. Harrison and M. T. McDermott, "A glassy carbon microfluidic device for electrospray mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 76, pp. 2393-2397, 2004.
- W. C. Sung, S. Y. Huang, P. C. Liao, G. B. Lee, C. W. Li and S. H. Chen, *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 3648-3654, 2003.
- M. Svedberg, A. Pettersson, S. Nilsson, J. Bergquist, L. Nyholm, F. Nikolajeff and K. Markides, "Sheathless electrospray from polymer microchips", *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 3934-3940, 2003.
- M. Svedberg, M. Veszelei, J. Axelsson, M. Vangbo and F. Nikolajeff, "Poly(dimethylsiloxane) microchip: microchannel with integrated open electrospray tip", *Lab Chip*, vol. 4, pp. 322-327, 2004.
- Y. Tachibana, K. Otsuka, S. Terabe, A. Arai, K. Suzuki and S. Nakamura, "Robust and simple interface for microchip electrophoresis-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, vol. 1011, pp. 181-192, 2003.
- Y. Tachibana, K. Otsuka, S. Terabe, A. Arai, K. Suzuki and S. Nakamura, *Journal of Chromatography A*, vol. 1025, pp. 287-296, 2004.
- A. Tan, S. Benetton and J. D. Henion, *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 5504-5511, 2003.
- K. Tang, Y. Lin, D. W. Matson, T. Kim and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1658-1663, 2001.
- S. Thorslund, P. Lindberg, P. E. André n, F. Nikolajeff and J. Bergquist, *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 4674-4683, 2005.
- S. Tuomikoski, T. Sikanen, R. A. Ketola, R. Kostiainen, T. Kotiaho and S. Franssila, *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 4691-4702, 2005.
- C. K. Van Pelt, S. Zhang and J. D. Henion, *J. Biomol. Tech.*, vol. 13, pp. 72-84, 2002.
- C. K. Van Pelt, S. Zhang, E. Fung, I. Chu, T. Liu, C. Li, W. A. Korfmacher and J. D. Henion, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, pp. 1573-1578, 2003.

E. X. Vrouwe, J. Gysler, U. R. Tjaden and J. van der Greef, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 14, pp. 1682-1688, 2000.

C. Wang, R. Oleschuk, F. Ouchen, J. Li, P. Thibault and D. J. Harrison, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 14, pp. 1377-1383, 2000.

<sup>a</sup> G. J. Wang, M. W. Yang and Y. Z. Chang, *Biomed. Microdev.*, vol. 6, pp. 159-164, 2004.

<sup>c</sup> Y. X. Wang, J. W. Cooper, C. S. Lee and D. L. DeVoe, "Efficient electrospray ionization from polymer microchannels using integrated hydrophobic membranes", *Lab Chip*, vol. 4, pp. 363-367, 2004.

J. Wen, Y. Lin, F. Xiang, D. W. Matson, H. R. Udseth and R. D. Smith, "Microfabricated isoelectric focusing device for direct electrospray ionization", *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 191-197, 2000.

D. J. Wilson and L. Konermann, *Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 6887-7894, 2005.

H. L. Wu, P. Y. Yang, G. R. Fan, Y. P. Tian, H. J. Lu and H. Jin, *Chin. J. Chem.*, vol. 24, pp. 903-909, 2006.

F. Xiang, Y. Lin, Wen. Jenny, D. W. Matson and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 1485-1490, 1999.

J. Xie, Y. N. Miao, J. Shih, Y. C. Tai and T. D. Lee, "Microfluidic platform for liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses of complex peptide mixtures", *Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 6947-6953, 2005.

N. Xu, Y. Lin, S. A. Hofstadler, D. Matson, C. J. Call and R. D. Smith, "A micro fabrication dialysis device for sample cleanup in electrospray ionization mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 70, pp. 3553-3556, 1998.

<sup>a</sup> Q. F. Xue, Y. M. Dunayevskiy, F. Foret and B. L. Karger, "Integrated multichannel microchip electrospray ionization mass spectrometry: Analysis of peptides from on chip tryptic digestion of melittin", *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, vol. 11, Issue 12, pp. 1253-1256, 1997.

<sup>b</sup> Q. F. Xue, F. Foret, Y. M. Dunayevskiy, P. M. Zavracky, N. E. McGruer and B. L. Karger, "Multichannel microchip electrospray mass spectrometry", *Anal. Chem.*, vol. 69, Issue 3, pp. 426-430, 1997.

Y. N. Yang, J. Kameoka, T. Wachs, J. D. Henion and H. G. Craighead, *Anal. Chem.*, vol. 76, pp. 2568-2574, 2004.

<sup>a</sup> Y. N. Yang, C. Li, J. Kameoka, K. H. Lee and H. G. Craighead, *Lab Chip*, vol. 5, pp. 869-876, 2005.

<sup>b</sup> Y. N. Yang, C. Li, K. H. Lee and H. G. Craighead, *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 3622-3630, 2005.

N. F. Yin, K. Killeen, R. Brennen, D. Sobek, M. Werlich and T. V. van de Goor, "Microfluidic chip for peptide analysis with an integrated HPLC column, sample enrichment column and nanoelectrospray tip", *Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 527-533, 2005.

C. H. Yuan and J. Shiea, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1080-1083, 2001.

G. E. Yue, M. G. Roper, E. D. Jeffery, C. J. Easley, C. Balchunas, J. P. Landers and J. P. Ferrance, *Lab Chip*, vol. 5, pp. 619-627, 2005.

A. D. Zamfir, N. Lion, Z. Vukelic, L. Bindila, J. Rossier, H. H. Girault and J. Peter-Katalinic, *Lab Chip*, vol. 5, pp. 298-307, 2005.

