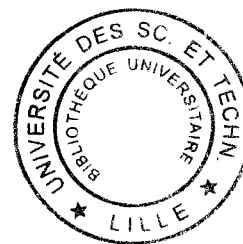


UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Santé



présentée par

Séverine LE GAC

Pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Sujet de la thèse :

**Développement de systèmes microfluidiques pour l'analyse
protéomique par ESI-SM et MALDI-SM.**

Soutenue publiquement le 26 avril 2004 à Lille devant le jury composé de

Pr Hubert Hondermarck	Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille	Président
Dr Christian Amatore	Directeur de Recherche au CNRS	Rapporteur
Pr Albert van den Berg	Professeur à l'Université de Twente (Pays-Bas)	Rapporteur
Pr Jean Rossier	Professeur à l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris	
Pr Alain Cappy	Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille	
Dr Christian Rolando	Directeur de Recherche au CNRS	

Small is beautiful.

Sommaire

<i>Sommaire</i>	3
<i>Remerciements</i>	9
<i>Table des abréviations</i>	13
<i>Avant-propos</i>	17
<i>Chapitre Généralités</i>	19
I. Généralités sur les microsystèmes	21
A. Notion de microsysteme	21
B. Avantages et caractéristiques des microsystèmes	22
1. <i>Avantages</i>	22
<i>Avantages liés à la taille des systèmes</i>	22
<i>Avantages liés à leur mode de fabrication et communs à la microélectronique</i>	23
2. <i>Caractéristiques de l'échelle du micron</i>	24
C. Matériaux et microfabrication	25
1. <i>Matériaux</i>	25
2. <i>Procédés de fabrication</i>	27
<i>Procédés de microfabrication de base</i>	27
<i>Autres méthodes émergentes de moindre coût et plus accessibles</i>	34
<i>Techniques de scellement</i>	36
D. Fonctions de base des microsysteme : le pompage et la détection	37
1. <i>Mode de pompage</i>	37
a. <i>Pompage externe : connexion à une pompe ou un pousse-seringue</i>	38
b. <i>Pompage électrocinétique</i>	38
c. <i>Pompage par mode centrifuge</i>	40
d. <i>Autres modes d'actuation</i>	40
2. <i>Détection</i>	40
a. <i>Techniques optiques</i>	41
b. <i>Electrochimoluminescence</i>	41
c. <i>Détection électrochimique</i>	42
d. <i>Spectrométrie de masse</i>	42
E. Domaines d'application majeurs	43
II. Exemples tirés de la littérature	44

A. Exemple de chimie organique	45
B. 'ProteinChip' de CIPHERGEN	49
C. Dispositif 'LabChip' d'Agilent/Caliper	59
D. CD microfluidique de Gyros AB	66
E. Système dédié à la manipulation et à l'analyse de cellule unique	70
III. Notre projet en microfluidique	78
A. Dispositif ESI	78
B. Dispositif MALDI	83
Références Chapitre 'généralités'	85
<i>Dispositif chromatographique basé sur une phase monolithique polymère</i>	91
I. Présentation du problème/ problématique	91
A. Problématique	91
B. Alternatives de la littérature pour la réalisation d'un module chromatographique sur microsystème	92
1. Pompage par électro-osmose	92
<i>Electrophorèse capillaire</i>	92
<i>Electrochromatographie</i>	92
2. Pompage non électro-osmotique	93
<i>Particules poreuses</i>	93
<i>Structuration par voie microtechnologique d'un microcanal</i>	95
<i>Phase stationnaire monobloc</i>	95
C. Notre choix	96
II. Les monolithes	97
A. Généralités	97
1. Matériau de nature macromoléculaire	97
2. Porosité des monolithes	97
3. Perméabilité des monolithes ou propriétés d'écoulement	98
4. Phénomènes de transfert de masse : diffusion vs convection	98
B. Formation des monolithes	100
1. Composition du mélange réactionnel	100
2. Protocole type de préparation d'un support monolithique	103

3. <i>Processus mis en jeu lors de la formation des monolithes</i>	104
C. Applications courantes des monolithes	109
1. <i>Phases stationnaires de chromatographie liquide à haute performance</i>	109
2. <i>Phases stationnaires d'électrochromatographie capillaire (ECC)</i>	109
3. <i>Bioréacteur enzymatique à haut débit</i>	110
4. <i>Autres applications des monolithes</i>	110
D. Monolithes et microfluidique	111
1. <i>Avantages dans le contexte microfluidique</i>	111
2. <i>Applications en microfluidique</i>	111
III. Etudes en support capillaire de phases inverses de séparation et dessalage	113
A. Présentation des phases élaborées et du protocole de préparation	113
1. <i>Nature des phases préparées</i>	113
2. <i>Composition des mélanges réactionnels</i>	113
a. <i>Phases de dessalage</i>	113
b. <i>Phases séparatives</i>	114
3. <i>Protocole de préparation des phases monolithiques</i>	115
a. <i>Etudes préliminaires dans un support capillaire</i>	115
b. <i>Protocole détaillé de l'élaboration des phases</i>	116
B. Etude physico-chimique des matériaux	116
1. <i>Etude morphologique qualitative MEB</i>	116
2. <i>Etude en fluidique</i>	117
a. <i>Mesure de la perte de charge au cours d'une expérience de séparation</i>	117
b. <i>Perméabilité des monolithes</i>	120
c. <i>Utilisation des paramètres de solubilité</i>	123
3. <i>Etude de porosité</i>	126
C. Etude en séparation des phases monolithiques	128
1. <i>Protocole et conditions de test</i>	128
2. <i>Résultats</i>	131
a. <i>Evaluation des performances des 5 colonnes</i>	131
b. <i>Influence de la longueur de la colonne</i>	140
3. <i>Conclusion</i>	154
IV. Prolongement des études sur des phases monolithiques	155

A. Phases inverses en microsystèmes intégrés	155
1. Polymérisation dans un microsystème	155
2. Tests en séparation	157
3. Dessalage et analyse en ligne par électronébulisation et spectrométrie de masse	159
4. Conclusion	163
B. Phases de digestion monolithiques	163
1. Problématique	163
2. Préparation de la phase monolithique de digestion	165
3. Test de digestion dans un microréacteur monolithique	166
4. Résultats	167
a. Dépouillement manuel des spectres de masse	167
(i) Cytochrome c de cheval	167
(ii) BSA (Albumine de Sérum Bovin)	169
b. Confrontation aux banques de données	171
(i) Cytochrome c de cheval	171
(ii) Albumine de Sérum Bovin	173
5. Conclusion	176
Références Chapitre 'dispositif chromatographique'	178
<i>Interface avec la spectrométrie de masse</i>	181
I. Présentation du problème/problématique	181
A. Description. Présentation de l'électronébulisation	181
1. Rôle de l'électronébulisation	181
2. Phénomènes d'électronébulisation	181
3. Source d'ionisation	182
4. Les régimes d'électronébulisation : ESI classique vs nanoESI	184
B. Limites de la technique	185
1. « Qualité » des sources	185
2. Mode utilisation de ces sources	185
3. Mode application HV : fragilité des revêtements	186
4. Couplage d'un microsystème à l'ESI-SM	188
5. Faiblesses et insuffisances des phénomènes d'électronébulisation	189
C. Réponse(s) envisagée(s)	190

1. <i>Source microfabriquée</i>	190
2. <i>Exemples de la littérature et performances observées de ces microstructures</i>	191
<i>Approche de type aiguille</i>	191
<i>Approche « dans-le-plan »</i>	196
3. <i>Amélioration des phénomènes de nano-électronébulisation</i>	199
II. Microfabrication de sources de nanoESI en vue de leur intégration sur un microsystème	201
A. Microfabrication de sources de nanoESI : choix de la géométrie des sources	201
1. <i>Approche cheminée</i>	201
2. <i>Approche plume</i>	203
B. Plumes de 1ère génération	204
1. <i>Description de la structure</i>	204
2. <i>Procédé de fabrication</i>	205
3. <i>Test en spectrométrie de masse : montage et conditions</i>	206
4. <i>Tests en spectrométrie de masse : résultats</i>	207
5. <i>Conclusions sur la première génération de prototypes en SU-8</i>	212
C. Plumes de 2ème génération	213
1. <i>Description de la structure et évolution par rapport aux premiers prototypes</i>	213
2. <i>Procédé de fabrication</i>	213
3. <i>Discussion sur les dimensions des sources</i>	216
4. <i>Première série de tests en spectrométrie de masse : montage et résultats</i>	218
5. <i>Deuxième série de tests en spectrométrie de masse : montage et résultats</i>	223
<i>Evolution du montage de test des plumes en spectrométrie de masse</i>	223
<i>Validation de ce nouveau montage de test</i>	223
<i>Test d'un autre peptide standard : le Glu-Fibrinopeptide B</i>	224
<i>Test d'une plume ayant une section de sortie réduite</i>	225
<i>Etude en sensibilité</i>	226
<i>Diversification des analyses</i>	227
1. <i>Digestat modèle d'une protéine, le cytochrome c</i>	227
2. <i>Protéine non digérée : l'apo-myoglobine</i>	231
3. <i>Neurotransmetteur : l'anandamide.</i>	232
6. <i>Conclusion</i>	234
D. Plumes de 3ème génération	235
1. <i>Description</i>	235

Sommaire

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM

<i>2. Procédé de fabrication</i>	237
<i>3. Tests en spectrométrie de masse : résultats</i>	239
<i>4. Conclusion</i>	244
III. Etude et amélioration des phénomènes de nano-électronébulisation	246
<i>A. Caractérisation et synchronisation : source conventionnelle</i>	246
<i>1. Caractérisation</i>	247
<i>2. Synchronisation</i>	250
<i>3. Conclusion</i>	251
<i>B. Electrochimie</i>	252
<i>Références Chapitre 'Interface avec l'ESI-SM'</i>	254
<i>Conclusion et Perspectives</i>	259

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier M. Christian Rolando, le Directeur de Recherche, directeur de cette thèse. Sans lui, je n'aurais pas effectué ce travail de recherche passionnant. Je le remercie, tout d'abord, de m'avoir proposé cette thèse et d'avoir insisté au point de me convaincre de rejoindre son équipe, à l'Université des Sciences et Technologies de Lille et ainsi de renoncer à ma vie Parisienne. Je le remercie ensuite de la confiance qu'il m'a accordée durant ces années, de la liberté qu'il m'a laissée dans l'organisation de mon travail et des opportunités dont il m'aura fait profiter et qui auront contrebalancé les périodes de « dure labeur ». De ce fait, cette période a été synonyme de richesses et d'évolution, y compris sur un plan personnel. J'ai pu franchir un pas vers le statut de Chercheur et investir mes connaissances dans le domaine de la Recherche. L'originalité et le côté novateur de ce sujet de thèse, enfin, me placent à l'heure actuelle dans un secteur porteur.

Je voudrais également témoigner toute ma sympathie au Dr Steve Arscott. Son arrivée dans le projet BioChipLab a marqué un renouveau dans la progression de ma thèse. Travailler avec lui est un véritable plaisir, tant sur le plan scientifique que humain. Notre collaboration, énième exemple de l'amitié Franco-britannique, a été plus que fructueuse et a donné lieu à moult discussions scientifiques, riches, ainsi qu'à quelques exemples de *French-British Honour* .

Je remercie les membres de mon jury de thèse, qui auront tous trouvé une place dans leur emploi du temps pour, tout d'abord, lire mon manuscrit et ensuite, assister à ma soutenance. Je remercie M. Hubert Hondermarck, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille d'avoir accepté d'être le Président de ce jury, M Christian Amatore, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure et M. Albert van den Berg, Professeur à l'Université de Twente à Enschede aux Pays-Bas d'avoir entrepris la tâche de rapporteurs, sans connaître a priori mon travail, M. Alain Cappy, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille et enfin, M. Jean Rossier, Professeur à L'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de la Ville de Paris. Après m'avoir initiée à la biologie au cours de mon cursus PCéen et me l'avoir fait aimer, il m'aura proposé, auprès de M. Christian Rolando, comme candidate potentielle pour ces développements microfluidiques. J'espère que prendre part à la présentation de ce travail lui montrera que j'ai su passer outre ce mot barbare et faire fructifier le sujet.

Je remercie enfin, Mlle Janine Cossy, Professeur à L'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de la Ville de Paris, qui aurait du faire partie du jury de cette thèse et qui en a été empêchée du fait d'un déplacement aux Etats-Unis.

Remerciements

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM

Je voudrais remercier les deux principaux soutiens financiers, sans lesquels ce travail n'aurait pas vu le jour : la Génopole de Lille pour le financement de ma thèse dans le cadre d'une bourse fléchée du Ministère de la Recherche, le Réseau des Micro- et NanoTechnologies (RMNT), à travers le programme de recherche *Protéomique Intégrée* et le programme GenHomme avec la constitution du consortium BioChipLab. J'aurais une pensée particulière pour M. Claude Beaugrand, partenaire industriel du programme *Protéomique Intégrée*. Je garderai en mémoire les moments passés avec lui à l'occasion de congrès, moments de loisirs ou de stress intense (ASMS 2001). Merci aussi à nos partenaires du consortium BioChipLab, en particulier, Sanofi-Synthélabo qui s'est investi dans ce projet pour le mener ainsi que les autres membres du consortium avec qui j'ai pu partager, régulièrement, des réunions fructueuses sur l'avancée de nos travaux respectifs. Ces réunions m'ont donné un aperçu de la Recherche autre que celui de la vie quotidienne au laboratoire.

Je remercie nos partenaires technologiques de l'Institut d'Electronique, de Microelectronique et de Nanotechnologies (IEMN) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille et l'équipe MicFut'. Je remercie M. Pierre Tabourier et Christian Druon, Professeurs à l'Université des Sciences et Technologies de Lille d'avoir été à l'origine de ce projet et le second pour avoir été, trois années durant, mon co-directeur de thèse. Je remercie aussi le Dr. Xavier Mélique, qui m'a accueillie à mon arrivée à Lille au sein de l'Institut d'Electronique, de Microelectronique et de Nanotechnologies. Je remercie enfin Julien Carlier, mon alter ego dans ce projet sur les aspects de microtechnologie et de microfabrication ; il a réalisé entre autres, les microcanaux, microsystèmes et microsystèmes intégrés testés lors de cette thèse.

Je remercie le Dr Cécile Cren-Olivé, Chargé de Recherche CNRS pour les longues heures passées à nous débattre avec les colonnes monolithiques lors de leur conditionnement et de leurs tests en nanoLC-SM et pour sa volonté d'en tirer la quintessence des performances. Je remercie chaleureusement l'équipe du Centre Commun de Masse, les Drs. Bernadette Coddeville et Guy Ricart, Ingénieurs de recherche à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Mlle Adeline Page, Ingénieur d'Etudes à l'Université des Sciences et Technologies de Lille pour leur aide au quotidien sur les spectromètres de masse et en particulier, Mlle. Adeline Page pour son aide technique et sa formation sur la trappe ionique.

Toutes les photographies de microscopie électronique à balayage qui illustrent cette thèse, n'auraient pas existé sans M. Christophe Boyaval, de l'Institut d'Electronique, de Microelectronique et de Nanotechnologies. Il aura toujours été disponible, y compris pour des

études hors de ses centres d'intérêts habituels, comme celles de phases monolithiques. Je le remercie de sa patience et de sa gentillesse d'avoir pris le temps de faire de beaux clichés, bien nets, même lorsque le matériel de base n'était pas optimal.

J'aurai une pensée particulière pour Mmes Jacqueline Ricart et Florence Ferret, les deux secrétaires de l'Equipe Polyphénols et du Centre Commun de Masse, et Mme Karine Delhaye, secrétaire de l'Unité pour leur bonne humeur, et leur patience au jour le jour pour faire face aux commandes de dernière minute, d'assumer l'interface avec l'Administration et ainsi de nous décharger de toutes les paperasseries sans fin.

Je remercie Nicolas Patron, Rajae Zemmouri et Kamal Tobal qui ont travaillé avec moi au cours de ma thèse et que j'aurai plus ou moins réussi à passionner à l'étude et à la conception de phases monolithiques.

Sur un plan moins professionnel, je remercie tous mes camarades et collègues de laboratoire, que j'aurai côtoyés de façon passagère ou sur une durée plus longue, avec une pensée plus particulière pour la *Moroccan Tea Team*, Mohammed Kajjout, Rajae Zemmouri, Saïd Eddarir, Mouhcine Benbijja et Kamal Tobal et pour Souad Rakass et Caroline Tokarski. J'aurai eu la chance de les connaître toutes deux et de partager leur quotidien dans un contexte hors-laboratoire, à l'occasion de rencontres scientifiques. Souad, je n'oublierai jamais ton sourire, ta sympathie et ta bonne humeur ! Je remercie aussi tous ceux, non cités de façon nominale, mais qui auront d'une quelconque façon rendu mon quotidien au laboratoire, agréable.

Last but not least, je finirai sur une pensée particulière à l'égard de mes parents, sans qui je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui : ils auront toujours été à mes côtés et m'auront soutenue à leur façon au cours de mes études. Sans eux, je n'aurai pas suivi le parcours qui m'a menée jusqu'ici. Je les remercie particulièrement d'avoir entrepris la lecture de ce manuscrit afin d'y traquer les fautes ayant échappé à ma vigilance.

Abréviations

Table des Abréviations

ACI	Action concertée Incitative'
AcCN	Acétonitrile
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	Acide desoxyribonucléique complémentaire : séquence d'ADN correspondant à celle d'ARN après sa maturation
AMPS	Acide m-parasulfonique
ARN	Acide RiboNucléique
ASMS	American Society for Mass Spectrometry
BCB	BenzoCycloButène
BET	Bromure d'éthyidium
BMA	Méthacrylate de butyle (Butyl Methacrylate)
BSA	Bovine Serum Albumine
BuOH	Butanol
CE	Electrophorèse capillaire
CEC	Electrochromatographie capillaire
CHCA	Acide α -cyanohydroxycinnamique
CyOH	Cyclohexanol
Cyt C	Cytochrome C
d.e.	Diamètre externe
DHB	Acide dihydroxybenzoïque
d.i.	Diamètre interne
DRIE-ICP	Technique de gravure sèche utilisant un plasma d'ions réactifs
ECL	Electro-chimioluminescence
EG	Ethylène glycol
EGDMA	Diméthacrylate d'éthylène glycol
ESIEE	École Supérieure d'Ingénieurs en Électronique et Électrotechnique
ESI-SM	Spectrométrie de masse avec une ionisation par électronébulisation
FET	Transistor à effet de champ
GluFib B	Glu Fibrinopeptide B

Abréviations

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM

GMA	Méthacrylate de glycidyl
GS	Gramicidine S
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HT	Haute tension
HUPO	Human Proteome Organization
HV	High Voltage (voir HT)
IDA	Acquisition dépendant de l'information
IEMN	Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies
IMAC	Chromatographie d'affinité pour un ion métallique
LIF	Fluorescence induite par irradiation laser
LIGA	Procédé de fabrication en trois étapes de lithographie, formation d'un moule en métal et moulage sur cette matrice métallique
LMA	Méthacrylate de lauryl
LPCVD	Déposition à basse pression d'une vapeur chimique
LSS	Modèle de prédiction de l'élution en chromatographie utilisant la force du solvant d'élution
Log P	Mesure d'hydrophobie
MALDI	Ionisation-désorption assistées par irradiation laser et une matrice
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEMS	Microsystèmes électriques et mécaniques
MeOH	Méthanol
microTAS	Microsystème intégrant un processus analytique complet
MW	Poids moléculaire
nanoLC	Chromatographie en phase liquide travaillant avec des débits de l'ordre de quelques centaines de nanolitres par minute
NN	2-nitroso-1-naphtol
OTC	Chromatographie de colonne ouverte
PA	Potentiel d'Action
PANI	Polyaniline
PCR	Réaction d'amplification en chaîne d'oligonucléotides
PCRD	Programme Cadre de Recherche et Développement

PDMS	Polydiméthylsiloxane
PE	Polyéthylène
PET	Polyéthylène téréphtalate
pI	Point isoélectrique
PMMA	Polyméthyl méthacrylate
PolyNIPAAAM	Poly-N-isopropylacrylamide
PolySi	Silicium Polycristallin
RMNT	Réseau des Micro- et NanoTechnologies
SAMs	Monocouche assemblée et organisée (Self-Assembled Monolayers)
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SELDI	Ionisation-désorption assistées par laser et la surface
SEND	Désorption
Si	Silicium
SM	Spectrométrie de masse
SM/SM	Spectrométrie de masse en tandem
SPE	Extraction en phase solide
SU-8	Résine photolithographiable
TFA	Acide trifluoroacétique
Th	Thomson, unité de mesure de m/z
TIC	Courant ionique total
TLM	Microscope à lentille thermique
TOF	Temps de vol : type d'analyseur en spectrométrie de masse
t_R	Temps de rétention
UV	Ultra-violet

Avant-propos

Cette dernière décennie, les microsystèmes fluidiques analytiques ont connu un développement exponentiel, au point de représenter une part importante des publications dans *Analytical Chemistry*, revue de référence de la discipline. Ce phénomène s'accroît avec l'apparition des premiers dispositifs commerciaux.

Ce travail de thèse porte sur des développements dans le domaine de la microfluidique avec la conception et la mise en œuvre de microsystèmes fluidiques dédiés à une analyse à haut débit d'échantillons protéomiques ou métabolomiques. Il a été réalisé à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL) en collaboration entre l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN, UMR CNRS 8520), le Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (LCOM, UMR CNRS 8009), en bénéficiant des infrastructures du centre commun de spectrométrie de masse, plateau de protéomique de la génopôle de Lille (labellisée opérationnelle RIO).

Ce travail s'est axé autour de deux projets de développement de microsystèmes analytiques. Le premier projet a fait partie du programme de recherche *Réseau de Micro- et Nano-Technologies* (RMNT) et s'intitule *Protéomique Intégrée* ; il concerne le développement d'un microsystème intégré pour une analyse d'échantillons protéiques par spectrométrie de masse reposant sur une ionisation par électronebulisation. Le deuxième projet, issu du programme GenHomme du Ministère de l'Economie et des Finances, a fait l'objet de la constitution d'un consortium de recherche sous le nom de *BioChipLab* regroupant des équipes lilloises (IEMN, LCOM), leurs homologues de la région grenobloise (CEA-LETI, CEA-DSV) et Sanofi-Synthélabo comme meneur de projet. L'objectif de ce consortium est double et plus ambitieux avec la réalisation de deux dispositifs microfluidiques intégrés, couplés à une analyse en ligne par spectrométrie de masse. Un dispositif est dédié à une ionisation de type MALDI et l'autre de type ESI pour l'analyse finale par spectrométrie de masse, en vue de l'identification et du dosage des substances analysées.

Les deux dispositifs assurent globalement la même fonction mais leur conception et leur mode de fonctionnement sont différents et orientés par le mode d'ionisation et la mise en œuvre de ce dernier. La fonction du dispositif est de traiter les échantillons biologiques afin d'optimiser leurs conditions d'analyse par spectrométrie de masse. La complexité de l'échantillon est réduite par un procédé chromatographique (piégeage sélectif de certaines protéines, séparation en conditions inverses de peptides issus de leur digestion, sélection d'une classe de peptides sur une phase appropriée d'affinité ou dessalage et concentration des échantillons). Ensuite, l'échantillon préparé est amené vers la zone d'ionisation, des plots cibles pour l'ionisation MALDI, la source d'ionisation pour l'ESI.

Avant-propos

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM

Une leçon générale du développement de tels dispositifs microfluidiques est que la miniaturisation d'objets existants à l'échelle macroscopique ne suffit pas pour parvenir à cette fin. L'enjeu de tels développements microfluidiques ne réside pas dans une simple réduction des dimensions mais dans une réelle innovation, dans la re-conception de dispositifs et d'objets adaptés à l'échelle du micron. La transposition d'échelle ne convient pas car les caractéristiques des échelles macro- et microscopiques sont fort différents du point de vue de la physique. Tout d'abord, les principes utilisés à l'échelle macroscopique n'existent pas toujours à celle microscopique. Ensuite, l'échelle microscopique présente des caractéristiques intéressantes pour les applications microfluidiques, comme un rapport surface-sur-volume élevé qui se traduit par une prépondérance des phénomènes de surface ou encore un écoulement laminaire des fluides. La présentation de ce travail de thèse tente d'illustrer ces aspects à travers le développement d'un dispositif microfluidique et la mise en œuvre, à cette fin, de concepts nouveaux ou originaux pour effectuer des opérations usuelles telles que la séparation de composés, le traitement d'échantillons biologiques, l'ionisation de molécules en solution ou encore le déplacement de liquides (non approfondi ici) en vue d'une miniaturisation de l'analyse.

