

50376
2004
147

N° d'ordre : 3529



THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES & TECHNOLOGIES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Spécialité Instrumentation et Analyses Avancées

par

Julien CARLIER

Développement technologique de composants microfluidiques intégrés à
base de résine SU-8

Application à l'analyse de protéines par Spectrométrie de Masse

Soutenue publiquement le 19 novembre 2004 devant la Commission d'Examen :

<u>Président :</u>	A. CAPPY	Professeur à l'université de Lille1
<u>Rapporteurs :</u>	D. BARBIER	Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon
	Y. CHEN	Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Paris
<u>Directeur de thèse :</u>	P. TABOURIER	Professeur à l'université du Littoral – Côte d'Opale
<u>Co-directeur de thèse :</u>	J. C. CAMART	Professeur à l'université de Lille1
<u>Examineurs :</u>	X. COQUERET	Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille
	D. EHRHARDT	Professeur à l'université de Siegen (Allemagne)
	C. DRUON	Professeur à l'université de Lille1

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été réalisés à l'Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) de Villeneuve d'Ascq dirigé par le Professeur A. CAPPY, dans l'équipe Microsystèmes-Microfluidique dirigée par le professeur Pierre TABOURIER.

Les études expérimentales ont été menées en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (LCOM), et en particuliers les équipes 'Photochimie et Radiochimie des Polymères' dirigée par le professeur X. COQUERET et 'Polyphénols complexes' dirigée par le directeur de recherche C. ROLANDO (dont les domaines de compétence touchent notamment à l'élaboration des phases monolithiques, la chimie de surface et la spectrométrie de masse).

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre de deux projets soutenus par :

- le Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies - Réseau RMNT: contrat 'Protéomique intégrée' (Juin 2001 - Juin 2004) avec comme partenaire industriel: MGP Instruments.
 - le Ministère de l'industrie : Bio-Ingénierie 2001 - Réseau 'Genhomme' (2001-2005) avec la collaboration de : Sanofi-Synthélabo, CEA-LETI, Osmooze et l'Université des Sciences et Technologies de Lille (IEMN, LCOM).
-

Remerciements

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies (I.E.M.N.) dirigé par Monsieur le Professeur A. CAPPY. Je le remercie vivement, ainsi que Monsieur le Professeur P.A. ROLLAND, responsable du Département Hyperfréquences et Semi-conducteurs (D.H.S.), de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur A. CAPPY de me faire l'honneur de présider cette Commission d'Examen et de juger l'ensemble de ce travail.

Monsieur le Professeur P. TABOURIER m'a proposé ce sujet de recherche et en a assuré la direction. Je lui exprime ma profonde gratitude, ainsi qu'à Monsieur le Professeur C.DRUON qui s'est toujours impliqué dans les discussions, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en m'accueillant dans l'équipe 'Microsystèmes-Microfluidique'. Leurs conseils ont enrichi mes connaissances et m'ont apporté un soutien constant.

Je voudrais rappeler le rôle du Professeur J.C. CAMART dans l'ensemble de mon parcours à l'IEMN. Il m'a tout d'abord encadré au cours du stage de D.E.A. que j'ai mené au sein de l'équipe 'Circuits et Applications'. Il m'a ensuite proposé de le suivre dans l'aventure 'Microsystèmes-Microfluidique' dans le cadre de cette thèse de doctorat dont il est co-directeur. Je tiens à le remercier de sa confiance, de son soutien, de ses conseils francs et avisés qui m'ont guidé jusqu'ici. Je tiens à lui exprimer ma très grande reconnaissance.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Monsieur D. BARBIER, Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, et à Monsieur le Professeur Y. CHEN, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Paris, pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail et d'en être rapporteurs.

Remerciements

Je remercie également, le Professeur X. COQUERET pour la collaboration que nous avons pu effectuer avec son équipe au cours et en dehors du contrat BIOCHPLAB ainsi que pour sa participation au jury de thèse.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur D. EHRHARDT de l'université de Siegen (Allemagne) pour ses conseils techniques ainsi que pour sa participation à mon jury de thèse.

Monsieur V. THOMY, Maître de conférences, m'a toujours guidé et soutenu pendant ce travail de recherche. Cela a eu une importance capitale, il a également su me faire partager son expérience de jeune docteur, ainsi que sa bonne humeur et son humour. Je lui en suis très reconnaissant car il fait partie des collègues sur lesquels on peut compter et qui rendent les journées de travail difficiles plus agréables.

Je remercie également X. MELIQUE, Maître de Conférences, I. ROCH-JEUNE, Ingénieur de recherche et S. ARSCOTT, Chargé de Recherche, de m'avoir formé et initié à la microtechnologie. Je remercie S. ARSCOTT pour tous les conseils qu'il a pu me donner grâce à sa longue expérience dans ce domaine. Son aide a également été précieuse pour certaines traductions en anglais, qu'il maîtrise presque parfaitement.

Je ne saurai oublier Monsieur C. ROLANDO, Directeur de recherche CNRS et responsable du Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, avec lequel l'équipe a mené ce travail en collaboration. Je tiens également à le remercier pour ses conseils et sa disponibilité ainsi que pour la possibilité que nous avons eu d'utiliser le matériel du Centre Commun de Mesures.

Que Madame C. CREN-OLIVE, Chargé de recherche, Mesdemoiselles S. LE GAC, Docteur de l'université, et K. CHUDA, ainsi que Monsieur K. TOBAL, doctorants, soient remerciés des trois années de collaboration passées à travailler sur ce sujet de recherche pluridisciplinaire. Je suis heureux d'avoir pu profiter de leur connaissance et de leur compétence en chimie et en spectrométrie de masse. Je remercie également Mademoiselle A. PAGE, Ingénieur d'études, pour ses conseils.

Remerciements

Je remercie les membres du consortium BIOCHIPLAB : F. VINET, N. SARRUT, C. VAUCHIER, F. RICOUL, S. BOUFFET, J. GARIN du CEA Leti et du service DSV à Grenoble ; J.P. LEPESANT de la société OSMOOZE ; P. TRICOLI, C. PICARD, porteurs du projet BIOCHIPLAB, M. MAFTOUH, D. LOYAU de la société SANOFI-SYNTHELABO pour les collaborations, les discussions que nous avons pu avoir dans le cadre du contrat au cours des réunions.. J'ai une pensée particulière pour Madame F. UZABIAGA qui malheureusement nous a quittés.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur C. BEAUGRAND, de la société MGP Instruments, dont l'enthousiasme et le dynamisme ont été communicatifs dans le cadre du projet RMNT.

Monsieur le Professeur J. PRIBETICH, responsable de l'équipe 'Circuits & Applications', m'a également toujours soutenu et conseillé pendant mon DEA mais aussi tout au long de ma thèse. Je tiens à lui témoigner ma plus vive reconnaissance et à le remercier de ses judicieux conseils (tant au point de vue scientifique qu'administratif), de son soutien permanent et des airs mélodieux qu'il aime nous faire partager.

Je tiens également à remercier François, Jean-Christophe, Matthieu G., Alan, Nicolas B., Clarisse, Nicolas V., Elisabeth qui, bien plus que de simples collègues de travail, m'ont fait partager leur judicieux conseils qui souvent allaient au delà de l'aspect scientifique et leur bonne humeur. Je remercie également L. DUBOIS, Maître de Conférences, pour les conseils techniques qu'il m'a apporté pendant et après mon D.E.A. Je ne saurai oublier tous les membres du 3^{ème} étage avec qui j'ai pu avoir aussi bien des discussions scientifiques que des moments de détente (au cours de la pause café par exemple) ainsi que tous les membres de l'I.E.M.N., que je ne peux citer ici, et qui m'ont témoigné à un moment ou à un autre leur soutien et apporté leur aide. A ceux qui ont marqué l'équipe par leur passage, Yohan et Marielle je tiens à leur signifier ma sympathie. J'ai eu la chance de rencontrer Monsieur P.A. FALL au cours de ma thèse. Sa disponibilité et son humour en toute circonstance m'ont beaucoup apporté, je l'en remercie.

Remerciements

Ces années m'ont également permis d'obtenir une expérience riche en enseignement dans le cadre d'un monitorat en électronique qui se poursuit dans le cadre d'un poste d'A.T.E.R. à Polytech'Lille dirigée par Monsieur le Professeur J.L. BON que je remercie vivement de m'avoir accueilli au sein de l'école.

Je ne peux donc oublier de remercier Madame D. BERNARD, Maître de conférences à Polytech'Lille, qui a plus que rempli son rôle de 'tutrice d'enseignement' au cours de mon monitorat exercé à Polytech'Lille. Elle a toujours été disponible, de bon conseil et m'a toujours largement soutenu et 'dépanné' dans les moments difficiles qui interviennent dans le parcours de thèse. Pour tout cela, je la remercie énormément.

Je tiens également à remercier sincèrement Messieurs A. POLLET, directeur du département ITEC, qui m'avait accueilli en tant qu'étudiant, il y a quelques années et qui m'a vu 'passer de l'autre côté de la barrière ou plutôt du bureau'. Je remercie également monsieur J.P.SIX, directeur du département I.M.A. pour sa confiance et son soutien. Je remercie également messieurs les professeurs P. DEPLANQUE, A.MAMOUNI et C. GAQUIERE, pour la liberté qu'ils m'ont laissée lors de mes premiers mois d'Attaché Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche, afin de finir dans les meilleurs délais mon manuscrit. Je pense également à Mesdames N. STRUYVE ET L. BALLENGHIEN. Je les remercie tous vivement de leur accueil à Polytech'Lille grâce auquel j'ai pu facilement m'intégrer.

Je remercie également Monsieur le professeur J.P. HUVENNE ainsi que Madame le Professeur M. BAYART, respectivement ancien et nouveau responsable de la formation 'Instrumentation et Analyses avancées' ainsi que Madame le Professeur S. TISON, responsable de l'école doctorale pour leur accueil dans la formation.

Je ne peux omettre les remerciements s'adressant à Messieurs, BIGOTTE, et RINGOT, et Madame LEFEVRE de la centrale de technologie 'Silicium' de l'IEMN, à Messieurs TILMANT, BOYAVAL, LEROY et Mesdames FATTORINI et LEGRAND de la centrale de technologie 'III-V' ainsi que M. FRANCOIS, M. MULLER et J.L. LORRIAUX pour leur aide, ainsi qu'à Madame J. LOUCHARD qui a assuré la reproduction de ce mémoire. Je remercie,

Remerciements

en particulier, Monsieur B. VERBEKE, pour l'aide qu'il m'a apporté dans le cadre du contrat BIOCHIPLAB pour assurer la collaboration avec les équipes de chimistes.

Que l'ensemble des personnels administratifs et techniques soit assuré de mes sincères remerciements pour leur disponibilité et leur aide précieuse, et en particulier, Mesdames M. MIENS et A. CALLEWAERT du service de D.A.O., Messieurs M. SENECHAL, P. DUBOIS et Mademoiselle Elodie FUGERE du service informatique ainsi que Monsieur P. ARMANT et Madame M. FUGERE.

Je tiens également à remercier Monsieur M. LAGOUGE, F. JENOT, L. PEYRE représentants des doctorants des Départements I.S.E.N., et O.A.E. pour leur collaboration et leur aide lors des divers Conseils de Laboratoire ainsi que lors du Conseil Scientifique.

Je remercie le CNRS ainsi que la région Nord-Pas-de-calais qui ont co-financés ma thèse dans le cadre d'une Bourse de Doctorant-Ingénieur entre octobre 2001 et octobre 2004.

Et enfin que tous mes amis qui m'ont soutenu et même supporté lors de ce long travail de thèse soient assurés de ma profonde reconnaissance.

Je remercie enfin mes parents ainsi que ma sœur et ma famille, sans qui je ne serais pas arrivé jusqu'ici. Ils m'ont, depuis toujours (j'insiste sur le terme), soutenu et encouragé à tous ces instants où j'ai pu compter sur eux. Je remercie et j'admire Caroline pour son soutien, sa patience, sa patience et encore sa patience (au regard de l'investissement que demande ce travail) ainsi que pour ce qu'elle représente pour moi.

Sommaire

Développement technologique de composants microfluidiques intégrés à base de résine SU-8

Application à l'analyse de protéines par Spectrométrie de Masse

Abréviations

Introduction	1
<u>Chapitre 1 : Microsystèmes et analyse de protéines</u>	5
<u>I) Techniques d'analyse de protéines par Spectrométrie de Masse</u>	7
A) La Spectrométrie de Masse : un outil d'identification des protéines	7
1) Principe général	8
2) Les techniques d'ionisation	8
a) L'ionisation MALDI	9
b) L'ionisation ESI	11
B) Etat de l'art des modes opératoires pour l'analyse de type ESI	14
1) Préparation de l'échantillon à analyser	14
2) Couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse	14
a) Principe de la chromatographie liquide	14
b) Appareillage	16
c) Chromatographie liquide phase inverse	17
d) Couplage nanoLC/MS/MS	18
3) Interface nanoESI	18
4) Définition des besoins	20
<u>II) Des microsystèmes pour l'analyse de protéines</u>	21
A) Intérêt des microsystèmes fluidiques	21
1) Miniaturisation et intégration	23
2) Cahier des charges	24
B) Etat de l'art des microsystèmes	25
1) Microcanaux :	25
a) Gravure du Silicium ou du Pyrex / fermeture par <i>Anodic bonding</i>	26
b) Technique de sablage (<i>powder blasting</i>)	27
c) Technologie PDMS	28

d) Technologie SU-8	29
e) Emboutissage à chaud	30
f) Technologie LIGA	31
g) Ablation Laser	32
2) Microcolonnes d'élution	32
a) Séparation électrophorétique	32
b) La technologie monolithe	33
c) Utilisation de billes fonctionnalisées	34
d) Micro-usinage du canal	35
3) Déplacement de liquide:	36
a) Déplacement de type EWOD	36
b) Ondes acoustiques de surface	38
c) Pompage électroosmotique	39
d) Pompe à actuation piézoélectrique	40
e) Pompe à actuation thermique	41
4) Source d'électronébulisation	42
a) Usinage Silicium	43
b) Utilisation de polymères	44
5) Microsystèmes commerciaux intégrés (et/ou automatisés)	46
C) Vers un microsystème intégré dédié à la Spectrométrie de Masse de type ESI	49
1) Degré d'intégration envisagé	49
a) Choix de la technologie de fonctionnalisation	50
b) Déplacement du liquide	50
2) Fonctions envisagées	51
a) Préparation de l'échantillon	51
b) Interface ESI	52
Conclusion	53
<i>Bibliographie du chapitre 1</i>	54
<u>Chapitre 2 : Choix d'une filière technologique</u>	60
<u>I) Convergence de la microtechnologie et de la biochimie</u>	62
A) Les contraintes dans un contexte pluri-disciplinaire	62
1) Contraintes imposées aux matériaux	62
a) Compatibilité avec les analyses LC-MS de protéines	62
b) Contraintes imposées par l'intégration de structures monolithiques	63
2) Contraintes physiques imposées à la fabrication du microsystème	65

a) Contraintes imposées aux microcanaux	65
b) Contraintes imposées à la fabrication de la source nano ESI	65
B) Sélection des matériaux	66
1) Test de compatibilité	66
2) Choix des matériaux	67
<u>II) Les opérations technologiques standard</u>	68
A) Photolithographie	68
B) Métallisation	70
1) Dépôt par évaporation	70
2) Dépôt par pulvérisation cathodique	71
C) Opérations de gravure	74
1) Gravure chimique humide	74
a) Gravure chimique des métaux	74
b) Gravure du silicium	75
c) Gravure du Pyrex	77
2) Gravure plasma	78
D) Procédé 'Lift off'	82
E) Préparation des substrats	83
1) Nettoyage par voie humide	83
2) Nettoyage par voie sèche	83
<u>III) Orientations technologiques</u>	84
A) Filière Silicium	84
1) Technologie adoptée	84
2) Résultats	84
a) Réalisation de microcanaux	84
b) Réalisation de sources nanoESI	85
B) Filière SU-8	88
1) Caractéristiques	88
2) Tests préliminaires	88
a) Problème d'adhérence de la SU-8	88
b) Problèmes de contraintes mécaniques	89
Conclusion	90
<i>Bibliographie du chapitre 2</i>	91

Chapitre 3 : Composants de base pour un

microsystème ESI intégré

94

I Procédés mis au point

96

A) Amélioration de l'adhérence de la résine SU-8 sur un substrat

96

1) Adhérence de résine sur substrat silicium

96

2) Adhérence de résine sur le Pyrex®

97

B) Contraintes mécaniques

98

C) Collage d'un couvercle en Pyrex® par SU-8

100

II) Fabrication de microcanaux

101

A) Canaux de type 1

102

1) Technologie de fabrication

102

2) Test des microcanaux

104

a) Test à 'faible' débit

106

b) Test à 'haut' débit

108

i) Tests de résistance à la pression par ajustement du débit

108

ii) Tests de résistance à la pression par ajustement de la charge

112

c) Intégration de monolithes dans les microcanaux

113

i) Ancrage du monolithe dans le microcanal

113

ii) Evaluation de la perte de charge induite par la structure

monolithique dans le microcanal

114

iii) Tests en spectrométrie de masse

115

B) Canaux de type 2

119

1) Technologie de fabrication

119

a) Procédé SU-8 bi-couche

119

b) Collage du couvercle

122

c) Connexion à des capillaires standard

122

2) Evaluation des microcanaux

123

a) Test à 'faible' débit

123

b) Test à 'haut' débit

125

c) Intégration de monolithe

126

III) Nanosource ESI d'électronébullisation

127

A) Technologie de fabrication

127

B) Evaluation des sources nanoESI

130

1) Présentation du banc de caractérisation

130

2) Evaluation des performances

131

<u>IV) Couplage intégré microcanal / nanosource ESI</u>	133
A) Technologie d'intégration	133
1) Principe	133
2) Fabrication	135
a) Préparation du substrat	138
b) Couche sacrificielle	138
c) Multicouche SU-8	139
d) Collage du couvercle	140
e) Libération des sources	140
B) Evaluation du couplage microcanal / source	142
1) La caractérisation	142
2) Evaluation du couplage	143
a) Première génération de couplage	143
b) Evolution de la configuration du couplage	144
c) Seconde génération de couplage	144
i) Nature de la géométrie	145
ii) Nature de la surface	145
d) Troisième génération de couplage	147
i) Système capillaire / source	147
ii) Système canal / source	149
e) Conclusion	153
Conclusion	154
<i>Bibliographie du chapitre 3</i>	155

Chapitre 4 : Composants actifs pour la microfluidique

<u>intégrée</u>	157
<u>I) Eléments pour l'électrochimie</u>	159
A) Intégration de microélectrodes	159
1) Intérêt de la résine SU-8	159
2) Technologie	160
B) Application en électrochimie	161
<u>II) Eléments de pompe à actuation thermique</u>	163
A) L'actuation thermique	163
1) Principe physique	163
2) Résistance de type 1	163
a) Fabrication	163

b) Test des résistances	164
3) Résistance de type 2	166
B) Microvalves	168
1) Valve passive de type convergent / divergent	168
a) Simulation	170
i) Etude à vitesse faible	171
ii) Etude à vitesse élevée	171
b) Tests préliminaires	172
2) Valves mobiles	173
a) Technologie de fabrication	174
b) Réalisations	175
3) Valves thermoactivables	176
a) Principe physique	176
b) Réalisations technologiques	176
c) Evaluation des actionneurs	177
<u>III) Echantillonneur microfluidique</u>	179
A) L'échantillonneur	180
1) Principe	180
2) Le système de déplacement de gouttes	180
3) Fabrication de l'échantillonneur	182
B) Résultats préliminaires	183
Conclusion	185
<i>Bibliographie du chapitre 4</i>	186
Conclusion et perspectives	188

Abréviations

Abréviations

ACN :	Acétonitrile
Bar :	1 bar = 10^5 Pa. Nous utilisons le bar comme unité de pression
CE :	<i>Capillary Electrophoresis</i> Electrophorèse capillaire
CEC :	<i>Capillary ElectroChromatography</i> Electrochromatographie capillaire
Die :	Diamètre interne du capillaire d'entrée du microsystème (banc de test)
Dic :	Diamètre interne du capillaire de charge placé en aval du microsystème (banc de test)
Dis :	Diamètre interne du capillaire de sortie du microsystème (banc de test)
DRIE-ICP :	<i>Deep Reactive Ion Etching – Inductive Coupled Plasma</i> Technique de gravure sèche utilisant un plasma d'ions réactifs
ESIEE :	Ecole Supérieure d'Ingénieurs en Electronique et Electrotechnique
ESI-MS :	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i> Spectrométrie de masse avec ionisation par électronébulisation
HPLC :	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Chromatographie Liquide Haute Performance
HT :	Haute Tension
ICP :	<i>Inductive Coupled Plasma</i> . Gravure profonde par voie sèche.
le :	Longueur du capillaire d'entrée du microsystème (banc de test)
lc :	Longueur du capillaire de charge placé en aval du microsystème (banc de test)
ls :	Longueur du capillaire de sortie du microsystème (banc de test)
LIGA :	Procédé de fabrication en trois étapes de lithographie, formation d'un moule en métal et moulage sur cette matrice métallique
LPCVD :	<i>Low Pressure Chemichal Vapor Deposition</i> Déposition à basse pression d'une vapeur chimique
MALDI :	<i>Matix assisted Laser desorption Ionisation Ionisation-</i> Désorption assistées par irradiation laser et une matrice
MEB :	Microscope Electronique à Balayage
MeOH :	Méthanol

Abréviations

MicroTAS :	<i>Micro Total Analysis System</i> Microsystème intégrant un processus analytique complet
NanoLC :	Chromatographie en phase liquide fonctionnant à des débits de quelques centaines de nanolitres par minute.
PBS :	<i>Phosphate Buffer Salin</i> . Tampon phosphaté utilisé pour enlever la trypsine non greffée lors de la réalisation d'un module de digestion
PDMS :	Polydiméthylsiloxane, matériau plastique souple.
PMMA :	Polyméthyl méthacrylate.
PolyNIPAM :	Poly-N-isopropylacrylamide
RIE :	<i>Reactive ion Etching</i> . Gravure par voie sèche.
Rpm :	<i>Revolution per minut</i> . Unité permettant de quantifier la vitesse de rotation des tournettes utilisées en photolithographie.
Rpm.s ⁻¹ :	<i>Revolution per minut</i> par seconde. Unité permettant de quantifier l'accélération de rotation des tournettes utilisées en photolithographie.
SELDI :	<i>Surface Enhanced Laser Desorption Ionization</i> Ionisation – désorption assistées par laser et par la surface
Si :	Silicium
SM :	Spectrométrie de masse
SM / SM :	Spectrométrie de masse en tandem
SU- 8 :	Résine photolithographiable négative
TFA :	Acide trifluoroacetic favorable à l'ionisation MALDI.
THF :	Tetra Hydro Furane
TIC :	<i>Total Ionic Current</i> Courant ionique total
TOF :	<i>Time Of Flight</i> : type d'analyseur à temps de vol en spectrométrie de masse
UV :	Ultra-violet

Introduction

Le présent travail s'inscrit dans le cadre des développements actuels qui s'opèrent à l'interface de la physique et de la biologie. Il se comprend donc, dans ce contexte pluridisciplinaire en plein essor où la physique du submicronique et la microtechnologie tentent de proposer des outils d'investigation expérimentale, à la hauteur des défis et des enjeux de la biologie de l'ère protéomique.

Une des ambitions actuelles de la biologie est en effet, d'étudier le comportement d'une cellule unique et d'analyser sa réponse à des stimuli via l'étude des protéines qu'elle exprime dans des scénarios organisés. Ceci présuppose la mise au point de moyens expérimentaux adaptés à cette échelle de travail et la possibilité d'atteindre une sensibilité d'analyse encore hors de portée. Mais les progrès sont rapides dans ce champ scientifique où les moyens techniques et financiers mis en œuvre dans les pays leaders comme les Etats-Unis, l'Allemagne et le Japon sont impressionnants. La littérature témoigne de cette compétition internationale et foisonne de propositions et d'études concernant les différents aspects de la protéomique.

Notre objectif de départ est de servir au mieux l'appareil d'analyse protéomique actuel le plus performant : le spectromètre de masse, en exploitant les atouts spécifiques des microsystèmes. Ces atouts sont souvent cités: très faible consommation d'échantillon, réduction drastique de la pollution, faibles constantes de temps de réaction liées à la miniaturisation, possibilité de regrouper diverses fonctions de traitement de l'échantillon, possibilité de paralléliser le système dans un contexte de haut débit.

A notre connaissance, dans l'état actuel de la technique, l'échantillon contenant les protéines qui est introduit dans le spectromètre de masse est relativement élaboré. C'est à dire qu'il est déjà le produit de manipulations préalables minutieuses, délicates qui de la collecte initiale à l'excision d'une tache d'électrophorèse 2D s'avèrent fastidieuses et longues. Le rêve du manipulateur prend donc la forme d'un microsystème idéal capable de prendre en charge toutes ces opérations de traitement avant l'injection pour identification par le spectromètre de masse d'une population bien triée de protéines.

La concrétisation effective des avantages potentiels d'un *lab-on-chip* dédié à la spectrométrie de masse pour l'analyse protéomique soulève en réalité de nombreuses difficultés :

- 1) celle à surpasser les performances de dispositifs non intégrables mais déjà miniaturisés;
- 2) celle au plan technologique à réaliser des éléments intégrés performants;
- 3) celle d'intégrer dans le même microsystème différentes fonctions optimisées;
- 4) celle technologique, à concilier dans un processus complet de fabrication du microsystème, des étapes hautes températures typiques de la microélectronique et des étapes basses températures typiques de la fonctionnalisation biochimique;
- 5) celle à choisir des matériaux permettant de réaliser des architectures à très grands rapports d'aspect et qui présentent une bonne compatibilité à l'égard des protéines;
- 6) celle à produire au final un objet jetable donc bon marché et susceptible d'avoir une certaine viabilité industrielle.

Dans cette recherche complexe faite de compromis, la microfluidique joue un rôle clé dans la mesure où les protéines baignent constamment dans un liquide (essentiellement aqueux). Le contrôle précis de ce liquide conditionne donc celui des protéines qu'il véhicule et fait progresser dans le microsystème selon un timing désiré et fixé à l'avance.

Notre travail est avant tout d'ordre technologique. Il a consisté à mettre en place une filière multimatériaux basée sur la résine SU-8 photolithographiable adaptée au prototypage rapide de structures si possible innovantes, dont l'architecture est optimisée de manière essentiellement empirique étant donné le caractère très complexe des mécanismes physico-chimiques mis en œuvre en mode de fonctionnement. Nos efforts visent en utilisant ces développements technologiques à réaliser un premier démonstrateur de type microsystème qui intègre des fonctions de base, le rendant opérationnel pour l'analyse des protéines par spectrométrie de masse.

Mais la filière technologique mise en place dans ce contexte offre des possibilités plus larges. Elle permet en effet, de développer également des composants actifs pour la microfluidique qui sont susceptibles d'être intégrés pour d'autres applications que celle concernant l'analyse protéomique par spectrométrie de masse avec ionisation de type électrospray (ESI/MS).

Dans ces conditions, la présentation qui suit comporte 4 chapitres. Le chapitre 1 traite de l'état de l'art concernant l'analyse de protéines par spectrométrie de masse. L'analyse critique développée, conduit à proposer le développement d'un prototype de microsysteme pour alimenter un spectromètre en mode ESI. Le chapitre 2 est relatif à la filière technologique multimatériaux à base de polymère SU-8 que nous avons développée pour surmonter les difficultés liées à la fonctionnalisation biochimique du microsysteme et à la contrainte que représente sa compatibilité biologique en mode opérationnel. Les composants de base, leur réalisation et les tests de validation effectués avant leur intégration finale dans le microsysteme prototype sont présentés dans le chapitre 3. Enfin, le chapitre 4 concerne les développements effectués dans le prolongement de l'étude précédente, et qui démontrent la flexibilité de la filière technologique mise au point et son intérêt pour d'autres champs applicatifs en microfluidique.

Chapitre 1

Microsystèmes et analyses de protéines

L'étude des protéines constitue actuellement un bassin d'attraction scientifique considérable dans lequel se mêlent des problématiques biologiques à la fois d'ordre théorique et d'ordre expérimental. Dans ce dernier champ, la spectrométrie de masse constitue d'après les spécialistes, un outil d'analyse aux performances sans égal et de surcroît constamment améliorées. Bien servir cet outil est donc un enjeu essentiel. Miniaturiser les éléments de l'environnement expérimental qui préside à la préparation des échantillons relève de cet objectif. Cet effort, qui permet de traiter dans de meilleures conditions des échantillons à analyser, disponibles le plus souvent en quantités infimes, est antérieur à l'avènement des microsystèmes microfluidiques. Nous examinons, ci-dessous, en quoi leur arrivée peut constituer un bouleversement au plan de l'analyse protéomique et quels étranglements ils sont susceptibles de desserrer dans une perspective d'analyse haut débit. L'étude, en particulier, de l'offre concernant les microsystèmes commerciaux dédiés à l'analyse des protéines par spectrométrie de masse de type ESI, nous permet de mieux cerner les problèmes posés. Elle permet, à côté des solutions déjà existantes dans la filière miniaturisée ou filière standard (qui fixe en quelque sorte la référence en matière de performances), d'apprécier l'apport effectif des microsystèmes commerciaux et de façon plus prudente celui des dispositifs de la littérature. Leur étude critique vise à en montrer les limites actuelles. Elle indique de ce fait les objectifs réalistes que l'on peut se fixer pour dépasser ce simple constat et définir du même coup le prototype de microsytème que nous nous attachons à réaliser.

I) Techniques d'analyse de protéines par spectrométrie de masse

A) La spectrométrie de masse : un outil d'identification des protéines

Après le vaste programme pluridisciplinaire de recherche dédié à la transcription du génome, un nouveau challenge est apparu ces dernières années : établir un lien entre les gènes, les protéines qu'ils synthétisent et les fonctions qu'elles exercent. Le protéome se définit comme l'ensemble des protéines codées par un génome. La protéomique permet de quantifier et d'identifier les protéines exprimées par une cellule à un moment donné dans des contextes physiologiques et pathologiques variés.

La première étape de l'analyse protéomique (**figure 1**) est de séparer les protéines présentes dans un mélange complexe. L'identification d'une protéine passe par la mesure de sa masse. La protéine est digérée par des enzymes, c'est à dire découpée en plus petits constituants, les peptides, dont chaque masse est analysée par spectrométrie. L'ensemble de ces masses constitue la carte peptidique massique de la protéine que l'on définit comme une première 'empreinte digitale' de cette protéine. La spectrométrie de masse permet ainsi d'obtenir des informations sur des biomolécules de structure très complexe, d'identifier dans un échantillon d'analyse la présence de peptides déjà répertoriés et également de caractériser de nouveaux peptides [1].

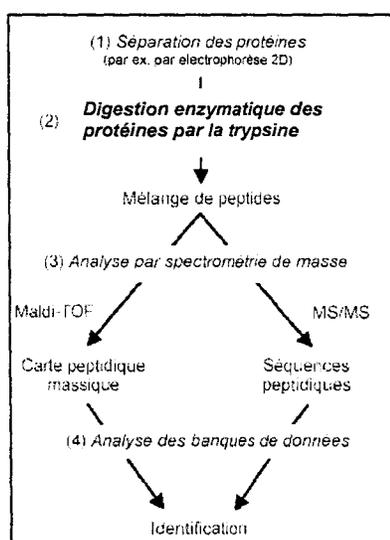


Figure 1 : Les étapes de l'analyse protéomique : la séparation des protéines par électrophorèse, la digestion enzymatique des protéines, l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou ESI MS/MS et l'analyse des banques de données [1].

1) Principe général

La spectrométrie de masse repose sur le principe suivant : à partir d'une molécule M gazéifiée, un ion gazeux M^+ est obtenu par ionisation basée sur des techniques différentes selon le type de spectrométrie de masse envisagé. L'objectif est d'ioniser la molécule sous test par une ionisation douce pour éviter sa fragmentation indésirée. Des ions de masse plus faible sont ensuite obtenus par des processus donnant des ions fragments caractéristiques de la molécule initiale. Ces ions fragments sont séparés en fonction de leur rapport masse / charge (m/z) par l'application d'un champ magnétique et / ou électrique, puis collectés par un détecteur (**figure 2**).

Les différents ions formés, caractérisés par leur masse et leur abondance relative, constituent le spectre de masse. Il présente, sous forme d'histogramme, les masses des différents fragments : chaque pic correspond à un peptide ou à une protéine. Ce spectre de masse est d'autant plus lisible qu'il est mieux résolu et moins bruité. Cela signifie que la ligne de base ne doit pas être perturbée par des pics parasites, dans lesquels risquent de se noyer les pics significatifs des fragments caractéristiques. Ces caractéristiques sont liées à la préparation et à l'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse.

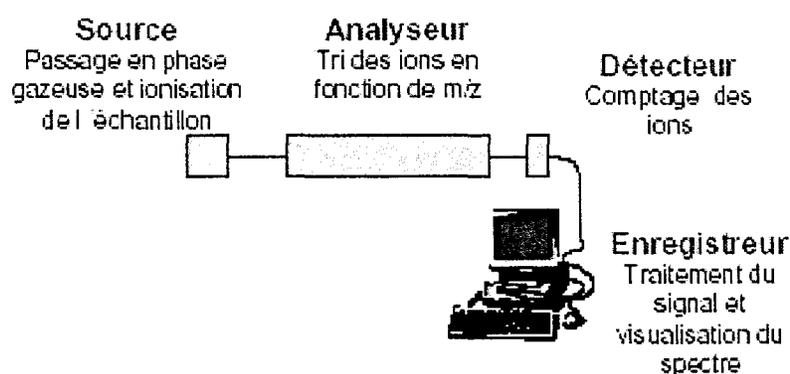


Figure 2 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse : une source ionisant l'échantillon se trouve en amont du spectromètre de masse, l'analyseur trie les ions en fonction du rapport m/z , un détecteur compte les ions, et l'enregistreur permet de visualiser le spectre [2].

2) Les techniques d'ionisation

Jusqu'à la fin des années 80, plusieurs techniques d'ionisation sont utilisées : l'ionisation par impact électronique de peptides modifiés chimiquement, puis la spectrométrie de masse par désorption plasma. Limitées par leur faible sensibilité et peu compatibles avec

l'analyse de biomolécules de masse élevée (telles que les protéines ou les peptides) ou avec l'analyse de mélanges complexes, ces techniques ont été supplantées par l'apparition de la désorption – ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et par l'ionisation par électronébulisation dénommée ESI (*Electrospray ionisation*). Ces dernières ont en effet permis de porter en phase gazeuse des biomolécules de masse élevée, à partir d'une phase solide grâce à la technique MALDI ou à partir d'une phase liquide par la technique ESI. Ces deux techniques, aujourd'hui couramment utilisées, peuvent être complémentaires.

a) L'ionisation MALDI

L'ionisation MALDI est apparue en 1988. Le principe, dans le cas d'une analyse protéomique, est le suivant : après digestion des protéines, l'échantillon de peptides sous test, dispersé dans une quantité de matrice cristalline de plusieurs mL, est irradié par des photons émis par un laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice (il s'agit souvent d'un laser N₂ à 337 nm qui produit jusqu'à 20 impulsions d'une durée de 3 nanosecondes par seconde).

La matrice a trois rôles principaux : favoriser la séparation des molécules en réduisant les forces intermoléculaires, absorber l'énergie du faisceau laser (afin de protéger les molécules cibles) et favoriser l'ionisation en induisant des transferts de protons. La concentration de la matrice est de l'ordre de 10 mg.mL⁻¹ et la quantité d'échantillon est d'environ 10 pmol. Le solvant utilisé pour ces solutions est 70 % d'acétonitrile avec 30 % d'eau et 0,1 % de TFA.

L'irradiation de la matrice et de l'échantillon provoque la création d'une grande quantité d'énergie dans la phase condensée, par excitation électronique des molécules de la matière. Des ions, formés par transfert de protons ou d'électrons entre la matière photoexcitée et l'échantillon analysé, désorbent. Les molécules ionisées de la matrice transfèrent donc un proton aux molécules de l'échantillon dans la phase ainsi obtenue (**figure 3**).

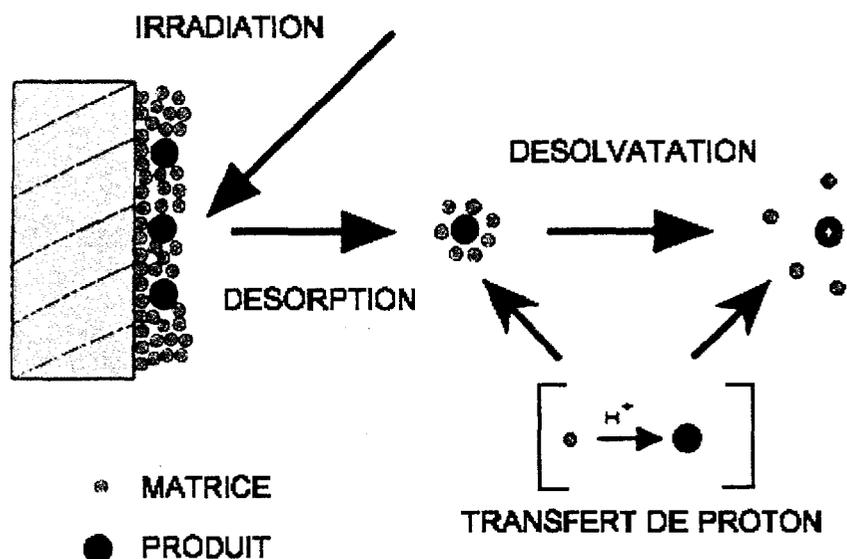


Figure 3 : Principe de l'ionisation MALDI de produit dans une matrice par irradiation LASER [2].

Ce type d'ionisation est généralement couplé à un analyseur en temps de vol (MALDI – TOF). Les ions sont accélérés (jusqu'à 20 keV) au moyen d'une haute tension et envoyés dans un tube de vol sous vide (environ 5.10^{-8} bar). Leur arrivée au bout du tube de vol est détectée par un multiplicateur d'électrons et enregistrée au bout d'un temps (t_1). Le temps zéro (t_0) est le moment où le laser a tiré. Le temps de vol des différents ions est calculé de la façon suivante :

$$m/z = B(T-A)^2$$

avec : m : masse

z : charge

T : temps de vol (= $t_1 - t_0$)

A et B : constantes de calibration

Les spectres de masse sont relativement simples à interpréter puisque l'état de charge est généralement de 1. Ainsi, les ions correspondent à $M+H^+$ où M correspond à la masse moléculaire de la molécule analysée.

Une carte peptidique massique est ainsi obtenue, représentant la distribution des masses des fragments d'une protéine. Cette dernière est identifiée en comparant sa carte

peptidique massique à celles contenues dans les banques de données protéiques. Cette technique permet donc d'identifier des protéines connues.

La technique SELDI (*Surface Enhanced Laser Desorption and Ionization*) permet une capture sélective préliminaire de protéines d'un échantillon biologique en utilisant diverses plaques révélant des interactions particulières au sein du mélange. Pour cela, les plaques sont recouvertes de surfaces d'affinité chromatographique. Une étape MALDI peut ensuite suivre [2].

b) L'ionisation ESI

Dans ce cas, les molécules sont ionisées à partir d'échantillons en solution à pression atmosphérique. La formation d'un nuage de gouttelettes chargées est obtenue en portant une solution d'échantillon à un potentiel électrique de plusieurs kV. Elles traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. La taille des gouttelettes diminue alors sous l'effet conjoint de l'évaporation du solvant et des explosions Coulombiennes successives : les charges de même signe se rapprochent sur la gouttelette et la répulsion électrostatique fait éclater cette goutte. Une goutte se forme lorsque les forces électriques sont plus grandes que les forces de tension de surface du liquide, c'est la limite de Rayleigh :

$$Q_r = 8\pi \cdot (\varepsilon \cdot \gamma \cdot R_r^3)^{1/2}$$

avec Q_r : charge de la gouttelette à la limite de Rayleigh

R_r : rayon de la gouttelette à la limite de Rayleigh

γ : coefficient de tension superficielle.

ε : permittivité du vide

De plus, la concentration en charges, et par conséquent le rendement d'ionisation, augmentent lorsque la taille des gouttes de rayon r diminue.

Ce mécanisme d'électrospray (**figure 4**) comporte trois phases : la formation de microgouttes, leur diffusion et enfin la formation d'ions en phase gazeuse: un cône de Taylor est formé à l'extrémité de la source selon l'axe du champ électrique, par effet de pointe, lorsque l'extrémité de la source est portée à un potentiel positif (accumulation de cations à la surface). Grâce à ce champ élevé, un long filament s'étire à l'extrémité du cône et se décompose en microgouttes chargées positivement (la force électrostatique l'emporte sur la tension superficielle). Le diamètre des gouttes est de l'ordre du micromètre et dépend du potentiel électrique, du débit de la solution en amont et de la nature du solvant [2].

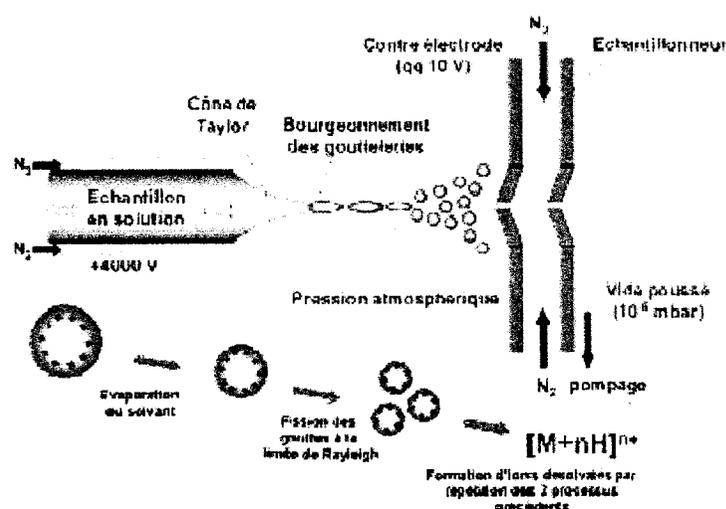


Figure 4 : Principe de l'ionisation ESI. Le spray constitué des gouttes du mélange (liquide + protéines) est le siège de séquences d'évaporation et d'explosions coulombiennes [2].

On aboutit à la formation d'espèces multi-chargées (multi-protonées), ce qui permet (en première approximation) de diviser la masse réelle de la molécule par le nombre de charges qu'elle porte et ainsi diminuer le rapport m/z de l'ion détecté.

Les spectres ESI présentent en général un ensemble de pics correspondant aux ions multichargés de type $[M+nH]n^+$ où M correspond à la masse moléculaire de la molécule analysée, et n au nombre de charges portées par cette molécule ionisée. La masse M peut-être déterminée très simplement par déconvolution du spectre et transformation de ce dernier en une courbe masse / intensité. Par exemple, pour deux pics successifs de rapports m/z mesurés

sur le spectre m_1 et m_2 (avec $m_1 < m_2$), et de charges n_1 et n_2 (avec $n_1 = n_2 + 1 = n + 1$), nous savons que :

$$m_1 = \frac{M + n_1}{n_1} = \frac{M + n + 1}{n + 1}$$

$$m_2 = \frac{M + n_2}{n_2} = \frac{M + n}{n}$$

Ceci fournit un système de 2 équations à 2 inconnues. On peut donc ensuite calculer l'état de charge n et la masse moléculaire M :

$$n = \frac{m_1 - 1}{m_2 - m_1}$$

$$M = \frac{(m_1 - 1)(m_2 - 1)}{m_2 - m_1}$$

Puisque l'électrospray fournit des ions multichargés, il est alors possible, avec des analyseurs de gamme de masse limitée, de réaliser l'analyse de protéines de masse moléculaire supérieure à 100 kDa. Le Dalton exprime la masse d'un atome d'hydrogène et est égal à $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg. Cette unité de masse atomique (u.m.a.) équivaut au douzième de la masse d'un atome de carbone 12.

L'électrospray est donc souvent couplé à un analyseur quadripolaire pour son faible coût, et sa simplicité d'utilisation. Mais il est aussi couplé aux spectromètres de masse à secteurs magnétiques, à trappe ionique, aux analyseurs à résonance ionique cyclotronique par transformée de Fourier et aux analyseurs TOF. Cette technique d'ionisation peut être couplée à un spectromètre de masse en mode tandem (MS/MS). Cela permet d'étudier la structure d'une protéine à partir de l'analyse des fragments des différents peptides issus des collisions de la protéine avec des molécules de gaz neutre. L'utilisation de la MS/MS permet ainsi de générer de courtes séquences peptidiques qui contribuent alors à l'identification sans ambiguïté des protéines analysées. Cette technique vient alors suppléer la méthode MALDI : elle est utilisée dans le cas de protéines non répertoriées où l'identification par carte peptidique massique par MALDI-TOF est inopérante [2-4].

B) Etat de l'art des modes opératoires pour l'analyse de type ESI

1) Préparation de l'échantillon à analyser

Avant toute analyse par spectrométrie de masse, l'échantillon sous test est préparé suivant plusieurs étapes : dessalage, préconcentration, digestion des protéines en peptides et séparation des peptides.

L'étape de dessalage est indispensable puisque l'analyse ESI-MS est très sensible aux sels inorganiques présents naturellement dans certaines solutions biologiques : ce mode d'ionisation ne tolère aucun sel non volatil dans la solution.

De plus, la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse sensible à la concentration ; la quantité absolue d'échantillon à analyser n'est pas un facteur limitant. Une étape de pré-concentration se révèle donc nécessaire car les protéines sont, en général, présentes en très faible quantité dans les solutions sous investigation.

Une étape de digestion s'effectue dans un réacteur de digestion où est greffée une protéase spécifique (le plus souvent la trypsine). En effet, cette enzyme est particulièrement intéressante car elle permet d'obtenir une digestion homogène de la protéine et donc des fragments de taille plus petite adaptée à la gamme de masse des spectromètres utilisés. Les peptides sont ensuite séparés puis fragmentés dans le spectromètre de masse en mode tandem (MS/MS) [1].

La séparation relève, quant à elle, de la chromatographie liquide présentée dans les paragraphes qui suivent.

2) Couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse

Mise à part l'étape de digestion qui intervient dans un réacteur spécifique, la plupart des étapes de préparation sont réalisées par chromatographie liquide. C'est le couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse [5] qui devient alors un outil puissant dans le cadre de l'analyse de protéines.

a) Principe de la chromatographie liquide

La chromatographie liquide haute performance (appelée HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*) est une méthode de séparation des constituants d'un même mélange : un fluide, appelé phase mobile, parcourt une colonne contenant elle-même une phase

stationnaire. Cette dernière peut être 'volumique', dans ce cas elle contient des 'granulés' poreux (colonne remplie) ou 'surfactive', la colonne est alors tapissée d'un film mince (colonne capillaire).

A l'instant initial, le mélange de peptides à séparer est injecté à l'entrée de la colonne et se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne. Les constituants du mélange, appelés généralement les solutés, sont alors inégalement retenus lors de la traversée de la colonne : il s'agit de la rétention. Deux conséquences résultent de ce phénomène : un déplacement moins rapide des solutés par rapport à la vitesse de la phase mobile et une vitesse de déplacement différente des solutés selon leur nature. Ils sont ainsi élués sélectivement, c'est à dire extraits, de la colonne les uns après les autres et donc séparés. L'efficacité de cette technique de séparation est fonction de la densité de la phase stationnaire.

Une colonne efficace est capable de séparer des produits qui ont des temps de rétention proches. Pour cela, le pic de chaque soluté doit être le plus fin possible. Trois facteurs sont la cause de l'élargissement des pics : la diffusion turbulente, la résistance au transfert de masse et la diffusion longitudinale.

L'élargissement dû à la diffusion turbulente est expliqué par le fait qu'il existe différents chemins parcourus par les molécules du soluté. La longueur des chemins n'étant pas la même, les temps de transit dans la colonne diffèrent et le pic de sortie s'élargit.

L'élargissement s'explique aussi par l'accumulation de la phase mobile dans les anfractuosités du support : les molécules qui diffusent dans ces poches de phase mobile vont moins vite que celles qui n'y diffusent pas. Le soluté peut aussi diffuser à l'intérieur de la phase stationnaire, ce qui réduit encore la vitesse d'échange et nuit à l'efficacité. Ainsi, plus la vitesse de la phase mobile augmente, plus le phénomène de résistance au transfert de masse nuit à l'efficacité.

Le coefficient de diffusion molaire est assez faible en milieu liquide. Cependant, cette diffusion existe et permet d'expliquer une partie de l'élargissement des pics. Dans la pratique, la diffusion longitudinale est négligeable à des vitesses ordinaires de phase mobile en milieu liquide.

En définitive, l'efficacité d'une colonne de chromatographie est définie par son nombre de plateaux théoriques : $N_{th} = 5,54 (t_r / W^{1/2})^2$ avec

N_{th} : nombre de plateaux théoriques

t_r : temps de rétention

$W^{1/2}$: largeur du pic à mi hauteur

La hauteur d'un plateau théorique est définie par $h = L / N_{th}$ où L est la longueur de la colonne. La courbe de Van Deemter (**figure 5**) permet de mettre en évidence l'importance du débit de la phase mobile sur l'efficacité de la colonne.

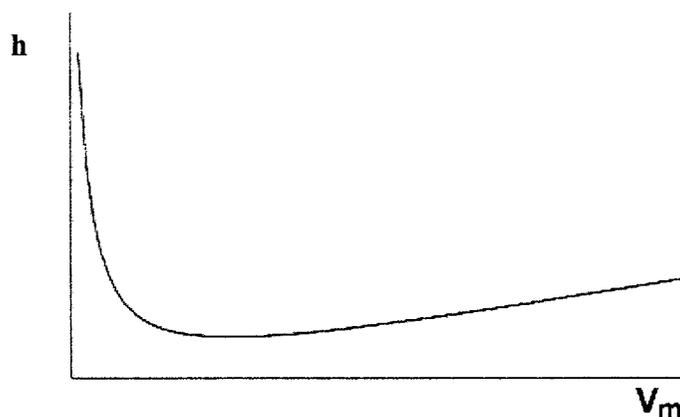


Figure 5 : Courbe de Van Deemter entre la hauteur équivalente d'un plateau théorique h et la vitesse moyenne de la phase mobile V_m .

b) Appareillage

Les éléments constituant un dispositif HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) sont les suivants (**figure 6**) :

- Un réservoir de solvant (éluant) qui contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour réaliser des gradients d'éluants (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe.

- Cette pompe est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler : en mode isocratique, (avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse), ou en mode gradient (avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants). Elle doit fournir, à débit constant (compris entre quelques $\mu\text{l}/\text{min}$ à plusieurs ml/min), une pression importante (pouvant atteindre plus d'une centaine de bars) induite par la densité de la phase stationnaire et par le diamètre réduit de la colonne.

- La vanne d'injection est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des

produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, paramètre important pour l'analyse quantitative.

- Une colonne est un tube construit dans un matériau inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées [6-7].

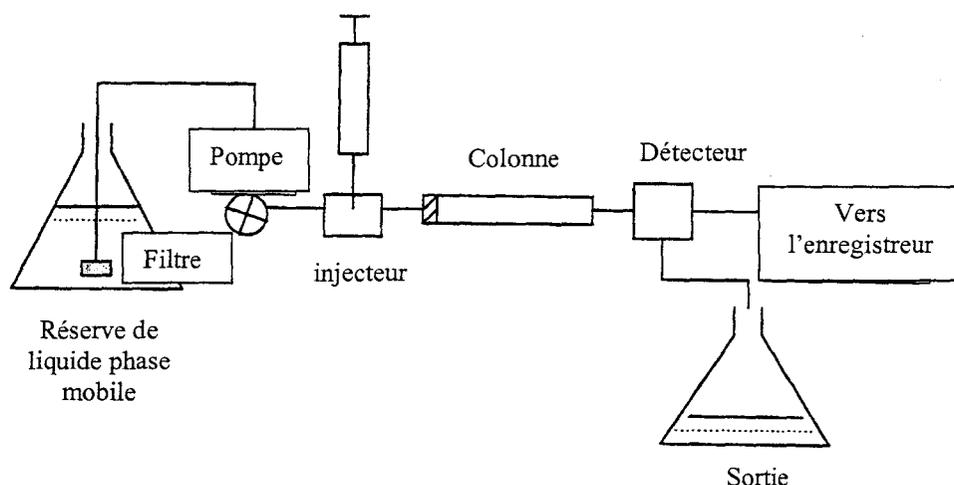


Figure 6 : Principe de fonctionnement d'un dispositif HPLC. Il comprend une pompe permettant la circulation de la phase mobile, une vanne d'injection de l'échantillon, une colonne de séparation et un détecteur [5].

c) Chromatographie liquide en phase inverse

Lorsqu'une ionisation est réalisée par électrospray, un type particulier de chromatographie est généralement pratiqué. Il s'agit de la chromatographie en phase inverse.

La phase inverse apolaire est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Ainsi les sels sont évacués et les peptides à analyser sont retenus sur la colonne puis ils sont élués par une phase mobile polaire (comme l'acétonitrile mélangé à de l'eau ou le méthanol). Cette séparation des sels et des protéines justifie l'intérêt de la chromatographie phase inverse pour une analyse par ESI.

Rappelons l'importance, sur la qualité de la mesure, de la concentration des solutés avant leur introduction dans le spectromètre de masse. En chromatographie liquide phase inverse, les protéines présentes dans la solution à analyser sont immobilisées sur la phase inverse. Ce pouvoir d'immobilisation est également inversement proportionnel au carré du diamètre de la

colonne. Afin de décrocher les solutés de cette phase, il faut ensuite introduire un solvant. De son volume dépend la concentration maximale des protéines en sortie de colonne. L'expérimentateur doit donc injecter un volume minimum de solvant (au moins égal au volume de la colonne). Pour ne pas affecter l'efficacité de séparation de la colonne, la longueur de colonne doit être, pratiquement conservée (afin de ne pas engendrer un élargissement des pics dû à une redispersion des éléments dans la colonne). Seul son diamètre doit donc être diminué afin de diminuer le volume de solvant à introduire. En conséquence, la concentration maximale en sortie de colonne est inversement proportionnelle au carré du diamètre interne de la colonne.

d) Couplage nanoLC / MS /MS

L'évolution actuelle vers une chromatographie liquide fonctionnant à des débits de l'ordre de 100 à 200 nL.min⁻¹ (Nano-LC) couplée à un analyseur de masse en mode MS/MS permet de répondre aux nécessités de l'analyse protéomique à haut débit et haute sensibilité. En effet, ce type de dispositif, en diminuant le volume mis en jeu (colonne de 75 microns de diamètre interne), augmente la concentration de peptides entraînant des gains de sensibilité (facteur 5 à 10), d'information et de temps.

Lorsque l'analyse est réalisée sur un mélange qui est directement issu de la digestion trypsique, il arrive qu'une partie seulement des peptides soit fragmentée avant la nébulisation totale de l'échantillon. Par contre lors d'un couplage avec la nano – LC, chaque peptide est analysé par spectrométrie de masse tandem puisqu'il est élué avec un temps de rétention propre. Les peptides sont donc analysés, ce qui permet d'obtenir un gain d'information de séquence sur la protéine étudiée et ce d'autant plus que ce type de couplage est associé à une automatisation qui lui permet de se dérouler 24h / 24h [1,4].

3) Interface Nano ESI

En sortie de colonne nano-LC, il est nécessaire d'alimenter le spectromètre de masse au moyen d'une source d'électronébulisation. Les sources ESI standard sont des aiguilles de silice étirée (**figure 7**). Dans des conditions classiques, le débit du liquide introduit est de 1 à 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, la tension d'ionisation est de 3 à 4 kV et l'orifice de l'aiguille a un diamètre de 100 μm [8]. Le rendement d'ionisation est d'environ 10^{-9} .

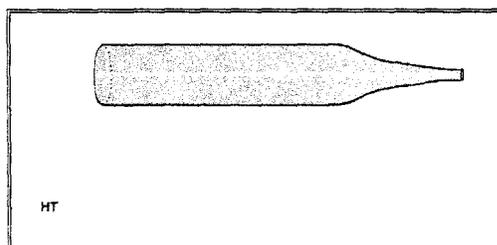


Figure 7 : Principe de la filière ESI standard. Une aiguille de silice étirée est utilisée. La tension d'ionisation est appliquée par un fil glissé dans l'aiguille [8].

Il y a une quinzaine d'années, l'ESI a été 'miniaturisée' pour donner naissance à la nanoESI (elle est ainsi nommée en référence aux débits en nL.min⁻¹ qui l'alimentent). A l'échelle nanométrique, la tension d'ionisation est inférieure à 1 kV, le débit inférieur à 1 µL.min⁻¹ et le diamètre interne de la source inférieur à 10 µm. Cette miniaturisation conduit à une amélioration du processus d'électronébulisation, à un gain en sensibilité en détection de peptides ou de protéines passant du niveau de concentration de la picomole (10⁻¹²) à celui de l'attomole (10⁻¹⁸) par litre (nous noterons par exemple une concentration de 10⁻¹² mol.L⁻¹ par pM pour picomolaire). Le rendement d'ionisation est de 10⁻³.

Voici deux sources nanoESI commercialisées et utilisées dans les laboratoires :

- les sources **Protana (figure 8)** : elles ont, à l'origine, un diamètre de sortie de 50 nm. Cependant, pour être utilisée, l'extrémité de la source doit être coupée pour obtenir un diamètre de quelques microns afin de l'ouvrir avant usage. Cette opération est non seulement fortement dépendante de l'opérateur mais en plus les manipulations ne sont pas reproductibles d'une aiguille à l'autre.

- les sources **New Objective (figure 9)** : ce sont également des aiguilles de silice mais leur sortie est micro-usinée à l'aide d'un laser. On obtient une très bonne reproductibilité mais elles sont particulièrement chères [9].

L'obstruction et la fragilité sont les défauts de ces sources nano ESI, du fait de leur diamètre relativement faible (quelques microns).

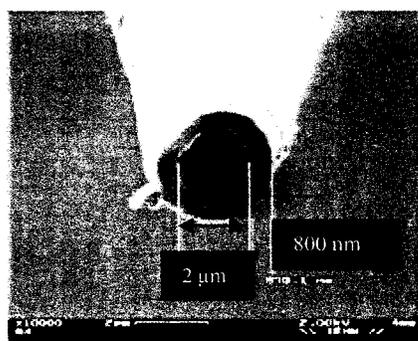


Figure 8 : Photographie réalisée au Microscope Electronique à Balayage (MEB) d'une source en silice fondue commercialisée par **Protana**. Elle présente un diamètre interne de 2 µm après coupe de l'extrémité.

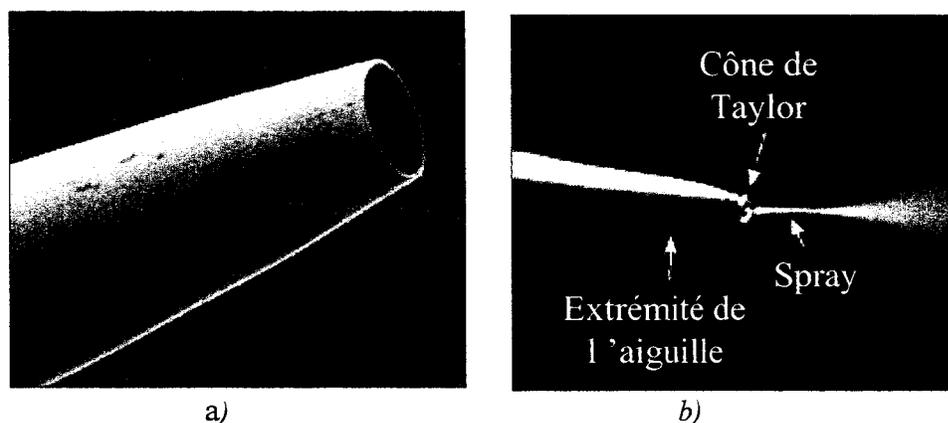


Figure 9 : Source nano ESI **New Objective** : a) photo de la source ayant un diamètre allant de 1 à 5 µm ; b) nanospray généré par cette source [9].

Ces aiguilles peuvent être reliées à un microsystème. Cette association repose sur deux techniques : l'aiguille est reliée au microsystème à l'aide d'un capillaire ou alors elle est placée directement sur le microsystème perpendiculairement à celui-ci. Durant cette opération, un ensemble d'inconvénients majeurs apparaît : canal bouché, apparition de fuites, diffusion des substances de colle dans l'échantillon (appelé relargage) [10-11].

4) Définition des besoins

Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'ESI est une technique très affectée par la présence de sels inorganiques ou surfactants organiques. Les sels perturbent le processus d'électrospray car ils forment une série d'adduits de type $M+Na^+$, $M+K^+$, $M+H+Na_2^+$, etc., ce qui complique le spectre et diminue la sensibilité.

La chromatographie sur colonne capillaire est une technique délicate : les défauts de connexion peuvent induire des volumes morts faisant chuter les performances de ces colonnes. De plus, la réutilisation du matériel de chromatographie demande des étapes de purification et de reconditionnement qui prennent beaucoup de temps.

Les deux techniques d'ionisation en spectrométrie de masse (MALDI et ESI) ne sont pas limitées par l'analyse en elle-même mais par les opérations de pré-traitement de l'échantillon qui la précèdent, comme le dessalage ou la pré-concentration.

Cependant, comparativement au degré de sensibilité atteint par la spectrométrie de masse, la purification manuelle des échantillons introduits de nouvelles pollutions [4].

II) Des microsystèmes pour l'analyse de protéines

A) Intérêt des microsystèmes fluidiques

Les apports des microsystèmes microfluidiques intégrés dédiés à l'analyse des protéines sont nombreux, notamment au niveau de la purification des échantillons biologiques *in situ* et de l'alimentation du spectromètre de masse. L'intérêt de ces microsystèmes appelés microTAS (*micro Total Analyse System*) est de pouvoir fournir à ces outils d'analyse des échantillons au niveau de leur sensibilité tout en y étant parfaitement adapté.

Ils ont pour objet, d'une manière générale, d'améliorer le rendement et l'efficacité des analyses. Ils ont également pour but de faciliter et de rendre les analyses plus rapides (quelques minutes au lieu de quelques heures) puisque les distances à parcourir sont plus courtes. Un autre objectif majeur qui peut être atteint grâce à l'utilisation des microsystèmes est la parallélisation des analyses, permettant de gagner du temps [12-16].

Les caractéristiques fondamentales de ce type de microsystème sont les suivantes : une miniaturisation poussée (microcanaux à l'échelle de la dizaine de microns), la simplicité des éléments de base dans la perspective d'intégration, ainsi qu'une compatibilité chimique et biologique de la filière technologique choisie avec l'application envisagée. L'exemple de la **figure 10** [17] présente un des premiers concepts de laboratoire sur puce dédié à l'électrophorèse capillaire. Il comprend une chambre d'injection, des chambres de réaction, une colonne de séparation ainsi que des 'poubelles'.

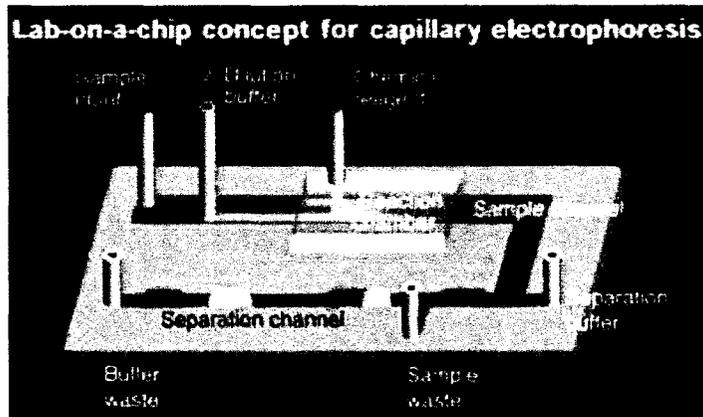


Figure 10 : Concept de laboratoire sur puce pour la séparation de molécules biologiques par électrophorèse capillaire [17].

Dans le cas des microsystèmes de type ouvert, l'intégration d'une interface, reliant le microsystème dédié au pré-traitement à l'outil d'analyse, n'est pas nécessaire. En effet, il suffit que l'échantillon à analyser soit observable ou excitable optiquement. Ces microsystèmes peuvent être dédiés à différents types d'analyses optiques comme la spectroscopie de fluorescence : microsystèmes fabriqués en PDMS (Polydiméthylsiloxane) et connectés à des fibres optiques permettant de détecter des billes fluorescentes (figure 11) [18]. C'est également le cas pour la spectroscopie infrarouge ou encore l'analyse par spectrométrie de masse de type MALDI.

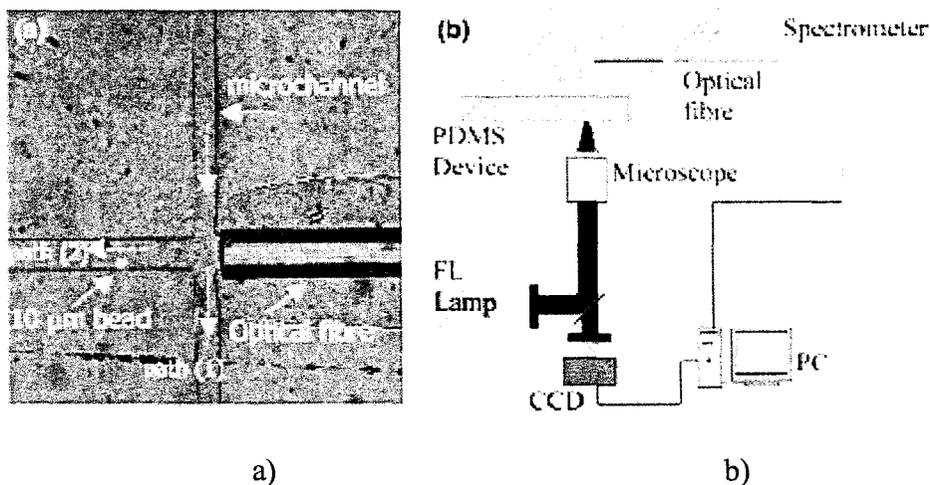


Figure 11 : Détection de particules fluorescentes : a) puce microfluidique développée en PDMS et connectée à des fibres optiques ; b) montage expérimental permettant de détecter les particules [18].

Par contre, des microsystèmes de type fermé, alimentant un appareil de détection physico-chimique autre qu'optique, doivent posséder une interface efficace capable de

coupler celui ci au matériel de détection. C'est le cas, en particulier, des *lab-on-chip* dédiés à l'analyse par spectrométrie de masse de type ESI, où l'échantillon est nébulisé avant son introduction dans l'appareil (**figure 12**) [19].

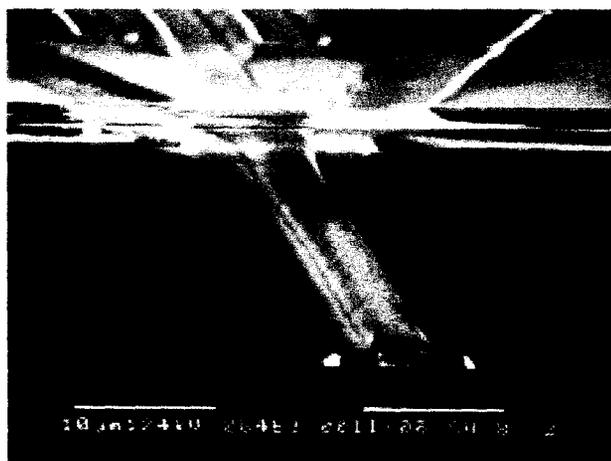


Figure 12 : Photographie MEB d'une microsource ESI réalisée en nitrure de silicium et dont les dimensions caractéristiques sont de l'ordre de la dizaine de microns [19].

Les interfaces avec le monde macro sont généralement des capillaires qui doivent être raccordés aux canaux du *lab-on-chip*. Ces capillaires en silice fondue ont des diamètres externes allant de 90 μm à plusieurs centaines de microns. Les capillaires de diamètre externe 90 μm ne sont disponibles qu'avec un diamètre interne inférieur à 20 μm , alors que des capillaires de diamètre externe 150 μm sont disponibles avec plusieurs diamètres internes allant jusqu'à 75 μm .