B. Zhang, H. Liu, B. L. Karger and F. Foret, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 3258-3264, 1999.

B. Zhang, F. Foret and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 1015-1022, 2000.

B. Zhang, F. Foret and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 2675-2681, 2001.

S. Zhang, C. K Van Pelt and J. D. Henion, *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 3620-3632, 2003.

## 2- Applications du FIB

Les principaux domaines d'applications du FIB sont la science des matériaux et en particulier le domaine des semi-conducteurs et des circuits intégrés.

### **Etablissement et coupure de connexions**

L'établissement ou la coupure d'éléments de connexions sur le niveau supérieur d'un dispositif a de nombreuses applications potentielles : personnalisation de circuits, réparation, réglage, localisation par isolement de certaines parties défailtantes, coupures de liaisons dans le but de programmation de mémoire ROM, ouvertures de courts-circuits dus à des difficultés de lift-off dans le cas de systèmes à très haute densité. Quelques unes de ces opérations sont communément réalisées par pulvérisation à l'aide d'un faisceau laser, mais la résolution offerte par les ions focalisés est supérieure.

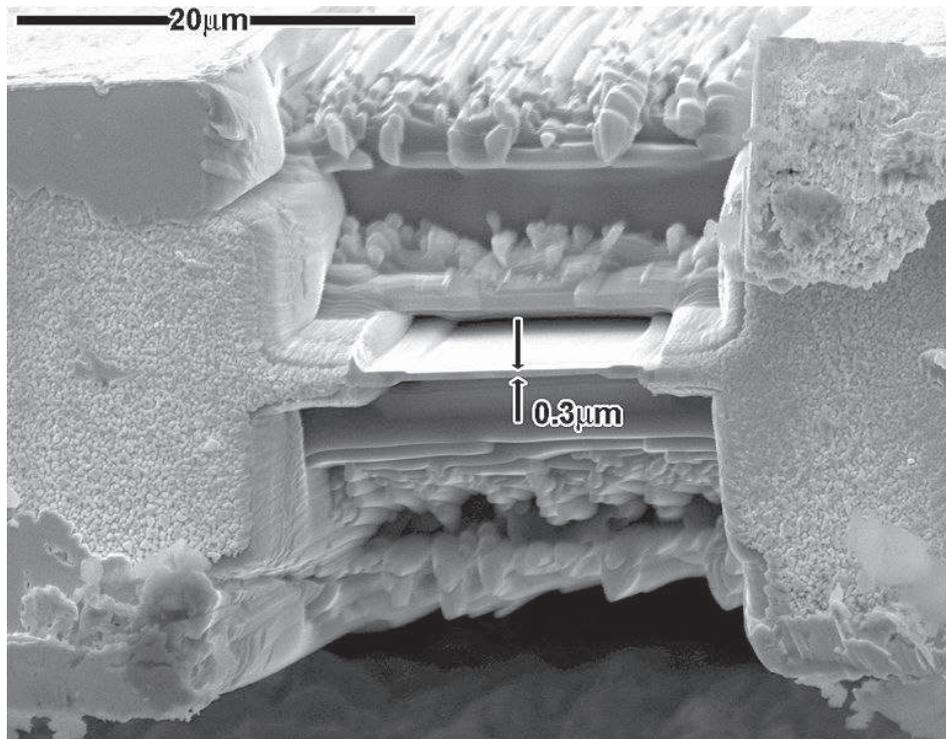
Le contrôle dans les trois directions du processus d'érosion localisée peut par exemple être mis à profit afin de régler une résistance constituée par deux plots de connexions séparés par une zone résistive de  $10 \times 10 \mu\text{m}$  en GaAs dopé p, le tout environné du même matériau, mais rendu isolant par amorphisation. La diminution de la section de cette partie résistive par pulvérisation jusqu'à ce que la valeur désirée soit atteinte permet un réglage de la résistance avec une précision de 5% dont la valeur reste stable dans le temps.

Comme nous l'avons vu précédemment, le FIB peut être utilisé pour enlever de la matière mais également pour déposer des matériaux. On parle de déposition induite par faisceau d'ions. Il s'agit d'un dépôt chimique en phase vapeur assisté par FIB qui se produit lorsqu'un gaz comme l'hexacarbonyle de tungstène ( $W(CO)_6$ ), introduit dans la chambre à vide est adsorbé par l'échantillon. En balayant une zone de l'échantillon avec le faisceau d'ions, le gaz précurseur est décomposé et le tungstène, non volatile, reste déposé à la surface de l'échantillon. La couche de tungstène déposée protège l'échantillon de la pulvérisation du gallium. D'autres métaux que le tungstène, comme le platine peuvent également être déposés par le même procédé.

Ainsi, le FIB est souvent utilisé dans l'industrie des semi-conducteurs pour réparer ou modifier un dispositif semi-conducteur. Par exemple, dans un circuit intégré, le faisceau de gallium peut être utilisé pour couper des connexions électriques non désirées ou pour déposer un matériau conducteur afin d'établir une connexion.

### **Caractéristique tomographique d'un dispositif**

Une des méthodes pour mettre en évidence l'empilement des couches des divers matériaux constituant un élément d'un micro-circuit est l'observation en microscopie à balayage après clivage mécanique. Ce procédé présente des inconvénients : difficulté de localisation précise de la région clivée, méthode destructive pour la plaquette entière. Une autre méthode qui constitue une application importante du FIB est la préparation d'échantillons pour la Microscopie Electronique en Transmission (TEM : Transmission Electron Microscopy). Le FIB convient tout à fait pour repérer et usiner ensuite l'échantillon avec une précision nanométrique. Ceci est très important pour l'analyse des défauts des circuits intégrés. Parmi les millions de transistors d'un circuit intégré, si un seul est mauvais, le FIB est le seul instrument capable de préparer un échantillon pour microscopie électronique et contenant ce transistor unique. Cette technique consiste à pulvériser les matériaux du micro-circuit par balayage du faisceau focalisé sur un rectangle correspondant à la région à étudier. Une tranchée est donc formée et si la vitesse de balayage est bien adaptée, les bords sont découpés très nettement, révélant la tomographie de la région. L'observation in situ par microscopie à balayage montre le contraste chimique entre les divers matériaux comme on peut le voir sur la Figure 1.