Chapitre
« généralités »

Les premiers outils de laboratoire miniaturisés et intégrés sur microsystèmes sont en train d'apparaître sur le marché, pour répondre à la demande en opérations et analyses rapides, à haut débit et à moindre coût. Cette demande est motivée, tout d'abord, par l'essor du domaine du diagnostic médical^{1,2} qui exige des analyses rapides avec une réponse instantanée, ensuite, par l'essor de la chimie combinatoire avec la synthèse de bibliothèques de composés préparés en quantités réduites mais suffisantes pour leur criblage ultérieur à haut débit et enfin, par la nécessité de baisser le coût des analyses. Cette tendance à miniaturiser les outils conventionnels de laboratoire touche donc, aussi bien les domaines de la chimie,^{3,4,5-7} de la biochimie⁶⁻⁸ et de la biologie.^{1,9,10} Néanmoins, si les premiers systèmes d'application biologique ou biochimique existent, le développement des microréacteurs dans le domaine de la chimie est encore au stade de balbutiements et loin de leur commercialisation.

Ce phénomène est similaire à celui advenu quelques décennies auparavant dans le domaine de la microélectronique et de l'informatique qui a conduit à une diminution majeure de la taille des ordinateurs, la ramenant de la dimension d'une salle à celle d'un livre. Cette révolution dans le domaine de la microélectronique a résulté de la diminution d'échelle des microcomposants électroniques et, par conséquent, de leur intégration et de leur mise en parallèle possibles ainsi que d'un accroissement de leurs performances. Cette tendance en microélectronique est en effet régie par la loi de Moore, qui prédit l'évolution des performances et de la taille des transistors en fonction du temps.

La tendance au développement de microsystèmes dédiés aux sciences de la vie est remarquée dans le domaine de la recherche académique avec la multiplication des congrès et manifestations scientifiques consacrés aux microsystèmes et à la miniaturisation (microTAS, Nanotech, Minotech, ...), ainsi que de publications et de journaux (*Lab-on-a-Chip*, *Electrophoresis special issue on miniaturization*, *Analytical Chemistry*) qui leur sont dédiés. En outre, elle est illustrée par l'apparition et la mise sur le marché des premiers systèmes commerciaux opérationnels (Tecan, Agilent, CIPHERGEN, Gyros) Une conséquence en est le foisonnement actuel des programmes de recherche et des financements (RMNT, Eurimus, ACI, 6^{ème} PCRD...) réservés à la conception et à la réalisation de microsystèmes, en particulier, pour des applications analytiques, médicales, diagnostiques ou encore environnementales.

En effet, le développement de microsystèmes est un domaine pluridisciplinaire qui favorise les échanges entre chercheurs. La fabrication des microsystèmes s'appuie sur des techniques de microélectronique et de microtechnologie, leur conception sur la compréhension des

Chapitre 1: « Généralités »

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM

phénomènes physiques et des comportements à ces échelles et leur mise en œuvre sur la chimie en général tant pour les rendre fonctionnels (et opérationnels) que pour leur utilisation.

Nous commencerons ce chapitre avec des considérations générales sur les microsystèmes avec : (i) une définition de la notion de « microsysteme », (ii) les caractéristiques des microsystèmes et les avantages qui en découlent, (iii) les matériaux et procédés de fabrication les plus courants, (iv) la présentation de deux modules incontournables, celui de pompage et celui de détection, (v) l'évocation des applications majeures des microsystèmes fluidiques dans les domaines de la chimie et des sciences de la vie. Ce point sera ensuite illustré en détails à travers quelques exemples concrets de microsystèmes. Enfin, nous présenterons le projet qui motive et sous-tend ce travail de thèse avec le développement de deux prototypes dédiés à de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse.

I. Généralités sur les microsystèmes

A. Notion de microsysteme

L'appellation 'microsysteme' désigne tout systeme miniature dédié, ici, à une application analytique ou réactionnelle. Les tailles caractéristiques de ces microsystèmes diffèrent selon le type d'applications. Pour des applications biologiques, les dimensions caractéristiques de ces dispositifs sont de l'ordre du micron ; les systèmes incluent des canaux dont la largeur et la profondeur varient de quelques microns à quelques centaines de microns.¹¹ Dans le domaine de la chimie, en revanche, les dimensions caractéristiques des microsystèmes sont plus larges et balayent une gamme allant de la centaine au millier de microns. En effet, pour des dimensions inférieures, on parle de nanoréacteurs et pour des tailles supérieures de milli- ou miniréacteurs.¹² Dans les deux cas, néanmoins, ces microsystèmes sont issus de procédés de fabrication de microtechnologie, développés à l'origine pour l'industrie microélectronique, ce qui explique l'utilisation du préfixe « micro » pour les désigner. Les procédés et techniques typiquement utilisés pour la fabrication des microsystèmes, qui seront présentés plus en détails ultérieurement, sont adaptés à la fabrication de structures ayant des dimensions caractéristiques de l'ordre du micron, en raison de leur résolution de fabrication, inférieure au millimètre et pouvant atteindre les quelques dizaines de nanomètres, comme nous le verrons ci-après. Les techniques plus conventionnelles ou macroscopiques ne présentent pas une résolution aussi basse.

Le terme de 'microsysteme' recouvre deux familles distinctes de dispositifs, les *microarrays* ou puces à composés (terme pour lequel il n'existe pas d'équivalent en français)¹³ et les systèmes microfluidiques.^{6,7,14,15} Ces deux groupes de microsystèmes se distinguent par leur mode opérationnel, qui est, respectivement, statique ou dynamique.

Les *microarrays* reposent sur le principe de fonctionnement des dispositifs du type des puces à ADN, applications les plus connues des microsystèmes.^{13,16} Des molécules-sondes sont immobilisées sur une plaque de verre ou de silicium dans des puits de 1 à 10 μm de diamètre ; elles servent de cibles d'hybridation ou d'interaction à des molécules à tester. La détection repose le plus souvent sur une technique de fluorescence. Les applications majeures sont le criblage à haut débit d'oligonucléotides, ADN, ARN ou ADN complémentaire. Des puces à peptides ou à protéines sont également développées pour l'étude d'interactions ou des mesures quantitatives ;¹⁷^{18,19} leur mise en œuvre reste cependant plus complexe du fait de la diversité chimique plus grande de ces composés,^{20,21} comparé aux oligonucléotides. Récemment, des *microarrays* ont également trouvé des applications en chimie pour l'étude à haut débit de molécules chirales.²²

L'autre famille de microsystèmes est de nature microfluidique. Dans ce cas, le système comprend des microcanaux de 5 à 200 μm de largeur où circulent les fluides, des réservoirs ou des cellules de réaction qui sont gravés dans le matériau à l'aide de techniques appropriées. Ces microsystèmes incluent différents éléments ou modules correspondant chacun à une opération précise. Le déplacement des liquides est assuré par un mode de pompage interne au microsystème, ou bien externe et situé en amont du dispositif. Les liquides peuvent aussi être déplacés uniquement en surface sur des zones matérialisées à cette fin. La détection est réalisée sur le système (électrochimie)^{23,24,25} ou à l'aide un appareil externe connecté au canal de sortie (fluorescence, spectrométrie de masse...)²⁶. Ces laboratoires-sur-puces ont trouvé des applications aussi bien en chimie, avec des synthèses menées sur de petites quantités de matériel, qu'en biochimie ou biologie, avec de l'analyse à haut débit¹⁵ ou la manipulation de cellules uniques^{27,28} ou de petites populations de cellules. Des systèmes mixtes combinant les deux aspects, *microarray* et microfluidique, sont en cours de développement.

Le travail décrit ici ne concerne que des applications microfluidiques des microsystèmes, c'est pourquoi nous nous limiterons dorénavant à cette famille de microsystèmes.

B. Avantages et caractéristiques des microsystèmes

Les développements en microfluidique sont motivés, d'une part, par les avantages apportés par les microsystèmes et, d'autre part, par les caractéristiques inhérentes à l'échelle du micron.

1. Avantages

Les avantages des microsystèmes sont de deux ordres distincts ; ils sont liés aux dimensions réduites des systèmes ou à leur mode de fabrication basé sur des procédés de microélectronique.

Avantages liés à la taille des systèmes

La première série d'avantages apportés par les microsystèmes est inhérente à leurs dimensions caractéristiques et à leur taille, qui sont de l'ordre du micron.

Les volumes manipulés sur les microsystèmes sont plus petits, ce qui entraîne une consommation moindre en produits chimiques, aussi bien en solvants et « tampons » qu'en composés impliqués dans les processus analytiques et réactionnels. Cette consommation moindre a deux répercussions évidentes. La première est d'ordre financier, les produits chimiques mis en jeu pouvant être fort

onéreux et rares, et la deuxième, d'ordre environnemental, la pollution engendrée d'une part, et les volumes de produits chimiques et solvants à stocker ou à recycler d'autre part, étant moindres.

La diminution des dispositifs va de pair aussi avec une plus grande rapidité des opérations. La vitesse des analyses est directement corrélée aux dimensions des systèmes ; plus ces derniers sont petits, plus les analyses sont rapides. La miniaturisation apporte donc un gain considérable en temps (pour les analyses et autres opérations menées sur les microsystèmes). De plus, la miniaturisation augmente les performances en séparation des dispositifs, puisque les phénomènes de dispersion transversale sont diminués.¹¹

Ces systèmes miniatures sont adéquats pour la manipulation de petits volumes. Ils sont donc, en premier lieu, désignés pour l'étude d'échantillons de taille réduite, comme ceux manipulés usuellement en biologie (extraits cellulaires, protéiques) dont le volume est inférieur au microlitre. Cette adéquation en taille améliore les conditions d'analyse de petits volumes d'échantillon qui sont « perdus » sur des systèmes conventionnels. Il en résulte, de plus, un gain en sensibilité des analyses. Ces systèmes miniatures conviennent, en second lieu, à la préparation des petites quantités de composés chimiques nécessaires à un premier criblage de molécules et au test de leurs activités.

Enfin, dans le domaine de la chimie, en particulier, le contrôle des opérations est accru sur un microsystème, ce qui découle des meilleures caractéristiques des transferts de chaleur. Ainsi, la synthèse de composés dangereux, toxiques et la conduite de réaction fortement exothermiques voire explosives sont-elles envisageables sur ces microsystèmes. L'isolement ou le stockage ultérieur des composés dangereux synthétisés est, par ailleurs, possible dans le microsystème même, qui sert alors de « poubelle chimique ».

Avantages liés à leur mode de fabrication et communs à la microélectronique

L'autre groupe d'avantages liés à l'utilisation de systèmes de dimension caractéristique de l'ordre du micron découle de la voie de fabrication utilisée, basée sur des procédés de microtechnologie.

Le premier apport des techniques de microtechnologie est le très fort contrôle possible de la fabrication des microsystèmes. Il en résulte une très grande précision des dimensions, pouvant, suivant le procédé choisi, descendre à des échelles inférieures au micron ainsi qu'une très forte reproductibilité des objets fabriqués. Ce dernier aspect est crucial pour des applications analytiques, car la reproductibilité des objets va de pair avec celle des analyses.

Un autre avantage est la possibilité d'une forte intégration sur un même substrat de quelques pouces de diamètres ; le même substrat peut comprendre plusieurs dispositifs identiques placés en parallèle. Cette intégration, qui peut être qualifiée d'horizontale, ouvre la voie à du haut débit et à une automatisation de l'analyse. L'intégration sur un même substrat peut aussi être verticale avec l'intégration de toute une suite opérationnelle, qu'elle soit réactionnelle ou analytique. Les différentes étapes du processus opérationnel s'enchaînent, alors, sans intervention manuelle de l'expérimentateur. Cet enchaînement automatisé limite les pertes et contaminations des échantillons, dues aux manipulations intensives des échantillons et à leur passage à travers de multiples récipients ou tubes.

Enfin, le recours à une voie de fabrication microtechnologique est compatible avec une production en masse et à moindre coût de microsystèmes, une fois que le processus de fabrication a été optimisé, ce qui diminue le coût de revient des systèmes mais aussi, in fine, des opérations ou analyses.

2. Caractéristiques de l'échelle du micron

Les caractéristiques intrinsèques à l'échelle micronique constituent un attrait supplémentaire pour le développement de systèmes miniatures.

A l'échelle du micron, l'écoulement des fluides est entièrement laminaire. Au contraire, à l'échelle macroscopique, il est turbulent, ce qui se traduit par l'apparition de perturbations locales dans le volume de liquide. Par conséquent, à l'échelle de quelques microns, le flux de liquide est plus homogène et il est mieux contrôlé dans son ensemble du fait de l'absence de turbulences locales. Une conséquence du caractère laminaire de l'écoulement en est, néanmoins, une absence de mélange spontané. Ce dernier est classiquement favorisé par la création de turbulences locales. Il est, ici, uniquement régi par la diffusion des molécules au sein du volume de liquide. Si deux flux de liquide se rencontrent à l'intersection entre deux microcanaux, la diffusion des espèces et le mélange par conséquent, se produisent exclusivement à l'interface entre les deux flux de liquide. Cette caractéristique propre à l'échelle du micron peut entraver la conduite de certaines réactions, mais elle peut aussi être mise à profit pour des études plus fines de réactions. Par ailleurs, comme nous le verrons plus loin dans ce paragraphe, l'absence de mélange est facilement palliée par l'introduction de structures appropriées et destinées à favoriser les processus de mélange.

Une autre caractéristique inhérente à ces petites structures est la prépondérance des surfaces et des phénomènes de surface ; cet aspect ne doit pas être négligé car il impose, pour un grand

nombre d'applications, des étapes préalables de traitement des surfaces. Le rapport surface-sur-volume varie en $1/r$; il résulte donc de la miniaturisation un fort accroissement de ce rapport, qui confère aux surfaces une importance toute relative. Ceci se traduit, en particulier, par un accroissement de l'aire d'échange entre la solution et la surface et, par conséquent, des interactions entre composés et surface. Ces interactions peuvent être néfastes avec une adsorption non spécifique intense des composés sur les surfaces et, de ce fait, leur perte. L'augmentation de l'aire d'échange entre solution et surfaces peut néanmoins être mise à profit pour des applications catalytiques par exemple ; la surface d'échange entre les composés dans les fluides et le catalyseur immobilisé en surface, est plus étendue. Enfin, pour certaines applications mettant en jeu un échange entre solutions et surface, une fonctionnalisation de surface et non plus en volume, peut être suffisante.

C. Matériaux et microfabrication

Différents matériaux peuvent être envisagés pour la fabrication des microsystèmes ;²⁹ des matériaux traditionnels de microtechnologie à base de silicium,^{30,31} des matériaux de type verre,³² des métaux ou encore des matériaux de type polymères.³³⁻³⁵ Du choix du matériau découle le plus souvent celui des techniques utilisées pour la fabrication du système. Notons que ces deux choix, celui du matériau et du procédé de fabrication, sont fortement conditionnés par l'application future du système. Le matériau doit posséder des propriétés physico-chimiques adéquates, comme, par exemple, une bonne conductivité thermique. Le procédé de fabrication doit conférer au système des caractéristiques souhaitées et être adapté à la géométrie et aux dimensions des structures envisagées.

Récemment, le domaine des microfabrications s'est élargi avec l'apparition d'autres matériaux,³⁵ non issus de l'héritage microélectronique et celle de procédés de fabrication qui leur sont associés pour la préparation de nouveaux types de systèmes.^{34,36,37} Les matériaux de type élastomères en font partie. Ils s'opposent aux matériaux traditionnels qui sont le plus souvent rigides.

1. Matériaux

Historiquement, le silicium et les matériaux dérivés du silicium (SiO_2 , Si_xN_y) ainsi que d'autres matériaux typiques de microélectronique ont été utilisés de façon prépondérante pour fabriquer les premiers microsystèmes. Du fait de ses antécédents dans le domaine de la microélectronique, le silicium est bien connu par les technologues, de même que les nombreux procédés de fabrication associés. Ces procédés ont facilement été adaptés pour la fabrication d'objets de type

MEMS. De plus, les propriétés du silicium sont intéressantes : des propriétés mécaniques remarquables, de bonnes résistances chimique et thermique, une conductivité non nulle, une réactivité à haute température. Ces caractéristiques en font un matériau de choix pour la fabrication de microsystèmes de chimie, car il peut être utilisé à très hautes températures et pour des applications mettant en jeu des solutions fortement agressives du point de vue chimique. L'oxydation de sa surface ou la modification de cette dernière à l'aide d'un traitement chimique approprié sont aisées ; les traitements de surface reposent le plus souvent sur la création de liaisons silanes sur les groupements silanols présents en surface. Enfin, du fait de sa versatilité, ce matériau peut être usiné à l'aide de diverses techniques afin de donner différents types de structures, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. Cependant, le silicium est encore fort onéreux et n'est pas transparent aussi bien dans le visible que dans l'UV, ce qui empêche toute détection par voie optique dans un système tout silicium ou toute modification (locale) par photochimie.

Les verres et le quartz, qui forment une autre classe de matériaux, pallient ces manques. De plus, ces matériaux sont adaptés à la création d'un flux électro-osmotique. Ils font montre de bonnes résistances aussi bien thermique que chimique et ce sont des matériaux biocompatibles. Enfin, les propriétés de surface du verre sont facilement modulables, du fait de la présence de groupements silanols en surface. Cependant, le verre et le quartz sont fort fragiles et même encore onéreux pour une production en masse à moindre coût. Du point de vue de la microfabrication, le verre se prête moins bien aux procédés de microtechnologie que les matériaux à base de silicium. Les structures obtenues sont moins « belles », moins « propres », car la gravure par voie chimique du verre ne génère pas des parois parallèles. Les contraintes de dimensions sont, par conséquent, plus fortes : la production de structures ayant un haut rapport d'aspect n'est pas envisageable, par exemple, ni celle d'objets de dimensions caractéristiques de l'ordre du micron. Enfin, les procédés de collage sont moins bien établis.

Depuis peu, de nouveaux matériaux apparaissent pour la fabrication de microsystèmes fluidiques : les matériaux de nature macromoléculaire.^{35,37} Il s'agit de matériaux plastiques rigides ou d'élastomères, plus souples. Leur attrait réside principalement dans le coût des objets en polymère, plus bas comparé à celui d'objets en silicium, en verre ou en quartz et dans leur fragilité moindre. L'intérêt de cette alternative macromoléculaire est donc une production d'objets jetables à usage unique. De plus, cette famille de matériaux est étendue et tous types de propriétés sont accessibles : transparence, bonnes propriétés d'adhésion. Par contre, leur conductivité thermique

est limitée, ils ne sont pas stables à haute température et ils se dissolvent plus facilement dans les solvants organiques. Ceci explique qu'ils sont plus facilement utilisés pour des applications biologiques que purement chimiques. En particulier, ils sont exclus pour des applications générant localement de très fortes quantités de chaleur.

Le dernier type de matériaux regroupe les céramiques.³⁸⁻⁴⁰ Ces matériaux peu chers sont adaptés à la création d'un flux électro-osmotique et ils présentent de bonnes propriétés d'adhésion. Ils ne sont pas tous transparents dans le visible, par contre, et sont plus adaptés à une détection interne au système, par électrochimie par exemple.³⁸ Enfin, leur manufacture ne nécessite pas de salles blanches ou de locaux spécialisés.³⁸

2. Procédés de fabrication

Les procédés de fabrication utilisés sont intimement liés au(x) matériau(x) constituant le microsystème. Le choix de la voie de fabrication est conditionné ainsi par la nature du matériau, le coût de fabrication, la durée du processus de fabrication, sa fiabilité, sa résolution et enfin, la facilité d'accès aux procédés. Les grands procédés de fabrication sont la lithographie, les procédés de gravure chimique ou physique des matériaux, les méthodes de moulage ou d'empreinte sur des matrices, l'usinage laser....

Nous allons maintenant envisager les différents procédés de fabrication les plus courants pour les matériaux à base de silicium, les matériaux de la famille des verres et enfin, les techniques dédiées à des manufactures à base de plastiques ou de résines. Ce paragraphe n'a pas vocation à être exhaustif en termes de méthodes de fabrication. Il ne recense pas les méthodes émergentes et récentes, mais présente plutôt les méthodes de fabrication de base. Nous verrons ensuite les différentes techniques de scellement génériques pour les matériaux à base de silicium, le verre et les matériaux de nature macromoléculaire.

Procédés de microfabrication de base

(i) Photolithographie

Une technique de base en microtechnologie est la lithographie ; elle permet de préparer des structures multicouches, les différentes couches étant préparées successivement et indépendamment les unes des autres. Cette méthode de lithographie consiste à transférer des motifs, sur une couche de résine (un polymère organique, le plus souvent) pour leur réalisation ultérieure dans la couche de matériau concernée.

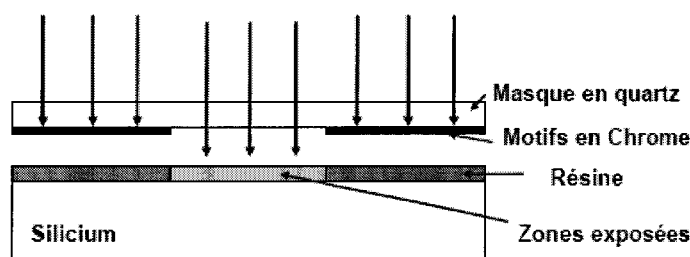


Figure 1 : Principe de la technique de lithographie

Tout d'abord, une couche assez mince de résine est déposée, de façon homogène, sur un substrat à usiner. En photolithographie, cette couche de résine est ensuite exposée à une lumière UV à travers un masque (voir Figure 1). Ce dernier, en quartz, comprend des motifs en chrome, opaques à la lumière UV. L'irradiation UV locale de la résine induit un changement de ses propriétés ; elle devient plus « molle » (résine positive) ou plus « dure » (résine négative) et, par conséquent, plus ou moins soluble, respectivement, dans la solution de révélation de la résine. L'étape de révélation conduit donc à un transfert du masque sur la couche de résine, qui sert de masque pour l'étape suivante d'attaque du substrat ou de son dopage. Une fois le matériau attaqué ou dopé, la résine est enlevée avec une étape de révélation au cours de laquelle la résine est dissoute dans un solvant adéquat. La résolution des motifs est typiquement de $0,2 \mu\text{m}$.⁴¹ Une meilleure résolution est envisageable si cette étape de lithographie utilise un faisceau d'électrons au lieu d'une lampe UV ; la résolution atteint, ici, $0,1 \mu\text{m}$

La photolithographie classique utilise une résine de nature macromoléculaire, qui n'est pas applicable à des surfaces courbes. Le coût de cette technique est, par ailleurs, élevé suite à la nécessité de l'utilisation de salles blanches et d'appareillages dédiés. De plus, ces équipements sont, à l'heure actuelle, peu accessibles à des chimistes et biologistes. Nous verrons donc comment cette étape de photolithographie et l'utilisation de masques peuvent être éliminées ou remplacées.

La gravure du matériau peut être réalisée selon deux types de méthodes distincts, les méthodes dites de gravure humide ou anisotropique et les méthodes dites de gravure physique ou isotropique. Selon la nature de la gravure, le matériau sera attaqué différemment et le profil de gravure ne sera pas le même (voir Figures 2 et 3).

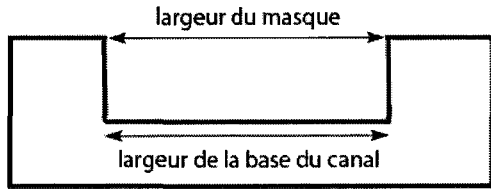


Figure 2 : Profil obtenu pour une gravure physique ou isotrope du silicium ; les flancs des canaux sont verticaux.

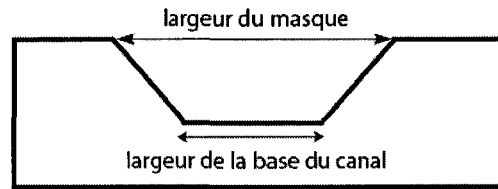


Figure 3 : Profil obtenu pour une gravure chimique ou anisotrope du silicium ; les flancs des canaux respectent la structure du matériau.