1) Miniaturisation et intégration

Les possibilités de miniaturisation, accessibles grâce aux progrès technologiques, permettent d'engendrer des changements profonds dans les domaines de la chimie analytique ou de la biologie. Les avantages présentés par les analyses chimiques sur puces sont la réduction des temps d'analyse, des volumes mis en jeu et des coûts.

Ainsi, un changement d'échelle, tant au niveau de la taille des microcolonnes qu'au niveau des sources nano ESI, entraîne une exploitation de plus faibles quantités de liquides biologiques (quelques μL). Ceci a plusieurs avantages : une multiplication des tests avec seulement quelques centaines de μL de la solution à analyser ainsi qu'une augmentation de la

sensibilité par l'étude de populations (de molécules, cellules ou protéines) très réduites. Afin d'augmenter l'efficacité de l'électrospray, la source doit être miniaturisée pour réaliser un nanoélectrospray. L'efficacité d'échantillonnage et de transmission des ions, de la source au spectromètre de masse, est relativement faible (elle n'est estimée qu'à 10^{-3}) [4,14].

L'intégration repose sur la localisation, au sein d'un même microsystème, de différentes étapes ou opérations d'une analyse biologique qui jusque là, s'effectuaient par manipulations extérieures. L'ensemble de ces opérations est séparé en opérations élémentaires réalisées au sein de modules fonctionnels qui regroupés constituent un véritable micro-laboratoire sur puce. Cette localisation d'opérations de pré-traitement a pour premier effet une vitesse d'analyse accrue grâce à la parallélisation possible des microsystèmes.

2) Cahier des charges

Ces laboratoires sur puce ont donc pour rôle de concentrer, purifier, séparer ou digérer des protéines ou des peptides (eux-mêmes issus de la digestion de protéines) avant introduction à l'entrée du spectromètre de masse [20]. Rappelons qu'une intégration couplée de fonctions relevant de la microtechnologie et de la biologie nous impose une démarche de simplification de nos modules fonctionnels élémentaires.

L'idéal serait donc un microsystème comportant un réservoir dans lequel est déposé l'échantillon brut. Celui-ci est ensuite poussé grâce à une pompe intégrée au travers d'un module de digestion puis d'une colonne de séparation chromatographique qui débouche sur une source d'électrospray miniaturisée intégrée alimentant le spectromètre de masse. Le schéma synoptique de cet idéal est représenté en **figure 13**.

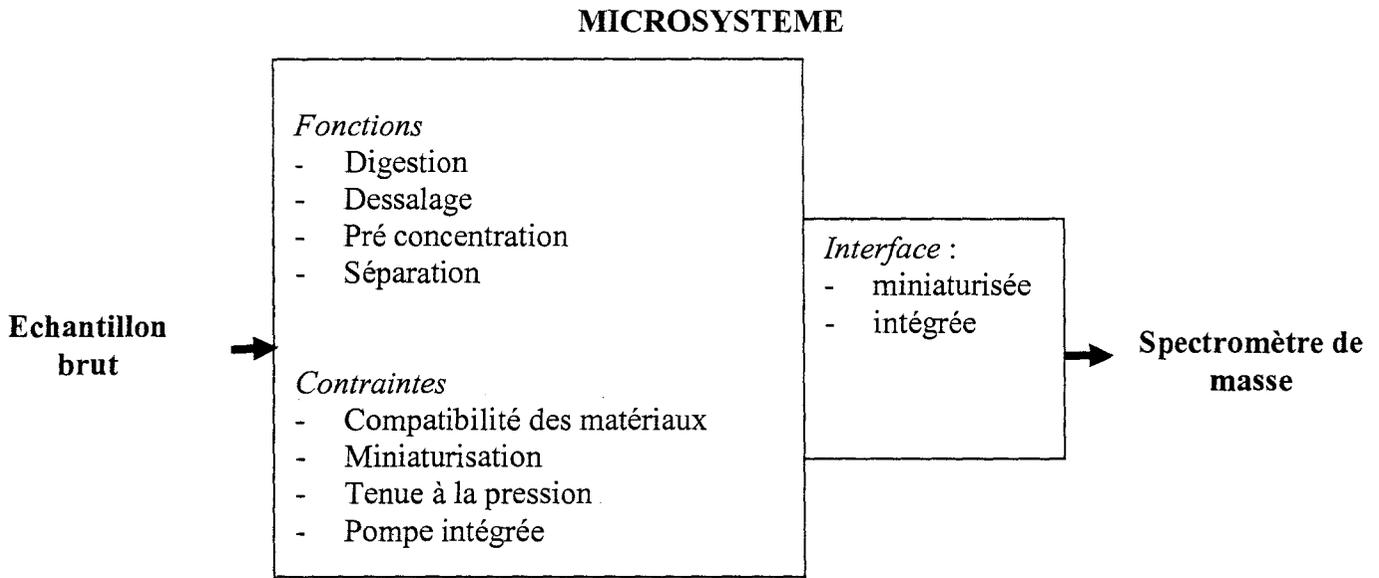


Figure 13 : L'idéal du manipulateur – Un microsystème capable de réaliser un pré-traitement complet de l'échantillon et son introduction dans le spectromètre de masse.

Plusieurs points sensibles du point de vue technologique apparaissent :

- la première difficulté est le couplage intégré d'une source miniaturisée avec des microcanaux dans lesquels ont lieu des opérations de prétraitement de l'échantillon
- la seconde est l'intégration d'une micropompe permettant de déplacer le liquide dans les différents modules de préparation de l'échantillon.

B) Etat de l'art des microsystèmes

Un état de l'art des différentes solutions proposées pour les modules envisagés permet de définir des objectifs réalistes. Il permet également de s'orienter vers une technologie favorisant l'intégration des différents modules fonctionnels ainsi qu'un prototypage rapide. Nous nous proposons de faire cet état de l'art dans la partie qui suit.

1) Microcanaux

La littérature fait état de nombreuses réalisations de microcanaux à partir de technologies extrêmement variées. En effet, cet élément constitue le cœur des microsystèmes fluidiques. Il est plus particulièrement l'élément de base de l'architecture d'un microsystème dédié à une utilisation en flux continu.

a) Gravure du Silicium ou du Pyrex® / fermeture par *anodic bonding*

La réalisation de canaux dans des substrats de Silicium ou de verre, fermés par un couvercle en verre scellé par *anodic bonding*, s'effectue par voie chimique ou par attaque physique. Que cela soit pour le Silicium ou le verre, l'attaque physique est privilégiée si l'on veut s'affranchir des problèmes d'isotropie caractéristiques des attaques par voie humide, et obtenir ainsi des canaux dont la section est rectangulaire avec des flancs droits [21]. Les microcanaux que nous devons réaliser ne doivent pas nécessairement répondre à ce critère.

Lorsque les canaux sont gravés dans le substrat de base, ceux-ci sont fermés par un couvercle en verre ou en silicium (**figure 14**). L'*anodic bonding* est une technique de scellement moléculaire entre le silicium et la silice [22]. Les substrats sont collés à une température d'environ 400°C et placés entre deux électrodes alors qu'une tension continue supérieure à 1 kV est appliquée. Le substrat de verre contient des ions sodium qui disparaissent de sa surface à haute température sous l'influence du champ électrique appliqué. Cette déplétion d'ions sodium sur la surface du verre la rend très réactive avec la surface du silicium, formant ainsi une solide liaison chimique.

Cette technique permet d'obtenir une très bonne étanchéité des canaux (force de résistance du collage d'environ 100 bar) [23] mais est plus délicate à utiliser lorsqu'on veut adjoindre aux microsystèmes des pistes métalliques conductrices [24]. La continuité de ces pistes n'est pas toujours assurée au niveau des flancs des canaux. Cette technologie est également exigeante en termes de planéité de surface et ne tolère quasiment aucun défaut du substrat (la taille des défauts doit être inférieure à quelques dizaines d'Angströms). Cette exigence peut rendre le collage d'un couvercle difficile lors de la réalisation de canaux de longueur centimétrique occupant des surfaces de plusieurs centimètres carrés.

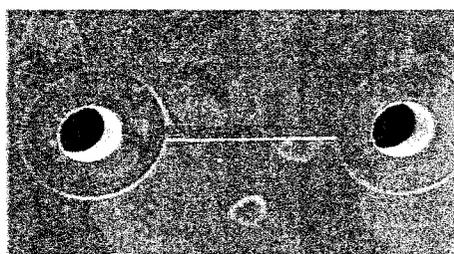


Figure 14 : Microcanal gravé dans un substrat de silicium par gravure RIE (voir chapitre 2) et fermé par un couvercle en verre par *anodic bonding* [23].

b) Technique de sablage (powder blasting)

La technique de sablage sur Pyrex® nécessite, à partir d'une étape de photolithographie, la réalisation d'un masque de résine. Les canaux sont gravés au moyen d'un sablage par poudre d'alumine contenant des grains de diamètre inférieur à 10 µm. Le masque de résine est ensuite dissout dans une solution de carbonate de sodium.

Les canaux sont fermés avec un autre substrat en Pyrex® soudé par *direct bonding*. Lors de cette opération les deux substrats de Pyrex® sont mis sous pression à une température de 650°C. L'intégration de connexions métalliques est ici envisageable tout en nécessitant la gravure du couvercle au niveau des électrodes. En effet, celles-ci génèrent une surépaisseur néfaste à la soudure directe entre le couvercle et la base. Des problèmes d'étanchéité peuvent survenir lorsque le collage est réalisé à une température de 450°C pour ne pas endommager les connexions métalliques [25].

La société néerlandaise **Micronit** [26] utilise cette technique et travaille sur la conception, le prototypage et la production de dispositifs microfluidiques sur puce, pour des applications biomédicales et chimiques. Son savoir-faire concerne l'usinage du verre et la microfabrication en silicium. Son activité principale est la production de puces en verre dédiées à l'électrophorèse capillaire et la commercialisation de l'interface nécessaire à leur utilisation (**figure 15**). Elle s'intéresse également à des développements sur demande de dispositifs *'lab-on-a-chip'* et propose son conseil technique pour des microfabrications. Elle a, en particulier une expertise dans les techniques d'usinage du verre type borosilicate, gravure de canaux, collage du couvercle sur le socle et perçage de trous, et propose différents modèles de puces d'électrophorèse capillaire, des puces standard ainsi que des puces plus élaborées.

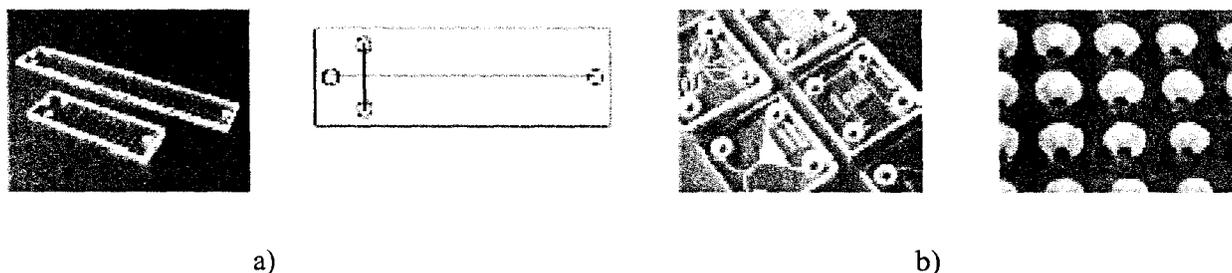


Figure 15 : Puces en verre fabriquées par la société **Micronit** : a) Puces en verre standard ;
b) Puces en verre à façon [26].

c) Technologie PDMS

Ce matériau possède des caractéristiques proches de celle d'une résine. Toutefois, il n'est pas possible de le graver chimiquement ou par plasma de façon significative. En revanche, il est possible de le peler très facilement au regard de sa très faible énergie de liaison, ce qui le prédestine au moulage. Les structures peuvent alors être obtenues à partir de moules (**figure 16**). On notera également qu'il est possible de créer des liaisons permanentes en effectuant un traitement par plasma O_2 . Ce traitement a pour conséquence de changer le caractère hydrophobe de la surface en hydrophile. Cependant, ce traitement n'est pas définitif. En effet, des études ont montré que le caractère hydrophile de la surface s'estompe après 45min. Par ailleurs, le module d'Young (caractéristique mécanique d'un matériau qui permet de caractériser son élasticité: 200 Gpa pour l'acier) du PDMS est de 0.75 Mpa, ce qui indique une flexibilité très importante. La métallisation directe du PDMS conduit à une surface complètement craquelée, car le PDMS se dilate. Le problème est résolu en traitant d'abord la surface de PDMS par un dépôt de CYTOP (qui est un promoteur d'adhérence pour le PDMS), lequel absorbe la variation de contrainte, et donne une surface parfaite lors de la métallisation (**figure 17**) [27–34].

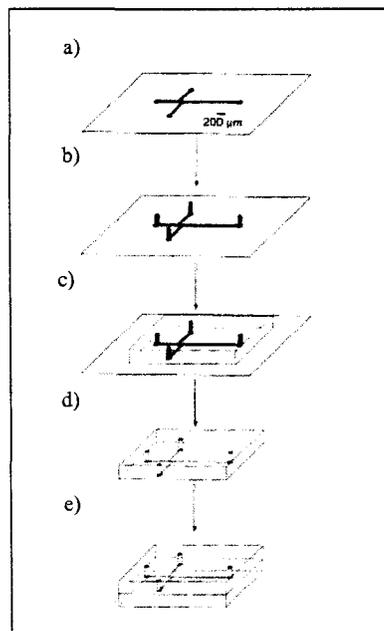


Figure 16 : Technologie PDMS a) fabrication d'un moule en SU-8 (couche 1) ; b) fabrication d'un moule en SU-8 par exemple (couche 2) ; c) dépôt du PDMS ; d) pelage du PDMS et récupération des microcanaux ; e) oxydation du PDMS et scellement à un autre substrat en PDMS par plasma [32].

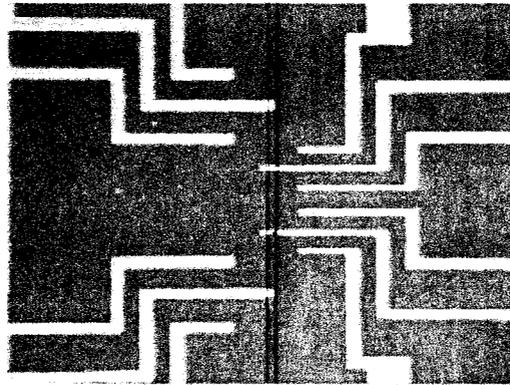


Figure 17 : Micro-électrodes (Chrome+Or) sur substrat de verre avec micro-canal en PDMS [33].

d) Technologie SU-8

La résine époxy négative SU-8 est particulièrement bien adaptée à la réalisation de microcanaux puisqu'elle permet d'obtenir des rapports d'aspect élevés jusqu'à 1 / 50. La SU-8 a également la propriété d'être transparente, relativement hydrophile (l'eau desionisée présente un angle de contact d'environ 60°), et d'avoir un module d'Young de 4 GPa favorable à la réalisation de structures suspendues de type cantilever. Cette résine peut avoir une viscosité importante (jusqu'à 45000 cSt alors qu'une résine de type Novolak comme l'AZ 5214 utilisée pour réaliser des lithographies classiques présente une viscosité de 24 cSt) qui permet un dépôt de 250 microns d'épaisseur en une seule couche. De part sa viscosité, un phénomène de bourrelet se produit sur la périphérie de l'échantillon. Ceci rend alors délicat le plaquage du masque optique lors de l'insolation de la résine [35-36].

L'inconvénient présenté par cette résine concerne son adhérence [37-38]. Il existe cependant dans la littérature des microcanaux en SU-8 fermés par un couvercle en silicium (**figure 18**) [39] ou encore des canaux enterrés dans de la résine : la fermeture des canaux est obtenue par l'insolation d'une faible épaisseur de résine polymérisant la couche supérieure (son épaisseur est définie par la dose UV imposée). Les canaux sont ensuite ouverts par révélation (**figure 19**) [40-42]. Ce dernier type de canaux ne peut atteindre des longueurs de plusieurs centimètres puisque la résine dissolue dans le révélateur constitue un mélange trop visqueux pour être évacué sur de telles longueurs.

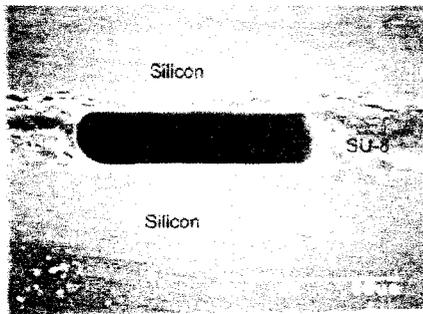


Figure 18 : Photographie MEB d'un microcanal en SU-8 et silicium par wafer bonding. La largeur du canal est de 50 μm , sa hauteur est d'environ 20 μm [39].

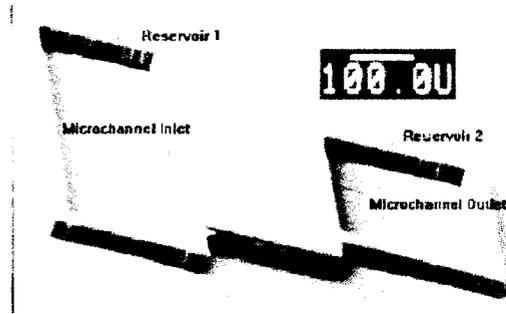


Figure 19 : Réalisation d'un microcanal enterré en SU-8 par attaque d'une couche sacrificielle. Ce canal a une longueur de quelques centaines de microns [40].

e) Emboutissage à chaud

Cette technologie repose sur l'utilisation d'un moule solide qui permet de reproduire des structures sur un polymère chauffé. Les moules utilisés sont généralement en silicium et des matériaux comme le PMMA sont emboutis (pression de 100 bar et température de 180°C pour ce dernier) (**figures 20-a et 20-b**). Les microcanaux sont ensuite fermés par collage sous température (108°C) et pression de 100 bar (*thermal bonding*). Cette technique tire profit de l'utilisation de polymères favorables au prototypage rapide et à la production de masse. Elle est très utilisée pour former des réseaux microfluidiques. Des électrodes ont été intégrées dans ces microcanaux dans le cadre de déplacements électrocinétiques (**figures 20-d**) [34]. Des motifs nanométriques comprenant une matrice de piliers de 200 nm de haut et de 150 nm de diamètre, ont été obtenus en ajustant les paramètres de température et de pression (**figure 20-c**) [42-44].

Les sociétés **Steag Microparts** et **SRU Biosystems** produisent des plaques de 96 puits (environ 1 μL) fabriquées en polymère par emboutissage à chaud. Ces plaques sont généralement utilisées pour des analyses optiques.

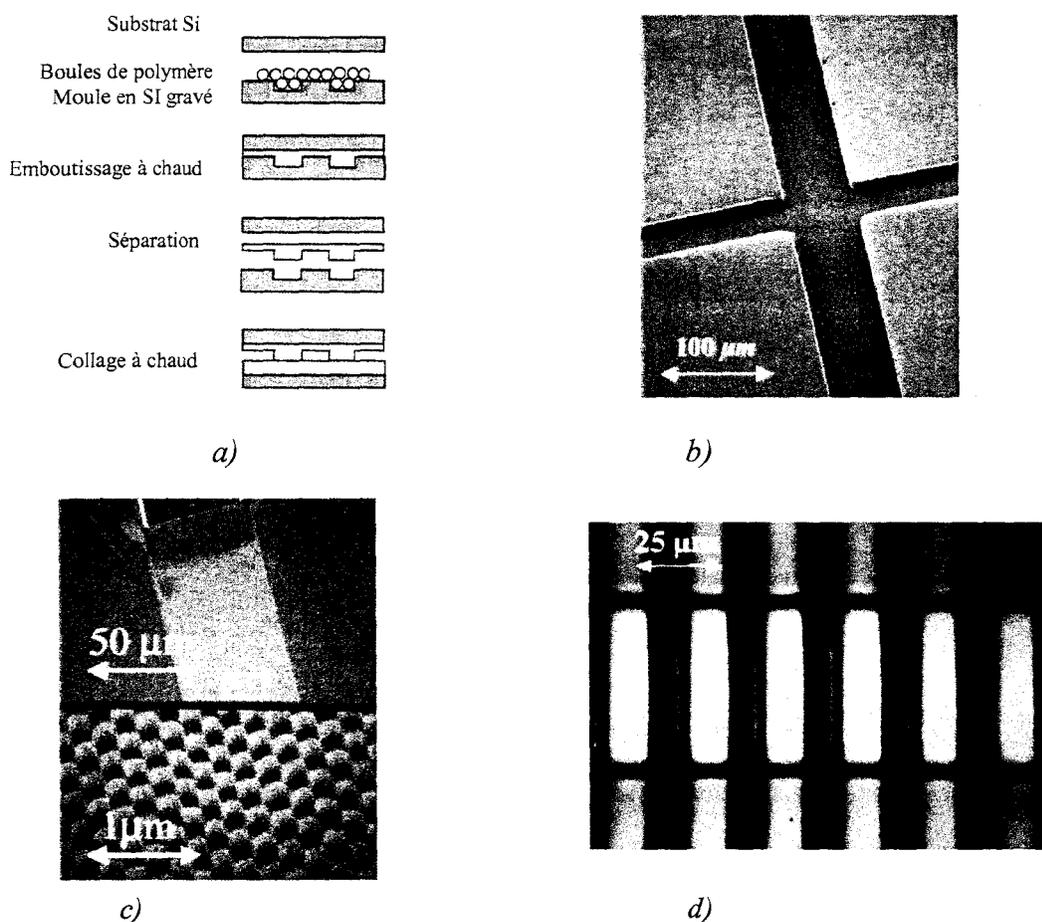


Figure 20 : Réalisation de micro et nano structures en PMMA par emboutissage à chaud : a) étapes du procédé de fabrication de microcanaux [42] ; b) microcanaux de $11\ \mu\text{m}$ d'épaisseur [42] ; c) nano piliers de $200\ \text{nm}$ de haut et de $150\ \text{nm}$ de diamètre dans un microcanal de $150\ \mu\text{m}$ de large [42] ; d) électrodes parallélisées (zones foncées) dans un microcanal (zone claire) [34].

f) Technologie LIGA

La technologie LIGA comprend plusieurs étapes. La première étape est la lithographie-X profonde : des motifs supportés par une membrane sont répliqués, par ombre portée, dans une résine photosensible aux rayons-X. Ils doivent absorber les rayons-X, contrairement à la membrane. La résine est déposée sur un substrat métallique préparé chimiquement et servant à l'électroformage. Le rayonnement synchrotron est utilisé comme source de rayons-X pour ses caractéristiques optiques uniques, particulièrement sa forte puissance et son parallélisme. Les épaisseurs de résine sont typiquement de quelques centaines de microns. La qualité de la réplification avec des rayons-X permet d'obtenir des microstructures avec des parois lisses et une précision inférieure au micromètre.

Après l'insolation par les rayons-X, les parties irradiées de la résine sont dissoutes par attaque chimique si la résine utilisée est 'positive'. Les parties restant sur le substrat sont donc la réplique des motifs absorbants du masque. Des structures métalliques définies par celles de la résine sur le substrat sont ensuite électroformées en utilisant un bain électrolytique adéquat. Le substrat est ensuite séparé de la partie électroformée. Un objet métallique avec des motifs négatifs de ceux de la résine et du masque est obtenu. Il peut alors servir de micromoule dans l'étape suivante, le micromoulage pour la reproduction des structures en plastique par injection de résine.

La répétition des deux dernières étapes, le procédé LIGA autorise une reproduction des microstructures en grand nombre. Un autre avantage de ce procédé est la diversité des matériaux employés pour la réalisation de micro-objets : plastique, métal, alliage et même céramique. Cette technologie nécessite cependant une irradiation aux rayons X et donc des bâtis spécifiques non disponibles à l'IEMN [45].

g) Ablation Laser

L'ablation Laser de substrat polymère est une autre technique utilisée pour la réalisation de canaux dédiés à la microfluidique. Le substrat à graver est positionné sur un support de déplacement xy piloté par ordinateur. Différents polymères peuvent être gravés : copolyester, polystyrène, polycarbonate, poly (méthylméthacrylate). Cette opération se fait sous environnement chimique d'oxygène, de nitrogène, d'eau ou de méthanol [46].

2) Microcolonnes d'élution

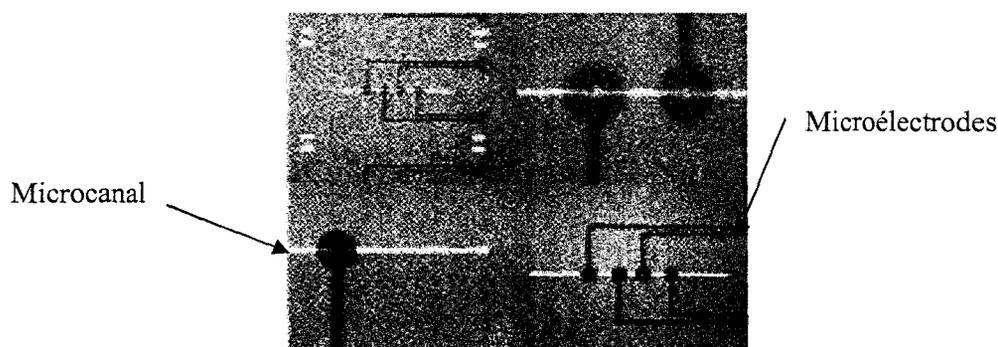
Après avoir abordé les différentes possibilités pour fabriquer des microcanaux, il s'agit de recenser les technologies qui peuvent être employées pour réaliser les prétraitements d'échantillon (de type digestion ou chromatographie liquide) avant analyse par spectrométrie de masse.

a) Séparation électrophorétique

Les techniques de séparation les plus utilisées dans les micro-dispositifs sont de type électrophorétique [47-50]. La principale raison de ce choix est qu'une différence de potentiel est plus facile à appliquer sur une puce qu'une forte pression à l'aide de micro-pompes

intégrées. Cependant, cette méthode nécessite des différences de potentiel relativement élevées (plusieurs kilovolts) difficiles à gérer sur un microsysteme dans le cadre de l'intégration d'une source nanoESI (potentiel de nébulisation de l'ordre du kilovolt). Ces tensions élevées peuvent entraîner des problèmes de chauffage. De plus, ce type de pompage nécessite des liquides chargés, charges induites par l'ajout de sels qui eux-mêmes nuisent à l'analyse par spectrométrie de masse de type ESI.

Diagnoswiss, propose des systèmes en polyimide dédiés à l'électrophorèse capillaire intégrant des connexions métalliques (**figure 21**), les réseaux de canaux étant réalisés par gravure plasma du polymère [51].



*Figure 21 : Microsysteme **Diagnoswiss** en polyimide intégrant des microélectrodes dédiées à l'électrophorèse capillaire dans les microcanaux [51].*

b) La technologie monolithe

Les monolithes [52-53] se caractérisent par une structure poreuse qui se forme au cours d'un processus de polymérisation radicalaire. Elle est formée de pores interconnectés de tailles différentes : des pores plus larges (600 à 3000 nm), pour l'écoulement des fluides, des pores plus petits (0,8 à 200 nm) où l'on peut venir greffer des groupements fonctionnels qui interagissent avec les espèces en solution. Afin d'éviter des pressions trop élevées, les pores les plus larges doivent représenter de 20 à 50% du volume poreux total. La perméabilité du monolithe gouverne la vitesse linéaire de fluide, elle est liée à la taille des pores. La surface développée par le matériau est, elle, principalement liée à la présence de petits pores.

Cette forte porosité confère aux monolithes des propriétés autorisant leur utilisation comme phase stationnaire de chromatographie. Dans ce cas, la chute de pression (ou perte de charge) observée est inférieure à celle obtenue avec d'autres phases usuelles. A titre d'exemple, pour un cylindre de monolithe de 75 μm de diamètre et de 17 cm de longueur, la chute de pression mesurée pour un mélange constitué de 95% d'eau et 5 % d'acétonitrile

circulant à un débit de 200 nL.min^{-1} est comprise entre 40 et 85 bar suivant la porosité du monolithe [54].

Les deux fonctions de digestion et de chromatographie liquide sont également réalisables au moyen de monolithes. La séparation repose dans de nombreux cas sur la technique d'électrophorèse capillaire (EC) mais cette dernière est toutefois exclue puisqu'elle utilise un mode de pompage basé sur un flux électroosmotique, impliquant l'ajout de sels (charges) en solution, peu compatible avec une analyse par ESI-SM.

Soulignons que ces phases monolithiques ont été élaborées jusqu'à présent en capillaire de silice fondue, comme le montre la **figure 22**.



Figure 22 : Section d'une phase monolithique réalisée dans un capillaire de diamètre interne $75 \mu\text{m}$. Nous observons des pores de l'ordre du μm , les pores nanométriques n'étant pas visible sur cette photo [54].

c) Utilisation de billes fonctionnalisées

Cette technique est basée sur l'utilisation de billes poreuses de silice ou de polymère (**figure 23**) [55]. Celles-ci sont fonctionnalisées avec des groupements d'intérêt pour la séparation ou avec une enzyme immobilisée de façon covalente dans le cas du réacteur enzymatique. Ces billes sont tassées dans une portion de canal et bloquées par des piliers gravés dans le matériau. Cependant, cette alternative pose des problèmes importants : le contrôle de la densité de tassement des billes et la sensibilité à une forte pression ou à une tension élevée.

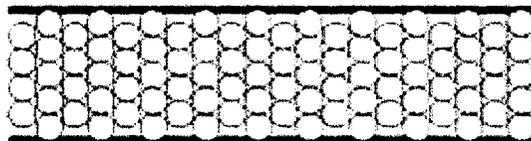


Figure 23 : Schéma de principe du tassement de billes de silice fonctionnalisées dans une portion de canal permettant de fonctionnaliser ce dernier en créant une phase fixe [54].

d) Micro-usinage du canal

Les billes peuvent être remplacées par un réseau de piliers gravés dans une portion de canal, ce qui rend plus facile le contrôle de la densité de particules. Ce type de structure est réalisable sur substrat en verre [56] (**figure 24**) et également en PDMS [57]. Le système réalisé sur verre par gravure profonde DRIE (*Deep Reactive Ion Etching*) comprend des canaux formés entre les piliers de 1,5 μm de large et 9 μm de haut. Cependant, la résolution atteinte par ces techniques de gravure ne donne pas une densité et une taille de piliers satisfaisante pour obtenir une surface spécifique assez développée pour des applications chromatographiques. Dans notre cas, il faudrait donc compléter cette approche par l'introduction d'une fonctionnalisation plus complexe 'en volume' pour l'obtention d'un réseau aux dimensions caractéristiques de l'ordre de la centaine de nanomètres.

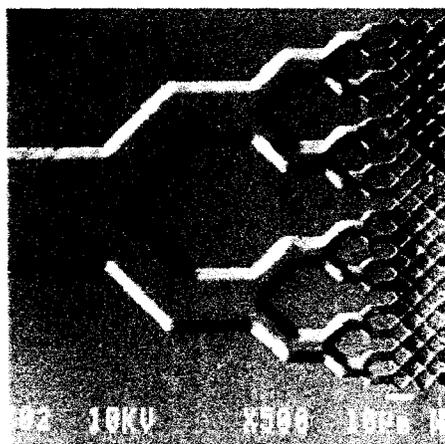


Figure 24 : Micro-usinage de piliers dans un substrat de quartz sur une portion de microcanal par gravure plasma (DRIE). Les canaux les plus petits ont une largeur caractéristique de 1,5 μm et une hauteur de 9 μm [56].

3) Déplacement de liquide

L'étape suivante d'intégration, lorsque le réseau microfluidique fonctionnalisé est constitué, est la mise en place d'une micropompe permettant la circulation des liquides dans ce réseau. Dans le cadre de nos applications les débits peuvent être différents suivant l'application allant du $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ au $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Les modes de pompage dédiés aux déplacements discrets mais également aux déplacements de colonnes de liquide sont présentés ci-après. La liste des modes de pompage est non exhaustive mais reste limitée aux systèmes simples autorisant une intégration potentielle. Ces différents modes font appel à des actuations diverses : électrique, pneumatique, thermique, mécanique ou encore acoustique. Cela reflète la diversité des dispositifs et des effets physiques proposés. Le flux dispensé par ces micropompes est, selon le cas, continu ou discret (déplacement de microgouttes).

a) **Déplacement de type EWOD (*ElectroWetting On Dielectric*)**

Le déplacement d'une microgoutte s'effectue entre deux plans garnis d'électrodes. La **figure 25** montre le principe de son déplacement. Les plans supérieur et inférieur sont constitués d'un matériau isolant et seulement deux paires d'électrodes sont représentées pour expliquer le fonctionnement [59].

Lors de la phase A, la goutte relaxe dans la paire d'électrodes 1. Elle est très légèrement engagée dans la paire 2 ce qui assure une situation favorable à l'amorçage de la phase B. En phase B, la paire 2 est portée à un potentiel $+V$ ce qui crée une force entraînant la goutte de la paire 1 vers la paire 2. La phase C correspond à la position finale de déplacement. Dans cette phase, la tension V_2 peut être annulée, la goutte relaxe et on retrouve un état semblable à l'état A. Dans cette structure, le volume de la microgoutte est fixé par la géométrie des électrodes. Le débit est contrôlable électriquement et le sens de transport est réversible. Ce principe de déplacement permet la conception d'un réseau 2D de déplacements discrets (**figure 26**).

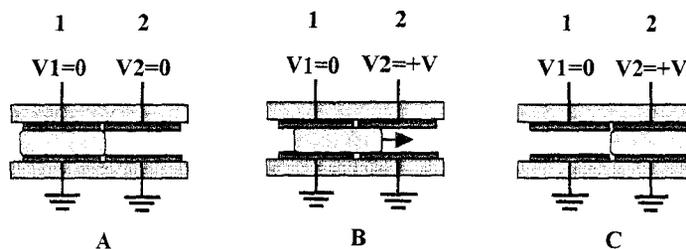


Figure 25 : Principe du déplacement de type EWOD. Il s'agit d'un déplacement de gouttes de liquide conducteur d'une paire d'électrodes à une autre par application d'un champ électrique entre ces paires d'électrodes [59].

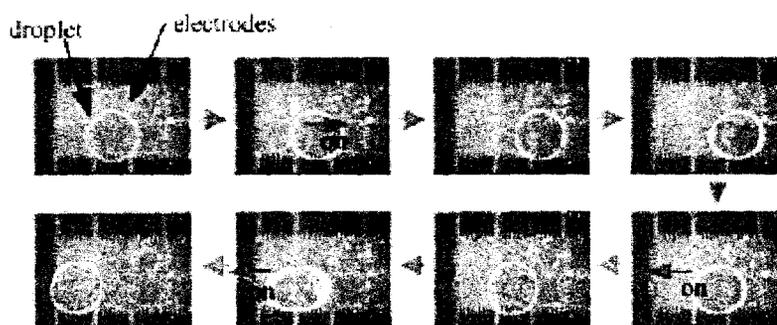


Figure 26 : Déplacement de gouttes réalisé grâce à une tension continue de 15 V avec une distance de 150 μm entre la base et la masse (volume des gouttes déplacées : environ 450 nL) [60].

Le déplacement de gouttes de liquide conducteur est très étudié en raison de l'intérêt des applications multiples en microfluidique. La conductivité du liquide est cependant source de difficultés pratiques : électrolyse au niveau des électrodes et phénomène d'ébullition en relation avec l'échauffement par effet Joule du liquide. Pour remédier au premier problème, les électrodes sont isolées électriquement. Dans ces conditions, la situation est celle de la **figure 26**. L'épaisseur de l'isolant est d tandis que celle de la goutte est D . Par ailleurs, ϵ_d est la permittivité de l'isolant sur les électrodes.

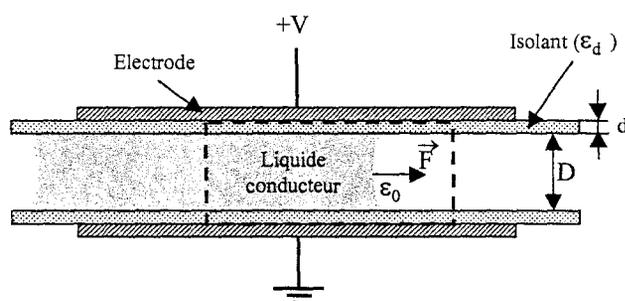


Figure 27 : Dispositif de transfert de goutte avec électrodes isolées. La ligne en tirets définit la surface S_e effective équivalente pour le calcul de la force par la méthode du tenseur de Maxwell [59].

Par suite de la présence des charges libres du liquide, il se forme une double couche électrique à l'interface liquide–isolant. L'application de la méthode du tenseur de Maxwell en utilisant la surface S_e indiquée sur la **figure 27**, conduit à l'expression de la force électrique agissante pour le déplacement de la goutte :

$$F = \varepsilon_d V^2 / [4d(1 + 2d\varepsilon_0 / D\varepsilon_d)]$$

Pour neutraliser l'effet des charges de conduction ionique, il est possible également de travailler avec un champ électrique alternatif dont la fréquence f doit être convenablement choisie. Cette valeur de f doit être suffisamment élevée pour que d'une part l'impédance capacitive des accès soit négligeable et que d'autre part la conduction ionique disparaisse. Dans ces conditions, on retrouve un comportement diélectrique pour la goutte et la force diélectrophorétique s'écrit :

$$F = \left[\frac{1}{D/\varepsilon_\ell + 2d/\varepsilon_d} - \frac{1}{D/\varepsilon_0 + 2d/\varepsilon_d} \right] \cdot \frac{V^2}{2}$$

où ε_ℓ représente la permittivité du liquide à la fréquence f .

Pour le déplacement des liquides conducteurs, il s'agit de soumettre le liquide chargé à un champ électrique en empêchant tout passage du courant électrique d'une électrode à l'autre via les charges mobiles du liquide. Les électrodes sont alors recouvertes par une couche d'isolant et une couche de Téflon® qui respectivement bloque le passage des charges et rend la surface hydrophobe. Cette dernière caractéristique permet d'éviter les phénomènes d'hystérésis rencontrés sur des surfaces hydrophiles à forte énergie de surface [58-60]. Des travaux sont réalisés sur ce sujet au sein de l'équipe Microfluidique de l'IEMN dans le cadre de la thèse de F. Caron.

b) Ondes acoustiques de surface (SAW : *Surface Acoustic Waves*)

Le déplacement de gouttes de liquide peut également être réalisé au moyen d'ondes acoustiques Rayleigh de surface (*Rayleigh Surface Acoustic Waves* ou RSAW) générées par des transducteurs interdigités et guidées sur un substrat piézoélectrique (**figure 28**) [61-62]. Ces travaux font également l'objet à l'IEMN du travail de thèse d'Alan Renaudin (équipe Microfluidique).

L'actuation se fait à partir de quelques transducteurs interdigités périphériques travaillant à plusieurs dizaines de MHz. Des microgouttes sont déplacées sur un substrat de LiNbO_3 ou entre ce dernier et un couvercle. La qualité des déplacements est conditionnée par un prétraitement du substrat destiné à rendre sa surface hydrophobe. Une étude numérique montre que ce prétraitement n'affecte pas sensiblement la propagation des ondes. Par ailleurs, la précision du guidage des gouttes peut être renforcée par la réalisation de micropistes, plus hydrophiles, prédéfinies. Leur fabrication correspond à une opération chimique de modulation locale de la mouillabilité du substrat. En modifiant la puissance d'alimentation des transducteurs, des possibilités microfluidiques sont offertes pour des gouttes de volume compris entre 0,5 et $3\mu\text{L}$ environ: déplacements contrôlés dans l'espace 2D et le temps ; opérations de fusion et de mélange de gouttes ; passage du déplacement 1-plan au déplacement 2-plans ou passage inverse.

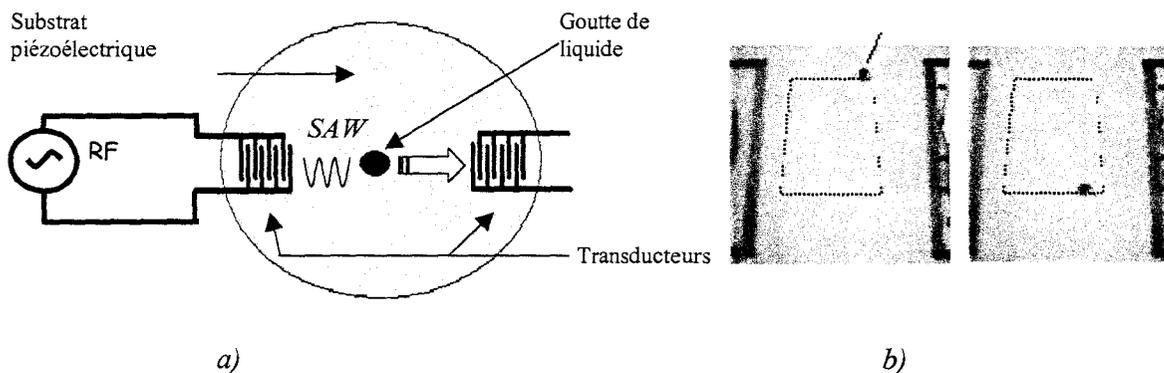


Figure 28 : Déplacement de microgoutte par onde Rayleigh : a) schéma de principe d'un dispositif ; b) trajectoire 2D d'une microgoutte d'eau désionisée ($1\mu\text{L}$) contrôlée à l'aide des transducteurs interdigités [62].

c) Pompage électroosmotique

La circulation du liquide peut également être induite par électro-osmose. Suivant les propriétés de surface d'un canal, un champ électrique produit des forces de déplacement initiant la circulation de fluides entre différents points du dispositif (**figure 29**). Ce mode de transport fluide conditionne fortement le choix du matériau utilisé. En effet, il est important que ce matériau présente des propriétés d'isolation électrique suffisamment importantes pour confiner le courant à l'intérieur des canaux où a lieu la circulation fluide [63]. Cette technique de déplacement intervient dans la séparation par électrochromatographie

qui est en quelque sorte une électrophorèse capillaire dans un tube contenant une phase stationnaire.

Il faut cependant distinguer le déplacement électroosmotique du déplacement de type électrophorétique qui correspond au déplacement des ions dans un fluide vers l'électrode chargée de façon opposée grâce à un gradient de champ. Ce dernier type de déplacement intervient dans la séparation par électrophorèse.

L'électroosmose est un phénomène particulier de l'électrophorèse qui se traduit par le déplacement d'une couche ionique de liquide sous l'action d'un champ électrique par rapport à une couche fixe d'ions de charges opposées. Des contre-ions de la solution d'électrolyte ont tendance à se plaquer contre la paroi du capillaire et à neutraliser ces charges, formant ainsi une double couche d'ions. Sous l'action du champ électrique, les cations les moins retenus de cette double couche ionique, solvatés, migrent vers la cathode entraînant avec eux les molécules de tampon. Le flux ainsi créé donne aux particules une mobilité qui s'ajoute à leur mobilité propre. La particularité de ce type d'actuation est que le front de déplacement du liquide est plat et non parabolique

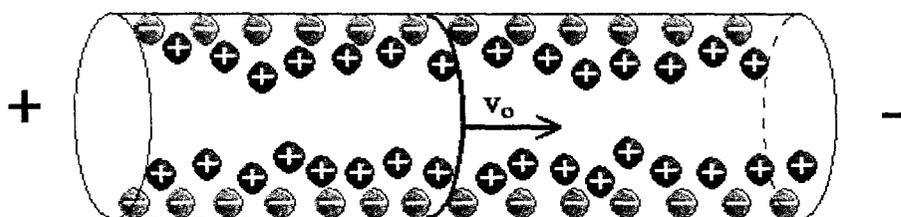


Figure 29 : Principe du déplacement électroosmotique engendré par la répartition des charges dans un capillaire par application d'une différence de potentiel continue entre ses extrémités.

d) Pompe à actuation piézoélectrique

Ces pompes sont basées sur l'actuation piézoélectrique de membrane en silicium (**figure 30-a**). Un film mince de PZT réalisé entre deux électrodes permet d'actionner une membrane en SiO_2 / Si . Les débits obtenus sont de l'ordre de $150 \mu\text{L}/\text{min}$ avec des pressions allant jusqu'à 2000 Pa [64]. La fiabilité de ce type de valves a été démontrée avec des tests jusqu'à deux millions de cycles sans détérioration [65]. Ces résultats sont obtenus avec une couche épaisse de PZT d'environ $100 \mu\text{m}$ avec une tension sinusoïdale d'amplitude 600 V à une fréquence de 200Hz . L'actuation de ces membranes a également été réalisé à partir de

films minces de PZT (800 nm) avec des tensions de l'ordre de la dizaine de volts pour une déflexion de quelques microns [66]. Les étapes principales de la réalisation de ces actuateurs sont présentées sur la **figure 30-b** : 1 : substrat SOI oxydé double face ; 2 : réalisation de la première électrode et de la couche de PZT ; 4 : réalisation de l'électrode supérieure ; 5 : libération de la membrane SiO₂ / Si).

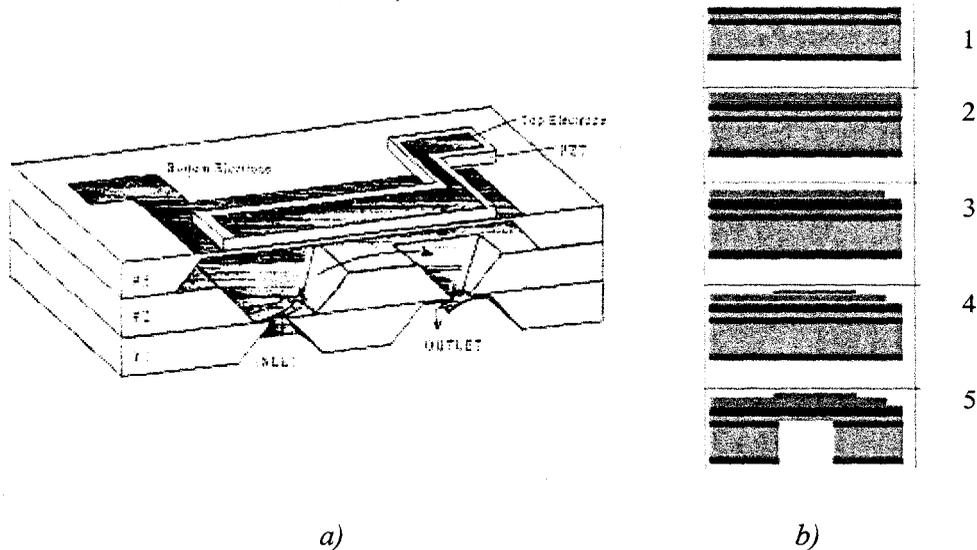


Figure 30 : Pompe à actuation piézoélectrique : a) schéma de principe de la pompe utilisant une couche de PZT pour actionner une membrane en silicium [64]; b) procédé de réalisation d'une membrane à actuation PZT en couche mince [66].

e) Pompe à actuation thermique

La plupart de ces pompes actionnées par une résistance chauffante sont associées à des valves basées sur des dissymétries géométriques. Il s'agit d'une pompe volumétrique où l'actuation thermique vaporise une partie du liquide se trouvant dans la chambre de pompage entraînant une variation du volume disponible pour le liquide dans une chambre (**figure 31**) connectée à deux valves. Celles-ci fonctionnent en opposition et permettent, pour un cycle de fonctionnement, la création d'un débit et d'une surpression en sortie de pompe.

Ce type de pompage ne permet pas de générer des débits supérieurs au bar mais présente l'avantage d'être relativement simple à mettre en œuvre. Des débits de 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ont été générés, ainsi que des pressions de pompage de 500 Pa avec un signal électrique sinusoïdal de fréquence supérieure à 500 Hz et une puissance de 0,5 W. Dans le cas de ces expériences, le pompage à actuation thermique est associé à des valves passives de type convergent / divergent (**figure 32**) [67]. Ces valves passives supportent des pressions

inférieures à 1 bar dans le cadre de microsystèmes où à ces dimensions, les nombres de Reynolds sont généralement bas et les écoulements laminaires [68].

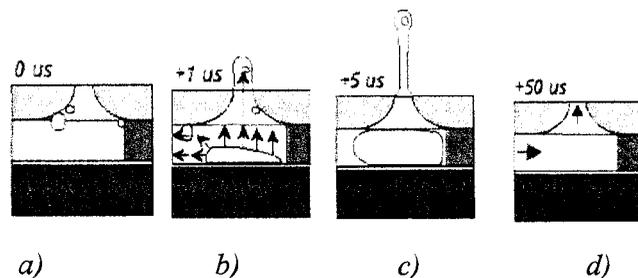


Figure 31 : Principe de l'expulsion d'une goutte de liquide après génération d'une bulle par actuation thermique : a) chambre remplie ; b) génération de la bulle par chauffage ; c) expulsion de la goutte ; d) remplissage de la chambre.

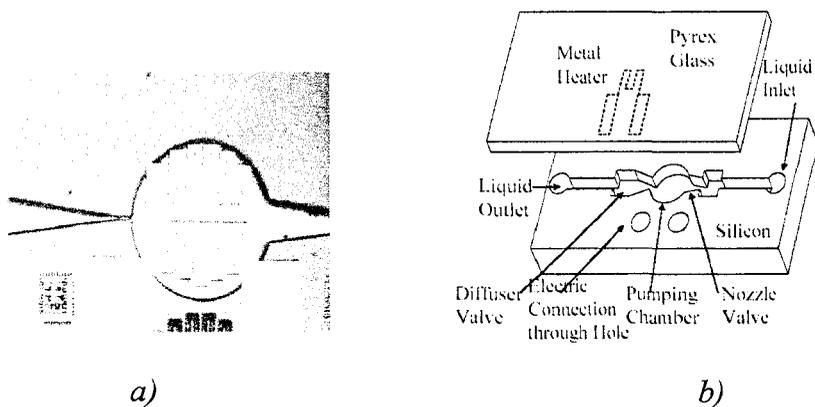


Figure 32 : Micropompe à actuation thermique réalisée sur un microsystème silicium / Pyrex® : a) photo d'une réalisation ; b) principe de la réalisation [67].

4) Source d'électronébulisation

Le dernier module fonctionnel à intégrer au sein d'un 'Lab on chip' est celui en charge de l'interface avec le spectromètre de masse. En effet, l'intégration d'une source ESI à un microsystème supprime une étape de manipulation des échantillons, ce qui diminue la perte de matériel et les contaminations. L'objectif de cette source est de guider le liquide vers une pointe afin de former un cône de Taylor. Cette source peut être isolante, il faut donc adjoindre une connexion métallique pour porter la tension d'ionisation sur le liquide à nébuliser. Elle doit cependant réaliser un effet de pointe permettant d'obtenir les lignes de champ nécessaire à la formation du nébulisât. Deux topologies sont envisagées : la source débouche dans le plan du microsystème (**figure 33**), ou perpendiculairement au microsystème (**figure 34**).

Différentes solutions plus ou moins efficaces ont été proposées jusqu'à présent. Un micro-canal débouchant sur la tranche du microsystème a été utilisé comme source nanoESI (**figure 35**) [69]. Cette technique pose cependant des problèmes de mouillage du liquide sur la tranche empêchant de réaliser un effet de pointe correcte nécessaire à la formation du nanospray ; cela a pour conséquence un faible rendement d'ionisation. Une autre idée consiste à réaliser une structure suspendue en parylène [70] qui dépasse du substrat.

Dans le cas d'une source perpendiculaire au substrat, un disque est creusé dans ce dernier dégageant une cheminée dans laquelle se place le liquide [70]. C'est la technique retenue par le laboratoire Advion™ [71] qui propose un système automatisé décrit par la suite.

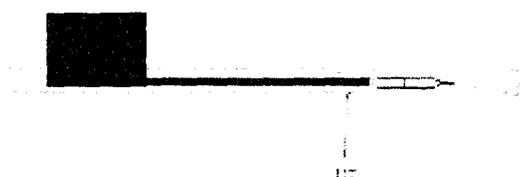


Figure 33 : Schéma de la topologie où la source est dans le même plan que le microsystème.

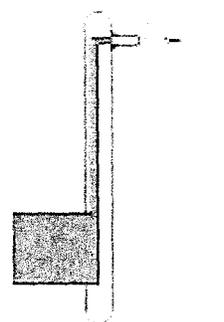
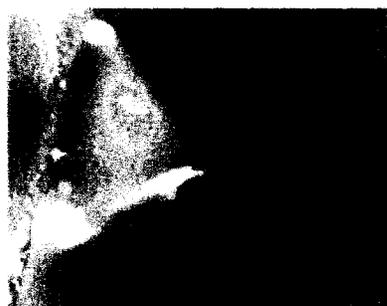


Figure 34 : Schéma de la topologie où la source est perpendiculaire au microsystème.



a)



b)

Figure 35 : Nanosource ESI réalisée à partir d'un microcanal réalisé sur verre débouchant sur la tranche d'un microsystème. La goutte de liquide mouille la tranche du microsystème : a) liquide en sortie de canal sans potentiel d'ionisation ; b) cône de Taylor observé sous tension d'ionisation [69].

a) Usinage Silicium

Des sources sont obtenues par gravure profonde du silicium en dégageant une 'cheminée' en silicium au centre d'une cavité circulaire (topologie décrite à la **figure 34**). Cette cheminée présente un diamètre interne de 15 μm (**figure 36-a**). Cette cheminée est alimentée par la face arrière du substrat où est gravé un réservoir. Ce réservoir est fermé par

un couvercle en Pyrex® soudé *par Anodic Bonding*. Il est connecté à deux microcanaux : le premier alimente le réservoir grâce à un capillaire qui est collé, le second permet d'introduire un fil de platine utilisé pour appliquer la tension d'ionisation via le liquide qui se trouve dans le réservoir [71]. D'autres sources de ce type ont été réalisées avec une forme qui n'est pas totalement cylindrique ; la cheminée est arrondie à son extrémité (**figure 36-b**) [72].

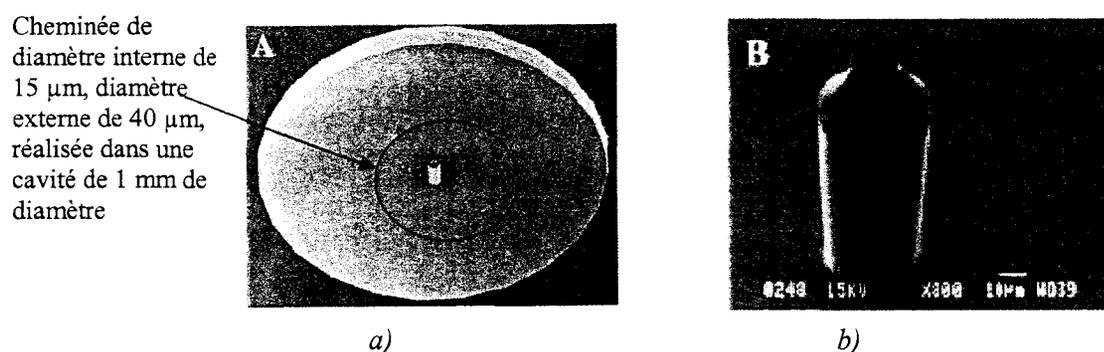


Figure 36 : Source ESI réalisée en silicium par gravure profonde : a) la cheminée, dégagée au centre la cavité circulaire, a un diamètre interne de 15 μm [71] ; b) la cheminée n'est plus un cylindre parfait mais s'arrondit à son extrémité [72].

b) Utilisation de polymères

D'autres techniques s'appuient sur différents polymères (elles correspondent plutôt à la topologie décrite à la **figure 33**), comme le PMMA par exemple, pour la fabrication de pointes dédiées à l'électrospray. Ces pointes sont alimentées par un canal ouvert réalisé sur la pointe triangulaire [73]. Plusieurs structures ont été réalisées sur un dispositif en forme d'étoile (**figure 37-a**).

La technologie d'emboutissage à chaud permet également d'obtenir des microcanaux couplés à une source en parylène intercalée entre la base et le couvercle du microcanal. La source est réalisée par photolithographie standard, et le microcanal par emboutissage d'un substrat polymère (cyclo Olefin) à partir d'un moule en silicium (**figure 37-b**). Grâce à cette technologie un couplage intéressant a été formé (débit de 300 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ et tension d'ionisation de 3 kV : figure du test insérée en bas à gauche de la **figure 37-b**) entre source et microcanal, cependant ces microcanaux n'ont pas été fonctionnalisés à notre connaissance [74].

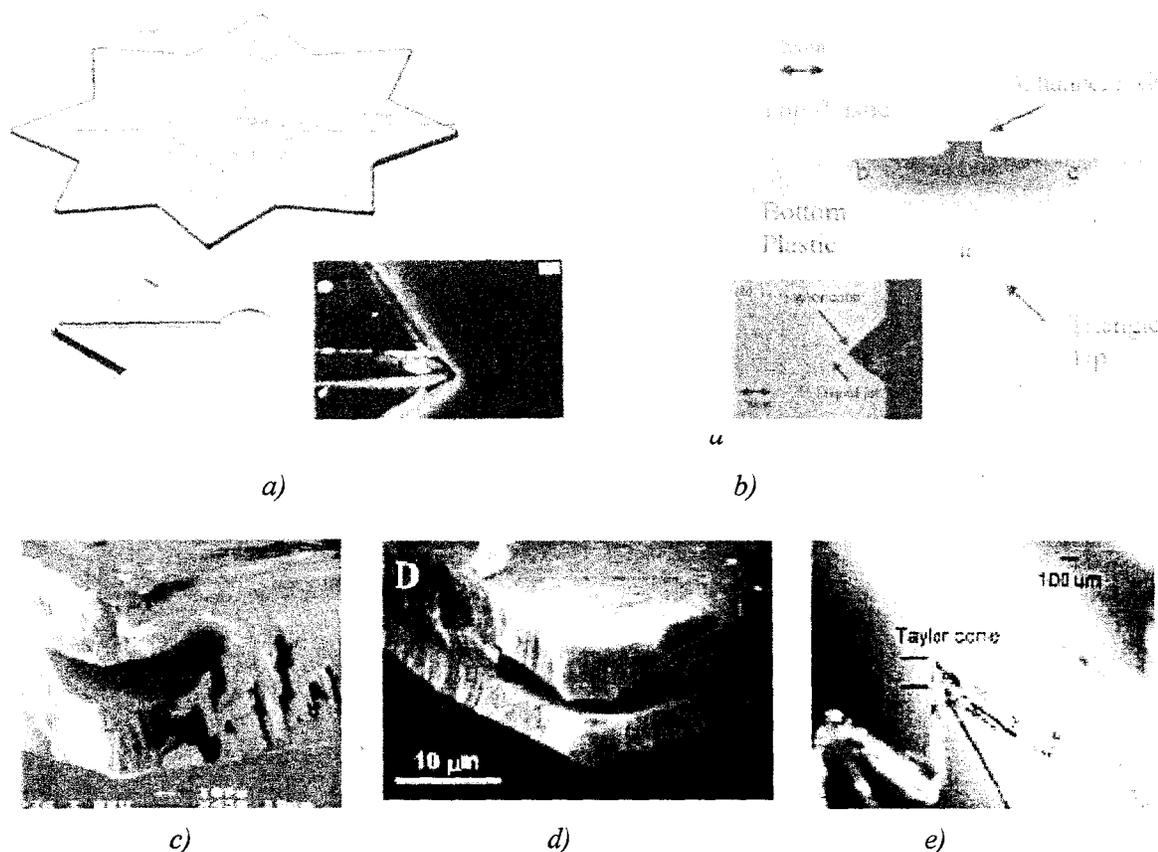
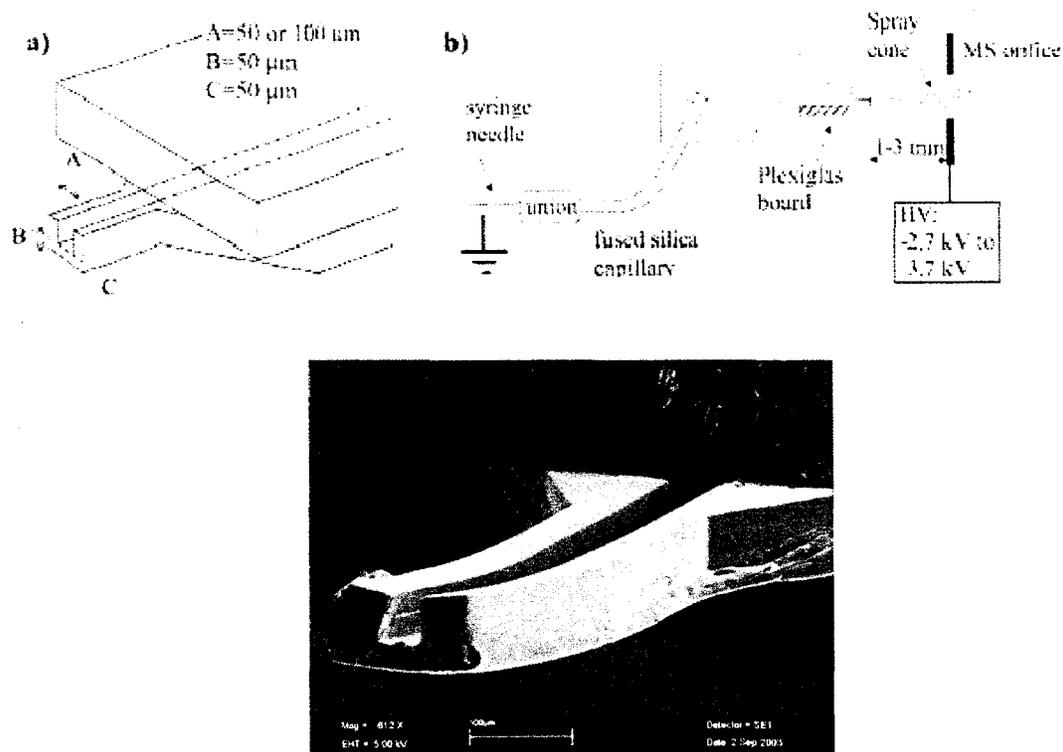


Figure 37 : Sources nanoESI réalisées à partir de polymère : a) système réalisé en PMMA constitué d'un réservoir, d'un canal et d'une source [73]; b) source obtenue grâce à une pointe triangulaire en parylène (entre deux substrats polymère formant un microcanal) [74] ; c) source en parylène [75]; d) source en polyimide [76]; e) source en PDMS [77].

D'autres sources sont également fabriquées en parylène (**figure 37-c**). Ces dispositifs réalisés en structures fermées contiennent des ouvertures de fente de 10 µm. Le rendement d'ionisation obtenu avec ces sources est comparable à celui des sources nanoESI commerciales [75]. Cependant, la reproductibilité et la réalisation technologique sont plus difficiles à obtenir car il s'agit de structures 3D fermées. Des sources ont été fabriquées en polyimide par ablation Laser (**figure 37-d**) [76], ou encore par moulage du PDMS (**figure 37-e**) [77].

Des dispositifs en PDMS (**figure 38**) couplant un canal et une source sont réalisés, les dimensions caractéristiques de la source sont de plusieurs dizaines de microns (canal de 50µm) et la tension d'ionisation nécessaire est d'environ 3 kV. Ces tests ont été réalisés avec du méthanol mais les canaux ne présentent aucune fonctionnalité particulière [78].



c)

Figure 38 : Dispositif en PDMS alimenté en continu comprenant une source d'électrospray alimenté par un capillaire : a) schéma décrivant la source ; b) schéma décrivant le système ; c) photo de la source [78].

5) Microsystèmes commerciaux intégrés (et/ou automatisés)

Des systèmes automatisés, utilisant des puces consommables dédiées spécifiquement à l'analyse MALDI mais aussi à l'analyse ESI, sont commercialisées par des sociétés comme Gyros, Advion, Agilent.

Gyros :

Gyros AB commercialise un dispositif microfluidique dédié à la préparation (dessalage, concentration) des échantillons protéiques avant leur analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'originalité réside dans l'intégration des réseaux microfluidiques sur un support de type CD. Ils sont donc exploités dans un support qui les portent en rotation à haute vitesse afin d'utiliser l'action de la force centrifuge pour les déplacements (**figure 39**). Chaque CD inclue 96 réseaux indépendants de microcanaux pour la préparation simultanée

des échantillons ; l'analyse se déroule sur une plateforme avec une robotique adaptée (**Gyros Workstation**) [79-80].

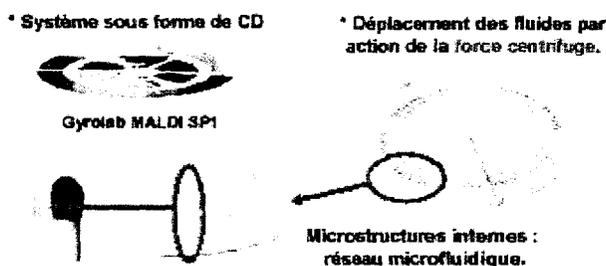


Figure 39 : Structuration interne du consommable Gyros sous forme de CD [79].

L'introduction de l'échantillon est contrôlée par la chimie de surface puis le volume précis à traiter est contrôlé par une première rotation du CD, le dessalage est effectué sur une phase inverse C18 sur laquelle l'échantillon est injecté avec une deuxième rotation du CD, puis il est élué. La matrice est ajoutée à l'éluat, puis après cristallisation de l'ensemble le CD est découpé et introduit dans le spectromètre de masse. Soulignons que ces systèmes n'intègrent que des colonnes courtes (inférieures à 2 cm) destinées uniquement au dessalage.

Advion :

Advion Biosciences a mis au point des sources microfabriquées pour l'analyse par ESI / MS; ces sources se présentent sous forme de plaque de silicium qui contiennent 100 sources indépendantes usinées dans le silicium par gravure profonde. L'ESI™ Chip est pilotée à l'aide d'une plateforme robotisée adaptée à l'entrée du spectromètre de masse: **NanoMate™ 100** (figure 40). L'échantillon est aspiré dans une plaque '96 puits' à l'aide d'une pointe conductrice puis est infusé à travers la source microfabriquée. Le nébulisât est initié par application de la tension d'ionisation et d'une pression à travers la pointe usinée [72].

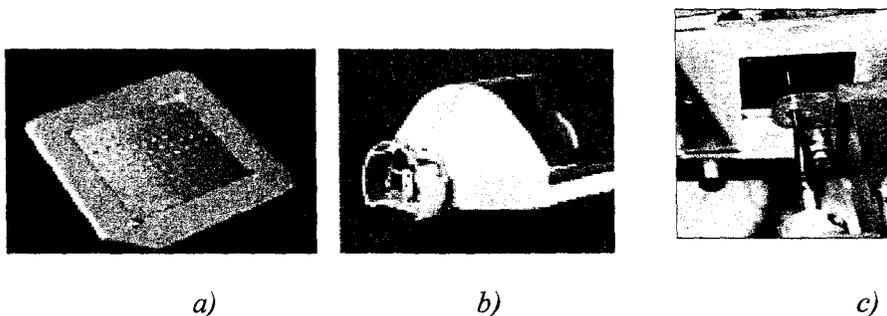


Figure 40 : Automatisation dédiée à la Spectrométrie de masse de type ESI développée par Advion :
a) ESI™ Chip ; b) Automate NanoMate™ 100 ; c) Alimentation de la puce [72].

Plusieurs avantages existent quant à l'utilisation de ces sources :

- automatisation des opérations,
- robustesse et reproductibilité des sources,
- travail sur volume réduit,
- et absence de contamination d'un échantillon à l'autre.

En revanche, ce système n'intègre aucune opération de prétraitement de l'échantillon.

Agilent :

Agilent a développé une puce couplant la séparation chromatographique et une source d'électronébulisation qui s'introduit dans une architecture de couplage LC / MS spécifique (**figure 41**). Ces puces combinent un réseau microfluidique fonctionnalisé et une source. Les puces sont fabriquées à partir d'un polymère (polyimide) où le réseau microfluidique et la source nanoESI sont réalisés par ablation laser. Le réseau est fermé grâce à un couvercle en plastique collé par laminage. Les modules de pré-concentration et de séparation sont réalisés grâce à la technologie basée sur des billes. L'alimentation est automatisée par le bâti LC / MS et il n'y a donc pas de système de pompe intégré sur la puce. Par contre, une valve rotative permet de réaliser les différentes connections (vers la poubelle pour la préconcentration ou vers la colonne de chromatographie) entre la puce et les arrivées de fluide pilotées par le bâti LC-MS [81-83].