**Figure 1** : Image MEB d'un échantillon usiné au FIB pour la Microscopie Electronique en Transmission.

La TEM nécessite des échantillons très minces, typiquement 100nm. La contrepartie de la préparation de l'échantillon par FIB est l'altération de l'échantillon provoquée par l'implantation ionique. Ce défaut toutefois ne sera visible que dans le cas d'une observation "haute résolution" du réseau cristallin. Un léger usinage ionique à l'argon de l'échantillon après sa préparation avec le FIB suffit pour nettoyer efficacement l'échantillon.

### Usinage direct de miroirs lasers

L'intérêt suscité actuellement par l'opto-électronique implique la maîtrise de l'intégration sur une même plaquette d'éléments optiques et de composants électroniques ou opto-électroniques. Par exemple, la réalisation d'un miroir laser par une technique de clivage mécanique qui donne des faces de bonne qualité est souvent difficile à mettre en œuvre, de même que le couplage laser-guide dans un système intégré suppose la gravure locale de faces verticales délicates à réaliser par des technologies classiques. Dans l'exemple de la Figure 2,

un miroir laser a été usiné dans le but de délimiter le résonateur d'un laser et de le coupler dans de bonnes conditions à un guide.



**Figure 2 :** *Usinage de miroirs après la fabrication d'un laser à semi-conducteur. La méthode permet la fabrication de structures gravées 3D, aux propriétés optiques satisfaisantes, sans dommages notables pour la région active [Sud 88].*

La coupure du ruban a des dimensions de  $10 \times 1 \mu\text{m}$  et de  $4 \mu\text{m}$  de profondeur. Cette structure à grand rapport profondeur/largeur implique le choix d'une loi de balayage qui minimise les effets de redéposition du matériau pulvérisé sur les parois, effet bien connu en érosion ionique conventionnelle. Les caractéristiques optiques du laser ont été améliorées après l'usinage du miroir par faisceau d'ions focalisés : meilleure efficacité quantique, abaissement du courant seuil.

### **Implantations localisées**

Une autre application des faisceaux d'ions focalisés à la micro-électronique concerne l'implantation localisée. Celle-ci permet, toujours sans masque, le transfert d'un dessin correspondant à la carte du dopage d'un semi-conducteur. L'un des avantages essentiels est la possibilité de créer des composants nouveaux, ou optimisés, grâce à la possibilité de variations latérales de la concentration d'impuretés (le dopage classique ne permet que des variations verticales, par modification de l'énergie des ions incidents). Des structures à

dopage "3D" sont donc possibles. Un autre avantage est la possibilité de réaliser des composants différents par leurs formes ou leurs taux de dopage sur une même plaquette.

## Références bibliographiques

P. Sudraud and G. B. Assayag, *Images de la Physique*, supplément au vol. 71 du Courrier du CNRS, pp. 84-92, 1988.

## 3- Scripts des simulations sous Maple

### Champ électrique à l'extrémité de la source en fonction de son rayon

```

z0 := 20E-6;
                                0.000020
V0 := 200;
                                200
f(x) :=  $\frac{V0}{x \cdot \log\left(\frac{4 \cdot z0}{x}\right)}$ ;
                                x →  $\frac{V0}{x \log\left(\frac{4 \cdot z0}{x}\right)}$ 
plot(f, 50E-9 .. 5E-6);

```

### Champ électrique axial

```

E0 := 8.85E-12;
                                8.85 10-12
z0 := 20E-6;
                                0.000020
rc := 0.75E-6;
                                7.5 10-7
V0 := 200;
                                200
σ :=  $\frac{V0}{\log\left(\frac{4 \cdot z0}{rc}\right)}$ ;
                                42.82922395

```

$$f(r, z) := -1 \cdot \sigma \cdot \left( \left( \frac{1}{((r^2 + (z0 + z)^2)^{0.5})} \right) + \left( \frac{1}{((r^2 + (z0 - z)^2)^{0.5})} \right) \right);$$

$$(r, z) \rightarrow -\sigma \left( \frac{1}{(r^2 + (z0 + z)^2)^{0.5}} + \frac{1}{(r^2 + (z0 - z)^2)^{0.5}} \right)$$

`plot3d(f(r, z), r=-200E-6..200E-6, z = 19E-6 ..0);`

### Champ électrique radial

`z0 := 20E-6;`

0.000020

`E0 := 8.85E-12;`

8.85 10<sup>-12</sup>

`rc := 0.75E-6;`

7.5 10<sup>-7</sup>

`V0 := 200;`

200

$$\sigma := \frac{V0}{\log\left(\frac{4 \cdot z0}{rc}\right)};$$

42.82922395

$$f(r, z) := \left( \frac{\sigma}{r} \right) \cdot \left( \left( \frac{(z0 + z)}{((r^2 + (z0 + z)^2)^{0.5})} \right) - \left( \frac{(z0 - z)}{((r^2 + (z0 - z)^2)^{0.5})} \right) \right);$$

$$(r, z) \rightarrow \frac{1}{r} \left( \sigma \left( \frac{z0 + z}{(r^2 + (z0 + z)^2)^{0.5}} - \frac{z0 - z}{(r^2 + (z0 - z)^2)^{0.5}} \right) \right)$$