(ii) Gravure chimique du silicium

La première voie de fabrication utilisée qui est adaptée à l'usinage en bloc du silicium est une gravure chimique et anisotropique, dite aussi gravure humide du silicium. La vitesse d'attaque du matériau dépend de la direction cristalline et de la composition de la solution de gravure (Figure 3). Les solutions chimiques les plus courantes sont des bases, KOH et TMAH (hydroxyde de tétraméthylammonium) par exemple, qui sont très sélectives vis-à-vis du matériau à attaquer. Comme les résines sont sensibles à ces bases, la couche de lithographie peut être constituée d'autres matériaux à base de silicium comme SiO_2 , Si_3N_4 ou SiC. Ce procédé de gravure chimique est adapté à la production de petites structures de dimensions néanmoins supérieures au micron, et ce avec une très forte précision de gravure. Pour des structures plus petites, la gravure est réalisée par voie physique, mais comme la gravure chimique est moins difficile à mettre en œuvre et qu'elle est moins chère, elle est préférée pour la réalisation de canaux de taille caractéristique de l'ordre de la dizaine de microns. Le profil de gravure est propre et respecte la structure fine du matériau, ses plans cristallins. La Figure 4 illustre un profil de gravure chimique dans le silicium d'un microcanal de 10 μm de largeur et de profondeur, réalisé au début de ce travail :⁴² le profil obtenu est en V du fait de l'orientation (110) du silicium utilisé.

De plus, cette technique est compatible avec une production en masse et automatisée d'une série d'objets identiques. Néanmoins, les procédés de gravure chimique du silicium utilisent un appareillage coûteux approprié et un environnement de salle blanche. Ils ne sont pas adaptés à la réalisation de structures ayant un haut rapport d'aspect. Ces procédés ont été utilisés pour la réalisation de canaux, de sillons, de membranes, de cantilevers, de filtres....

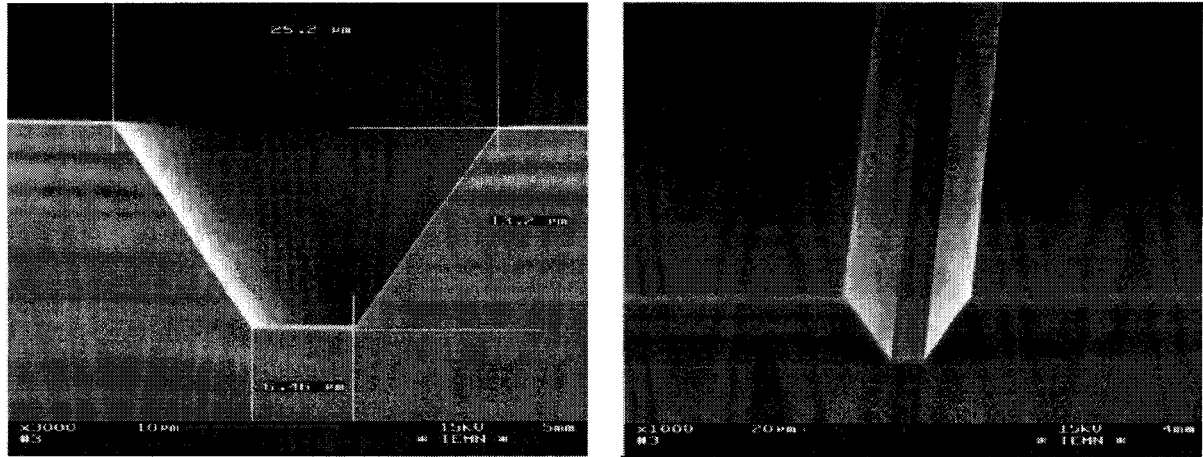


Figure 4 : Profil de gravure obtenu par voie chimique dans du silicium d'orientation (100) ; microcanal de largeur et de profondeur égales à 10 μm .

(iii) Gravure physique du silicium

La gravure physique est une autre technique adaptée à l'usinage du silicium. Aucune direction du matériau n'est privilégiée. La vitesse de gravure est la même selon toutes les directions du matériau. Ainsi, le profil de gravure obtenu diffère-t-il de celui issu d'un procédé de gravure chimique (Figure 2). La gravure physique fait appel à plusieurs techniques, qui diffèrent entre elles de par la nature de l'espèce utilisée pour la gravure. La gravure plasma utilise un plasma de radicaux qui sont générés dans un vide poussé. La vitesse de gravure est conditionnée par la nature du gaz utilisé et sa réactivité. Un enjeu est d'utiliser des radicaux stables qui ont une demi-vie suffisamment longue pour qu'ils atteignent le substrat à attaquer. La gravure à base d'ions réactifs repose sur des effets physico-chimiques ; la gravure du substrat est initiée par l'énergie cinétique des ions lorsqu'ils arrivent sur le substrat. Une troisième classe de techniques dites de gravure physique comprend les techniques de gravure profonde utilisant un faisceau d'ions réactifs. Cette dernière technique est adaptée à la réalisation de structures présentant un rapport d'aspect élevé et supérieur à 15, avec des parois verticales de plus de 400 μm de hauteur. Dans les différents cas, il n'y a pas de restriction géométrique pour les structures formées comme avec un procédé humide. Enfin, la gravure physique du silicium est adaptée à la production de toutes petites structures (dimension caractéristique $< 0,1 \mu\text{m}$), ce, avec une très grande résolution de fabrication ainsi que de structures présentant éventuellement un rapport d'aspect élevé.

(iv) Manufacture du verre

Les techniques de gravure du verre sont maintenant bien établies ; elles sont couplées à des techniques de photolithographie classiques ou adaptées s'il s'agit d'un verre spécial et

photosensible (FOTURAN). Le procédé est similaire au procédé de gravure humide du silicium. La solution de gravure est à base d'acide fluorhydrique, HF. Néanmoins, comme les propriétés du matériau ne sont pas les mêmes, la précision structurale est beaucoup plus limitée et les contraintes géométriques sont fortes. La largeur des structures doit être au moins deux fois supérieure à leur profondeur, comme illustré sur le schéma 5. Ainsi, cette technique n'est-elle pas adaptée à la réalisation de structures présentant un rapport d'aspect élevé. Une gravure physique du verre est aussi envisageable, mais cette technique est moins courante.

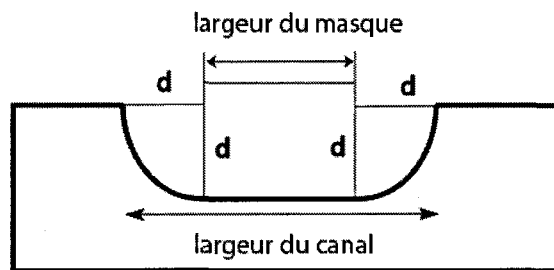


Figure 5 : Profil de gravure obtenu avec un usinage par voie chimique du verre

Enfin, le verre peut être usiné par « *powderblasting* » ou sablage du matériau.^{43,44} La technique d'attaque du verre par sablage commence, de même que les techniques de gravure humide par une étape de photolithographie au cours de laquelle les motifs à réaliser dans le verre sont transférés dans une couche de résine. Le substrat en verre est alors exposé à la poudre, d'alumine par exemple. Les zones découvertes et non protégées par la résine sont gravées et la profondeur et la vitesse de gravure sont conditionnées par le temps d'exposition à la poudre et à la vitesse d'éjection de cette dernière. Cette technique confère une assez forte rugosité au substrat usiné, de 0,8 à 2,5 μm , selon le procédé utilisé.

(v) Procédé LIGA

Le terme LIGA est un acronyme allemand pour « Lithographie/Galvanoformung und Abformung ». ⁴⁵ Il désigne un procédé de fabrication en différentes étapes : (i) une étape de lithographie profonde, (ii) une étape de « electroforming » pour réaliser une matrice en matériau conducteur et enfin, (iii) une étape de moulage sur la matrice obtenue.

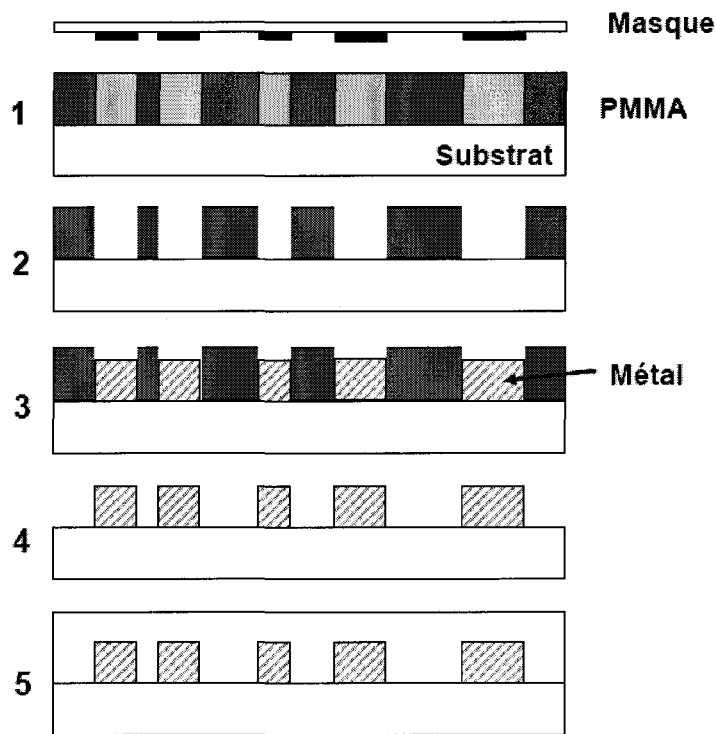


Figure 6 : Principe du procédé de fabrication LIGA : les motifs d'un masque sont transférés sur une épaisse couche de résine de PMMA (étape 1) par lithographie ; La résine est révélée pour donner des motifs (étape 2) ; le métal est ajouté en complément de la structure en PMMA obtenue (étape 3) ; la résine restante est enlevée pour donner un moule prêt à utiliser (étape 4) ; le moule est utilisé comme empreinte pour former des structures en céramique, en métal ou encore en polymère (étape 5).

Le procédé commence par la formation à l'aide de techniques de lithographie et des rayons X, UV ou d'un faisceau d'ions, d'une structure dans une couche épaisse de résine (Figure 6.1 et 2). L'utilisation d'un rayonnement X permet de former avec une très grande précision une structure ayant un rapport d'aspect élevé. La deuxième étape est l'élaboration d'une structure en matériau conducteur « complémentaire » à l'aide de la structure préparée dans la résine par 'electroplating' (Figure 6.3). La résine est ensuite éliminée par une étape classique de révélation pour libérer le moule (Figure 6.4). La troisième et dernière étape est une étape de moulage (Figure 6.5) par injection de matériaux plastiques ou céramiques ou sur de l'acier sur cette matrice en matériau conducteur ; le moule peut être utilisé successivement plus de 100 fois sans aucun endommagement ou fatigue. Cette dernière étape de moulage peut être réalisée selon différentes approches, avec l'injection d'une résine liquide dans le moule ($T > 200^{\circ}\text{C}$), le pressage contre ce moule d'un matériau mou et malléable (PMMA, $T > 160^{\circ}\text{C}$). Ce procédé est adapté à la fabrication de structures complexes tridimensionnelles présentant un rapport d'aspect élevé, et ce, avec une très grande précision. De plus, il est applicable à une large gamme de matériaux. Le

procédé de fabrication LIGA donne des structures « grossières » de taille caractéristique supérieure à 10 μm .

(vi) *Techniques de moulage ou empreinte sur une matrice*

Les techniques de moulage ou façonnage sur empreinte reposent sur l'utilisation d'un moule ou matrice, fabriqué dans un premier temps. Le moule est réalisé en silicium, aluminium ou en matériau plastique. Les procédés de fabrication de moulage ou estampage sont utilisés pour différents types de matériaux, des matériaux macromoléculaires, rigides ou de type élastomères, des céramiques, des métaux...

Classiquement, pour le moulage de structures en polymère organique, la matrice est en PDMS. Le matériau à mouler est introduit sous forme d'un pré-polymère liquide, qui est ensuite cuit par voie thermique ou photochimique (irradiation UV). Cette opération de moulage a lieu à de hautes températures et sous une forte pression ; néanmoins, l'utilisation de résines à viscosité élevée ou de céramiques est compatible avec des conditions de température et de pression plus basses.

Les techniques de moulage par injection donnent une résolution de fabrication de l'ordre de 0,5 μm . Elles permettent la fabrication de structures en matériaux composites, i.e. à partir de plusieurs composantes de natures différentes, métaux, céramiques, métaux renforcés en fibres... Ainsi, la production de structures présentant différentes propriétés, avec un extérieur rigide pour un cœur souple, par exemple, est-elle possible. Dans ces cas-là, l'étape de moulage est combinée à une étape de *sintering*. Cette technique s'avère prometteuse à l'heure actuelle pour la production de structures de dimensions caractéristiques inférieures à la centaine de nanomètres.

Le moulage sur empreinte ou estampage est une technique de fabrication à bas coût de revient et compatible avec un haut débit de production. Des microstructures en plastique ont été fabriquées à l'aide de ce procédé, avec une résolution de l'ordre de 25 nm. A cette fin, le moule en plastique est humidifié à l'aide d'un solvant adéquat ; le matériau à mouler, en contact avec la matrice, prend l'aspect d'un gel, ce qui améliore l'étape de moulage.

(vii) *Usinage laser*

L'usinage laser est adapté à la réalisation de structures tridimensionnelles et complexes. En particulier, il ne donne pas lieu à des restrictions géométriques particulières sur un usinage vertical, comme c'est le cas avec les autres procédés de fabrication, en général. Les techniques d'usinage laser sont de deux types : (i) une technique d'ablation du matériau à l'aide d'un faisceau

laser et (ii) une technique qui induit la polymérisation d'un matériau suite à une irradiation à l'aide d'un faisceau laser. Ces techniques utilisant un laser ne nécessitent pas de masques ; la forme à produire est facilement transférée à l'aide d'un logiciel de conception assistée à l'aide d'un faisceau laser pour la fabrication de la structure. Les méthodes de fabrication par ablation laser ont une résolution qui descend à environ 6 μm , cette limitation étant imposée par les phénomènes de diffraction. Elles sont adaptées à l'usinage de plastique, de verre, de céramiques, par exemple et elles sont particulièrement adaptées à une production peu onéreuse de structures en plastiques. Une autre technique utilisant un faisceau laser repose sur une écriture à l'aide d'un laser. Le laser induit ici, la polymérisation d'une pré-résine, de façon locale, afin de former des structures tri-dimensionnelles. Cette méthode est aussi dite de stéréolithographie.

Autres méthodes émergentes de moindre coût et plus accessibles

(i) Prototypage rapide

La technique dite de prototypage rapide^{46,47-50} permet de s'affranchir de l'utilisation de masques onéreux et de préparation longue et malaisée, le plus souvent prise en charge par un sous-traitant. L'objectif, avec cette technique, est de faire de la production rapide de structures « grossières », i.e. de dimensions caractéristiques supérieures à 20 μm . La forme à produire est dessinée à l'aide d'un logiciel approprié, puis elle est transférée sur un film de polymère à l'aide d'un système d'imagerie assistée par un laser. Ainsi, la structure est-elle obtenue en quelques heures avec un coût approximatif de 1 euro/cm². La limitation de cette technique est liée à la résolution de l'écriture au faisceau laser.

(ii) Lithographie dite molle et autres techniques émergentes

Depuis peu, des techniques, peu coûteuses et ne nécessitant pas d'équipement de salles blanches émergent.^{34,36,51,52,53} Ces techniques sont dites de lithographie molle. Elles englobent les techniques de *micro-contact printing* (μCP),⁵⁴⁻⁵⁶ de moulage⁵⁷ Toutes ces techniques reposent sur l'utilisation d'un moule ou d'un tampon en PDMS issu de procédés de fabrication classiques.^{46,58,59}

A l'origine, l'utilisation d'un tampon en PDMS était réservée à des applications de fonctionnalisation de surface, avec la création de monocouches organisées de molécules ou SAMs pour *Self-Assembled Monolayers* (Figure 7).^{56,60} Le tampon est trempé dans une solution de composés. Après mise en contact du tampon avec la surface, les composés sont adsorbés sur la surface à fonctionnaliser selon des motifs bien définis.

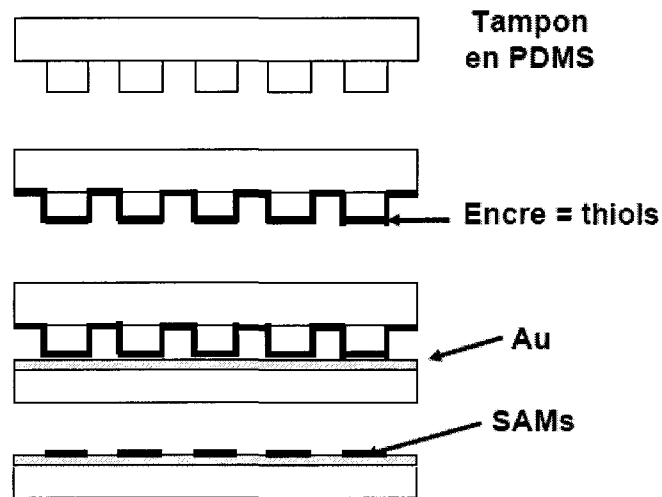


Figure 7 : Principe du procédé d'élaboration de SAMs à base de thiols sur une surface d'or : le tampon en PDMS est trempé dans la solution de composés thiols constituant la fonctionnalisation de surface à opérer (étape 2) ; le tampon imprégné de la solution de thiols est mis en contact avec la surface recouverte d'or à fonctionnaliser (étape 3) ; les thiols sont adsorbés en surface selon les motifs présentés par le tampon.

Les couches de molécules chimio-sorbées présentent un fort degré d'organisation et une épaisseur typique de quelques nanomètres, 2-3 nm. Cette épaisseur peut être très finement ajustée, à 0,1 nm près, avec l'ajout d'un groupement méthylène.⁶¹ La fonctionnalité de la surface est donnée par le groupement présent à la surface ; ainsi, cette technique est-elle couramment utilisée pour créer une balance hydrophile/hydrophobe sur une surface. Le plus souvent, les composés utilisés sont des thiols, adsorbés sur des surfaces métallisées d'or, argent, platine^{62,63}... Cette technique est applicable à des surfaces courbes, et non uniquement planes, comme la plupart des procédés de microtechnologie, si l'on utilise un tampon cylindrique que l'on fait rouler sur la surface.⁶⁴ De plus, les monocouches organisées peuvent servir de masques car elles résistent à l'attaque de solutions chimiques de gravure.⁶⁵⁻⁶⁷

Le même type de moules en PDMS peut aussi servir à la fabrication de structures en polymère organique rigide. La réplique par moulage permet la production de structures en polymère organique par coulage sur la matrice en PDMS et cuisson photochimique (irradiation UV). Cette technique donne des structures avec un rapport d'aspect élevé et des dimensions allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques centimètres. Dans le cas d'un micro-moulage capillaire, le moule en PDMS rempli de pré-résine à polymériser est mis en contact avec un substrat. Une fois la polymérisation terminée, des canaux ou d'autres structures rigides sont créés sur le substrat.

*Techniques de scellement**(i) Silicium-Silicium, Silicium-Verre, Verre-Verre.*

Différents procédés sont disponibles pour le scellement silicium-silicium, aussi bien des procédés à haute qu'à basse température. La première technique est dite de fusion.^{68,69} Elle procède en trois étapes, une étape de nettoyage, une mise en contact et un collage vrai. Les deux substrats silicium sont d'abord nettoyés. Leurs surfaces ainsi rendues hydrophiles sont mises en contact puis pressées l'une contre l'autre à température ambiante pour conduire à la formation de pré-liaisons dues à des interactions hydrophiles de surface. L'ensemble est porté à une température supérieure à 800°C pour pérenniser ces liaisons chimiques à l'interface entre les deux substrats. Cette technique est mise en œuvre dans un environnement de salle blanche (classe I) car toute trace de poussière ou de particule met en péril la création de pré-liaisons lors de la mise en contact des deux substrats à sceller. Une autre méthode de scellement, dite à basse température, utilise une couche intermédiaire d'oxyde, déposée sur l'un des substrats par vaporisation-déposition.⁷⁰ L'étape de traitement de surface est une pré-activation de la surface et permet d'abaisser la température de scellement.⁷¹ Ici, la température de scellement est baissée à 300°C environ. La troisième méthode de collage est dite de collage anodique.⁷² Un des substrats est tout d'abord tapissé d'une couche verre à base de silicate de sodium. Ensuite, une différence de potentiel, de l'ordre de 50 V, est appliquée entre les deux substrats et l'ensemble est porté à 350-500°C. Les liaisons, qui apparaissent entre les deux substrats, sont dues à un transport d'atomes d'oxygène du verre vers le silicium. Par conséquent, cette méthode est aussi adaptée au scellement d'un substrat Pyrex sur un substrat silicium. Dans ce cas, le potentiel négatif est appliqué sur le substrat Pyrex. La qualité de la surface conditionne la qualité du scellement : les deux surfaces doivent être extrêmement lisses. Par contre, cette méthode de scellement tolère la présence d'une couche d'oxyde ou de nitrure de silicium sur le substrat non-Pyrex. Une autre technique encore est l'utilisation d'une couche de matériau intermédiaire qui aide au scellement des deux substrats.^{73,74} Cette couche intermédiaire peut consister en du verre ou un polymère, comme les résines PMMA ou PDMS. L'intérêt de cette méthode de scellement réside dans le fait qu'elle se produise à basse température ($T^{\circ}\text{C} < 100^{\circ}\text{C}$) ; elle est donc compatible avec une fonctionnalisation chimique au préalable des substrats ou même une métallisation des canaux, qui ne résistent pas à une température de quelques centaines de °C. Avec une technique dite à basse température, elles ne sont pas endommagées lors de l'étape de scellement.

Les techniques de scellement de deux substrats en verre sont proches de celles décrites pour le silicium. On retrouve les techniques de fusion à très haute température, les techniques de fusion à

plus basse température⁷⁵ qui impliquent un traitement de surface au préalable visant à activer les surfaces, les techniques de collage anodique⁷⁶ et l'utilisation d'une couche de matériau intermédiaire comme le PDMS. Pour le collage anodique, une fine couche de matériau (~ 200 nm) comme du silicium polycristallin est déposée sur l'un des deux substrats à sceller.

(ii) Matériaux de type polymères

Différentes techniques de scellement de deux substrats plastiques ou de nature macromoléculaire sont envisageables. Une première technique repose sur l'utilisation d'une fine de couche de colle adaptée ou d'une couche sacrificielle du même matériau. Par exemple, comme nous le verrons dans la dernière partie de ce chapitre, le collage de deux substrats en résine SU-8 est assuré par une fine couche de la même résine déposée sur l'un des substrats ;⁷⁷ l'ensemble est ensuite cuit à haute température pour assurer une bonne adhésion des différents composants. Cette technique de collage qui met en jeu une couche intermédiaire de résine (SU-8, PMMA, BCB...) peut également être appliquée à des collages de substrats en verre ou silicium. Une autre alternative, pour le collage, en particulier, de deux substrats en PDMS, consiste à oxyder les deux surfaces à mettre en contact.⁴⁹ Le pressage des deux substrats donne lieu alors à la formation de liaisons covalentes entre les deux surfaces en contact. Une autre méthode encore consiste à abraser une fine couche de matériau sur les deux substrats à sceller avant de les mettre en contact.^{78,79} Cette technique a également été mise en œuvre pour un collage entre matériau macromoléculaire et silicium ou silice fondue.

D. Fonctions de base des microsystème : le pompage et la détection

1. Mode de pompage

Un problème central au développement des microsystèmes est le mode de déplacement des liquides et le pompage. Les systèmes de pompage conventionnels ne sont pas miniaturisables à l'échelle d'un microsystème. De plus, à cette échelle, la précision de débit de fluide de l'ordre de, ou inférieur à, la centaine de nanolitres est difficile à atteindre.

Il apparaîtrait optimal d'intégrer le système de pompage au microsystème, ce qui impose la présence de pièces mobiles, comme des pistons et des valves qui contrôlent la progression du liquide et sa direction de déplacement, au sein du microsystème. Ces pièces sont fabriquées conjointement au reste du microsystème, lors du procédé de microtechnologie. Cependant, la fabrication par voie microtechnologique de ces petites pièces, comme des valves, efficaces et robustes de surcroît, relève « clairement » de l'art.