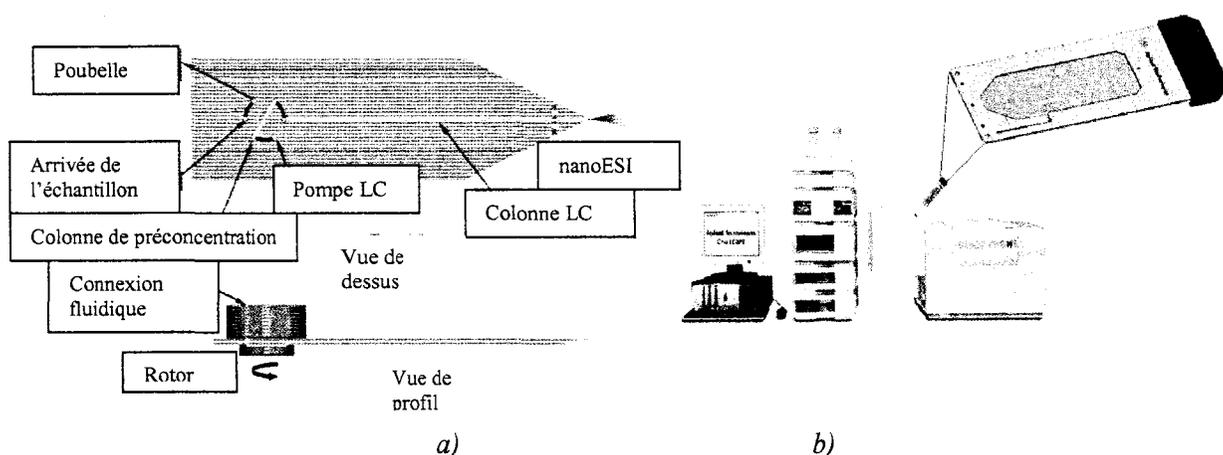


Figure 41 : Schéma de principe de la puce développée par Agilent basée sur l'utilisation d'un ensemble pompe – valves externes : a) schéma de principe ; b) ensemble LC / MS permettant d'accueillir la puce [81].

Dans le cadre de l'analyse de composés biochimiques ou de cellules, **Agilent** (en collaboration avec **Caliper**), réalise également des puces de verre à électrophorèse (**figure 42**) composée de deux substrats de verre formant un microsystème à partir de la technologie sur verre décrite précédemment (puces LabChip). Ces puces sont analysées dans le système **2100 BioAnalyser** : injection de l'échantillon dans la puce, séparation par électrophorèse sur matrice de gel et détection en sortie de puce par fluorescence [84].

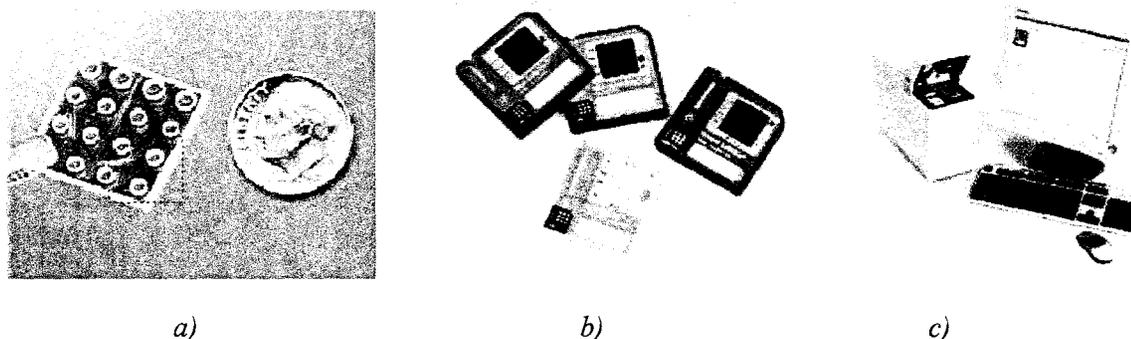


Figure 42 : Agilent 2100 Bio Analyser dédié à l'analyse de composés biochimiques par fluorescence : a) Puce en verre intégrant le réseau microfluidique de la puce LabChip ; b) Puces LabChip ; c) Agilent 2100 Bio Analyser [84].

C) Vers un microsystème intégré dédié à la Spectrométrie de Masse ESI

Les objectifs que nous nous fixons sont définis dans un cadre pluridisciplinaire en collaboration avec des spécialistes de la spectrométrie de masse (LCOM) à laquelle les microsystèmes sont dédiés, et des polymères. Ces polymères seront utilisés pour fonctionnaliser les microsystèmes.

1) Degré d'intégration envisagé

Un état des lieux a été effectué concernant les réalisations actuelles en microtechnologie et les protocoles opératoires associés à l'analyse par spectrométrie de masse. Il nous reste à définir une ébauche d'architecture du microsystème envisagé. Cette dernière doit être en relation avec la technologie adoptée pour les opérations élémentaires nécessaires à l'analyse. La puce proposée récemment par **Agilent** (juin 2004) correspond en partie aux objectifs que nous nous sommes fixés. Cependant, notre objectif est de réaliser des puces consommables indépendantes d'un bâti spécifique et donc adaptables sur différents types de spectromètres de masse.

a) Choix de la technologie de fonctionnalisation

Notre choix se tourne donc vers une technique de préparation de l'échantillon (dessalage, préconcentration, séparation) par chromatographie. La problématique est donc de trouver une phase stationnaire ou support solide pertinent dans ce contexte microfluidique et applicable à la réalisation du dispositif chromatographique. Plusieurs options de fonctionnalisation ont été présentées. La gravure d'un substrat silicium permet de contrôler exactement la géométrie d'un réacteur, elle repose sur des opérations de nanolithographie. Des structures dont la dimension caractéristique est nanométrique peuvent également être obtenues avec les monolithes (même si leur porosité n'est pas parfaitement contrôlée) par exposition aux UV. La réalisation de monolithes est envisageable dans des canaux à structure transparente. Ces phases monolithiques ont l'avantage d'être un support, fonctionnalisable par greffage permettant de réaliser les opérations de digestion [85] et de chromatographie en phase inverse [86-87].

D'un point de vue analytique, le flux de liquide dans des dispositifs 'packés' (billes de silice tassées) est beaucoup moins rapide que dans des dispositifs de type monolithe. Ce paramètre est de prime importance pour des biomolécules telles que les protéines qui sont volumineuses et présentent des coefficients de diffusion très faibles. En effet, dans les matériaux standard, le passage des molécules est principalement régi par des phénomènes de diffusion ; ceci convient pour des petites molécules (à coefficient de diffusion élevé), mais pas pour des protéines dont le coefficient de diffusion est limité. Dans le cas de monolithes, le transfert de masse est accru, le transport des fluides et des espèces étant non seulement produit par des phénomènes de diffusion mais également de convection. Les monolithes sont donc adéquats pour des applications qui nécessitent un transfert de masse rapide des espèces.

Et enfin, les monomères (à la base de la fabrication des monolithes) ouvrent la voie à une grande variété de chimie de surface laissant augurer une évolution importante des fonctionnalités [53].

b) Déplacement du liquide

Comme nous l'avons expliqué, il faut distinguer des microsystèmes de déplacement de gouttes (qualifiés de déplacements discrets) et des microsystèmes travaillant avec des colonnes de liquide (qu'on qualifiera de déplacements continus). Suivant ce type, la structure globale du système ainsi que le mode de déplacement du liquide seront différents.

Les déplacements continus peuvent être assurés de façons très diverses : par effet électroosmotique, par variation du volume de la chambre de pompage de façon électrostatique ou piézoélectrique ou par actuation thermique, par ondes acoustiques ou encore par électromouillage.

Sachant que ces microsystèmes sont, dans un premier temps, destinés à accueillir des structures monolithiques engendrant des pressions de plusieurs dizaines de bar, les seules pompes capables de répondre à une demande aussi élevée sont à l'heure actuelle de type électroosmotique. L'inconvénient de ce principe de pompage est qu'il oblige à charger le liquide en sels et à travailler avec une différence de potentiel de l'ordre du kV. Il ne se révèle donc pas facilement intégrable pour une analyse par ESI - MS. Dans ces conditions, notre choix s'est porté vers une poussée hydrodynamique externe dans un premier temps.

2) Fonctions envisagées

a) Préparation de l'échantillon

Comme nous l'avons vu précédemment, le microsystème de type lab-on-chip a pour fonction première la purification de l'échantillon à analyser. Ce dessalage peut se faire par chromatographie en phase inverse dans une colonne monolithique. Cette phase effectue également une fonction de pré-concentration des échantillons dilués.

Un module de chromatographie permettant de séparer les peptides peut être envisagé. La difficulté principale dans ce cas concerne le rapport longueur sur hauteur du canal de ce module (environ 2000) par référence à une colonne capillaire standard de 15 cm de longueur et de 75 μm de diamètre interne. Un module de digestion peut également être intégré en amont de la colonne chromatographique, en s'appuyant également sur une structure monolithique où est greffée la trypsine.

Notre objectif est de réussir à intégrer ces phases monolithiques dans des microcanaux, afin de reproduire les performances obtenues avec des capillaires où elles ont été greffées. Ces microcanaux destinés à des fonctions de dessalage peuvent avoir une longueur inférieure à 5 cm et une section d'environ $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. Par contre, la séparation demande des microcanaux de longueur supérieure à 10 cm et de section d'environ $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ pour reproduire les colonnes réalisées en capillaire à partir d'une phase monolithique.

b) Interface ESI

En ce qui concerne la source, deux topologies ont été recensées. La première comprend une source qui débouche dans le plan du microsysteme, suspendue en débord de ce dernier réalisant l'effet de pointe (**figure 43**). La seconde comprend une source qui débouche perpendiculairement au plan du microsysteme et réalisent l'effet de pointe grâce à une topologie de type cheminée (**figure 44**). Nous nous proposons de tester ces deux types de source afin de choisir la topologie la mieux adaptée à l'intégration des modules de préparation de l'échantillon avec une source nanoESI.

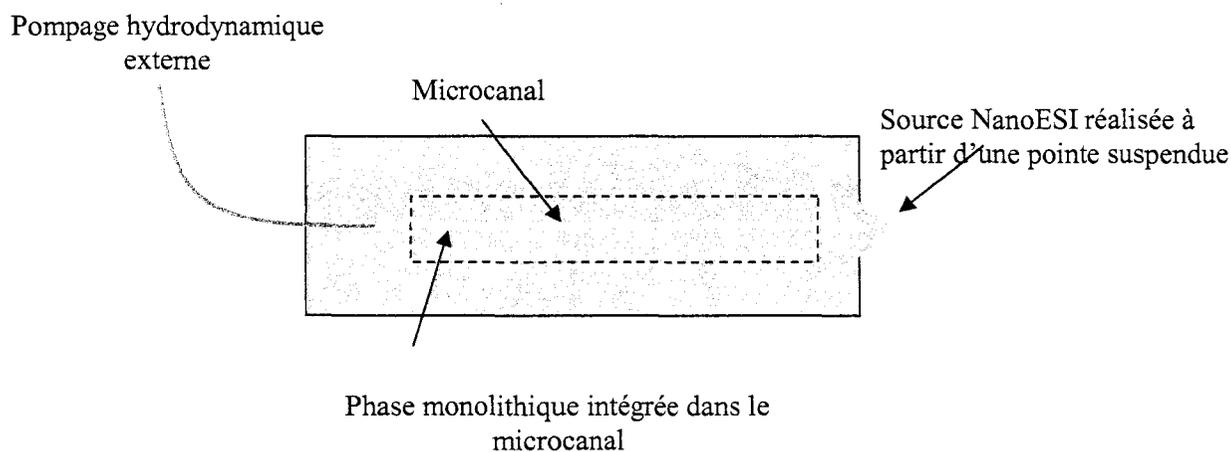


Figure 43 : Schéma du prototype envisagé avec une source débouchant dans le plan du microsysteme.

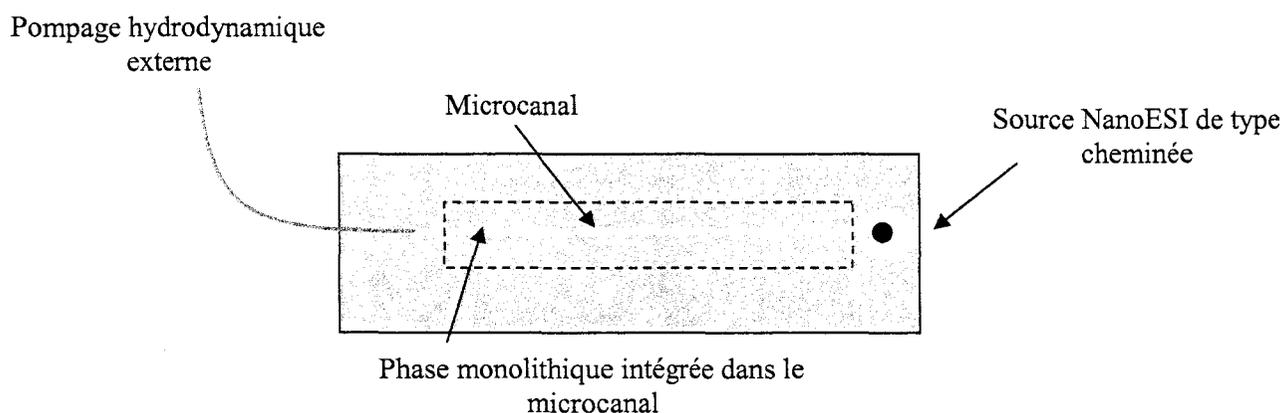


Figure 44 : Schéma du prototype envisagé avec une source débouchant perpendiculairement au plan du microsysteme.

Conclusion

La technologie existante dédiée aux analyses couplées entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse évolue suivant une expérience de plusieurs dizaines d'années. Ce chapitre a mis en évidence l'intérêt des microsystèmes dans le cadre de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse. Il nous est donc possible, au regard des fonctions qui doivent être intégrées dans le microsystème, d'élaborer l'architecture du microsystème dédié.

Différentes étapes fondamentales ont été mises en évidence, des étapes préliminaires de traitement de l'échantillon (premier tri, purification, préconcentration...) mais aussi des étapes plus proches de l'analyse finale (séparation...) qui s'opèrent sur des quantités réduites. Ces fonctions, qui sont préalables aux analyses par spectrométrie de masse, vont requérir des microcanaux de dimensions différentes suivant l'objectif fixé. En ce qui concerne la séparation, les microcanaux devront présenter un rapport longueur sur hauteur caractéristique (environ 2000) au regard des tests qui ont été réalisés en capillaire. En effet, dans le cadre de notre collaboration, la technologie choisie pour les modules de prétraitement est la polymérisation *in situ* de structures monolithiques qui peuvent être fonctionnalisés et répondre potentiellement aux opérations de dessalage, pré-concentration, et séparation par chromatographie de phase inverse mais également à une opération de digestion.

Enfin, le microsystème doit comporter une interface intégrée capable d'alimenter le spectromètre de masse de type ESI. Dans ce cas, deux topologies peuvent être envisagées : pour la première, la source débouche perpendiculairement au plan du microsystème, pour la seconde, elle débouche dans le plan du microsystème.

L'intégration d'une technologie de pompage continue constitue une étude à part entière si on se réfère aux pressions qu'elle doit être capable de fournir au travers des modules de prétraitement de l'échantillon. Le pompage de type électroosmotique pourrait assurer le déplacement du liquide mais il est peu compatible avec l'ionisation ESI.

L'objectif est donc de réaliser, dans un premier temps, un microsystème à pompage hydrodynamique externe intégrant des canaux fonctionnalisés, notamment dédiés au dessalage, et une source couplée efficacement.

Bibliographie du chapitre 1 :

- [1] J. Garin, M. Ferro, N. Rolland, J. Joyard, 'Stratégies en protéomique : outils, limites et développements', Ecole thématique Biologie végétale, 2001.
- [2] J. Vinh, 'Etude et caractérisation structurale des modifications post-traductionnelle de la tubuline par spectrométrie de masse', Thèse de l'université Pierre et Marie Curie – Paris 6, 1999.
- [3] E. Constantin, P. Traldi, D. Favretto, A. Schnell, 'Spectrométrie de Masse : Principes et Applications', Technique et Documentation Lavoisier, 2ème édition, 1996.
- [4] J.C. Blais, 'Cours de Spectrométrie de Masse', Garchy, 1994.
- [5] J. de Graeve, F. Berthou, M. Prost. 'Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse', Editions Masson, Paris, 1986.
- [6] J.J. Kirkland, 'Chromatographie en phase liquide. Pratique et applications modernes', Gauthier-Villars, Paris, 1973.
- [7] C. Horvath, 'High Performance Liquid Chromatography', Tomes I et II, Academic Press, New-York, 1980.
- [8] A. Fligge , K. Bruns, M. Przybylski, 'Analytical development of electrospray and nano electrospray mass spectrometry in combination with liquid chromatography for the characterisation of proteins', J. Chromatogr. B, 706, pp. 91-100, 1998
- [9] Brevet n° WOSE0101303: Bergquist J., Nilsson S., Wetterhall M., déposé le 08/06/2001.
- [10] I. Lazar, R.S.Ramsey, S. Sundberg, J.M. Ramsey, 'Subattomole-sensitivity microchip nano electrospray source with Time Of Flight mass spectrometry detection', Analytical Chemistry, 71, 17, pp.3627-3631, 1999.
- [11] D. Figeys, R. Aebersold, 'Nanoflow solvent gradient delivery from a microfabricated device for protein identifications by electrospray ionization mass spectrometry', Anal. Chem., 70, 18, pp.3721-3727, 1998.
- [12] S. Le Gac, C. Rolando, 'Les microsystèmes en chimie', l'actualité chimique, pp.21-32, février 2002
- [13] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, 'Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing', Sensors and actuators, vol. B1, pp. 244-248, 1990.
- [14] S. C. Jacobson, A. W. Moore, J. M. Ramsey, 'Fused quartz substrates for microchip electrophoresis', Analytical chemistry, vol. 67, pp. 2059-2063, 1995.
- [15] F. E. Regnier, B. He, S. Lin, J. Busse, 'Chromatography and electrophoresis on chips : critical elements on future integrated, microfluidic analytical systems for life science', Trends in biotechnology, vol. 17, pp. 101-106, 1999.

- [16] Y. Liu, R. S. Foote, S. C. Jacobson, R. S. Ramsey, J. M. Ramsey, 'Electrophoretic separation of proteins on a microchip with noncovalent postcolumn labeling', *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 4608-4613, 2000.
- [17] M. Freemantle, 'Downsizing Chemistry : Chemical analysis and synthesis on microchips promise a variety of potential benefits', *Science/Technology*, Volume77, number 8, 1999.
- [18] Q. Kou, I. Yesilyurt, V. Studer, M. Belotti, E. Cambriel, Y. Chen, 'On-chip optical components and microfluidic systems', *Microelectronic Engineering* 73-74, pp.876-880, 2004.
- [19] A. Desai, Y. C. Tai, M. T. Davis, T. D. Lee, 'A MEMS electro spray nozzle for mass spectrometry', *International Conference on Solid State Sensors and Actuators (Transducers '97)*, pp. 927-930, May 1997.
- [20] N. Lion et al, 'Les microsystèmes en protéomique', *Electrophoresis*, 24, pp.3533-3562, 2003.
- [21] W. Lang, 'Silicon microstructuring technology', *Materials Science and Engineering*, R 17, no 1, pp 1-55, September 1996.
- [22] A. Albaugh, 'Mechanisms of Anodic Bonding of Silicon to Pyrex®', IEEE 1988.
- [23] J. Wei, H. Xie, M.L. Nai, C.K. Wong, L. C. Lee, 'Low temperature wafer anodic bonding', *J. Micromech. Microeng.* 13, 217-222, 2003.
- [24] K. Schjolberg - Henriksen, J. A. Plaza, J. M. Raft, J. Esteve, F. Campabadal, J. Santander, G. U. Jensen, A. Hanneborg 'Protection of MOS capacitors during anodic bonding', *J. Microchem. Microeng.*, 12, pp.361-367, 2002.
- [25] S. Schlautmann, H. Wensink, R. Schasfoort, M. Elwenspoek, A. van den Berg 'Powder-blasting technology as an alternative tool for microfabrication of capillary electrophoresis chips with integrated conductivity sensors', *J. Micromech. Microeng.* 11, pp.386-389, 2001.
- [26] www.micronit.com
- [27] G. Bar, L. Delineau, A. Häfele, M. Whangbo, 'Investigation of the stiffness change, the indentation force and the hydrophobic recovery of plasma-oxidized PDMS surfaces by tapping mode AFM', *Polymer* 42, pp 3527-3632, 2001.
- [28] M. Khoo, C. Liu, 'Micromagnetic Silicone Elastomer Membrane Actuator', *Sensors and Actuators A* 89, pp 259-266, 2001.
- [29] V. Namasivayam, R.H. Liu, B. Towe, P. Grodzinski, 'Design of a Self-Contained 3D Microvalve in PDMS', *Transducers'01, International Conference on Solid State Sensors and Actuators*, Munich, Germany, June 10-14, 2001.
- [30] K.Hoshino, I. Shimoyama, 'An Elastic ThinFilm Microlens Array with Pneumatic actuator', *MEMS 2001, Micro Electro Mecanical Systems*, Interlaken, Switzerland, January 21-25, pp 321-325, 2001.

- [31] R.H. Liu, H. Cheng, K.R. Luehrsen, D. Ganser, D. Weston, J. Blackwell, P. Grodzinski, 'Highly Parallel Integrated Microfluidic Biochannel Arrays', MEMS 2001, Micro Electro Mechanical Systems, Interlaken, Switzerland, January 21-25, pp.439-443, 2001.
- [32] J Cooper McDonald et al, 'Fabrication of microfluidics systems in PDMS', electrophoresis, 21, pp.27-40, 2000.
- [33] V. Senez et al, 'Développement de micro-capteurs pour la mesure du spectre d'impédance électrique de cellules biologiques', Journées Scientifiques Francophones, 2003.
- [34] V. Studer, A. Pepin, Y. Chen, A. Ajdari, 'Fabrication of microfluidic devices for AC electrokinetic fluid pumping', Microelectronic Engineering 61-62, pp.915-920, 2002.
- [35] H. Lorenz, M. Despont, N. Fahrni, N. Lablance, P. Renaud, P. Vettiger, 'A low cost negative resist for MEMS', J. Microchem. Microeng., 7, pp.121-124, 1997.
- [36] H. Lorenz, M. Laudon, P. Renaud, 'Mechanical characterization of a new high-aspect-ratio near UV-photoresist', Microelec. Engin., 41/42, pp.371-374, 1998.
- [37] E. H. Conradie, D. F. Moore, 'SU-8 thick photoresist processing as a functional material for MEMS applications', J. Micromech. Microeng., 12, 4, pp.368-374, 2002.
- [38] C.- H. Lin, G.-B. Lee, B.-W. Chang, G.-L. Chang, 'A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photoresist', J. Micromech. Microeng., 12, pp.590-597, 2002.
- [39] C.-T. Pan, H. Yang, S.-C. Shen, M.-C. Chou, H.-P. Chou, 'A low-temperature wafer bonding technique using patternable materials', J. Micromech. Microeng. 12, pp.611-615, 2002.
- [40] Y.-J. Chuang, F.-G. Tseng, J.-H. Cheng, W.-K. Lin, 'A novel fabrication method of embedded microchannels by using SU-8 thick-film photoresists', Sensors and Actuators A 103, pp.64-69, 2003.
- [41] F. E.H. Tay, J.A. van Kan, F. Watt, W.O. Choong, 'A novel micro-machining method for the fabrication of thick-film SU-8 embedded micro-channels', J. Micromech. Microeng. 11, pp.27-32, 2001.
- [42] V. Studer, A. Pépin, Y. Chen, 'Nanoembossing of thermoplastic polymers for microfluidic applications', Appl. Phys. Lett. 80, 3614, 2002.
- [43] H.Y. Kim, K.S. Kim, B.H. Kim, 'Micro/nano patterning characteristics in hot embossing process', AIP Conf. Proc. 712(1) 1470, 10 Jun 2004.
- [44] Y. Chen, A. Lebib, S. P. Li, D. Peyrade, M. Natali, A. Pépin, E. Cambriil, 'Nanoimprint and soft-lithography trilayer processes', Eur. Phys. J. AP 12, p.223, 2000.

- [45] W. K. Schomburg, J. Vollmer, B. Bustgens, J. Fahrenberg, H. Hein, W. Menz, 'Microfluidic components in LIGA technique', *J. Micromech. Microeng.*, 4, pp.186-191, 1994.
- [46] D. P. Pugmire, D. J. Ross, M. J. Tarlov, T. J. Johnson, G. W. Kramer, L. E. Locascio, E. A. Waddell, 'One-Step Laser Ablation and Surface Modification of Polymer Substrates for the Fabrication of Microfluidic Devices' *Analytical Chemistry* (99A), 2001.
- [47] C. L. Colyer, S. D. Mangru, D. J. Harrison, 'Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins', *Journal of Chromatography A*, vol. 781, pp. 271-276, 1997.
- [48] R. M. McCormick, R. J. Nelson, M. G. Alonso-Amigo, D. J. Benvegnu, H. H. Hooper, 'Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates', *Analytical chemistry*, vol. 69, pp. 2626-2630, 1997.
- [49] C. S. Effenhauser, G. J. M. Bruin, A. Paulus, M. Ehrat, 'Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices : analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips', *Analytical Chemistry*, vol. 69, pp. 3451-3457, 1997.
- [50] B. Zhang, H. Liu, B. L. Karger, F. Foret, 'Microfabricated devices for capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry', *Analytical Chemistry*, vol. 71, pp. 3258-3264, 1999.
- [51] <http://www.diagnoswiss.com/>
- [52] D. Josic, A. Buchacher, A. Jungbauer, 'Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion', *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, 752, pp.191-205, 2001.
- [53] F. Svec, J.M.J. Frechet, 'Rigid Monolithic Porous Polymers: An Inexpensive, Efficient, and Versatile Alternative to Beads for the Design of Materials for Numerous Applications' *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 38, pp.34-48, 1999.
- [54] S. Le Gac, 'Développement de systèmes microfluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM', Thèse de doctorat de l'Université de Lille1, 2004.
- [55] R.D. Oleschuk, L.L. Shultz-Lockyear, Y. Ning, D.J. Harrison, 'Trapping of bead-based reagents within microfluidic systems. On-chip solid-phase extraction and electrochromatography', *Analytical Chemistry*, 72, pp.585-590, 2000.
- [56] B. He, F. Regnier, 'Microfabricated liquid chromatography columns based on collocated monolith support structures', *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17, pp.925-932, 1998.
- [57] B. Slentz, N. Penner, F. Regnier, 'Protein proteolysis and the multi-dimensional electrochromatographic separation of histidine – containing peptide fragments on a chip', *Journal of Chromatography A*, 984, pp.97-107, 2003.

- [58] T.B. Jones, 'On the relationship of dielectrophoresis and electrowetting', *Langmuir*, 18, pp.4437-4443, 2002.
- [59] J. Carlier, F. Caron, C.Druon, P.Tabourier, J.C. Camart, 'Transport diélectrophorétique de microgouttes pour un lab-on-chip à vocation biologique', *Congrès SHF Microfluidique - Toulouse*, pp.275-282, décembre 2002.
- [60] J.Lee, H.Moon, J.Fowler, T.Schoellhammer, C.J.Kim, 'Electrowetting and electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling', *Sensors and Actuators A*, vol.A95, pp.259-268, 2002.
- [61] N.T. Nguyen, A. Meng, J. Black, R. White, 'Integrated flow sensor for in-situ measurement and control of acoustic streaming in flexural-plate-wave micropumps', *Sensors and Actuators A*, 79, pp.115-121, 2000.
- [62] A. Renaudin, V. Zhang, P. Tabourier, J.C. Camart, C. Druon, 'Droplet manipulation using SAW actuation for integrated microfluidics', *μTAS 2004 Malmö Sweden*, pp.26-30 september 2004.
- [63] A. Manz, C. Effenhauser, N. Burggraf, J. Harrison, K. Seiler, K. Fluri, 'Electroosmotic pumping and electrophoretic separations for miniaturized chemical analysis systems', *J. Micromech. Microeng.*, 4, pp.257-265, 1994.
- [64] M. Koch, N. Harris, A.G.R. Evans, N.M. White, A. Brunnschweiler, 'A novel micromachined pump based on thick-film piezoelectric actuation', *Sensors and Actuators A* 70, pp.98-103, 1998.
- [65] C. Malhaire, A. Didiergeorges, M. Bouchardy, D. Barbier, 'Mechanical characterization and reliability study of bistable SiO₂/Si membranes for microfluidic applications', *Sensors and Actuators A*, 99, pp.216-219, 2002.
- [66] C. Zinck, D. Pinceau, E. Defaÿ, E. Delevoye, D. Barbier 'Development and characterization of membranes actuated by a PZT thin film for MEMS applications', *Sensors and Actuators A* 115, pp.483-48, 2004.
- [67] J.H.Tsai, L.Lin, 'A thermal bubble actuated micro nozzle-diffuser pump', *MEMS'01*, pp.409-412, 2001
- [68] P.Tabeling, 'Introduction à la microfluidique', Belin, collection Echelles, 2003.
- [69] R.S. Ramsey, J.M. Ramsey, 'Generating Electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping', *Analytical Chemistry*, 69, 1174-1178, 1997.
- [70] X. Wang, A. Desai, Y. Tai, et al., 'Polymer-based electrospray chips for mass spectrometry', pp.523-528, 1999.
- [71] G.A. Schultz, T.N. Corso, et al., 'A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry', *Analytical Chemistry*, 72, 17, pp.4058-4063, 2000.

[72] <http://www.advion.com/R&D.html>

[73] C.-H. Yuan, J. Shiea, 'Sequential Electrospray Analysis Using Sharp-Tip Channels Fabricated on a Plastic Chip', *Analytical Chemistry*, Vol.73, N°6, pp.1080-1083, 2001.

[74] J. Kameoka, R. Orth, B. Ilic, D. Czaplowski, T. Wachs, H.G. Craighead 'An Electrospray Ionization Source for Integration with microfluidics', *Analytical Chemistry*, Vol.74, N°22, pp.5897-5901, 2002.

[75] V. Gobry, J. van Oostrum, M. Martinelli, T.Rohner, J.S. Rossier, H.H.Girault, 'Microfabricated polymer injector for direct mass spectrometry coupling', *Proteomics*, 2, pp.405-412, 2002.

[76] L. Licklider, X.Q. Wang, A. Desai, Y.C.Tai, T.D. Lee, 'A micromachined chip-based electrospray source for mass spectrometry', *Analytical Chemistry*, 72, pp.367-375, 2000.

[77] J.S. Kim, D.R. Knapp, 'Miniaturized multichannel electrospray ionization emitters on poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices', *Electrophoresis*, 22, pp.3993-3999, 2001.

[78] M. Svedberg, M. Veszelei, J. Axelsson, M. Vangbo, F. Nikolajeff, 'Fabrication of open PDMS electrospray tips integrated with microchannels using replication from a neckel master', *Micro Total Analysis Systems 2003*, Squaw valley, California, USA, 5-9 Oct 2003.

[79] <http://www.gyros.com>

[80] M. J. Felton, *Anal. Chem.*, 75, 302A-306A, 2003.

[81] <http://www.chem.agilent.com>

[82] K. Killeen, H. Yin, D. Sobek, R. Brennen and T. van de Goor 'Chip-lc/ms: hplc-ms using polymer microfluidics', *Micro Total Analysis Systems 2003*, Squaw valley, California, USA, 5-9 Oct 2003.

[83] H. Yin, K. Killeen, D. Sobek, R. Brennen, T. van de Goor, 'Chip-LC/MS: An integrated Solution for Complex Proteomics Sample Analyses', p.2247, *Ann. Conf. of the American Society for Mass Spectrometry*, Montreal, Canada, 2003.

[84] <http://www.calipertech.com/>

[85] S. Xie, F. Svec, J.M.J. Frechet, 'Design of reactive porous polymer supports for high throughput bioreactors: poly(2-vinyl-4,4- dimethylazlactone-co-acrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monoliths', *Biotechnology and Bioengineering*, 62, pp.30-35, 1999

[86] D. Throckmorton, T. Shepodd, A. Singh, 'Electrochromatography in microchips: reversed-phase separation of peptides and amino acids using photopatterned rigid polymer monoliths', *Analytical Chemistry*, 74, pp.784-789, 2002.

[87] Q.C. Wang, F. Svec, J.M.J. Frechet, 'Reversed-phase chromatography of small molecules and peptides on a continuous rod of macroporous poly(styrene-co-divinylbenzene)', *Journal of Chromatography, A*, 669, pp.230-235, 1994.

Chapitre 2

Choix d'une filière technologique

Le choix d'une technologie est déterminé par de multiples contraintes. Dans le cas présent, où l'objectif est la réalisation d'un microsystème dédié à l'analyse de protéines par ESI/MS, se cumulent les contraintes liées à la chimie, à l'analyse et à la microtechnologie.

Au sein d'un tel microsystème, l'interaction entre protéines et parois des microcanaux est accentuée par la miniaturisation de l'architecture qui accroît le rapport surface sur volume. Il est donc essentiel de respecter des conditions de bio-compatibilité : les protéines ne doivent pas adhérer sur ce matériau. De plus, tous les matériaux choisis doivent être parfaitement neutres vis-à-vis des liquides biologiques transportés qui comportent pour les besoins de l'analyse, des ajouts (acides, acétonitrile, etc...) souvent très agressifs. Dans le cas contraire, la détérioration de ces matériaux entraîne un 'relarguage moléculaire'. Son existence se traduit par une signature parasite dans la gamme de masses examinées qui peut aller du simple bruit à la présence fortement préjudiciable de raies polluantes. Cet effet de détérioration existe aussi au niveau de l'électrospray : l'effet de pointe recherché implique la création localisée de champs électriques intenses susceptibles de dégrader la structure.

Le choix du matériau doit également être effectué en tenant compte des étapes technologiques de fabrication du microsystème. Dans ce cas, il faut non seulement fabriquer l'objet mais aussi assurer sa fonctionnalisation biochimique c'est-à-dire faire en sorte que des greffages chimiques puissent s'opérer. Cette double exigence implique la convergence, dans un processus commun, des étapes de fabrication (issues de la microtechnologie) et de fonctionnalisation biochimiques. Les premières ont lieu en général à des températures dépassant 300°C alors que les secondes correspondent à des processus basses températures. Cette différence devient critique pour les opérations de biochimie dont le résultat serait annihilé par des traitements thermiques ultérieurs même modérés.

Nous examinons dans ces conditions, les orientations technologiques que nous avons prises afin de réaliser des microsystèmes considérés comme prototypes. A ce stade de l'étude, la possibilité de faire un prototypage rapide nous semble être un atout dans la perspective de modifications et d'évolutions de nos architectures.

I) Convergence de la microtechnologie et de la biochimie

La réalisation du microsystème fait l'objet d'une collaboration étroite de notre équipe avec des équipes spécialisées dans la chimie organique et macromoléculaire. Le développement des structures monolithiques repose sur le savoir-faire des équipes de Christian Rolando et Xavier Coqueret du Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (LCOM) de l'université de Lille 1. Cependant, l'intégration de ces polymères entraîne un report de contraintes (contraintes matériaux mais aussi contraintes physiques) sur la fabrication du microsystème.

A) Les contraintes dans un contexte pluri-disciplinaire

1) Contraintes imposées aux matériaux

a) Compatibilité avec les analyses LC-MS de protéines

Cette 'compatibilité' avec la méthode d'analyse nécessite l'innocuité des matériaux utilisés pour l'analyse des liquides biologiques par spectrométrie de masse ESI. Ce critère est le premier à devoir être pris en compte dans une démarche de réalisation technologique.

Le microsystème utilisé pour l'analyse d'un liquide biologique ne doit pas altérer celui-ci tant en quantité qu'en qualité. Rappelons que la spectrométrie de masse est une méthode de détection très sensible. Celle-ci peut être confrontée à des problèmes tels que le relargage de contaminants des matériaux utilisés dans le liquide sous investigation (signaux parasites qui augmentent le bruit de fond et rendent l'interprétation difficile) ou l'adsorption des molécules biologiques à ces matériaux (fixation des analytes d'intérêts sur les matériaux qui entraîne une chute de sensibilité).

Dans le cadre du couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse ESI, les contraintes matériaux sont lourdes. Les solvants utilisés pour les séparations chromatographiques sont agressifs. Les matériaux utilisés doivent donc être résistants à l'acétone, à l'alcool, à l'acétonitrile, à l'acide formique et au méthanol (autant d'éléments utilisés en chromatographie de phase inverse). Le silicium, la silice ou encore le Pyrex® sont résistants à ces différents solvants, mais la technologie d'usinage qu'ils nécessitent est moins bien adaptée à un prototypage rapide que ne l'est la résine photolithographiable.

b) Contraintes imposées par l'intégration des structures monolithiques

La connaissance de la technologie choisie pour la fonctionnalisation est nécessaire à l'orientation technologique de fabrication du microsystème. Elle permet de prendre en considération, de façon plus détaillée, les contraintes imposées par la fabrication des structures monolithiques mais aussi par leur intégration.

Description du monolithe :

Le monolithe est formé par polymérisation radicalaire par voie thermique (chauffage du mélange réactionnel) ou par voie photochimique (irradiation UV du mélange réactionnel). Le mélange réactionnel utilisé se compose de monomères, d'un solvant inerte (ou porogène) et d'un amorceur photochimique.

Les monomères se partagent en deux groupes : les monomères dits 'fonctionnels' qui portent la fonctionnalité ou les groupements réactionnels du support final, et les monomères dits 'réticulants', qui assurent la formation du réseau macromoléculaire. Ils appartiennent à différentes grandes familles : celle des acrylates, des éthers de vinyl et des composés vinyliques, notamment.

Le porogène correspond à un solvant ou à un mélange de solvants inertes (alcools, hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques, cétones, éthers, par exemple). Son choix repose sur des critères de solubilité des monomères, des chaînes de polymère en formation et du réseau final. En effet, le processus de polymérisation est influencé, entre autres, par la nature du porogène qui gouverne les propriétés du monolithe final (morphologie, porosité...).

L'amorceur photochimique utilisé pour la synthèse de monolithes est, en général, du peroxyde. La nature de l'amorceur radicalaire est également un facteur qui influence la distribution des pores au sein du matériau final de par sa réactivité. Ces différents constituants sont introduits dans le mélange réactionnel avec des proportions contrôlées. Leur quantité est ajustée en fonction des conditions de polymérisation et des propriétés attendues du matériau monolithique : l'amorceur représente de 0,2 à 5 % en masse de la quantité totale de monomère introduite et le volume de porogène correspond au volume poreux total final du matériau monolithique, il est donc choisi en fonction de la porosité finale souhaitée. Le volume de monomère varie de 10 à 50 % du volume réactionnel total, avec une préférence pour la gamme 20 à 40 % [1-7].

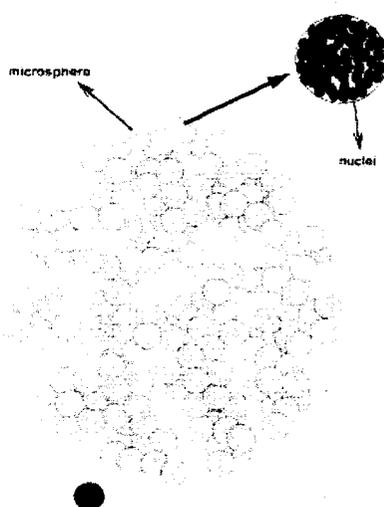


Figure 1 : Mécanisme de formation de la structure poreuse d'un monolithe : les chaînes macromoléculaires formées précipitent pour donner des nuclei qui ne s'inter-pénètrent pas. Les nuclei s'associent alors en agglomérats qui sont reliés entre eux par des chaînes de polymère [10].

Fabrication du monolithe :

Dans un premier temps, le mélange réactionnel est dégazé par bullage d'azote (ou autre gaz inerte) afin d'éliminer l'oxygène présent en solution. Avant de commencer la réaction de polymérisation, il est introduit dans un tube scellé à ses deux extrémités, généralement une longueur de capillaire de silice fondue (**figure 1**). Le tube est soit chauffé (50 à 90°C) soit placé sous irradiation UV pendant une durée de 3 à 24 heures selon trois critères :

- la composition du mélange réactionnel,
- la puissance de la lampe,
- et principalement l'épaisseur à polymériser sous atmosphère contrôlée d'argon ou d'azote.

Une fois la réaction terminée, le monolithe est lavé abondamment à l'acétonitrile ou au méthanol. Cette opération permet d'éliminer toute trace de mélange réactionnel (porogène, amorceur, monomères n'ayant pas réagi éventuellement) et de dissoudre les éventuelles particules de polymère. Elle peut être réalisée de façon séquentielle en utilisant différents solvants, en particulier si le milieu contient initialement des particules de polymère soluble. Le matériau est lavé à l'aide de solvants organiques usuels : méthanol, acétonitrile, tétrahydrofurane (THF), acétone ou toluène par exemple.

Une étape ultérieure de fonctionnalisation du support monolithique est possible pour l'introduction de groupements fonctionnels ou pour le greffage de molécules. Dans certains cas, un ancrage covalent du monolithe sur les parois internes du tube est nécessaire ; ces parois subissent alors un traitement chimique ou silanisation préalable à l'injection du mélange réactionnel favorisant l'introduction des groupements réactifs vis-à-vis de la polymérisation (acrylate, vinyle.....) [8-10].

La réalisation des phases monolithiques au sein d'un microsystème entraîne des contraintes au niveau de la résistance chimique des différents matériaux puisqu'ils ne doivent pas être attaqués par les solutions nécessaires à la préparation du monolithe.

2) Contraintes physiques imposées à la fabrication du microsystème

L'objectif est de réaliser un couplage efficace et intégré entre des microcanaux pouvant intégrer des structures monolithiques et une source d'électronébulisation.

a) Contraintes imposées aux microcanaux

Le couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse ESI implique une architecture en canaux fermés étanches sous haute pression (plusieurs dizaines de bars). En effet, cette pression est engendrée, lors de l'étape de lavage du monolithe, par circulation de solvants, au travers de la charge que constitue le monolithe. Il est donc nécessaire que la force de collage des différents matériaux entre eux soit suffisante pour obtenir cette étanchéité.

Afin de fabriquer un réseau microfluidique, des structures tridimensionnelles à rapport d'aspect entre longueur et hauteur supérieur à 1000 doivent être réalisées, et ce sur des longueurs suffisantes en fonction de l'application envisagée.

L'intégration de modules fonctionnalisés chimiquement nécessite la transparence de la face inférieure ou supérieure des microcanaux afin de réaliser les opérations de photochimie nécessaires à la polymérisation *in situ* des monolithes sous rayonnement UV [11 -12].

b) Contraintes imposées à la fabrication de la source nanoESI

Concernant l'ionisation ESI, le liquide peut être alimenté électriquement au niveau de la source par l'intermédiaire du substrat. Ce dernier est donc le siège d'une haute tension qui

entraîne un champ électrique élevé sur des faibles dimensions : plusieurs kilovolts par centimètre.

La réalisation des sources impose également une contrainte géométrique forte puisqu'il s'agit de réaliser un effet de pointe (l'entrée du spectromètre constitue le plan de masse). Pour réaliser un nanospray, la source, en forme de pointe, doit avoir une extrémité (dégagée) d'un diamètre de l'ordre de la dizaine de microns et une longueur de plusieurs centaines de microns.

B) Sélection des matériaux

1) Test de compatibilité

Des tests sont réalisés afin de sélectionner les matériaux appropriés aux applications visées. Les matériaux suivants sont testés : Si, SiO₂ déposé par PECVD, SiO₂ obtenu par oxydation thermique humide du silicium, Si₃N₄, Pyrex®, or, SU-8, PDMS et parylène. En mode ESI, les substances biologiques utilisées pour les tests sont :

- 4 marqueurs neuromédiateurs type amino acides (ex : Histamine),
- 2 neuromédiateurs peptidiques (ex : Neurotensine),
- 2 marqueurs lipidiques (ex : Anandamide),
- 2 protéines HGH et BSA et les peptides issus de la digestion trypsique de ces protéines sont également utilisés.

Les tests en statique consistent à mettre en solution les substances biologiques à très faible concentration (0,1 ou 5 ng.µl⁻¹ pour les neuromédiateurs et 4 ou 400 fmol.µl⁻¹ pour les protéines et peptides tryptiques), dans différents solvants appropriés aux analyses visées. Une petite quantité de la solution (15 µl pour l'analyse ESI et 8 µl pour l'analyse MALDI) est déposée sur le substrat et est laissée en contact pendant 15 à 20 minutes, ensuite 1 à 5 µl sont prélevés pour analyse MS.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de relargage significatif des différents matériaux testés, aussi bien en analyse ESI que MALDI :

- neuromédiateurs peptidiques : aucune adsorption n'est observée avec la majorité des matériaux, mis à part avec l'or et le PDMS (rendement de 0-40%, matériau comparé au témoin),

- amino-acides : une légère adsorption est constatée avec tous les matériaux (rendement 50-90%) et une adsorption forte avec le Si, le PDMS ainsi que le parylène (rendement 0-40%),
- lipides : une très forte adsorption est observée avec tous les matériaux (rendement 0-30%),
- protéines et peptides provenant des digests tryptiques : la SU-8 donne les meilleurs résultats. Les spectres de masse obtenus sont de meilleure qualité que ceux obtenus avec les témoins pour les protéines et peptides, aussi bien en solution acide que basique.

En conclusion, ces tests de compatibilité nous permettent de retenir essentiellement trois matériaux : le Si, le Pyrex® et la SU-8 [13].

2) Choix des matériaux

Le choix de la filière technologique employée repose sur les trois matériaux précédemment définis. Notre intérêt s'est porté en premier lieu sur le silicium, communément utilisé en microtechnologie, et compatible avec nos applications.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la SU-8. Dans ce cas, il est nécessaire de réaliser des microsystèmes en SU-8 en la déposant sur un substrat solide. Le choix d'un substrat Pyrex® (**Corning, Pyrex® 7740**) est intéressant pour certaines applications puisqu'il est un bon isolant électrique et thermique. De plus, ce matériau est transparent autorisant le suivi du déplacement de liquide (en première caractérisation visuelle lors de nos tests) ainsi que la réalisation des étapes de photochimie intervenant dans la fabrication d'un monolithe.

La SU-8 est une résine photolithographiable négative rendant possible un prototypage rapide. Cette résine, transparente après polymérisation, est une résine structurale : elle permet l'obtention de motifs avec de grands rapports d'aspect (supérieurs à 10) pour la structuration tridimensionnelle d'un réseau microfluidique [14] dont les dimensions caractéristiques varient de la dizaine à la centaine de microns grâce au large éventail des résines SU-8 commercialisées [15] :

- la SU-8 2002 (viscosité d'environ 7,5 cSt) se dépose en couche de 2 à 3 μm ,
- la SU-8 2010 (viscosité d'environ 380 cSt) en couche de 10 à 20 μm ,

- la SU-8 2035 (viscosité d'environ 7000 cSt) en couche de 55 à 110 μm ,
- et la SU-8 2075 (viscosité d'environ 22000 cSt) se dépose en couche de 75 à 225 μm [16].

Cette résine repose sur une technologie relativement basse température (<100°C). Elle présente la particularité d'être isolante électriquement (résistivité de 10^{14} Ohm.cm) et thermiquement ($0,2 \text{ W.m}^{-1}\text{K}^{-1}$ contre $1,31 \text{ W.cm}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour le silicium) [17,18]. Les principales caractéristiques de la SU-8 sont présentées dans le **tableau 1**.

Caractéristiques	Valeurs
Module d'élasticité (Module d'Young)	4.02 GPa
Contrainte mécanique	19 - 16 Mpa
Température de dégradation de la résine polymérisée	Environ 400°C
Coefficient d'expansion thermique	52.0 ppm.K ⁻¹
Conductivité thermique	0.2 W.m ⁻¹ K ⁻¹
Résistivité électrique	10^{14} Ohm.cm

Tableau 1 : Principales caractéristiques de la SU-8.

II) Les opérations technologiques standard

Avant de présenter les protocoles développés dans le cadre de ce travail de thèse, nous rappelons les principales étapes technologiques standard [19-21] utilisées pour la réalisation des microsystèmes.

A) Photolithographie

La photolithographie est une technique permettant de transférer des motifs de taille micronique d'un masque sur une résine. Cette opération est basée sur l'utilisation d'une résine photosensible qui est un composé organique (polymère thermoplastique) dont la solubilité est affectée par le rayonnement UV. Il existe des résines positives et des résines négatives. Pour une résine dite positive, les zones insolées (à travers les parties transparentes du masque) sont éliminées à la révélation (**figure 2**). Les résines dites négatives sont au contraire polymérisées sous rayonnement UV. La taille minimale des motifs obtenus est d'environ 1 μm

dans le cas d'une lithographie réalisée avec une épaisseur de résine de l'ordre du micromètre. Le masque est une plaque de quartz recouverte d'une couche de chrome, dans laquelle sont gravés les motifs. Le principe de la photolithographie s'apparente à la photographie, puisqu'il comporte une étape d'insolation, de révélation puis de développement.

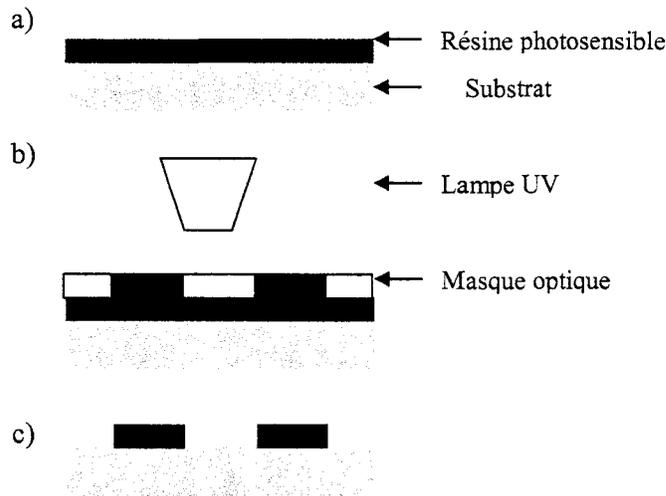


Figure 2 : Schéma de principe de la photolithographie (dans le cas d'une résine positive) : a) dépôt de la résine sur le substrat par enduction ; b) insolation locale de la résine sous UV au travers d'un masque optique ; c) révélation (la résine insolée se dissout dans le développeur).

Étalement d'une résine photosensible positive

Une résine photosensible positive est étalée sur le substrat avec une tournette, qui met l'échantillon en rotation rapide (à l'IEMN **Karl Suss RC5 et RC8**). Il suffit d'y déposer quelques mL de résine avec une pipette pour obtenir une couche fine et d'épaisseur uniforme. L'épaisseur de résine déposée dépend de la vitesse (souvent exprimée en rpm : *revolution per minute*), de l'accélération (souvent exprimée en rpm.s⁻¹ : *revolution per minute / s*), de la durée de la rotation, et de la viscosité de la résine utilisée. Après étalement, la résine est séchée pendant quelques minutes sur une plaque chauffante.

Insolation de la résine à travers le masque

L'échantillon recouvert de résine est installé dans la machine à insoler. Il est positionné, avec précision par rapport au masque, sous le microscope de la machine. Il s'agit à l'IEMN d'aligneurs **Karl Suss MA750 et MA6/BA6 Suss MicroTec** (alignement de masque et exposition en proximité, en contact doux, dur et chambre à vide ; alignement submicronique et exposition avec résines minces ou épaisses) présenté à la **figure 3**. Lorsque le positionnement est correct, l'échantillon est mis en contact avec le masque par aspiration

puis est insolé. Le temps d'exposition dépend de l'épaisseur de résine et de la puissance de la lampe UV à vapeur de mercure ($\lambda = 350 - 500 \text{ nm}$).

Développement de la résine insolée

La dernière étape de photolithographie consiste à dissoudre les zones de résine exposées à la lumière UV dans le développeur.

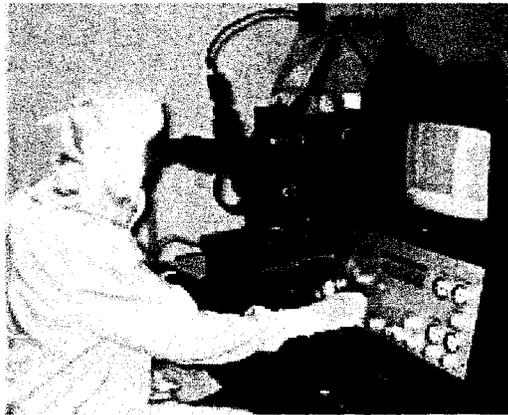


Figure 3 : Photographie de l'aligneur MA6/BA6 Suss MicroTec : alignement des substrats par rapport au masque optique et insolation en UV250 et en UV400.

B) Métallisation

La métallisation se réalise par évaporation ou par pulvérisation. Le dépôt par évaporation est un dépôt anisotrope (évaporation du métal dans la direction verticale) alors que le dépôt par pulvérisation est un dépôt plutôt isotrope (éjection d'atomes d'une cible).

1) Dépôt par évaporation

Il s'agit de l'évaporation d'un métal chauffé de façon à exposer le substrat au flux de vapeurs métalliques. Cette technique consiste à provoquer l'évaporation d'un métal dans le vide en le chauffant jusqu'à sa température d'ébullition. Les atomes métalliques se propagent alors en ligne droite et se fixent sur la surface froide de l'objet à traiter.

Plusieurs méthodes permettent de réchauffer le métal à évaporer :

- le creuset : récipient contenant le métal et réchauffé par une résistance électrique. Le substrat à traiter est placé au-dessus de ce creuset.

- le canon à électrons : un échantillon du métal à évaporer est soumis à un intense faisceau d'électrons qui le réchauffe jusqu'à l'évaporation. Le substrat à traiter est également placé au-dessus.

- le filament de tungstène : déposition de quelques cavaliers constitués de métal à évaporer sur de robustes filaments en tungstène. Ceux-ci sont chauffés par un puissant courant électrique qui les traverse. Quand la température de fusion des cavaliers est atteinte, le métal "mouille" le filament et se répand sur sa surface avant de s'évaporer. Le tungstène est choisi pour constituer ces filaments, car ce corps a une haute température de fusion.

Dans le cas des bâtis utilisés à l'IEMN, un canon à électrons est utilisé (**figure 4**). Il s'agit de bâtis d'évaporation par canons à électrons 6 creusets. Ces bâtis sont équipés de canons (source **Commonwealth** et **Iontech** 3 cm) qui permettent, sous pression partielle d'argon et à très faible énergie, un 'prénettoyage' des substrats avant dépôt.

Cette technique de dépôt est utilisée préférentiellement dans le cas d'un *lift-off* (technique détaillée par la suite). En effet, dans ce cas, le dépôt n'est pas continu autour des motifs, ce qui facilite l'infiltration de l'acétone sous les films métalliques à décoller.

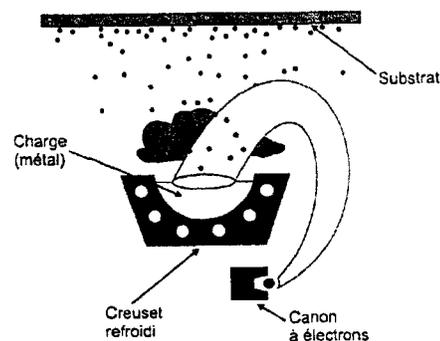


Figure 4 : Schéma de principe de la métallisation par évaporation.

2) Dépôt par pulvérisation cathodique

L'utilisation de la pulvérisation cathodique [22,23] comme technique de dépôt est couramment répandue. Cette méthode, en comparaison avec l'évaporation, permet de déposer des couches plus denses et d'obtenir une meilleure adhérence de la couche sur le substrat.

Son processus se définit en deux phases (**figure 5**) :

- l'éjection d'atomes superficiels d'une cible du matériau à déposer (cathode), par des atomes ionisés d'un gaz (en général neutre),
- et le transfert des ces atomes éjectés sur un substrat (anode) que l'on désire recouvrir d'une couche mince.

Ce processus se déroule toujours dans une chambre à vide.

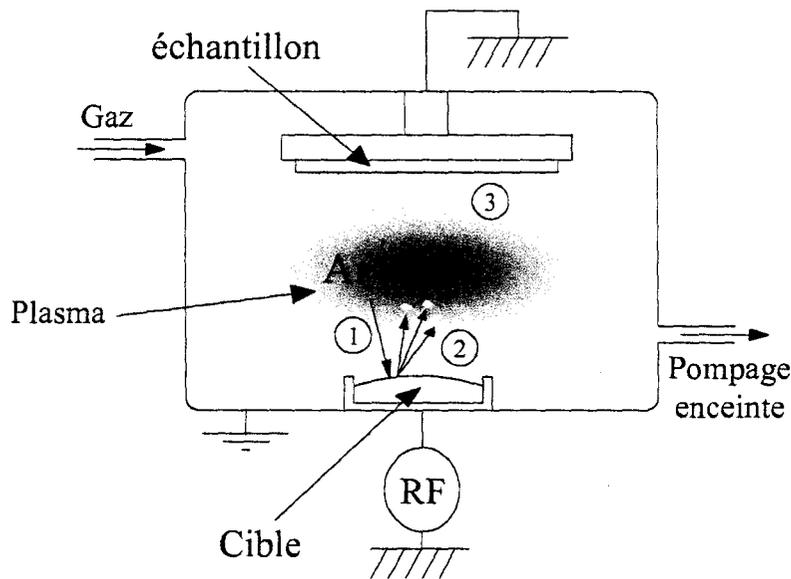


Figure 5 : Schéma de principe de la métallisation par pulvérisation cathodique qui comprend deux étapes fondamentales : l'éjection d'atomes de la cible et leur transfert vers le substrat.

La pulvérisation RadioFréquence (RF) est utilisée pour déposer des couches conductrices, semi-conductrices et isolantes. Une tension négative est appliquée alternativement à la cathode et à l'anode. A la fréquence utilisée (13,56 MHz), les ions, au regard de leur masse, ne peuvent pas suivre les variations temporelles du potentiel comparativement aux électrons. Le couplage étant capacitif, une auto-polarisation négative de la cible se produit pour équilibrer les courants ioniques et électroniques de façon à obtenir un courant moyen total nul. Les caractéristiques de tels dépôts sont une vitesse de déposition lente (dans le cadre de notre utilisation, la vitesse de déposition du nickel est de $50 \text{ \AA} \cdot \text{min}^{-1}$) et une température peu élevée durant le dépôt.

La pulvérisation cathodique est une méthode douce pour la déposition, à la surface de l'échantillon, d'un grand nombre de matériaux tels que le chrome, l'argent, le cuivre, le

platine, le nickel, le tungstène, l'oxyde de silicium. Pour réaliser un dépôt métallique, à température ambiante et sous un vide poussé, l'échantillon est placé dans une enceinte sous vide en face d'une cible du matériau à déposer. L'argon est introduit dans l'enceinte à une pression de 10^{-8} mBar et une excitation haute fréquence est appliquée sur la cible. Un plasma (mélange globalement neutre d'ions argon et d'électrons) est ainsi créé au voisinage de la cible. Celle-ci se trouve alors bombardée par les électrons et les ions plasma. Comme la mobilité des électrons est supérieure à celle des ions, un plus grand nombre d'électrons arrivent sur la cible et celle-ci s'autopolarise négativement pour repousser les électrons excédentaires. Les ions argon sont accélérés par le champ électrique ainsi créé et transfèrent leur quantité de mouvement aux atomes de la cible qui s'arrachent à celle-ci. Ces atomes se déposent sur l'échantillon placé en regard de la cible. L'IEMN dispose d'un bâti de pulvérisation cathodique **Plassys MP450S** (figure 6).



Figure 6 : Bâti de métallisation par pulvérisation cathodique Plassys MP450S (Pulvérisation magnétron ; il comprend un sas d'introduction de l'échantillon, un porte-substrat tournant, 3 cathodes 4" + 1 cathode 2").

C) Opérations de gravure

Il existe des gravures qualifiées d'humide et des gravures qualifiées de sèche. Cette distinction est liée au procédé d'attaque du matériau. L'attaque humide est un procédé chimique qui retire des atomes à la surface du matériau. Elle se fait donc dans un liquide, d'où le nom d'attaque humide. A contrario, l'attaque peut être physique, comme en RIE (*Reactive Ion Etching*) ou PE (*Plasma Etching*). Elle est alors engendrée par des chocs de particules sur la surface à traiter. Cette attaque est réalisée sous ultravide d'où le nom d'attaque sèche.

L'attaque sèche privilégie des directions particulières de gravure (elle est anisotrope) alors que l'attaque humide se fait dans toutes les directions (elle est isotrope) (**figure 7**). Cependant, dans le cas d'éléments constitués de plans cristallins, le résultat des attaques humides peut être anisotrope.

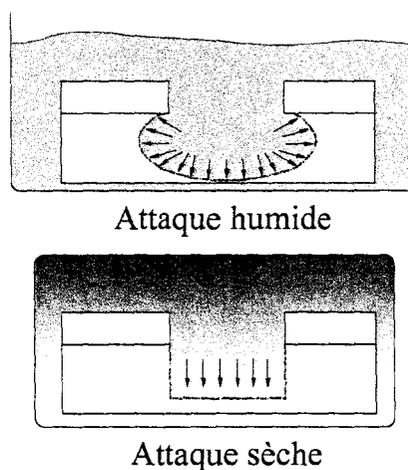


Figure 7 : Distinction entre gravure humide (isotrope) et gravure sèche (anisotrope).

1) Gravure chimique humide

a) Gravure chimique des métaux

Les motifs métalliques sont éventuellement réalisés par gravure. La résine positive n'est pas insolée au niveau des motifs et permet de protéger le métal localement. Les étapes de fabrication des motifs métalliques sont alors les suivantes (**figure 8**) :

- dépôt d'un film métallique sur l'échantillon par pulvérisation cathodique,
- lithographie en utilisant un masque négatif,
- attaque par voie humide des zones métalliques découvertes grâce à l'acide ou à un mélange adéquat.

Les métaux gravés, dans le cadre de nos travaux, sont le nickel (gravé par l'acide nitrique dilué $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}$ (1: 5) pour éviter le décollement de la résine) et l'or (gravé par une solution d'iodure de potassium) utilisé pour masquer le Pyrex® lors de son attaque.

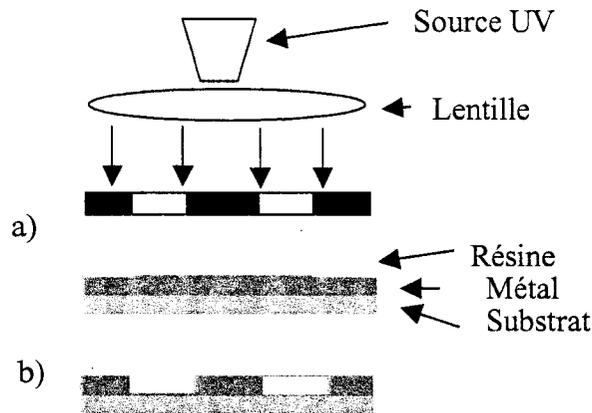


Figure 8 : Réalisation d'un motif métallique par gravure chimique ; a) réalisation du masque en résine par photolithographie ; b) gravure du métal.

b) Gravure du silicium

La gravure chimique humide anisotrope du silicium se fait classiquement grâce à des solutions de KOH ou TMAH [24]. Les caractéristiques des états de surface et de la vitesse de gravure varient en fonction de la concentration et de la température de ces bains, maintenues constantes par bain marie et condensation des vapeurs. Des solutions entre 20 et 25 % en concentration massique sont utilisées. Elles permettent d'obtenir des vitesses de gravure du silicium variant entre $0,5$ et $1,5 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ pour des températures situées entre 70 et 90°C . Les matériaux de masquage les plus utilisés sont du nitrure de silicium Si_3N_4 ou de l'oxyde de silicium SiO_2 . Cependant, les vitesses de gravure du SiO_2 sont plus élevées dans le KOH (quelques nanomètres par seconde) que dans le TMAH (quelques Angströms / seconde). Ces solutions sont utilisées pour usiner le silicium en volume, révélant en cours de gravure des plans cristallographiques spécifiques de ce dernier.

La gravure humide du Silicium nécessite la réalisation d'un masque en SiO_2 . Le dépôt d'une couche de SiO_2 (épaisseur : $1,3\mu\text{m}$) est réalisé par oxydation thermique humide, il est ensuite attaqué localement par l'acide fluorhydrique (HF) au travers d'un masque en résine (épaisseur : $1,2 \mu\text{m}$) réalisé par photolithographie. Le silicium est ensuite gravé par l'hydroxyde de potassium (KOH) porté à 80°C (vitesse d'attaque d'environ $1 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) à travers le masque de SiO_2 . L'ensemble des étapes est résumé sur la **figure 9**.

Oxydation thermique humide du silicium :

La croissance de l'oxyde de silicium à la surface du silicium mono-cristallin ou polysilicium est obtenue à haute température (entre 900°C et 1200°C) sous flux de vapeur d'eau. L'oxydation est dite humide.



La vitesse de croissance de l'oxyde est fonction de la température, du flux de vapeur d'eau, de l'orientation cristalline et du dopage du silicium. L'IEMN dispose d'un système de four **TEMPRESS** avec 3 tubes horizontaux (dont un dédié au procédé d'oxydation pyrogénique sèche ou humide, N₂/Ar, O₂, H₂ avec torche externe).

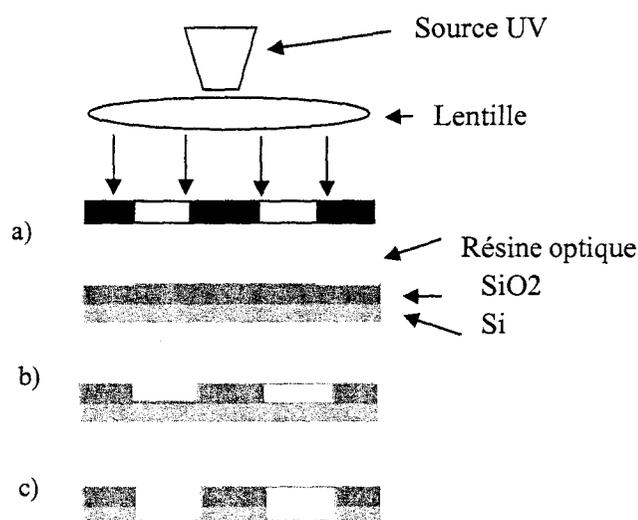


Figure 9 : *Processus de gravure du silicium ; a) réalisation du masque en résine par photolithographie ; b) réalisation du masque en oxyde de silicium ; c) gravure du silicium.*

La gravure humide au KOH a pour caractéristique d'être anisotrope. Les vitesses d'attaque ne sont pas les mêmes pour les directions cristallines (100) et (011). Un exemple de gravure du silicium 100 (**figure 10**) montre que les flancs gravés présentent un angle d'inclinaison d'environ 55° suivant la structure cristalline du silicium.

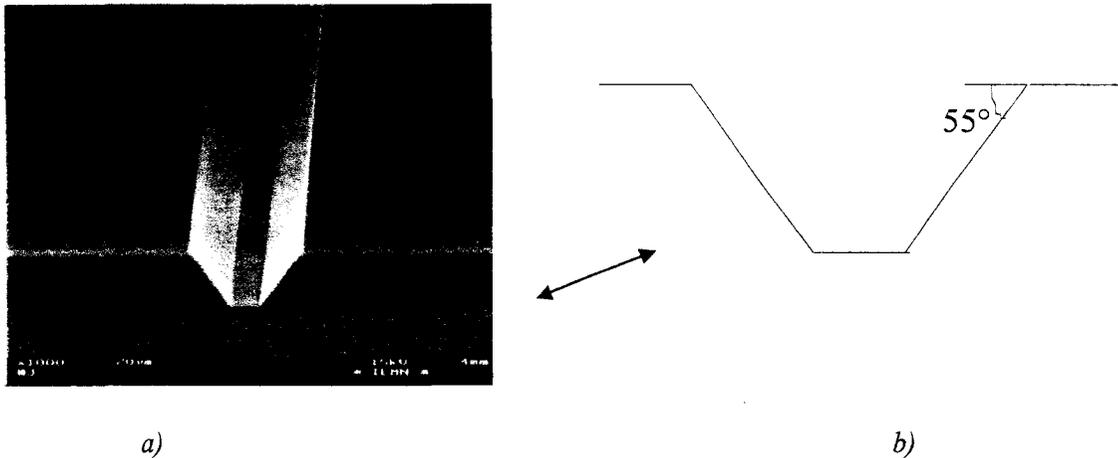


Figure 10 : Gravure humide du silicium a) Réalisation d'un microcanal connecté à son accès capillaire obtenu par gravure humide du silicium au KOH b) Angle d'inclinaison des flancs du microcanal.

c) Gravure du Pyrex®

La gravure du Pyrex® est réalisable par voie chimique humide ou sèche. Dans le cas d'une gravure humide, elle se fait difficilement. Un masque métallique réalisé sur le substrat (photolithographie puis métallisation) protège les zones qui ne doivent pas être gravées. Le Pyrex® est ensuite attaqué par l'acide fluorhydrique (HF). La vitesse d'attaque d'un substrat en Pyrex® est de $13 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ pour une solution HF (50%) : H_2O (1:5) [25]. L'attaque du même substrat avec une solution HF (50%) : H_2O (1:1) permet d'obtenir une gravure plus rapide ($0,9 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$). Cependant, cette gravure chimique particulièrement isotrope (**figure 11**) entraîne une sous-gravure importante ($1,5 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) et une forte détérioration du masque en or (**figure 12**). L'attaque physique par plasma résout ce problème mais nécessite une technologie de gravure profonde pour obtenir les dimensions caractéristiques que nous souhaitons atteindre.