`plot3d(f(r, z), r=-200E-6..200E-6, z = 19E-6 ..0);`

### Potentiel électrique

`z0 := 20E-6;`

0.000020

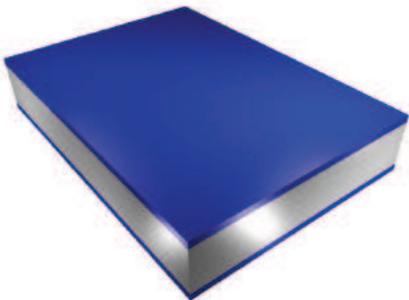
$E0 := 8.85E-12;$ 
 $8.85 \cdot 10^{-12}$ 
 $rc := 0.75E-6;$ 
 $7.5 \cdot 10^{-7}$ 
 $V0 := 200;$ 
 $200$ 

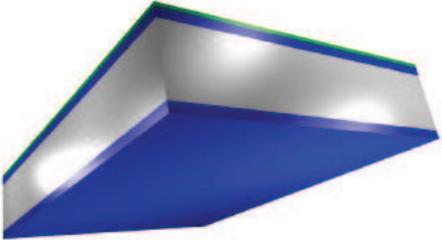
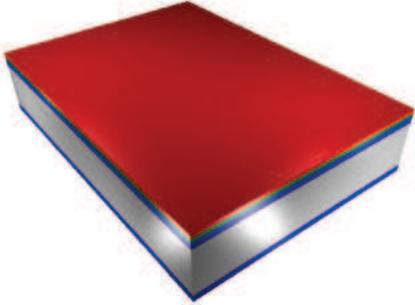
$$\sigma := \frac{V0}{\log\left(\frac{4 \cdot z0}{rc}\right)};$$
 $42.82922395$ 
 $f(r, z) := -1 \cdot \sigma$ 

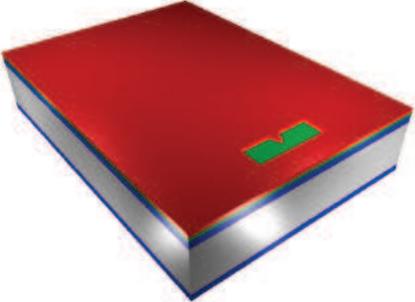
$$\cdot \log\left(\frac{\left(\left((r^2 + (z0 - z)^2\right)^{0.5}\right) + (z0 - z)\right)}{\left(\left((r^2 + (z0 + z)^2\right)^{0.5}\right) + (z0 + z)\right)}\right);$$

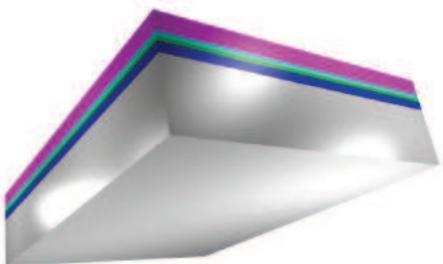
$$(r, z) \rightarrow -\sigma \log\left(\frac{\left(r^2 + (z0 - z)^2\right)^{0.5} + z0 - z}{\left(r^2 + (z0 + z)^2\right)^{0.5} + z0 + z}\right)$$
 $plot3d(f(r, z), r = -200E-6 .. 200E-6, z = 19E-6 .. 0);$ 

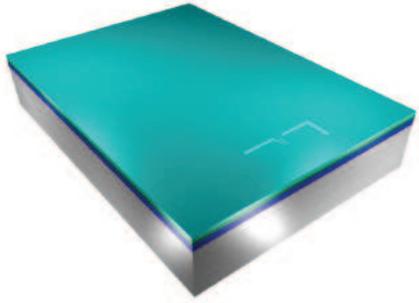
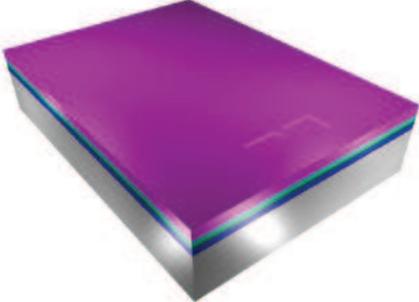
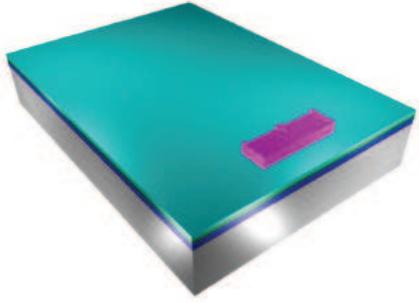
## 4- Procédé de fabrication au masqueur électronique des nano-sources

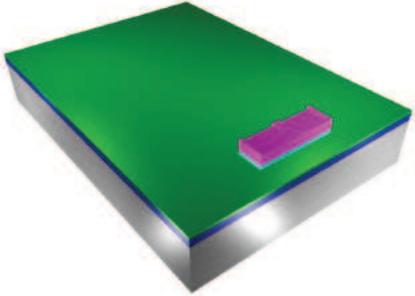
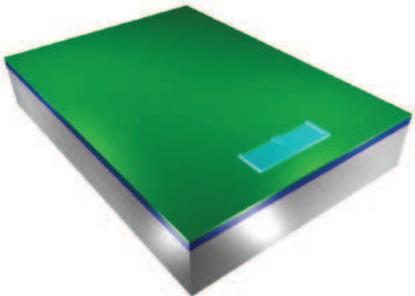
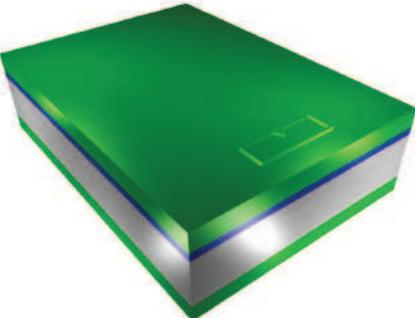
 <p>■ Si   ■ SiO<sub>2</sub></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nettoyage du substrat de Silicium dans l'acide fluorhydrique (50%) <i>Durée d'immersion : 1min + rinçage EDI + rinçage dans un bain d'eau azoté 15min + séchage par centrifugation.</i></li> <li>• Nettoyage du substrat de Silicium au Pirhaña (50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) <i>Durée d'immersion : 30min + rinçage EDI + rinçage dans un bain d'eau azoté 15min + séchage par centrifugation.</i></li> <li>• Nettoyage du substrat de Silicium dans l'acide fluorhydrique (50%) <i>Durée d'immersion : 1min + rinçage EDI + rinçage dans un bain d'eau azoté 15min + séchage par centrifugation.</i></li> <li>• Oxydation humide du substrat dans un four Tempress : <i>Débit : 1,5sLm de O<sub>2</sub>, 2,5sLm de H<sub>2</sub>, Température : 1100°C, Durée : 2h15, Epaisseur : 1µm</i></li> </ul>
---	--