Dans ce paragraphe, nous envisagerons différents modes de pompage « courants » décrits sur des microsystèmes, qu'ils soient externes ou internes au microsystème. Cette énumération n'a pas pour but d'être exhaustive mais de donner quelques exemples concrets de systèmes de pompage.

a. Pompage externe : connexion à une pompe ou un pousse-seringue

La solution la plus simple est de connecter le microsystème à un appareil de pompage externe. Le plus courant est le pousse-seringue, la seringue étant reliée à l'entrée des microcanaux par le biais de capillaires de transfert. Néanmoins, la pression délivrée par un pousse-seringue est trop faible pour des canaux garnis d'une phase stationnaire dense ; le recours à un système de pompage de nanoLC est alors à envisager. Cependant, cette solution, qui apparaît simple, est loin d'être optimale puisqu'un des avantages premiers du microsystème est sa petite taille, autorisant son transport en vue d'une utilisation sur site. Une solution toute intégrée est donc préférable à un fonctionnement dans un environnement et en combinaison avec des appareils encombrants.

b. Pompage électrocinétique

Une autre alternative, qui est particulièrement appropriée au déplacement de liquides sur un microsystème est un pompage électrocinétique. Il est régi par l'application de tensions entre les entrées et les sorties du système et il repose sur l'établissement d'un flux électro-osmotique.⁸⁰

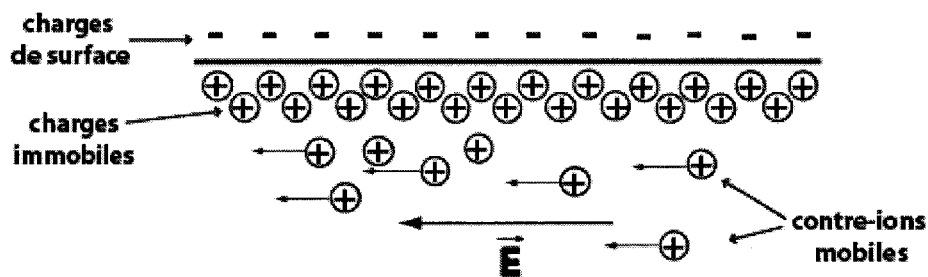


Figure 8 : Principe du pompage électrocinétique et du phénomène d'électro-osmose

Ce mode de pompage est mis en œuvre dans des capillaires ou microcanaux, dont les parois internes sont couvertes de charges natives ; le verre, le silicium ou encore la silice fondue présentent des groupements silanols en leur surface, qui, en milieu basique, donnent des charges négatives portées par des groupements Si-O⁻. Sur cette couche de charges négatives, s'adsorbent des cations ou charges positives. Il en résulte la formation d'une double couche de charges, appelée couche de Stern. La surface présente des charges qui provoquent une accumulation de

contre-ions au voisinage de la surface. Une partie de ces contre-ions est fixe et retenue sur la surface, alors que les contre-ions plus lointains sont mobiles.

Le pompage électrocinétique tire profit de l'apparition de cette couche de contre-ions, dite couche de Stern. Lors de la création d'un champ électrique et de l'application d'une tension, les charges positives (ou contre-ions) situées dans le liquide et non en voisinage direct avec la surface, sont mises en mouvement et se déplacent vers l'électrode vers laquelle elles sont attirées. Dans leur mouvement, elles entraînent la solution et les analytes qui se déplacent : une force volumique de déplacement du liquide est créée. Ce phénomène est appelé électro-osmose. L'ordre de grandeur des tensions appliquées pour le déplacement d'un liquide aqueux dans un microcanal de quelques dizaines de microns de largeur est de quelques dizaines de volts.

Les avantages de ce mode de pompage sont nombreux. Tout d'abord, sa mise en œuvre sur un microsystème est simple : aucune pièce supplémentaire n'est nécessaire sur le microsystème, comme des valves et des pistons. Le contrôle des flux de liquide est effectué par un changement des bornes d'application des tensions. Ainsi, les bifurcations des liquides dans les canaux au niveau des intersections sont-elles simples à effectuer. Un autre avantage de ce mode de pompage est le profil de progression de liquide qui est plat,⁸⁰ à l'inverse de celui observé avec un mode de pompage hydrodynamique qui est parabolique. Ce profil plat limite les dispersions des composés et « optimise » la séparation en limitant les élargissements de pics sur le chromatogramme. Une limitation de la technique identifiée au format capillaire concerne la valeur des tensions appliquées et des champs électriques associés ; des valeurs trop élevées conduisent à la formation de bulles d'air, par effet Joule, qui dégradent les séparations. En format microfluidique, ces problèmes disparaissent du fait des excellentes caractéristiques du transfert de chaleur à ces échelles. Des tensions plus élevées donnant des séparations et des analyses plus rapides sont envisageables à condition que le matériau constituant le microsystème résiste à ces fortes tensions.

Néanmoins, le pompage électrocinétique implique l'ajout d'espèces chargées dans la solution qui vont entraîner les composés dans leur migration vers les pôles chargés, cathode ou anode. Cette modification de la composition de la solution peut être gênante pour d'autres fonctions de microsystème ; en particulier, si le système est couplé à la spectrométrie de masse avec une ionisation par électronébulisation, la présence de sels dans solutions perturbe les phénomènes d'ionisation et induit des effets de suppression de signal pour les composés à analyser.

c. Pompage par mode centrifuge

L'exploitation de la force centrifuge^{81,82} apparaît comme un moyen élégant de déplacer les fluides dans un microsysteme. Ce mode de pompage ne nécessite aucune pièce mobile pour contrôler les flux de liquide et n'impose pas de modifier la composition de la solution. Par ailleurs, aucune limitation sur le débit de liquide n'apparaît, la pression générée et donc la vitesse du liquide étant directement reliées à la vitesse de rotation du système.

Ce mode de pompage centrifuge est utilisé sur des systèmes commerciaux, le CD de Gyros AB, qui sera décrit plus en détails dans la suite de ce chapitre, et le LabCD de la société Tecan.

d. Autres modes d'actuation

D'autres modes d'actuation, de réalisation et de mise en œuvre plus ou moins complexes, ont été décrits dans la littérature. Ils reposent sur différents principes simples qui les caractérisent.

Le pompage dit thermique^{83,84} repose sur un chauffage local du liquide à l'aide d'une électrode intégrée dans un microcanal, qui induit sa vaporisation partielle. La bulle formée dont le volume augmente suite à la montée en température, pousse le liquide. La direction de déplacement de liquide est contrôlée par la géométrie de la chambre d'actuation qui vise à favoriser l'avancée du liquide dans un sens uniquement.^{83,85-87} Ce mode de pompage ne nécessite pas l'ajout de pièces mobiles, puisque le contrôle des flux est réalisé grâce à la géométrie de la structure.

Dans le mode de pompage dit piézoélectrique,^{85,86,88} le déplacement des liquides est provoqué par la mise en vibration et le mouvement d'une membrane par un effet piézoélectrique. Notons que le mouvement de la membrane peut être provoqué par voie magnétique, thermopneumatique ou encore électrostatique.⁸⁹

A ces modes d'actuation sont associés divers types de valves que nous ne détaillerons pas ici.

2. Détection

Les performances des microsystèmes sont limitées au niveau de la détection. En microfluidique, cette limitation concerne la sensibilité de la méthode de détection qui doit être compatible avec la manipulation de très faibles concentrations en analyte. En revanche, dans le cas des *microarrays*, cette limitation est double et se manifeste à la fois au niveau de la quantité de molécules à détecter et au niveau de la résolution spatiale de la technique. En effet, la détection sur *microarrays* utilise principalement une technique de fluorescence. En sortie de systèmes microfluidiques, d'autres

techniques non optiques sont envisageables et elles sont intégrées sur le système ou connectées au canal de sortie et externes au système. Les techniques majeures sont de nature optique (UV, fluorescence), l'électrochimie et la spectrométrie de masse.

a. Techniques optiques

La détection optique par mesure d'absorbance UV est utilisée pour toute molécule absorbant dans cette gamme de longueurs d'onde ; elle sert communément en sortie de colonne de chromatographie ou d'électrophorèse, mais elle permet également la détection post-synthèse de produits.⁹⁰ Cette technique impose le choix d'un matériau transparent aux UVs pour le microsystème, ou tout du moins, son couvercle.

L'autre famille de techniques de détection optique repose sur le phénomène de fluorescence. Elle comprend en particulier la technique dite de fluorescence induite par irradiation laser (LIF). Cette méthode, très sensible, permet de détecter des analytes présents dans des échantillons de l'ordre du femtolitre, à de très faibles concentrations. Récemment, l'utilisation de fibres optiques a contribué à l'amélioration de cette technique. Cependant, elle implique que les espèces à détecter soient fluorescentes ou couplées à un groupement fluorescent, ce qui impose une étape supplémentaire de traitement des échantillons et de couplage des analytes à un fluorophore. De plus, ces méthodes optiques nécessitent un appareillage lourd : laser, photomultiplicateur, lentilles de focalisation. Une amélioration notable est à attendre de l'émergence de détecteurs de fluorescence intégrés sur le système. Dans le cas de la détection sur *microarrays*, la taille du faisceau laser est aussi une caractéristique importante qui limite la résolution spatiale de la détection.

b. Electrochimiluminescence

Récemment, de nouvelles techniques de détection ont été intégrées sur des microsystèmes. Elles sont basées sur la formation et la détection d'une espèce électrochimiluminescente (ECL) dans une cellule électrochimique intégrée sur le système. Cette technique a tout d'abord été utilisée pour la détection d'ions métalliques et dans le cadre de tests immunologiques. En effet, les avantages majeurs de cette technique sont l'absence de source lumineuse et l'utilisation d'un appareillage moins lourd que pour des techniques de détection purement optiques. Arora *et al.* décrivent ainsi un système de détection utilisant le complexe tris-(2,2'-bipyridyl)ruthénium (II) comme espèce électrochimiluminescente.⁹¹ Ce composé est oxydé, puis passe dans un état excité ; son retour à la forme initiale s'accompagne de l'émission d'un photon. La sensibilité de la méthode ne dépend que de la concentration en tris-(2,2'-bipyridyl)ruthénium (II), elle est

indépendante du volume de l'échantillon concerné. Cependant, une mise au point plus poussée s'avère indispensable pour accroître la robustesse de la méthode et étendre ses domaines d'application.

c. Détection électrochimique

Une variante de cette technique est la détection électrochimique, qui utilise des électrodes implantées dans des canaux de microsysteme.⁹² Cette technique a une sensibilité et une sélectivité comparables à celles obtenues par fluorescence, elle est utilisable pour des échantillons de faible volume et ne nécessite pas l'utilisation de matériaux transparents pour fabriquer le microsysteme. Par ailleurs, les électrodes sont aisément miniaturisables et sont le siège à la fois de la réaction et de la détection. Enfin, ce type de détection est entièrement intégré sur le microsysteme et ne nécessite pas d'appareillage extérieur. Mathies *et al.* ont été les premiers à intégrer un tel système de détection sur un dispositif miniaturisé d'électrophorèse capillaire.⁹³ Depuis, de nombreux progrès ont été réalisés avec le développement de (i) détecteurs électrochimiques sous forme de films épais qui ont permis de baisser la limite de détection,⁹⁴ (ii) d'électrodes modifiées en polymère⁹⁵ et enfin, (iii) d'électrodes duales intégrées sur un système en PDMS.^{96,97}

d. Spectrométrie de masse

Une autre technique de détection est la spectrométrie de masse ; elle est particulièrement adaptée aux composés biologiques :⁹⁸ les modes d'ionisation ESI et MALDI sont appropriés à l'analyse de polymères biologiques, tels que les protéines, les oligonucléotides (ADN) et les polysaccharides. Ces techniques d'ionisation douces confèrent à la molécule assez d'énergie pour son ionisation et sa vaporisation, sans induire sa fragmentation. Par ailleurs, la spectrométrie de masse apparaît intéressante car elle fournit la masse moléculaire des composés étudiés ainsi que des informations structurales. Les expériences de SM/SM ou de spectrométrie de masse en tandem conduisent à la séquence des peptides analysés. Ainsi, après confrontation de ces données expérimentales à celles présentes dans les banques de données, l'identification des protéines initialement présentes est possible. Les deux méthodes d'ionisation ESI et MALDI présentent des avantages propres et différents. Le mode ESI ou d'ionisation par électronébulisation fournit plus d'informations mais le débit d'analyse est plus faible. Un avantage de la technique ESI est la possibilité de connecter la source d'ionisation à un système de chromatographie en amont, HPLC, CE...⁹⁹ Cette technique d'ionisation est donc particulièrement intéressante dans le cadre d'un couplage d'un microsysteme fluide à une analyse par spectrométrie de masse. De plus, les sources de nano-électronébulisation et les microsystèmes fluidiques présentent des débits de même ordre de

grandeur.¹⁰⁰ Dans ce cas, le raccord entre le microsysteme et la source d'ionisation repose sur l'utilisation d'un capillaire de transfert, qui est inséré à la sortie du microsysteme, comme nous le verrons dans le chapitre 3. Cette connexion microsysteme-spectrométrie de masse exhibe de bonnes performances analytiques et permet une analyse en ligne des échantillons après leur préparation sur un microsysteme.

E. Domaines d'application majeurs

Les domaines d'application majeurs des microsystèmes sont la chimie et les sciences de la vie, biologie et biochimie.

Dans le domaine de la chimie, les microsystèmes tiennent lieu, tout d'abord, de microréacteurs pour la conduite de réactions de synthèse organique,^{3,4,101-103} à petite échelle pour des études de réactivité ou encore pour celle de réactions de catalyse hétérogène.¹⁰⁴ Pour ces dernières applications, l'attrait majeur des microsystèmes réside dans le rapport surface-sur-volume qui est élevé, conduisant à plus large surface d'échanges relative entre les fluides et la surface d'immobilisation du catalyseur. En chimie organique, ces microréacteurs tirent profit du caractère laminaire du flux, avantageux pour des réactions conduites dans conditions de transfert de phase.¹⁰⁵ Un autre exemple dans le domaine de la chimie est d'ordre analytique pour des applications environnementales, avec l'analyse sur-site d'échantillons environnementaux en vue de la détermination de teneurs en polluants ou en produits toxiques.

Dans le domaine biochimique, les premières applications apparaissent comme une continuation des puces à ADN. Des études visent à miniaturiser à l'échelle d'un microsysteme des réactions d'amplifications de brins d'ADN à l'aide de la technique de PCR.¹⁰⁶ Par ailleurs, le séquençage d'oligonucléotides par électrophorèse capillaire dans des microcanaux usinés sur un microsysteme a été décrit par Mathies et al..⁹³ Par extension, ces séparations électrophoretiques ont été utilisées pour d'autres molécules, comme des protéines.¹⁰⁷ Un deuxième domaine d'application est la protéomique, avec l'intégration sur un microsysteme fluidique de différentes étapes de préparation des échantillons protéomiques avant leur analyse en ligne par spectrométrie de masse, le plus souvent.^{14,26,100,108,109} Récemment, des systèmes de manipulation de cellules sont apparus ; ils sont dédiés à des analyses sur cellule unique,^{28,110-112} au criblage de composés à l'aide de tests cellulaires, au tri cellulaire,^{113,114} à la transfection de brin d'ADN^{115,116} ou à des études comportementales de cellules.¹¹⁰

II. Exemples tirés de la littérature

Dans cette partie, qui vise à présenter des systèmes commerciaux ou décrits dans la littérature, nous avons préféré citer quelques exemples judicieusement choisis et les décrire en détails, plutôt que de dresser un catalogue exhaustif de tous les microsystèmes ou d'une série de microsystèmes dédiés à une application précise. En effet, les chapitres suivants qui traitent de la conception des différents modules constituant nos microsystèmes, comprennent des revues bibliographiques ciblées sur les voies de réalisation de ces modules.

Nous décrivons les systèmes suivants :

- (i) un système pour des applications de chimie organique,¹⁰³ qui tire profit des écoulements laminaires typiques à cette échelle. Ce système est développé dans un laboratoire de recherche académique situé au Japon et dirigé par le Professeur Kitamori.
- (ii) un système dédié à une analyse par spectrométrie de masse avec une ionisation MALDI et basé sur une purification sélective des échantillons à analyser.^{117,118} Ce système est commercialisé par la société CIPHERGEN.
- (iii) des systèmes d'analyse biochimique basés sur de l'électrophorèse capillaire sur gel, destinés à une analyse de brins d'oligonucléotides, ADN, ARN, ADN complémentaires,¹¹⁹ de protéines¹⁰⁷ ou de cellules. Cette série de systèmes est proposée par la société Agilent Technologies sous la marque LabChip. Elle a été développée conjointement avec la société Caliper.
- (iv) un système microfluidique se présentant sous forme d'un CD, pour la préparation intégrée d'échantillons peptidiques avant une analyse par spectrométrie de masse avec une ionisation MALDI.¹²⁰ Ce système est commercialisé par une petite société suédoise, Gyros AB.
- (v) un système de manipulation de cellules dans le domaine de la neurologie, les cellules nerveuses étant immobilisées sur une puce en silicium et leur activité électrique étudiée en fonction de divers stimuli. Cet exemple relève de la recherche académique et l'exemple présenté provient des travaux effectués dans l'équipe du Pr. Fromherz au Max Planck Institute, en Allemagne.

Ces quelques exemples illustrent néanmoins le pouvoir et l'apport de la microfluidique dans les divers domaines abordés.

A. Exemple de chimie organique

Ce premier exemple de microsystème appartient à un domaine non usuel. En effet, autant les systèmes analytiques ont atteint des stades de développement avancé voire de commercialisation, autant les microsystèmes dans le domaine de la chimie organique en sont encore à leurs balbutiements et au stade de développement amont, en laboratoire. Ils ne sont pas commercialisés.

1. Principe de la démarche

Cet exemple se caractérise, néanmoins, par la démarche, propre aux microsystèmes, d'intégration de différentes étapes dans un format miniature et dans des microcanaux de quelques dizaines de microns de largeur et de profondeur. L'intégration ici concerne un processus chimique qui est mené en flux continu, dans un réacteur tubulaire et non statique. Ce processus chimique est segmenté en différentes étapes élémentaires ou opérations unitaires. Ces opérations sont prises en charge par différents modules unitaires, intégrés dans un microsystème,¹⁰³ à l'instar de l'intégration de différentes opérations à l'échelle d'une usine de production chimique.

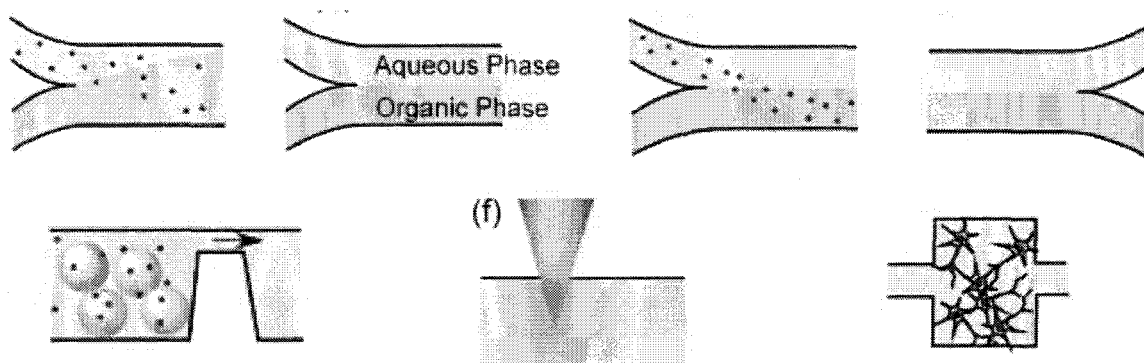


Figure 9 : Opérations unitaires et modules correspondant en microfluidique. De gauche à droite : un module de réaction/mélange, un microréacteur multiphasique, un extracteur, une zone de séparation de phases, un extracteur en phase solide, une zone de chauffage, une zone de culture cellulaire.

Les diverses opérations unitaires recensées dans le domaine de la chimie organique sont : le mélange, la réaction, l'extraction en phase liquide, la filtration, l'extraction sur phase solide, le lavage... Les différents modules unitaires prennent en charge ces opérations (Figure 9). Il s'agit d'un mélangeur, d'un extracteur, de microréacteurs tubulaires multiflux, d'une zone d'extraction sur phase solide, d'une zone de culture cellulaire...

Les dispositifs décrits ici combinent plusieurs de ces modules avec notamment des microréacteurs laminaires à flux multiples. Le concept de ces dispositifs, qui exploitent le caractère laminaire du flux, est illustré à travers 2 exemples particuliers, un système d'analyse pour la détermination de la teneur en métaux lourds dans des échantillons environnementaux et un microréacteur pour des réactions organiques en conditions de transfert de phase.

2. Système de détermination de teneur en Co(II)

Le premier exemple est la détermination du taux en métaux lourds comme Co(II) dans des échantillons aqueux environnementaux, à l'aide d'une méthode d'analyse dite humide. Cette méthode repose sur la détection des métaux lourds sous forme de complexes. Après formation du complexe, de nombreuses étapes de lavage aqueux, en milieu neutre, acide ou alcalin visent à éliminer toute trace d'ions métalliques autres que Co(II). Le processus « traditionnel » comprend 40 étapes distinctes et successives. Un premier apport du microsystème est de réduire ce nombre d'étapes à l'aide de réacteurs à trois flux, qui permettent de mener parallèlement plusieurs lavages, acide et basique par exemple. Ainsi, l'intégration et la démultiplication des étapes permettent-elles de simplifier et d'accélérer le processus d'analyse.

3. Fabrication du système et montage

Le microsystème est une puce en verre fabriquée par des procédés classiques de photolithographie et de gravure humide du matériau. Les microcanaux ont une largeur de 50, 90 ou encore 140 μm pour une profondeur constante de 20 μm . Le fond des microcanaux n'est pas plat ; il présente de légères remontées qui ont pour rôle de stabiliser les interfaces liquide-liquide dans les zones multi-flux. Ainsi, les différents sous-canaux qui correspondent aux différents sous-flux de liquide, sont-ils gravés indépendamment lors du procédé de fabrication du système. Le pompage des liquides est assuré par voie externe à l'aide de pousse-seringues et de seringues connectées aux microcanaux via des capillaires standard en silice fondue. La détection est réalisée en sortie de microsystème à l'aide d'un microscope (TLM).

4. Fonctionnement du système

Le procédé analytique conventionnel repose sur la formation d'un complexe entre Co(II) et un agent complexant, le 2-nitroso-1-naphtol (NN) ; l'analyse de ce complexe conduit à la détermination de la teneur initiale en Co(II). Le complexe formé lors de la première étape du processus, est extrait de la solution à l'aide d'une séquence de lavages aqueux, acides et basiques,

qui est répétée plusieurs fois. La teneur en Co(II) est déterminée dans la solution lavée obtenue avec la mesure de la quantité de complexe formé.

Le microsystème comprend deux zones : une première zone de réaction et d'extraction du complexe formé et une deuxième zone de décomposition et d'élimination des espèces indésirables (autres cations métalliques) grâce à une série de lavages acides et basiques. Tout le principe de ce dispositif microfluidique est basé sur le caractère laminaire des flux et la mise en contact de différents flux de liquide qui s'écoulent de façon parallèle sans se « mélanger », les communications entre flux étant régies par la diffusion des espèces d'un flux à l'autre.

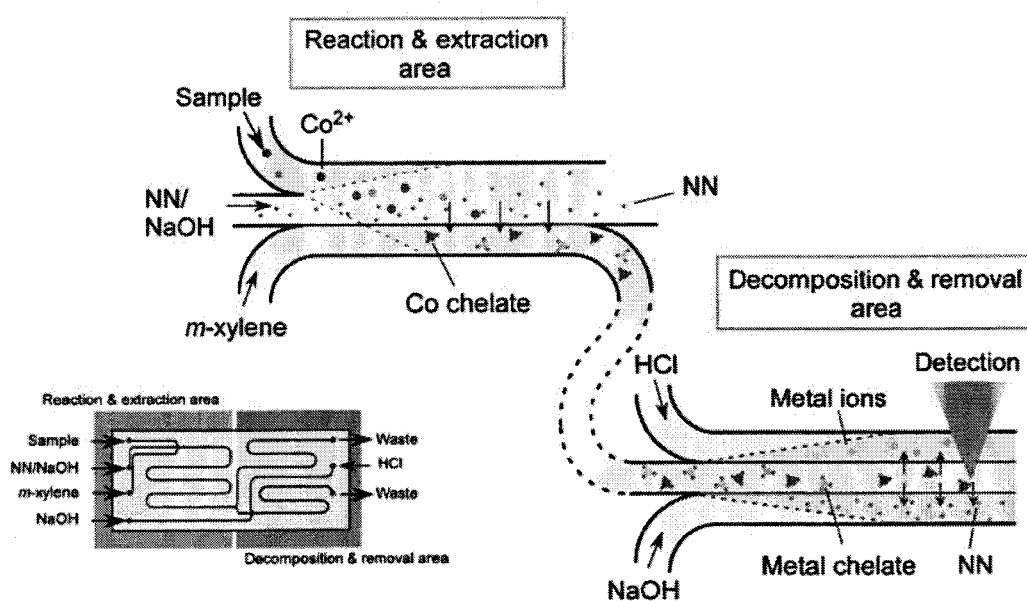


Figure 10 : Principe de fonctionnement du microsystème d'analyse et de détermination de la teneur en Co(II) dans un échantillon environnemental.