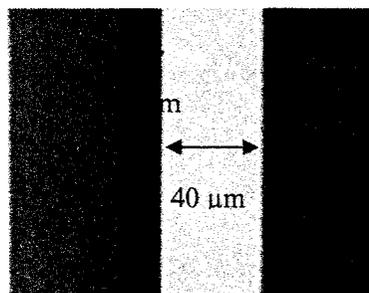


Figure 11 : Réalisation d'un méso en Pyrex® de $11 \mu\text{m}$ de hauteur (protégé par un masque d'or) obtenu par gravure chimique HF 50% : H_2O (1:5). La photographie montre le caractère isotrope de la gravure, le masque d'or étant venu se recoller sur les flancs du méso sous gravé.

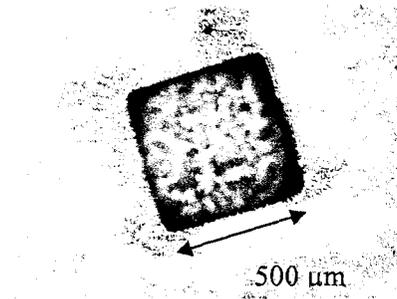


Figure 12 : Gravure d'un substrat en Pyrex® par attaque HF (50%):H₂O (1:5). Dégradation du masque d'or utilisé pour protéger le substrat en Pyrex®.

2) Gravure plasma

Dans le cadre de nos travaux, cette technologie est utilisée pour graver le silicium ou pour le nettoyage de substrat par plasma O₂.

La gravure ionique réactive est une méthode de gravure sèche et d'attaque à partir d'un plasma. Elle se caractérise par une combinaison de deux effets, une pulvérisation physique et une activité chimique d'espèces réactives [26]. Cette combinaison permet d'obtenir des gravures anisotropes à flancs droits sélectives en fonction des matériaux. En jouant sur les paramètres pression, température, polarisation, il est possible de favoriser l'un ou l'autre des processus. Une polarisation faible, une pression et une température élevées favorisent le processus chimique. Par contre, une tension de polarisation importante et une pression basse favorisent la gravure physique.

L'échantillon est tout d'abord placé dans le bâti puis l'enceinte est fermée (étape 1). Un vide poussé est réalisé par un pompage primaire pour obtenir un vide grossier (étape 2), puis par une turbo pompe pour arriver à un vide poussé (étape 3). Les gaz entrant dans la composition du plasma sont libérés dans l'enceinte (étape 4). Le substrat subit les attaques physiques et chimiques. A la fin de l'opération de gravure, l'enceinte est ventilée afin d'évacuer les gaz présents (étape 5). Le bâti est alors ouvert pour récupérer l'échantillon gravé.

Le principe du procédé, représenté **figure 13**, est résumé comme suit :

- génération dans le plasma des espèces pouvant attaquer chimiquement la couche,
- transfert des espèces réactives depuis le plasma vers la surface de la couche à graver,
- adsorption de l'espèce attaquante à la surface,

- réaction avec le matériau de surface. Le matériau produit par la réaction doit être volatil pour pouvoir quitter la surface,
- désorption du produit de réaction,
- diffusion dans l'environnement gazeux.

Notons que pour la mise au point de cette étape technologique, la difficulté est de générer des espèces volatiles après réaction en surface.

Dans le réacteur qui comprend des portes-substrats horizontaux, les gaz injectés sont destinés à graver la couche de surface (**figure 14**). De la même façon, un générateur radiofréquence est utilisé pour générer les espèces réactives dans le réacteur.

gaz circulants dans le plasma

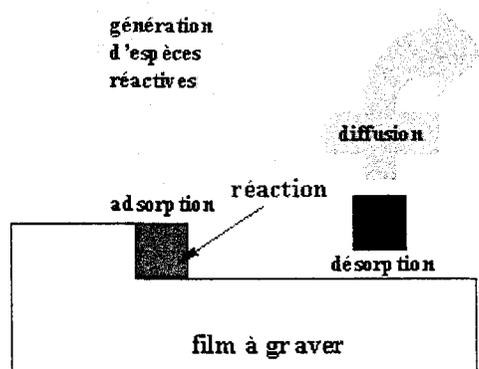


Figure 13 : Schéma de principe de la réaction de gravure plasma. Pour que la gravure soit efficace, il faut éliminer les produits de réaction.

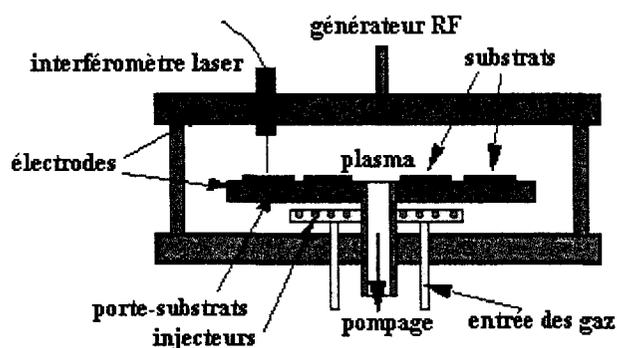


Figure 14 : Réacteur de gravure plasma à platine portes-substrats horizontale.

Sans polarisation particulière des électrodes, l'attaque est en général isotrope. Cependant, lorsque les matériaux à graver ont des orientations préférentielles, c'est le cas des cristaux semi-conducteurs, la gravure peut se faire préférentiellement suivant des plans réticulaires ou axes cristallographiques.

Le réacteur est, dans la plupart des cas, équipé d'un système de contrôle de gravure ou plus exactement de fin de gravure. Il s'agit d'un interféromètre à laser dont la période du signal détecté est modifiée lors d'un changement d'espèces gravées.

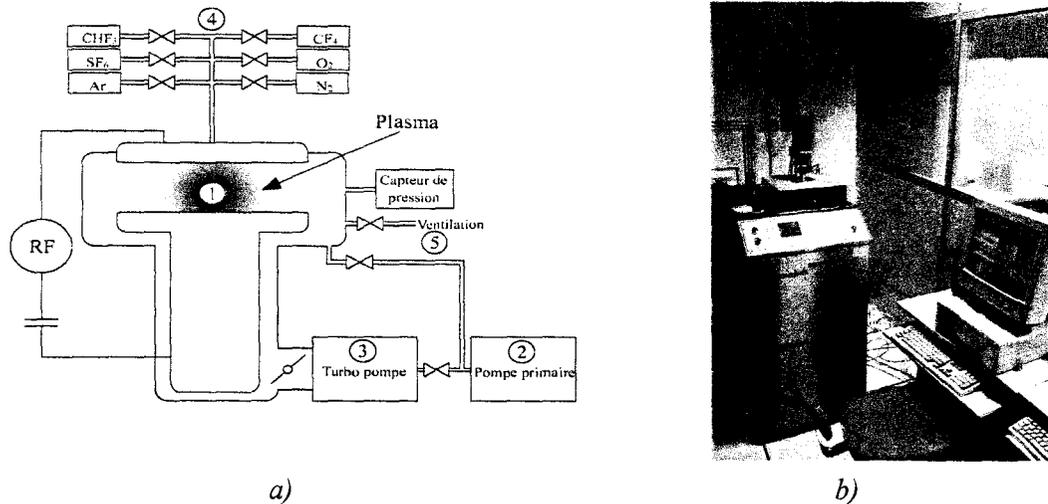


Figure 15 : Présentation du bâti de gravure RIE : a) Schéma de principe ; b) Photo du bâti **OXFORD Plasmalab 80 plus** équipé d'un détecteur de fin d'attaque par interférométrie laser.

Gravure du silicium :

Le résultat d'une gravure humide du silicium dans l'hydroxyde de potassium KOH est fonction de l'orientation cristalline du substrat. Mais les techniques de gravure par voie sèche RIE (**figure 15**) ou ICP donnent des gravures anisotropes [27]. En effet, un contrôle précis de la verticalité des flancs est obtenu par le bombardement ionique perpendiculaire à la surface du substrat et par la protection des flancs (passivation) pour inhiber la gravure chimique latérale.

L'IEMN dispose d'un système ORACLE de la société **TRION** (**figure 16**). Cet équipement est constitué d'une plate-forme de type 'cluster' avec chargement sous vide. Le système de gravure par plasma comprend deux réacteurs pouvant fonctionner indépendamment. La première chambre, destinée à la gravure par les gaz chlorés, est équipée des gaz suivants : Cl_2 , BCl_3 , CF_4 , O_2 et hélium. L'autre, spécialisée dans la gravure par les gaz fluorés, utilise les gaz ci-après : C_2F_6 , SF_6 , CHF_3 , argon, O_2 , CH_4 et H_2 . Les deux réacteurs sont alimentés chacun par une source RIE et une source ICP à 13,56 MHz, au travers de réseaux d'accord à commandes automatiques. Les sources RIE ont une puissance de 300 W, par contre les sources ICP délivrent des puissances de 600 W pour la chambre chlorée et 1200 W pour la chambre fluorée.

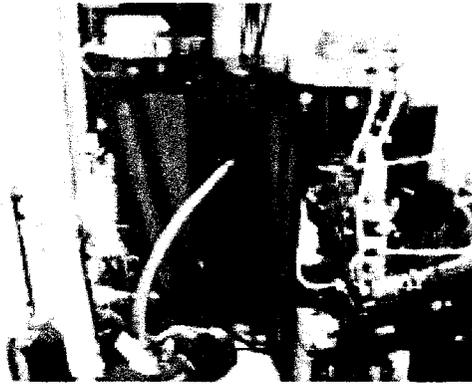


Figure 16 : Photographie du bâti ICP ORACLE de la société **TRION** comprenant deux chambres : l'une est dédiée à la gravure par les gaz chlorés, l'autre à la gravure par les gaz fluorés.

Le procédé de gravure profonde du silicium par voie sèche de type Bosch, qui est en cours d'installation dans notre laboratoire (brevet détenu par **Robert Bosch GmbH**) utilise alternativement un plasma de SF_6 (quelques secondes) pour graver le silicium et un plasma de C_4F_8 (quelques secondes) qui recouvre les surfaces de polymère (**figure 17**). L'énergie moyenne des ions unidirectionnels se situe autour de 100 eV dans la phase SF_6 , ce qui permet de retirer le polymère uniquement dans le fond des motifs pour continuer la gravure. La température du substrat doit être maintenue entre 30 et 50 °C. La vitesse de gravure du Si se situe entre 3 et 20 $\mu m \cdot min^{-1}$ et dépend principalement du procédé et de la charge en Si. Les matériaux utilisés comme masque sont la résine photosensible ou l'oxyde de silicium SiO_2 . La sélectivité avec le silicium se situe dans la gamme 100 à 200 et 200 à 400 respectivement, et dépend de nombreux paramètres (pression, charge en Si, ouverture des motifs, puissance injectée dans le porte substrat).

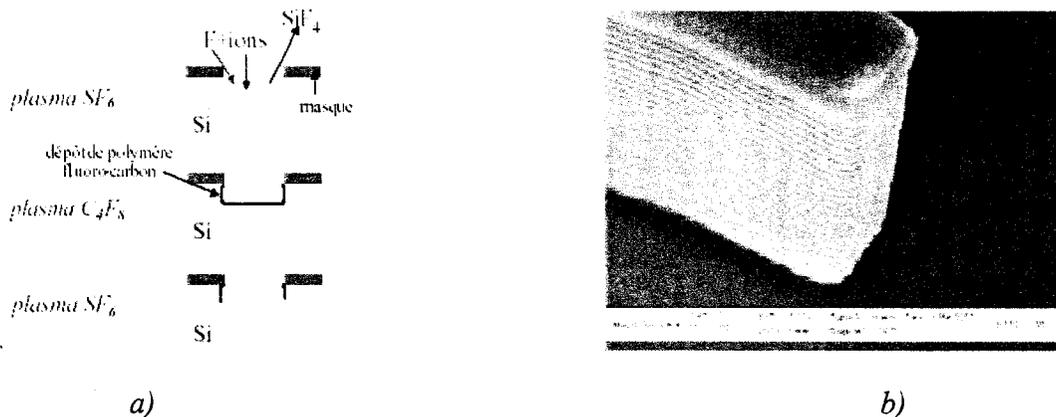


Figure 17 : Le procédé Bosch : a) principe b) cliché incliné MEB d'un flanc de gravure sur lequel on peut voir l'alternance des phases d'attaques et de passivation.

D) Procédé 'lift-off'

L'alternative à la gravure chimique pour obtenir des pistes métalliques est la technique du 'lift-off'. Ce procédé permet de réaliser un masque en résine dont les ouvertures ont un profil 'en casquette' (**figure 18**) : la résine est déposée par centrifugation, subit un traitement de surface afin de la durcir, est insolée au niveau des motifs (a), puis révélée (b). Le métal est ensuite déposé par évaporation (c), et la discontinuité de la surface métallique au niveau de l'ouverture de la résine permet l'attaque de celle-ci pour obtenir au final le motif métallique (d).

Il s'agit de modifier en surface les propriétés de dissolution de la résine dans son révélateur pour obtenir le profil 'en casquette'. Pour expliquer le phénomène, appelons v les vitesses de dissolution de la résine dans son révélateur. La vitesse de dissolution de la résine insolée (v_1) est largement supérieure à celle de la résine non insolée (v_2). Cependant, la surface de la résine est plus dure, elle va donc être moins vite attaquée (v_3) par le révélateur puisque $v_1 \gg v_2 > v_3$.

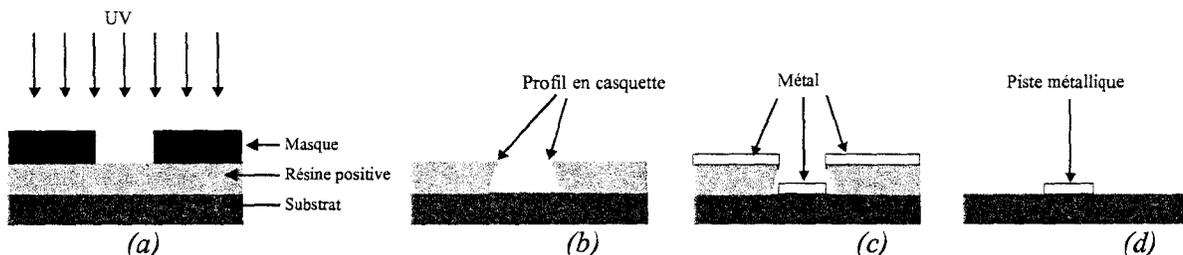


Figure 18 : Etape de réalisation de motifs métalliques par la technique du 'lift-off'.

Dans le cas d'une opération de *lift-off*, un dépôt par évaporation est réalisé. En effet, dans ce cas le dépôt métallique n'est pas continu au niveau des ouvertures, puisque le métal est évaporé suivant la direction verticale. Le dépôt par pulvérisation est moins bien adapté au *lift-off* puisque la pulvérisation réalisée de façon isotrope forme un dépôt continu au niveau des ouvertures de résine (le dépôt par pulvérisation est utilisé dans le cas d'une gravure chimique du métal).

E) Préparation des substrats

Cette étape de préparation des substrats est une étape fondamentale. La surface utilisée comme base de réalisation ne doit pas présenter de résidus organiques qui compromettraient l'adhérence du matériau à déposer sur le substrat [16]. Cette adhérence est nécessaire pour réaliser des structures microfluidiques étanches. En ce qui concerne la rugosité des matériaux, la technique de *l'anodic bonding* est exigeante puisqu'elle nécessite une rugosité de la surface inférieure à la centaine d'Angströms.

1) Nettoyage par voie humide

L'acide fluorhydrique dilué (1%) est utilisé pour éliminer l'oxyde natif (quelques dizaines d'Angströms) présent sur les substrats de silicium. Une attaque de quelques minutes suffit. Cet acide est également utilisé pour dépolir les substrats de verre ou de Pyrex® afin de le rendre plus rugueux pour améliorer l'adhérence des résines photosensibles.

Le mélange Pyranah ou acide de Caro (nom de son inventeur) est utilisé pour retirer les résidus organiques des substrats. Le mélange le plus communément retenu par les industriels de la microélectronique silicium est $H_2SO_4 : 5 / H_2O_2 : 1$. Il permet d'éliminer des composés organiques présents sur les plaquettes de silicium, à la suite de diverses opérations telles que les dépôts de résines, ou des traces de solvants (rinçages de plaquettes). La cinétique de ce mélange dépend de sa température. La température ambiante est recommandée car si elle est plus élevée, sa concentration évolue et l'attaque devient moins reproductible.

2) Nettoyage par voie sèche

Un plasma oxygène est utilisé pour nettoyer (ou graver) en surface les substrats en verre ou en Pyrex®. Dans de nombreux processus, le plasma est employé afin de retirer les oxydes et les composés réductibles ou d'attaquer physiquement une surface. Les gaz typiquement employés peuvent comprendre des combinaisons d'argon, d'azote, d'hydrogène, d'oxygène.

III) Orientations technologiques

La technologie adoptée doit répondre à l'ensemble des contraintes (contraintes matériaux mais aussi contraintes physiques) recensées en début de chapitre. Elle doit également être rapidement évolutive dans le cadre d'une collaboration où les échanges intermédiaires sont nombreux. Nous envisageons deux orientations basées sur les matériaux retenus lors des tests. La première repose sur la gravure du silicium qui est alors le matériau de base de fabrication du microsystème. La seconde repose sur l'utilisation d'un polymère, la SU-8, pour former les différents éléments du microsystème. Rappelons que notre objectif premier est de réaliser un microsystème intégré comprenant des microcanaux (remplis ou non de phase monolithique), couplés à une source d'électronébulisation nanoESI. Si la réalisation de chaque élément pris séparément est possible, l'intégration n'est pas triviale puisque chaque 'brique' impose ses contraintes propres qui ne sont pas forcément compatibles avec la fabrication des autres.

A) Filière silicium

1) Technologie adoptée

Nous choisissons de réaliser des microcanaux par gravure humide d'un substrat en silicium et fermés grâce à un couvercle en verre scellé par *anodic bonding* à l'Ecole Supérieure d'Ingénieurs en Electronique et Electrotechnique (ESIEE). La source d'électronébulisation est réalisée indépendamment par une méthode de gravure profonde du silicium. Il s'agit d'une cheminée dégagée au centre d'un disque gravé dans le silicium. Cette cheminée est alimentée par la face arrière du substrat qui doit donc être parfaitement percé. Cette opération est sous-traitée à l'ESIEE qui dispose d'un procédé de gravure profonde anisotrope (procédé BOSCH) pour réaliser des structures avec de tels rapports d'aspect.

2) Résultats

a) Réalisation de microcanaux

Nous réalisons, grâce à la technique de gravure chimique du silicium par voie humide, des microcanaux de profondeur 10 μm (**figure 19-a**) connectés à des capillaires standard (diamètre externe : 90 μm / diamètre interne : 20 μm). Les microcanaux sont connectés aux

capillaires via des accès plus profonds (ils doivent avoir une profondeur plus grande que le diamètre externe des capillaires). Ils sont obtenus en réalisant deux niveaux de gravure du silicium. Un premier niveau d'une profondeur d'environ 100 μm pour l'introduction des capillaires de diamètre externe plus grand que la section des microcanaux et un second niveau permettant de réaliser le microcanal [28]. Ils ont été couplés à une aiguille nanoESI classique (**figure 19-b**) par l'intermédiaire d'une connectique **Up-Church Scientific P775** en T permettant de connecter : le capillaire de sortie du microsystème, l'aiguille nanoESI et un fil métallique d'alimentation haute tension. Ce système a permis des tests en spectrométrie de masse et les microcanaux n'ont pas, à priori, présenté de fuites. Les tests n'ont pas été approfondis car nous nous sommes rapidement orientés vers une autre filière suite au problème rencontré avec les sources réalisées en silicium.

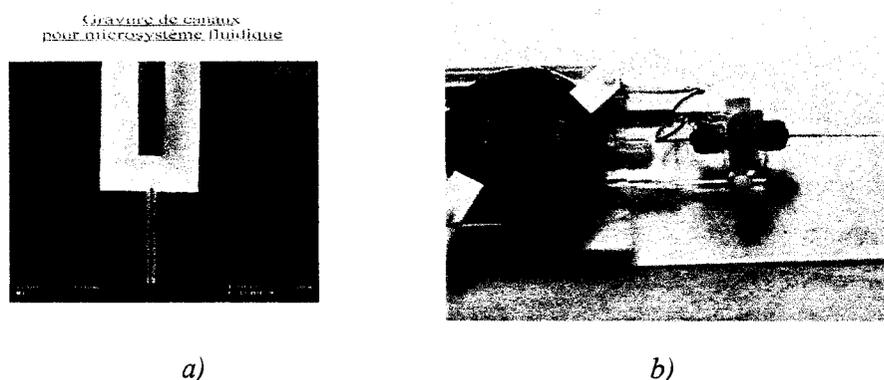


Figure 19 : Réalisation de microcanaux en silicium fermés grâce à un couvercle en Pyrex® par anodic bonding : a) canal de 10 μm réalisé par gravure chimique ; b) montage de connexion à une source nanoESI commerciale.

b) Réalisation de sources nano ESI

Nous avons tenté de reproduire la configuration décrite par Schultz [29] et présentée dans l'état de l'art du chapitre 1 (**figure 20**). L'objectif est de tester ce type de source avant d'envisager l'intégration souhaitée. Les sources de type cheminée sont réalisées par gravure profonde ICP dans le cadre d'une collaboration avec l'ESIEE. Le diamètre interne de la cheminée est de 20 μm alors que le diamètre externe est de 40 μm (**figure 21-c**). Cette cheminée d'une hauteur de 100 μm se trouve au centre d'une cuvette d'1mm de diamètre (**figure 21-b**) [30].

Rappelons que la source est alimentée par un réservoir circulaire gravé dans la face arrière du substrat. Ce réservoir est lui-même alimenté grâce à un capillaire collé. Un fil de platine permet d'appliquer la tension d'ionisation via le liquide qui se trouve dans le réservoir. Le capillaire et le fil de platine sont introduits dans le réservoir via des microcanaux creusés dans le silicium.

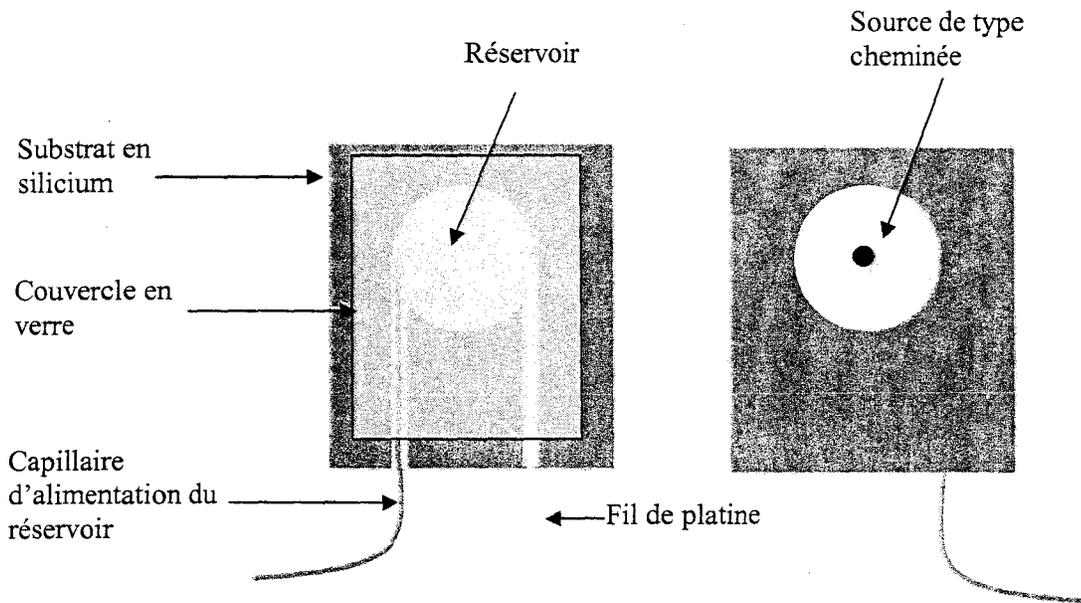


Figure 20 : Schéma de la source d'électronébulisation de type cheminée réalisée en silicium :
 a) face arrière comprenant le réservoir, son capillaire d'alimentation et un fil de platine ; b) face avant comprenant la source de type cheminée.

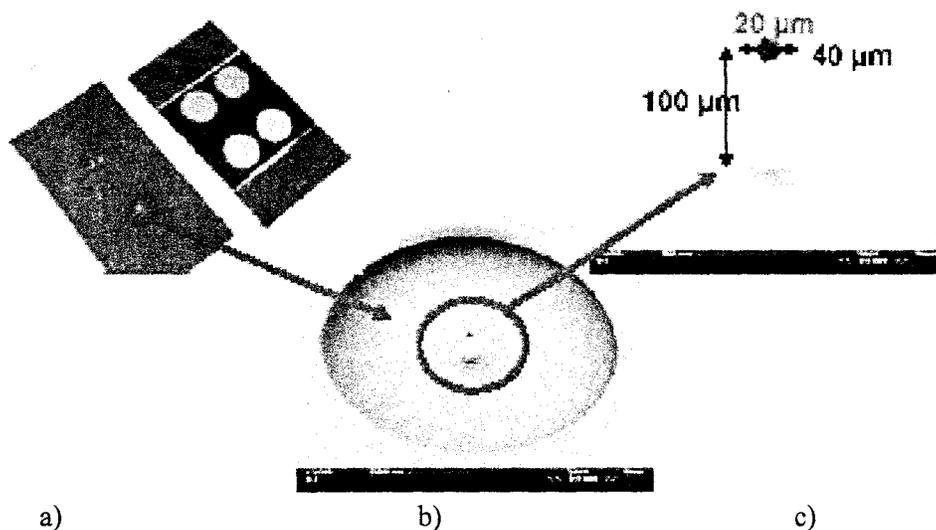


Figure 21 : Vue d'ensemble d'un microsystème comprenant 4 sources : a) les sources sont sur la face avant (à gauche) et les réservoirs sont sur la face arrière (à droite) ; b) cheminée située au centre du recess circulaire ; c) focalisation sur la cheminée.

Les tests de cette structure sont réalisés au moyen d'un banc (**figure 22**) de caractérisation microfluidique permettant d'observer en première approche le comportement fluidique du liquide sur la source. La haute tension est appliquée à la source au niveau du réservoir par le fil de platine relié à un générateur de tension continue.

Une électrode de cuivre de type écran plat, simulant le plan d'entrée du spectromètre de masse, est placée en face de la source ; elle constitue un plan de masse. Cette électrode est chauffée à 40°C grâce à une piste résistive de tantale favorisant l'évaporation des gouttes qui s'y déposent lors du test et rend plus stable les conditions de fonctionnement du spray.

D'un point de vue pratique, la source est posée sur une plateforme de déplacement micrométrique x, y et z. Le positionnement est réglé au micron près sous microscope. Une caméra couplée à un PC montre la formation du cône de Taylor qui caractérise l'amorçage de l'électronébulisation et le fonctionnement de l'électrospray (**figure 22**).

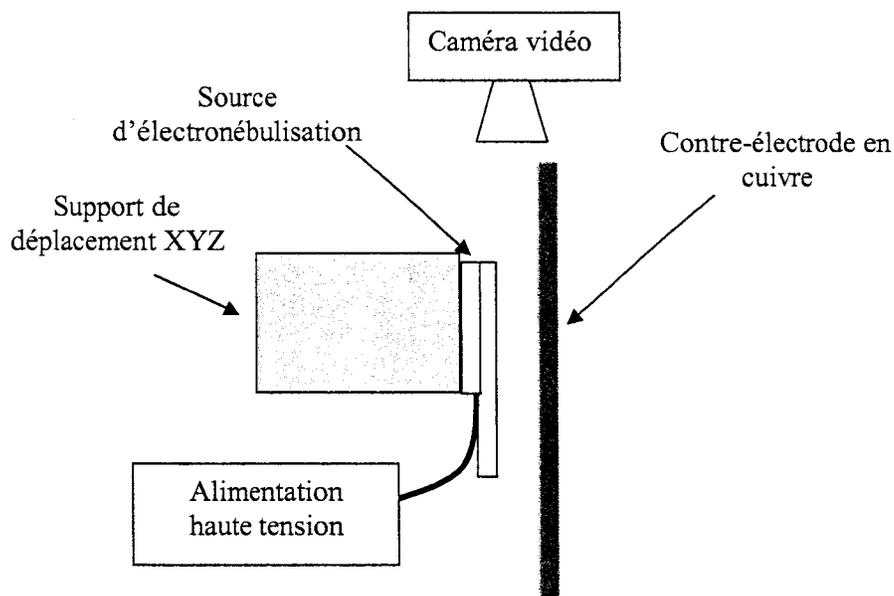


Figure 22 : Schéma de principe du banc de caractérisation comprenant une caméra vidéo couplée à un microscope, un support de déplacement XYZ permettant de positionner la source ESI, une alimentation haute tension, une plaque de cuivre.

Cette structure présente des problèmes de fonctionnement en essai. Le premier problème rencontré concerne l'alimentation en liquide des cheminées : le liquide sortant de celle-ci mouille totalement la cuvette située autour de la cheminée. L'effet de pointe de cette source est alors perdu et les conditions nécessaires à l'obtention d'un nébulisat ne sont pas des conditions d'électronébulisation. Le second problème concerne l'intégration, cette structure

débouchant perpendiculairement au plan du substrat. Comme le réseau microfluidique se trouve dans le plan du substrat, le placement du microsystème face à l'entrée du spectromètre de masse est plus délicat. Bien que cette option ait été choisie par d'autres groupes de recherche, nous nous sommes orientés vers une autre stratégie plus propice à l'intégration.

B) Filière SU-8

1) Caractéristiques

Cette filière repose sur l'utilisation de la SU-8 comme matériau de base pour réaliser les microcanaux. Ces structures en SU-8 sont réalisées sur des substrats en silicium ou en Pyrex®. Les microcanaux formés dans la résine sont fermés par un couvercle en verre qui est collé par une fine couche de SU-8. Cette filière nous paraît plus intéressante car toutes les opérations technologiques ont lieu à l'IEMN et nous pouvons donc conserver la réactivité nécessaire dans le cadre d'un prototypage rapide.

2) Tests préliminaires

a) Problème d'adhérence de la SU-8

Le problème d'adhérence est souvent rencontré lors de la réalisation de structures à haut rapport d'aspect, nécessitant une très bonne adhérence sur le substrat. Si cette adhérence est faible sur le silicium, elle l'est encore plus sur le Pyrex®. Les substrats doivent donc être nettoyés et déshydratés. Ils subissent un traitement au mélange Pyranha pendant 20 minutes afin d'éliminer les reliquats organiques de la surface suivi d'une déshydratation à 200°C pendant 10 heures [31].

La couche de SU-8 déposée sur le couvercle doit parfaitement y adhérer pour réaliser un collage étanche. Ce n'est pas le cas lorsque la résine est directement déposée sur le substrat puisque celle-ci se décolle complètement lorsqu'elle est plongée dans un bain d'acétonitrile pendant plusieurs heures (**figure 23**).

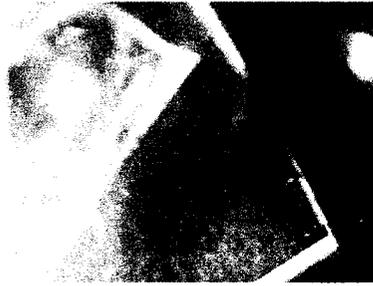


Figure 23 : Décollement de la couche de SU-8 sur le couvercle en Pyrex® sans traitement après un bain de 8 heures dans l'acétonitrile.

b) Problèmes de contraintes mécaniques

La résine SU-8 présente des caractéristiques de dilatation thermique (3.10^{-6} K^{-1} pour le silicium contre $5,2.10^{-5} \text{ K}^{-1}$ pour la SU-8) et de contraintes mécaniques (tension résiduelle de 16-19 Mpa) [32] qui provoquent des problèmes au niveau de l'étanchéité de microcanaux. En effet, des couches de SU-8 épaisses et continues sur une grande partie du substrat entraînent des déformations du substrat. Le polymère formé après le second recuit se rétracte et déforme le substrat auquel il adhère.

Conclusion

Les matériaux utilisés pour réaliser le microsystème doivent être compatibles avec les solvants qui sont utilisés pour la fabrication des phases monolithiques, mais également dans le cadre des analyses protéomiques. Les matériaux retenus, après tests de compatibilité, sont le silicium, la résine photolithographiable SU-8 ainsi que le Pyrex®. Ces matériaux se révèlent compatibles avec nos applications ; ils n'ont pas présenté de problèmes spécifiques d'adsorption de protéines ou de relargage de polluants.

Nous avons tout d'abord réalisé des éléments (microcanaux et source ESI) basés sur une technologie silicium / Pyrex® en collaboration avec l'ESIEE. Nous avons rencontré des problèmes lors des essais et nous nous sommes orientés vers la résine SU-8. La technologie multimatériaux ainsi définie (silicium, SU-8, Pyrex®) doit être optimisée mais semble autoriser la fabrication, dans le cadre d'un prototypage rapide, des différentes structures visées. Les canaux formés dans la résine SU-8 sont fermés par un couvercle en Pyrex®, non opaque aux UV, collé par une couche de SU-8. Les phases monolithiques peuvent être polymérisées *in situ* par exposition aux UV, une fois le mélange réactionnel introduit dans les microcanaux. Cependant, le microsystème devra être capable de répondre à des contraintes fortes (circulation de solvants et pressions élevées engendrées par la fabrication d'une phase monolithique).

Cette résine, aux caractéristiques mécaniques intéressantes (Module d'Young de 4 Gpa), permet de réaliser des structures suspendues et semble donc tout à fait favorable à la réalisation d'une source ESI ainsi qu'à son intégration avec des microcanaux.

Bibliographie du chapitre 2

- [1] C.Yu, F.Svec, J.M.J. Frechet, 'Towards stationary phases for chromatography on a microchip: molded porous polymer monoliths prepared in capillaries by photoinitiated in situ polymerization as separation media for electrochromatography'. *Electrophoresis*, 21, pp.120-127, 2000.
- [2] F.Svec, J.M.J.Frechet, 'Rigid Monolithic Porous Polymers: An Inexpensive, Efficient, and Versatile Alternative to Beads for the Design of Materials for Numerous Applications'. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 38, pp.34-48, 1999.
- [3] O.Okay, 'Macroporous copolymer networks', *Progress in Polymer Science*, 25, pp.711-779, 2000.
- [4] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, 'Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non ideality in chromatography', *Chem. Eng. Sci.* 5, pp.271-289, 1956.
- [5] S. Xie, F. Svec, J.M.J. Frechet, 'Rigid porous polyacrylamide -based monolithic columns containing butyl methacrylate as a separation medium for the rapid hydrophobic interaction chromatography of proteins', *J. Chromatogr. A* 775, pp.65-72, 1997.
- [6] A. Premstaller, H. Oberacher, W. Walcher, A.M. Timperio, L. Zolla, J.-P. Chervet, N. Cavusoglu, A. van Dorsselaer, C.G. Huber, 'High Performance Liquid Chromatography-electrospray ionisation Mass Spectrometry using monolithic capillary columns for proteomic studies' *Anal. Chem.* 73, pp.2390-2396, 2001.
- [7] G. Jas, A. Kirschning. 'Chemistry in Flow' *Chem. Eur. J.* 9, p. 5708, 2003.
- [8] S.Xie, F.Svec, J.M.J.Frechet, 'Preparation of porous hydrophilic monoliths: Effect of the polymerization conditions on the porous properties of poly(acrylamide-co-N,N'-methylenebisacrylamide) monolithic rods.' *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 35, pp.1013-1021, 1997.
- [9] C. Viklund, F. Svec, J.M.J. Frechet, K. Irgum, 'Porous materials with high characteristics for separation, catalysis or solid-phase chemistry: control of porous property during polymerisation' *Chem. Mater.* 8, pp.744-750, 1996.
- [10] K.Tobal, 'Développement de phases de type monolithe, optimisées pour la nanochromatographie et les applications microfluidiques' *Diplôme d'études Approfondies de Chimie Organique et Macromoléculaire, Option polymères*, 2003.
- [11] S. Le Gac, 'Développement de systèmes microfluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM', *Thèse de doctorat de l'université de Lille1*, 2004
- [12] S. Le Gac, J. Carlier, C. Cren-Olivé, J.-C. Camart, C. Rolando, 'Monoliths for microfluidics devices in proteomics', *J. Chrom. B.*, 808(1), pp.3-14, 2004.

[13] Communication écrite de F. Uzabiaga, Sanofi – Synthélabo, contrat de recherche BIOCHIPLAB, 2003.

[14] J. Zhang, K.L.Tan, G.D.Hong, L.J. Yang, H.Q. Gong, 'Polymerization optimization of Su-8 photoresist and its applications in microfluidic systems and MEMS', J. Microm. and Microeng. 8, pp.20-26, 2001.

[15] C.-H. Lin, G.-B. Lee, B.-W. Chang, G.-L. Chang, 'A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photoresist', Journal of Micromechanics and Microengineering 12, pp.590-597, 2002.

[16] www.microchem.com

[17] H. Lorenz, M. Despont, M. Fahrni, N. LaBianca, P. Vettiger, and P. Renaud, 'SU-8: a low-cost negative resist for MEMS', J. Micromech. Microeng 7, pp.121-124, 1997.

[18] L. Guerin, M. Bossel, M. Demierre, S. Calmes, P. Renaud, 'Simple and low cost fabrication of embedded microchannels by using a new thick-film photoplastic', in Proc. Transducers 1997, Chicago (USA), pp.1419-1422, 1997.

[19] S.M.Sze, 'Semiconductor devices : physics and technology', John Willey and Sons, 1985.

[20] W.B. Glendinning, J.N. Helbert 'Handbook of VLSI Microlithography. Principles, Technologies and Applications', Noyes Publications, Mill Road, Park Ridge, New Jersey (USA), 1991.

[21] L.F. Thompson, C.G. Wilson, M.J. Bowden 'Introduction to microlithography : theory, materials and procesing', American Chemical Society, Washington D.C. (USA), 1983.

[22] A. Richardt, A.M. Durand, 'Le vide – Les couches minces – Les couches dures', ed. In Fine, 1994.

[23] A. Richardt, A.M. Durand, 'La pratique du vide et des dépôts de couches minces', ed. In Fine, 1995.

[24] K. Sato et al., 'Characterization of orientation-dependent etching properties of single-crystal silicon : effects of KOH concentration' Sensors and Actuators A 64, pp.87-93, 1988.

[25] T. Cormany, P. Enoksson, G. Stemme 'Deep wet etching of borosilicate glass using an anodically bonded silicon substrate as mask', J. Micromech. Microeng. 8, pp.84–87, 1998.

[26] H. Janseny, H.Gardeniers, M. de Boer, M.Elwenspoek, J. Fluitman 'A survey on the reactive ion etching of silicon in microtechnology', J. Micromech. Microeng. 6, pp.14–28, 1996.

[27] W. Lang, 'Silicon microstructuring technology', Materials Science and Engineering, R 17, no 1, pp.1-55, September 1996.

- [28] P. Tabourier, C. Druon, C. Rolando, P. Lefèbvre, 'On-chip microfluidics proteomic analysis by electrospray ionization/mass spectrometry', 1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology, Lyon, 12-14 Octobre 2000, Proceedings pp.439-444, 2000.
- [29] G.Schultz, T. Corso, 'A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry', *Anal. Chem.*, 72, 17, pp.4058-4063, 2000.
- [30] S. Le Gac, C. Rolando, C. Druon, P. Tabourier, 'Microsystème fluïdique d'analyse protéomique par ESI-MS', Société Hydrotechnique de France, Colloque Hydrotechnique – Microfluidique, Toulouse 3-5 décembre 2002, Proceedings pp.133-140, 2002
- [31] K. Chuda, X. Coqueret, J. Carlier, V. Thomy, C. Druon, P. Tabourier, J.-C. Camart, 'Pressure and solvents resistant microsystem for monolithic column integration', Congrès IUPAC, Paris, 2004.
- [32] H. Lorenz, M. Laudon, P. Renaud, 'Mechanical characterization of a new high-aspect-ratio near UV-photoresist', *Microelec. Engin.* 41/42, pp.371-374, 1998.

Chapitre 3

Composants de base pour un microsysteme *ESI intégré*

Le choix d'un projet de microsystème et celui d'une filière technologique associée nous conduisent à la réalisation d'un premier prototype de microsystème ESI/MS comportant les composants de base aptes à lui conférer un intérêt pratique effectif. L'approche adoptée ici est de type '*assemblage technologique*'. Elle consiste à fabriquer séparément les différents composants et à les valider par des tests hydrodynamiques et/ou par spectrométrie de masse avant de les rassembler dans le microsystème final. Leur compatibilité technologique est assurée par l'utilisation d'une même filière technologique pour l'étape préalable de mise au point.

D'autres problèmes se présentent de manière systématique à tous les concepteurs de microsystèmes fluidiques. Ils concernent la connexion avec l'environnement extérieur : côté entrée, le mode d'introduction de l'échantillon, l'actuation hydrodynamique à partir d'une source externe généralement sous forte pression et côté sortie, le couplage avec l'appareil d'analyse. Nous examinons ci-après, les éléments de solution apportés et les questions relatives à la fabrication de microcanaux pouvant intégrer une phase monolithique, à la réalisation d'une source nanoESI ainsi qu'à l'intégration de ces deux éléments sur un microsystème.

I Procédés mis au point

Afin de répondre aux problèmes rencontrés lors des tests préliminaires, les procédés standard d'utilisation de la résine SU-8 sont adaptés et des procédés spécifiques sont développés. Les solutions apportées aux problèmes rencontrés, relatifs à l'adhérence et aux contraintes mécaniques, sont présentées. Ces solutions découlent de l'expérience présentée dans la littérature à travers quelques publications [1-4].

A) Amélioration de l'adhérence de la résine SU-8 sur un substrat

Nous présentons ici les solutions apportées pour améliorer l'adhérence de la résine SU-8 sur substrat silicium ou substrat Pyrex® (qui n'est pas satisfaisante naturellement dans le cadre de nos applications) car c'est un point clé pour réaliser des structures étanches.

1) Adhérence de la résine sur substrat silicium

Pour améliorer la liaison entre le substrat et la résine, une couche de SU-8 2002 d'accrochage est déposée. Il s'agit d'une couche fine qui joue le rôle d'interface entre le substrat et les couches plus épaisses. Elle adhère mieux sur le substrat pour deux raisons essentielles. Tout d'abord, elle ne présente pas de rapport d'aspect important puisqu'elle recouvre totalement ou quasi totalement le substrat. De plus, comme cette couche est très fine, elle subit moins de contraintes mécaniques et thermiques que des couches plus épaisses. Elle permet d'ancrer efficacement les structures à haut rapport d'aspect sur le substrat puisque l'adhérence entre deux couches de SU-8 est très bonne. Cette couche est réalisée après une étape de préparation du substrat (le substrat est trempé dans un bain de mélange Pyranha puis déshydraté à 200°C pendant 10 heures). La couche est enduite avec les paramètres qui suivent : vitesse = 2000 rpm (rpm : *revolution per minute*), accélération = 2000 rpm.s⁻¹ pendant 30 s. Elle subit un premier recuit à 95 °C pendant 6 min, est insolée pendant 10 s (avec une lampe UV d'intensité 13 mW.cm⁻²) et est enfin recuite pendant 2 min à 95 °C puis 1 min à 170 °C. Cette couche est ainsi totalement polymérisée. Soulignons que certains paramètres sont volontairement amplifiés (par rapport à ceux conseillés par le fabricant **Microchem, MA, USA**) puisque nous n'avons pas de contraintes de résolution des motifs à révéler dans ce cas [5].

2) Adhérence de la résine sur le Pyrex®

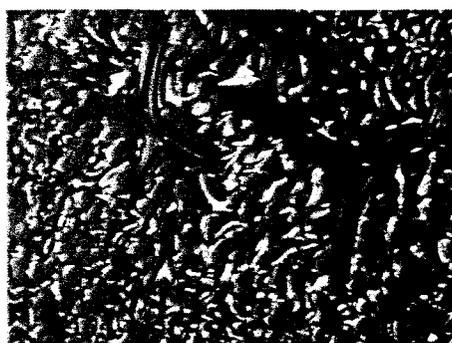
L'adhérence de la résine sur ce substrat est de moins bonne qualité que sur le silicium. Nous avons donc testé différentes préparations de surface permettant de l'améliorer. Les préparations testées sont les suivantes :

- bain dans un mélange pyranha (H_2O_2 :1 / H_2SO_4 :1) puis déshydratation du substrat,
- préparation à l'acide fluorhydrique (HF) 50 %,
- plasma O_2 (procédé décrit dans le chapitre 2),
- traitement de surface par époxy silane comme agent de couplage (développé dans le cadre de la thèse de M^{elle} Kashia Chuda, LCOM).

Des motifs carrés (2 mm de côté) de SU-8 2002 sont réalisés sur ces surfaces préparées. Les substrats sont ensuite plongés dans un bain composé de 95% d'acétonitrile et 5% d'eau pendant au maximum 8 heures (s'il n'y a pas eu décollement de la résine). Après tests, nous avons constaté que les résultats les plus probants étaient obtenus sur des lames de Pyrex® nettoyées classiquement (à l'acétone et à l'alcool) et ayant reçu un traitement époxy silane. Dans ce cas, les motifs de SU-8 ne se sont pas décollés et nous n'avons pas observé de décollement local de la résine alors qu'elle se rétracte (elle se 'frippe') avec les autres préparations de surface (**figure 1**).



a)



b)

Figure 1 : Après un bain d'1h dans un mélange eau (5%) / acétonitrile (95%), décollement d'une couche de SU-8 sur une lamelle préparée: a) par un plasma O_2 ; b) dans un mélange Pyranah.

L'application la plus répandue de ces agents de couplage est la formation des liaisons entre un substrat inorganique et le polymère, ce qui correspond bien à notre application car nous cherchons une liaison efficace entre le Pyrex® et la résine SU-8 (**figure 2**). L'efficacité d'un agent de couplage est le résultat de plusieurs facteurs : énergie de surface, adsorption,

interactions acide – base, formation du réseau interpénétré, réactions covalentes. Cet agent de couplage permet d'éviter le décollement de motifs en SU-8 réalisés sur Pyrex® et plongés dans un bain d'acétonitrile pendant 8 heures (**figure 3**).

La technique pour greffer l'agent de couplage consiste à tremper la lame dans une solution composée d'alcool et d'eau (95 % éthanol + 5 % eau et l'ajout sous agitation de 10 % de silane) sous agitation pendant 10 min. La lame est ensuite rincée à l'éthanol puis recuite à 110°C pendant 10 minutes [6].

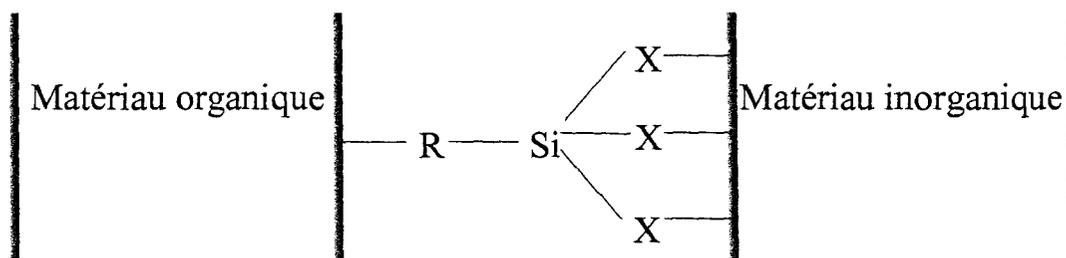


Figure 2 : Liaison chimique entre le Pyrex® (matériel inorganique) et le polymère (matériel organique) grâce au traitement époxy – silane.



Figure 3 : Observation de l'adhérence des motifs en SU-8 sur le couvercle en Pyrex® avec traitement époxy silane après un trempage de 8 heures dans un mélange eau (5%) / acétonitrile (95%).

B) Contraintes mécaniques

Afin d'éviter les problèmes de déformation du substrat contraint par la SU-8, nous réalisons des microcanaux à partir de murs pour réduire la surface de SU-8 polymérisée (**figure 4**). L'utilisation de masques positifs (essentiellement opaques aux UV) permet de diminuer la surface de SU-8 présente sur le substrat jusqu'à 60% (**figure 5**). Cette technique oblige cependant à prendre en compte plusieurs considérations : les murs constituant le

microcanal ne doivent pas être trop minces ($> 100 \mu\text{m}$) pour conserver une bonne étanchéité des microcanaux, de plus, ils ne doivent pas être trop espacés pour ne pas laisser des zones trop importantes sans support (le couvercle pourrait casser sous la pression lors du collage).

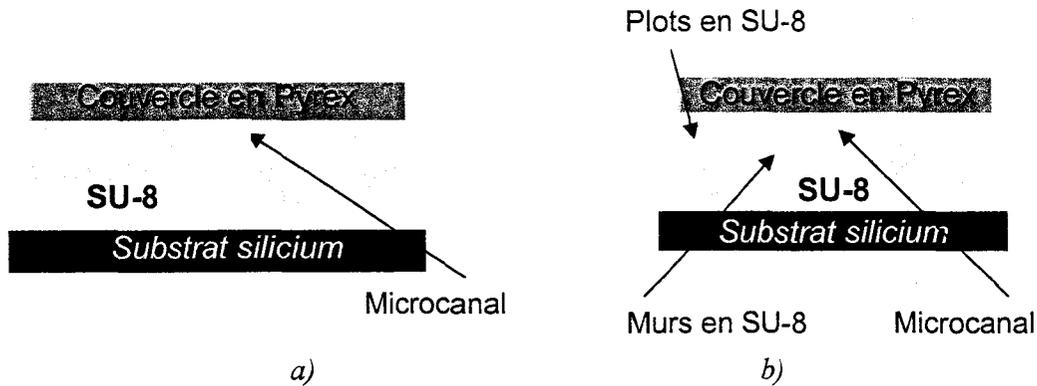


Figure 4 : Schéma de principe de la réalisation de microcanal en SU-8 : a) canal réalisé dans une couche pleine de SU-8 et fermé par un couvercle en Pyrex® ; b) canal réalisé à partir de murs en SU-8 et fermés par un couvercle en Pyrex® reposant sur des supports en SU-8 (diminution de la surface de SU-8 sur le substrat afin de limiter les contraintes mécaniques).

Ces masques positifs permettent de s'affranchir des problèmes de bourrelet haut de plusieurs dizaines de microns à la périphérie du substrat (couronne d'environ 5 mm de largeur) qui compromettent parfois l'étape de collage. Pour éviter la formation de bourrelets, les couches de résine sont directement recuites à 95°C (alors que le fabricant **Microchem** préconise d'effectuer une rampe partant de 65°C jusque 95°C). Ainsi, la résine flue (avant que les solvants ne soient totalement éliminés) et l'épaisseur de la couche est homogénéisée [5].

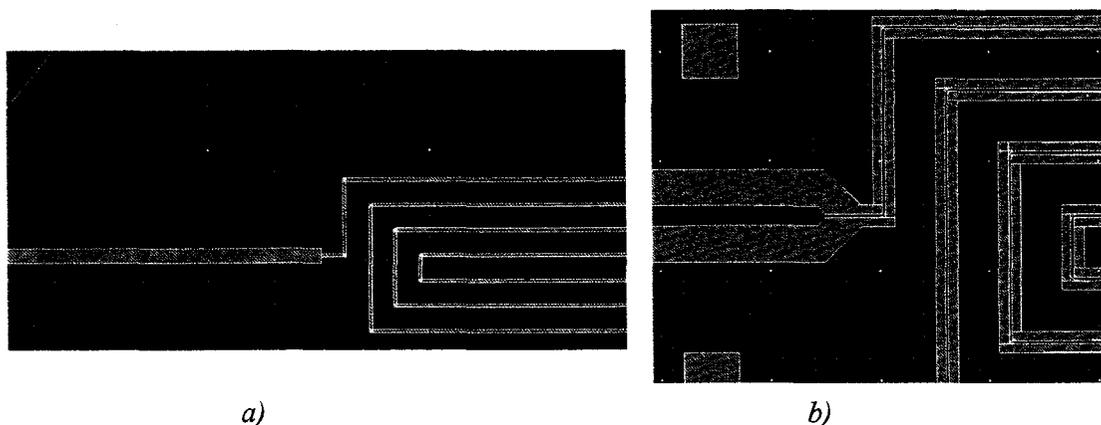


Figure 5 : Schémas des masques utilisés pour fabriquer : a) des canaux directement dans la couche de SU-8 (résine non polymérisée au niveau des motifs blancs sur la figure à partir de masques négatifs) ; b) des canaux à partir de murs en SU-8 (résine polymérisée au niveau des motifs blancs sur la figure à partir de masques positifs).

La **figure 6** présente des photos MEB montrant les réalisations obtenues avec les masques de la **figure 5**.

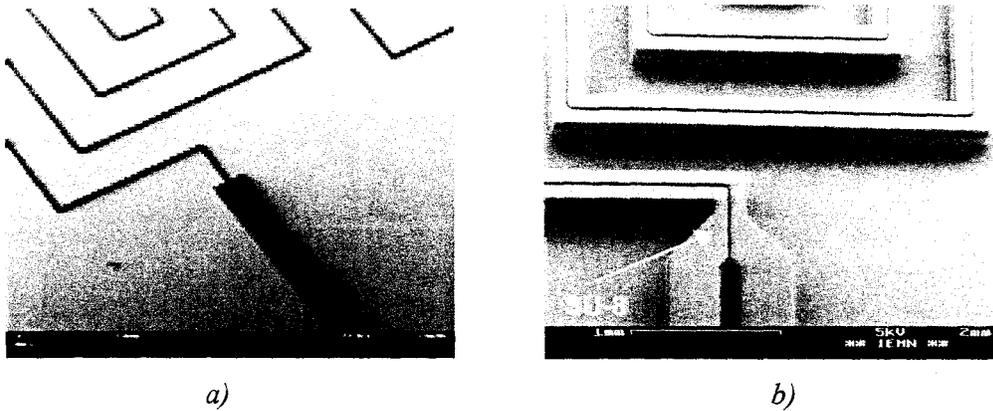


Figure 6 : Photographies réalisées au Microscope Electronique à Balayage de microcanaux : a) directement réalisés dans la couche de SU-8 ; b) formés à partir de murs en SU-8.

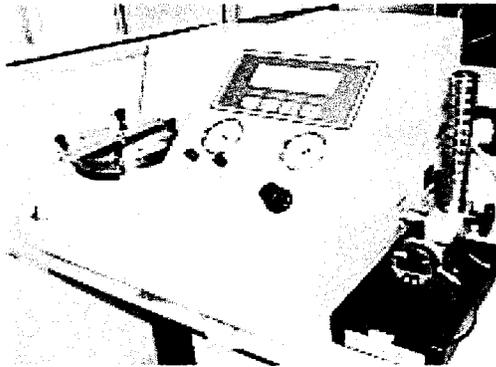
C) Collage d'un couvercle en Pyrex® par SU-8

L'intérêt du Pyrex® est son faible taux d'absorption des UV (l'insolation d'une résine positive de type Novolak à travers un couvercle permet une dissolution totale de la résine lors de la révélation du substrat). Une légère surdose de l'exposition permet donc d'obtenir les mêmes résultats pour les étapes de photochimie avec et sans lame de Pyrex®. Cet avantage est double : réticulation de la couche de SU-8 destinée au collage du couvercle, et également polymérisation UV des phases monolithiques destinées à la fonctionnalisation des microcanaux.

Le couvercle utilisé doit être souple et donc de faible épaisseur (inférieure à 200 μm) afin d'épouser les défauts de planéité et de s'appliquer au mieux sur les murs constituant les canaux. En effet, les couches épaisses de résine présentant un bourrelet à la périphérie du substrat, il peut exister une différence de niveau entre les murs situés au centre du substrat et ceux qui sont excentrés (dénivelés inférieurs à la dizaine de microns). La finesse du couvercle permet aussi, hormis sa souplesse, d'insoler facilement la résine déposée sur celui-ci comme couche de colle.

Avant de recevoir le traitement époxy, le couvercle subit donc un premier nettoyage à l'acétone et à l'alcool classique suivi d'une déshydratation courte (30 min à 200°C). Une couche de SU-8 2002 de 2 μm est déposée sur le couvercle par enduction, puis chauffée à 95°C pendant 30 secondes afin d'homogénéiser l'épaisseur de la couche. Le couvercle est ensuite rapidement appliqué sur les murs manuellement. Le système 'microcanal + couvercle'

est placé dans une colleuse automatique **Logitech (CA, USA)** (**figure 7**) qui permet de chauffer tout en appliquant une pression. Le tout est porté à 95°C et soumis à une pression de 2 bar par l'intermédiaire d'une membrane plastique pendant 20 minutes. L'ensemble est ensuite refroidit sous pression, puis retiré de la colleuse pour être insolé sous UV. Le système est à nouveau replacé dans cette machine où il subit la même étape de chauffage sous pression afin de polymériser la couche de collage [5].



*Figure 7 : Colleuse automatique **Logitech** qui permet de chauffer le substrat tout en exerçant une pression grâce à une membrane plastique.*

II) Fabrication de microcanaux

Comme nous l'avons vu lors de l'état de l'art (chapitre 1 II B), la résine SU-8 permet le prototypage rapide (les étapes essentielles relèvent de la photolithographie) de structures à grand rapport d'aspect. Nous mettons à profit les caractéristiques de la SU-8 (chapitre 2 III B) pour réaliser des microcanaux capables de résister aux solvants (utilisés pour leur fonctionnalisation) mais aussi aux pressions de plusieurs dizaines de bar engendrées par une phase monolithique (chapitre 2 I A).

La technologie mise au point permet en particulier de fabriquer deux types de microcanaux. Les premiers (canaux de type 1) ont une longueur inférieure à 5 cm. Plusieurs canaux de type 1 de sections différentes sont développés : de hauteur (160 μm) et de longueur (4 cm) constantes, leur largeur (plusieurs centaines de microns) varie afin de tester la faisabilité de microcanaux plus larges que hauts. Ils peuvent être destinés à des fonctions de dessalage (pour laquelle une longueur de quelques cm de monolithe suffit).

Les canaux de type 2, qui ont un rapport, longueur / côté de la section, supérieur (environ 5000), sont réalisés afin de valider la faisabilité, la fiabilité et l'exploitation de microcanaux ayant de telles caractéristiques géométriques sur une surface limitée. Rappelons que les étapes de séparation par chromatographie ou de digestion nécessitent des capillaires

de diamètre interne 75 μm et de longueur supérieure à 10 cm (essais réalisés en capillaires par le LCOM, dans le cadre de la thèse de M^{elle} S. Le Gac) [6].

A) Canaux de type 1

La connexion des canaux au monde extérieur est assurée par des capillaires en silice fondue (couramment utilisés dans le milieu de la nano chromatographie liquide) de diamètre externe de 150 μm commercialisés (**Polymicro Technologies, Phoenix, AZ**) avec des diamètres internes pouvant aller de 1 à 75 μm . Ainsi, les canaux ont une hauteur constante de 160 μm , cette dimension nous permet d'introduire facilement les capillaires en formant les microcanaux à partir d'une seule couche épaisse. Des canaux de largeur 100 μm , 200 μm et 500 μm et de longueur 4 cm sont réalisés. Ils sont formés à partir de murs relativement larges (200 μm) favorables à l'obtention d'une large surface de collage avec le couvercle nécessaire lors de la circulation de solvants sous pression [7].

1) Technologie de fabrication

Les microcanaux sont réalisés à partir d'une structure multicouche qui comprend une couche d'accrochage fine ($< 5 \mu\text{m}$) de SU-8 2002 (couche 0), une autre permettant le collage du couvercle (couche 2) ainsi qu'une couche épaisse de SU-8 2075 (couche 1), dans laquelle est formé le microcanal (**figure 8**). Les paramètres utilisés pour le dépôt des couches de SU-8 sont résumés dans le **tableau 1**. Ils sont fermés par un couvercle en Pyrex® ayant subi un traitement époxy silane afin de favoriser l'adhérence de la couche de collage de SU-8 2002.

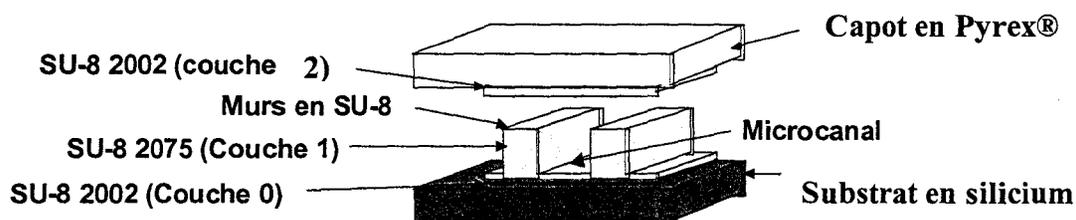


Figure 8 : Schéma de principe de la structure multicouche pour la réalisation d'un microcanal à partir d'une seule couche épaisse de SU-8. La couche fine (0) de SU-8 permet l'adhérence sur le substrat, la couche (1) de former les murs constituant le microcanal et la couche (2) de coller le couvercle en Pyrex®.

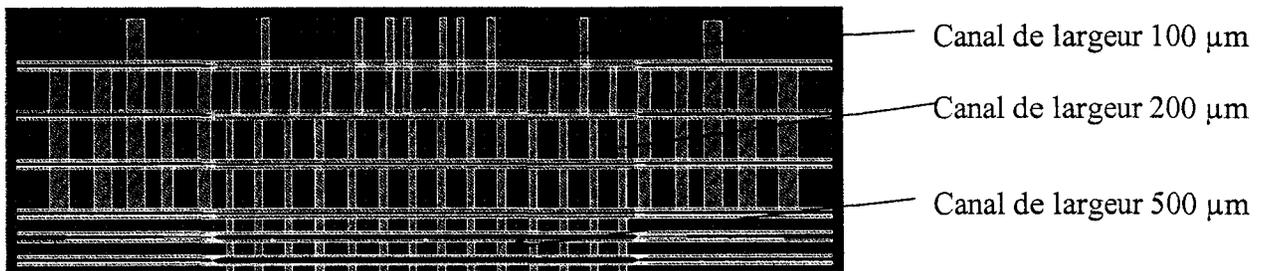


Figure 9 : Dessin du masque utilisé pour la réalisation des canaux de type 1. Ce masque comprend des canaux de largeurs 100 µm, 200 µm, 500 µm connectés à des accès capillaires identiques, ainsi que de nombreux supports pour le collage du couvercle.

De multiples supports (perpendiculaires au microcanal) sont intercalés entre les microcanaux, afin de créer une structure répartie pour le soutien du couvercle lors de l'étape de collage (**figures 9 et 10-a**). Des accès, en forme 'd'entonnoir', ayant une largeur décroissante de 230 µm à 140 µm sont réalisés afin de faciliter l'introduction des capillaires. Ils permettent aussi de bloquer ces derniers pour qu'ils ne pénètrent pas dans le microcanal (**figure 10-b**). Ils sont ensuite fixés par une colle époxy standard. Des tests ont été entrepris pour coller les capillaires avec de la SU-8. Cependant, cette résine nécessite un pré-recuit qui la fait fluer fortement ; la résine flue dans l'accès capillaire jusqu'à son extrémité, risquant de le boucher. Néanmoins cette technique doit encore être optimisée afin de diminuer fortement les volumes morts au niveau de la jonction.

	Couche 0 (SU-8 2002)	Couche 1 (SU-8 2075)
Etalement (rpm / rpm.s ⁻¹ / s)		300/100/30
Dépôt (rpm / rpm.s ⁻¹ / s)	2000/2000/30	1400/500/30
Recuit 1 (<i>pre bake</i>)	95°C / 6 min	95°C / 35 min
Exposition (14mW/cm ²)	10 s	40 s
Recuit 2 (<i>post bake</i>)	95°C / 2 min	95°C / 15 min
Recuit 3 (<i>hard bake</i>)	170°C / 1 min	

Tableau 1 : Paramètres de dépôt, d'exposition et de recuits des différentes couches de SU-8 utilisées pour la fabrication des microcanaux de type 1. La couche 0 constitue la couche d'adhérence et la couche 1 permet de former les murs du microcanal.

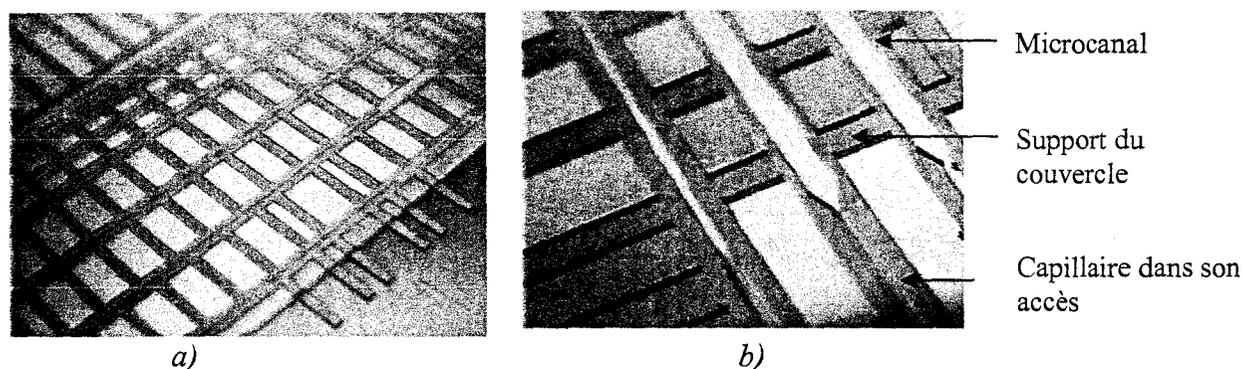


Figure 10 : Photographies d'un microsystème comprenant des microcanaux formés par des murs de SU-8 et des plots de résine qui supportent le couvercle en Pyrex® : a) microcanaux de largeur différente ; b) capillaires connectés aux microcanaux de largeur 200 μm et 500 μm .

2) Test des microcanaux

Les microcanaux fabriqués sont destinés à être fonctionnalisés avec des monolithes. La mise en œuvre de ces phases monolithiques crée une perte de charge de plusieurs dizaines de bar qui intervient dès la fabrication (en particulier lors de la phase de lavage du monolithe où les débits sont de plusieurs dizaines de $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) et aussi lors de l'utilisation. De plus, les débits utilisés en nanoLC sont de l'ordre de $100 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$, les microcanaux ne doivent donc pas engendrer de microfuites rédhibitoires à ces très faibles débits.

L'évaluation des microcanaux est donc réalisée en deux temps. Dans un premier temps, un test à faible débit (de l'ordre de la centaine de $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$) permet de détecter les microfuites grâce à un banc de test 'bas débit'. Nous mesurons le débit en sortie du microsystème et le comparons à celui imposé en entrée. Si les débits ne sont pas identiques, nous réalisons une inspection visuelle du microcanal (couvercle transparent) puis des connectiques du banc afin de localiser la fuite (la fuite peut en effet être engendrée par le microsystème mais aussi par une connectique du banc de test).