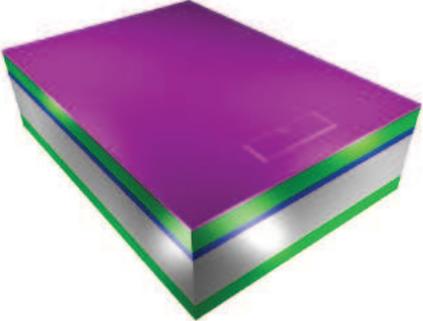
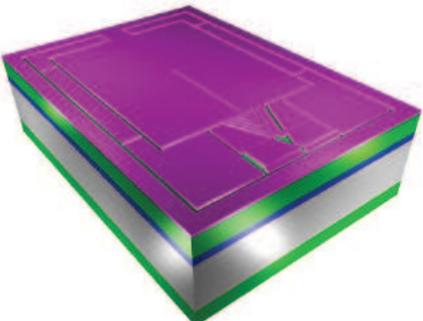
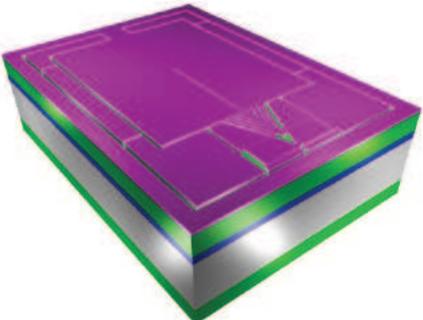
 <p>■ Si ■ SiO<sub>2</sub> ■ Poly</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dépôt de Polysilicium par LPCVD (Low Pressure Chemical Vapor Deposition) dans un four Tempres :  <i>Débit : 80sccm de SiH<sub>4</sub>,  Température : 585°C, Pression : 200mT,  Durée : 1h05min, Epaisseur : 300nm</i></li> </ul>
 <p>■ Si ■ SiO<sub>2</sub> ■ Poly</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gravure sèche RIE (Reactive Ion Etch) du Polysilicium en face arrière (bâti STS) :  <i>Pression etch : 86% (manuel), Pression pass : 0% (manuel), Débit : 0sccm de C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, 450sccm de SF<sub>6</sub> (hexafluorure de soufre) 45sccm de O<sub>2</sub>, Puissance bobine etch : 2500W, Puissance bobine pass : 0W, Freq généré platten : 380kHz, Puissance platten etch : 45W, Puissance platten pass : 0W, Electro delay etch : 0, Electro delay pass : 0, Electro current etch : 0, Electro current pass : 0, Temp platten : 10°C, Durée : 15sec</i></li> </ul>
 <p>■ Si ■ SiO<sub>2</sub> ■ Poly ■ ZEP 520A</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1<sup>ère</sup> lithographie : transfert du masque positif n°1. Dépôt de résine positive électronique (ZEP 520A) en face avant sur tournette GYRSET RC8 Suss Microtec :  <i>Capot : fermé, Vitesse : 1500 tr.min<sup>-1</sup>,  Accélération : 1000 tr.min<sup>-2</sup>, Durée : 8sec,  Capot : ouvert, Vitesse : 500 tr.min<sup>-1</sup>,  Accélération : 1000 tr.min<sup>-2</sup>, Durée : 8sec,  Epaisseur : 590nm</i>  Recuit sur plaque chauffante :  <i>Température : 180°C, Durée : 3min</i>  Exposition réalisée avec le nanomasqueur LEICA EBPG 5000PlusES :  <i>Dose : 197μC.cm<sup>-2</sup> (Niveau 0) et 225μC.cm<sup>-2</sup> (Niveau 1)  Résolution : 10nm (Niveau 0) et 25nm (Niveau 1)  Tension : 100kV</i></li> </ul>