La première zone du microsystème correspond à la rencontre entre trois flux, un flux composé de l'échantillon à analyser (et contenant les ions Co(II)), un flux contenant l'agent complexant NN et un troisième flux de m-xylène dans lequel le complexe est soluble. La réaction de complexation se produit à l'interface entre les deux premiers flux et le troisième sert à l'extraction des complexes formés. Ce dernier flux de m-xylène s'écoule alors vers la deuxième partie du microsystème, où, de nouveau, trois flux se rencontrent : le flux de m-xylène contenant les complexes, un flux acide de HCl et un flux basique de NaOH. L'échantillon à analyser contient d'autres cations métalliques, complexés par NN, mais ces complexes ne sont pas stables en milieu basique ou en milieu acide. Ils se décomposent lors des lavages à HCl ou à NaOH, ils sont

éliminés pour ne laisser que le complexe à base de Co(II) pour l'étape finale d'analyse qui a lieu en sortie de la deuxième partie du microsystème.

Le microsystème comprend 8 modules unitaires, intégrés sur un système de 3×7 cm. La longueur totale du canal est de 130 mm. Les performances du système ont été éprouvées pour des mélanges modèles de cations Co(II) et Cu(II) à des concentrations respectives de 10^{-7} et 10^{-6} mol/L. Le débit a été fixé à $0,4 \mu\text{L}/\text{min}$ pour le flux de m-xylène contre $0,2 \mu\text{L}/\text{min}$ pour les autres flux. L'extraction est optimale si les canaux sont peu profonds et le débit de liquide plutôt lent. De plus, le fond des canaux doit être tapissé de guides. En absence de ces guides, les interfaces liquide-liquide ne sont pas stables et les séparations de phase sont malaisées.

Cet exemple illustre la capacité d'intégration et la performance des systèmes microfluidiques au service d'applications dans le domaine de la chimie organique. Plusieurs opérations unitaires sont réalisées sur un microsystème qui intègre les modules unitaires nécessaires correspondants, de réaction, d'extraction, de lavage et de détection.

5. Réaction en conditions de transfert de phase

Un deuxième exemple, plus simple, de l'utilisation de ces dispositifs exploitant le caractère laminaire du flux, est la conduite de réactions de chimie organique en conditions de transfert de phase, à une échelle microfluidique. Différents flux non miscibles et contenant les différents réactifs sont mis en contact. La réaction a lieu à l'interface entre les flux suite à la diffusion des espèces d'un flux à l'autre (Figure 11). Les flux sont ensuite séparés, en sortie de microsystème, et le(s) produit(s) est (sont) récupéré(s) dans le flux approprié.

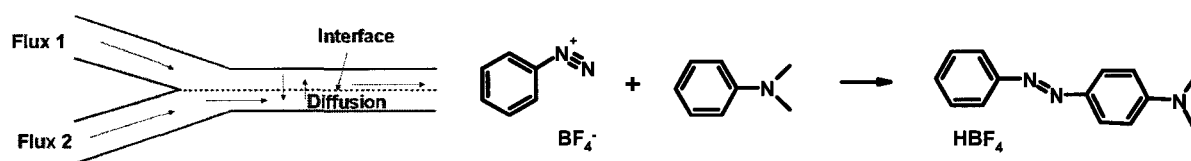


Figure 11 : Schéma du réacteur en Y

Figure 12 : Réaction de formation d'un composé diazo

Typiquement, le microréacteur présente une topologie en Y, les deux branches du Y servant d'entrée pour les deux réactifs dans les deux phases, aqueuse et organique. L'interface se forme dans le canal central entre les deux flux, comme le montre la Figure 11.

La réaction se produit à cette interface, elle ne nécessite aucune agitation du milieu réactionnel. La réaction choisie pour illustrer le fonctionnement d'un tel réacteur est une réaction de couplage conduisant à l'obtention d'un composé diazo (Figure 12).

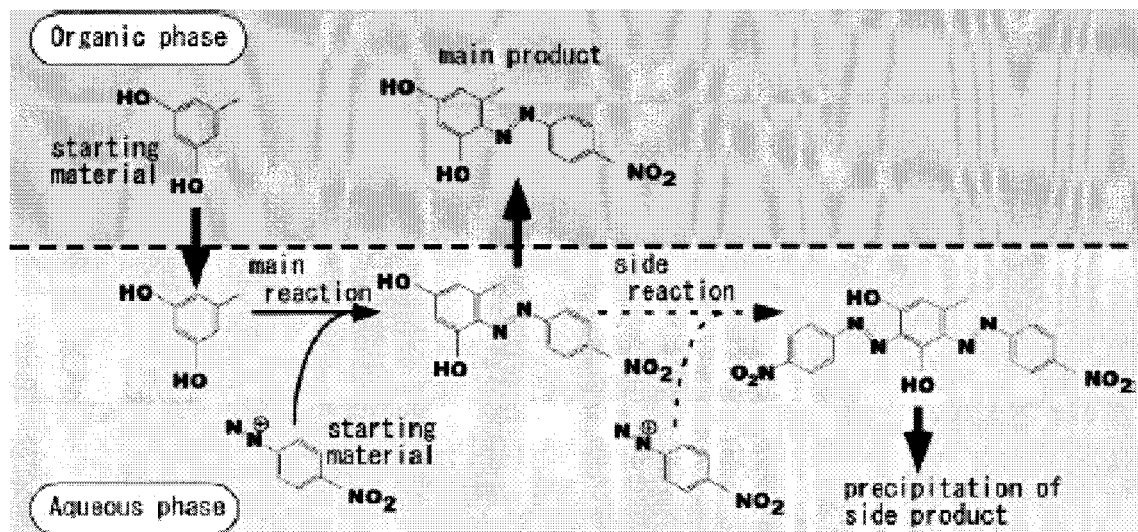


Figure 13 : Réaction de couplage ayant lieu dans un microsystème, à l'interface entre les deux flux, aqueux et organique.

La réaction est testée ici sur le 5-méthyl résorcinol et le tétrafluoroborate de 4-nitrobenzène diazonium (Figure 13), introduits respectivement en phase organique et en phase aqueuse à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le résorcinol, mis en contact avec la phase aqueuse, diffuse dans cette dernière. Il peut donc réagir avec le sel de diazonium pour donner le composé diazo, soluble dans la phase organique. Le taux de conversion, en format microfluidique, avoisine les 100% contre un rendement plus faible en conditions macroscopiques, dépendant de la vitesse d'agitation du milieu. Par ailleurs, un produit secondaire, de type bisazo, se forme conjointement. Néanmoins, comme sa diffusion vers la phase organique est beaucoup plus lente, les deux produits peuvent aisément être séparés en format microfluidique, le bisazo restant dans la phase aqueuse.

B. ProteinChip de CIPHERGEN

La société Ciphergen propose des systèmes statiques (ou non microfluidiques), appelés ProteinChip, sur lesquels sont immobilisés les composés à analyser par spectrométrie de masse avec une ionisation MALDI.^{118,121,122} Les protéines à analyser sont capturées sur une surface fonctionnalisée, par le biais d'interactions de nature chimique ou biochimique établies entre les protéines et la surface. Ce système apparaît comme une sorte de chromatographie de surface, la

fonctionnalisation de surface jouant le rôle de phase stationnaire. Le système ProteinChip est couplé à une analyse en ligne par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, la plaque ProteinChip devenant la cible MALDI. Ce microsystème repose sur une technique d'ionisation SELDI (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization*)¹¹⁷ pour une analyse directe, par spectrométrie de masse, de composés présents dans des échantillons biologiques bruts. La technique SELDI est une variante de la technique MALDI : les composés à analyser sont immobilisés sur une surface, qui intervient dans l'ionisation des composés et leur analyse. Ces dispositifs ProteinChip combinent alors une étape de chromatographie spécifique et une analyse par spectrométrie de masse.

Ce système s'oppose à ce qui est couramment appelé « puce à protéines » ou *protein arrays*, par analogie aux puces à ADN (ou autres oligonucléotides). En effet, dans le cas des puces à protéines, le but est de détecter des interactions entre une protéine et un autre composé ou de quantifier le niveau d'expression de protéines données.^{18,20} Ces systèmes de *protein arrays* exhibent deux faiblesses. La première est l'absence de technique d'amplification des protéines qui permet de disposer d'une quantité suffisante de matériel à immobiliser sur un microsystème et détectable de façon fiable à l'aide des techniques optiques usuelles. Le deuxième problème réside dans l'hétérogénéité chimique des protéines.²¹ Les oligonucléotides présentent une unique nature chimique alors que les protéines présentent une grande diversité de propriétés physico-chimiques. Leur immobilisation sur une plaque conduit à la destruction de leur structure tridimensionnelle, empêchant toute étude d'interactions. Le système ProteinChip est une alternative palliant ces problèmes inhérents aux puces à protéines : les protéines ne sont pas immobilisées sur une surface mais sont retenues selon des interactions spécifiques. Leur structure est conservée et les différentes chimies de surface proposées sur les puces CIPHERGEN couvrent l'ensemble des propriétés des protéines.

A l'origine, le système était dédié à une analyse comparative entre plusieurs échantillons protéiques ou analyse différentielle,¹²³ clé de la découverte de marqueurs biologiques de maladies et de la compréhension de la modulation des activités biologiques. Ces applications se sont élargies ensuite vers des études plus protéomiques, en particulier avec la diversification des barrettes ProteinChip et leur utilisation pour des analyses de peptides.

1. Description des dispositifs ProteinChip

Les ProteinChips sont réalisées dans du silicium. Elles comprennent chacune 8 à 16 zones fonctionnalisées (Figure 14).

Ces fonctionnalisations sont de différents types, chimiques ou biochimiques. Les fonctionnalisations chimiques correspondent à des phases stationnaires de chromatographie classiques (Figure 15, en haut), phases hydrophiles, hydrophobes, échangeuses d'ions (anions et cations) ou d'affinité pour un métal. Les fonctionnalisations biochimiques (Figure 15, en bas) sont les suivantes : ADN, enzyme, anticorps... Ces barrettes dont la surface est pré-activée peuvent être fonctionnalisées a volo par l'utilisateur, puisque ce dernier dispose du kit de fonctionnalisation et peut immobiliser tout type de composés.

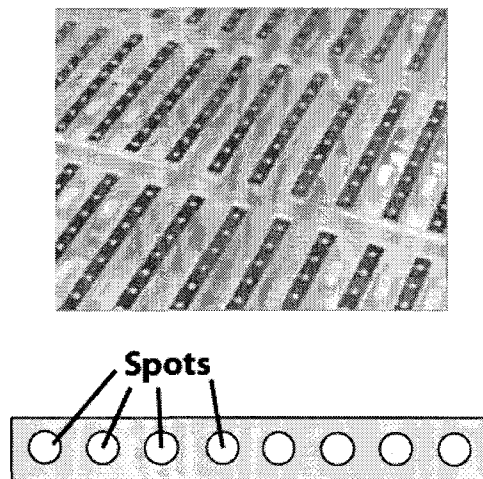
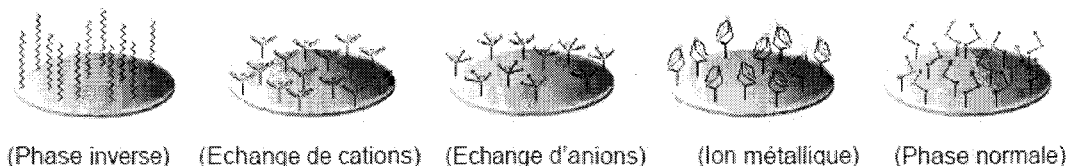


Figure 14 : Barrettes Ciphergen

En haut : Photographie de barrettes ProteinChip comprenant 8 zones de dépôt de l'échantillon (zones blanches) ; en bas : schéma représentatif d'une barrette avec ses 8 spots fonctionnalisés.

La mise en parallèle des analyses est possible sur les 16 zones de chimie identique que présente une puce ProteinChip. Les 16 zones peuvent aussi être utilisées pour un même échantillon mais en faisant varier les conditions d'analyse comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. Enfin, une dernière génération de barrettes ProteinChip, plus récentes, incorpore la matrice dans la fonctionnalisation de surface ; il s'agit de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique. La technique d'analyse n'est plus dite de SELDI, mais de SEND pour *Surface Enhanced Neat Desorption*.¹²⁴

Surfaces présentant une fonctionnalisation chimique



Surfaces pré-activées pour une fonctionnalisation à façon: études d'interactions

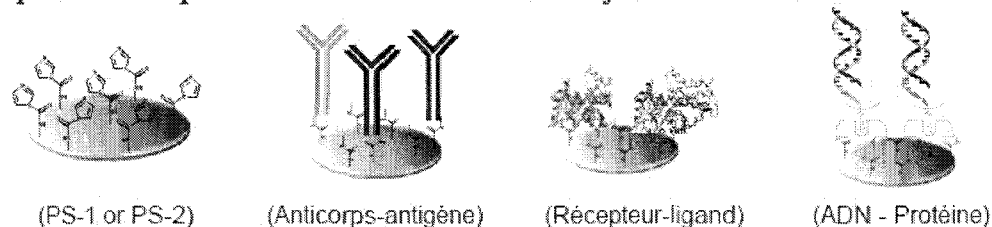


Figure 15: Gamme de chimies de surface disponibles sur les barrettes ProteinChip de la société CIPHERGEN.

En haut: fonctionnalisations dites chimiques, reproduisant les phases stationnaires usuelles de chromatographie, avec de gauche à droite, une fonctionnalisation hydrophobe, des fonctionnalisations d'échange d'ions, cations et anions, une fonctionnalisation à base d'ions métalliques et une fonctionnalisation hydrophile.

En bas: surfaces pré-activées pour une fonctionnalisation à façon par l'utilisateur et dédiées à des études d'interactions avec des protéines. De gauche à droite, la surface pré-activée, une surface fonctionnalisée avec un anticorps, avec un récepteur, des brins d'ADN pour piéger, respectivement, une protéine d'intérêt, un ligand, une protéine interagissant avec l'ADN.

2. Protocole

Le schéma de la Figure 16 illustre l'approche globale d'analyse sur des ProteinChip.

Dans un premier temps, l'échantillon à analyser est préparé de façon succincte ; il est extrait d'un morceau de tissu, de cellules, par exemple, ou il est juste récupéré de sa source biologique. Le système ProteinChip est très tolérant vis-à-vis de la composition des échantillons et ne requiert pas d'étapes préliminaires de préparation, le plus souvent. Ensuite, les ProteinChip utilisées sont choisies en fonction des chimies de surface qui seront testées. Toutes les chimies adaptées à l'échantillon sont testées en parallèle pour un travail « en aveugle » où la composition de l'échantillon est inconnue, de même que les conditions idéales/optimales d'étude des échantillons, comme c'est le cas lors de la recherche des marqueurs biologiques.

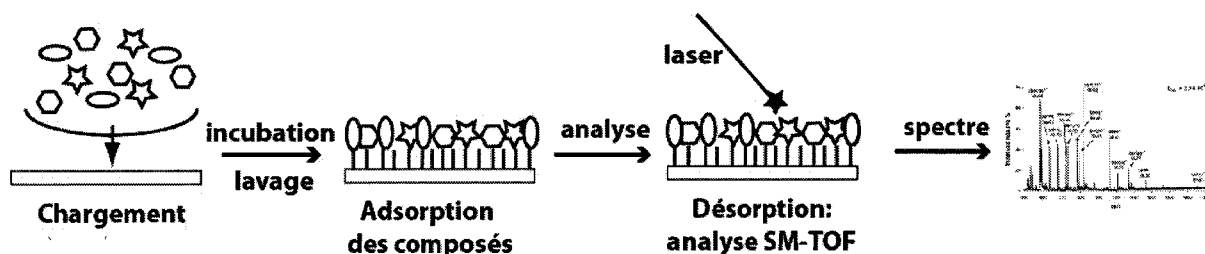


Figure 16 : Mise en œuvre d'une barrette CIPHERGEN

La solution biologique contenant divers composés est mise en contact avec la surface de la barrette. Après incubation et lavage, les composés d'intérêt (protéines le plus souvent) sont adsorbés de façon spécifique sur les sites d'interactions de la barrette. La barrette est alors introduite dans le lecteur de ProteinChip et les espèces sont désorbées et analysées suite à l'irradiation laser de la barrette. Les résultats sont obtenus sous forme d'un spectre de masse ou sous forme d'un pseudo-gel unidimensionnel.

Chaque type de chimie permet d'isoler un sous-groupe de protéines et de fractionner l'échantillon. 1 μ L d'échantillon est déposé sur chaque zone testée. L'incubation a lieu pendant une heure pour permettre la fixation des composés sur la phase stationnaire de la puce. La surface de la puce est ensuite lavée de façon abondante de façon à éliminer les interactions non spécifiques entre composés et phase stationnaire. Cette étape de lavage peut être multiple, avec une modulation de la stringence de la solution de lavage (Figure 17). Ainsi, les protéines fixées sont-elles partiellement éliminées lorsque la force de la solution de lavage augmente : la complexité de l'échantillon est réduite (Figure 18). Ces lavages à force croissante permettent également de déterminer les conditions d'éluion des composés sur la phase stationnaire, ce qui, dans un deuxième temps, peut être mis à profit pour une séparation des composés sur une colonne de chromatographie en phase liquide. La plaque ProteinChip est ensuite introduite dans l'appareil d'analyse MALDI-TOF dédié à ces puces, commercialisé par la société CIPHERGEN ou lecteur de ProteinChip. Suivant la génération des ProteinChip utilisées, cette étape est précédée du dépôt de la matrice sur les zones de la puce. Comme nous l'avons vu, une série de ProteinChip incorpore la matrice dans leur fonctionnalisation de surface. L'analyse a lieu dans des conditions standard d'analyse MALDI-TOF avec un laser à 337 nm.

Le lecteur de ProteinChip génère ensuite les graphes de l'analyse, soit sous forme conventionnelle de spectres de masse, soit sous forme de gels unidimensionnels reconstitués, qui mettent en évidence les intensités relatives des différentes protéines. La préparation et l'analyse d'une plaque durent environ 1 heure ; la technique est rapide !

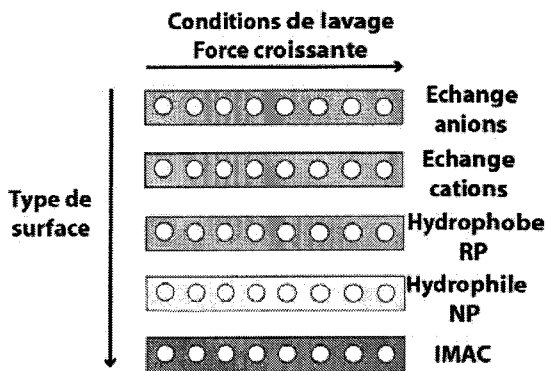


Figure 17 : Protocole opératoire de travail en aveugle : plusieurs barrettes ProteinChip présentant différentes chimies de surface sont testées simultanément. Parallèlement, les conditions de lavage des barrettes et d'éluion des composés sont variées en vue d'un fractionnement plus grand de l'échantillon.

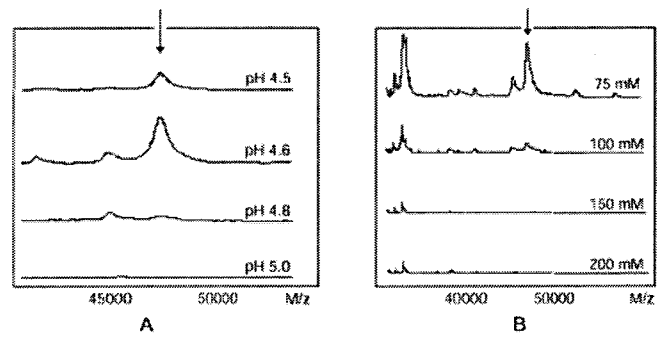


Figure 18 : Spectres de masse résultant d'une étude en aveugle sur un même échantillon testé dans différentes conditions de lavage ou d'éluion. La barrette consiste en une phase d'échange de cations. A gauche, le pH de la solution de lavage a été changé ; à droite, la concentration en NaCl dans un tampon constitué de 50 mM acétate et 5 mM citrate, pH = 4,6 est modifiée.¹²⁵

3. Applications

Les domaines d'application majeurs des ProteinChips de Ciphergen sont les études protéomiques selon une approche différentielle, à l'image des gels bidimensionnels.¹²³ Les puces sont compatibles avec une analyse des profils d'expression des protéines (Figure 19).

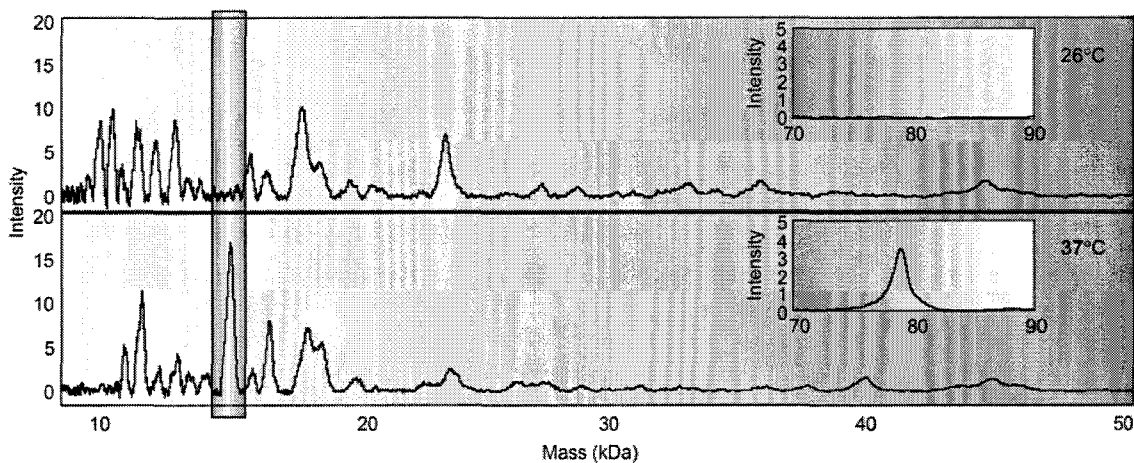


Figure 19 : Exemple d'expérience de protéomique différentielle réalisée à l'aide de ProteinChip. L'échantillon consiste en des extraits bruts cytosoliques de bactérie *Yersinia Pestis*. En haut, la bactérie a été cultivée à 26°C contre 37°C en bas.¹²³

L'étude protéomique est complétée par une « digestion-sur-puce » des protéines, en utilisant des barrettes dédiées à cet effet.¹²⁶ La digestion des protéines n'est pas effectuée selon une approche

classique basée sur l'utilisation de la trypsine ou de la pepsine, mais par une hydrolyse acide « limitée » des protéines. Elle est menée en phase vapeur ou en phase liquide, la barrette étant introduite dans un flacon contenant une solution acide de TFA (acide trifluoro-acétique) ou de PFPA (acide pentafluoropropionique). Une autre application encore dans le domaine de la protéomique est la caractérisation et l'identification de protéines.

Des barrettes ProteinChip sont spécifiques des analyses de digestats tryptiques : les surfaces sont hydrophobes (C16) et retiennent et dessalent les échantillons peptidiques. Ces barrettes peuvent aussi incorporer la matrice dans leur fonctionnalisation de surface, comme le montre le schéma ci-dessous (Figure 20). Elles sont dédiées à des analyses de digestats de protéines par MALDI-TOF et elles permettent un dessalage des échantillons et une ionisation/désorption sans ajout de matrice.