Nous testons, dans un second temps, la résistance à la pression du microsystème au moyen d'un banc de test 'haut débit' (plusieurs $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). De tels valeurs du débit qui correspondent à la phase de lavage du monolithe. Notre démarche consiste alors à augmenter la pression progressivement en augmentant le débit. Nous réalisons enfin des tests à débits modérés ($50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) en plaçant une charge additionnelle en aval du microcanal.

Nous rappelons ci-dessous quelques éléments classiques nécessaires au calcul théorique des pertes de charges engendrées par les différents capillaires utilisés.

Viscosité dynamique et loi d'Hagen-Poiseuille

Sous l'effet des forces d'interaction entre les molécules du fluide et celles de la paroi, chaque molécule du fluide ne s'écoule pas à la même vitesse : il existe un profil de vitesse. Si on représente par un vecteur la vitesse de chaque particule située dans une section droite perpendiculaire à l'écoulement d'ensemble, la courbe, lieu des extrémités de ces vecteurs représente le profil de vitesse. Le mouvement du fluide peut être considéré comme résultant du glissement des couches de fluide les unes sur les autres. La vitesse de chaque couche est une fonction de la distance z de cette courbe au plan fixe.

La force de frottement qui s'exerce à la surface de séparation de ces deux couches s'oppose au glissement d'une couche sur l'autre. Elle est proportionnelle à la différence de vitesse des couches, à leur surface et inversement proportionnelle à dz : le facteur de proportionnalité η est le coefficient de viscosité dynamique du fluide exprimée en Pa.s ou Poiseuille (Pl). La viscosité cinématique d'un fluide ν est définie par $\nu = \eta / \rho$ avec η la viscosité dynamique et ρ la masse volumique.

Le nombre de Reynolds Re est utilisé pour déterminer si un écoulement est laminaire ou turbulent. Si $Re < 2300$, l'écoulement est considéré comme laminaire : l'écoulement est alors réversible. Si $Re > 2300$, l'écoulement est considéré comme turbulent : les phénomènes d'irréversibilité de l'écoulement deviennent importants.

$$Re = V \cdot D / \nu \quad \text{avec} \quad V : \text{la vitesse moyenne (m.s}^{-1}\text{),}$$
$$D : \text{le diamètre du canal (m),}$$
$$\nu : \text{la viscosité cinématique (m}^2\text{.s}^{-1}\text{).}$$

Compte tenu des dimensions et des débits auxquels nous travaillons, les nombres de Reynolds sont très faibles (< 1) [8]. Les écoulements sont donc laminaires (en régime établi) et la charge subie par le microcanal peut alors être calculée à partir de la loi d'Hagen-Poiseuille.

$$q_v = \frac{\pi \cdot d^4 \Delta p}{128 \cdot \eta \cdot l} \quad \text{avec} \quad q_v : \text{le débit du liquide (m}^3\text{.s}^{-1}\text{),}$$
$$l : \text{la longueur du microcanal (m),}$$
$$d : \text{le diamètre du microcanal (m),}$$
$$\eta : \text{la viscosité dynamique (Pa.s),}$$
$$\Delta p : \text{la perte de charge (Pa).}$$

Cette loi est utilisée pour calculer la perte de charge engendrée par les capillaires de connexions du microcanal ou par les capillaires utilisés comme charge hydrodynamique dans les bancs de test.

a) Test à 'faibles' débits

Les tests à débits faibles permettent de détecter l'existence de microfuites. Les tests hydrodynamiques sont effectués au moyen d'un banc de test 'bas débit' au centre duquel se trouve le microcanal à tester (**figure 11**) connecté par des capillaires d'entrée (e) et de sortie (s). Une charge hydrodynamique peut être placée en amont du microsystème ; elle est composée d'une longueur l_c de capillaire de diamètre interne $d_{ic} = 20 \mu\text{m}$. Le débit est imposé en amont du microsystème par un pousse seringue et la lecture du débit en sortie se fait par suivi de l'avancée du front de liquide dans un tube de diamètre interne de $840 \mu\text{m}$. Ce dernier ne constitue pas une charge supplémentaire pour le microcanal puisque son diamètre est 10 fois supérieur au capillaire de sortie du microcanal (en effet, le diamètre d'un tube intervient au dénominateur et à la puissance 4 dans la relation qui permet de calculer la perte de charge qu'il engendre). L'erreur de lecture dans ce tube est de $0,5 \text{ mm}$ soit un volume de 108 nL . Les tests se déroulent donc sur plusieurs heures afin que ce volume lié à l'incertitude de lecture soit négligeable ($< 1\%$) face au volume total injecté dans le microsystème. Nous avons validé au préalable l'étanchéité du banc de mesure en remplaçant le microsystème par une longueur équivalente de capillaire lors d'un test à un débit de $50 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Lors du test du microsystème, si le débit lu en sortie est différent de celui imposé en amont, soit le microsystème présente des microfuites, soit des bulles se sont intercalées dans le circuit. Dans ce dernier cas, les tests seront faussés, nous prenons donc toutes les précautions pour éviter de créer des bulles dans le circuit (cependant, nous commençons les tests effectifs après une phase de démarrage de plusieurs heures à la fin de laquelle l'évacuation des bulles parasites est en général réalisée).

Dans le banc de test, le microsystème est connecté à un pousse seringue (**Harvard Apparatus, MA, USA**) dont le débit minimal est de $50 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ et le débit maximal de quelques $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Les connexions sont assurées par des ensembles manchons / férules commercialisés par **Up Church Scientific (WA, USA)**. De tels ensembles sont composés d'un manchon dans lequel est enfilé le capillaire à connecter. Le manchon est ensuite introduit dans une férule vissée sur un raccord (**figure 11-a**). Les connectiques utilisées sont les suivantes : manchon **F 181** pour un capillaire de diamètre externe $150 \mu\text{m}$; férule **F 125**

pour connecter les capillaires, fêrulle F 300 pour le tube en Téflon® ; raccord de type P 720 pour relier deux capillaires et raccord de type P 770 pour connecter un tube en Téflon® de diamètre externe 1,6 mm. La pression exercée lors du serrage, par la fêrulle sur le manchon, assure l'étanchéité (celle-ci est garantie par le fabricant jusqu'à au moins 200 bar).

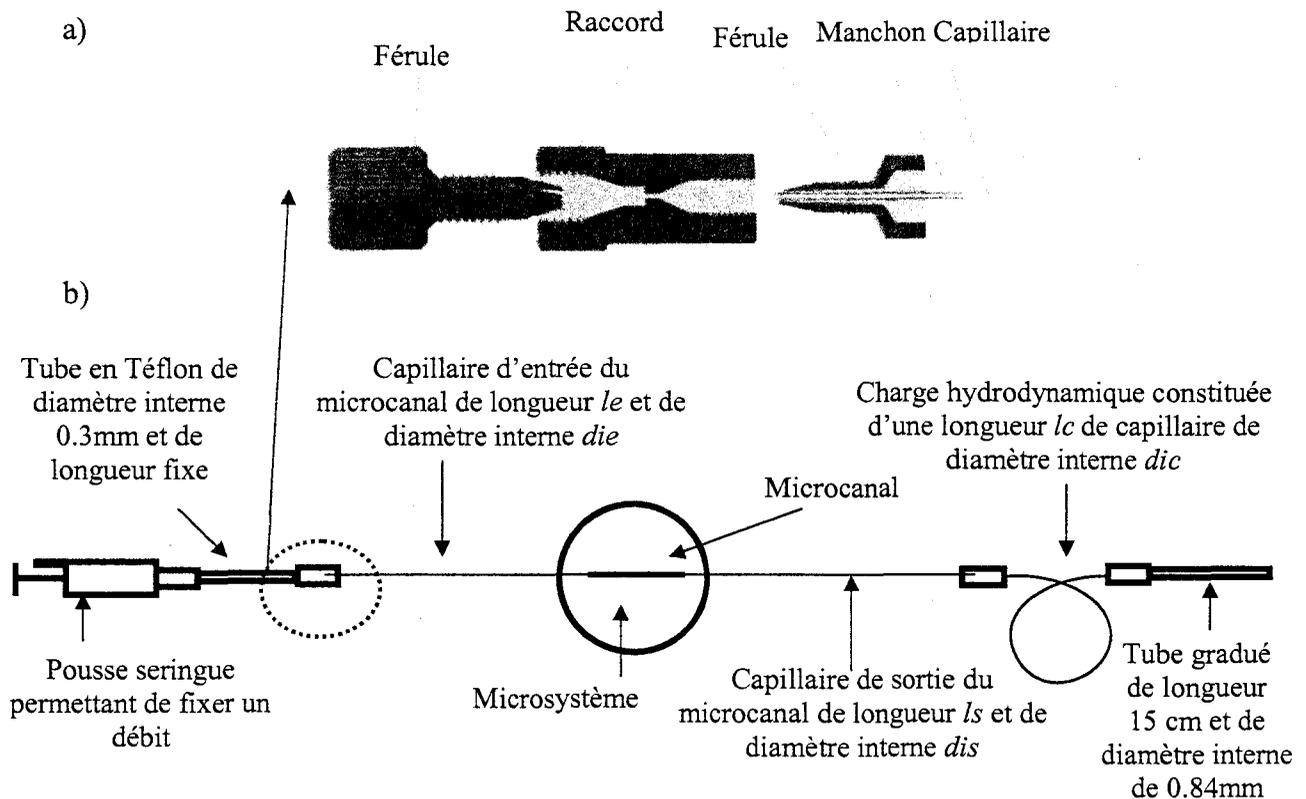


Figure 11 : Test des canaux à faible débit : a) raccord **Up-Church P 770** utilisé pour connecter un tube en Téflon® à un capillaire ; b) dispositif comprenant un pousse-seringue connecté au microsystème par un tube en Téflon®, le microsystème connecté à une charge hydrodynamique ainsi que le tube de lecture du débit en sortie.

Une première série de tests est réalisée avec de l'eau desionisée (viscosité = 1 mPa.s) à un débit de 100 nL.min^{-1} sur un microcanal de section $100 \times 160 \text{ } \mu\text{m}^2$. Les capillaires d'entrée et de sortie du microsystème sont identiques : $le = ls = 10 \text{ cm}$ et $die = dis = 75 \text{ } \mu\text{m}$. Ici, il n'y a pas de charge additionnelle (elle sera utilisée pour l'évaluation des canaux de type 2). Aucune fuite n'est observée pendant la durée des tests (6 heures), la charge subie par le microcanal et constituée par le capillaire de connexion en sortie est alors calculée par la loi d'Hagen-Poiseuille à 1 bar. Trois tests ont été réalisés sur des microcanaux différents.

L'étape suivante est d'étudier la résistance du matériau à la circulation continue des solvants utilisés. Des tests identiques à ceux décrits précédemment ont été réalisés avec du méthanol (viscosité dynamique = 0,52 mPa.s) et avec un mélange 'eau (49,5%); acétonitrile (49,5 %); acide formique (1%)' (couramment utilisé dans le cadre de la séparation par chromatographie) de viscosité dynamique estimée théoriquement à 0,67 mPa.s. Ils permettent également de mettre en évidence l'absence de microfuites (dans ce cas, trois tests ont également été réalisés sur des microcanaux différents).

b) Test à haut débit

i) Tests de résistance à la pression par ajustement du débit

Une série de tests à débit ajustable a été effectuée, en collaboration avec M^{lle} Kashia Chuda (LCOM), par circulation du liquide dans les microcanaux au moyen d'une pompe de chromatographie liquide (**Merck L-6200A Intelligent pump**) qui délivre des débits allant de quelques dizaines de $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ à plusieurs $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Les connexions utilisées pour ce banc (**figure 12**) sont les mêmes que celles utilisées pour le banc 'faibles débits'. Un capteur de pression intégré à la pompe permet de mesurer la pression engendrée par le microsystème. Ce dernier est constitué du microcanal et de capillaires d'entrée (*e*) et de sortie (*s*) de diamètre externe 150 μm , de diamètre interne $die = dis = 50 \mu\text{m}$ et de longueur $le = ls = 10 \text{ cm}$. Notons que le microsystème peut être connecté en aval à une charge hydrodynamique constituée d'un capillaire de diamètre interne $dic = 20 \mu\text{m}$.

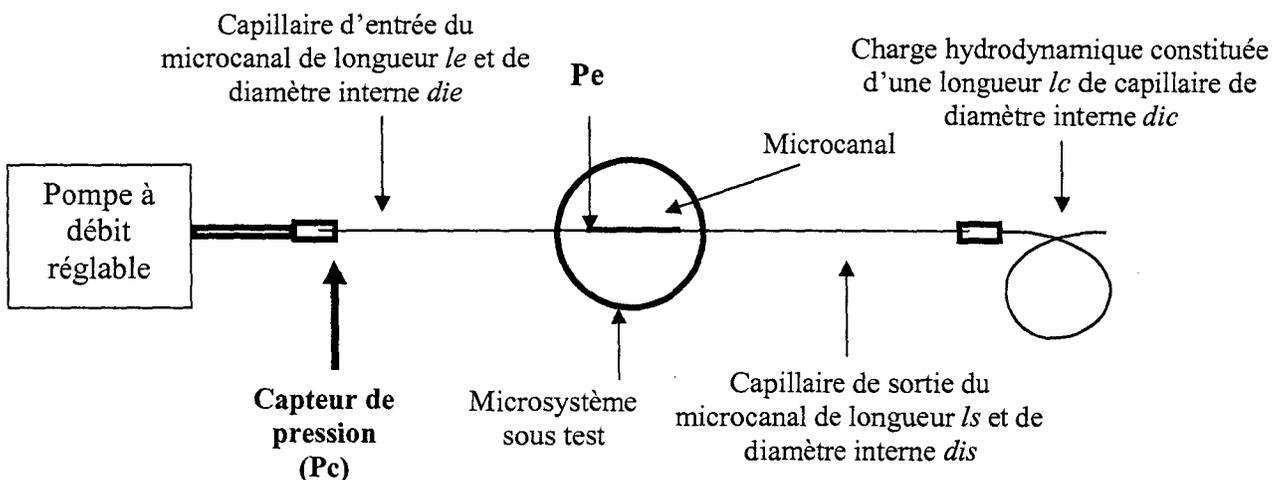


Figure 12 : Banc de test permettant de mesurer la tenue à la pression des microcanaux à haut débit.

Ce banc comprend une pompe de chromatographie liquide à débit variable avec capteur de pression, le microsystème connecté à des capillaires d'entrée et de sortie, ainsi qu'une charge hydrodynamique éventuelle.

Des canaux de section $100 \times 160 \mu\text{m}^2$, $200 \times 160 \mu\text{m}^2$ et $500 \times 160 \mu\text{m}^2$ sont testés en l'absence de charge hydrodynamique additionnelle. Les pertes de charge induites par ces canaux sont considérées comme étant négligeables devant celles induites par les capillaires de connexion (la perte de charge induite par un microcanal de section $200 \times 160 \mu\text{m}^2$ est environ 100 fois inférieure à celle créée par un capillaire de diamètre interne $50 \mu\text{m}$). Cependant, la pression mesurée par le capteur de la pompe (P_c) ne correspond pas directement à la pression subie par le microcanal. Le capteur mesure la pression induite par le microcanal associé aux deux capillaires d'entrée et de sortie. Le microcanal lui-même ne supporte que la pression induite par le capillaire de sortie. On peut donc approximer la pression supportée par le microcanal à la moitié de celle indiquée par le capteur de pression puisque les capillaires de connexion sont de longueurs identiques (la chute de pression dans le microcanal peut en effet être négligée).

Les microcanaux (de section $100 \times 160 \mu\text{m}^2$, $200 \times 160 \mu\text{m}^2$ et $500 \times 160 \mu\text{m}^2$) supportent des pressions d'environ 40 bar pour un débit maximum de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (**figures 13-15**). Sur chaque graphique, les points de mesure ainsi que la droite de régression sont tracés. Les pentes des droites de régression (exprimées en $\text{bar} \cdot \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) obtenues à partir des courbes de débit en fonction de la pression sont quasiment identiques à moins de 8% près (58,3 pour le canal de section $100 \times 160 \mu\text{m}^2$; 64,1 pour le canal de section $200 \times 160 \mu\text{m}^2$; 59,9 pour le canal de section $500 \times 160 \mu\text{m}^2$). Ces résultats concordent bien avec le fait que la pression induite par le microcanal est négligeable devant celle induite par les capillaires de connexion du microsystème.

Pression subie par le microcanal (bar)

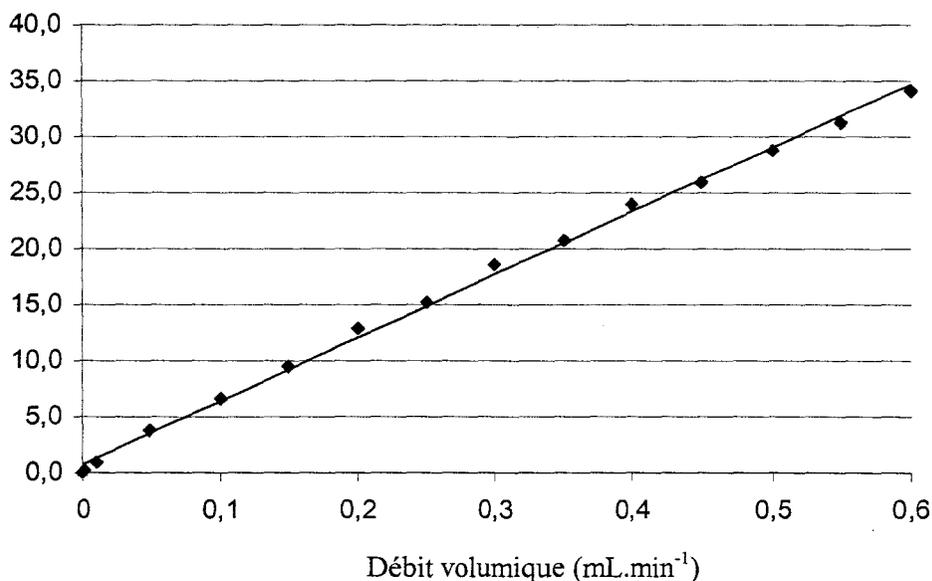


Figure 13 : Evolution de la pression subie par les microcanaux de type 1 de section $100 \times 160 \mu\text{m}^2$ en fonction du débit de méthanol (connexion du microcanal par des capillaires de diamètre interne $d_{ie} = d_{is} = 50 \mu\text{m}$ et de longueur $l_e = l_s = 10 \text{ cm}$). Ils montrent une résistance à une pression de 35 bar.

Pression subie par le microcanal (bar)

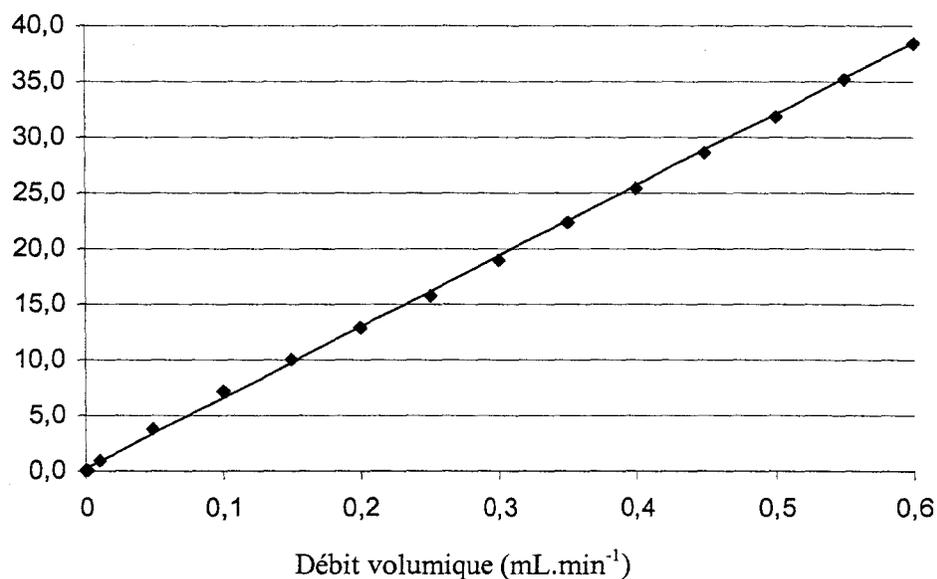


Figure 14 : Evolution de la pression subie par les microcanaux de type 1 de section $200 \times 160 \mu\text{m}^2$ en fonction du débit de méthanol (connexion du microcanal par des capillaires de diamètre interne $d_{ie} = d_{is} = 50 \mu\text{m}$ et de longueur $l_e = l_s = 10 \text{ cm}$). Ils montrent une résistance à une pression de 38 bar.

Pression subie par le microcanal (bar)

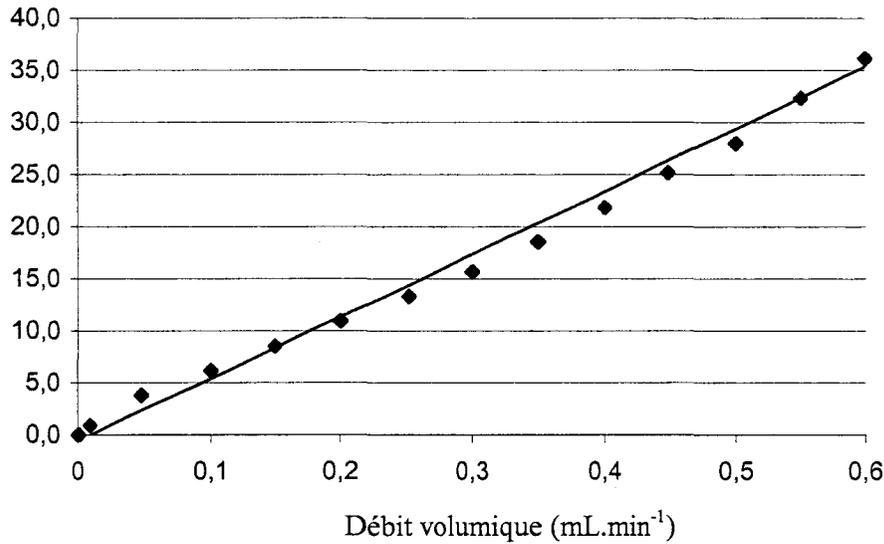


Figure 15 : Evolution de la pression subie par les microcanaux de type 1 de section $500 \times 160 \mu\text{m}^2$ en fonction du débit de méthanol (connexion du microcanal par des capillaires de diamètre interne $d_{ie} = d_{is} = 50 \mu\text{m}$ et de longueur $l_e = l_s = 10 \text{ cm}$). Ils montrent une résistance à une pression de 36 bar.

La loi d'Hagen-Poiseuille donne une pente de 55 en considérant l'influence du canal négligeable devant un capillaire de diamètre interne $50 \mu\text{m}$ et de longueur 10 cm . L'écart entre résultats théoriques et expérimentaux est lié à la nécessité de mesurer la pression engendrée par l'ensemble du microsystème pour en déduire la pression subie par le microcanal (le microcanal doit obligatoirement être connecté en amont pour être alimenté). L'essentiel des résultats est présenté dans le **tableau 2**.

Dimensions de la section du microcanal	$100 \times 160 \mu\text{m}^2$	$200 \times 160 \mu\text{m}^2$	$500 \times 160 \mu\text{m}^2$
Pression supportée (à un débit de)	35 bar (à $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	38 bar (à $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	36 bar (à $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
Ecart avec la théorie	5,7 %	14,0 %	8,2 %

Tableau 2 : Résistance à la pression des différents microcanaux de type 1 mesurée par circulation de méthanol.

Afin de s'affranchir de cette erreur, nous travaillons pour le test suivant à débit constant en plaçant en aval du microsystème une charge beaucoup plus importante que celle induite par le microsystème.

ii) Tests de résistance à la pression par ajustement de la charge

Dans ce cas, les canaux sont testés à débit fixe en utilisant une charge en sortie. Cette charge est réalisée à partir d'une longueur lc (comprise entre 0 et 6cm) de capillaire de diamètre interne $dic = 20 \mu\text{m}$ (**figure 12**). Des canaux de section $100 \times 160 \mu\text{m}^2$ sont testés par circulation de méthanol pendant 8 heures. Dans le cadre de ces tests, le microsysteme est connecté à des capillaires de diamètre externe $150 \mu\text{m}$, de diamètre interne $die = dis = 75 \mu\text{m}$ et de longueur $le = ls = 10 \text{cm}$. Ainsi, la perte de charge induite par l'ensemble du microsysteme (canal + capillaires de connexion) est négligeable devant la charge additionnelle placée en aval du microsysteme. En effet, la charge théorique induite par le microsysteme à un débit de $50 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ est inférieure à 1 bar (la pression mesurée sans charge additionnelle est de 0,5 bar).

Ces tests montrent une tenue en pression des canaux à 60 bar à débit constant de $50 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ (**figure 16**) avec une charge additionnelle de longueur $lc = 5,5 \text{cm}$ (la perte de charge théorique induite par 5,5 cm de capillaire de diamètre interne $20 \mu\text{m}$ est de 61 bar à ce débit).

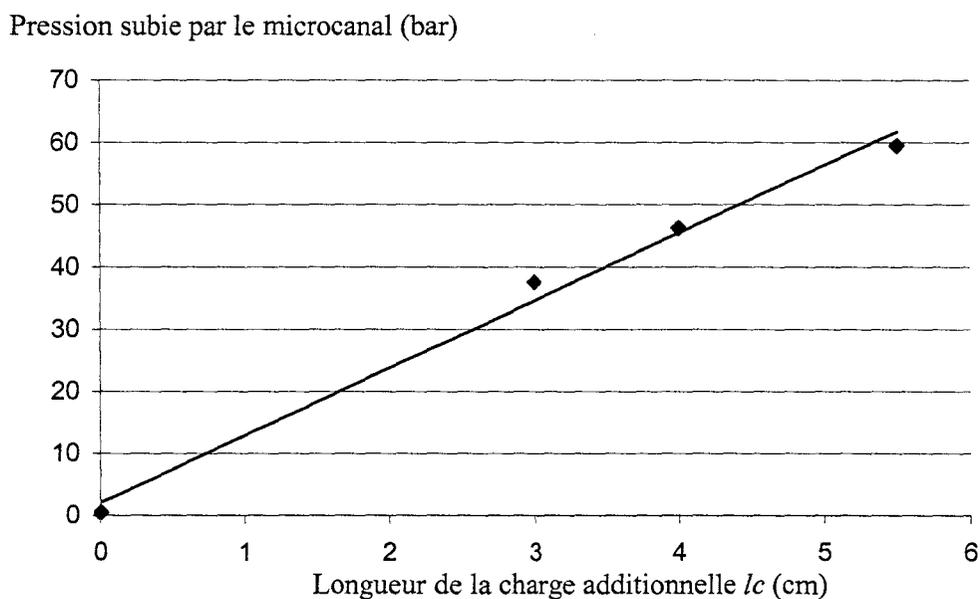


Figure 16 : Evolution de la pression dans un microcanal de section $100 \times 160 \mu\text{m}^2$ pour différentes charges (capillaire de diamètre interne $dic = 20 \mu\text{m}$ et de longueur lc) à débit constant de méthanol de $50 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Le microcanal supporte une pression de 60 bar.

Nous avons ensuite porté le débit à $70 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ et la pression mesurée est d'environ 80 bar (perte de charge théorique : 85 bar soit une erreur d'environ 5 %). Le microcanal est resté étanche plus de 25 heures avec une circulation continue de méthanol avant de céder (**figure 17**). Cette durée est largement suffisante pour effectuer les analyses souhaitées. Cette

fiabilité des canaux doit ensuite être testée en conditions réelles d'utilisation, c'est à dire après fonctionnalisation par intégration *in situ* de monolithes.

Pression subie par le microcanal (bar)

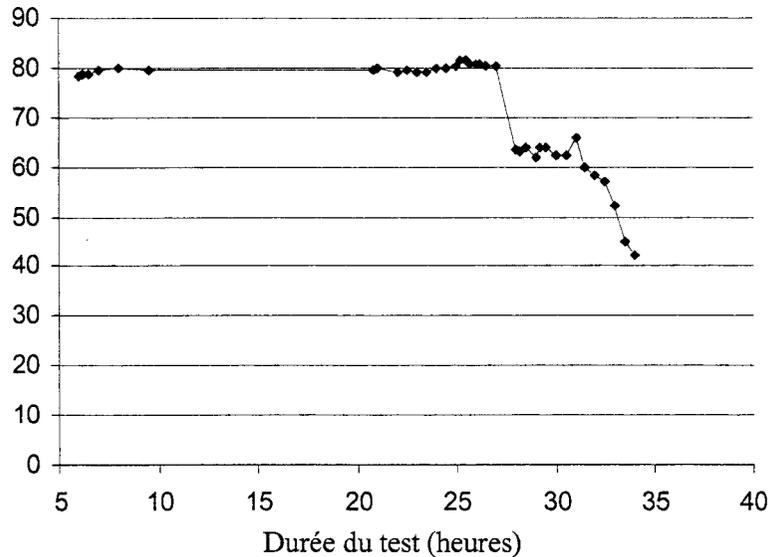


Figure 17 : Evolution de la pression subie par le microcanal de section $100 \times 160 \mu\text{m}^2$ à un débit de $70 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ de méthanol. La charge additionnelle est constituée d'une longueur $l_c = 4 \text{ cm}$ de capillaire de diamètre interne $d_{ic} = 20 \mu\text{m}$.

c) Intégration de monolithes dans les microcanaux

Rappelons que la fonctionnalisation du microcanal est obtenue grâce à l'intégration d'un monolithe. L'objectif de ces tests, réalisés en collaboration avec M^{elles} Séverine Le Gac et Kashia Chuda (LCOM), est de valider l'intégration de monolithes dans des microcanaux en SU-8. Il s'agit donc de vérifier la faisabilité mais également l'efficacité de l'ancrage du monolithe dans le microcanal.

i) Ancrage du monolithe dans le microcanal

Rappelons que la fabrication des structures monolithiques est réalisée en plusieurs étapes. Les paramètres de fabrication des monolithes dans le microsysteme au cours des étapes fondamentales de réalisation sont les suivants :

- mélange de polymérisation (monomère + 70% de porogène afin de ne pas fabriquer un monolithe trop dense) injecté et insolé localement *in situ* sous UV pendant 2 heures,
- rinçage abondant au méthanol pendant 10 heures.

Si la phase monolithique n'est pas ancrée de façon covalente et n'est pas bien répartie sur les parois en SU-8 du microcanal, des écoulements préférentiels peuvent intervenir le long des parois du microcanal et la résistance hydrodynamique y sera beaucoup plus faible. Le liquide circule donc en dehors de la colonne monolithique qui est 'court-circuitée' et perd de ce fait l'essentiel de son efficacité. Un traitement préliminaire des parois du microcanal avec un agent de couplage s'avère donc nécessaire, pour assurer l'ancrage covalent du monolithe.

Le microcanal subit un prétraitement par circulation d'un mélange à base d'une amine (DETA) permettant d'ancrer la phase monolithique sur la résine. Afin de vérifier l'efficacité de ce traitement, il est nécessaire de sacrifier le microsystème. Le couvercle est cassé pour observer au microscope électronique à balayage l'intérieur du microcanal. On remarque que la phase monolithique s'est désolidarisée mais qu'une partie de cette structure est restée ancrée sur les parois latérales et inférieures du microcanal (**figure 18**). Cette observation montre l'ancrage du monolithe dans le microcanal. [6].

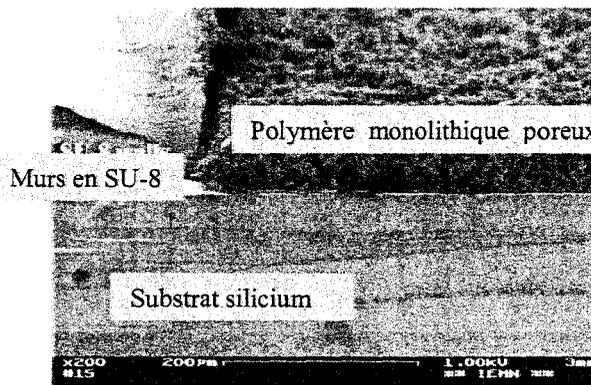


Figure 18 : Vue en coupe au microscope électronique à balayage du monolithe dans un microcanal en SU-8. Le monolithe est ancré sur la couche d'adhérence en SU-8 déposée sur le substrat ainsi que sur les murs formant le microcanal.

ii) **Evaluation de la perte de charge induite par la structure monolithique dans le microcanal**

Les pertes de charge induites par des structures monolithiques intégrées dans des canaux de section $100 \times 160 \mu\text{m}^2$ sont mesurées pour connaître l'impact sur le microsystème. La perte de charge induite par les capillaires de diamètre interne $75 \mu\text{m}$ ($< 1 \text{ bar}$) est négligeable devant la perte de charge induite par la structure monolithique. Ces structures monolithiques qui peuvent avoir des dimensions caractéristiques nanométriques induisent des pertes de charge relativement importantes même à faible débit. Ces tests sont donc réalisés à

des débits bien inférieurs à ceux imposés lors des tests de résistance à la pression des microcanaux qui étaient alors vides.

L'influence du temps de polymérisation de la phase monolithique intégrée dans un microcanal est étudiée (**figure 19**) dans le but de diminuer la résistance hydrodynamique de la microcolonne tout en préservant son efficacité. La mesure de perte de charge est réalisée à l'aide du banc de test utilisé pour les tests à débit ajustable. Plusieurs temps de polymérisation de 20, 30 et 40 minutes permettent de générer des phases dont la résistance hydrodynamique augmente avec ce temps de polymérisation. Les pentes des droites représentant la perte de charge par centimètre en fonction du débit sont de 0,2 ; 10 et $16 \text{ bar.cm}^{-1} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ pour des temps de polymérisation respectifs de 20, 30 et 40 minutes.

Les pertes de charge induites par les structures monolithiques sont de plusieurs dizaines de bar par centimètre à des débits inférieurs à $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

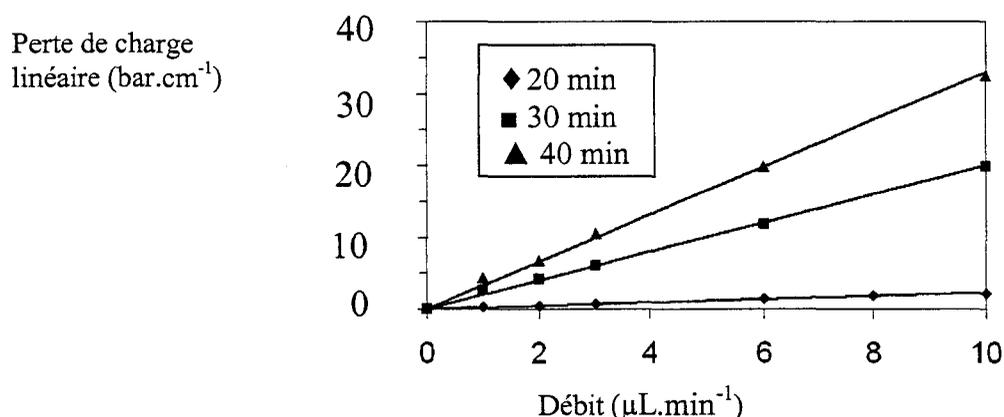


Figure 19 : Evolution de la perte de charge induite par le monolithe dans le microcanal en fonction du débit pour des structures monolithiques réalisées avec des temps de polymérisation différents

iii) Tests en spectrométrie de masse

Nous avons réalisé dans ces microcanaux remplis d'une phase monolithique des tests de dessalage, de séparation et de digestion analysés par spectrométrie de masse.

Tests de dessalage

Les tests de dessalage ont pu être faits avec une solution de 4 peptides standard (repérés par des * sur les spectres) est dessalée après son passage dans la phase monolithique. L'opération de dessalage comprend les étapes suivantes : la colonne est équilibrée avec une solution (acétonitrile : 49,5 % ; eau : 49,5 % ; 1 % TFA) puis lavée avec une solution d'eau

desionisée mélangée à 1 % de TFA. La solution de peptide (3-4 μL) est chargée dans le monolithe par pousse seringue puis la phase monolithique lavée avec la dernière solution (Eau, 1% TFA).

Les peptides sont élués avec la solution (acétonitrile : 49,5 % ; eau : 49,5 % ; 1 % TFA) à un débit de 200 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$. L'échantillon est prélevé en sortie de microcanal grâce à une micropipette, les microgouttes sont ensuite analysées par spectrométrie de masse MALDI.

Les spectres obtenus par spectrométrie de masse MALDI avant (**figure 20-a**) et après (**figure 20-b**) passage de la solution dans la colonne montrent une disparition des contaminations ainsi que des adduits salins.

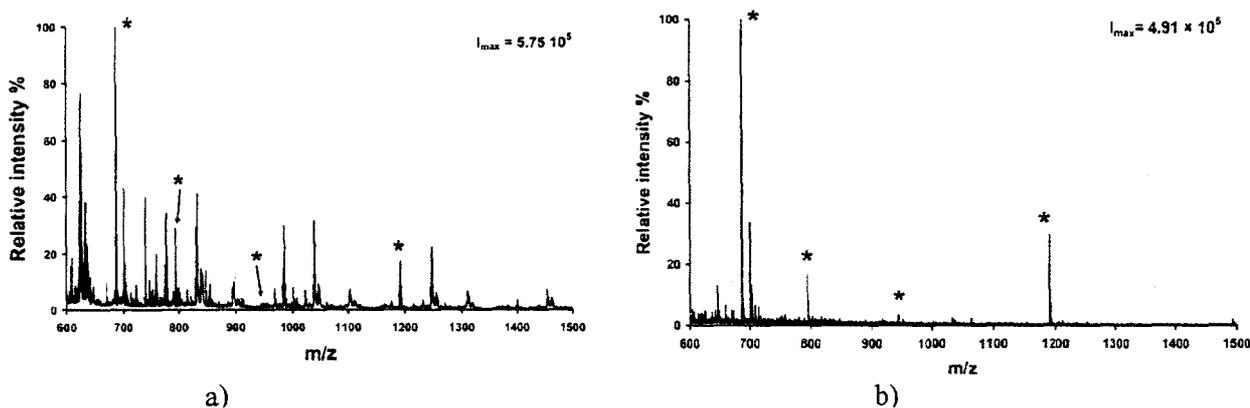


Figure 20 : Spectre de masse MALDI d'une solution de 4 peptides standard : a) avant passage dans la structure monolithique intégrée dans le microsystème ; b) après passage dans la structure monolithique. Les peptides identifiés sont annotés.

Une autre solution a également été dessalée (**figure 21**) par connexion du microsystème à une source commerciale nanoESI Picotip (New Objective, Cambridge, MA, USA) de diamètre interne 15 μm . La connexion du microsystème est réalisée grâce à des éléments en Téflon® (LC-Packings Dionex, Amsterdam, Pays- Bas). L'échantillon est injecté dans le microsystème (Famos Injection System, LC-Packings Dionex, Amsterdam, Pays- Bas) à un débit de 200 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Ultimate Micropump et Accurate stream splitter, LC-Packings Dionex, Amsterdam, Pays- Bas). L'élué est assuré avec un gradient de solvant partant d'une solution (Eau ; 0,1% de TFA) puis contenant 5 à 80 % d'acétonitrile en 30 minutes. La détection est assurée par un spectromètre de type QqTOF API Qstar (Applied Biosystems, MA, USA).

La focalisation sur différentes zones spectrales (**figure 22**) montre l'efficacité du dessalage. En effet, l'amplitude des pics caractéristiques des sels $(M+Na+H)^{2+}$ et $(M+2H)^{2+}$ est faible devant celle des pics des peptides.

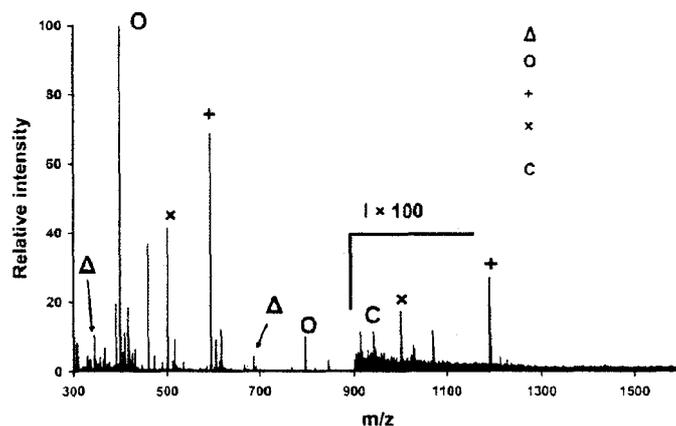


Figure 21 : Solution de peptides (les peptides sont annotés sur la figure) dessalée dans la structure monolithique en microcanal connecté à une source standard nanoESI.

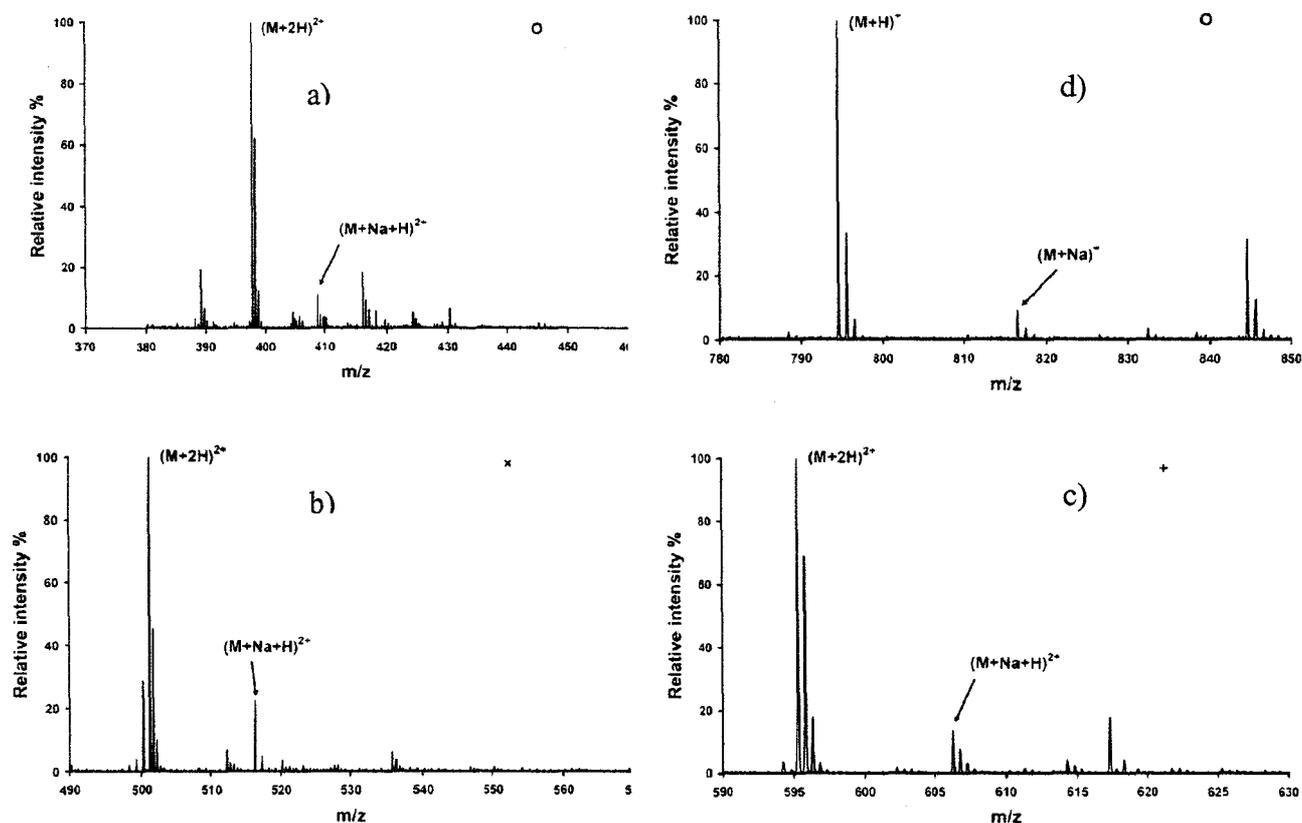


Figure 22 : Focalisation Zoom sur différentes gammes (m/z) du spectre : a) gamme 370-460 ; b) gamme 490-570 ; c) gamme 590-630 ; d) gamme 780-850. Nous pouvons observer qu'il y a bien eu dessalage de la solution de peptides.

Tests de séparation

Le microsysteme (**figure 23-a**) supporte la pression induite par les tests de séparation d'un digestat de cytochrome C en nano LC durant 12 heures, sous une pression moyenne d'environ 50 bar (**figure 23-b**) [9] à un débit de $200 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ (les variations de pression observée sur la **figure 23-b** correspondent à des variations de concentration en acétonitrile et non à une fuite du microsysteme). Cependant, les résultats de tests en séparation ne sont pas efficaces puisque tous les peptides contenus dans le mélange sont élués en même temps. La longueur, mais également la section de la colonne de séparation, jouent un rôle fondamental sur son efficacité (la longueur du microcanal qui est de 4 cm est trop courte pour une section d'environ $100 \times 160 \text{ }\mu\text{m}^2$).

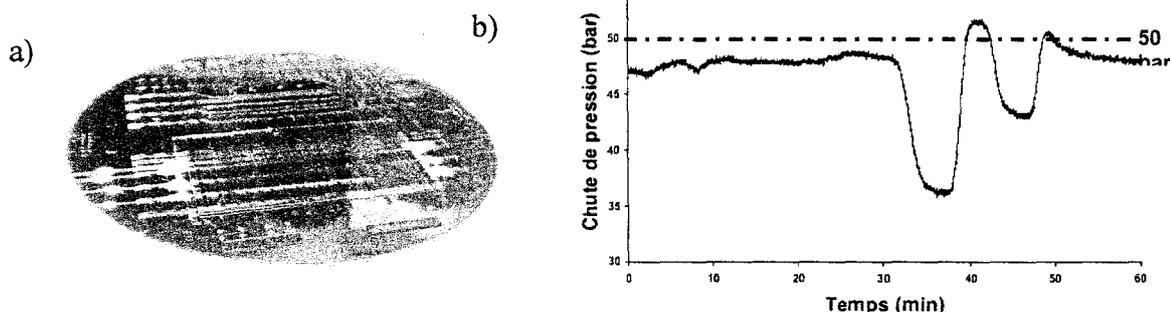


Figure 23 : Microcanal de type 1 de section $200 \times 160 \text{ }\mu\text{m}^2$ intégrant une structure monolithique : a) photographie du microsysteme ; b) chute de pression mesurée de part et d'autre de la colonne monolithique préparée dans le microsysteme lors d'une expérience de séparation en nanoLC.

Test de digestion

Nous avons également réalisé une étape de digestion à partir de ce type de microcanal en SU-8. Un traitement amine est réalisé pour favoriser l'ancrage du monolithe. La structure monolithique est polymérisée pendant 6 min puis subit un lavage au THF (Tetra Hydro Furane permettant de laver le monolithe) pendant 1h. Un greffage de trypsine est ensuite réalisé à température ambiante pendant 4h. Il s'en suit un lavage de 2h dans le PBS (permettant d'éliminer la trypsine non greffée) et de 2h dans le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (permettant d'équilibrer la colonne). La digestion de $10 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de cytochrome C de bovin est ensuite effectuée en continu pendant un temps de 45 secondes. Ainsi sur un échantillon de 20 peptides, 15 peptides sont retrouvés après digestion (mais pas les peptides les plus gros). Cela peut s'expliquer par deux raisons : le monolithe est trop poreux (40 % de monomère) et la longueur développée (3,5 cm) n'est pas suffisante (soulignons que des résultats de digestion totale sont obtenus dans un capillaire de longueur 25 cm et de diamètre interne $75 \text{ }\mu\text{m}$).

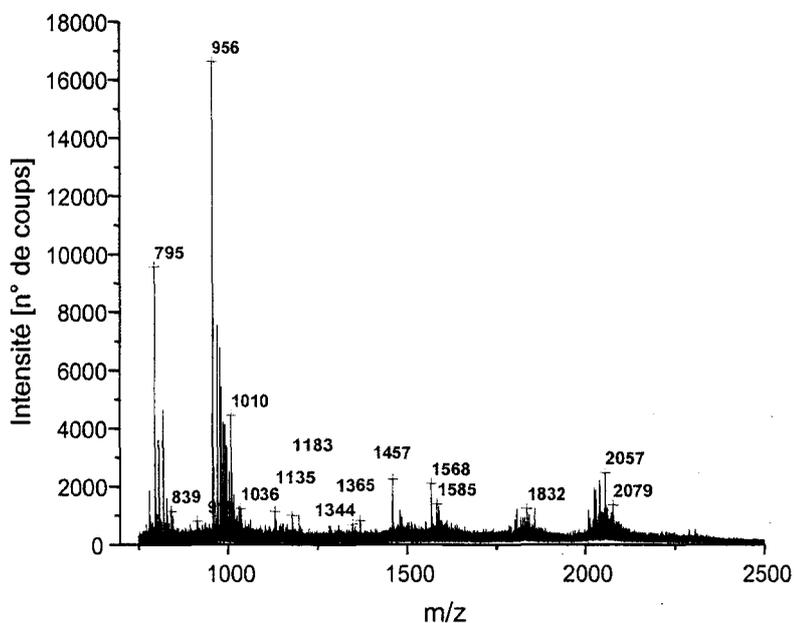


Figure 24 : Spectre de masse MALDI issu de la digestion de cytochrome C de bovin obtenu par fonctionnalisation à la trypsine d'un monolithe intégré dans un microcanal de type 1.

Nous constatons après analyse du spectre que 58% de la protéine a été identifiée (il faut 50% pour valider sa reconnaissance), le spectre (**figure 24**) n'est pas de très bonne qualité et il y a beaucoup de bruit mais le recouvrement est bon. Les conditions d'immobilisation sont à optimiser mais cet essai montre la faisabilité de la digestion dans un canal de quelques centimètres de longueur.

B) Canaux de type 2

L'objectif que nous nous sommes fixés ici est de réaliser sur une faible surface ($< 100 \text{ mm}^2$) des microcanaux ayant une grande longueur au regard des dimensions de la section. Nous choisissons de réaliser des canaux de 15 cm de longueur et de section $30 \times 60 \mu\text{m}^2$ (rapport *longueur* du microcanal sur *hauteur* d'environ 2500). Afin de pouvoir obtenir cette longueur de 15 cm sur un substrat de diamètre 3 pouces (7,6 cm), le canal a la forme d'un serpent.

1) Technologie de fabrication

a) Procédé SU-8 bicouche

Le procédé multicouche développé, comprenant deux couches épaisses, permet de connecter des capillaires de section plus importante que la section du microcanal à réaliser.

En effet, le diamètre externe des capillaires est de $150\ \mu\text{m}$ alors la section du canal est un rectangle dont les côtés sont inférieurs à $100\ \mu\text{m}$. Dans ce cas, une première couche, dans laquelle sont réalisés les accès capillaires, surélève le microcanal. Ce dernier est ensuite réalisé dans une seconde couche superposée à la première (**figure 25**). La seconde couche intégrera également les accès capillaires afin que ceux-ci aient une hauteur supérieure à $150\ \mu\text{m}$.

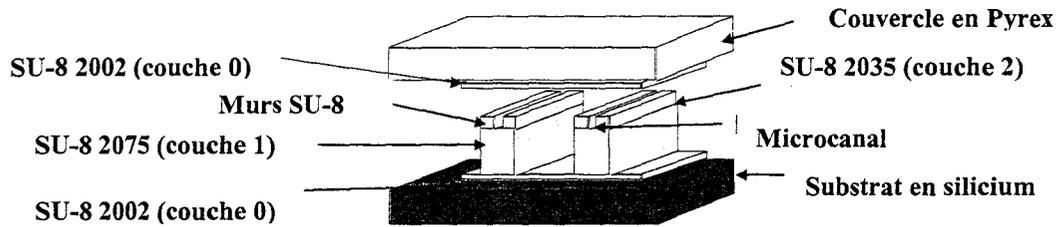


Figure 25 : Schéma de principe de réalisation d'un microcanal en structure bicouche. La couche 0 est la couche d'accroche, la couche 1 permet de surélever le microcanal et la couche 2 de former les murs du microcanal.

La **figure 26** illustre la jonction entre un capillaire et le microcanal présentant une aire de chevauchement entre leur section interne.

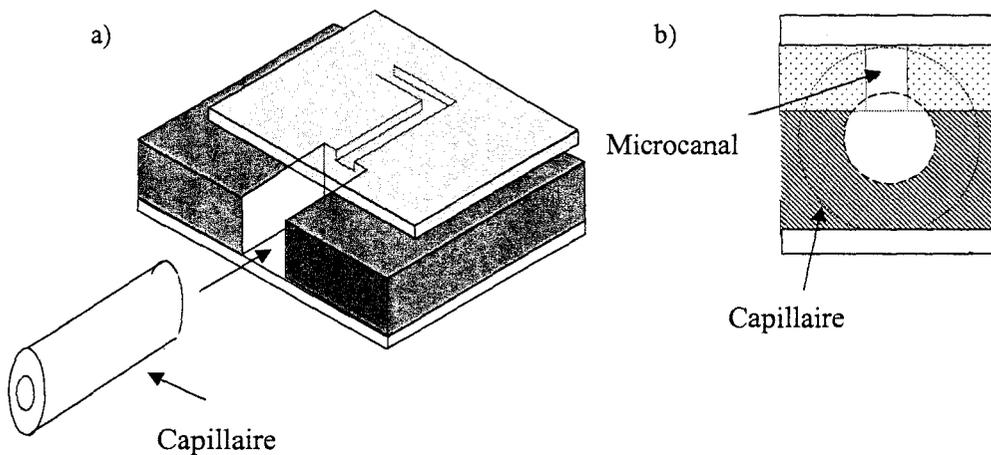


Figure 26 : Jonction entre le capillaire de diamètre externe $150\ \mu\text{m}$ (inséré dans son accès dédié) et le microcanal de section $30 \times 80\ \mu\text{m}^2$: a) vue en 3D ; b) vue en coupe.

Les deux couches sont réalisées consécutivement et de manière classique (hormis l'étape de révélation). La première est déposée par enduction (SU-8 2075 d'épaisseur $110\ \mu\text{m}$), avec comme paramètres : $v = 1600\ \text{rpm}$; $a = 500\ \text{rpm.s}^{-1}$; $t = 30\ \text{s}$. Cette couche subit un premier recuit à 95°C pendant 25 min avant d'être insolée à travers le premier niveau

de masque (**figure 27- a**) pendant 30 s (intensité de la lampe UV $I = 13 \text{ mW.cm}^{-2}$). Cette couche est finalement recuite à 95°C pendant 12 min. L'ensemble des paramètres utilisés pour déposer les couches de SU-8 est regroupé dans le **tableau 3**. La seconde (SU-8 2035 d'épaisseur $80\mu\text{m}$) est ensuite réalisée de la même façon avec les paramètres suivants : $v = 2200 \text{ rpm}$; $a = 500 \text{ rpm.s}^{-1}$; $t = 30 \text{ s}$. Elle subit un premier recuit à 95°C pendant 10 min avant d'être insolée à travers le second niveau de masque (**figure 27-b**) pendant 18 s ($I = 7 \text{ mW.cm}^{-2}$). Puis elle est finalement recuite à 95°C pendant 4 min.

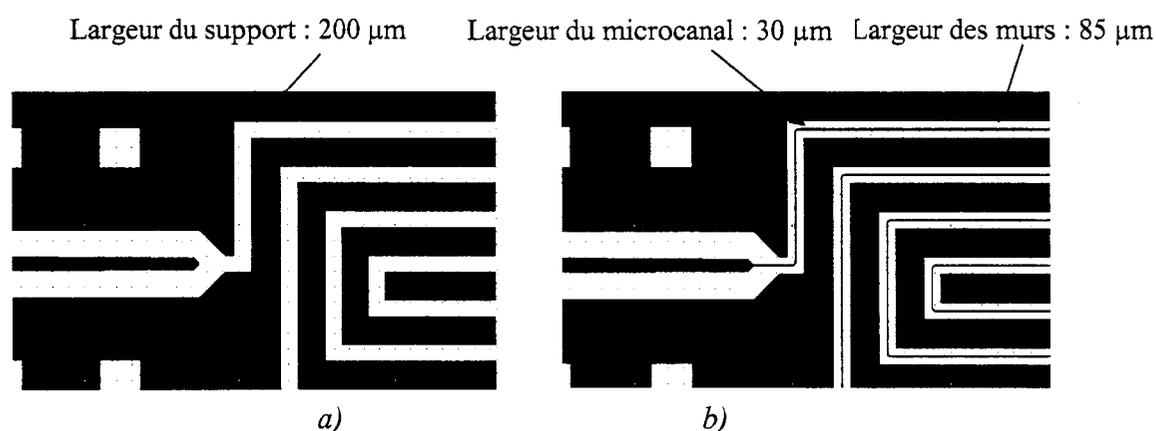


Figure 27 : Masques permettant de réaliser les canaux destinés à la séparation a) niveau 1 permettant de réaliser les supports des microcanaux afin de les surélever pour permettre la connexion des capillaires b) niveau 2 permettant de réaliser les microcanaux.

	Couche 0 (2002)	Couche 1 (2075)	Couche 2 (2035)
Étalement ($\text{Rpm/rpm.s}^{-1}/\text{sec}$)		300/100/30	300/100/30
Dépôt ($\text{Rpm/rpm.s}^{-1}/\text{sec}$)	2000/2000/30	1600/2000/30	2000/2000/30
Recuit 1 (<i>Pre Bake</i>)	$95^{\circ}\text{C} / 6 \text{ min}$	$95^{\circ}\text{C} / 35 \text{ min}$	$95^{\circ}\text{C} / 7 \text{ min}$
Exposition (14mW/cm^{-2})	10 s	40 s	12 s
Recuit 2 (<i>Post Bake</i>)	$95^{\circ}\text{C} / 2 \text{ min}$	$95^{\circ}\text{C} / 15 \text{ min}$	$95^{\circ}\text{C} / 4 \text{ min}$
Recuit 3 (<i>Hard Bake</i>)	$170^{\circ}\text{C} / 1 \text{ min}$		

Tableau 3 : Paramètres de dépôt et de recuit des différentes couches de SU-8 permettant de réaliser les microcanaux de type 2.

La révélation n'intervient qu'en dernier lieu et nécessite de changer une à deux fois le bain pour éviter sa saturation. En effet, le procédé multicouche qui génère des épaisseurs supérieures à $150 \mu\text{m}$, demande la dissolution d'une grande quantité de résine non polymérisée. Cette quantité de résine est d'autant plus importante que nous travaillons avec des masques positifs.

b) Collage du couvercle

Les canaux sont fermés grâce à un couvercle en Pyrex® collé par polymérisation d'une couche de colle en SU-8 suivant le procédé défini. Une vue en coupe d'un microcanal au microscope électronique à balayage permet d'observer l'étanchéité *a priori* de la structure ainsi que la soudure entre les différentes strates de SU-8 (**figure 28**). La section du microcanal en 'trou de serrure' s'explique par l'influence de la pression (2 bar) exercée lors du collage (sur la couche de colle en SU-8 qui déborde de part et d'autre des murs formant le microcanal mais aussi sur les murs dont les flans s'arrondissent). Cela montre aussi la potentialité de la couche de colle à 'absorber' les imperfections des surfaces à coller. L'observation de cette section met également en évidence le fait que le microcanal ne soit pas bouché.

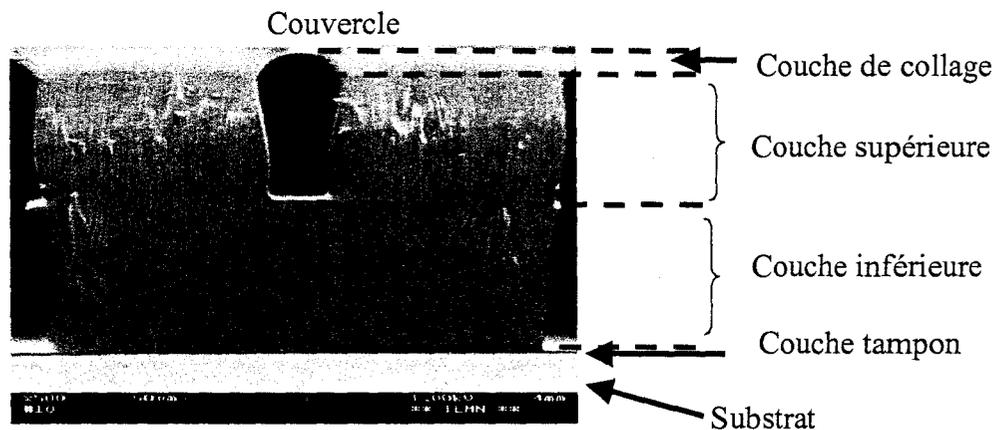


Figure 28 : Vue en coupe d'un microcanal de type 2 de section $30 \times 80 \mu\text{m}^2$. Cette forme en 'trou de serrure' s'explique par le collage du couvercle en Pyrex® (pression de 2 bar et température de 95°C).

c) Connexion à des capillaires standard

Les capillaires sont collés avec une colle époxy de manière identique aux canaux destinés au dessalage. Le dessin des accès capillaires permet d'introduire ces derniers jusqu'à l'entrée du microcanal (**figure 29**). Cette technique permet de limiter les volumes morts. La **figure 30** présente les microcanaux connectés aux capillaires insérés dans leurs accès.

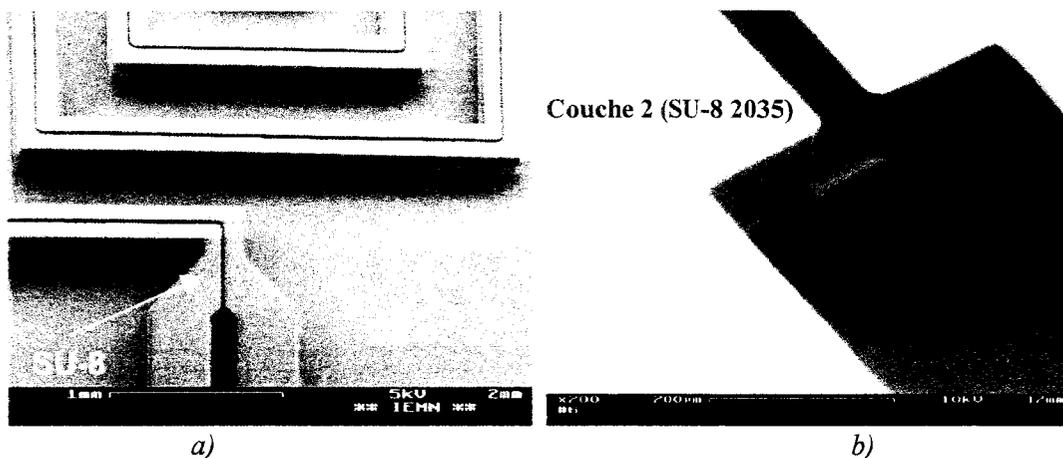


Figure 29 : Jonction entre l'accès capillaire et le microcanal de type 2 vue au MEB : a) vue d'ensemble ; b) zoom sur l'accès capillaire.

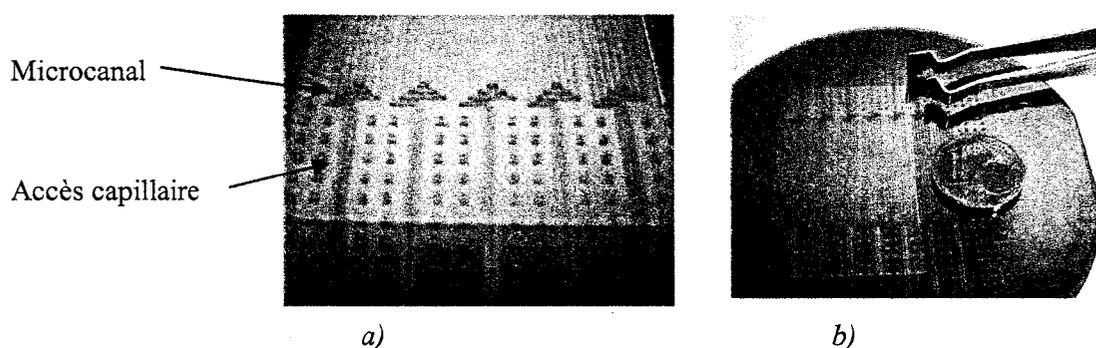


Figure 30 : Photos des microcanaux parallélisés : a) vue des accès capillaires permettant de connecter les capillaires aux canaux de type 2 en forme de 'serpentin' ; b) microsystème global sur substrat 3 pouces.

2) Evaluation des microcanaux

a) Test à 'faible' débit

Ces microcanaux de type 2 étant à priori moins robuste que les canaux de type 1, nous avons réalisé une étude à 'faible' débit (pressions plus basse) plus approfondie. Les tests à bas débit sont réalisées sur le banc présenté à la **figure 11** avec de l'eau desionisée. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (nanoLC / MS) est utilisée à des débits d'environ $200 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$, nous nous sommes donc proposés d'étudier l'étanchéité des microsystèmes pour des débits allant de $50 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ à $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Les tests à un débit de $50 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ sont réalisés avec des charges différentes de longueur l_c : 10 cm, 50 cm, 250 cm, et 300 cm de capillaire de diamètre interne $d_{ic} = 20 \mu\text{m}$ induisant des pertes de charge respectivement de 250 mbar, 1 bar, 5 bar et 6 bar. Ils sont suivis de tests à $100 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ avec

des charges de 10 cm et 90 cm de capillaire de diamètre interne de 20 μm induisant des pertes de charge respectivement de 430 mbar et 2 bar. Enfin, des tests sont effectués à des débits de 200 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ et 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ avec respectivement 20 cm et 10 cm de capillaire de diamètre interne $d_{ic} = 20\mu\text{m}$ induisant des pertes de charge respectives de 2 et 4,25 bar.

Ces tests permettent de montrer l'absence de microfuites lors de la circulation d'eau desionisée à des débits faibles pour des pressions de l'ordre du bar. L'ensemble de ces tests est récapitulé dans le **tableau 4** (les pressions indiquées correspondent aux pressions à la sortie du microcanal).

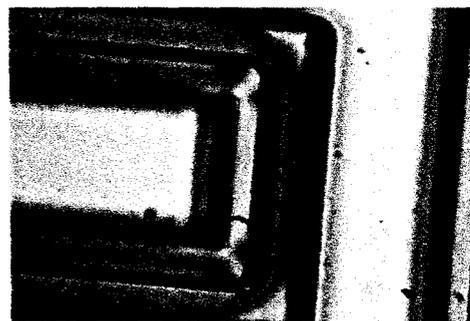
Nous effectuons également des mesures avec un mélange 'acétonitrile : 49,5% ; eau : 49,5% ; acide formique : 1 %'. La circulation du mélange dans des microcanaux de type 2 à un débit de 100 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ n'entraîne pas de fuites pendant un test d'une durée de 4 heures, la charge est alors inférieure à 1 bar. Cependant, une irisation bleue apparaît au niveau des murs (**figure 31**) révélant certainement un soulèvement du couvercle.

Charge (bar)	Débit imposé ($\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$) par le pousse-seringue			
	50	100	200	1000
	Débit mesuré en sortie ($\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$)			
0,43		99 \pm 0,4		
0,25	49 \pm 0,6			
1	50 \pm 0,9			
2		100 \pm 0,9	200 \pm 0,9	
4,25				1000 \pm 3,6
5	50 \pm 0,45			
6	50 \pm 0,45			

Tableau 4 : Pression subie par les microcanaux de type 2 (à la sortie du microcanal) à bas débit d'eau (de 50 à 1000 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$) avec des pressions allant jusqu'à 6 bar.



a)



b)

Figure 31 : Circulation du mélange 'acétonitrile / eau / acide formique' dans les canaux de type 2 : a) dans une portion rectiligne du microcanal ; b) dans les coudes du microcanal. Observation d'une coloration bleue sur les murs du microsysteme.

b) Test à 'haut' débit

Des tests à des débits plus élevés sont effectués. Ces mesures sont réalisées sur le banc utilisé pour les tests à débit ajustable des microcanaux de type 1 (présenté **figure 12**). Ainsi, avec des débits de méthanol de plusieurs centaines de microlitres par minute, des pressions de plusieurs dizaines de bar sont engendrées dans les canaux de type 2.