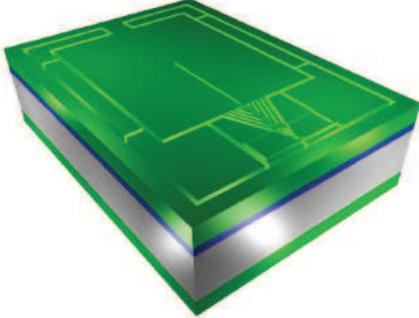
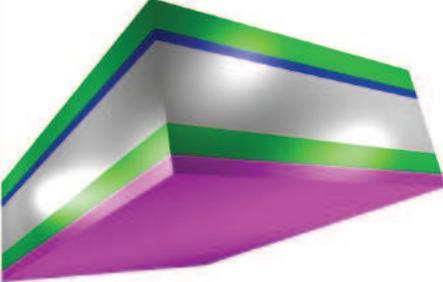
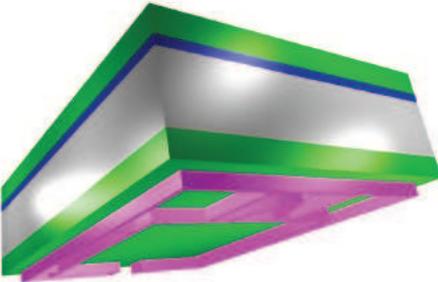
 <p>■ Si ■ SiO<sub>2</sub> ■ Poly ■ ZEP 520A</p>	<p>Développement de la résine ZEP 520A (ZED N50 n Amyl acetate) :</p> <p><i>Temps de révélation : 1min10sec + rinçage dans un mélange constitué de 11 mL d'alcool isopropylique et 89mL de MIBK + rinçage avec de l'alcool isopropylique + séchage à l'azote</i></p>
 <p>■ Si ■ SiO<sub>2</sub> ■ Poly ■ ZEP 520A</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gravure sèche RIE (Reactive Ion Etch) du Polysilicium en face avant pour définir la partie nanométrique de la source (bâti Oxford PlasmaLab 80Plus) :</li> </ul> <p><i>Puissance : 140W, Débit : 3sccm de SF<sub>6</sub> (hexafluorure de soufre), 24.5sccm de CHF<sub>3</sub> (trifluorométhane), Pression : 25mT, Durée : 16min</i></p>
 <p>■ Si ■ SiO<sub>2</sub> ■ Poly</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dérésinage de la ZEP 520A : Elimination de la ZEP 520A dans l'EBRPG <i>Durée : 5min + rinçage à l'acétone puis à l'alcool isopropylique+ séchage à l'azote</i></li> <li>Nettoyage des résidus de résine par plasma O<sub>2</sub> (bâti Oxford PlasmaLab 80Plus) :</li> </ul> <p><i>Puissance : 100W, Débit : 30sccm de O<sub>2</sub>, Pression : 100mT, Durée : 3min</i></p>

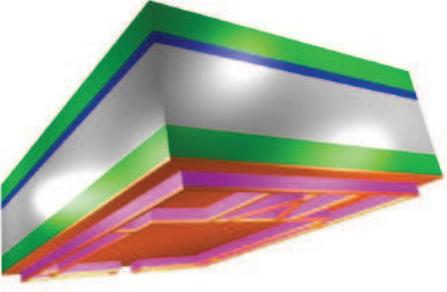
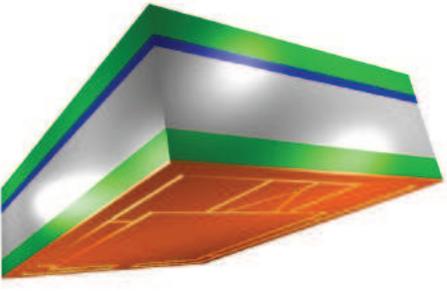
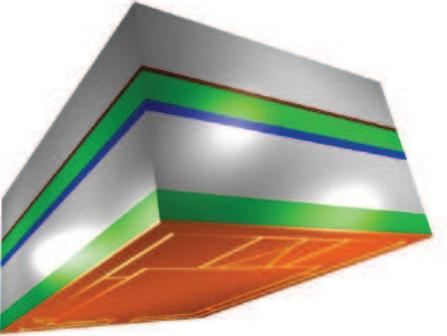
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: gray; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dépôt de LTO (Low Temperature Oxide) par LPCVD (Low Pressure Chemical Vapor Deposition) dans un four Tempress :  <i>Débit : 70sccm de SiH<sub>4</sub>, 25sccm de N<sub>2</sub> et 150sccm de O<sub>2</sub>,  Température : 420°C, Pression : 150mT,  Durée : 23min, Epaisseur : 500nm</i> </li> </ul>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: gray; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: purple; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> S1818 </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protection du LTO en face avant :  Dépôt de résine positive photosensible (S1818) sur tournette GYRSET RC8 Suss Microtec :  <i>Capot : ouvert, Vitesse : 4000 tr.min<sup>-1</sup>,  Accélération : 5000 tr.min<sup>-2</sup>, Durée : 12sec,  Epaisseur : 1.9µm</i>  Recuit sur plaque chauffante :  <i>Température : 110°C, Durée : 1min</i> </li> </ul>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: gray; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: purple; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> S1818 </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gravure humide du LTO et de l'oxyde thermique humide en face arrière (BE7-1) :  <i>Durée : 16min+ rinçage à l'EDI + séchage à l'azote</i> </li> </ul>