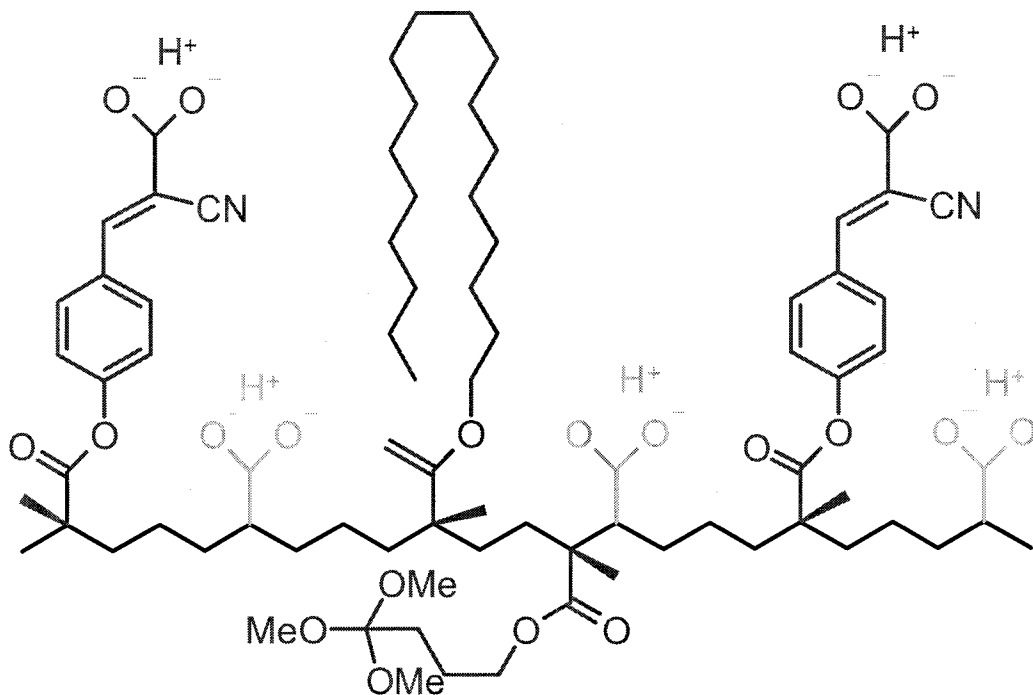


Figure 20 : Fonctionnalisation de la surface SEND comprenant plusieurs groupes : en vert, groupements correspondant à la matrice (CHCA) ; en bleu, groupements acides acryliques visant à promouvoir le signal en masse ; en mauve, chaînes aliphatiques en C18 pour un dessalage sur la cible des échantillons ; en rouge, groupements d'ancrage sur la surface de silicium.

D'autres barrettes sont dédiées à des études de modifications post-traductionnelles. En effet, une chimie de surface proposée est de type IMAC (*Ion Metal Affinity Chromatography*). Elle inclut

un cation métallique permettant la rétention sélective de composés phosphorylés. Le cation métallique est adsorbé sur la barrette par l'utilisateur, il est choisi en fonction de l'application visée : du gallium ou du fer pour des études de phosphopeptides ou du cuivre pour des phosphoprotéines. L'étude des glycosylations est réalisée sur des protéines et non des peptides, sur des surfaces hydrophobes non spécifiques ; la matrice ajoutée est, elle, spécifique des composés glycosylés.

Toutes les études protéomiques sur effectuées sur des peptides, des digestats tryptiques ou des phosphopeptides sont complétées par une analyse en spectrométrie de masse en tandem (SM/SM), qui permet un séquençage des peptides et la détermination du site de phosphorylation. Dans ce cadre, l'analyse finale en spectrométrie de masse n'est pas réalisée sur le lecteur de ProteinChip mais sur un spectromètre de masse de type QqTOF.

Une deuxième application est la mise au point ou le contrôle des conditions d'analyse et de séparation d'échantillons protéiques.¹²⁵ Une étude préliminaire à l'aide de ProteinChip avec des lavages séquentiels de force accrue, permet de déterminer les conditions optimales d'analyse et de séparation des échantillons, quelle que soit la chimie de surface présente sur les barrettes.

Une troisième application découlant de la première est la découverte de marqueurs biologiques.¹²⁷ Des études différentielles sur plusieurs échantillons sains ou pathologiques mettent en évidence les protéines affectées par la pathologie, soit du point de vue de leur niveau d'expression, soit du point de vue de leurs modifications post-traductionnelles. Notons qu'un avantage de cette technique SELDI est sa compatibilité avec une étude simultanée de multiples marqueurs biologiques et non d'un marqueur unique, ce qui accroît statistiquement, les chances de trouver « le bon » marqueur ou de dépister une maladie.

Ainsi, cette technique a-t-elle été fort utile pour la découverte de marqueurs de nombreuses pathologies, différentes formes de cancer, le HIV et des maladies cardio-vasculaires. Un exemple de la littérature reposant sur des barrettes ProteinChip a permis d'étudier deux lipoprotéines à haute densité apoA-I (MW 28 kDa) et apoA-II (17 kDa), leur niveau d'expression ainsi que leur glycosylation, dans différentes formes de diabète et des maladies cardio-vasculaires.¹²⁸ Deux types de barrettes ProteinChip ont été utilisés pour cette étude, des barrettes d'échanges d'ions, d'anions et de cations. La barrette la plus performante pour cette analyse s'est révélée être celle d'échange de cations, sur laquelle les deux protéines apoA-I et apoA-II se lient et peuvent être séparées. L'identification et la quantification de ces deux protéines sont alors envisageables. Il a

ainsi pu être mis en évidence qu'un fort taux de protéine apoA-I était la signature d'un diabète de type 2. Des exemples plus récents ont été présentés dernièrement en congrès (ASMS 2003, HUPO Meeting 2003) concernant l'étude de maladies respiratoires comme le SARS à l'aide de barrettes ProteinChips et la découverte de marqueurs de cette maladie.

De cette application de découverte de marqueurs biologiques découle celle d'étude diagnostique ; une fois les marqueurs mis en évidence, la même technique permet de dépister les maladies selon la même approche d'analyse des échantillons.

Une dernière application de ces dispositifs est l'étude d'interactions avec des protéines. A cette fin, des barrettes fonctionnalisées avec des brins d'oligonucléotides permettent d'étudier des protéines interagissant avec l'ADN au niveau cellulaire. Les barrettes faites maison par l'utilisateur peuvent présenter n'importe quelle protéine en surface et sont donc utiles pour l'identification de partenaires protéiques d'une protéine donnée. Enfin, ces barrettes préparées par l'expérimentateur trouvent une application de tests immunologiques.

4. Points forts et faiblesses

Ces systèmes ProteinChip ont maintenant percé le marché et sont reconnus pour leur robustesse et leur ingéniosité. La chimie de surface proposée par CIPHERGEN est bien diversifiée. Cette diversité peut encore être accrue avec la possibilité de fonctionnalisations personnalisées sur des barrettes dont la surface a été pré-activée et l'immobilisation de différents types de cations métalliques ou de protéines spécifiques. De plus, la technique SELDI présente des avantages, comparée à la technique standard de MALDI. Avec la technique SELDI, la matrice d'ionisation est amenée dans un second temps sur la surface. A l'inverse, en MALDI, les solutions d'analytes et de matrice sont déposées conjointement. Les dépôts sont plus homogènes qu'en MALDI et la quantification des échantillons est possible. Les dépôts et, par conséquent, les conditions d'analyse sont aussi plus reproductibles ce qui se répercute sur la qualité des analyses. La nouvelle génération de barrettes ProteinChip va même plus loin, puisque la matrice est incluse dans la fonctionnalisation de surface. Les phénomènes de désorption de matrice qui se traduisent par des massifs de pics de matrice dans la gamme des basses masses ($PM < 600-700$) sont, de ce fait, supprimés.

Une autre série d'avantages des systèmes ProteinChip est liée à la qualité et à la quantité de l'échantillon utilisé. Aucune purification préalable n'est requise avant le dépôt des échantillons sur les puces. L'échantillon est utilisé sous sa forme brute, ce qui rend possible l'analyse directe de

liquides biologiques (urine, plasma, sang, liquide cébrospinal) ou d'extraits bruts de tissus ou de cellules issus d'une étape de microdissection laser. La quantité initiale d'échantillon est, par conséquent, plus faible : 1 μL de cet échantillon brut est déposé. Pour une analyse standard, le même volume d'échantillon est utilisé mais il est issu de moult étapes de traitement ce qui représente une quantité d'origine d'environ 10 μL . Les auteurs disent que pour un gel bidimensionnel classique de protéomique différentielle, le matériel biologique minimum nécessaire correspond à 50000 cellules, contre 2000 cellules seulement pour une analyse équivalente sur ProteinChip.

Un autre avantage est enfin lié à la taille des systèmes et commun à tous ces systèmes miniaturisés : la rapidité des analyses. En une heure, une série entière d'échantillons, de la préparation des plaques à leur analyse sur le lecteur de ProteinChip, est étudiée.

Autant les avantages des ProteinChip sont aujourd'hui reconnus, autant les lacunes du système sont aussi bien identifiées. Ces lacunes proviennent principalement de l'étape finale d'analyse dite de lecture des plaques, qui n'est pas effectuée dans des conditions optimales. Cette étape repose sur une analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. L'appareil utilisé n'est pas un MALDI-TOF standard mais un appareil développé et commercialisé par la société Ciphergen, à cette fin de lecture de ProteinChip et qui présente des caractéristiques techniques déplorables. En premier lieu, la résolution des pics sur les spectres de masse est très mauvaise, de même que la précision de mesure de masse ; ceci n'est pas compatible avec une analyse biologique. En effet, pour discriminer entre deux composés de masses voisines et pour confronter des données expérimentales à celles présentes dans les banques protéomiques, une précision en masse de 10^{-3} est classiquement requise. Le constructeur et les notices aux utilisateurs insistent bien sur la nécessité de calibrer l'appareil de façon très attentionnée avant chaque analyse, quitte à rajouter des composés standard en sus lors des analyses, afin d'améliorer et d'utiliser au mieux les capacités de l'analyseur.

Ces déficiences au niveau de l'analyse font du système ProteinChip de Ciphergen un outil non approprié pour des études en protéomique, domaine où la quête à la précision et à la résolution de l'analyse ne s'arrête jamais. Le système pallie par contre le manque en sensibilité grâce au fractionnement et à la réduction de complexité des échantillons : le nombre de composés présents et à analyser simultanément est moindre et les phénomènes de suppression de signal pour les composés minoritaires.

Il en résulte que pour des études plus poussées et plus précises, une étape ultérieure d'analyse sur un autre spectromètre de masse, dont les caractéristiques sont meilleures, d'une part, et compatibles avec une démarche protéomique, d'autre part, est incontournable. Récemment, de nouvelles sources adaptées à un spectromètre de masse de type QqTOF, appareil qui permet de faire du séquençage de peptides, et aux barrettes Ciphergen sont apparues sur le marché. La préparation des échantillons sur des barrettes ProteinChip peut ainsi être intégrée dans un protocole protéomique standard, avec la caractérisation et l'identification des protéines d'intérêt.

Ces avantages apportés par le système Ciphergen, comparé à d'autres techniques plus conventionnelles, les performances de ce système et ses lacunes expliquent pourquoi à l'heure actuelle, la technique ProteinChip est particulièrement utilisée par une communauté de médecins et de cliniciens qui privilégient la simplicité d'utilisation et de mise en œuvre de la technique au détriment de ses capacités et de sa qualité. La technique Ciphergen semble, en plus, appropriée à des applications de diagnostic médical et de découverte de marqueurs biologiques, puisqu'elle permet une analyse différentielle rapide d'échantillons biologiques avec la mise en évidence des espèces modifiées par une pathologie. Pour le domaine de la recherche, la technique Ciphergen aide l'expérimentateur à la détermination de conditions de purification par exemple : elle reste uniquement complémentaire à d'autres techniques conventionnelles.

C. Dispositifs LabChip d'Agilent/Caliper

Les puces microfluidiques commercialisées par Agilent et fabriquées par Caliper sont destinées à une analyse de composés biochimiques ou de cellules (Figure 21). Les premiers, ARN, ADN et ADN complémentaire ou protéine, sont séparés par électrophorèse sur matrice de gel,^{107,119} les seconds selon un principe de cytométrie de flux de base. Les puces sont opérées à l'aide d'un robot, le 2100 BioAnalyzer (Figure 22), qui contrôle et dirige le déroulement des tests et sert à la lecture des puces en fin d'analyse. Pour les applications biochimiques, le rôle du système est de contrôler la pureté des échantillons avant leur utilisation. Par exemple, avant de préparer des *arrays*, la pureté des échantillons d'oligonucléotides à immobiliser sur l'*array* doit être vérifiée. Les solutions issues de réaction d'amplification en chaîne à l'aide de la polymérase doivent être analysées afin de valider l'absence d'impuretés dues à la réaction. Pour les applications cellulaires, le système permet de contrôler la viabilité des cellules contenues dans un échantillon et/ou de vérifier une étape de manipulation des cellules préalable, comme l'introduction d'une protéine ou la transfection d'un gène, qui est ensuite exprimé par la cellule.

Chapitre 1: « Généralités »

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM



Figure 21 : Puces LabChip développées conjointement par les sociétés Caliper et Agilent Technologies pour des analyses d'ADN (bleu), ARN (vert), de protéines (mauve) et de cellules (jaune).

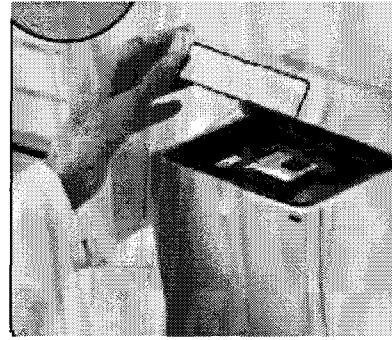


Figure 22 : Robot destiné à la manipulation des puces LabChip et à l'analyse sur ces puces, le 2100 Bioanalyzer.

1. Système et fabrication

La puce Caliper est en verre soda-lime. Elle est constituée de deux substrats de verre, l'un servant de socle et l'autre servant de couvercle au système. Dans le premier sont usinés les canaux, et dans le deuxième sont creusés les trous d'accès pour l'introduction des réactifs et échantillons. Les canaux sont fabriqués selon une voie standard de photolithographie et de gravure chimique du verre ;¹⁰⁷ leurs dimensions dépendent du type de puces et donc de son application. Pour les applications biochimiques, ces canaux sont de 36 μm de largeur contre 13 μm de profondeur, alors que pour les applications cellulaires, les canaux sont plus larges, de largeur égale à 70 μm pour une profondeur équivalente. La Figure 23 représente le schéma d'une puce Caliper et montre une photo d'une de ces puces sans son emballage plastique.

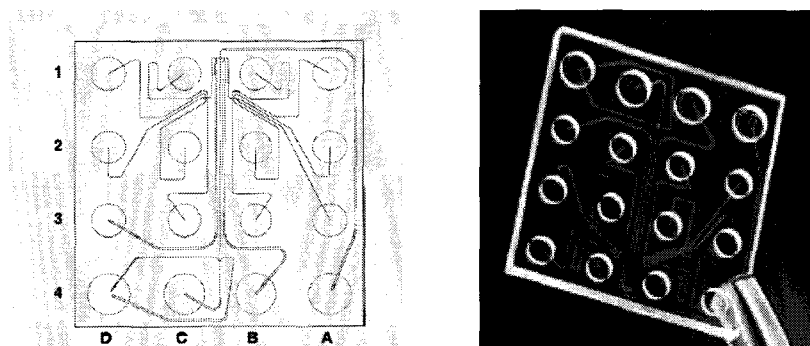


Figure 23 : Puce en verre constituant la partie microfluidique du dispositif LabChip. A gauche : schéma de la puce et des réseaux microfluidiques, à droite : photographie de la puce en verre.

Une fois fermé et placé dans sa cartouche d'emballage, le système est prêt à l'emploi.

Pour les applications biochimiques, le canal de séparation est rempli de la matrice gel servant de phase de séparation électrophoretique. La composition de cette matrice gel à base d'acrylamide varie selon la nature des composés à analyser et à séparer ; en particulier, le monomère et le degré de réticulation du gel changent. Le déplacement des liquides est contrôlé par l'application de tensions. Le système d'analyse de cellules est, lui, opéré sous pression hydrodynamique à l'aide d'une pompe péristaltique. Une même puce sert à plusieurs analyses indépendantes, réalisées successivement puisque la puce comprend un unique canal de séparation avec une unique zone de détection en sortie de canal. Les puces à oligonucléotides présentent 12 systèmes d'analyse indépendants, celles à protéines 10, contre 6 seulement pour les cellules. Le nombre de puits d'injection est constant. Si certains d'entre eux sont utilisés pour l'injection de tampon de dilution, par exemple, le nombre de puits restant pour l'injection d'échantillons diminue.

2. Protocole d'analyse

L'analyse et l'opération des puces sont effectuées sur un robot dédié, le 2100 BioAnalyzer, qui contrôle le fonctionnement du système, règle les paramètres expérimentaux, comme la température, prend en charge la séparation et la détection en sortie de système et traite les résultats pour les éditer soit sous forme d'électrophérogramme, soit sous forme de pseudo-gel unidimensionnel.

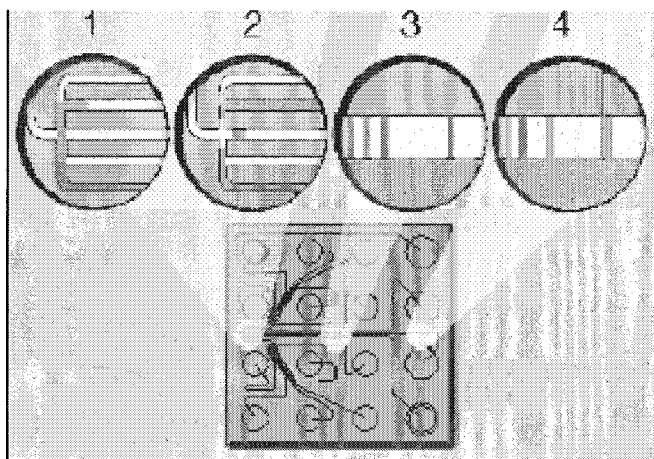


Figure 24 : Principe de fonctionnement de l'analyse sur LabChip : (1) l'échantillon est injecté sur la puce, (2) une petite quantité de l'échantillon est injectée dans le canal de séparation suite à un changement dans l'application des tensions, (3) la séparation a lieu dans le canal principal de la puce et (4) les composés séparés sont détectés en sortie de puce par fluorescence.

La puce est préparée, au préalable, de façon entièrement manuelle, avec l'injection de la matrice de gel et de l'échantillon, à l'aide d'une micropipette graduée. Ce dernier est dilué dans un tampon

adéquat contenant le marqueur de fluorescence avant d'être injecté. La dilution et la quantité injectée dépendent du type de l'analyse. Pour les oligonucléotides, la dilution est au $1/5^{\text{ème}}$ et $5 \mu\text{L}$ sont injectés sur la puce. Pour les protéines, $4 \mu\text{L}$ d'échantillon sont dilués dans $10 \mu\text{L}$ de tampon SDS. Pour les cellules, $10 \mu\text{L}$ d'échantillon sont nécessaires, ce qui représente environ 20000 cellules. Notons que pour des analyses de cytométrie de flux classiques, la quantité de cellules minimale nécessaire est bien plus élevée. La cartouche contenant la puce est alors insérée dans le robot 2100 Bioanalyzer et l'analyse est contrôlée par l'intermédiaire du robot et d'un logiciel par l'expérimentateur.

Lors de l'injection de l'échantillon, la quantité introduite est finement contrôlée. En effet, un échantillon « trop long » ne sera pas bien séparé sur une puce aussi courte ; le canal de séparation devra être plus grand. Ceci met en évidence une des faiblesses de ce système ; la quantité d'échantillon chargée sur la puce est largement supérieure à celle réellement utilisée pour l'analyse. Le reste de l'échantillon est gâché et non récupéré. La longueur injectée est contrôlée par l'application de tensions adéquates sur le canal de séparation, l'échantillon étant d'abord injecté et déplacé selon une direction perpendiculaire (voir Figure 24, étape 1). L'échantillon est alors poussé dans le canal de séparation par du tampon de séparation (Figure 24, étapes 2 et 3). La détection est effectuée en sortie de canal de séparation par épi-fluorescence, le détecteur étant intégré dans le système 2100 BioAnalyzer (Figure 24, étape 4).

La fluorescence est introduite dans la solution à analyser de différentes façons. Pour les protéines, le marqueur de fluorescence utilisé a une affinité pour les micelles de SDS. Les protéines étant situées au cœur de micelles de SDS ou étant liées à ce composé, elles deviennent fluorescentes et détectables.¹⁰⁷ Notons que pour diminuer le bruit de fond généré par des micelles de SDS non liées à des protéines, la concentration en SDS du tampon de séparation est abaissée au-dessous de la concentration micellaire critique en fin de séparation et avant l'étape de détection. Ce marqueur est non spécifique des protéines, ce qui diminue la sensibilité de la méthode, comparée à une séparation sur gel en conditions usuelles. En particulier, le premier pic lors de la séparation correspond à une micelle fluorescente sans protéine. Ce pic sert de référence pour la séparation. Pour les échantillons de type oligonucléotides, la fluorescence est induite par un composé intercalant des oligonucléotides. Ce composé est également introduit dans le tampon de séparation et la matrice gel. Par contre, ici, le marqueur de fluorescence est spécifique de l'espèce analysée, ADN simple brin, ADN double brin ou ARN, ce qui augmente la sensibilité de l'analyse et la rend bien supérieure à celle envisageable avec une technique classique de séparation sur une

bande de gel. Pour les cellules enfin, le marquage est double. Un premier marqueur fluorescent sert à vérifier la viabilité des cellules. Ce marqueur peut être du BET, introduit dans le noyau de la cellule. L'autre marqueur de fluorescence sert à détecter les cellules possédant une protéine d'intérêt ; il est donc couplé à un anticorps spécifique de cette protéine d'intérêt. Le système détecte donc, d'une part, les cellules viables, et d'autre part, les cellules qui possèdent une protéine et, par conséquent, les cellules qui ont une double fluorescence (viabilité + protéine d'intérêt). Le 2100 BioAnalyzer génère alors un graphe compilant les résultats de l'analyse, un électrophérogramme standard (Figure 25), comme ceux obtenus lors d'une séparation par électrophorèse ou sous forme de bande de gel unidimensionnel d'électrophorèse (Figure 26).

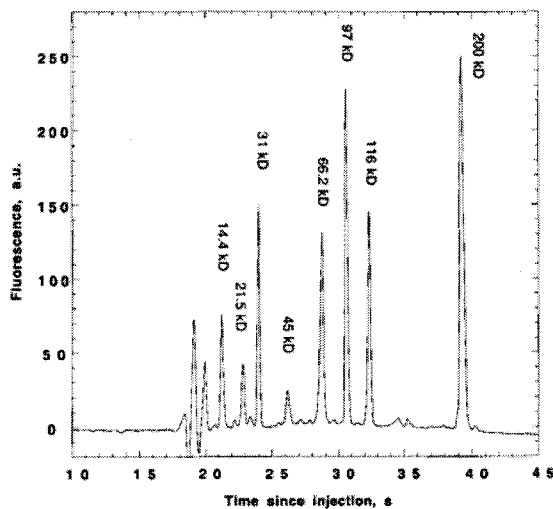


Figure 25 : Séparation d'une échelle de poids moléculaire de protéines sur un dispositif LabChip et présentée sous forme d'électrophérogramme.

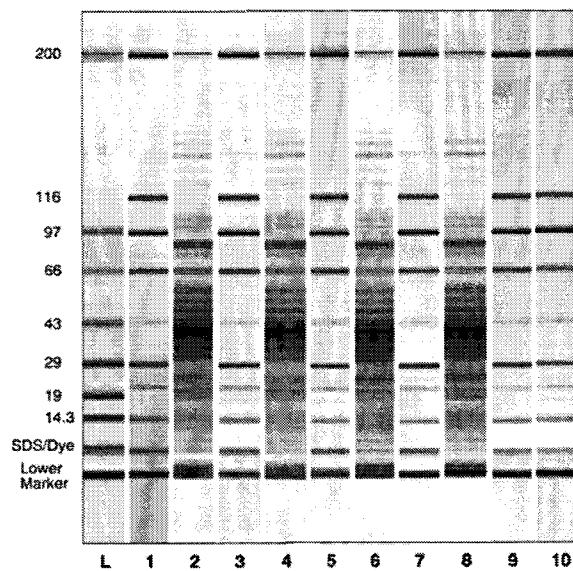


Figure 26 : Séparation, sur une puce LabChip, de 10 échantillons protéiques et d'une échelle de poids moléculaires ; Les lignes 1, 3, 5, 7, 9, 10 correspondent à l'échelle de poids moléculaire et les lignes 2, 4, 6, 8 à un lysat de *E. Coli*. Les séparations sont présentées sous forme de gel unidimensionnel.

L'analyse dure environ 30 minutes pour une puce complète, soit 6 à 12 échantillons suivant l'application. Elle comprend les analyses vraies des composés, les étapes de séparation/détection, mais aussi, les étapes de conditionnement du système avec le réglage du laser par exemple, de calibration et celles de lavage entre deux analyses. Une séparation ne dure, en effet, que 90 s.