Soulignons que, contrairement aux cas des tests des canaux plus larges, la perte de charge induite par le microcanal n'est plus négligeable devant la perte de charge induite par les capillaires de connexion du microsysteme de diamètre interne $d_{ie} = d_{is} = 50 \mu\text{m}$ et de longueur $l_e = l_s = 10 \text{ cm}$. Dans ce cas, les pressions mesurées par le capteur du banc de test correspondent à la somme des pertes de charge induites par le microcanal et par les capillaires de connexion (**figure 32**). Ainsi, pour obtenir la perte de charge à l'entrée du microcanal, il faut multiplier les mesures du capteur de pression par 0,7 (valeur estimée théoriquement à partir de la loi d'Hagen-Poiseuille) afin de soustraire la perte de charge induite par le capillaire d'entrée du microcanal (**figure 33**).

Nous pouvons donc conclure sur une résistance de ces microcanaux à la pression jusqu'à environ 30 bar. L'objectif principal de cette étude est d'avoir un ordre de grandeur de la résistance de ces microcanaux puisque leur validation se fait suite à l'intégration de monolithes.

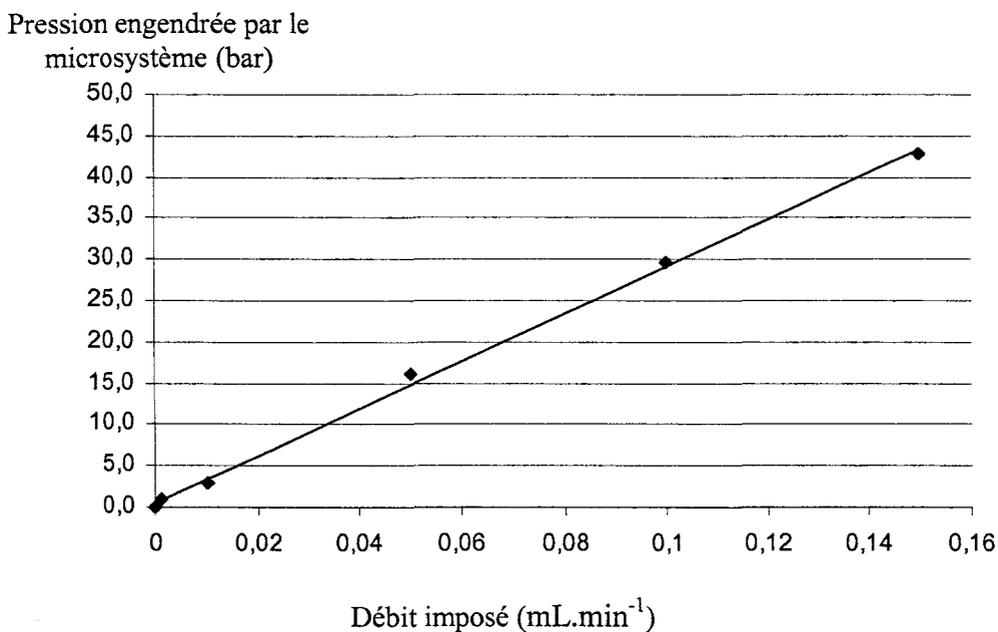


Figure 32 : Pression engendrée par le microsysteme (pression mesurée par le capteur du banc de test à haut débit) en fonction du débit pour une circulation de méthanol. Le microcanal est connecté à des capillaires de diamètre interne $d_{ie} = d_{is} = 50 \mu\text{m}$ et de longueur $l_e = l_s = 10 \text{ cm}$.

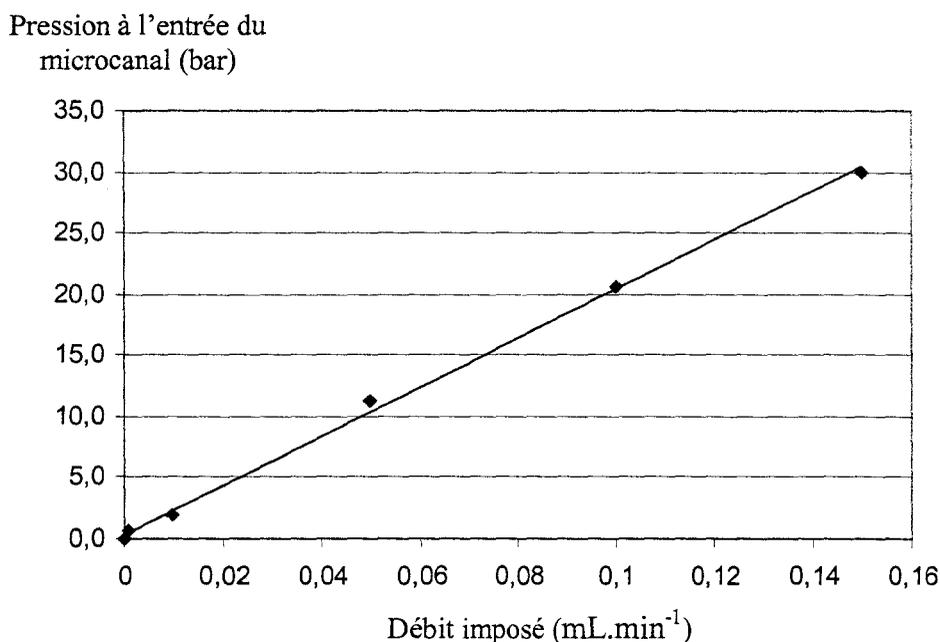


Figure 33 : Pression à l'entrée du microcanal de type 2 en fonction du débit pour une circulation de méthanol. La pression mesurée correspond à la perte de charge induite par le microcanal ainsi que par le capillaire de connexion de sortie ($d_{is} = 50 \mu\text{m}$ et $l_s = 10 \text{ cm}$).

c) Intégration de monolithes

Nous avons pu valider la faisabilité de microcanaux à grand rapport d'aspect sur une faible surface (à une étanchéité d'environ 30 bar).

Nous avons ensuite essayé d'intégrer un monolithe dans ces microcanaux [10] résistants à la pression et au méthanol même si ce dessin n'est pas adapté à la séparation car les nombreux coudes entraîneraient la dispersion des espèces.

Des problèmes de fuite interviennent après polymérisation du monolithe dans le microcanal lors de l'étape de lavage du monolithe. Deux raisons peuvent expliquer ce problème. D'une part, pour compacter au maximum le serpent, les murs ont été réduits à une largeur de $85 \mu\text{m}$, (les canaux de type 1 sont formés par des murs de $200 \mu\text{m}$ de large) et la largeur des murs favorise l'ancrage du couvercle autour du microcanal. D'autre part, la forme de serpent introduit des coudes à 90° qui augmentent la perte de charge.

Nous envisageons donc de réaliser des microcanaux destinés à la séparation ayant des murs de largeur $200 \mu\text{m}$ avec une forme de spirale qui occupe une surface plus importante mais qui élimine les coudes à 90° .

III) Nanosource ESI d'électronébullisation

Si les opérations de prétraitement de l'échantillon sont fondamentales, l'alimentation du spectromètre de masse est fondamentale. La source qui assure cette alimentation doit avoir un rendement d'ionisation permettant de détecter des peptides en concentration inférieure à la picomole.

L'état de l'art (chapitre 1 II B) a montré la possibilité de réaliser des sources nanoESI à partir de polymères. Nous avons également pu constater que la réalisation de structures fermées pouvait être plus délicate et engendrer des sources ayant une extrémité d'environ 100 μm de section. Notre objectif est d'obtenir un effet de pointe avec une structure ayant une section de l'ordre de la dizaine de microns. Cette diminution est favorable au rendement d'ionisation de la source (chapitre 2 I A).

Il s'agit dans un premier temps de réaliser une source capable d'électronébuliser un échantillon déposé sous forme de goutte (au moyen d'une micropipette) dans un microréservoir. La source s'autoalimente suivant sa 'consommation' propre.

A) Technologie de fabrication :

Le module d'Young de la résine SU-8 polymérisée qui est de 4 GPa autorise la réalisation de structures suspendues qui restent rigides avec une déflexion tolérable ($< 100 \mu\text{m}$). La déflexion de ces structures suspendues est proportionnelle au module d'Young du matériau ainsi qu'au rapport l^2 / e^3 où l est la longueur de la structure suspendue et e son épaisseur. Néanmoins, cette résine subit, suivant les caractéristiques des recuits auxquels elle est soumise, des contraintes résiduelles qui entraînent une tension de la structure. Ces contraintes entraînent un redressement qui compense leur déflexion naturelle [11]. De plus, la résine SU-8 permet d'atteindre une résolution inférieure à la dizaine de microns. Nous pouvons donc envisager de réaliser des sources d'électronébullisation avec cette résine.

Les sources sont réalisées sur une couche sacrificielle, qui est attaquée par la suite pour les désolidariser du substrat d'origine. La couche sacrificielle, généralement en SiO_2 , est attaquée par l'acide fluorhydrique. Cette attaque ne doit pas dégrader la résine puisqu'elle correspond à une étape de sous gravure qui peut prendre jusqu'à dix heures. Les couches sacrificielles peuvent également être réalisées à partir d'un métal. La solution chimique de

gravure de ce métal doit être compatible avec le matériau utilisé pour réaliser la structure suspendue. Nous avons donc choisi le nickel qui est attaqué par l'acide nitrique dilué mais auquel la résine SU-8 est insensible. Ces structures sont donc réalisées sur des substrats en silicium qui sont facilement clivés manuellement (grâce à la structure cristalline du silicium) afin de libérer la structure suspendue.

La réalisation d'une source de type 'aiguille fermée' en SU-8 (**figure 34-a**) est possible en utilisant une structure multicouche ainsi qu'une couche sacrificielle permettant de libérer le canal de cette aiguille. Cependant, cette technique demande un certain nombre d'opérations, dont une d'attaque de la couche sacrificielle d'autant plus délicate que la longueur du canal est grande. De plus, cette solution ne permet pas à priori d'obtenir des structures aussi pointues qu'avec une structure monocouche.

Une solution alternative (proposée par S. Arscott [12]) consiste à réaliser une structure plane de type plume (**figure 34-b**) avec une seule couche de SU-8 ; la couche 2 de l'aiguille (la fente est utilisée pour guider le liquide par capillarité jusqu'à son extrémité). La terminaison de cette structure plane est fabriquée sur une couche sacrificielle qui permet de la désolidariser localement du substrat. Ce dernier est ensuite clivé en exploitant la structure cristalline du silicium afin d'obtenir une structure suspendue [13].

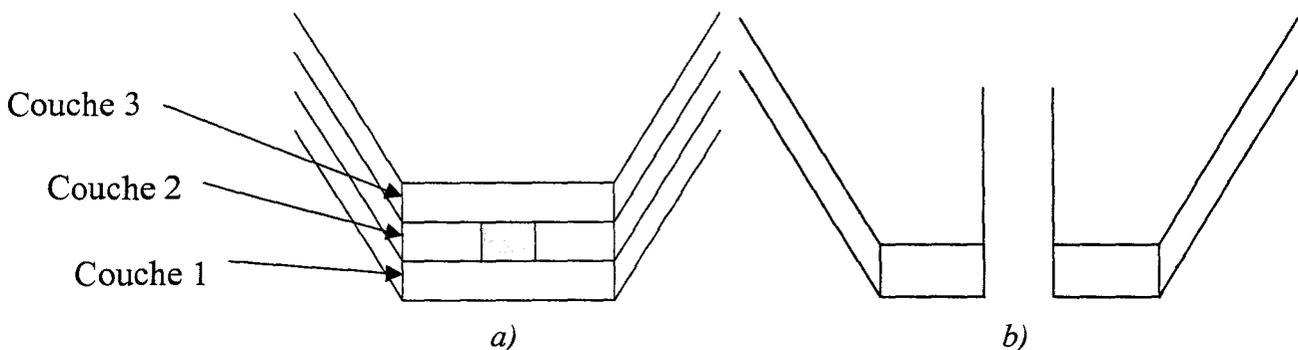


Figure 34 : Schéma des structures envisagées pour obtenir une source d'électronébulisation :

a) structure fermée obtenue à partir de 3 couches de SU-8 et d'une couche sacrificielle permettant de libérer un canal ; b) structure monocouche permettant d'obtenir une source reposant sur le principe d'une plume de stylo.

La structure réalisée est en grande partie ancrée sur le substrat de silicium. La source elle-même est réalisée sur une couche sacrificielle en nickel d'environ 1000 Å d'épaisseur (**figure 35**). Cette couche sacrificielle est ensuite attaquée par une solution d'acide nitrique diluée ($\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O} \ 1 : 4$) qui ne dégrade pas la SU-8. Cette attaque, relativement longue

puisqu'elle s'apparente à une opération de sous-gravure qui s'opère sur des dimensions millimétriques, nécessite une dizaine d'heures.

Une fois la source désolidarisée du substrat, celui-ci est partiellement séché car il faut laisser une zone humide autour de la source pour qu'elle n'adhère pas au substrat pendant le clivage. Cette dernière étape est ensuite réalisée afin d'obtenir la source en débord du substrat.

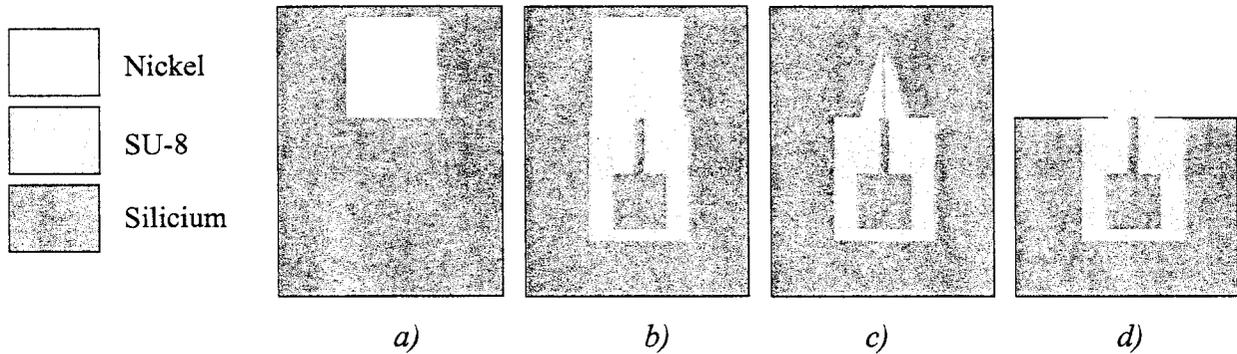


Figure 35 : Principe de fabrication des sources : a) réalisation de la couche sacrificielle en nickel ; b) fabrication de la structure en SU-8 ; c) attaque de la couche sacrificielle ; d) clivage du substrat en silicium.

Les sources fabriquées (**figure 36**) sont obtenues à partir d'une couche de SU-8 de $35 \mu\text{m}$ (SU-8 2035 déposée avec les paramètres $v : 4000 \text{ rpm}$; $a : 500 \text{ rpm.s}^{-1}$; $t : 30 \text{ s}$). Les dimensions des fentes des sources réalisées doivent tenir compte de ses fonctions essentielles : cette largeur doit permettre de guider le liquide par effet capillaire du réservoir jusqu'à la pointe mais elle ne doit pas être trop large afin de garder l'effet de pointe permettant d'obtenir l'électrospray

Du point de vue des contraintes technologiques, ce sont les limites de la photolithographie SU-8 qui imposent des ordres de grandeur à respecter. Ainsi, les dimensions des fentes des sources réalisées sont de 8 et $16 \mu\text{m}$. Cette résolution de la fente est accessible avec une source d'épaisseur d'environ $30 \mu\text{m}$ qui permet d'avoir une structure rigide (en effet, plus la couche est fine, plus le temps d'exposition nécessaire est court, limitant ainsi l'influence des phénomènes de diffraction). Les doses d'exposition préconisées par le fabricant **Microchem** ont été revues à la baisse (diminution d'environ 30%).

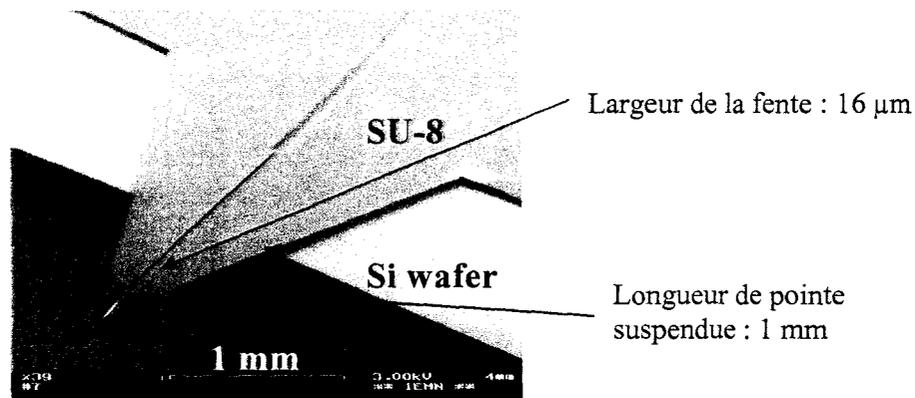


Figure 36 : Photo MEB d'une source ayant une fente de 16 μm de large. La source suspendue est obtenue après clivage du substrat en silicium.

B) Evaluation des sources nanoESI

1) Présentation du banc de test

Les sources réalisées sont testées sur un spectromètre de masse de type trappe à ions LCQ Deca XP+ (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). Cet appareil, piloté par ordinateur, contrôle la tension d'ionisation. Celle-ci est appliquée, par l'intermédiaire d'un fil de platine connecté à la source de tension du spectromètre de masse, au niveau d'une goutte de liquide placée dans l'un des réservoirs de la source (figure 37). La source, placée sur un système de déplacement tridimensionnel, est positionnée, avec une précision de quelques microns, face à l'entrée du spectromètre de masse.

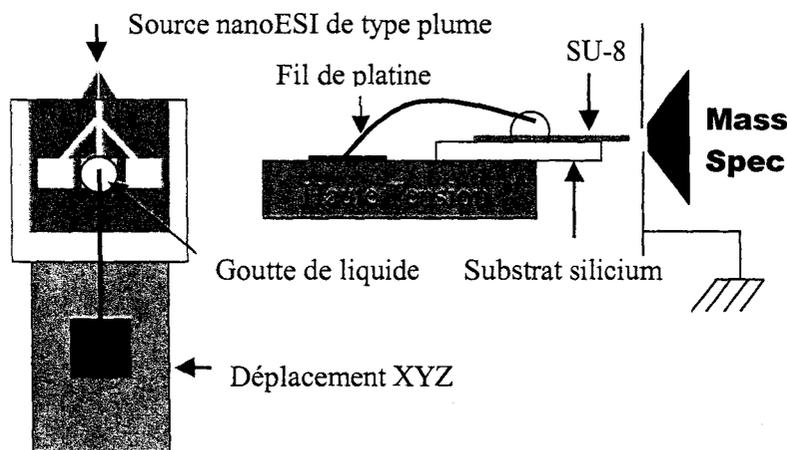


Figure 37 : Schéma de principe du banc de test des sources. Le système alimente un spectromètre de masse donnant des informations sur la stabilité et la qualité du nébulisât généré. La haute tension est appliquée par un fil de platine.

Ce banc nous donne accès à l'évolution du courant d'électrospray (*Total Ion Current : TIC*) en fonction du temps. Le détecteur compte le nombre d'ions détectés par seconde (de 10^5 à 10^9 suivant la concentration pour une source nanoESI commerciale), quantifie la stabilité du spray généré par la source ainsi que son efficacité. Nous obtenons également le spectre de masse qui découle de cette ionisation.

2) Evaluation des performances

Une première génération de source ayant une fente de $30\ \mu\text{m}$ de haut et $20\ \mu\text{m}$ de large a permis d'obtenir le spectre présenté à la **figure 38-a**. Le test est réalisé avec un échantillon de Gramycidine S à une concentration de $1\ \mu\text{M}$ et à une tension d'ionisation de $1,5\ \text{kV}$. Le phénomène d'électronébulisation a bien lieu mais la qualité d'ionisation révélée par le spectre n'est pas à la hauteur de celle obtenue avec les sources commerciales **Protana**. Ce spectre est comparé à celui obtenu avec la source commerciale pour le même échantillon à une tension d'ionisation de $1\ \text{kV}$ (**figure 38-b**). Le pic représentant l'espèce dichargée (c'est à dire $M+2H^+$ avec $m/z : 574$) est beaucoup plus présent que le pic monochargé ($m/z : 1142$). En effet, l'orifice moins large de la source **Protana** permet la formation de gouttelettes plus petites favorables au phénomène d'ionisation, renforçant la présence des ions multi-chargés.

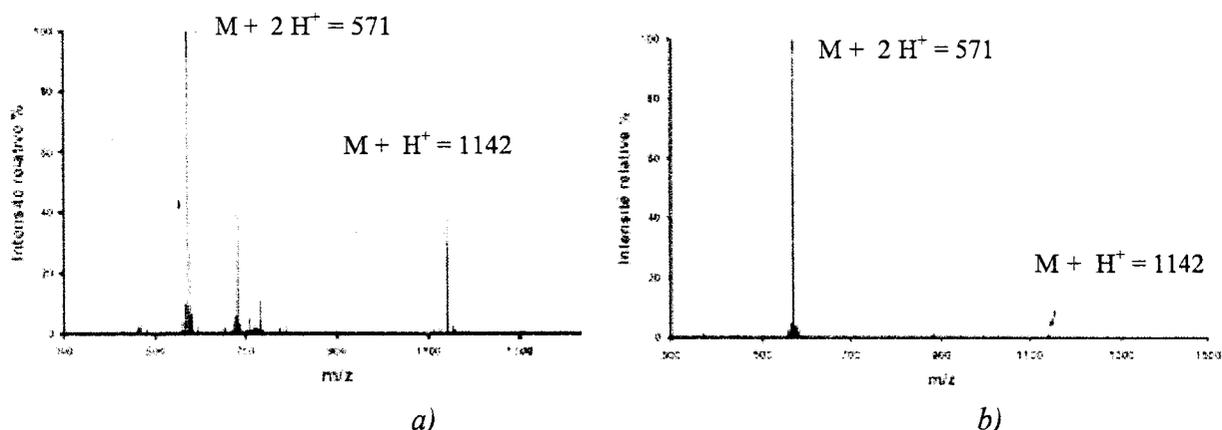


Figure 38 : Spectre d'un échantillon de Gramycidine S à $1\ \mu\text{M}$: a) obtenu avec une source de type plume ayant une fente de $20\ \mu\text{m}$ à une tension d'ionisation de $1,5\ \text{kV}$; b) obtenu avec une source **Protana** à une tension d'ionisation de $1\ \text{kV}$.

Deux sources ayant des fentes de dimension de $8 \times 25\ \mu\text{m}^2$ et $16 \times 25\ \mu\text{m}^2$ sont comparées. Les spectres de masse obtenus (**figure 39**) montrent l'importance de la diminution de la largeur de cette fente qui influe directement sur son efficacité. Ainsi, dans le cas de la fente la plus étroite, le pic de l'ion dichargé est plus important [14].

Le rapport hauteur / largeur de la fente est également important puisqu'il conditionne l'efficacité de la capillarité de la fente. Nous avons constaté que la hauteur devait être supérieure à la largeur de la fente pour avoir une capillarité correcte dans ce type de structure.

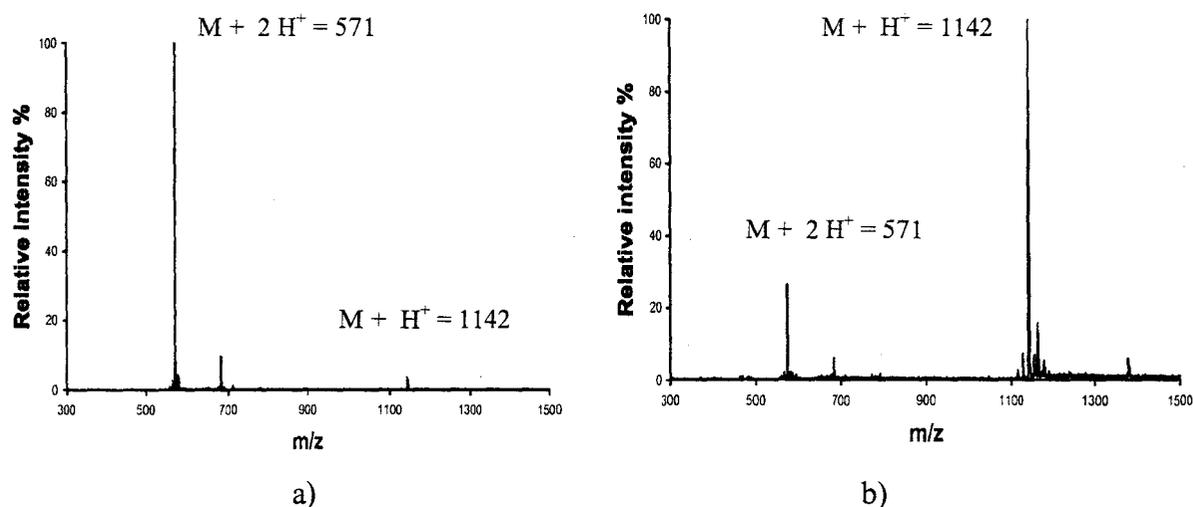


Figure 39 : Spectres de masse obtenus avec deux sources de type plume ayant une largeur de fente différente : a) source ayant une fente de $8 \times 25 \mu\text{m}^2$ (tension d'ionisation de 1 kV et échantillon de Gramicidin S à une concentration de $5 \mu\text{M}$) ; b) source ayant une fente de $16 \times 25 \mu\text{m}^2$ (tension d'ionisation de 1,2 kV et échantillon de Gramicidine S à une concentration de $1 \mu\text{M}$).

Le débit généré par ces sources est stable, comme le montre l'évolution du courant d'électrospray en fonction du temps obtenu avec la fente de largeur $8 \mu\text{m}$ (**figure 40**) pour un enregistrement de 2 min. Les spectres de masse ainsi obtenus peuvent alors être comparés favorablement aux spectres obtenus avec les sources commercialisées, telles que les sources **Protana**.

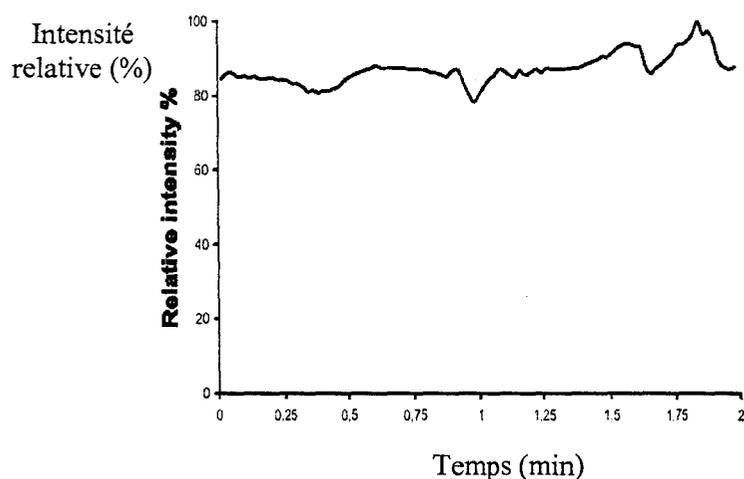


Figure 40 : Courant d'électrospray observé pour une source ayant une fente de $8 \times 35 \mu\text{m}^2$ (Total Ion Current : TIC), pour un échantillon de Gramicidine S à concentration de $5 \mu\text{M}$ avec une tension d'ionisation de 1 kV.

Ces tests ont permis de mettre en évidence deux critères à respecter pour que ce type de source fonctionne correctement. Le premier est la diminution de la largeur de la fente afin d'améliorer le rendement d'ionisation. Le second est de conserver un certain rapport hauteur / largeur de la fente qui permet la capillarité. Si le phénomène de capillarité est bien connu dans un canal fermé ou non, des études récentes réalisées au sein de l'équipe ont montré qu'il fallait conserver un rapport supérieur à 2 pour assurer le phénomène de capillarité [15], même si ce rapport est fortement dépendant de la nature du liquide et du matériau qui constitue la fente. Ces sources, dont le fonctionnement autonome est aussi performant que celui des sources nano ESI standard, peuvent maintenant être couplées à un microcanal dans une perspective d'intégration.

IV) Couplage intégré Microcanal / Source

L'objectif de cette intégration est d'alimenter la source nanoESI avec un débit continu (les opérations de prétraitement de l'échantillon sont réalisées en débit continu). Dans certains cas, comme le dessalage ou la digestion, la vitesse du flux n'est pas un facteur fondamental, le débit peut être adapté à la consommation de la source. En revanche, pour la séparation, son efficacité et sa résolution vont dépendre de la vitesse du flux, selon la courbe de Van Deemter (chapitre 1 I B) et de l'absence de volume mort. Il faut donc essayer de trouver le compromis entre efficacité de l'opération et efficacité de l'électronébulisation.

Cependant notre objectif premier est de valider la faisabilité du microsystème intégré puis de savoir quel est le débit minimum autorisant une alimentation correcte de la source. Nous savons qu'en fonctionnement nanoESI habituel, le débit en sortie de colonne chromatographique est supérieur à la consommation propre de la source ESI qui s'accommode de cette situation au prix d'un gaspillage. Nous tentons ci-après d'examiner dans quelles conditions cette perte d'échantillon peut être réduite.

A) Technologie d'intégration

1) Principe

La technologie mise en place dans une perspective d'intégration permet la réalisation de systèmes couplant un canal court de type 1 et une source d'électrospray de type plume (**figure 41**) [16]. Nous avons réalisé le microsystème avec un microcanal de type 1 de section

$150 \times 160 \mu\text{m}^2$ qui peut être facilement connecté à un capillaire de diamètre externe standard de $150 \mu\text{m}$ (dans le but de simplifier la fabrication de ces prototypes permettant en premier lieu de caractériser le couplage). La difficulté architecturale repose sur le couplage des microcanaux en 3 dimensions et de la source en 2 dimensions (**figure 41-b**). Cela influe sur l'efficacité 'microfluidique' du couplage requise par l'application.

La tension d'ionisation est appliquée au liquide au niveau de la source (via le substrat en silicium) par le support du spectromètre de masse. Le substrat doit pour cela être localement dégagé de toute couche déposée pour être en contact direct avec le liquide à ioniser.

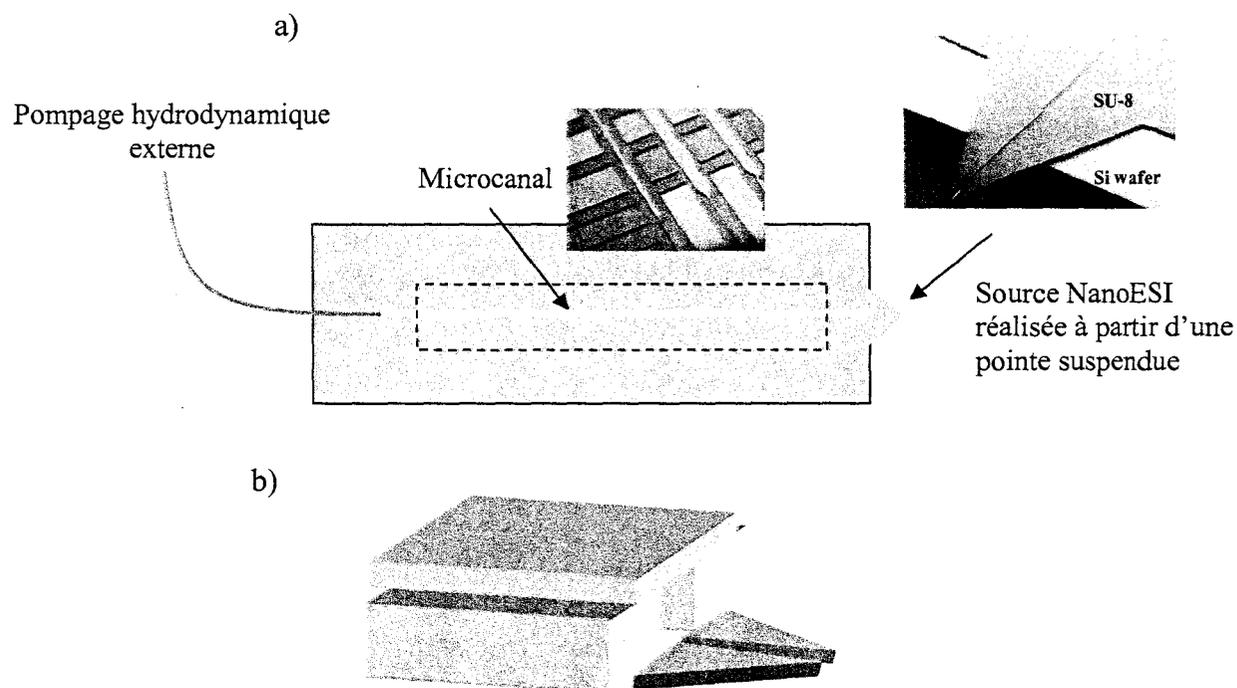


Figure 41 : Schéma de principe de la structure intégrant un microcanal et une source : a) vue de dessus (le microcanal, qui est connecté à un capillaire d'entrée, alimente la source nanoESI) ; b) vue 3D de la transition entre un microcanal et une source.

Un couplage utilisant un capillaire de sortie (**figure 42**) peut être utile pour la fabrication du monolithe. Il sert à évacuer les fluides nécessaires à la réalisation de la colonne sans contamination de la source. Il est ensuite coupé pour déboucher en surplomb de la fente de la source (**figure 43**) lors de l'utilisation du microsystème. Nous avons donc choisi de réaliser des prototypes permettant de connecter en sortie du microcanal un capillaire de diamètre externe de $150 \mu\text{m}$. C'est la fabrication de ce prototype qui est décrite par la suite.

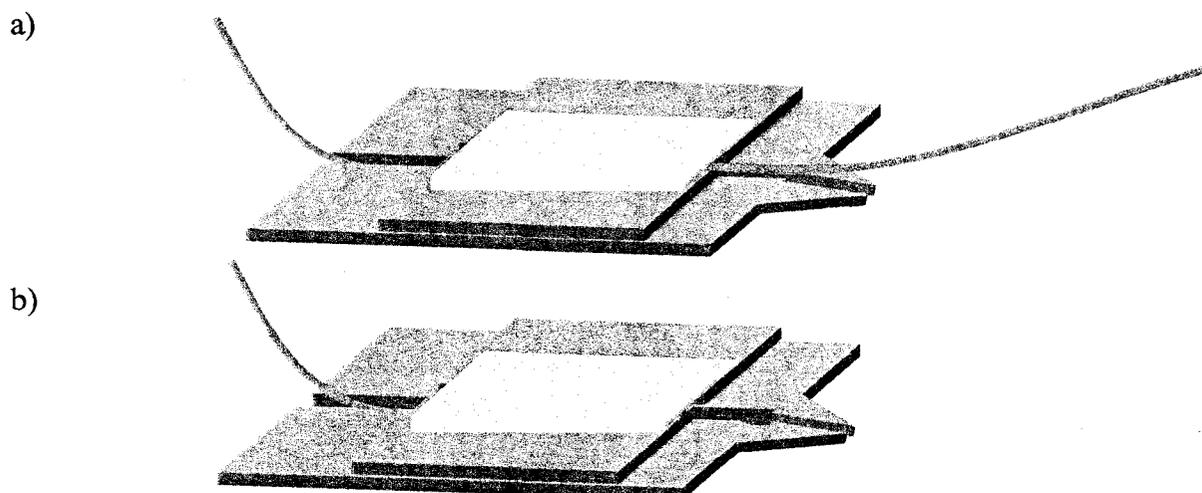


Figure 42 : Microsysteme intégré comprenant un capillaire alimentant le microcanal (où peut être polymérisée la structure monolithique) ainsi qu'une source d'électronébulisation : a) microsysteme avec capillaires collés en entrée et sortie du microcanal pour la fabrication de la microcolonne ; b) microsysteme terminé avec capillaire d'entrée pour l'utilisation.

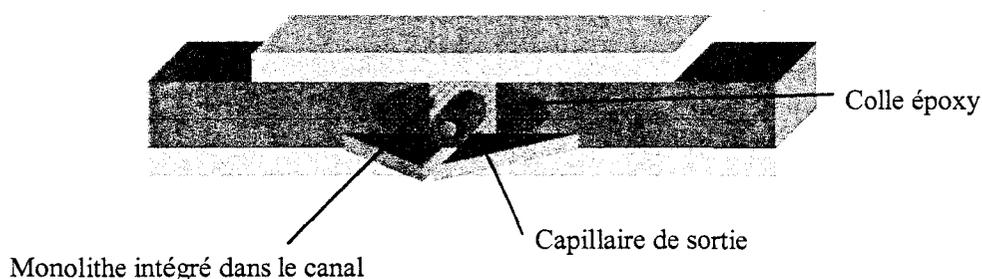


Figure 43 : Schéma montrant la jonction capillaire / source. Le capillaire collé en bout de microcanal débouche en surplomb sur la source.

2) Fabrication

Nous décrivons la fabrication des microsystemes intégrés avec un capillaire de sortie. La **figure 44** présente l'ensemble des étapes. La **figure 45** résume les opérations fondamentales de la fabrication (sur cette figure, les multiples 'arêtes' dessinées perpendiculairement au canal du microsysteme ont juste pour rôle de supporter le couvercle lors du collage mais n'ont aucune autre fonctionnalité particulière).

La couche de SU-8 2002, déposée sur le silicium, favorise l'adhérence de structures épaisses (100 μm) comme décrit en **figure 8**. Une première couche épaisse de SU-8 sert à la formation de la source d'électronébulisation. Une seconde couche permet de surélever le couvercle afin de pouvoir insérer les capillaires et de former le canal. Il est alors fermé par un couvercle en Pyrex® par collage SU-8. Un couvercle 'souple' est à nouveau utilisé afin d'épouser les murs du canal et les piliers servant à le supporter.

Le procédé de fabrication des sources d'électronébulisation intégrées est le même que pour les sources présentées dans le paragraphe III-A. Elles sont réalisées sur une couche sacrificielle de nickel déposée sur le substrat en silicium (le reste de la structure en SU-8 qui est ancrée sur le substrat est réalisé sur une couche d'adhérence en SU-8 2002 ouverte au niveau des motifs sacrificiels en nickel). Une fois les sources formées, la couche de nickel est attaquée et les sources sont libérées par clivage du support de silicium perpendiculairement à la fente de la source. La fente capillaire assure le prolongement du microcanal via le capillaire de sortie.

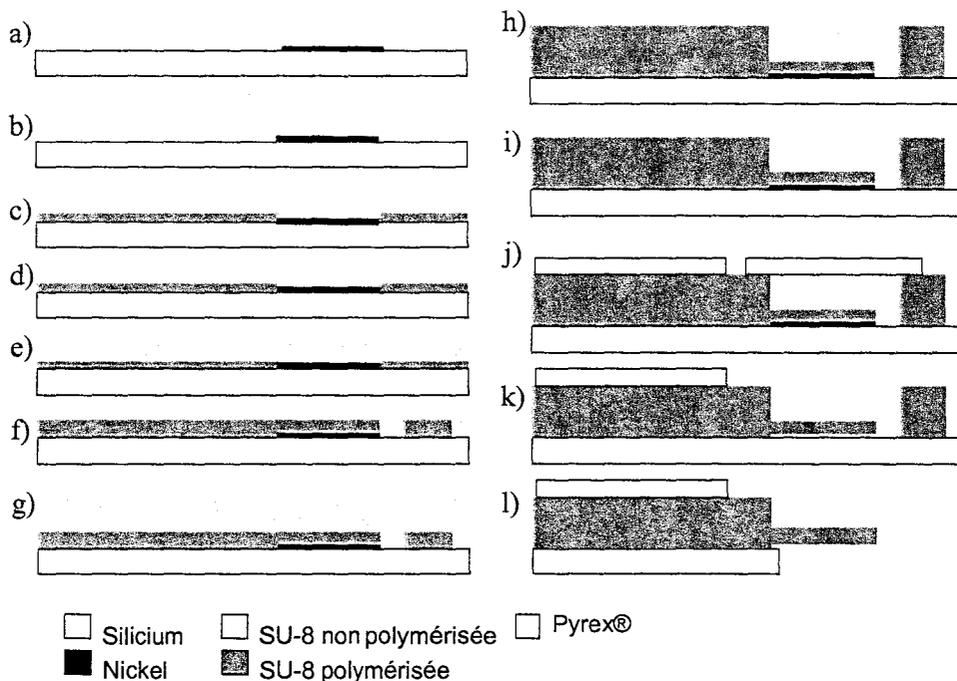


Figure 44 : Procédé de fabrication détaillé du microsystème intégré. Les différentes étapes comprennent : a) la réalisation de la couche sacrificielle ; b) à i) la structure multicouche SU-8 ; j) le collage du couvercle ; k) et l) la libération de la source.

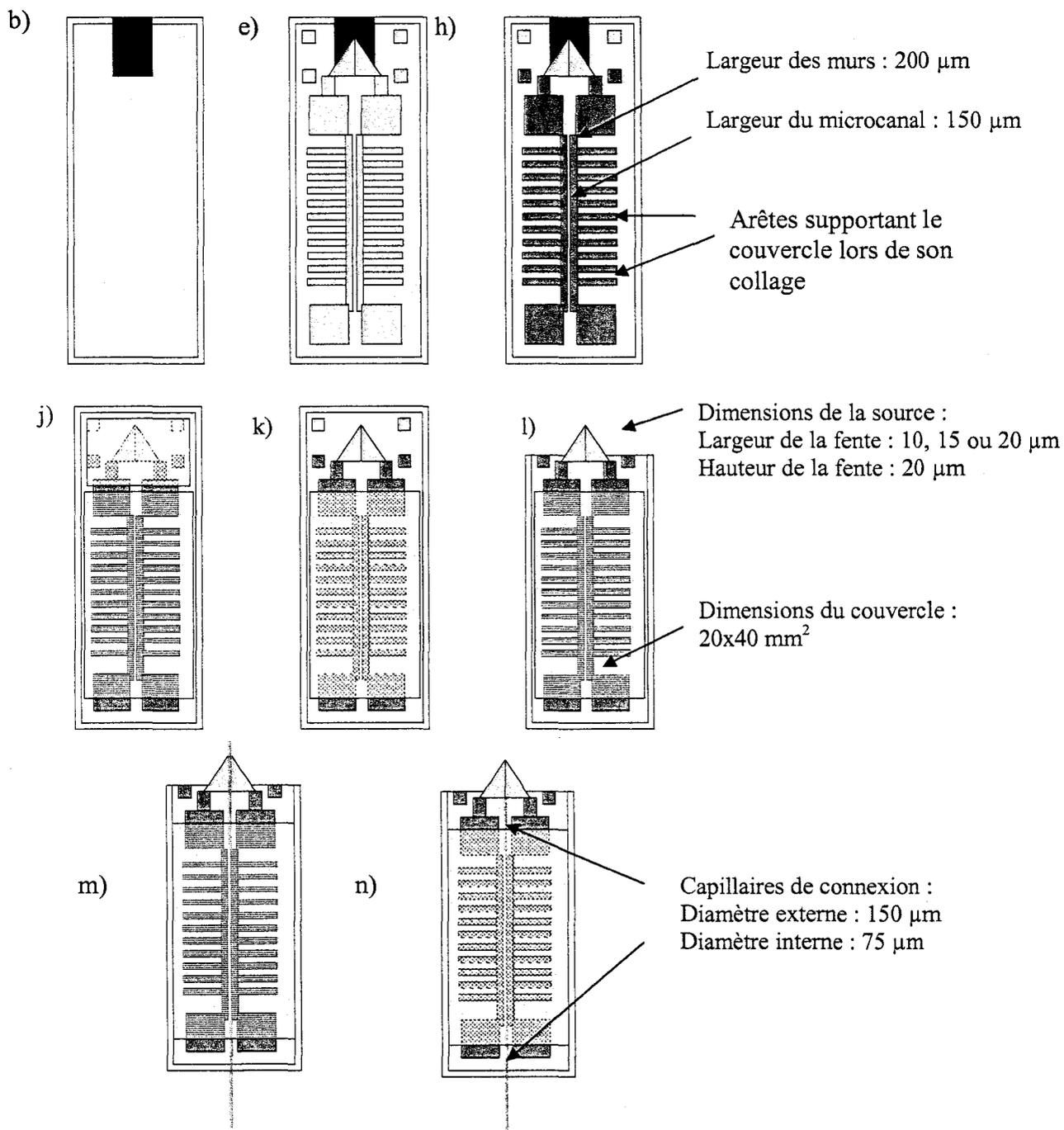


Figure 45 : Etapes principales de la fabrication du microsystème intégré : les étapes b), e), h), j), k) et l) correspondent aux étapes présentées sur la **figure 44**. L'étape m) concerne le collage des capillaires d'entrée et sortie. A l'étape n), le capillaire de sortie est coupé pour l'utilisation du microsystème.

a) Préparation du substrat

Dans un premier temps nous avons réalisé la couche métallique sacrificielle sur une couche d'adhérence pleine en SU-8 2002. Cependant, cette couche ayant subi un bain d'acétone durant l'étape de '*lift-off*', ou la gravure à l'acide nitrique pour définir les motifs en nickel, ne remplit plus son rôle de couche d'interface. Il faut donc réaliser la couche sacrificielle au préalable, puis réaliser la couche d'adhérence.

Donc, afin d'avoir la meilleure adhérence possible de la couche d'interface en SU-8 2002, le substrat est nettoyé de tout résidu organique par une attaque Pyranha ($\text{H}_2\text{SO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ 2:1) pendant 15 minutes, suivie d'une déshydratation à 200°C pendant 12 heures.

Cette préparation doit être d'autant plus soignée que la couche d'interface est ouverte localement afin d'une part de laisser accès aux motifs métalliques utilisés comme couche sacrificielle et d'autre part de pouvoir appliquer au liquide la tension d'ionisation via le substrat en silicium.

De plus, des recuits successifs sont imposés aux différentes couches de SU-8. Ces recuits peuvent provoquer un décollement de l'ensemble des structures par retrait de la couche inférieure. Dans le cas des systèmes bi-couches décrits précédemment et destinés à fabriquer des microcanaux de type 2, la couche la plus épaisse (environ 100 μm) est la couche déposée en premier lieu. Ainsi, la couche suivante (environ 50 μm) ne subit que ses recuits propres. Elle n'est donc pas sur-recuite et par voie de conséquence les contraintes ne sont pas multipliées. Dans le cas des systèmes intégrés, la couche la plus fine (20 μm) est la première couche déposée, elle subit donc les recuits de la couche supérieure plus épaisse (environ 140 μm) qui durent plusieurs dizaines de minutes.

b) Couche sacrificielle

Les motifs en nickel (**figure 44-a**) qui sont sacrifiés en fin de procédé (dépôt d'une fine couche métallique de 1000 Å de Nickel) sont obtenus par lithographie classique. Nous avons constaté une attaque d'autant plus efficace de cette couche sacrificielle (qui est localement encastrée entre le substrat et la source à libérer) que son épaisseur est importante (de l'ordre de plusieurs centaines d'Angströms) : si la couche est mince, l'acide circule difficilement jusqu'au front d'attaque. Les motifs sont ensuite obtenus par '*lift-off*' dans un bain d'acétone sous ultrasons.

c) Multicouche SU-8

Une première couche de SU-8 2002 (2000rpm / 2000rpm.s⁻¹ / 30s) est déposée comme couche d'adhésion. Celle-ci est ouverte localement au niveau des motifs qui seront sacrifiés (**figure 44-b à 44-d**). Une couche de 20 µm de SU-8 2035 (4000 rpm / 500 rpm.s⁻¹ / 30s) est ensuite déposée. Cette couche est volontairement sous exposée (environ 100 mJ au lieu de 200 mJ) afin d'obtenir des fentes d'une dizaine de microns de largeur. La source est réalisée sur ces motifs métalliques au moyen de cette couche ; cette dernière comprend également l'ensemble de la structure (murs du canal ainsi que les plots supportant le couvercle) (**figure 44-e et 44-f**).

Une couche de 140 µm de SU-8 2075 (1500 rpm / 500 rpm.s⁻¹ / 30s) est ensuite déposée. Elle permet l'insertion des capillaires puisqu'on y réalise les mêmes motifs que dans la couche précédente de SU-8 2035, à l'exception de la source (**figure 46**). Cette couche ne demande pas de précaution particulière en ce qui concerne l'exposition (motifs supérieurs à la centaine de microns). Cependant le pré recuit est limité à 18 min au lieu de 25 min afin de ne pas trop contraindre la couche de 20 µm située en dessous. L'ensemble est ensuite développé jusqu'à révélation totale des fentes des sources (**figure 44-g à 44-i**). L'ensemble des paramètres utilisés pour déposer les couches de SU-8 est regroupé dans le **tableau 5**.

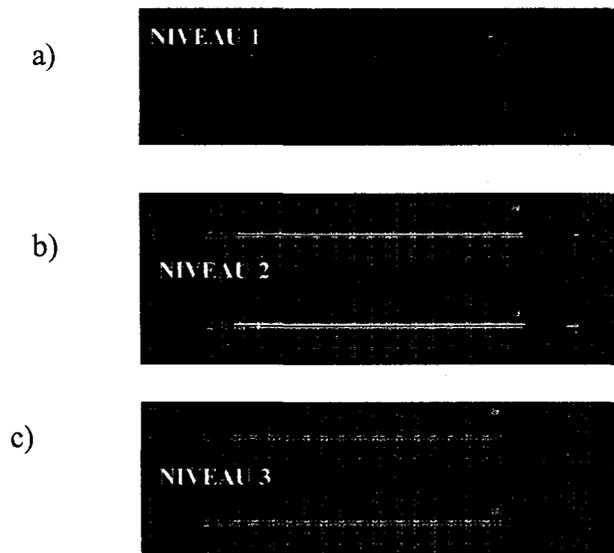


Figure 46 : Différents niveaux de masques utilisés pour réaliser le couplage microcanal source : a) le masque de niveau 1 pour réaliser la couche sacrificielle ; b) le masque de niveau 2 pour dessiner la première couche de SU-8 comprenant la source ; c) enfin le masque de niveau 3 permet de surélever le couvercle avec la dernière couche de SU-8.

	Couche 0 (SU-8 2002)	Couche 1 (SU-8 2035)	Couche 2 (SU-8 2075)
Étalement (rpm / rpm.s ⁻¹ / s)		300/100/30	300/100/30
Dépôt (rpm / rpm.s ⁻¹ / s)	2000/2000/30	4000/500/30	1600/500/30
Recuit 1 (<i>pre bake</i>)	95°C / 6 min	95°C / 8 min	95°C / 18 min
Exposition (14mW/cm ²)	10 s	40 s	12 s
Recuit 2 (<i>post bake</i>)	95°C / 2 min	95°C / 4 min	95°C / 12 min
Recuit 3 (<i>hard bake</i>)	170°C / 1 min		

Tableau 5 : Paramètres de dépôt, d'insolation et de recuits des différentes couches de SU-8 (couche 0 insolée avec le masque 1, la couche 1 avec le masque 2 et la couche 2 avec le masque 3).

d) Collage du couvercle

L'étape de collage (**figure 44-j**) classique demande des précautions particulières. En effet, lors des lithographies des deux couches épaisses de SU-8, des plots de même hauteur que l'ensemble de la structure sont réalisés autour de la source. Ils soutiennent une lamelle de Pyrex® de même nature que le couvercle (principalement de même épaisseur) mais qui elle, n'est pas collée. Son rôle est de protéger la source de la membrane de la colleuse **Logitech** (**figure 45-j**). A la fin de l'opération de collage, cette protection est retirée (**figure 44-k**).

e) Libération des sources

L'extrémité du microsystème comprenant la source est plongée dans un bain d'acide nitrique dilué (HNO₃ / H₂O 1:4) afin d'attaquer la couche sacrificielle (**figure 44-k**). Le substrat est placé verticalement et le niveau du bain d'attaque est fixé pour ne plonger que la source et éviter de plonger toute la structure en SU-8 dans l'acide. Cette opération demande une dizaine d'heures puisque la hauteur du front d'attaque de l'acide est largement inférieure à la longueur de nickel se trouvant sous la source (**figure 47-a**).

Comme pour la libération des sources non intégrées présentées en III-A, une fois la source désolidarisée du substrat, celui-ci est partiellement séché. Le clivage est enfin réalisé (**figure 44-l**) afin d'obtenir la source en débord du substrat (**figure 47-b**).

Lorsque la structure multicouche est terminée et que la source est libérée (**figures 48 et 49**), le capillaire de diamètre externe 150 µm est fixé par colle époxy en entrée et en sortie de canal (**figure 50**).

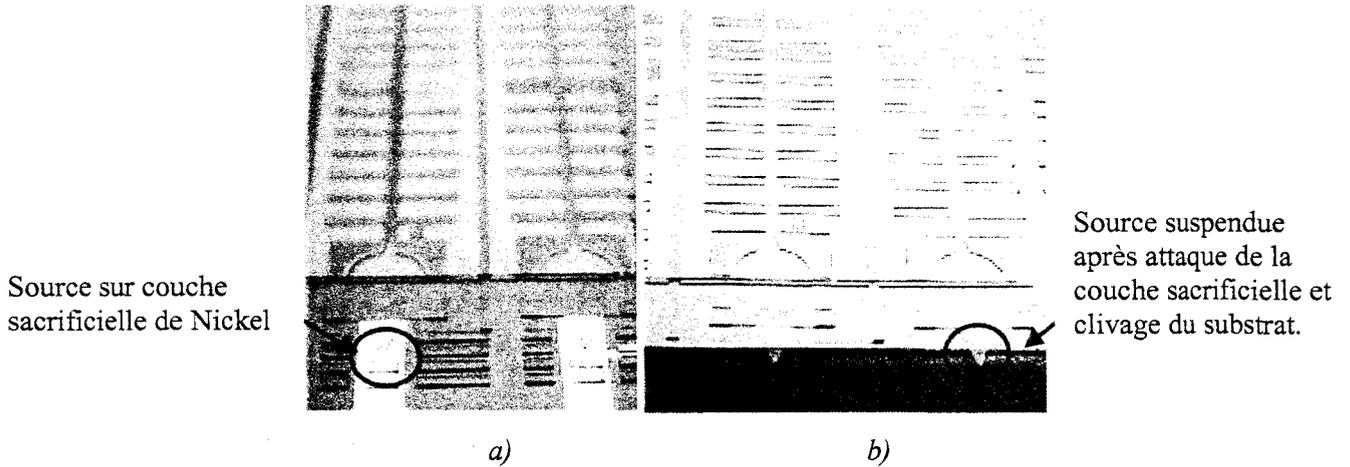


Figure 47 : Photos de réalisation des sources d'électronébulisation : a) système intégré avant libération des sources suspendues (couche sacrificielle de nickel non attaquée) ; b) système intégré après libération des sources suspendues (substrat clivé).

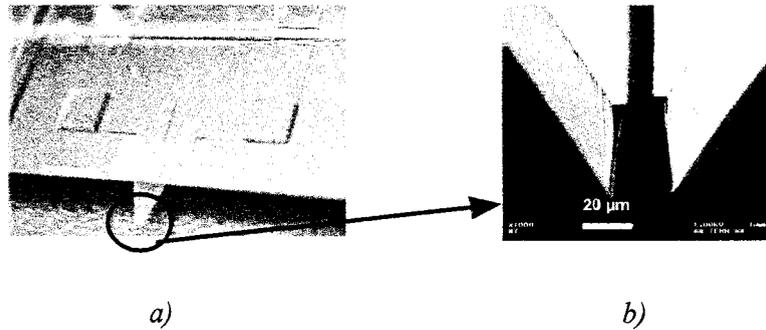


Figure 48 : Nanosource ESI intégrée au microsystème : a) vue globale de la source ; b) agrandissement de la fente de la source.

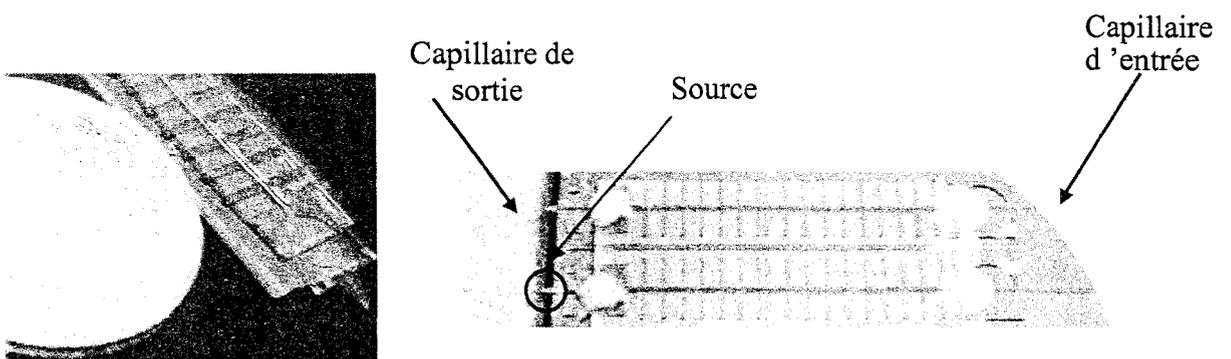


Figure 49 : Photo d'un prototype réalisé montrant le microcanal (de section $150 \times 160 \mu\text{m}^2$) et la nanosource ESI (longueur 2 mm, épaisseur $25 \mu\text{m}$, largeur de fente $15 \mu\text{m}$) sans capillaires de connexion.

Figure 50 : Vue globale du microsystème après collage des capillaires d'entrée et de sortie.

B) Evaluation du couplage microcanal / source

Cette etape de test a pour but de connaitre les debits necessaires a l'alimentation de la source. Le couplage doit assurer le minimum de fuite (puisque nous avons une structure ouverte) dans le but de consommer la plus petite quantite d'echantillon possible.

De plus, rappelons que dans le cas d'une etape de separation, la vitesse et donc le debit du fluide ont une importance fondamentale. Nous avons vu que dans des capillaires de 75 μm de diametre interne, le debit utilise en nanoLC est de 200 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ ce qui correspond a une vitesse lineaire de $7,5\cdot 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Si nous voulons garder cette vitesse constante, il faut adapter la section du canal pour avoir un debit correspondant a celui de la source (par exemple, pour garder la vitesse lineaire constante avec une consommation propre de la source de 50 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$, la section du microcanal doit etre $33\times 33 \mu\text{m}^2$). Nous avons cependant choisi dans un premier temps, pour faciliter la fabrication d'un microsysteme connectable a des capillaires de diametre externe de 150 μm , de realiser des microcanaux de section $150\times 160 \mu\text{m}^2$.

1) La caracterisation

Nous realisons, pour les structures couplant un microcanal et une source, une premiere observation visuelle a partir du banc presente chapitre 2 III A. Cela permet d'observer l'alimentation ou non de la source par le debit impose en continu en ne polluant pas inutilement le spectrometre de masse. Si cette alimentation est realisee, nous caracterisons l'efficacite du couplage grace a un banc (figure 51) utilisant le spectrometre de masse trappe a ions LCQ Deca XP+ (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA).

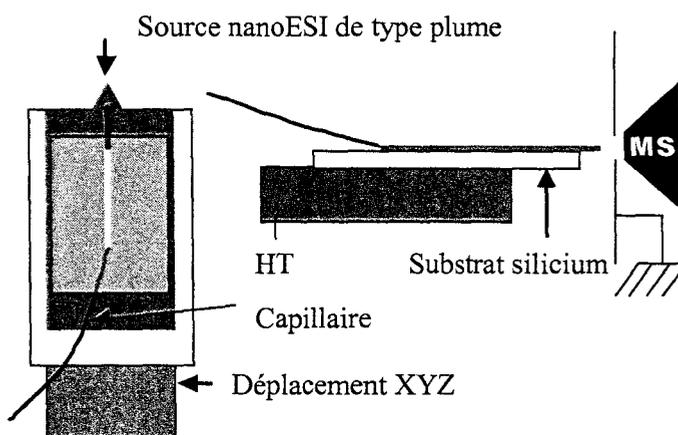


Figure 51 : Montage utilise pour caracteriser le microsysteme integre. Le banc comprend un systeme de deplacement tridimensionnel du microsysteme ainsi que l'alimentation haute tension (elements du spectrometre de masse).

Ce banc comprend également un pousse-seringue alimentant le microsysteme en continu. Nous appliquons la tension d'ionisation (source haute tension intégrée au spectromètre de masse) au liquide en sortie de canal, via le substrat en silicium (comme nous l'avons expliqué précédemment, une ouverture est réalisée à cet effet dans la couche d'accrochage en SU-8 2002).

2) Evaluation du couplage

a) Première génération de couplage

Nous appelons première génération de couplage, la configuration comprenant un capillaire collé en amont de la source et débouchant à 1 mm de l'extrémité de celle-ci (**figure 52**). Nous avons constaté que cette première série de prototype entraîne des fuites le long du capillaire d'alimentation. En effet, la configuration d'une structure à section circulaire sur un plan favorise un effet capillaire le long du tube et provoque des fuites du liquide. De plus, la distance d' 1 mm entre l'extrémité de la source et celle du capillaire rend le couplage quasiment inexistant. Nous avons de ce fait, réalisé le même type de structure avec un capillaire débouchant à 300 μm de l'extrémité de la pointe. Dans ce cas, la continuité du couplage semble plus cohérente, mais les problèmes de fuite subsistent, et des débits inférieurs à 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ne permettent pas, dans notre cas, une alimentation correcte de la source.

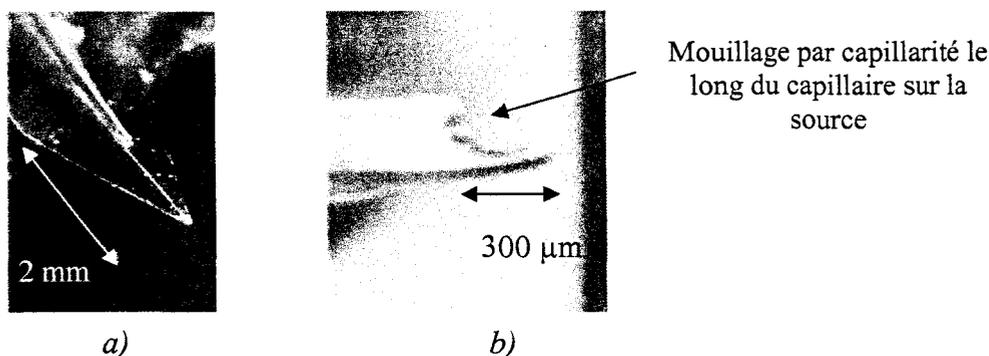


Figure 52 : Système comprenant une source alimentée par des capillaires (configuration a) : a) photo de la structure montrant le capillaire de sortie alimentant la source : extrémité du capillaire à 1 mm de la pointe de la source ; b) photo montrant le mouillage par capillarité le long du capillaire : extrémité du capillaire à 300 μm de la pointe de la source.

b) Evolution de la configuration du couplage

D'autres types de couplage (résultant de l'évolution de notre expérience acquise au cours des manipulations) sont réalisés sans utiliser un capillaire de transition entre le microcanal et la source. L'objectif est d'obtenir un couplage autorisant une alimentation à des débits d'environ 100 nL.min^{-1} [17].

La première génération correspond à un couplage entre le microcanal et la source par l'intermédiaire d'un capillaire selon la configuration présentée à la **figure 53-a**. Les systèmes de seconde génération n'ont donc plus de capillaire de transition et le microcanal débouche directement sur le bord de la source suivant la configuration présentée à la **figure 53-b**. Les systèmes de troisième génération reprennent les configurations a ou b mais sont caractérisés par un traitement local (autour de la source, celle-ci n'étant pas traitée) au Téflon[®] permettant de s'affranchir des problèmes de fuite du liquide par capillarité en sortie de microcanal. Enfin, les systèmes de génération 4 sont caractérisés par une géométrie de couplage présentée à la **figure 53-c**, la source étant traitée localement au Téflon[®].

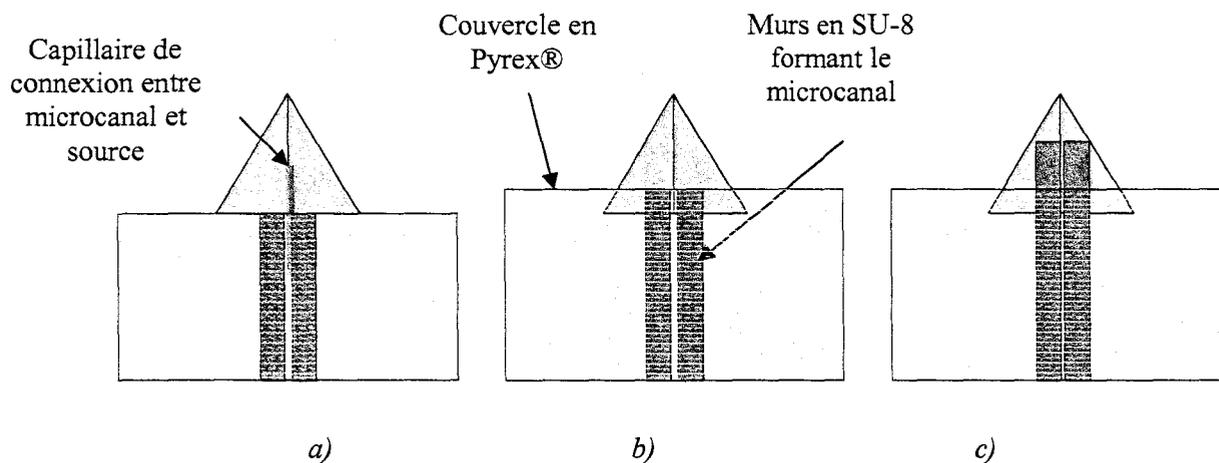


Figure 53 : Schéma de présentation des différentes configurations des prototypes réalisés : a) configuration a utilisant un capillaire entre le microcanal et la source ; b) configuration b où le microcanal débouche sur le bord de la source ; c) configuration c où le microcanal est prolongé sur la source.

c) Seconde génération de couplage

Les microsystèmes où le canal débouche directement sur la source (couplage de génération 2) sont réalisés. Cette topologie a pour but de caractériser en premier lieu le couplage sans intégration de monolithes. Deux géométries sont caractérisées : dans le premier

cas, le microcanal débouche à 2 mm de l'extrémité de la source (**figure 54-a**), dans le second, il débouche en milieu de plume à 1 mm de l'extrémité (**figure 54-b**). Dans les deux cas, des fuites sont observées le long du couvercle et autour de la source ; ces structures ne permettent une alimentation du spectromètre de masse que pour des débits supérieurs à $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Cependant, cette approche a permis de tirer deux conclusions. La première concerne la géométrie de ce couplage qui doit assurer la continuité entre le flux provenant du microcanal et la source. La seconde concerne la nature de la surface au niveau de la tranche du couvercle qui doit être hydrophobe pour éviter les fuites.

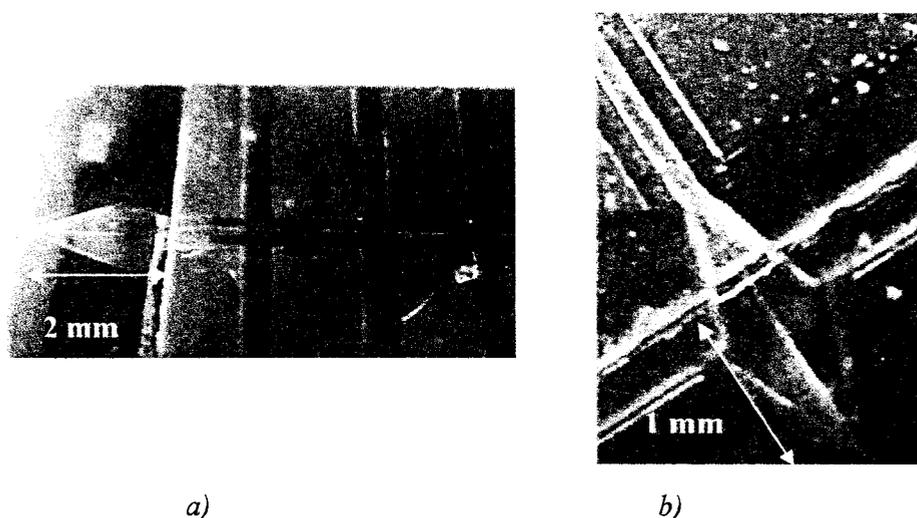


Figure 54 : Couplage de génération 2 sans capillaire de jonction entre le microcanal et la source :
a) le microcanal débouche à 2 mm de l'extrémité de la source ; b) le microcanal débouche en milieu de plume à 1 mm de l'extrémité.

i) Nature de la géométrie

Afin de limiter les volumes morts, la source d'électronébulisation doit être alimentée le plus près possible de la pointe où s'amorce l'électrospray (comme nous l'avons constaté avec les deux premières générations de couplage que ce soit avec un capillaire ou avec un microcanal). Cela peut être réalisé grâce à un microcanal débouchant près de l'extrémité de la source.

ii) Nature de la surface

Si les débits inférieurs à $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ne permettent pas d'alimenter la source, cela est dû au problème de fuite au niveau de la transition. En effet, la majeure partie du liquide fuit sur

le côté longeant le bord du couvercle au lieu de se diriger en bout de source. Afin de limiter ces phénomènes d'écoulements parasites, il semble important de rendre la surface suffisamment hydrophobe pour que le liquide débouchant du canal reste confiné localement entre la fin du microcanal et l'extrémité de la source.