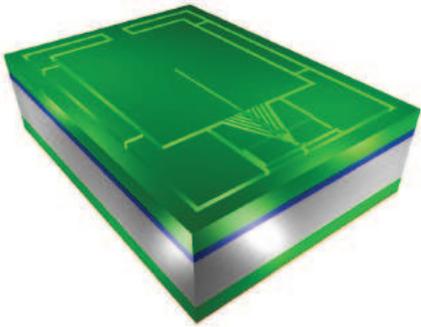
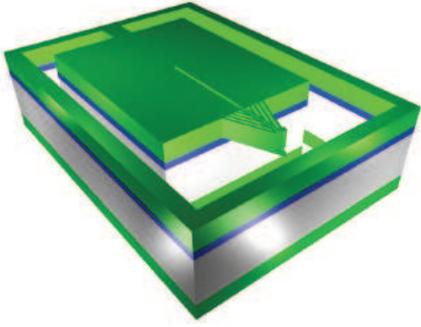
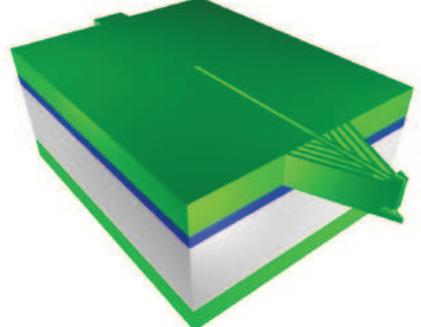
 <p>■ Si   ■ SiO<sub>2</sub>   ■ Poly ■ LTO</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dérésinage de la S1818 : Elimination de la S1818 dans l'acétone <i>Durée : 1min + rinçage à l'alcool isopropylique + séchage à l'azote</i></li> <li>Nettoyage des résidus de résine par plasma O<sub>2</sub> (bâti Oxford PlasmaLab 80Plus) : <i>Puissance : 100W, Débit : 30sccm de O<sub>2</sub>, Pression : 100mT, Durée : 3min</i></li> </ul>
 <p>■ Si   ■ SiO<sub>2</sub>   ■ Poly ■ LTO   ■ AZ9260</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2<sup>ème</sup> lithographie : transfert du masque négatif n°2. Dépôt de résine positive photosensible (AZ9260 diluée) en face avant sur tournette GYRSET RC8 Suss Microtec : <i>Capot : fermé, Vitesse : 4000 tr.min<sup>-1</sup>, Accélération : 1500 tr.min<sup>-2</sup>, Durée : 15sec, Capot : ouvert, Vitesse : 1500 tr.min<sup>-1</sup>, Accélération : 1000 tr.min<sup>-2</sup>, Durée : 15sec, Epaisseur : 1.5µm</i> Détourage sur tournette GYRSET RC8 Suss Microtec : <i>Capot : ouvert, Vitesse : 1500 tr.min<sup>-1</sup>, Accélération : 1000 tr.min<sup>-2</sup>, Durée : 10sec, Taille substrat : 76 + 10sec de séchage</i> Recuit sur plaque chauffante : <i>Température : 110°C, Durée : 1min</i> Exposition réalisée avec l'aligneur MA6/BA6 Suss Microtec : <i>Durée : 11sec à 11.7mW.cm<sup>-2</sup>, Type : Vacuum</i></li> </ul>
 <p>■ Si   ■ SiO<sub>2</sub>   ■ Poly ■ LTO   ■ AZ9260</p>	<p>Développement de la résine AZ9260 diluée (AZ400K dilué dans de l'EDI 1/4) : <i>Temps de révélation : 1min30sec + rinçage à l'EDI + séchage à l'azote</i></p>

 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: purple; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> AZ9260 </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gravure sèche RIE (Reactive Ion Etch) du LTO en face avant pour définir la zone qui protège la partie nanométrique de la source (bâti Oxford PlasmaLab 80Plus) :</li> </ul> <p><i>Puissance : 180W, Débit : 20sccm de CHF<sub>3</sub> (trifluorométhane) et 20sccm de CF<sub>4</sub> (tétrafluorométhane), Pression : 50mT, Durée : 19min30sec</i></p>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dérésinage de l'AZ9260 diluée : Elimination de l'AZ9260 diluée dans l'EBRPG <i>Durée : 2min + rinçage à l'acétone + rinçage à l'alcool isopropylique + séchage à l'azote</i></li> <li>Nettoyage des résidus de résine par plasma O<sub>2</sub> (bâti Oxford PlasmaLab 80Plus) :</li> </ul> <p><i>Puissance : 100W, Débit : 30sccm de O<sub>2</sub>, Pression : 100mT, Durée : 3min</i></p>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dépôt de Polysilicium par LPCVD (Low Pressure Chemical Vapor Deposition) dans un four Tempress :</li> </ul> <p><i>Débit : 80sccm de SiH<sub>4</sub>, Température : 585°C, Pression : 200mT, Durée : 14h10, Epaisseur : 4µm</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Recuit:</li> </ul> <p><i>Débit : 2.5sLm de N<sub>2</sub>, Température : 1050°C, Durée : 1h</i></p>

 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: purple; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> S1805 </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3<sup>ème</sup> lithographie : transfert du masque positif n°3.  Dépôt de résine positive photosensible (S1805) en face avant sur tournette GYRSET RC8 Suss Microtec :  <i>Capot : fermé, Vitesse : 2500 tr.min<sup>-1</sup>,  Accélération : 2000 tr.min<sup>-2</sup>, Durée : 10sec,  Capot : ouvert, Vitesse : 1500 tr.min<sup>-1</sup>,  Accélération : 1000 tr.min<sup>-2</sup>, Durée : 12sec,  Epaisseur : 380nm</i>  Recuit sur plaque chauffante :  <i>Température : 110°C, Durée : 1min</i>  Exposition réalisée avec l'aligneur MA6/BA6 Suss Microtec :  <i>Durée : 2.5sec à 10.15mW.cm<sup>-2</sup>, Type : Vaccum</i> </li> </ul>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: purple; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> S1805 </p>	<p>Développement de la résine S1805 en face avant (MF 319) :</p> <p><i>Temps de révélation : 45sec + rinçage à l'EDI + séchage à l'azote</i></p>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: purple; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> S1805 </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gravure sèche RIE (Reactive Ion Etch) du Polysilicium en face avant pour définir la partie micrométrique de la source (bâti STS) :</li> </ul> <p><i>Temps cycle etch : 3sec, Temps cycle pass : 2.2sec,  Pression etch : 86% (manuel), Pression pass : 86% (manuel), Débit : 100sccm de C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, 450sccm de SF<sub>6</sub> (hexafluorure de soufre) 45sccm de O<sub>2</sub>, Puissance bobine etch : 2500W, Puissance bobine pass : 1000W,  Freq géné platten : 380KHz, Puissance platten etch : 45W, Puissance platten pass : 0W, Electro delay etch : 0, Electro delay pass : 0, Electro current etch : 0, Electro current pass : 0, Temp platten : 10°C, Pulse width : 5ms, Duty cycle : 25%, Durée : 1min30sec</i></p>