Les systèmes ont été éprouvés, à la fois sur des échantillons standard, des échelles de poids moléculaire, et des « vrais » échantillons, comme des lysats cellulaires. Les puces dédiées aux oligonucléotides sont capables de distinguer des plasmides intacts, des plasmides ayant subi une

coupure simple brin et ceux ayant subi une coupure double brin, par exemple. La sensibilité de ces systèmes est aussi très bonne : de 0,5 ng/ μ L pour les ADNs, contre 200 pg/ μ L pour les ARNs. Elle est environ 50 fois meilleure qu'un système conventionnel. Les performances de puces spécifiques des protéines sont moins bonnes, la sensibilité est dans une gamme 20-2000 ng/ μ L et est bien inférieure à celle obtenue sur une bande de gel conventionnelle. La gamme de masse est celle de l'échantillon étalon de Agilent, elle va de 5 à 50 kDa.

3. Avantages et limitations

Un avantage majeur de ce système est la rapidité et la précision des analyses. En effet, les dimensions des systèmes d'une part, et les valeurs des tensions autorisées sur un microsystème d'autre part, permettent d'accélérer les analyses, comparé à des systèmes plus conventionnels de séparation sur des bandes de gel ou d'électrophorèse capillaire sur gel. Ainsi, une puce qui comprend plusieurs systèmes d'analyse indépendants, est-elle opérée en 30 min sur le robot 2100 BioAnalyzer. Le gain de temps provient aussi de la méthode de marquage des échantillons, qui est intégrée au système ; la dilution de l'échantillon séparé, pour les protéines, dure 0,3 s environ, soit le temps nécessaire pour parcourir la zone de dilution. Les bandes de gel conventionnelles subissent cette étape de marquage, une fois la séparation terminée et, dans ce cas, cette étape dure jusqu'à une heure. La reproductibilité des analyses est, elle aussi, plus grande qu'avec des systèmes conventionnels. Cette reproductibilité s'explique par la reproductibilité des systèmes et des conditions opératoires, par le contexte microfluidique et enfin, par le fait que les analyses sont plus automatisées. Cette automatisation des analyses supprime toute intervention manuelle humaine, lors de la séparation, qui est considérée comme un facteur aléatoire en analyse.

Notons cependant que l'analyse sur les LabChips n'est pas entièrement automatisée : la préparation des puces et l'injection des échantillons, en particulier, sont encore manuelles. En effet, les volumes mis en jeu, de l'ordre du microlitre sont trop petits pour une manipulation manuelle à l'aide de micropipettes, ce qui induit des variations dans les volumes injectés et ce qui limite, par conséquent, les applications de quantification des analyses. Une manipulation robotisée permettrait de gagner du temps et d'optimiser la reproductibilité des analyses.

Une autre limitation que nous avons déjà citée, est la différence entre la quantité d'échantillon introduite sur la puce (4 μ L) et celle véritablement injectée dans le canal de séparation (25 pL) : une partie de l'échantillon est gaspillée.

Enfin, autant les systèmes dédiés à des analyses d'oligonucléotides (ADN, ARN) sont optimisés, autant ceux destinés aux échantillons de protéines requièrent encore des améliorations. La limite de détection pour ces composés est uniquement de 20 à 2000 ng/ μ L, ce qui rend les LabChip beaucoup moins performants que des systèmes d'analyse conventionnels comme les bandes de gel. Cette faiblesse est due à la technique de marquage et de détection fluorescente qui n'est pas aussi spécifique que les marquages des protéines à l'Argent, au bleu de Coomassie ou au Sypro ou ceux des oligonucléotides à l'aide d'agents intercalants.

4. Futurs axes de recherche et de développement

Les développements futurs d'Agilent concernant ce système sont multiples. Un premier objectif est d'augmenter le débit d'analyse en la parallélisant. Une puce comprendra ainsi, prochainement, plusieurs canaux de séparation/détection. Les étapes de lavage de la zone de séparation entre deux échantillons et éventuellement de re-conditionnement de la colonne seront supprimées. D'autre part, les analyses pourront être menées simultanément et non plus successivement, comme c'est le cas à l'heure actuelle. Un gain en temps est aussi à espérer d'une automatisation plus forte de l'analyse. En effet, pour l'instant, la préparation des puces est entièrement manuelle. Dans le futur, elle sera automatisée et la jonction entre les plaques 96 ou 384 puits et la puce LabChip, les étapes de dilution de l'échantillon et de son injection finale dans la puces LabChip seront effectuées à l'aide d'une interface robotisée. Un autre axe de développement vise à améliorer les conditions de détection et la sensibilité des analyses de protéines sur puce, avec l'utilisation d'un marqueur de fluorescence plus spécifique. Le troisième point, enfin, concerne le volume d'échantillon restant qui est jeté. Ce volume non injecté dans le canal de séparation sera, à l'avenir, récupéré pour un autre type d'analyse, avec une étape de détection finale par spectrométrie de masse, par exemple.

D. CD microfluidique de Gyros AB

1. Description du système

Le dernier système microfluidique dédié à une analyse par spectrométrie de masse que nous présenterons dans cette partie est commercialisé par la petite société suédoise Gyros AB. Ce système microfluidique, qui se présente sous la forme d'un CD (Figure 27), est dédié à la préparation d'échantillons peptidiques avant leur analyse par spectrométrie de masse avec une ionisation MALDI et, en particulier, à leur dessalage.¹²⁹

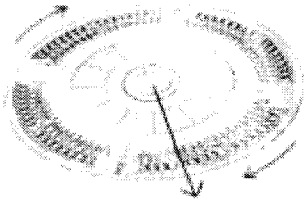


Figure 27 : Photographie d'un CD d'analyse Gyros, en polycarbonate, dont le mode d'actuation est basé sur la force centrifuge.

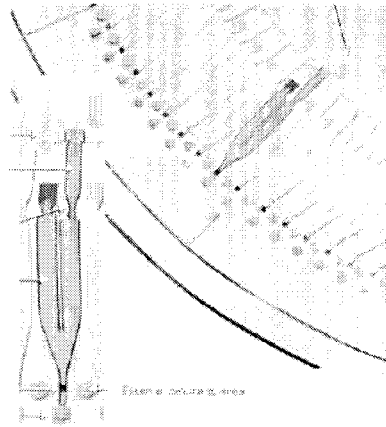


Figure 28 : Agrandissement d'une partie du CD et d'un système d'analyse usiné dans le matériau avec, de bas en haut, la zone d'introduction de l'échantillon, la zone de contrôle du volume injecté sur la colonne, la colonne et la zone de cible MALDI.

2. Mode de déplacement des liquides

La géométrie du système sous forme de CD a été choisie pour un déplacement des liquides exploitant la force centrifuge. Le CD comprend des microstructures internes usinées (Figure 28) dans le matériau et formant plusieurs réseaux microfluidiques radiaux, comme le montre la photo ci-dessus. Une simple mise en rotation du système conduit à un déplacement des liquides du centre du CD vers sa périphérie. Ce système de type CD apparaît fort ingénieux car il résout les problèmes de déplacement des liquides habituels dans les systèmes microfluidiques et de conception de micropompes. Ici, le système est simple et élégant. Son fonctionnement est indépendant de la composition et des propriétés des solutions comme leur force ionique, leur viscosité...

Le dispositif comprend 96 dispositifs d'analyse indépendants, placés tout autour d'un CD de 12 cm de diamètre : la mise en parallèle des dispositifs sur ce format CD est aisée. Le fonctionnement du CD est simple aussi : les systèmes travaillent simultanément avec la mise en rotation du CD. Aucune précaution ne doit être prise pour que tous les systèmes soient actifs ou non.

3. Matériau et Fabrication du système

De plus, le procédé de fabrication des systèmes est simple et peu onéreux. Il supprime les problèmes et les coûts associés à l'utilisation et à la manufacture de matériaux comme le verre et le silicium. Le matériau, le polycarbonate, appartenant à la famille des plastiques, est, de même,

moins cher. La fabrication des CDs repose sur un procédé d'estampage d'une résine de type polycarbonate qui est injectée sous forme de pré-résine sur une matrice. Ce procédé est compatible avec une production de masse de systèmes à partir d'un moule unique. Le coût de revient par CD est donc d'autant plus faible que le nombre de dispositifs est élevé. Les autres étapes de la fabrication sont, bien entendu, le capotage du système, les traitements adéquats des surfaces et l'introduction de la phase stationnaire utilisée pour la préparation des échantillons. Il s'agit d'une phase classique constituée de billes poreuses fonctionnalisées C18.

Le fonctionnement du système repose sur un traitement adéquat des surfaces et des parois internes des microcanaux. La plupart des matériaux plastiques sont hydrophobes ; ils ne sont pas adaptés à un remplissage par capillarité des réseaux microfluidiques. De ce fait, la surface interne du système est d'abord rendue hydrophile par une étape de traitement de plasma oxygène. Des petites zones hydrophobes sont néanmoins préservées localement ; elles agissent comme des valves passives. Si la vitesse de rotation du CD n'est pas trop élevée, ces zones hydrophobes stoppent la progression du liquide dans les canaux. Par contre, si la vitesse de rotation est accrue, le liquide dépasse les zones hydrophobes. Ce système de valves passives permet de contrôler de façon très précise, à l'échelle du nanolitre, les volumes introduits dans le système d'analyse.

4. Fonctionnement du système

Les CDs microfluidiques sont mis en œuvre sur une plate-forme robotisée dédiée, la station de travail Gyros (Gyros Workstation), qui assure la connexion entre des plaques standard 96 puits utilisées en biologie/biochimie et le CD d'analyse.

Ce système est destiné à une préparation intégrée et automatisée des échantillons peptidiques avant leur analyse par spectrométrie de masse avec une ionisation MALDI. Les étapes de préparation des échantillons sont (i) leur dessalage et leur concentration réalisés sur une phase inverse fonctionnalisée C18 et (ii) leur mélange et leur co-cristallisation avec une solution de matrice. Le système de dessalage consiste en une colonne de 10 nL de volume garnie de billes poreuses conventionnelles de 15 μm . Le volume des échantillons traités varie entre 1 et plusieurs μL . La zone de cible MALDI pour chacun des 96 dispositifs est de $200 \times 400 \mu\text{m}$. L'analyse totale d'un CD est estimée à une durée de 40 minutes.

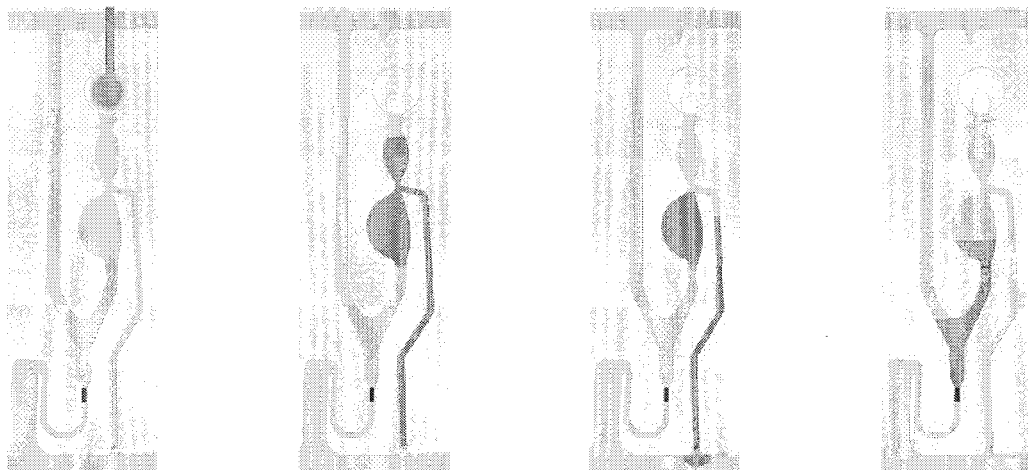


Figure 29 : Fonctionnement d'un système microfluidique Gyros AB ; (a) remplissage du réseau fluïdique par action capillaire, (b) rotation lente du CD : évacuation de l'excès de liquide, (c) introduction d'un volume de 60 nL dans la chambre d'analyse, (d) passage de la solution à travers la colonne à vitesse croissante de la rotation.

L'analyse commence avec le dépôt par le bras du robot de la solution à analyser, qui a été prélevée sur une plaque 96 puits, par une micropipette : les différents systèmes d'analyse du CD sont chargés en échantillons. Le CD subit une première rotation afin de charger une quantité précise d'échantillon dans les systèmes d'analyse ; cette première étape est réalisée à basse vitesse de rotation de façon à stopper le liquide au niveau des valves passives. Une deuxième mise en rotation du système charge alors la solution à dessaler sur la colonne chromatographique. La colonne est alors lavée en milieu acide pour éliminer les impuretés et les espèces liées de façon non spécifique sur la phase. L'éluïtion est effectuée avec une solution plus polaire, à base d'acétonitrile et comprenant la solution de matrice (acide α -cyanoxydroxycinnamique, CHCA).

Ce système a été éprouvé sur des échantillons biologiques séparés au préalable sur des gels mono- ou bi-dimensionnels.¹²⁰ La sensibilité d'analyse indiquée par la société Gyros AB est inférieure à la femtomole et proche de l'attomole. Nos tests au laboratoire de ces CDs microfluidiques à l'aide de la plate-forme associée ne nous ont pas convaincus. Il ressort de ces tests que les résultats en dessalage exhibés par ces CDs sont fort médiocres et même inférieurs à ceux obtenus avec un procédé d'analyse conventionnel et non automatisé, basé sur des cônes de dessalage *ZipTip* (Millipore) et un dépôt manuel de l'échantillon dessalé et de la matrice sur une cible MALDI.

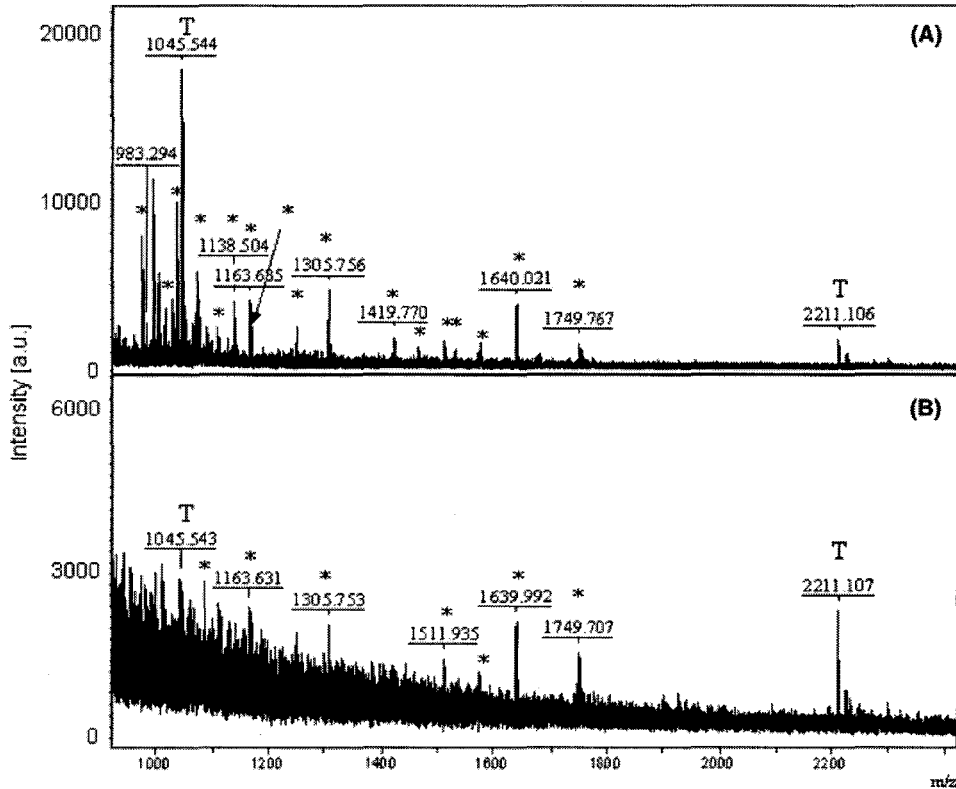


Figure 30 : Spectres de masse MALDI-TOF d'un extrait de digestion à la trypspine de la BSA (environ 12 fmol/ μ L placé sur le gel en début d'analyse) effectuée sur un gel ; en haut : préparation de l'échantillon sur le CD Gyros conduisant à l'identification de 17 peptides ; en bas : analyse sur une cible MALDI conventionnelle (matrice CHCA)

5. Faiblesses et points forts

Nous retiendrons donc uniquement l'élégance du format de type CD, l'approche automatisée et la reproductibilité de l'analyse, la voie de fabrication du système et sa fonctionnalisation. L'analyse nécessite moult optimisations pour que le système soit efficace et compétitif avec certaines alternatives bien connues et déjà adoptées par les utilisateurs finaux.

6. Futurs développements

L'étape de développement en cours sur ces dispositifs est la mise au point d'un système de chromatographie d'affinité. Les billes poreuses qui forment la phase stationnaire seront fonctionnalisées avec de la streptavidine en vue du piégeage sélectif de peptides couplés à de la biotine, la détection étant assurée ici par une technique de fluorescence. Un autre axe de développement actuel concerne la purification sélective de peptides phosphorylés à l'aide d'une phase stationnaire de type IMAC.

E. Système dédié à la manipulation et à l'analyse sur cellule unique

Une autre famille de microsystèmes est destinée à des études sur des cellules. Différentes applications se distinguent, alors :

- (i) des applications de culture cellulaire sur puce avec des études comportementales sur les cellules et leur réaction à l'injection de drogues ou à la transfection de nouveaux gènes,^{28,115}
- (ii) des systèmes de tri cellulaire, selon la taille et la forme des cellules ou visant à vérifier leur viabilité,
- (iii) des études sur des neurones avec l'immobilisation de cellules nerveuses sur des microsystèmes à base de silicium en vue de la compréhension des mécanismes sous-tendant la communication neuronale et le fonctionnement du cerveau.

Nous nous centrerons ici sur cette dernière application de « Neuronchip » dont le développement et le fonctionnement s'inspirent des techniques de patch-clamp. Ces dernières consistent à isoler une cellule nerveuse à l'aide d'une micropipette, à étudier son comportement et son activité électrique, en réponse à des stimuli extérieurs, électriques ou chimiques, comme une application de potentiels d'excitation, l'injection de drogues et à regarder dans quelle mesure ces stimuli affectent l'activité électrique de la cellule. Une autre approche est de s'intéresser à l'activité chimique de la cellule, à l'aide de techniques d'électrochimie, qui permettent l'identification et la quantification des neurotransmetteurs libérés par le neurone.¹³⁰

Seulement, ces manipulations sont effectuées sur des cellules uniques, isolées de leur contexte, un morceau de cerveau, voire même sur un canal ionique unique de cette cellule nerveuse. De plus, les études électrochimiques ou de patch-clamp sont dissociées les unes des autres et non réalisées conjointement. Une première amélioration serait de transposer ce type d'études à une famille de cellules nerveuses, comme un réseau de neurones et de caractériser simultanément l'activité de toutes ces cellules, connectées entre elles par l'intermédiaire de synapses. Une autre amélioration serait de combiner les études électrochimiques et de patch-clamp en vue d'une étude conjointe des activités chimique et électrique des cellules nerveuses.

Toute activité humaine est régie par le cerveau, l'activité des neurones et la communication entre eux ; ils sont au nombre de 10^{11} dans le cerveau humain et chaque neurone peut être connecté à plusieurs milliers d'autres neurones par l'intermédiaire de synapses, servant à leur communication. Jusqu'alors, les études de cellules nerveuses sont limitées par la non accessibilité de ces cellules

pour des études *in vivo* et *in situ*, dans leurs conditions de fonctionnement. Les études en solution, dites de patch-clamp, par ailleurs, se limitent à une seule cellule et ne renseignent pas sur les communications entre neurones. Elles ne permettent donc pas d'appréhender de façon complète le fonctionnement de notre cerveau et le comportement des individus. Quant aux études de modélisation, elles sont fort incomplètes du fait du manque de données expérimentales.

En revanche, une étude sur un microsystème, servant de support à l'immobilisation d'une série de neurones permet, tout d'abord, une étude double, à la fois électrique et électrochimique et ensuite, une étude plus globale sur une population de cellules nerveuses. Les neurones sont examinés soit de façon individuelle et isolée, soit de façon plus globale avec une étude de la communication s'établissant entre eux, spontanément ou sous l'action d'un quelconque stimulus. Ainsi, ces microsystèmes rendent-ils possible l'élucidation des mécanismes qui sous-tendent l'activité neuronale et le fonctionnement du cerveau et la modélisation de ce fonctionnement.

Le but fort ambitieux de ces études de neurones sur puce ou de neuronchip est (i) d'immobiliser une population de cellules nerveuses sur un microsystème, (ii) de les faire communiquer entre elles par l'intermédiaire de synapses aussi bien électriques que chimiques, (iii) de les exciter à l'aide de stimuli électriques (créneaux ou pics de tension) ou chimiques (injection de drogues dans le milieu de culture ou dans la cellule), (iv) d'enregistrer l'activité électrique des différents représentants de cette population neuronale. Dans un premier temps, certains éléments du système sont encore hors de la puce et font appel aux techniques classiques de patch clamp, puis, au fur et à mesure des développements, le degré d'intégration augmente.

Les développements de neuronchips s'effectuent principalement sur des cellules nerveuses d'invertébrés (calamar, sangsue, escargot). Ceci s'explique d'une part, par la taille de ces cellules d'environ 60 μm contre 10 μm pour des cellules humaines équivalentes et d'autre part, par la petite taille du système nerveux chez ces espèces : un petit nombre de cellules suffit pour reproduire un système nerveux complet.

Quelques groupes de par le monde se sont intéressés à cette problématique d'étude de populations de neurones à l'aide de microsystèmes. L'équipe de Fromherz, en Allemagne est particulièrement foisonnante sur ce sujet, avec moult publications à ce jour. Ils ont été les pionniers pour l'immobilisation de neurones sur un microsystème en silicium en vue d'une étude de l'activité électrique de ces derniers en utilisant des transistors à effet de champ.

La première étape de leurs travaux a consisté à immobiliser une cellule nerveuse, une cellule de Retzius de sangsue, sur une plaque de silicium, passivée par une couche d'oxyde thermique et couverte d'une monocouche de poly-lysine, au-dessus d'un transistor à effet de champ (Figure 31).¹³¹ De cette façon, ils ont pu reproduire une synapse artificielle, la zone post-synaptique correspondant au transistor servant à enregistrer l'activité électrique du neurone. Ce dernier est stimulé à l'aide de micropipettes de patch-clamp piquées dans la cellule, l'une servant à l'excitation du neurone et l'autre à l'enregistrement de l'activité intracellulaire du neurone. L'activité extracellulaire est, elle, étudiée à l'aide du transistor implanté sur la puce, sous le neurone. La réponse du neurone à une stimulation sous forme d'un créneau de tension est un potentiel d'action ou un train de potentiels d'action si l'excitation est sous forme d'une série de pics (Figure 32) ; l'activité extracellulaire du neurone est enregistrée à l'aide du transistor implanté sur la puce.

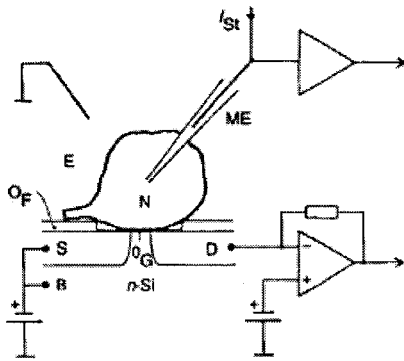


Figure 31: Schéma du dispositif d'enregistrement de l'activité neuronale sur une puce en Si, à l'aide d'un transistor à effet de champ (FET) réalisé par dopage local du Si. Une microélectrode piquée dans la cellule permet de mesurer l'activité électrique intracellulaire du neurone.

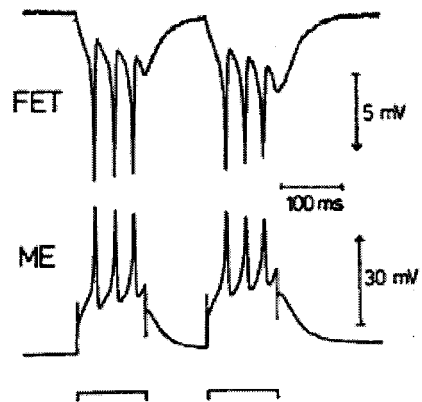


Figure 32: Exemple d'enregistrement: le neurone est soumis à un stimulus électrique (courbe du bas) enregistré à l'aide d'une microélectrode piquée dans la cellule. La courbe du haut représente son activité électrique, en réponse, enregistré à l'aide du FET. Le stimulus correspond à une série de pics de tension et la réponse à un train de potentiels d'action.