Afin de résoudre ce problème, des mesures d'angles de goutte permettant de connaître le degré d'hydrophobicité de plusieurs matériaux sont réalisées (**Digidrop,GBX**). Le principe est le suivant : lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact θ . Il rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface et dépend des interactions entre le liquide et le solide.

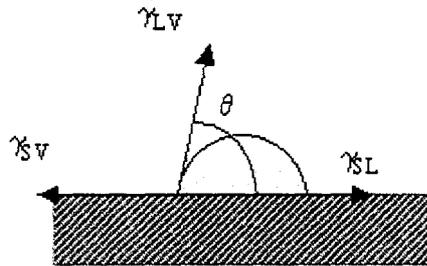


Figure 55 : Définition des paramètres : γ_{SL} , γ_{SV} , γ_{LV}

Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (faible énergie de surface) ou hydrophile (grande énergie de surface) de la surface. La forme d'une goutte à la surface d'un solide est régit par 3 paramètres (**figure 55**) : γ_{SL} (la tension interfaciale solide-liquide), γ_{SV} (la tension interfaciale solide-vapeur), γ_{LV} (la tension interfaciale liquide-vapeur). Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young :

$$\gamma_{SV} + \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta = 0 \quad [17]$$

Les matériaux testés sont les suivants : SU-8, SU-8 ayant subi un plasma CHF₃, (débit CHF₃ = 100 sccm ; Puissance RIE = 100 W ; Puissance ICP = 100 W ; Pression = 200 mT ; Temps = 10 min ; DC Bias = 300 V), Pyrex®, Pyrex® ayant subi un plasma CHF₃, silicium, silicium ayant subi un ou deux plasmas CHF₃, SU-8 ayant reçu un traitement hydrophobe au Téflon® par vaporisation.

Les résultats sont présentés dans le **tableau 6**. Ces mesures caractérisent la nature plus ou moins hydrophile du matériau afin d'estimer le risque de fuite par capillarité du

liquide sur ces matériaux. Nous avons opté pour le traitement au Téflon® par vaporisation permettant d'obtenir la surface la plus hydrophobe.

Matériau	SU-8	SU-8 (plasma CHF ₃)	Pyrex®	Pyrex® (plasma CHF ₃)	Si	Si (plasma CHF ₃)	Si (plasma CHF ₃ x2)	SU-8 traitée au Téflon®
Angle de contact d'une goutte d'eau (°)	65	95	40	18	73	86	94	106

Tableau 6 : Angle de contact d'une goutte d'eau mesuré sur différents matériaux.

d) Troisième génération de couplage

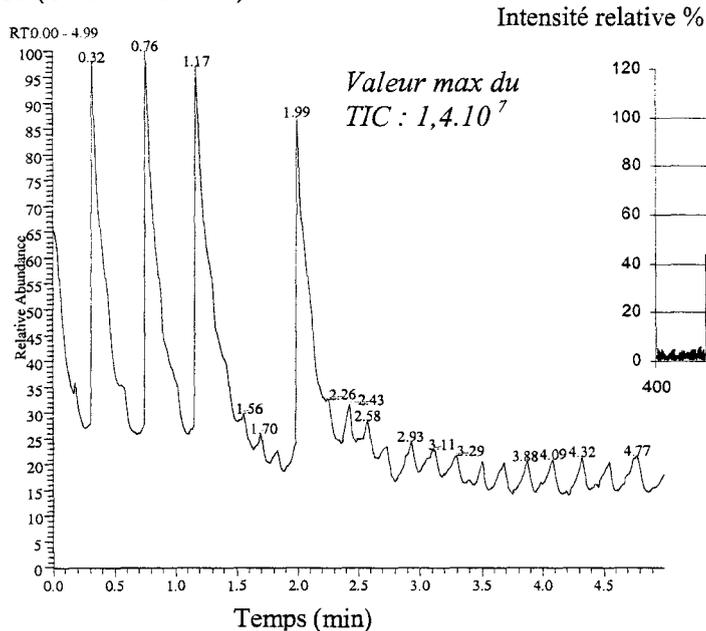
Ces structures sont localement traitées au Téflon® et présentent un comportement plus efficace avec moins de pertes dues au confinement du liquide en sortie de flux continu.

i) Système capillaire / source (configuration a)

Les tests sont réalisés avec une solution contenant un peptide (la bradikynine) à concentration de 8 pM dont le spectre de masse bien connu présente des pics caractéristiques : $m/z = 904$ (monochargé) et $m/z = 452$ (dichargé). Pour les microsystèmes présentant une distance de 2 mm entre la fin du capillaire et l'extrémité de la source, des débits allant de 900 à 700 nL.min⁻¹, et des tensions comprises entre 1,5 et 1,7 kV permettent d'observer un courant d'électrospray (TIC : *Total Ion Current*) constant pendant 1 min.

Lorsque la distance entre la fin du capillaire et l'extrémité de la source n'est plus que de 1 mm, à une tension d'ionisation de 1,7 kV, nous observons un TIC pulsé dû à une alternance d'engorgements et d'expulsions de goutte pour un débit de 500 nL.min⁻¹ (**figure 56**). Le spectre est correct puisque le spectromètre est bien alimenté. La tension s'est révélée trop importante pour ce débit. Nous obtenons un TIC plus constant pour des débits de 400 ; 300 ; 200 nL.min⁻¹. Pour un débit de 100 nL.min⁻¹, il se produit un assèchement de la source provoquant la rupture du couplage. Pour une tension d'ionisation de 1,3 kV, nous observons un TIC constant pour des débits de 300 et 500 nL.min⁻¹. Cette fois, pour un débit de 500 nL.min⁻¹, le TIC n'est pas pulsé car la consommation de la source est plus faible (**figure 57**). Il y a également plus d'ions dichargés avec cette plus faible tension.

TIC (Total Ion Current)



Intensité relative %

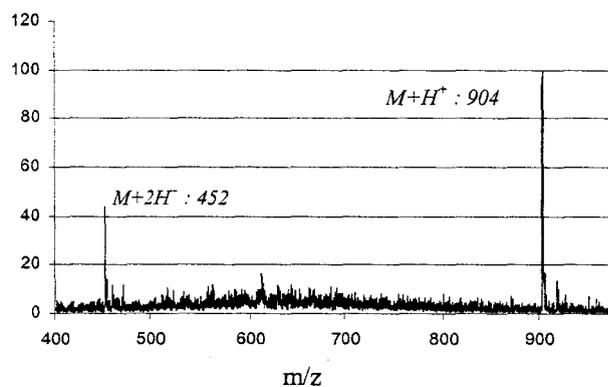
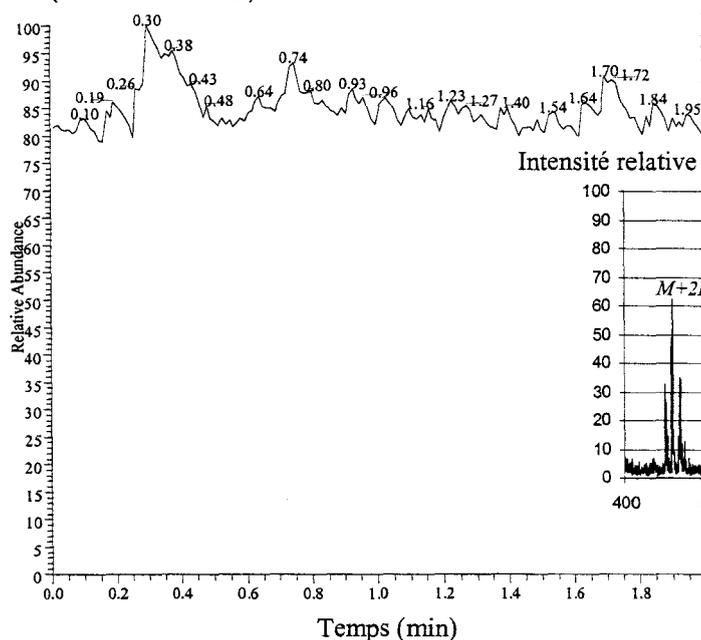


Figure 56 : Evolution du courant d'électrospray en fonction du temps pour un débit amont de $500 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ et une tension d'ionisation de $1,7 \text{ kV}$ (sur la droite, spectre de masse observé). Le résultat est obtenu avec un couplage de génération 3 dans une configuration a. Nous observons un régime pulsé.

TIC (Total Ion Current)



Intensité relative %

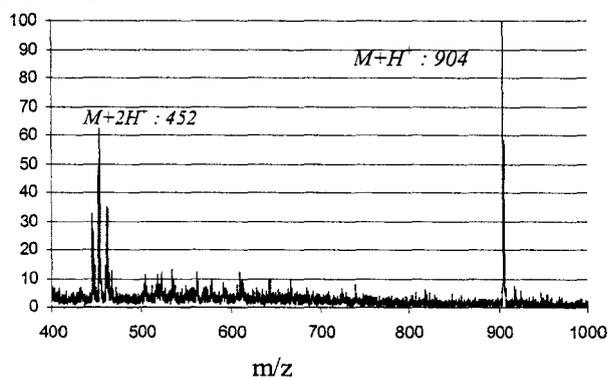


Figure 57 : Evolution du courant d'électrospray en fonction du temps pour un débit amont de $500 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ et une tension d'ionisation de $1,35 \text{ kV}$ (sur la droite, spectre de masse observé). Le résultat est obtenu avec un couplage de génération 3 dans une configuration a. Nous observons la stabilité du courant d'électrospray.

Nous pouvons donc établir une corrélation entre débit et tension. Si la tension est trop élevée par rapport au débit, des gouttes de l'ordre du μL sont expulsées et le TIC a un régime pulsé. Ainsi les meilleurs résultats avec ce type de source sont obtenus avec une tension de 1,3 kV pour un débit de $300 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$. Cependant, les structures alimentées par un capillaire (**figure 58-a**) présentent encore des phénomènes de fuite le long de ce capillaire et rendent l'alimentation de la source plus aléatoire. En effet, la goutte débouchant du capillaire remonte le long du capillaire d'alimentation (**figure 58-b**) ou se dirige vers l'extrémité de la pointe (**figure 58-c**). De plus cette configuration entraîne des volumes morts assez importants qui sont réducteurs dans le cadre d'une opération de séparation.

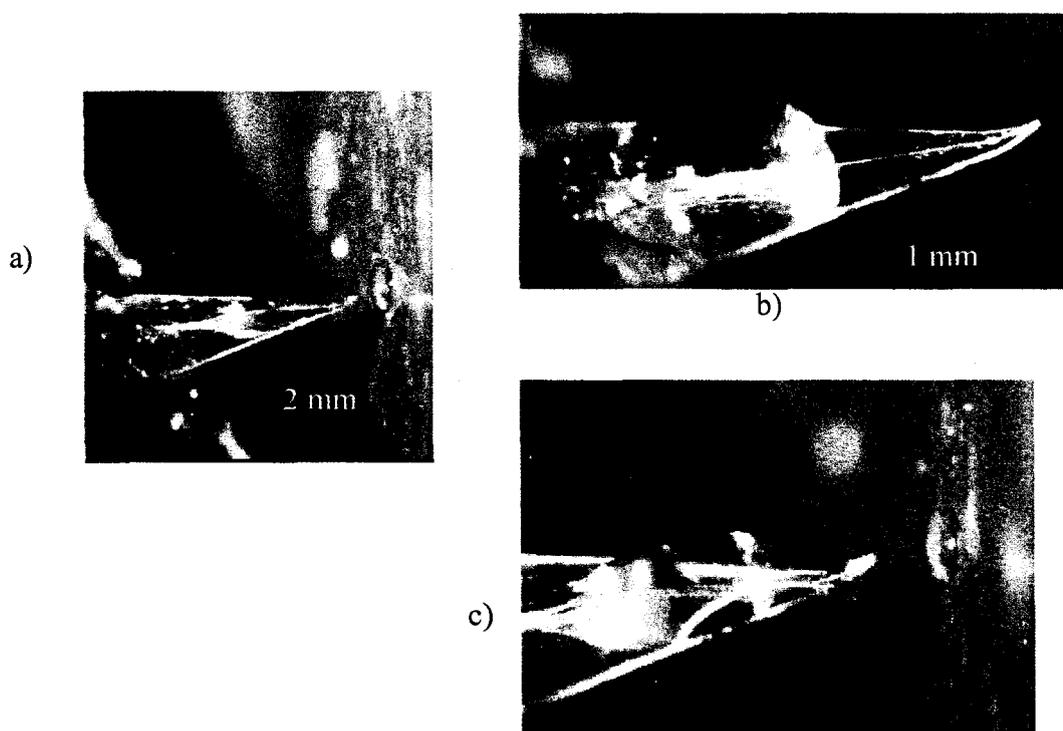


Figure 58 : Comportement fluïdique en bout de capillaire alimentant une source traitée au Téflon® : a) apparition de la goutte en bout de capillaire ; b) formation de la goutte le long du capillaire ; c) gonflement de la goutte en bout de capillaire et formation de l'électrospray.

ii) Système canal / source (configuration b)

Les microsystèmes, présentant un couplage direct entre microcanal et source (**figure 52-b**) traitée au Téflon®, permettent de nous affranchir des problèmes de remontée du liquide le long du capillaire (**figure 58**), rendant la manipulation plus reproductible. Cependant, il est important de ne pas recouvrir totalement la source avec du Téflon® sinon la

transition entre microcanal et fente de la source n'est pas assurée. Le flux continu sortant du canal gonfle en formant une goutte qui n'alimente pas la pointe de la source (**figure 59**). Nous prenons donc soin lors de la vaporisation du Téflon® de ne recouvrir que la tranche du couvercle et non la fente de la source (protégée par un capillaire par exemple).

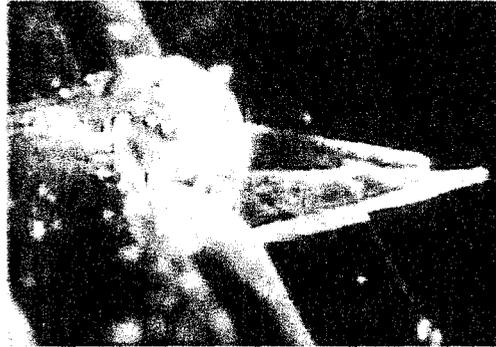


Figure 59 : Comportement fluide en bout de canal (configuration b) alimentant une source traitée au Téflon® permettant de la rendre hydrophobe. La goutte ne se disperse pas, il n'y a pas de fuites par capillarité sur la tranche du couvercle mais le liquide ne se dirige pas vers la fente de la source.

La performance du couplage reste cependant au même niveau, nous avons obtenu un TIC constant (**figure 60**) pour un débit de 500 nL.min⁻¹ et une tension de 1,5 kV ainsi que pour un débit de 200 nL.min⁻¹ et une tension de 900V (**figure 61**) mais le TIC est moins stable.

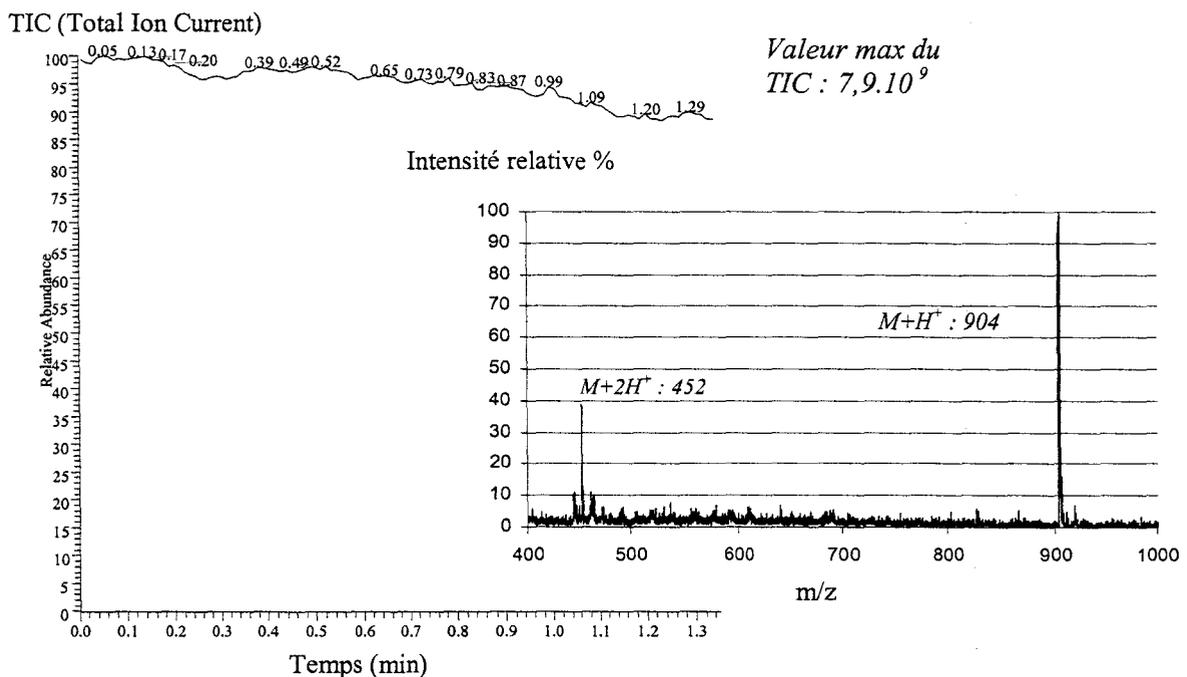


Figure 60 : Observation de la stabilité du courant d'électrospray pour un débit amont de 500 nL.min⁻¹ et une tension d'ionisation de 1,5 kV (sur la droite, spectre de masse observé).

Spectre obtenu avec un couplage de génération 3 dans une configuration b.

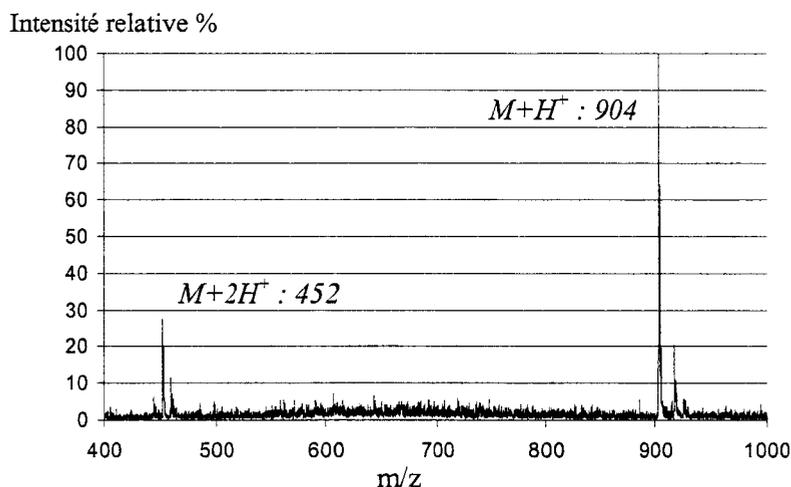


Figure 61 : Spectre de masse obtenu pour un débit amont de $200 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ et une tension d'ionisation de 900 V . Le spectre est obtenu avec un couplage de génération 3 dans une configuration b.

La dernière évolution de cette génération de système est réalisée à partir de murs qui prolongent le microcanal sur la source correspondant à la configuration c (**figures 62 et 63-a**). Ce design permet de minimiser le volume mort au niveau du couplage. Il guide le flux sortant du canal vers la pointe en limitant les pertes d'échantillon dans l'objectif de diminuer le débit imposé en amont pour alimenter le microsystème.

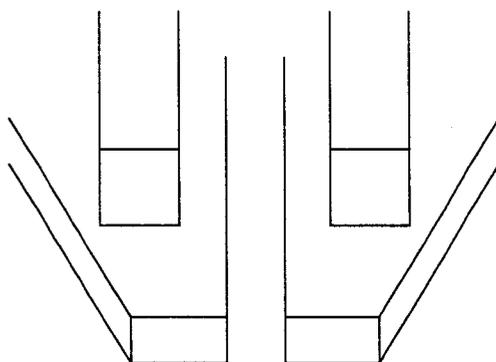


Figure 62 : Schéma du couplage microcanal / source en configuration c où le microcanal est prolongé sur la source.

La **figure 63-a** montre la réalisation de ce couplage avec des murs traités au Téflon® et la **figure 63-b**, la progression du liquide sur la source lorsque la tension d'ionisation n'est pas appliquée pour des débits d'environ $100 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$. Nous avons pu remarquer qu'il n'y avait pas formation de goutte en bout de canal.

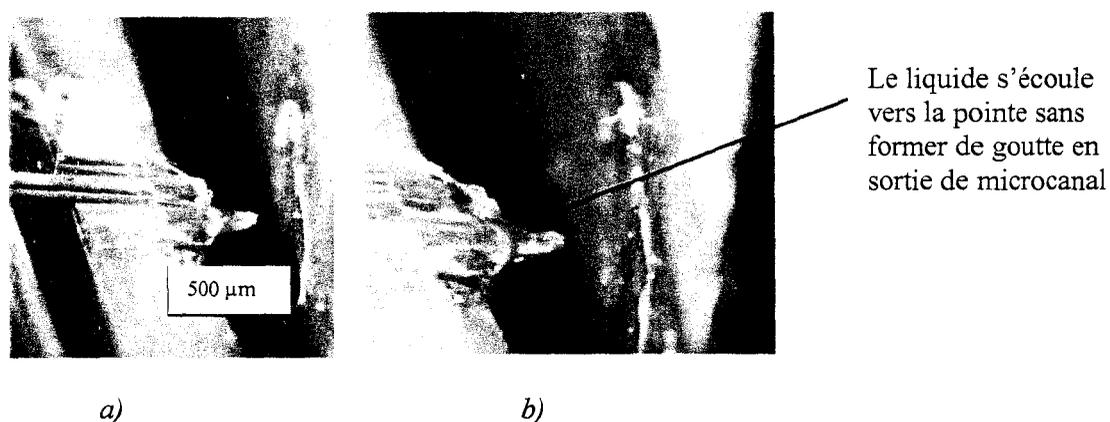


Figure 63 : La source est alimentée par un canal prolongé recouvert de Téflon® (génération 3 avec la configuration c) : a) Photo de la structure suspendue ; b) progression du liquide sur la source.

Ce design permet de guider des flux vers la source pour des débits inférieurs à $100 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le microsystème est alimenté par le mélange de peptides suivants : $m/z = 685$, $m/z = 942$, $m/z = 794$, $m/z = 1001$, $m/z = 1188$. Le débit imposé est de $100 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ et la tension d'ionisation est de 2 kV . Les peptides sont retrouvés dans le spectre de masse présenté sur la **figure 64** (les pics étoilés correspondent aux ions monochargés ou dichargés des différents peptides) [18].

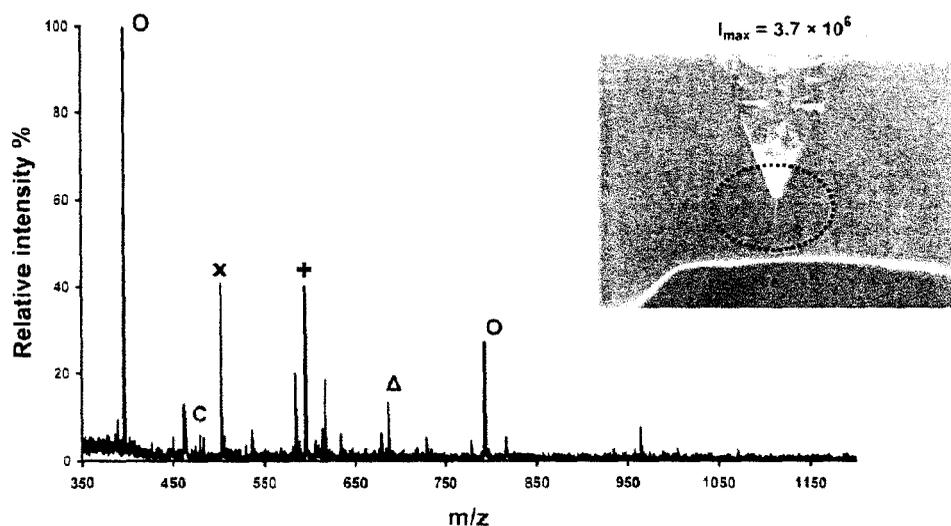


Figure 64 : Spectre de masse d'un mélange de peptides obtenu avec le couplage microcanal / source de génération 3 et configuration c dans les conditions suivantes : débit = $100 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$; tension d'ionisation = 2 kV . Les peptides suivants sont observés : $m/z = 685$, $m/z = 942$, $m/z = 794$, $m/z = 1001$, $m/z = 1188$. La photo insérée montre le nébulisât permettant d'obtenir ce spectre.

e) **Conclusion**

Dans le cas d'un couplage destiné à des étapes de séparation où les volumes morts sont rédhibitoires, nous envisageons de réaliser un microcanal débouchant à moins de 300 μm l'extrémité de la source (**figure 65**). Cette distance est nécessaire pour assurer l'effet de pointe permettant l'électronébulisation.

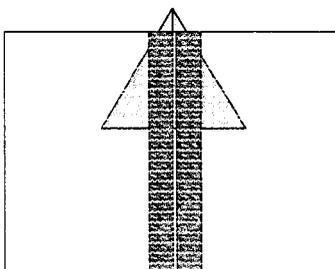


Figure 65 : Configuration où le microcanal débouche, en étant fermé, à moins de 300 μm de l'extrémité de la source.

Nous envisageons donc l'intégration des structures monolithiques (testées dans les microcanaux simples) dans cette dernière génération de prototype. Il faut cependant prendre en compte l'évacuation des fluides permettant de fabriquer le monolithe, puisque la dernière génération de couplage ne comprend plus de capillaire de sortie.

Conclusion

Nous avons présenté, au cours de ce chapitre, la caractérisation des deux types de microcanaux réalisés (canaux courts de type 1 et canaux longs de type 2), de la source nanoESI développée, ainsi que la caractérisation en débit de prototypes intégrés comprenant ces deux éléments.

Les microcanaux réalisés présentent une résistance mécanique à la pression (lors de la circulation de solvants) qui a été caractérisée. Les microcanaux de type 2 résistent à des pressions jusqu'à 30 bar alors que les canaux de type 1 montrent une robustesse allant jusqu'à 70 bar. La porosité des structures monolithiques étant contrôlables, cette résistance permet d'obtenir un compromis satisfaisant entre faisabilité et performance. Les microcanaux de type 1 ont été validés en intégrant des structures monolithiques. Cette intégration a notamment permis de réaliser un module de dessalage efficace.

Un nouveau type de source dédiée à la spectrométrie de masse de type ESI est également réalisé en exploitant les caractéristiques mécaniques de la SU-8. Leur géométrie s'inspire de plumes de calligraphie, exploitant ainsi la capillarité de la fente. Ces sources se montrent relativement robustes et potentiellement manipulables dans le cadre d'une utilisation en routine dans les laboratoires d'analyses. L'efficacité de ces sources est directement liée à la diminution de leurs dimensions critiques puisque le rendement d'ionisation est d'autant meilleur que l'électronébulisation génère des gouttes de faible diamètre. Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec une largeur de fente de 8 microns.

Enfin, la technologie évolue dans la perspective d'une intégration de ces modules. Le premier point positif concerne le procédé technologique global autorisant la fabrication d'un microsysteme intégré. Le second concerne l'efficacité du couplage directement lié à sa géométrie ainsi qu'à la nature de la surface. Un traitement de surface hydrophobe confine localement le liquide en bout de canal et des spectres sont obtenus pour un débit amont de $100 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ qui est un débit courant en chromatographie liquide. Cette configuration peut être optimisée pour réduire encore les volumes morts dans le cas d'une opération de séparation. Ces résultats sont obtenus sans capillaire de transition entre microcanal et source, mais l'intégration de phases monolithiques est réalisable à condition de procéder au lavage de la source après polymérisation du monolithe.

Bibliographie du chapitre 3

- [1] E. H. Conradie and D. F. Moore, 'SU-8 thick photoresist processing as a functional material for MEMS applications', *J. Micromech. Microeng.*, 12, 4, pp.368-374, 2002.
- [2] C.-H. Lin, G.-B. Lee, B.-W. Chang and G.-L. Chang, 'A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photoresist', *J. Micromech. Microeng.*, 12, pp 590-597, 2002.
- [3] C.-T. Pan, H. Yang, S.-C. Shen, M.-C. Chou and H.-P. Chou, 'A low-temperature wafer bonding technique using patternable materials', *J. Micromech. Microeng.* 12, 611-615, 2002.
- [4] Y.-J. Chuang, F.-G. Tseng, J.-H. Cheng and W.-K. Lin, 'A novel fabrication method of embedded microchannels by using SU-8 thick-film photoresists', *Sensors and Actuators A* 103, pp.64-69, 2003.
- [5] J. Carlier, S. Arscott, V. Thomy, J.C. Fourier, F. Caron, J.C. Camart, C. Druon, P.Tabourier 'Integrated Microfluidics based on Multi-Layered SU-8 for Mass Spectrometry analysis', *J. Micromech. and Microeng.* 14, pp.619-24, 2004.
- [6] S. Le Gac, 'Développement de systèmes microfluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM', Thèse de doctorat de l'université de Lille1, 2004.
- [7] K. Chuda, X. Coqueret, J. Carlier, V. Thomy, C. Druon, P. Tabourier, J.-C. Camart, 'Pressure and solvents resistant microsystem for monolithic column integration', Congrès IUPAC, Paris, 2004, acceptée.
- [8] D. Meier, O. Kempf, 'Mécanique des fluides', Masson, série Le Hir / Maruani, 1996.
- [9] S. Le Gac, J. Carlier, C. Cren-Olivé, J.-C. Camart, C. Rolando, 'Monoliths for microfluidics devices in proteomics', *J. Chrom. B.*, 808(1), pp.3-14, 2004.
- [10] J. Carlier, S. Le Gac, S. Arscott, V. Thomy, J. C. Fourier, F. Caron, C. Cren-Olivé, C. Rolando, J. C. Camart, C. Druon, P. Tabourier, 'SU-8 technology and monolithic columns for integration in a biological lab-on-chip', *Proc. Micro Total Analysis System (μ TAS)*, Squaw Valley, CA, USA, October 5-9, Vol.1, pp 315-318, 2003.
- [11] H. Lorenz, M. Laudon and P. Renaud, "Mechanical characterization of a new high-aspect-ratio near UV-photoresist", *Microelec. Engin.*, 41/42, pp 371-374, 1998.
- [12] S. Arscott et al, - 'Sources délectronébulisation planaires sur le modèle d'une plume de calligraphie et leur fabrication', demande de brevet français N° 03 50820 déposée le 12-11-2003.

- [13] S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier and C. Rolando, "A planar on-chip micro-nib interface for NanoESI-MS microfluidic application", *J. Micromech. Microeng.* 14, pp.310-316, 2004.
- [14] S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier, C. Rolando, 'A Micro-nib nanoelectrospray source for mass spectrometry', *Sens. and Act. B*, 98, pp.140-147, 2004.
- [15] M. Brinkmann, R. Blossey, S. Arscott, C. Druon, P. Tabourier, P. Tabourier, S. Le Gac, C. Rolando, 'Microfluidic design rules for capillary slot-based electrospray sources', *Applied Physics Letters* 85 (11), pp.1240-1242, 2004.
- [16] J. Carlier, S. Arscott, F. Caron, J.-C. Fourier, V. Thomy, J.-C. Camart, C. Druon, P. Tabourier, 'Microfluidique intégrée pour le couplage d'un microcanal à une interface nanoESI : application à la protéomique ', *Congrès SHF Microfluidique, Toulouse, 2004*, acceptée.
- [17] C.J. van Oss, 'Forces interfaciales en milieux aqueux', Ed . MASSON, 1996.
- [18] J. Carlier, S. Arscott, V. Thomy, J.-C. Camart, C.Cren-Olivé, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier, 'Integrated microfabricated systems including a purification module and an on-chip nanoESI interface for biological analysis', *J. Chrom A*, submitted.

Chapitre 4

Composants actifs pour la microfluidique *intégrée*

La filière SU-8 mise au point plus spécifiquement pour réaliser le prototype de microsystème ESI/MS offre en pratique un champ applicatif plus étendu. Nous mettons donc à profit l'expérience acquise pour explorer la réalisation d'autres composants microfluidiques. De plus, cette filière se prête à la réalisation de composants variés dans la mesure où elle autorise également des dépôts de matériaux très divers comme les métaux ou le Téflon[®], mais aussi des polymères aux fonctionnalités biochimiques spécifiques.

La possibilité d'intégrer des connexions métalliques dans les structures en SU-8 ouvre des perspectives que nous avons explorées. Ainsi, nous pouvons proposer des prototypes dédiés à une autre application qu'est l'électrochimie *in situ* dont le principe repose sur l'application de différences de potentiel localisées grâce à des microélectrodes intégrées.

Nous avons également exploré la faisabilité de composants microfluidiques intégrés dédiés au déplacement de liquide. Ces composants sont réalisables en exploitant les caractéristiques de la SU-8. Nous avons étudié la réalisation de plusieurs types de microvalves, dont des microvalves thermo-activables basées sur l'utilisation d'un polymère thermosensible qui peut être commandé par un actuateur thermique intégré dans des microcanaux en SU-8. Nous envisageons aussi la réalisation d'un échantillonneur pour le passage d'un transport fluide continu à celui d'un transport de microgouttes. Le transport de microgouttes par effet EWOD nécessite l'utilisation d'une couche de Téflon[®] déposée sur les électrodes de commande en métal, matériaux avec lesquels la résine SU-8 s'est avérée compatible.

I) Éléments pour l'électrochimie

A) Intégration de microélectrodes

Dans le cadre de nos collaborations, nous nous sommes intéressés à une autre application : l'électrochimie. Cette application repose sur la création de différences de potentiel localisées obtenues grâce à des microélectrodes. La technologie de fabrication de microcanaux en SU-8 permet d'intégrer des connexions métalliques de ce type.

1) Intérêt de la résine SU-8

L'intégration de microélectrodes repose sur la compatibilité entre pistes métalliques et réseau microfluidique étanche. Le problème rencontré lors de l'intégration de connexions métalliques dans un réseau microfluidique gravé dans le silicium ou dans le verre est double.

D'une part, les pistes métalliques réalisées sur un substrat préalablement gravé risquent d'être discontinues puisque l'étape de lithographie a lieu sur un substrat qui n'est plus un plan. D'autre part, la surépaisseur induite par les pistes métalliques oblige à graver le substrat (ou le couvercle) afin d'enterrer les pistes pour s'affranchir de cette surépaisseur (**figure 1-a**). En revanche, si une résine photolithographique est utilisée pour former le réseau microfluidique, il est possible de réaliser les connexions métalliques en premier lieu. De plus, de par son état visqueux, la résine compense la surépaisseur des pistes métalliques lors du dépôt (**figure 1-b**).

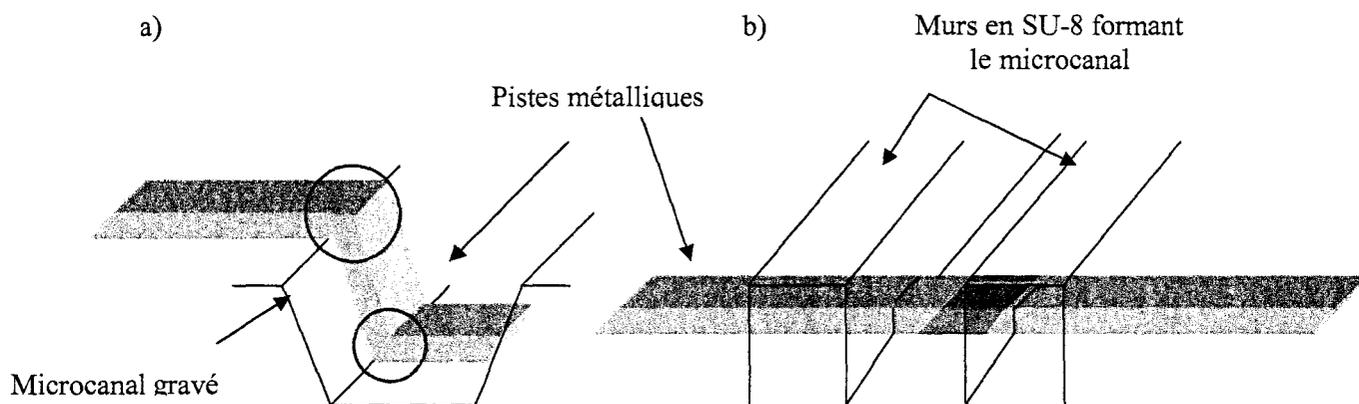


Figure 1 : Intégration de connexions métalliques dans un microcanal : a) le microcanal est préalablement gravé ; b) les pistes métalliques sont d'abord réalisées, le microcanal est réalisé grâce à la résine SU-8 ensuite.

2) Technologie

Les substrats utilisés sont en Pyrex® (ou en silicium recouvert de SiO₂) qui est électriquement isolant. Les métaux utilisés pour réaliser les connexions métalliques sont du nickel ou de l'or. Ce dernier n'adhérant pas sur le verre, il nécessite une couche d'interface en titane ou en nickel.

L'adhérence de la SU-8 2002 sur les substrats en Pyrex®, comme nous l'avons vu chapitre 3 I A, n'est naturellement pas suffisante pour assurer l'étanchéité. Au niveau du couvercle du dispositif, nous avons eu recours, lors de la préparation, à un agent de couplage. En revanche, au niveau de la base du microsystème, si une couche d'adhérence en SU-8 2002 est nécessaire comme pour le silicium, la préparation du substrat est différente puisqu'il reçoit des connexions métalliques. Or, le dépôt de l'agent de couplage (qui est réalisé après la fabrication des connexions métalliques) n'est pas obtenu par une étape de photolithographie, il n'est pas possible de le déposer localement sans recouvrir les connexions métalliques (ce qui peut être gênant dans le cadre des applications). Nous avons donc préparé le substrat en le trempant dans un bain d'acide fluorhydrique (HF 50%) avant d'effectuer le dépôt métallique.

Les connexions métalliques sont ensuite obtenues de façon standard par photolithographie, métallisation par évaporation et *lift-off*.

Le changement majeur (par rapport à la technologie décrite dans le chapitre 3) concerne la couche d'accrochage en SU-8 2002 qui est cette fois ouverte localement pour ne pas recouvrir les électrodes et les plots de commandes associés. Les structures en SU-8 sont réalisées suivant la technologie présentée dans le chapitre 3. Un couvercle en Pyrex® est ensuite collé par SU-8 pour fermer la structure (**figure 2**).

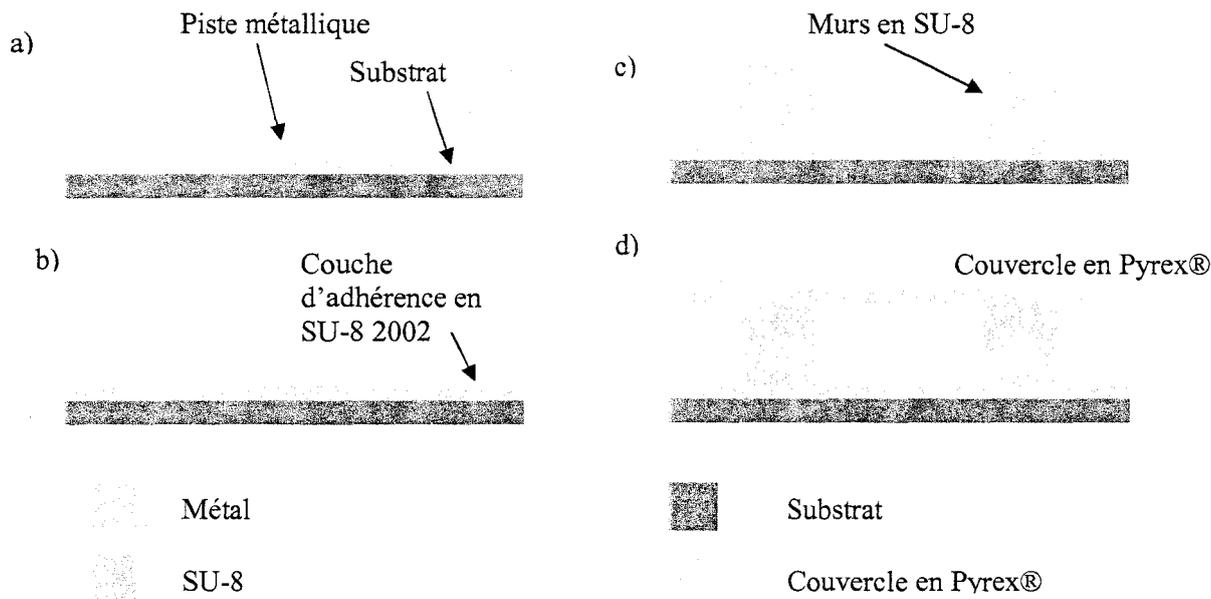


Figure 2 : Etapes fondamentales de l'intégration de connexions métalliques dans une structure en SU-8 : a) fabrication de la piste métallique par lift-off ; b) dépôt de la couche d'interface en SU-8 2002 ouverte au niveau des motifs métalliques ; c) réalisation des murs formant le microcanal ; d) collage du couvercle par SU-8.

B) Application en électrochimie

L'électrochimie a pour objet l'étude des réactions chimiques impliquant le transfert ou le transport de charges électriques.

L'objectif est de faire de la voltamétrie cyclique dont le principe consiste à appliquer une tension croissante à travers une électrode plongée dans l'échantillon à analyser (cyclique car deux balayages linéaires, dans un sens et dans l'autre de façon à revenir au potentiel de départ, après avoir donc effectué un cycle). L'augmentation de la tension provoque une excitation chimique de l'antioxydant qui se traduit par l'apparition d'un courant d'oxydation dont l'intensité augmente jusqu'à atteindre un maximum (pic d'oxydation) pour diminuer ensuite alors que le potentiel continue à augmenter. Les séquences de variation de tension sont contrôlées par des bases de temps choisies pour se focaliser spécifiquement sur les pics d'oxydation qui sont habituels dans les antioxydants. L'intérêt de la linéarité du balayage est de faire directement correspondre l'échelle en temps avec l'échelle en potentiel qui sera utilisée pour représenter la réponse en courant. L'effet du balayage de potentiel est de

provoquer la consommation progressive de l'espèce étudiée et le courant correspond à ce que peut fournir le mécanisme à chaque potentiel.

Dans la relation Tension / Courant, le potentiel d'oxydation permet l'identification du type d'antioxydant. La hauteur du pic du courant d'oxydation indique la concentration de cet antioxydant [1-3].

L'électrode de travail est l'électrode sur laquelle est étudié le mécanisme d'oxydo-réduction. L'électrode de référence est l'électrode sur laquelle est déposé un couple rédox choisi pour sa stabilité et qui traduit le potentiel chimique de l'électrolyte en potentiel électrique de façon à pouvoir imposer ou mesurer une différence de potentiel entre l'électrolyte (la solution) et l'électrode de travail. On appelle contre-électrode, l'électrode servant à faire passer le courant vers l'électrode de travail afin de lui imposer un potentiel.

Les 3 électrodes (de référence, de travail et la contre-électrode) ont une longueur de 2 cm, une largeur de 50 μm ou 20 μm et sont espacées de 30 μm (**figure 3**). Ces dimensions ont été choisies pour pouvoir être intégrées facilement dans des canaux de type 1. L'intérêt d'avoir des microélectrodes est de pouvoir augmenter la vitesse de balayage car le terme de chute ohmique est diminué [4]. La chute ohmique est la différence de potentiel électrique due au passage du courant (ionique) dans l'électrolyte qui présente une certaine résistance entre l'électrode de travail et celle de référence.

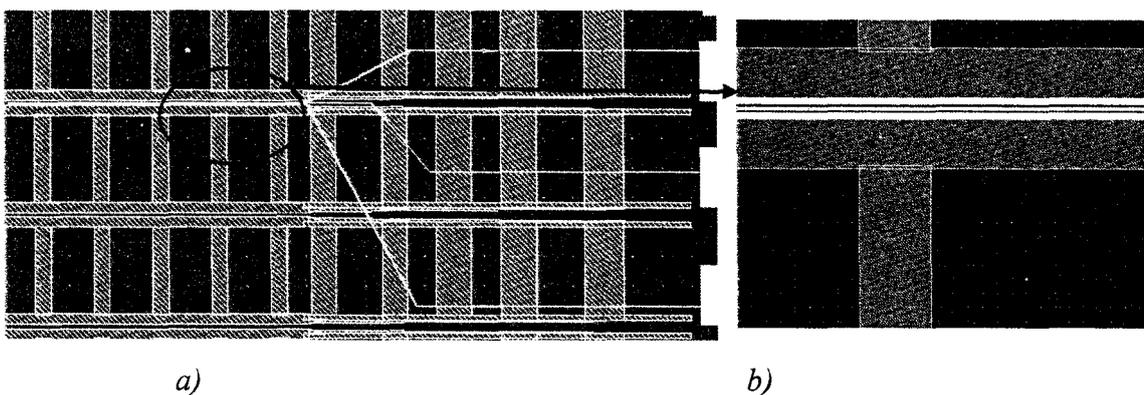


Figure 3 : Schéma du masque utilisé pour réaliser la structure dédiée à l'électrochimie. Elle comprend : a) des microcanaux réalisés en SU-8 ainsi que b) 3 électrodes.

II) Éléments de pompe à actuation thermique

L'intégration d'une pompe dans les microsystèmes fluidiques est un point clé dans le cadre d'une autonomie croissante. L'intégration de tels composants de pompage entraîne des contraintes liées à la technologie employée (qui doit être compatible avec le reste du microsystème), à la simplicité de réalisation (pour une intégration facilitée) et aux performances escomptées selon l'application envisagée (pressions obtenues, temps de réaction, durée de vie). Dans ce contexte, nous nous sommes orientés vers une étude de faisabilité d'une pompe à l'aide de la technologie à base de SU-8 développée. Cette étude repose sur la réalisation de plusieurs composants tels qu'un actuateur thermique et différents types de valves (des valves passives dont l'effet est basé sur la dissymétrie de leur géométrie), des valves de type anti-retour comprenant une pièce mobile ou encore des valves thermoactivables afin d'assurer une fonction de pompe.

A) L'actuation thermique

1) Principe physique

Des études théoriques et expérimentales (chapitre 1 II B 3) présentent le phénomène de l'actuation thermique [5-7]. Ce principe repose sur la création d'une bulle par évaporation d'une infime quantité d'eau liquide par effet joule grâce à un élément résistif. La possibilité de générer cette bulle est directement liée à la puissance transmise à l'actuateur par impulsion.

2) Résistance de type 1

La possibilité de réalisation d'une actuation thermique dans une chambre en SU-8 repose sur l'intégration de pistes métalliques. Celles-ci vont permettre de réaliser des électrodes de commande (de faible résistance) et un élément résistif de 50Ω (pour être adapté au générateur).

a) Fabrication

Une première génération de résistances chauffantes est réalisée [8]. Ces résistances (**figure 4**) exploitent la résistivité élevée de l'alliage nickel/chrome 80/20 ($\rho = 108.10^{-6} \Omega.cm$). L'élément chauffant est composé uniquement de ce matériau alors que

les électrodes de commande sont constituées de l'empilement d'une couche d'alliage et d'une couche d'or de résistivité beaucoup plus faible ($\rho = 2,44.10^{-6} \Omega.cm$). L'ensemble électrodes de commande et résistance est fabriqué par *lift-off* de cette double couche, l'or étant ensuite attaqué localement pour former la résistance. Au niveau des électrodes de commande, la couche d'or (beaucoup moins résistive) court-circuite la couche d'alliage et empêche ces éléments de chauffer.

Afin de limiter la valeur de la résistance des électrodes de commande, dans le but d'améliorer le contraste résistif avec l'élément chauffant, ces pistes sont volontairement surdimensionnées (largeurs millimétriques). Cette technique permet d'obtenir des résistances de 50Ω connectées à des pistes d'accès d' 1Ω .

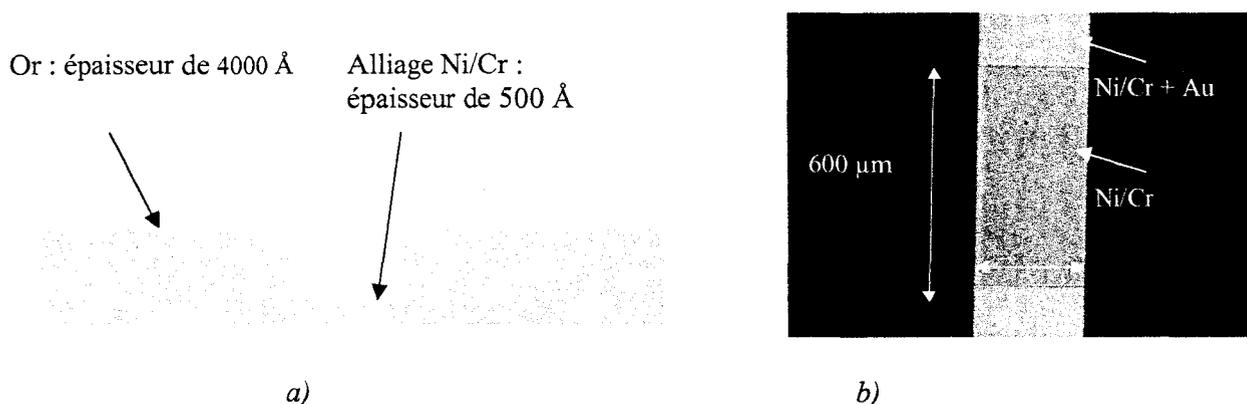


Figure 4 : Résistances de première génération réalisées à partir du contraste de résistivité des matériaux (l'or et l'alliage Ni/Cr) : a) structure de l'élément chauffant ; b) photographie de la résistance de dimensions $300 \times 600 \mu m^2$.

b) Tests des résistances

Ces résistances, facilement réalisables et reproductibles, ont été caractérisées. Les connexions métalliques, alimentant l'élément chauffant, ont une résistance inférieure à 1Ω . Les mesures de résistance des éléments chauffant réalisés donnent une valeur moyenne de 47Ω (sur 20 réalisations).

Pour contrôler plus précisément l'énergie transmise au liquide, nous avons alimenté les éléments résistifs par des impulsions électriques élémentaires. Le premier test a donc consisté à alimenter (**figure 5-a**) l'élément chauffant recouvert d'une goutte d'eau d'un volume de l'ordre de 100 nL. L'énergie théoriquement nécessaire pour vaporiser entièrement

ce volume est d'environ 230 mJ (l'énergie de vaporisation massique de l'eau est de $2,27 \cdot 10^6 \text{ J.kg}^{-1}$).

L'alimentation est réalisée avec des impulsions électriques de 5 V d'amplitude, d'une durée de 75 ms (puissance de 0,5 W et énergie de 37,5 mJ) ; ces paramètres ont été déterminés pour pouvoir vaporiser le volume en 5 ou 6 impulsions. Nous avons constaté expérimentalement qu'un train de 10 à 12 impulsions (espacées de 500 ms) provoque l'évaporation de la goutte d'eau. Chaque impulsion correspond à une énergie de 37,5 mJ, l'énergie cumulée est donc supérieure à l'énergie nécessaire. Cela est dû à une déperdition de chaleur liée à l'alimentation de la résistance qui n'est pas continue, mais aussi aux légères pertes de chaleur transmises au substrat.

Dans un second temps, nous avons augmenté l'amplitude à 10 V pour obtenir un effet plus rapide. La résistance est, dans ce cas, détruite après la première impulsion. En effet, le problème majeur rencontré est la densité de courant limitée par l'interface Au - Ni/Cr. A ce niveau, la résistance est trop fragile puisque toutes les lignes de courant passent d'un milieu peu résistif d'épaisseur 4000 Å à un milieu très résistif d'épaisseur 500 Å. La rupture de la continuité électrique se situe à cette interface Au - Ni/Cr (**figure 5-b**).

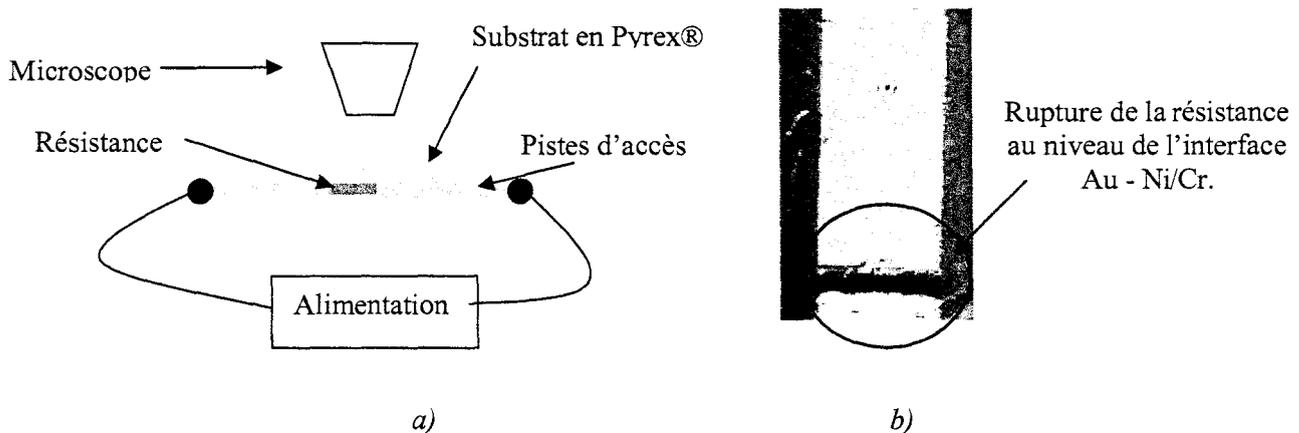


Figure 5 : Test des résistances de type 1 : a) dispositif de test ; b) résistance après une impulsion de 10 V pendant 75 ms.

La surface de cette résistance est également trop faible pour transmettre au maximum la puissance dissipée par effet joule au volume de liquide chauffé. Elle occupe une surface de $0,18 \text{ mm}^2$ ce qui représente seulement environ 25 % de l'aire de la chambre d'actuation qui est de $0,78 \text{ mm}^2$. Une résistance occupant une forme circulaire permet de répartir au mieux la surface chauffée dans la chambre d'actuation. De plus, la fréquence (2 Hz) et l'amplitude

(5 V) des impulsions, que les résistances de type 1 supportent, sont trop faibles pour assurer un pompage continu de liquide dans des microcanaux.

3) Résistance de type 2

La valeur d'une résistance est directement liée à la résistivité du matériau mais également à son rapport longueur sur section. D'autres éléments chauffants peuvent être obtenus avec une résistance réalisée en forme de serpent. Ceux-ci sont réalisées en or (une couche d'interface en nickel est nécessaire pour déposer celui-ci sur le Pyrex®), ont une longueur centimétrique et sont inscrites dans un cercle de 1 mm de diamètre.

Afin d'obtenir le même ordre de grandeur de contraste entre pistes d'accès et résistance, nous réalisons une résistance d'environ 40Ω , de largeur $20 \mu\text{m}$, d'épaisseur 5000 \AA et de longueur déployée $1,6 \text{ cm}$ (longueur maximale intégrable dans les chambres d'actuation si l'on veut réaliser un *lift-off* aisément) (**figure 6**). Cette résistance de type serpent occupe une surface de $0,32 \text{ mm}^2$. Cette surface n'est pas beaucoup plus importante que celle des résistances de type 1 ($0,18 \text{ mm}^2$) par contre, elle est mieux répartie et occupe la totalité de la surface de la chambre d'actuation.

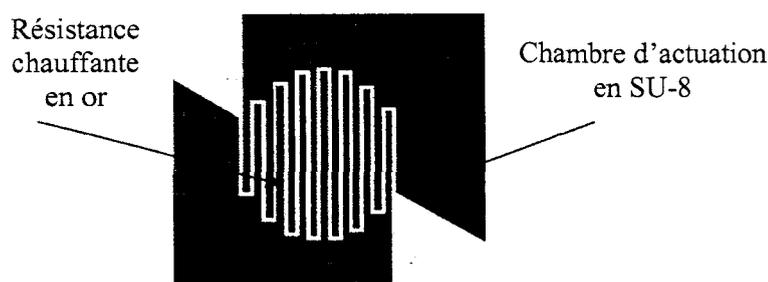


Figure 6 : Schéma du masque utilisé pour la réalisation des chambres d'actuation thermique de diamètre 1 mm : piste métallique en or (résistance de 40Ω), structures en SU-8 permettant de constituer la chambre d'une hauteur de $50 \mu\text{m}$ débouchant sur des canaux de section $50 \times 50 \mu\text{m}^2$.

Dans cette situation, nous avons pu vaporiser une goutte de 200 nL en une impulsion d'énergie 280 mJ ($P = 5,6 \text{ W}$, $U = 15 \text{ V}$; $t = 50 \text{ ms}$) (**figure 7**). Ces résistances supportent des courants de 375 mA .

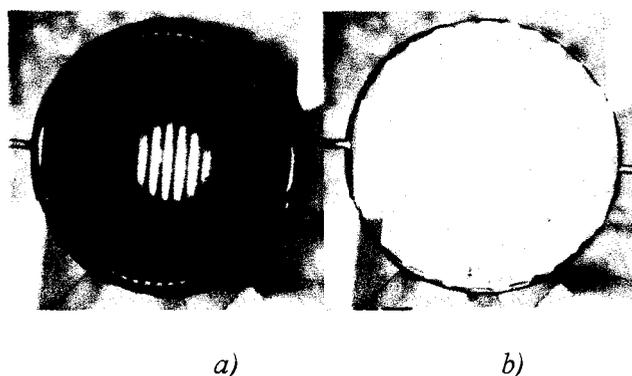


Figure 7 : Evaporation d'une goutte d'eau desionisée par application d'une tension de 15V pendant 50 ms sur une résistance de 40 Ω : a) goutte d'eau confinée dans la chambre avant impulsion ; b) vaporisation totale de la goutte après impulsion.

Nous observons ensuite le comportement du liquide dans le cadre d'une actuation en chambre fermée par un couvercle (**figure 8-a**). Une couche épaisse (100 μm) de SU-8 2075 est déposée afin de réaliser les chambres d'actuation ainsi que les microcanaux. La fermeture du système se fait par collage d'un capot en Pyrex® au moyen d'une couche de SU-8 suivant le procédé de collage décrit précédemment.

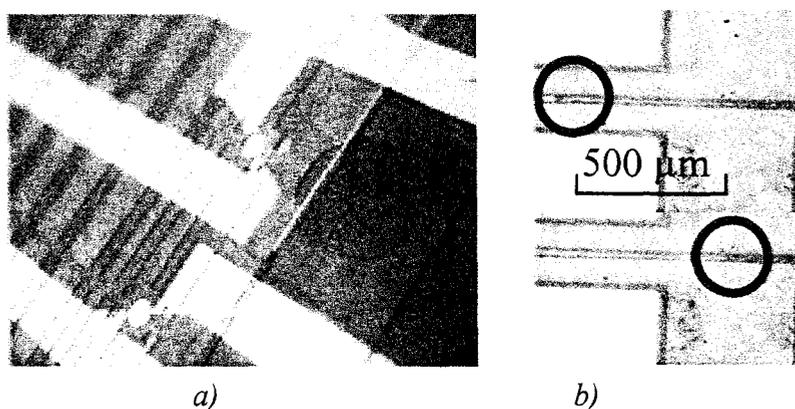


Figure 8 : Chambre d'actuation thermique : a) photo du microactuateur thermique ; b) déplacement d'un front de liquide dans un microcanal situé en amont du microactuateur. Le cercle indique le front du liquide dans le microcanal avant et après l'impulsion électrique dans la chambre d'actuation.

Cette actuation s'est révélée efficace puisqu'elle a permis de déplacer des colonnes de liquide dans des microcanaux de section $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ sur 0,7 mm de longueur (**figure 8-b**) grâce à une impulsion de 6V ($I = 150 \text{ mA}$) d'une durée de 50 ms. La puissance de l'impulsion est alors de 0,9 W et son énergie de 45 mJ. Cette impulsion permet de vaporiser une couche de liquide (épaisseur $< 10 \mu\text{m}$), qui crée une bulle dans la chambre afin

d'expulser le liquide dans les microcanaux. L'énergie dans ce cas est beaucoup moindre que celle nécessaire à l'évaporation d'une goutte complète dans une structure ouverte puisque d'une part, la chaleur est confinée dans une structure fermée et d'autre part, un plus faible volume de liquide est vaporisé.

L'actuation s'étant révélée efficace, il s'agit ensuite de fabriquer des valves pouvant être couplées à cette actuation afin d'obtenir un sens de déplacement préférentiel et réaliser un réel effet de pompe.

B) Microvalves

Plusieurs types de valves ont été étudiés, tirant profit de la technologie multimatériaux développée. Les premières sont des valves passives de type nez / diffuseur et reposent sur la dissymétrie de leur géométrie. Ce type de structure peut être facilement obtenu avec une résine photolithographiable. Nous avons également étudié des valves mobiles en SU-8 qui peuvent être réalisées sur une couche sacrificielle avant d'être libérées (comme nous l'avons fait pour les sources d'électronébulisation, même si ici nous libérons totalement la structure dans une chambre). Enfin, la possibilité d'intégrer un polymère thermoactivable contrôlé par actuateur thermique dans des structures en SU-8 est explorée.

1) Valve passive de type convergent / divergent

Ce type de valve passive peut se définir comme une résistance hydrodynamique dont la valeur est différente selon le sens d'écoulement. Le comportement de ces valves est assimilé à un microclapet possédant un taux de fuite important. Le sens passant est défini comme étant le sens pour lequel le débit est prépondérant, l'autre sens étant appelé sens résistant. Son efficacité est donc inférieure à celle des microclapets classiques. En revanche, l'absence de parties mobiles augmente considérablement la fiabilité et limite fortement les risques d'endommagement et de colmatage [9-10]. Les études réalisées ont montré la possibilité d'obtenir un pompage avec une pression de 400 Pa en couplant ce type de valve à une actuation thermique efficace [5].

Un effet rectifiant pour la circulation d'un fluide peut être obtenu en utilisant des géométries particulières en amont et en aval de la chambre de pompage. De telles valves basées sur un effet rectifiant (au lieu de l'effet tout ou rien classique) sont appelées 'sans

partie mobile' ou 'valveless' dans la littérature. Une telle structure a été proposée initialement par Stemme et Stemme en 1993 (**figure 9**) [9]. Il s'agit d'une structure comportant une actuation piézoélectrique et des éléments amont et aval de type nez / diffuseur.

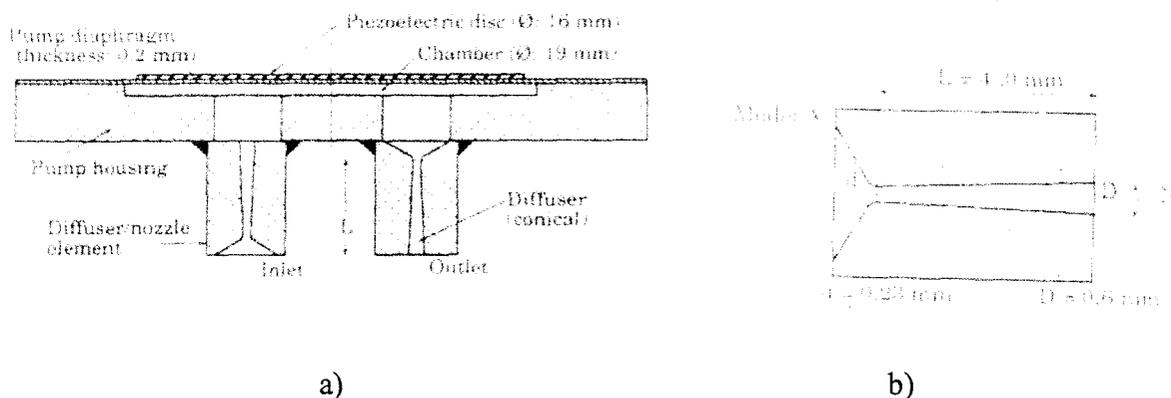


Figure 9 : Micropompe réalisée par Stemme couplant une actuation piézoélectrique et des valves passives de type convergent / divergent en entrée et en sortie : a) schéma de principe de la micropompe ; b) schéma donnant les dimensions des structures de type nez / diffuseur [9].

Avec un actionnement à une fréquence de 110 Hz, un débit maximum de $4,4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ a été obtenu pour un différentiel de pression maximum de 20,6 kPa.

La littérature fait également état de micropompes réalisées à l'aide de procédés de la microélectronique. On trouve ainsi des structures intégrées à base de silicium et de verre [5,11]. Ces structures intégrées offrent comme performance un débit maximum de plusieurs $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ et des différentiels de pression de quelques centaines de Pa.

En 2002, Tsai et Lin ont proposé une structure microfluidique comportant une chambre de mélange, une actuation par bulle engendrée thermiquement et un système de filtres pour les bulles. Une revue des différentes structures de micropompe dont celles utilisant les effets rectifiant a été proposée en 2003 [6].

Les résultats sur ces structures intégrées appellent plusieurs remarques. D'une part, le différentiel de pression qu'elles engendrent reste faible ($< 1 \text{ kPa}$) et d'autre part, l'explication physique de l'effet rectifiant n'est pas clairement exposée. En effet, pour ce dernier point, les auteurs expliquent l'effet rectifiant en utilisant des coefficients de perte de charge utilisés classiquement dans des structures à grand nombre de Reynolds. Dans les microsystèmes, les nombres de Reynolds sont petits (< 1) et l'écoulement est laminaire. Aussi, dans un tel régime,

il semble peu probable que la structure nez / diffuseur puisse avoir un effet de rectification suffisant. Dans le but d'éclaircir ce dernier point, nous avons entrepris de simuler le fonctionnement d'une structure convergent / divergent et d'étudier le comportement de l'écoulement dans les deux sens d'une structure microfluidique.

a) Simulation

Le but de cette simulation est d'étudier la résistance hydrodynamique d'une structure de type nez / diffuseur (**figure 10**), pour un écoulement dans un sens et dans l'autre.

Nous avons effectué les simulations avec le logiciel **ANSYS** basé sur la méthode de calcul par éléments finis. Nous considérons le cas d'un système en 2 dimensions, avec une vitesse d'écoulement nulle sur les parois et un maillage automatique constitué de trièdres. Dans un but de simplification, nous n'avons pas imposé d'autres contraintes spécifiques sur les parois.

Nous réalisons une première étude pour des vitesses de 10^{-3} à 10^{-2} m.s⁻¹, ce qui correspond dans nos structures à des débits de l'ordre de la centaine de nL.min⁻¹, cela correspond à un régime d'écoulement établi en microsystème. Cette première étude correspond à un écoulement laminaire (nombre de Reynolds $Re < 2300$).