 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si   <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> SiO<sub>2</sub>   <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> LTO </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dérésinage de la S1805 en face avant : Élimination de la S1805 dans l'EBRPG <i>Durée : 2min + rinçage à l'acétone + rinçage à l'alcool isopropylique + séchage à l'azote</i></li> <li>• Nettoyage des résidus de résine par plasma O<sub>2</sub> (bâti Oxford PlasmaLab 80Plus) : <i>Puissance : 100W, Débit : 30sccm de O<sub>2</sub>, Pression : 100mT, Durée : 3min</i></li> </ul>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si   <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> SiO<sub>2</sub>   <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> LTO   <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: purple; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> AZnLof 2020 </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4<sup>ème</sup> lithographie : transfert du masque positif n°4. Dépôt de résine négative photosensible (AZnLof 2020 diluée) en face arrière sur tournette GYRSET RC8 Suss Microtec : <i>Capot : ouvert, Vitesse : 2000 tr.min<sup>-1</sup>, Accélération : 1000 tr.min<sup>-2</sup>, Durée : 20sec, Épaisseur : 1.3µm</i> Recuit sur plaque chauffante : <i>Température : 110°C, Durée : 1min</i> Alignement avec la face avant et exposition réalisée avec l'aligneur MA6/BA6 Suss Microtec : <i>Durée : 3.8sec à 10.4mW.cm<sup>-2</sup>, Type : Vacuum</i> Recuit sur plaque chauffante : <i>Température : 110°C, Durée : 1min</i></li> </ul>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si   <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> SiO<sub>2</sub>   <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> LTO   <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: purple; border: 1px solid black; margin-right: 5px; margin-left: 20px;"></span> AZnLof 2020 </p>	<p>Développement de la résine AZnLof 2020 diluée en face arrière (MIF 326) : <i>Temps de révélation : 40sec + rinçage à l'EDI + séchage à l'azote</i></p>

 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: gray; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: purple; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> AZnLof 2020    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: orange; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Al </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Etch + dépôt d'Aluminium par évaporation en face arrière afin de constituer un masque pour la gravure profonde : <i>Epaisseur : 100nm</i></li> </ul>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: gray; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: orange; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Al </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lift-off de l'Aluminium en face arrière dans du Remover PG chauffé à 60°C + ultrasons : <i>Durée : 7h + rinçage à l'acétone + rinçage à l'alcool isopropylique + séchage à l'azote</i></li> </ul>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: gray; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Si    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> SiO<sub>2</sub>    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> LTO    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: orange; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Al    <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: brown; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Graisse </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gravure sèche RIE (Reactive Ion Etch) du Polysilicium et du Silicium du substrat en face arrière jusqu'à la couche d'oxyde thermique de la face avant (bâti STS) : <i>Temps cycle etch : 3sec, Temps cycle pass : 2.2sec, Pression etch : 86% (manuel), Pression pass : 86% (manuel), Débit : 100sccm de C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, 450sccm de SF<sub>6</sub> (hexafluorure de soufre) 45sccm de O<sub>2</sub>, Puissance bobine etch : 2500W, Puissance bobine pass : 1000W, Freq géné platten : 380KHz, Puissance platten etch : 45W, Puissance platten pass : 0W, Electro delay etch : 0, Electro delay pass : 0, Electro current etch : 0, Electro current pass : 0, Temp platten : 10°C, Pulse width : 5ms, Duty cycle : 25%, Durée : 1h par pas de 10min puis collage sur un substrat vierge avec un cordon de graisse à vide afin d'éviter que des morceaux ne tombent dans la chambre puis poursuite de la gravure pendant 30min par pas de 10min</i></li> </ul>

 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black;"></span> Si                <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black;"></span> SiO<sub>2</sub>                <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black;"></span> Poly  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: cyan; border: 1px solid black;"></span> LTO                <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: orange; border: 1px solid black;"></span> Al         </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Décollage des deux substrats en utilisant la lame d'un scalpel et élimination de la graisse à vide à l'aide d'un chiffon imbibé d'acétone puis un autre imbibé d'alcool</li> </ul>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black;"></span> Si                <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black;"></span> SiO<sub>2</sub>                <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black;"></span> Poly         </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gravure de l'Aluminium et libération des sources dans l'acide fluorhydrique (50%)  <i>Durée d'immersion : 2min + rinçage EDI + séchage</i></li> </ul>
 <p> <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: grey; border: 1px solid black;"></span> Si                <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black;"></span> SiO<sub>2</sub>                <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black;"></span> Poly         </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rupture à l'aide d'un scalpel du point d'attache de la source au substrat avant utilisation</li> </ul>

## 5- Liste des publications

### Articles internationaux:

C. Descatoire, L. Buchaillot and S. Arscott, "Sub-attolitre nanodroplet deposition using a silicon-based nanoelectrospray emitter tip", *Materials Science & Engineering C*, Vol. 27, Issues 5-8, pp. 1491-1495, September 2007.

### Conférences nationales et internationales:

C. Descatoire, D. Troadec, L. Buchaillot, A.E. Ashcroft and S. Arscott, "A nanofluidic electrospray source fabricated using focused ion beam etching", *Proceedings of  $\mu$ TAS 2005 9<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, Boston, Massachusetts, USA, October 9-13, 2005, Vol. 1, pp.241-243.

C. Descatoire, D. Troadec, A.E. Ashcroft, L. Buchaillot and S. Arscott, "Nanomachined electrospray ionisation tips", *Nanotech 2005 9<sup>th</sup> Annual European Conference on Micro & Nanoscale Technologies for the Biosciences*, Montreux, Switzerland, November 15-17, 2005, Appendice A1.

C. Descatoire, L. Buchaillot and S. Arscott, "Silicon-based nanofluidic devices for the handling of liquids at attolitre volumes", *E-MRS (European Materials Research Society) Spring Meeting*, Nice, France, May 29-June 2, 2006.

C. Descatoire, D. Troadec, L. Buchaillot, A.E. Ashcroft and S. Arscott, "Sources d'électronébulisation nanofluidiques pour les applications en protéomique", *Workshop GDR Micro et Nano Systèmes*, Villeneuve d'Ascq, France, October 11-12, 2006.