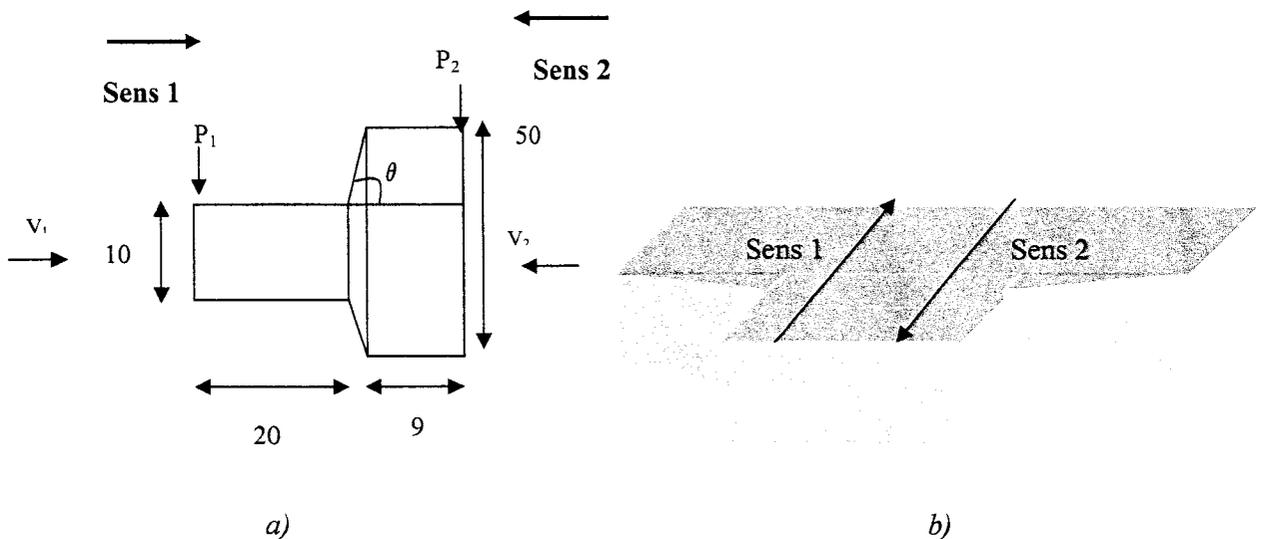


Figure 10 : Schéma de la structure de type nez / diffuseur étudié par simulation : a) étude en simulation 2 D avec les dimensions données en microns ; b) vue en perspective de la structure 2 D.

Dans un sens d'écoulement, il y a création de zones de recirculation locales entraînant des frottements et une résistance accrue dans ce sens. Cependant, cet effet est d'autant plus

efficace lors d'un régime d'écoulement de type turbulent (nombre de Reynolds $Re > 2300$), or aux dimensions des microsystèmes, en régime établi, les nombres de Reynolds sont inférieurs à 1. Ce n'est plus le cas pendant l'état transitoire qui survient au moment de l'actuation thermique pouvant engendrer sur de courtes durées des nombres de Reynolds importants [12]. Nous effectuons donc une seconde étude avec une vitesse d'écoulement de 10 m.s^{-1} .

i) Etude à vitesse faible

La résistance hydrodynamique d'une structure est directement proportionnelle à la perte de charge qu'elle engendre. Nous cherchons à obtenir le différentiel de pression qu'engendre cette structure dans le sens 1 et dans le sens 2 pour une vitesse d'écoulement donnée.

La première étape consiste à calculer la pression P_1 , en fixant la vitesse V_1 constante (vitesse imposée au niveau du petit côté dans le sens 1) et P_2 à 0. Nous obtenons dans cette configuration un différentiel de pression $\Delta P_a = P_1 - P_2 = P_1$, proportionnel à la résistance hydrodynamique dans le sens 1.

Dans la seconde étape, P_2 est calculée, en fixant $P_1 = 0$ et V_2 constante (vitesse imposée au niveau du grand côté dans le sens 2) V_1 et V_2 sont choisies de telle sorte que les débits soient identiques afin de pouvoir comparer les résistances hydrodynamiques. Nous pouvons alors calculer $\Delta P_b = P_2 - P_1 = P_2$, proportionnel à la résistance hydrodynamique dans le sens 2.

En fixant $V_1 = 10^{-2} \text{ m.s}^{-1}$ et $P_2 = 0$ lors de la première étape, et $V_2 = 2.10^{-3} \text{ m.s}^{-1}$ et $P_1 = 0$ lors de la seconde, la simulation indique une variation de 9 % entre les résistances hydrodynamiques dans les sens 1 et 2 (le nombre de Reynolds étant alors de 0,1). On peut donc présenter le sens 1 comme un sens résistant et le sens 2 serait plutôt passant mais l'efficacité de cette structure pour un régime laminaire est peu significative.

ii) Etude à vitesse élevée

Nous avons également réalisé des tests à des vitesses plus élevées ($V_1 = 10 \text{ m.s}^{-1}$ et $V_2 = 2 \text{ m.s}^{-1}$) permettant d'engendrer des nombres de Reynolds plus importants et ainsi de mettre en évidence les zones de recirculation caractérisées par l'orientation des vecteurs vitesses (**figure 11**). Ces vitesses linéaires, de l'ordre du m.s^{-1} , correspondent à des débits de plusieurs dizaines de $\mu\text{L.min}^{-1}$. Nous avons observé dans ce cas une différence de résistance

hydrodynamique entre le sens passant et le sens résistant de l'ordre de 30 %. Cette différence plus significative peut laisser présager un effet rectifiant dans le cadre de l'actuation thermique où interviennent des régimes transitoires.

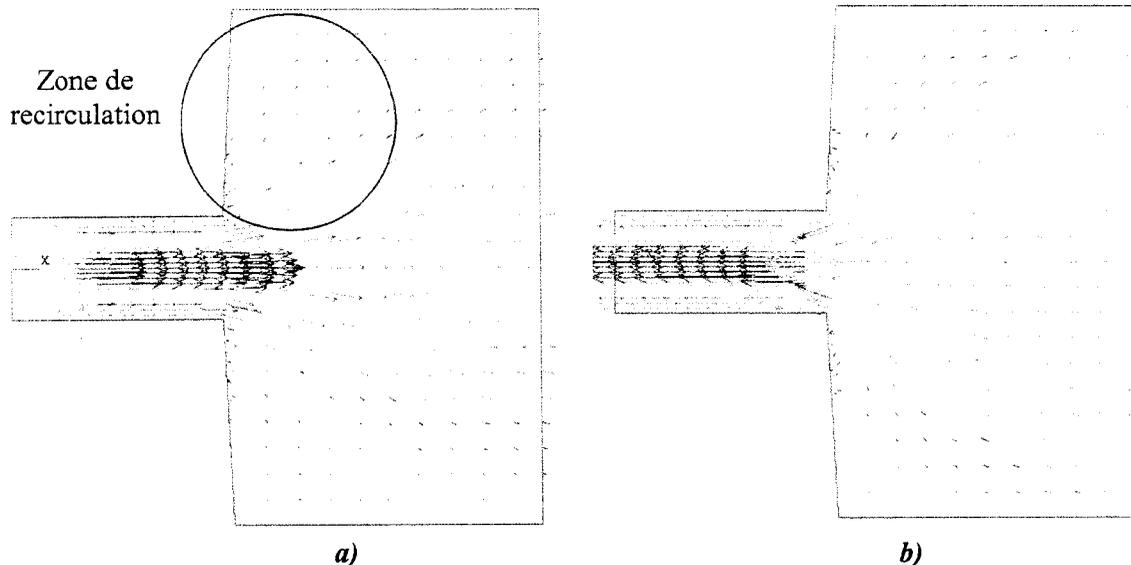


Figure 11 : Résultat de la simulation des profils de vitesse réalisé avec ANSYS pour la structure présentée en figure 6 : a) alimentation dans le sens résistant avec une vitesse V_1 de 10 m.s^{-1} ; b) alimentation dans le sens passant avec une vitesse V_2 de 2 m.s^{-1} .

Les résultats de cette simulation montrent que l'effet rectifiant est très faible en régime laminaire. Il devient significatif pour des nombres de Reynolds supérieurs à 100.

Des travaux complets ont été réalisés dans ce domaine avec le code de calcul FLUENT, laissant présager des résultats encourageant avec des 'diodes' fluidiques de type Vortex ou Tesla présentant une efficacité deux fois supérieures à celle des diodes de type convergent / divergent [13,14].

b) Tests préliminaires

Les tests ont été réalisés dans une structure intégrant une résistance de type 1 dans une chambre d'actuation de forme triangulaire réalisées en SU-8 (**figure 12**). L'observation des fronts de liquide dans les canaux situés de part et d'autre de la chambre d'actuation a montré une dissymétrie (trop faible pour être quantifiée) de l'expulsion du liquide entre le microcanal se trouvant du côté de la base du triangle (sens résistant) que forme la chambre et celui qui se trouve du côté de la pointe du triangle (sens passant) lors d'une impulsion de 6V d'amplitude d'une durée de 40 ms.

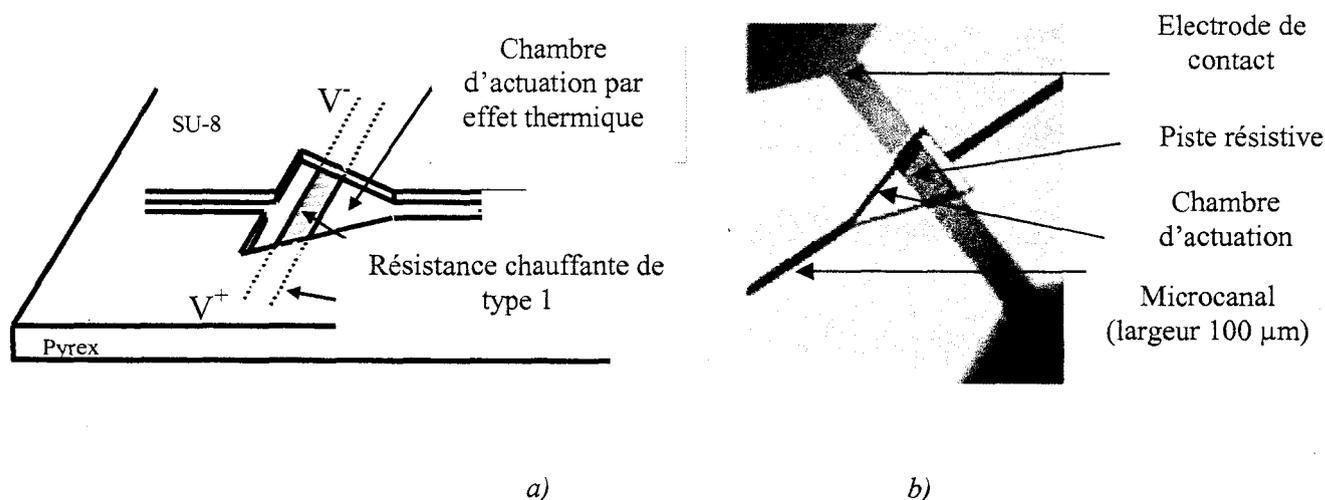


Figure 12 : Intégration d'un actuateur thermique de génération 1 dans une chambre dissymétrique de forme triangulaire : a) schéma de principe ; b) réalisation en SU-8 connectée à des canaux de section $100 \times 100 \mu\text{m}^2$.

Une dissymétrie est donc observée mais elle est insuffisante du fait d'une dynamique trop faible avec les résistances de génération 1. Il s'agira donc par la suite de coupler ces valves à des actuateurs réalisés à partir des résistances de génération 2 plus efficaces.

Nous envisageons également de structurer géométriquement la surface de la SU-8 par modification de la nature de la surface afin de créer des turbulences [15].

Nous nous sommes orientés parallèlement vers d'autres types de valves de type tout ou rien.

2) Valves mobiles

L'expérience de la technologie SU-8 acquise au cours de ce travail, en particulier la libération de sources d'électronébulisation en SU-8 sur couche sacrificielle, nous a orientés vers la réalisation de valves de type tout ou rien réalisées en utilisant une microbille [16] ou une pièce mobile polymérisée *in situ* [17]. Celle-ci est poussée par le flux du liquide et peut obstruer le canal situé d'un côté de la chambre d'actuation (côté bloqué). Au niveau du côté passant, la valve est retenue par une butée ancrée empêchant de bloquer le canal (**figure 13**).

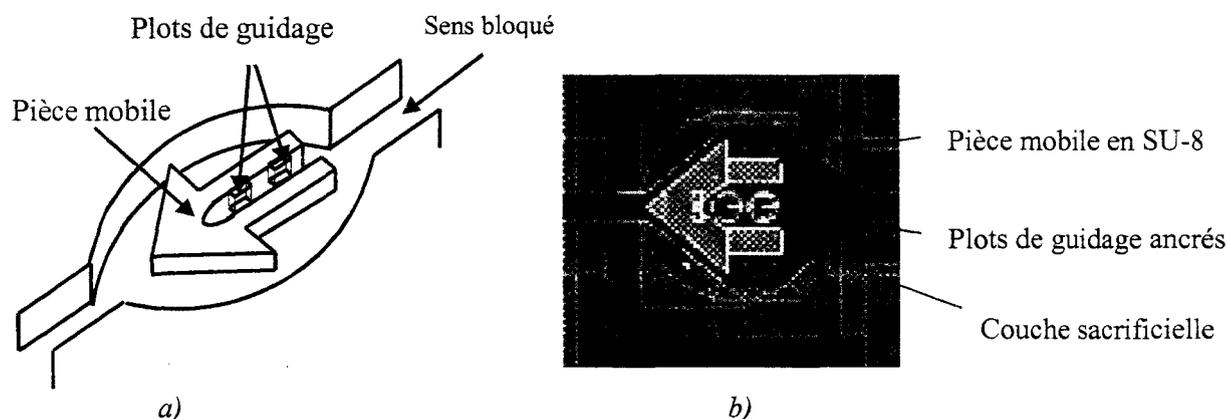


Figure 13 : Valves mobiles de type 'tout ou rien' : a) schéma de principe. Ces valves sont constituées d'une pièce mobile et de plots de guidage ancrés ; b) masque utilisé pour la réalisation de la pièce mobile en SU-8 sur une couche sacrificielle en nickel permettant de libérer la pièce.

Deux types de valves ont été dessinés, les premières possèdent une pièce mobile ayant la forme d'une flèche, pour les secondes, la pièce mobile a la forme d'un palet. Nous nous sommes plutôt orientés vers cette dernière forme dans un souci de simplification technologique.

a) Technologie de fabrication

La réalisation d'une telle pièce mobile en SU-8 est possible grâce à la compatibilité de la SU-8 avec les procédés de métallisation. En effet, la pièce mobile est fabriquée sur une couche métallique de nickel, sacrifiée par la suite, libérant ainsi la pièce.

Les zones en nickel sont réalisées par gravure locale du métal sur un substrat en silicium préparé de façon classique. Cette zone métallisée recouvre l'ensemble de la chambre où évoluera la pièce mobile. Elle est ouverte au niveau des piliers qui seront ancrés et non libérés lors de l'attaque de la couche sacrificielle (**figure 13-b**). La couche d'adhérence est déposée sur le substrat puis ouverte localement au niveau de la couche sacrificielle.

Cette structure est réalisée grâce à un empilement de couches de SU-8. La première sert à réaliser la structure (pièce mobile comprise) et la seconde à surélever l'ensemble de la structure par rapport à la pièce mobile pour que celle-ci ne soit pas bloquée lors du collage du couvercle.

Le couvercle est ensuite collé classiquement, alors que la pièce n'est pas encore libérée (elle serait sinon perdue au cours des manipulations). L'ensemble est ensuite placé

dans un bain d'acide nitrique, qui permet d'attaquer la couche sacrificielle et de libérer la pièce mobile confinée dans une chambre fermée.

b) Réalisations

Les pièces mobiles ont pu être réalisées (**figure 14-a**) et libérées. Nous laissons la chambre accueillant la pièce mobile continuellement remplie de liquide pour éviter l'accrochage de la cette pièce par capillarité (cela se produit quand il y a assèchement total de la structure). Lors des premiers tests hydrodynamiques, où le flux est assuré grâce à un pousse seringue connecté à un capillaire alimentant la microvalve, la pièce mobile est déplacée par la circulation de liquide. Mais lorsque nous inversons le flux, la pièce reste bloquée entre la base du microcanal et son couvercle au niveau des murs verticaux et ne revient pas à sa position d'origine. En effet, au niveau des murs, la couche de colle est plus épaisse (**figure 14-b**), comme nous l'avons vu en observant au MEB la section des canaux de type 2 (chapitre 3 II B) : la pièce mobile s'immobilise sur les parois. Nous avons réalisé les tests avec circulation de liquide dans le sens passant en premier lieu, mais lorsque le flux est dirigé dans le sens bloqué, le palet reste immobile. Le problème est le même lors de la circulation dans le sens bloqué en premier lieu.

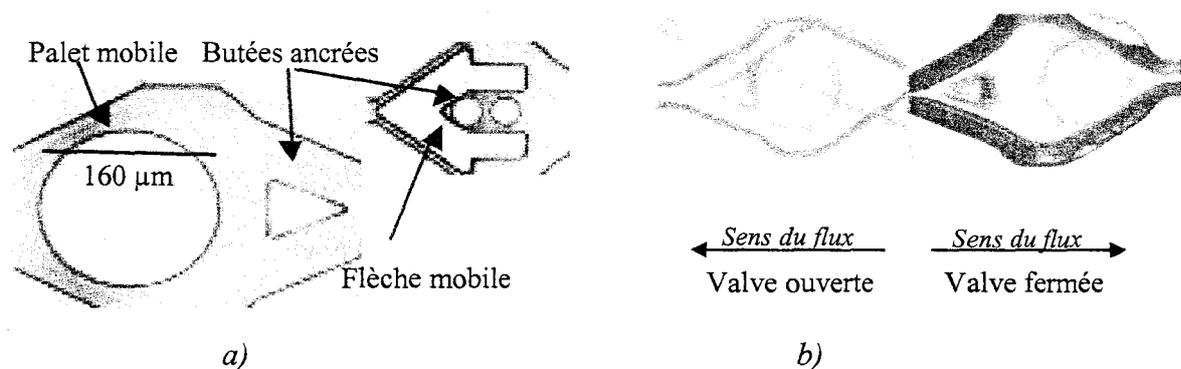


Figure 14 : Photos des valves mobiles réalisées en SU-8 : a) avant libération de la pièce mobile et collage du couvercle ; b) après libération de la pièce mobile. Nous observons un problème de blocage du palet dans le microcanal.

La technologie développée à base de SU-8 ne nous a pas permis de réaliser des valves mobiles fiables. Les risques de blocage de la pièce mobile sont importants à cause de la couche de collage du couvercle en SU-8 2002 ; la jonction entre les murs en SU-8 et le couvercle ne forme pas un angle droit. Nous avons ainsi exploré une autre voie reposant sur la

possibilité d'intégrer un polymère thermoactivable dans les structures en SU-8 avec actuateur thermique.

3) Valves thermoactivables

L'objectif est de réaliser une valve de type 'tout ou rien' par chauffage d'un polymère thermoactivable (le polyNIPAM) intégré dans les chambres d'actuation thermique présentées précédemment. Cette étude est menée en collaboration avec M^{elle} Kashia Chuda (LCOM).

a) Principe physique

Le polynipam (*N*-isopropylacrylamide : NIPAM) est un polymère thermoactivable qui perd sa solubilité dans l'eau entre 30 et 40°C. Le polyNIPAM présente une température critique de démixtion à 32°C. Certains mélanges liquides ne sont miscibles que dans un domaine restreint de composition qui est fonction de la température. Ainsi à 20°C si on ajoute progressivement du phénol à de l'eau, à partir d'une certaine masse de phénol ajoutée, le système se sépare en deux phases distinctes : c'est le phénomène de démixtion [18-19].

L'idée est donc de polymériser le polyNIPAM sur des résistances chauffantes (**figure 15-a**) : ce polymère peut donc occuper un volume maximal dans la chambre lorsqu'il est à température ambiante et se rétracter quand il est chauffé (**figure 15-b**).

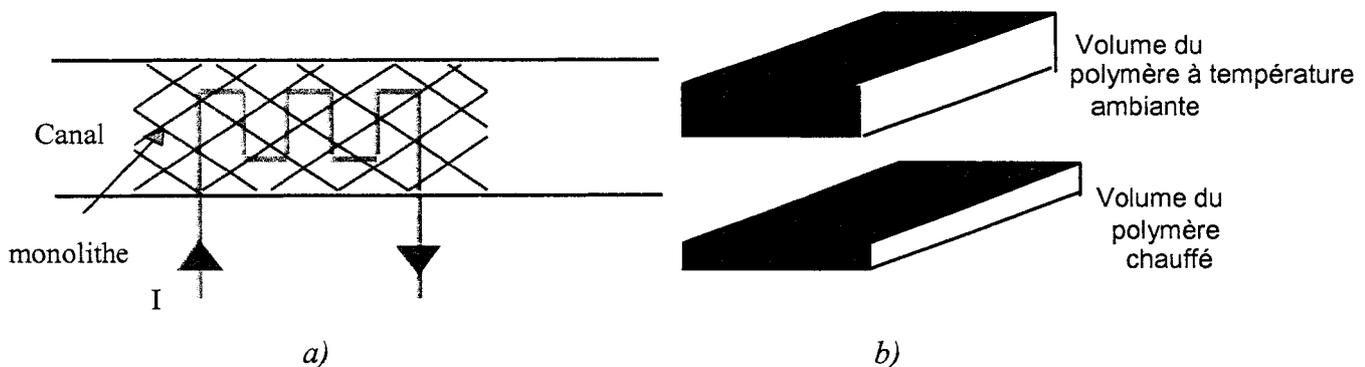


Figure 15 : Principe de fonctionnement des valves thermoactivables utilisant le polyNIPAM :

a) description de la structure ; b) volume du polymère à température ambiante / lorsqu'il est chauffé.

b) Réalisations technologiques

La technologie reprend celle développée pour la chambre d'actuation thermique couplant métallisations et multi couches SU-8. La couche d'interface en SU-8 2002 doit être ouverte localement au niveau des éléments chauffants (permettant d'activer le PolyNIPAM)

mais également au niveau des électrodes de commande pour appliquer les différences de potentiel. L'architecture des chambres d'actuation est adaptée aux résistances chauffantes. Une, deux ou trois résistances chauffantes de génération 2 ont été mises en série afin d'être intégrées dans des chambres d'actuation dont la longueur varie de 1 à 3 mm (figures 16 et 17).

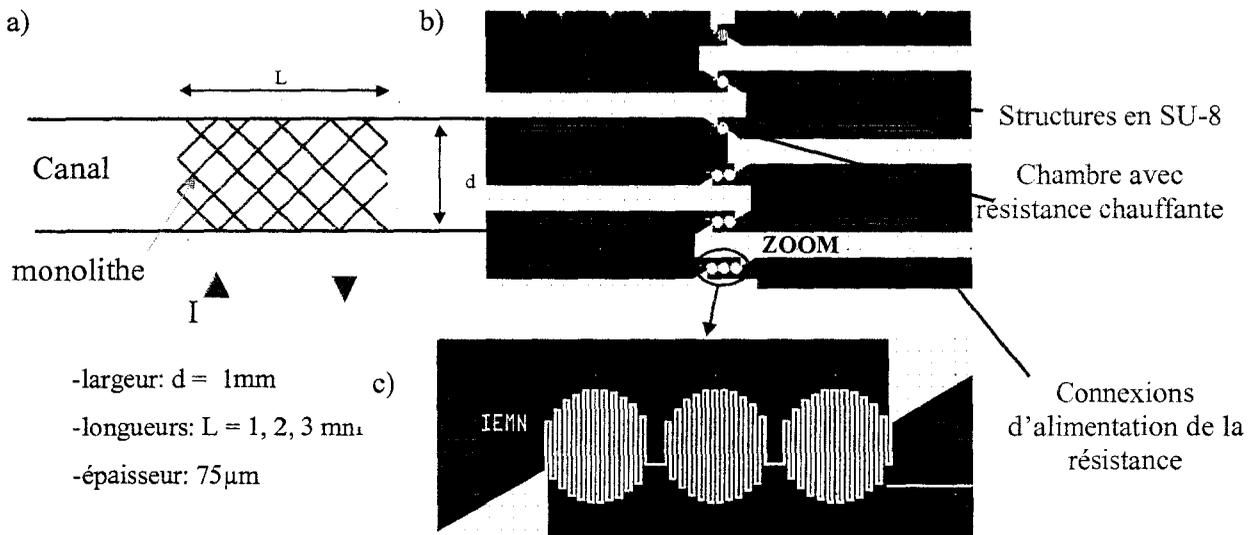


Figure 16 : Schéma des différentes structures réalisées pour l'actuation thermique de PolyNIPAM dans le cadre de valves thermoactivables : a) schéma d'intégration du polymère dans les chambres d'actuation thermique ; b) plusieurs chambres d'actuation sont réalisées : leur largeur et hauteur sont constantes mais leur longueur est de 1 ; 2 ou 3 mm ; c) zoom sur l'élément chauffant composé de 3 résistances de type 2 mises en série dans une chambre d'actuation de largeur 3 mm.



Figure 17 : Réalisation des chambres d'actuation thermique (de longueur 3 mm) destinées à recevoir le polymère thermoactivable.

c) Evaluation des actuateurs

Le test est fait en chambre ouverte, avant intégration du polyNIPAM. Une première série de tests est réalisée afin de définir l'ordre de grandeur des tensions continues à appliquer aux bornes de l'élément résistif pour accéder à la gamme de températures critiques du polyNIPAM pour se placer dans l'état bloqué ou dans l'état passant (mode binaire d'actuation

pour un fonctionnement en ‘tout ou rien’). Ces tests consistent en la mesure de température d’une goutte d’eau déposée dans une chambre d’actuation (de largeur 1 mm) ouverte. L’alimentation de la résistance chauffante est effectuée par une tension continue. La mesure est réalisée grâce à un thermocouple (**Digi-Sense, Cole Parmer Instrument Company**) plongé au centre de la goutte. Les mesures sont effectuées après stabilisation de la température (**figure 18**). Une gamme de températures comprises entre 26 et 54°C est accessible. La température critique de contrôle du PolyNIPAM est atteinte avec des tensions comprises entre 1 et 2 Volts. La répétition de 5 séries de tests a permis de mettre en évidence une reproductibilité au degré près.

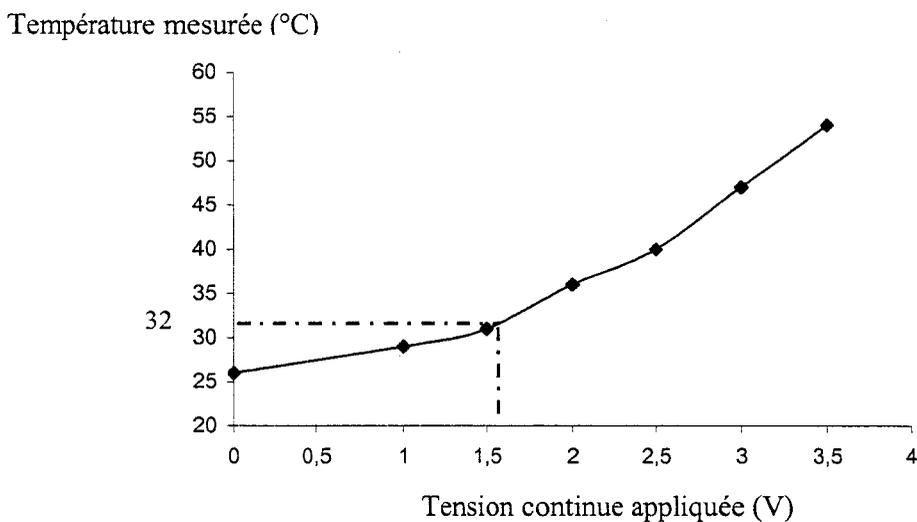


Figure 18 : Evolution de la température d’eau dans la chambre ouverte en fonction de la tension appliquée sur la résistance chauffante (la température de démixtion du PolyNIPAM est de 32°C).

Le second type de test a pour but de quantifier la réactivité de l’actuateur afin de connaître le temps nécessaire pour atteindre la température critique du PolyNIPAM. En effet, lors de l’étude précédente, les mesures de température ont été effectuées après stabilisation de la température qui peut prendre plusieurs dizaines de secondes. La chambre est maintenant excitée par des impulsions spécifiques d’amplitude de 5,5 V et durée variable. Nous mesurons donc la température maximale au cœur d’une goutte d’eau déposée dans la chambre d’actuation thermique après l’impulsion (**tableau 1**). Les températures maximales présentées dans le tableau 1 sont atteintes en moyenne au bout de 3 secondes.

Durée de l'impulsion (ms)	50	100	150	200	250
Température maximale mesurée (°C)	28	30	32	34	36

Tableau 1 : Evolution de la température mesurée dans une goutte d'eau en fonction du nombre d'impulsions ($U = 5,5V$; $t = 50 ms$) appliquées à la résistance dans la chambre d'actuation thermique ouverte.

Ce premier test réalisé dans des conditions qui ne sont pas les conditions réelles d'exploitation de l'élévation de température (les structures seront fermées et non ouvertes, et le PolyNIPAM couvrira cette résistance) ont permis de montrer que l'intégration du polymère thermoactivable peut se révéler intéressante dans le cadre de la fabrication de valve de type tout ou rien. Nous avons également constaté que l'adhérence de la couche de résine est meilleure sur du nickel. La résistivité du nickel ($\rho = 6,84.10^{-6} \Omega.cm$) est supérieure à celle de l'or mais il suffit d'adapter la différence de potentiel à ses bornes pour retrouver l'énergie nécessaire.

Nous envisageons donc, dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe du professeur X. Coqueret (LCOM), de réaliser des structures en polymères thermoactivables dans ces chambres d'actuation thermique fermées.

III) Echantillonneur microfluidique

La technologie développée pour la réalisation des microcanaux est également exploitable dans le cadre d'un couplage entre déplacement continu de colonne de liquide et déplacement discret de liquide par effet EWOD. Ce projet au cœur de la microfluidique digitale qui est en plein essor repose sur une technologie développée au sein de l'équipe. L'objectif est de développer un composant permettant une transition entre une alimentation continue de liquide et un système de déplacement discret. La technologie multi-matériaux est compatible avec le dépôt de Téflon® utilisé dans le cadre du déplacement discret de liquide par effet EWOD.

Une opération de transition entre flux continu de liquide et déplacement de gouttes a déjà été publiée [20]. Cependant, dans ce cas, le flux continu de liquide est assuré au moyen d'une seringue qui alimente le dispositif de déplacement de gouttes. Dans notre cas, l'originalité repose sur le fait que les microcanaux assurant le flux continu et le dispositif de

déplacement discret sont intégrés sur un microsystème réalisé avec une technologie multi-matériaux : Pyrex® / Silicium / résine SU-8 / Téflon® / Nickel.

A) L'échantillonneur

1) Principe

Le microsystème comporte deux zones : une zone de flux continu où le liquide circule dans un microcanal (alimenté par un capillaire) couplé à une zone de flux discret où il circule sous forme de microgouttes par effet EWOD dans une structure comprenant un ou deux plans (figure 19).

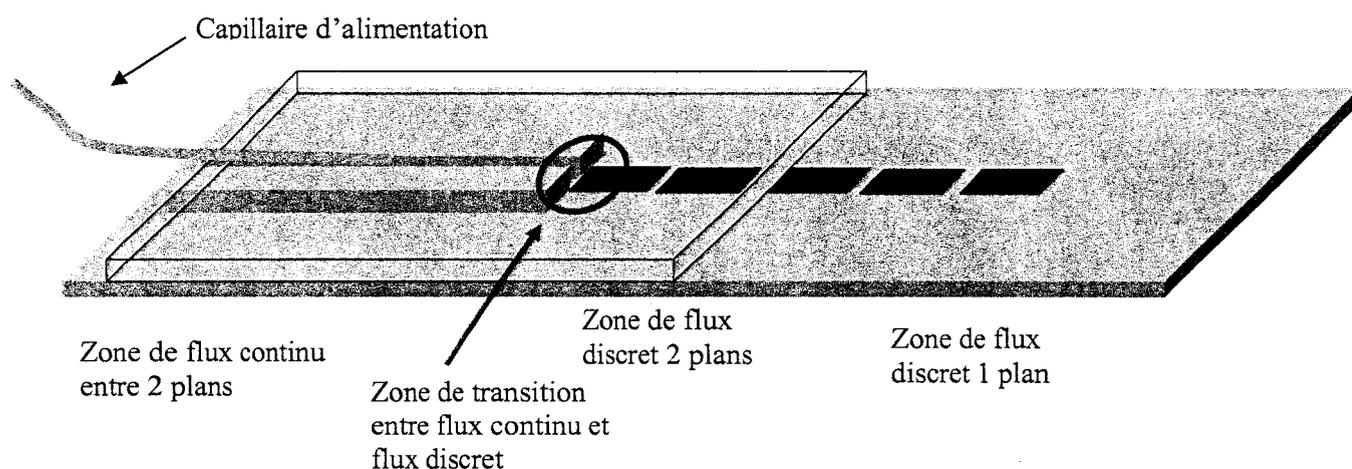


Figure 19 : Schéma de principe de l'échantillonneur permettant une transition entre déplacement continu et déplacement discret de liquide.

2) Le système de déplacement de gouttes

Le dispositif de déplacement de gouttes met en œuvre l'effet EWOD [21] que nous avons présenté dans l'état de l'art du chapitre 1 II-B. Les architectures, développées dans le cadre de la thèse de F. Caron, correspondent à celles indiquées à la figure 20 pour la structure 2 plans et à la figure 22 pour la structure 1 plan avec une électrode de type microrail [22].

Le système deux plans comporte sur le substrat inférieur des électrodes carrées ($1,7 \times 1,7 \text{ mm}^2$) interdigitées (triangles équilatéraux de $20 \mu\text{m}$ de côté et espacés de $20 \mu\text{m}$), représentés sur la figure 21, qui permettent de faciliter la transition d'une microgoutte d'un plot à l'autre. De plus, sur chaque substrat sont déposées une couche isolante réalisée en SU-8

(d'épaisseur $2\ \mu\text{m}$) et une couche hydrophobe d'épaisseur $300\ \text{\AA}$ réalisée en Téflon® (AF 1601 Dupont) sur chaque substrat.

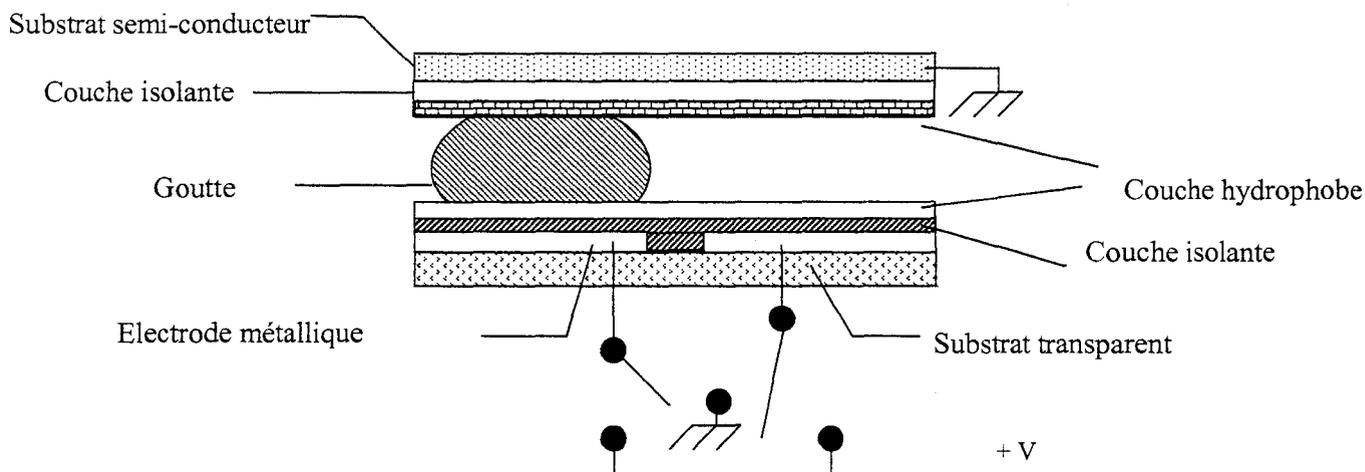


Figure 20 : Architecture du dispositif de déplacement EWOD entre deux plans (coupe longitudinale).

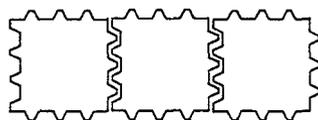


Figure 21 : Forme des électrodes interdigitées (vue de dessus).

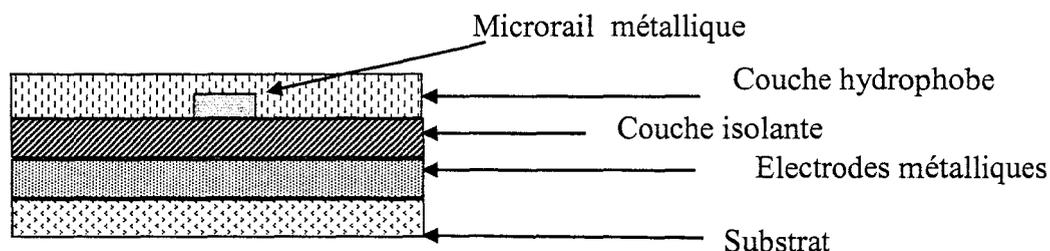


Figure 22 : Architecture possible pour le déplacement EWOD sur un plan (coupe transversale).

Le déplacement de gouttes à partir d'un seul plan ne nécessite qu'un seul substrat, équipé d'électrodes interdigitées, d'une couche isolante en SU-8, d'une couche hydrophobe en Téflon®, et d'une piste de contact métallique reliée à la masse qui joue le rôle de contre-électrode (figure 22).

Les métallisations nécessaires à l'obtention de ces dispositifs de déplacement entre un ou deux plans sont facilement réalisables par 'lift-off' ou par gravure du métal afin d'ajuster la géométrie des plots de commande électrique. Le Téflon® (AF 1601 Dupont) dilué à 0,3 % avec du fluorocarbure est déposé sur la SU-8 à la tournette ($v = 1000\ \text{rpm}$ / $a = 1000\ \text{rpm.s}^{-1}$ / $t = 30\text{s}$) afin d'obtenir la couche hydrophobe de la structure.

Un exemple de scission de microgouttes, réalisé grâce à un système de déplacement discret simple non destiné au couplage entre flux continu et flux discret avec une structure 2 plans, est présenté **figure 23** [21]. A partir d'un réservoir de liquide (alimenté initialement grâce à une micropipette) chevauchant un plot de commande (**figure 23-a**), une colonne de liquide est étirée sur 4 plots (**figure 23-b**) en appliquant une différence de potentiel de 70 V entre ces plots et le substrat supérieur. Le plot qui est le plus près du réservoir est ensuite mis à la masse pour provoquer un pincement du liquide à ce niveau (**figure 23-c**), une goutte est ainsi extraite (**figure 23-d**). Cela montre la possibilité d'extraire des microgouttes d'un flux continu greffé au système avec une technologie multi-matériaux.

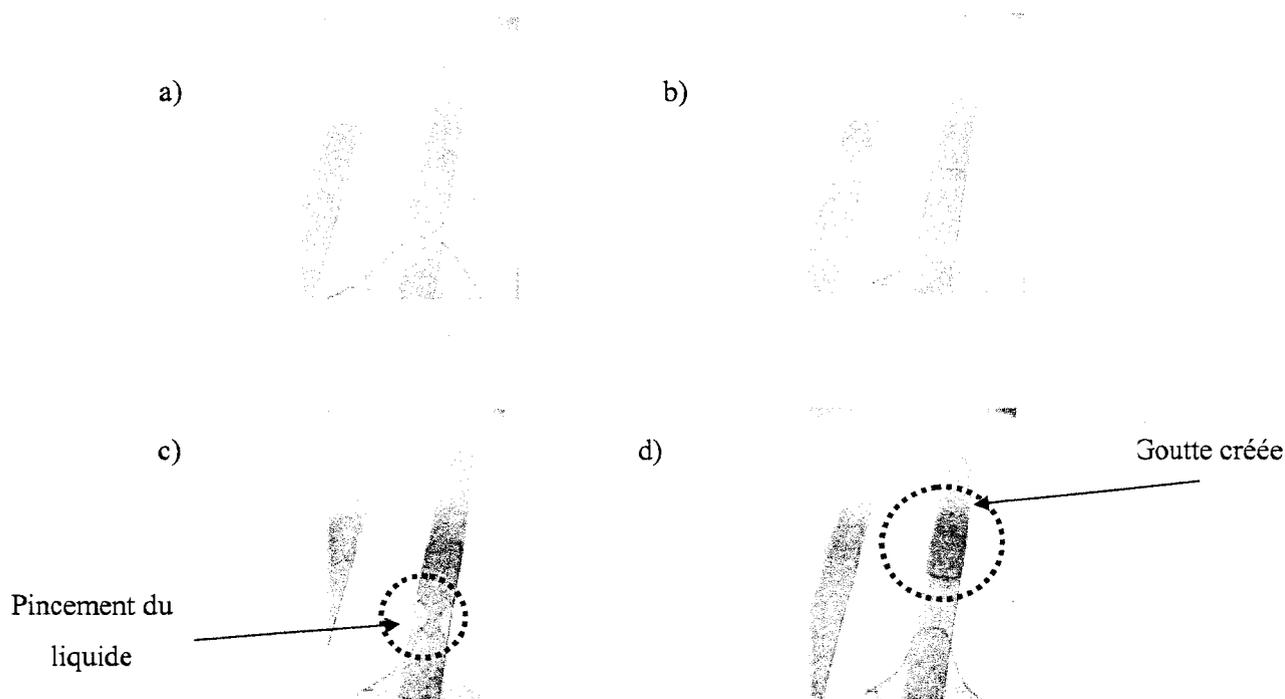


Figure 23 : Exemple de scission de goutte : a) volume de liquide constituant un réservoir ; b) alimentation des 4 plots dans la continuité du réservoir ; c) pincement du doigt liquide par mise à la masse du plot situé près du réservoir ; d) goutte créée.

3) Fabrication de l'échantillonneur

Le système est composé de deux substrats. Le système de déplacement de goutte composé d'un seul plan (correspondant au dispositif présenté ci-dessus) est réalisé sur le substrat inférieur en Pyrex®. Le substrat supérieur intègre des microcanaux de type 1 réalisés en SU-8 qui sont ouverts (absence de couvercle en Pyrex®). Ces microcanaux sont tapissés d'une couche de Téflon® (**Dupont AF1601** à 0,3% dilué avec du fluorocarbène). Cette

couche est déposée sur la SU-8 à la tournette ($v = 1000 \text{ rpm} / a = 1000 \text{ rpm.s}^{-1} / t = 30\text{s}$). Cette technique permet d'obtenir une couche de 300 \AA qui nécessite un recuit progressif (5 min à 50°C , 5 min à 170°C , 15 min à 300°C). Le dépôt de Téflon® sur des structures à haut rapport d'aspect demande des précautions concernant le dernier recuit à température élevée. En effet, si la résine SU-8 supporte tout à fait ces températures, les contraintes mécaniques qui en découlent (en relation avec son coefficient de dilatation thermique), provoquent la dégradation des structures. Ainsi, la mise à température ambiante doit s'effectuer progressivement (le substrat revient à température ambiante sur la plaque chauffante éteinte).

Les deux substrats mis en contact forment le microcanal lorsqu'ils sont maintenus serrés par deux pinces type 'crocodile'. Ces microcanaux sont étanches, en absence de surpression, car ils sont formés de murs et d'un couvercle hydrophobes. Dans cette structure hydrophobe, le flux en continu reste 'compact' et il n'y a pas d'écoulements parasites (qui entraîneraient des fuites) au niveau de la jonction des deux substrats.

B) Résultats préliminaires

Une transition continu / discret entre un canal et un système de déplacement de goutte a été obtenue. Nous avons extrait des microgouttes de l'ordre du μL dans un système deux plans à partir d'une colonne de liquide contenue dans un microcanal. Nous pouvons voir sur la **figure 24-a**, que le liquide contenu dans le microcanal (de largeur 5 mm) est guidé sur 4 plots de déplacement de gouttes qui sont portés à un potentiel de 70 V. Le potentiel est ensuite appliqué sur le dernier plot pour extraire une goutte (**figure 24-b et 24-c**). Nous répétons l'opération pour augmenter le volume de la goutte (**figure 24-d et 24-e**).

Nous avons également réalisé cette opération d'extraction de goutte d'une colonne de liquide, entre un canal et un système de déplacement de goutte '1 plan' comme décrit à la **figure 25**. Cependant, dans ce cas, l'extraction de gouttes est plus laborieuse. Il semble plus simple d'extraire la goutte grâce à un système de déplacement discret entre 2 plans pour ensuite la guider vers un système ne comprenant qu'un plan.

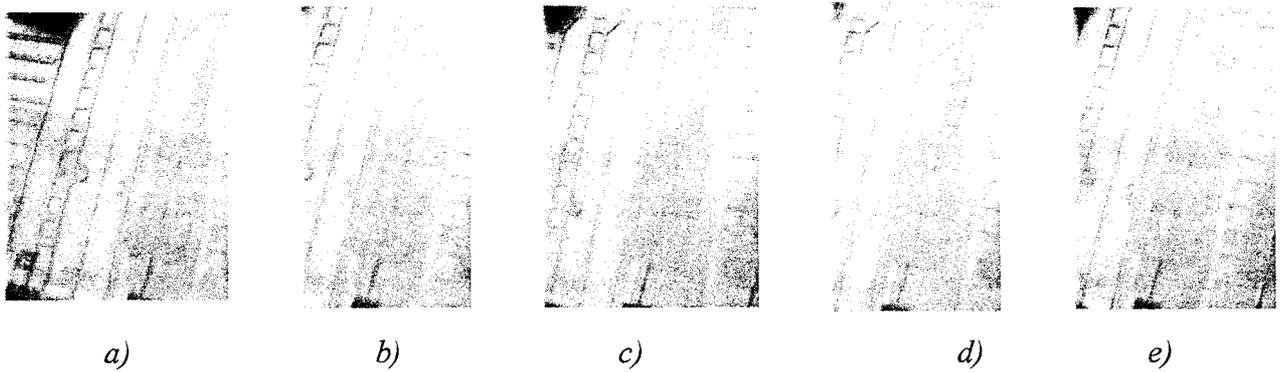


Figure 24 : Déplacement discret d'une goutte d'eau à partir d'un réservoir contenu dans un canal fermé a) étirement du liquide sur 4 plots plus petits ; b) scission de la goutte par application d'un potentiel sur le plot réservoir et sur le dernier plot ; c) goutte extraite du réservoir ; d) nouvelle alimentation du plot à atteindre ; e) augmentation du volume de la goutte.

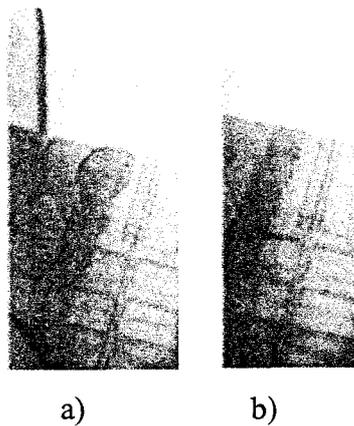


Figure 25 : Extraction d'une goutte provenant d'un réservoir pouvant être alimenté en continu ; a) liquide dans le réservoir ; b) goutte extraite pouvant être déplacée sur un plan.

Ces résultats préliminaires montrent la potentialité du couplage entre déplacement continu et déplacement discret sur un microsystème intégré.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que cette technologie multimatériaux est compatible avec l'utilisation de motifs métalliques que nous exploitons pour réaliser des microélectrodes qui peuvent être dédiées à l'électrochimie.

L'intégration de structures d'actuation thermique dans ces microsystèmes montre également la potentialité d'exploitation de connexions métalliques grâce à la technologie de collage à température modérée. La seconde génération de résistance chauffante nous a permis d'obtenir une actuation efficace. Nous avons exploré des valves à pièce mobile avec lesquelles nous avons rencontré des problèmes. Nous nous orientons de ce fait plutôt vers des valves passives qui doivent être optimisées. Il est également envisageable de piloter des polymères thermoactivables qui constitueraient des valves de type 'tout ou rien' intégrées, grâce à une actuation thermique efficace.

Les structures en SU-8 se révèlent compatibles avec un traitement hydrophobe au Téflon® qui permet de les coupler avec des dispositifs de déplacement de gouttes. En effet, en rendant les structures en SU-8 hydrophobes, nous pouvons réaliser des microcanaux étanches par pression faible entre ces structures et un capot en verre également traité au Téflon®. Ce couplage avec un mode de déplacement discret de gouttes calibrées peut laisser présager un certain nombre d'applications nécessitant une opération d'échantillonnage microfluidique.

Bibliographie du chapitre 4

- [1] E. Vieil, 'Méthodes électroanalytiques', D.E.A. d'Electrochimie, INPG Grenoble, 2002.
- [2] J. S. Rossier, M. A. Roberts, R. Ferrigno, H. H. Girault 'Electrochemical Detection in Polymer Microchannels', *Anal. Chem.*, 71, pp.4294-4299, 1999.
- [3] K. Ueno, H.B. Kim, N. Kitamura, 'Characteristic Electrochemical Responses of Polymer Microchannel-Microelectrode Chips', *Anal. Chem.*, 75, pp.2086-2091, 2003.
- [4] C. Amatore, E. Maisonhaute, G. Simonneau, 'Ultrafast Cyclic Voltammetry : Performing in the few Megavolt per Second Range Without Ohmic Drop', *Electrochem. Commun.*, 2, pp.81-84, 2000.
- [5] J.H.Tsai, L.Lin, 'A thermal bubble actuated micro nozzle-diffuser pump', *MEMS'01*, pp.409-412, 2001.
- [6] J.H.Tsai, L.Lin, 'Thermal bubble powered microfluidic mixer with gas bubble filter', the 11th international conference on Solid-State Sensors and Actuators, Munich (Germany), June 2001.
- [7] J.H.Tsai, L.Lin, 'Transient thermal bubble formation on polysilicon micro-resisters', *Journal of Heat transfer*, 124, pp.375-381, 2002.
- [8] J. Carlier, F. Caron, S. Arscott, J.-C. Fourier, V. Thomy, C. Druon, P. Tabourier, J.-C. Camart, 'Micro-pompe à actuation thermique appliquée à la microfluidique', *SFT thermique et microtechnologies*, ELSEVIER, pp.943-948, 2003.
- [9] E. Stemme, G. Stemme, 'A valveless diffuser/nozzle-based fluid pump, *Sensors and Actuators*, A, 39, pp.159-167, 1993.
- [10] H. Andersson, W. van den Wijngaart, P. Nilson, P. Enoksson, G. Stemme. 'A valve-less diffuser micropump for microfluidic analytical systems', *Sensors and Actuators B*, 72, pp 259-265, 2001.
- [11] A. Olson, P. Enoksson, G. Stemme, E. Stemme. 'Micromachined flat-walled valveless diffuser pumps', *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 6, pp.161-166, 1997.
- [12] P. Tabeling, 'Introduction à la microfluidique', Belin, Collection Echelles, 2003.
- [13] M. Anduze, 'Etude expérimentale et numérique de microécoulements liquides dans les microsystèmes fluidiques', Thèse de doctorat de l'INSAT, 2000.
- [14] A. Olsson, G. Stemme, E. Stemme 'Simulation studies of diffuser and nozzle elements for valve-less micropumps', *Transducers*, Chicago (USA), 15-19 June, pp.1039-1042, 1997.

- [15] S.G. Kandlikar, S. Joshi, S. Tian, 'Effect of channel roughness on heat transfer and fluid flow characteristics in narrow channels', ASME National Heat Transfer Conference, Los Angeles (USA), 10-12 June, 2001.
- [16] O.Krusemark, A. Feustel, J. Muller, 'Microball valve for fluidic micropumps and gases', μ TAS98, pp.399-402, 1998.
- [17] J. E. Rhem, T.J. Shepodd, E.F. Hasselbrink, 'Mobile flow control elements for high-pressure micro-analytical systems fabricated using in-situ polymerization' Proc. Micro Total Analysis System (μ TAS), Squaw Valley, CA (USA), 5-9 October, 2003.
- [18] O. Braun, 'Synthèse en microémulsion de polymères ioniques stimulables et étude de leurs propriétés en solution aqueuse', Thèse, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 2001.
- [19] P. Mallo, O. Braun, J. Selb, F. Candau, 'Nouveaux polymères, le procédé pour leur préparation et les microlatex inverses les contenant', Brevet Français n° 99-16575, Seppic, 1999.
- [20] M.G. Pollack, R.B. Fair and A.D. Shenderov, 'Electrowetting-based actuation of liquid droplets for microfluidic applications', Applied Physics Letters, 77 (11), 2000.
- [21] S. K. Cho, H. Moon, C.J. Kim, 'Creating, Transporting, Cutting, and Merging Liquid Droplets by Electrowetting-Based Actuation for Digital Microfluidic Circuits', Journal of Microelectromechanical Systems, 12, 1, pp 70-80, february 2003.
- [22] F. Caron, J.C. Fourier, J. Carlier, S. Arscot, V. Thomy, P. Tabourier, J.C. Camart, C. Druon, 'Droplet transport by EWOD on Patterned Wetting Surfaces (PWS) for biochemical applications', 4th International Discussion Meeting on Electrowetting, Blaubeuren (Germany), 6-8 September 2004.

*Conclusion et
perspectives*

Notre travail a consisté à mettre en place une filière technologique multi-matériaux à base de résine SU-8 pour développer des composants microfluidiques et les intégrer dans un prototype de lab-on-chip. Ce prototype est destiné à l'analyse de protéines par spectrométrie de masse ESI.

La mise en place de cette filière a demandé de lever plusieurs verrous. Ceci n'a pu se faire que dans un contexte pluridisciplinaire et dans le cadre d'une collaboration avec le LCOM. L'apport des chimistes nous a été indispensable à deux niveaux : pour parfaire le résultat d'opérations technologiques existantes (collage d'un couvercle par exemple) mais aussi pour apporter au microsystème réalisé la fonctionnalité biochimique liée à l'application visée (fabrication et ancrage d'une microcolonne monolithique).

Au final, nous avons ainsi pu surmonter les problèmes suivants :

- problème de tension mécanique résiduelle aux interfaces pour réaliser des microcanaux tout SU-8 ou des sources nanoESI de type plume en débord du substrat,
- problème du collage d'un capot de Pyrex® pour fermer le microcanal. Le collage doit résister pendant plusieurs heures à des pressions supérieures à 50 bar en présence de liquides corrosifs (acétonitrile par exemple) et ce, sans relargage d'éléments ayant une signature spectrale parasitant la zone en m/z analysée en spectrométrie de masse. Cette compatibilité des matériaux de la filière est contraignante compte tenu de l'extrême sensibilité de la méthode d'analyse.
- problème de l'ancrage d'une colonne monolithique dans un microcanal et de sa fonctionnalisation *in situ*.

L'apport extérieur de techniques biochimiques amène des solutions mais aussi des contraintes spécifiques qui ont demandé une adaptation des protocoles microélectroniques standard développés à l'IEMN. Les nombreux essais de mise au point technologique que nous avons effectués, nous ont permis de réaliser des composants microfluidiques de base puis de les intégrer dans un microsystème prototype. Celui-ci comporte un microcanal capable de recevoir une colonne monolithique. Ce microcanal est couplé vers l'aval à une source nanoESI de type plume et relié en amont par un capillaire à une pompe réalisant l'actuation du liquide qui transporte l'échantillon à analyser. Ce microsystème est donc analogue au

produit commercialisé par Agilent en juin 2004 qui peut nous servir de référence pour les futures évaluations de performances analytiques.

Notre prototype représente pour le moment le résultat le plus abouti que nous avons obtenu avec la filière multi-matériaux à base de SU-8. Rappelons rapidement les résultats préalables obtenus.

D'une part, des tests de compatibilité avec l'analyse de protéines par spectrométrie de masse ont montré que, le silicium, la résine photolithographiable SU-8 et le Pyrex® sont des matériaux adéquats pour la fabrication de tels microsystemes. D'autre part, nous nous sommes tournés vers la fonctionnalisation basée sur les polymères monolithiques poreux permettant le prétraitement des liquides biologiques. Nous avons fait le choix d'un pompage hydrodynamique externe pour la circulation du liquide dans le microsysteme, au regard des pressions de plusieurs dizaines de bars qu'induisent les monolithes (de dimension caractéristique nanométrique) dans les microcanaux.

Nous avons tout d'abord étudié une filière reposant sur l'utilisation du silicium et du Pyrex®. Des microcanaux gravés en silicium et fermés grâce à un couvercle en Pyrex® par *anodic bonding* ont été réalisés. Nous avons également étudié des sources de type cheminée qui débouche perpendiculairement au plan du substrat. Ces composants n'ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants au niveau des sources d'électronébulisation dans une perspective d'intégration.

Nous nous sommes donc ensuite orientés vers une technologie basée sur l'utilisation de la résine photolithographiable SU-8. Cela a permis de réaliser des microcanaux formés à partir de murs (de largeur 200 μm) en SU-8. Cette topologie engendre moins de contraintes mécaniques sur le substrat que des couches pleines en SU-8 dont le coefficient d'expansion thermique est important. Ils sont fermés grâce à un couvercle en Pyrex® ayant reçu un traitement de surface spécifique permettant d'améliorer l'adhérence d'une couche de SU-8 2002 utilisée comme couche de colle. Ces canaux peuvent être connectés à des capillaires standard de diamètre externe 150 μm .

Un premier type de microcanaux de section allant de 100x160 μm^2 à 500x160 μm^2 avec une longueur de 4 cm ont été réalisés. Ils ont montré une résistance à la pression jusqu'à 70 bar par circulation de méthanol. De plus, des tests complémentaires ont montré que des débits aussi bas que 50 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ pouvaient être employées car aucune microfuite n'a été détectée dans la structure dans ces conditions. Ces canaux ont été fonctionnalisés par intégration de structures monolithiques. Les étapes de dessalage par chromatographie de

phase inverse en microcanaux se sont montrées efficaces. Ces analyses ont été réalisées en spectrométrie de masse MALDI mais aussi ESI par couplage du microsystème à une source de diamètre interne de 20 μm .

Dans le but de compacter sur une surface limitée un microcanal de grande longueur développée, nous avons réalisé des canaux de type serpentin ayant une longueur 5000 fois plus grande que les dimensions caractéristiques de la section. Ces canaux de 150 mm de longueur et de $30 \times 55 \mu\text{m}^2$ de section ont résisté jusqu'à des pressions de 30 bar. Ils ont également été caractérisés à bas débit afin de les valider en montrant l'absence de microfuites. Dans cette configuration, la largeur des murs qui forment le microcanal a été réduite pour minimiser l'aire occupée par le microcanal. Ces murs de 85 μm de largeur, se sont révélés trop minces pour supporter les pressions nécessaires.

La technologie développée a également permis de réaliser un nouveau type de source d'électronébulisation de type 'plume' suspendue grâce aux caractéristiques mécaniques de la SU-8. Ces sources sont majoritairement ancrées sur le substrat, mais la pointe est réalisée sur une couche sacrificielle afin de pouvoir la désolidariser du substrat. Le substrat est ensuite clivé pour obtenir la structure suspendue qui génère un effet de pointe nécessaire à l'électronébulisation ESI. Ces sources dont la largeur de la fente capillaire peut descendre jusqu'à 8 microns ont permis d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus avec des aiguilles nanoESI commerciales. L'intérêt majeur de ce type de source en SU-8 est qu'elle peut être couplée aux microcanaux réalisés à partir du même matériau. Dans ce contexte, la technologie développée jusque là, a évolué afin de pouvoir fabriquer un microsystème intégrant ces deux éléments. Différentes configurations de couplage ont été testées et optimisées. Cela a permis d'aboutir à un couplage reposant sur le prolongement des microcanaux sur la source (afin de guider au mieux le liquide) et sur un traitement hydrophobe de la zone de couplage (pour éviter les fuites de liquide par capillarité entre une structure fermée et une structure ouverte). Les microsystèmes intégrés comprenant des microcanaux et une source, permettent de travailler à des débits de l'ordre de $100 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$. L'objectif suivant est l'intégration dans ces microsystèmes des différentes étapes de prétraitement de l'échantillon en amont de la source d'électronébulisation.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail, d'autres composants microfluidiques ont été proposés pour intégrer des fonctions supplémentaires dans un lab-on-chip de la filière SU-8.

Il s'agit d'un travail en cours dans lequel nous cherchons aussi à tirer parti des propriétés du matériau SU-8 lui-même. Nous exploitons ses propriétés électriques isolantes (diélectrique pour le transport EWOD) ou la possibilité de microstructurer en surface la SU-8 (pour l'évolution de microvalves passives). Nous exploitons enfin la possibilité d'intégrer des connexions métalliques, ainsi que sa capacité à recevoir du Téflon® pour la réalisation d'un échantillonneur microfluidique.

Nous espérons ainsi explorer plus complètement les possibilités offertes par cette filière technologique et montrer que sa flexibilité est un atout pour fabriquer un lab-on-chip hybride regroupant des composants variés qui mettent en œuvre plusieurs effets physico-chimiques.

Les très nombreuses réalisations de la littérature actuelle montrent que notre approche n'est pas la seule possible et qu'il est encore trop tôt pour voir se dégager des solutions standard en microfluidique. L'évolution, dans ce domaine aux champs applicatifs très variés est extrêmement rapide. L'aspect multi-matériaux s'impose alors que commence l'exploration de la nanofluidique et que se pose par exemple le problème de l'implantation dans le lab-on-chip de détecteurs très sélectifs et d'une sensibilité ultime.

*Publications et
Communications*

Revue internationale à comité de lecture:

J. Carlier, S. Arscott , V. Thomy , J.C. Fourier , F. Caron, J.C. Camart , C. Druon, P. Tabourier, 'Integrated Microfluidics based on Multi-Layered SU-8 for Mass Spectrometry analysis', Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 14, issue 4, pp 619-624, 2004.

S. Le Gac, **J. Carlier**, C. Cren-Olivé, J.-C. Camart, C. Rolando, 'Monoliths for microfluidics devices in proteomics', J. Chrom. B., 808(1), 3-14, 2004.

Revue nationale à comité de lecture:

J. Carlier, F. Caron, S. Arscott, J.-C. Fourier, V. Thomy, C. Druon, P. Tabourier, J.-C. Camart, 'Micro-pompe à actuation thermique appliquée à la microfluidique ', SFT thermique et microtechnologies, ELSEVIER, pp 943-948, 2003.

J. Carlier, F. Caron, C. Druon , P. Tabourier, J. C. Camart,'Transport diélectrophorétique de microgouttes pour un lab-on-chip à vocation biologique', La houille blanche – Revue internationale de l'eau n°4, pp 57-61, 2003.

Congrès internationaux avec comité de sélection :

J. Carlier, F. Caron, J.-C. Fourier, V. Thomy, C. Druon, P. Tabourier, J.-C. Camart, S. Le Gac, C. Rolando, S. Arscott, 'Microfluidics for proteomics : discrete liquids', Japan-European Workshop on Chem Micro Mechatronics Systems and Biochips, ENS Cachan, february 2003.

S. Le Gac, C. Rolando, S. Arscott, **J. Carlier**, F. Caron, J.C. Fourier, V. Thomy, C. Druon, P. Tabourier, J.C. Camart, 'Microfluidics for proteomics: continuous liquids' Japan-European Workshop on Chem Micro Mechatronics Systems and Biochips, ENS Cachan, 19th february, 2003.

J. Carlier, S. Le Gac, S. Arscott, C. Rolando, C. Druon, P. Tabourier, 'SU-8 Technology and monolithic columns for integration in a biological lab-on-a chip', MicroTAS 2003 Conference, Squaw Valley California (USA), pp. 315-318, October 2003.

Congrès nationaux avec comité de sélection

J. Carlier, F. Caron, C.Druon, P.Tabourier, J.C. Camart, 'Transport diélectrophorétique de microgouttes pour un lab-on-chip à vocation biologique ', Congrès SHF Microfluidique - Toulouse , pp 275-282, décembre 2002.

J. Carlier, F. Caron, S. Arscott, J.-C. Fourier, V. Thomy, C. Druon, P. Tabourier, J.-C. Camart, 'Micro-pompe à actuation thermique appliquée à la microfluidique ', Congrès Société Française de Thermique, Grenoble, juin 2003.

F. Caron, **J. Carlier**, S. Arscott, V. Thomy, J.-C. Fourier, J.-C. Camart, P. Tabourier, C. Druon,'Déplacement de microvolumes de liquides dans des microsystèmes à vocation biologique', Congrès Français de Mécanique, Nice, septembre 2003.

J. Carlier, S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier, C. Rolando, 'Protéomique intégrée', Journées RMNT, Lille, Novembre 2003.

K. Chuda, X. Coqueret, **J. Carlier**, S. Arscott, V. Thomy, C. Druon, P. Tabourier, J.-C. Camart, ' La résine photolithographiable SU-8 aspects chimiques et technologiques de la fabrication de microsystèmes ',Congrès Polyray, Lille, avril 2004.

K. Chuda, X. Coqueret, **J. Carlier**, V. Thomy, C. Druon, P. Tabourier, J.-C. Camart, 'Pressure and solvents resistant microsystem for monolithic column integration ', Congrès IUPAC, Paris, 2004, acceptée.

J. Carlier, S. Arscott, F. Caron, J.-C. Fourier, V. Thomy, J.-C. Camart, C. Druon, P. Tabourier, 'Microfluidique intégrée pour le couplage d'un microcanal à une interface nanoESI : application à la protéomique ', Congrès SHF Microfluidique, Toulouse, 2004, acceptée.

F. Caron, J.C. Fourier, **J. Carlier**, S. Arscott, V. Thomy, J.C.Camart, C. Druon, P. Tabourier, 4th International Discussion Meeting on Electrowetting, , Blauberan(Germany), p.23, 6-8 september,2004

Résumé

Le travail de recherche a pour objectif de développer une technologie permettant la fabrication de microsystèmes microfluidiques dédiés à l'analyse de protéines par spectrométrie de masse. Ces laboratoires sur puce (appelés communément *Lab-On-Chip*) présentent plusieurs avantages : diminution de la quantité d'échantillon nécessaire à l'analyse, du risque de pollution, des manipulations extérieures....

Ces microsystèmes ont été conçus dans le cadre d'une collaboration pluridisciplinaire regroupant des technologues, des chimistes et des biologistes. Une filière technologique permettant une grande souplesse, un prototypage rapide, mais aussi la possibilité d'intégration de différentes 'briques' technologiques sur un même microsystème a été développée afin d'envisager à moyen terme la conception d'un laboratoire sur puce. Les microsystèmes ont ensuite été réalisés à partir de cette technologie reposant sur l'utilisation de matériaux compatibles (Silicium, Pyrex®, résine photolithographique SU-8) avec les applications visées.

La première étape du travail porte sur la réalisation de microcanaux étanches répondant à des contraintes spécifiques concernant les matériaux mais également la tenue à la pression. Ces microcanaux peuvent être connectés facilement au monde macro par l'intermédiaire de capillaires standard. Ils ont été testés (résistance à la pression jusqu'à 70 bar et aux solvants) et se sont révélés aptes à être fonctionnalisés (greffage de polymères) pour réaliser des opérations de chromatographie.

Ces systèmes dédiés à la spectrométrie de masse de Type ESI (ElectroSpray Ionisation) nécessitent l'intégration d'une interface permettant d'alimenter le spectromètre. Un nouveau type de source, développé au sein de l'équipe 'Microfluidique', est réalisé à partir de la résine SU-8. Cette dernière présente des caractéristiques intéressantes permettant en particulier de réaliser des structures suspendues présentant une rigidité adaptée à la structure de type plume. Ces sources ont été testées en spectrométrie de masse et se sont révélées aussi efficaces que les sources commerciales. Ces sources, couplées à des microcanaux dans un microsystème, ont permis d'alimenter un spectromètre de masse avec des débits aussi bas que $100 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$. Avec cette technologie, il doit être possible d'intégrer différentes fonctions de prétraitement de l'échantillon au sein de microcanaux fonctionnalisés ainsi que la source ESI réalisée.

La filière technologique développée permet aussi le dépôt de différents matériaux comme les métaux et le Téflon®. Nous montrons ainsi la possibilité de réalisations de composants microfluidiques comme les valves thermoactivables et l'échantillonneur microfluidique. Nous espérons ainsi exploiter la flexibilité d'une technologie multi-matériaux pour regrouper des composants variés qui mettent en œuvre plusieurs effets physico-chimiques.

Mots clés

Microfluidique,

Microsystèmes,

Microcanaux,

Spectrométrie de masse,

ESI,

SU-8

Source d'électronébulisation,

Technologie multi-matériaux