Une deuxième étape a été d'intégrer l'excitation de la cellule nerveuse, toujours une cellule de Retzius de sangsue, sur la puce en silicium, sous forme d'une boucle d'excitation passive (Figure 33).¹³² De cette façon, une boucle d'excitation et d'enregistrement de la réponse du neurone a-t-elle été obtenue. Par contre, ici, l'enregistrement de l'activité neuronale, aussi bien au niveau intra- que extracellulaire est effectué en dehors de la puce, à l'aide de micropipettes de patch-clamp, piquées dans la cellule (activité intracellulaire) ou placées à son voisinage (activité extracellulaire). Seule l'excitation est prise en charge par la puce. La zone d'excitation correspond à une zone

dopée p au bore sur une plaquette de silicium dopée n ; une couche superficielle d'oxyde de silicium est, de plus, placée dans un renforcement destiné à recevoir la cellule nerveuse (Figure 33).

Suivant la nature et l'amplitude du signal d'excitation, la réponse éventuelle de la cellule se présente sous forme d'un potentiel d'action ou d'un train de potentiels d'action (Figure 34).

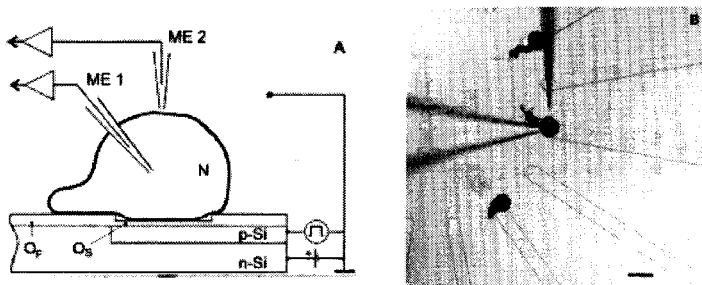


Figure 33 : Puce d'excitation de neurones.

A droite, schéma du dispositif avec la zone d'excitation (zone dopée p sur le wafer de si dopé n) et les deux microélectrodes de patch clamp. L'électrode ME1 mesure l'activité électrique intracellulaire du neurone et ME2 celle extracellulaire. *A gauche*, photographie d'un dispositif d'étude de neurones.

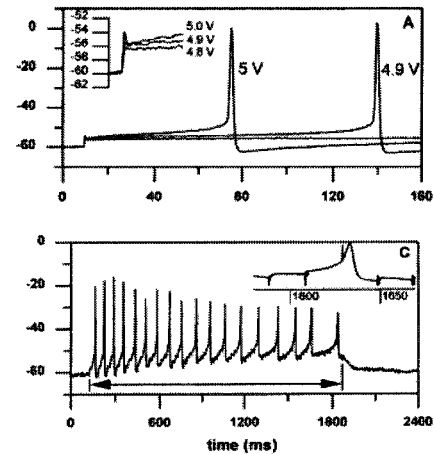


Figure 34 : Exemples d'activité électrique du neurone (enregistrée à l'aide de la microélectrode piquée dans la cellule) en réponse à un stimulus appliqué via la puce.

L'étape ultérieure est d'immobiliser plusieurs neurones qui convergent entre eux, sur une puce. A cette fin, il faut établir des synapses entre eux et les faire se rencontrer. Tout neurone en milieu de culture pousse : il déploie des neurites qui s'allongent progressivement. La croissance des neurites peut être contrôlée et guidée sur des surfaces traitées avec de la laminine, protéine spécifique de la matrice extracellulaire des neurones de sangues.^{133,134} Ainsi, pour établir des synapses artificielles sur une puce, faut-il faire se rencontrer deux neurones suite à leur croissance sur des surfaces couvertes de laminine. Au bout de 2 à 5 jours, des arborescences apparaissent sur les cellules neuronales immobilisées sur des surfaces traitées à la laminine.¹³⁵ Si cette protéine est fixée sous forme de lignes, la croissance du neurone a lieu uniquement selon ces lignes : la croissance du neurone est contrôlée. Lorsque deux neurones en croissance se rencontrent sur une des lignes de laminine, une synapse électrique est reproduite sur la puce en silicium.

La connexion entre deux neurones est maintenant possible, suite à l'établissement de synapses entre plusieurs cellules en culture sur la puce en silicium. L'étape suivante a alors logiquement consisté en la création et l'étude d'une synapse neurone-neurone sur une puce en silicium, plusieurs cellules neuronales étant immobilisées sur un même système.¹³⁶ Des neurones sont fixés sur une plaquette de silicium, au-dessus de zones d'excitation et d'enregistrement de l'activité électrique (Figure 35, en haut) ; ces cellules sont incubées dans un milieu de culture pendant plusieurs jours façon à ce que des connexions neurites/neurites se créent (Figure 35, en bas).

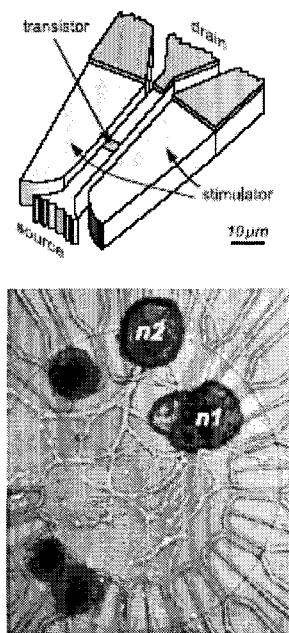


Figure 35: Dispositif d'étude de connexions neuronales

En haut: Schéma de la zone d'excitation (ailes de part et d'autre) et du transistor d'enregistrement d'activité électrique.

En bas: Photographie de la puce, présentant plusieurs zones associant excitation et transistor. Les neurones situés sur ces zones communiquent entre eux via des synapses établies au centre de la puce, lorsque deux neurites se rencontrent.

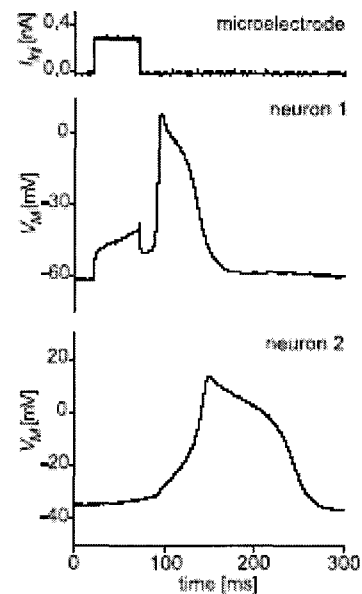


Figure 36: Exemple d'activité électrique de deux neurones. Le neurone 1 est soumis à une excitation (créneau de tension) (courbe supérieure), sa réponse est un potentiel d'action (courbe du milieu) qui stimule le neurone 2 via la synapse établie entre les deux. Le neurone 2 présente alors une activité électrique, sous forme d'un potentiel d'action, décalé dans le temps.

Une fois le système prêt, l'activité des deux neurones est étudiée conjointement. L'un des neurones est excité à l'aide d'un stimulus électrique ; les activités électriques intracellulaire et extracellulaire des deux neurones sont alors étudiées à l'aide de micropipettes de patch clamp et de transistors à effet de champ situés sous les neurones (Figure 36). A chaque signal de stimulation du neurone 1, correspond une activité électrique de ce neurone sous forme de

potentiels d'action ainsi qu'une réponse dite post-synaptique, sous forme d'un potentiel d'action chez le deuxième neurone, cette activité étant décalée dans le temps par rapport au signal d'excitation et à l'activité du premier neurone.

Une alternative a consisté à immobiliser les cellules neuronales au sein de zones matérialisées à l'aide d'une clôture formée de piquets en polyimide, canalisant les cellules sur des zones bien définies¹³⁷ (Figure 37). Les croissance neuronales d'échappent de ces enclos et se rencontrent dans la zone centrale de la puce (voir Figure 38). Ainsi, les communications entre deux neurones séparés de ~ 200 µm ont-elles été étudiées et enregistrées (Figure 39).

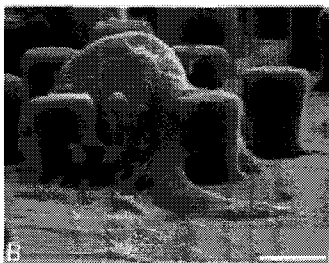


Figure 37 : Cellule nerveuse immobilisée au sein d'une clôture formée de piquets en polyimide. Notons la croissance des neurites (barre d'échelle = 20 µm).

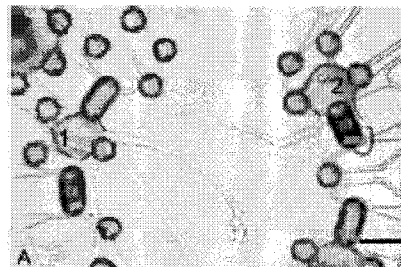


Figure 38 : Photographie du système avec les clôtures en polyimide en périphérie de la puce, où les cellules nerveuses sont immobilisées. Au centre de la puce se rencontrent les neurites (barre d'échelle = 50 µm).

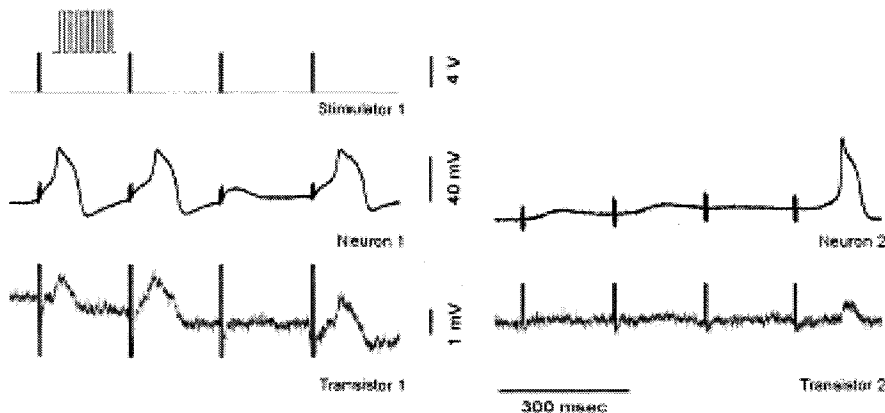


Figure 39 : Activité électrique des deux neurones connecté par une synapse : en haut à gauche, signal d'excitation du neurone 1 ; au centre, signal électrique intracellulaire à l'aide d'une microélectrode piquée dans la cellule ; en bas, activité électrique extracellulaire détectée à l'aide du transistor à effet de champ situé sous le neurone.

D'autre part, comme l'activité intracellulaire et celle extracellulaire du deuxième neurone présentent des signaux post-synaptiques sous forme de potentiels d'action, alors la

communication neuronale s'est bien établie via des synapses et non via la puce en silicium portant la population de cellules.

Une dernière progression, récente a été l'étude d'une synapse chimique entre deux neurones immobilisés sur une puce.¹³⁸ Les deux neurones, choisis pour former une synapse cholinergique, sont placés au voisinage l'un de l'autre de façon à pouvoir communiquer par voie chimique et établir une synapse soma-soma. L'un, le neurone pré-synaptique, est situé au-dessus d'une zone excitatrice et l'autre, le neurone post-synaptique, au-dessus d'un transistor à effet de champ. Lorsque le neurone pré-synaptique est excité, il émet un potentiel d'action et libère un neurotransmetteur, qui va alors exciter le neurone post-synaptique qui émet aussi un potentiel d'action.

Notons qu'une limitation majeure à ce type d'études concerne la taille des cellules étudiées. Seules les larges cellules nerveuses de plus de 60 μm de diamètre sont compatibles avec ces études sur puce ; des cellules de taille plus réduite, de 10 μm , sont trop petites pour couvrir une zone incluant un transistor et une boucle capacitive d'excitation. Les études sont donc menées sur des neurones et des cellules nerveuses d'invertébrés comme la sangsue, le calamar ou l'escargot. Un autre intérêt de ces espèces est qu'un petit nombre de cellules reproduit un système neuronal complet et en permet la compréhension, comme nous l'avons déjà signalé.

Une autre faiblesse de ces systèmes est la présence quasi incontournable de microélectrodes de patch-clamp piquées dans la cellule neuronale pour mesurer l'activité électrique intracellulaire ou encore l'utilisation de ces pipettes pour injecter dans la cellule des substances chimiques. Ces pointes visant à pénétrer la cellule n'ont pas encore été intégrées sur la puce et fabriquées à l'aide de techniques de microtechnologie classiques. Le système n'est donc pas totalement intégré.

Une voie d'immobilisation des cellules en vue de leur étude est l'introduction d'un traitement chimique sous forme d'une monocouche sur la surface de silicium.¹³⁹ Cette monocouche consiste, par exemple, en de la poly-lysine, véritable « colle » à cellule ou a pour terminaison le tripeptide RGD, connu pour avoir une forte affinité pour la matrice extracellulaire. L'utilisation d'un tel traitement de surface permet de faire de la culture localisée de cellules sur des zones dessinées sur la surface. La surface subit une double fonctionnalisation selon des motifs définis. La première fonctionnalisation résiste à l'adsorption des cellules (polyEG) alors que la deuxième présente une terminaison RGD, sur laquelle les cellules s'accrochent. Cette double fonctionnalisation est obtenue par la formation de deux monocouches de type SAMs.

III. Notre projet en microfluidique

Notre projet en microfluidique s'intègre dans la problématique évoquée jusqu'à maintenant, avec la conception et le développement de systèmes analytiques destinés aux domaines de la biochimie et de la protéomique. La technique « royale » d'analyse dans ce domaine étant la spectrométrie de masse, nous l'avons choisie comme mode de détection externe au microsystème. Deux modes d'ionisation sont privilégiés pour les analyses protéomiques, les modes d'ionisation dite douce et reposant soit sur une électronébulisation (ESI) de la solution, soit sur une ionisation et une désorption assistées par un laser (MALDI). Ainsi, deux objets sont-ils envisagés, l'un destiné à une analyse par spectrométrie de masse de type MALDI et l'autre à une analyse par spectrométrie de masse précédée d'une ionisation par électronébulisation (ESI).

Pour les deux objets, les mêmes fonctions sont visées, en premier abord, avec l'intégration des étapes de préparation des échantillons avant leur analyse en ligne par spectrométrie de masse. Néanmoins, la conception des objets des divers modules et leur mode de fonctionnement sont radicalement différents, afin que les deux systèmes soient adaptés aux techniques d'ionisation respectives. En effet, elles ne sont pas mises en œuvre de la même façon : la technique d'ionisation par électronébulisation est mise en œuvre sur un flux de liquide en mouvement alors que l'autre opère sur un échantillon sous forme solide et localisé.

Nous allons maintenant envisager la réalisation de ces deux objets dédiés à une analyse par spectrométrie de masse, en présentant les choix technologiques effectués pour les divers modules, et, en particulier, celui de déplacement des liquides qui conditionne la réalisation des autres modules, comme nous le verrons.

A. Dispositif ESI

L'ionisation par électronébulisation est réalisée sur une colonne de flux continu, ce qui impose un mode de déplacement des liquides sous la forme d'une colonne continue. Nous avons, par ailleurs, préféré un système de pompage intégré sur le système en vue de son fonctionnement de façon autonome, sans appareillage lourd à côté. Enfin, nous avons choisi un mode de pompage non électrocinétique, puisque ce dernier implique l'ajout de charges en solution qui ne sont pas compatibles avec une ionisation par électronébulisation. De plus, la jonction entre la tension appliquée pour l'électro-osmose et celle d'ionisation n'est pas triviale à mettre en place, car ces

deux tensions ne sont pas d'ordres de grandeur comparables : la tension d'ionisation est d'environ 1 kV contre quelques dizaines de volts pour le pompage électrocinétique.

En conclusion, le système dédié à une analyse par ESI-SM comprend des canaux dans lesquels le liquide circule sous forme de colonnes continues et le déplacement est assuré par un système de pompage intégré au système.

Dans un premier temps, nous avons opté pour une filière tout silicium pour la réalisation de ce dispositif. Les premiers microsystèmes consistent en une dizaine de microcanaux parallèles (Figure 40), de 10 μm de largeur et de profondeur, qui sont usinés par gravure chimique sur une plaquette de 2 pouces de silicium (Figure 41). Les largeurs et profondeurs des canaux sont plus grandes à l'entrée et à la sortie du microsystème et égales à 100 μm pour faciliter l'insertion de capillaires en vue de la connexion du microsystème avec le monde extérieur. Ces canaux sont fermés par un couvercle en Pyrex, scellé sur le socle en silicium par collage anodique.⁴² Ces premiers systèmes, dont les photographies sont présentées ci-dessous, ont été testés en couplage avec l'ESI-SM pour un test d'adsorption de peptides standard.

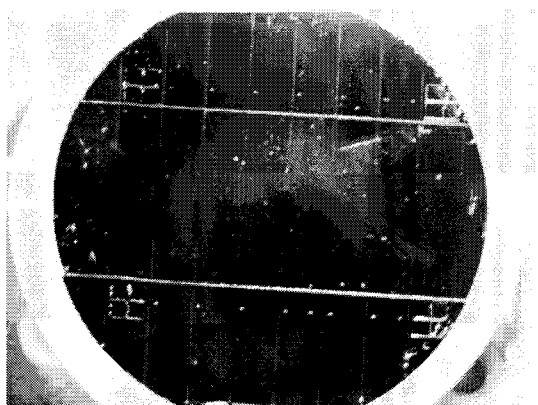


Figure 40 : Photographie globale d'un microsystème « tout silicium » comprenant 9 microcanaux identiques en parallèle et fermés par un couvercle en Pyrex.

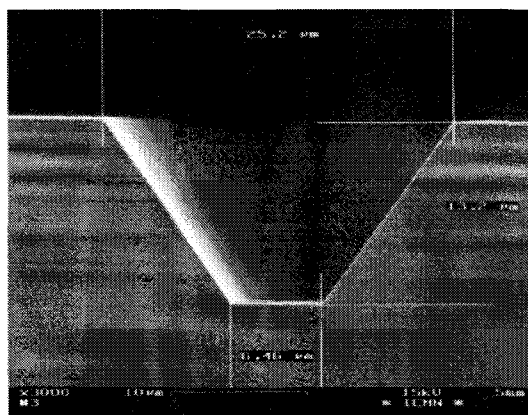


Figure 41 : Photographie de microscopie électronique d'un microcanal usiné par gravure chimique du silicium et ayant une largeur et une profondeur de 10 μm .

Cette filière de fabrication tout silicium a ensuite été abandonnée au profit d'une filière multi-matériaux à base de silicium, de Pyrex et de résine photolithographique SU-8. Les canaux sont réalisés dans cette dernière. Une première couche de résine homogène est déposée sur le support en silicium ; dans une deuxième couche de la résine sont réalisés les canaux par une technique

classique de photolithographie. Les canaux sont enfin fermés par un couvercle en Pyrex qui est collé sur la résine SU-8.

Le point-clé de cette voie de fabrication s'est révélé être le collage du couvercle en Pyrex sur le socle en résine SU-8 ; le système doit rester étanche et résister à l'application de pressions élevées (jusqu'à 100 bar) d'une part, et à des compositions variées de solutions chimiques d'autre part, puisque les analyses chimiques sont couramment effectuées dans des mélanges eau-solvant organique (acétonitrile, méthanol...) acidifiés avec 0,1 à 1% d'acide formique ou trifluoroacétique. Ces premiers systèmes en SU-8 ne résistaient qu'à des solutions purement aqueuses injectées à un faible débit dans les canaux. Une modification de la composition de la solution ou un accroissement de la pression se traduisait par des fuites et une rupture du scellement socle/couvercle.

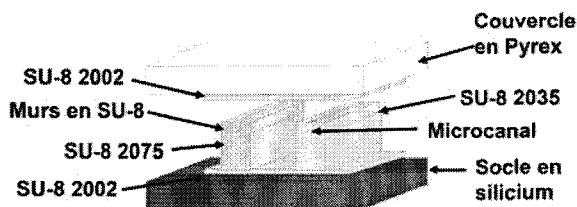


Figure 42 : Schéma représentatif de la structure multicouche à base de silicium et de SU-8 utilisée pour la réalisation des microsystèmes en SU-8.



Figure 43 : Photographie d'un microsysteme en SU-8 ; les canaux sont en serpentins.

Le procédé de fabrication des systèmes a donc été modifié.⁷⁷ Dorénavant, les microcanaux sont définis par deux fins murs de résine, qui sont construits sur une première couche fine de résine (Figure 42). Des piliers sont ajoutés entre les murs, en dehors des zones définissant les canaux, pour supporter le couvercle en Pyrex. Le collage est optimisé avec l'ajout d'une fine couche de résine qui est déposée sur la plaquette de Pyrex. Du fait de la présence de piliers, la surface de contact entre le couvercle et la résine du socle est plus petite ce qui diminue les contraintes mécaniques exercées sur le couvercle en Pyrex. Ces contraintes provoquent une courbure et des déformations importantes du substrat de base du microsysteme, qui sont néfastes à l'étanchéité globale des microcanaux.

Le mode de pompage choisi est basé sur des effets thermiques et géométriques. Le liquide est vaporisé de façon locale, dans une chambre dite d'actuation tapissée d'une électrode résistive

(Figure 44). La formation de cette bulle pousse le liquide. Le retour du liquide est interdit, en amont, soit par un effet rectifiant et une géométrie appropriée du canal, soit par l'ajout de valves réalisées en résine SU-8 (Figure 45).

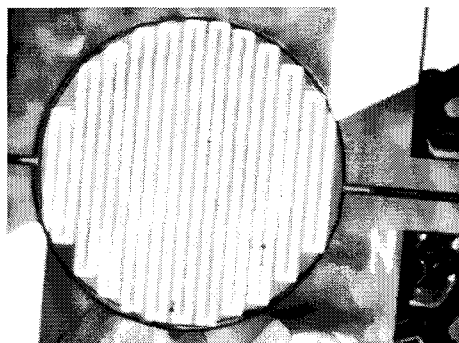


Figure 44 : Chambre d'actuation tapissée d'une électrode résistive chauffante (piste en Cr)

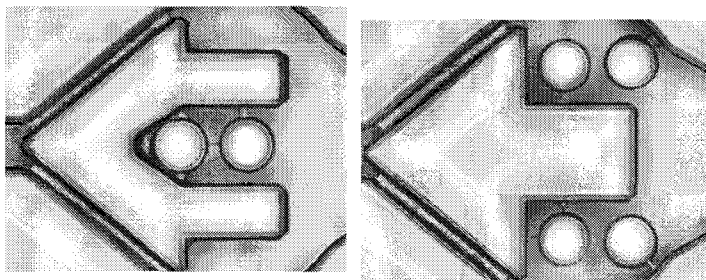


Figure 45 : Exemples de valves microfabriquées, en SU-8 et se comportant comme des flèches mobiles

Les autres modules de ce système, le module chromatographique et le module de connexion à la spectrométrie de masse sont simplement évoqués ici. Ils sont présentés plus en détails dans les chapitres suivants, puisqu'ils font l'objet de ce travail de thèse.

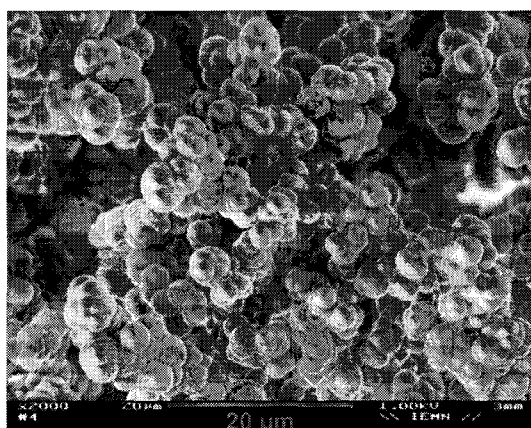


Figure 46 : Photographie de microscopie électronique d'une phase monolithique préparée dans un capillaire (i.d. 75 μm).

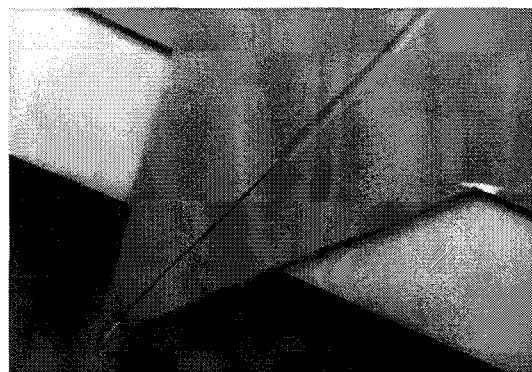


Figure 47 : Photographie de microscopie électronique d'une source d'ionisation ayant une géométrie de type plume

Notre choix pour la réalisation du module chromatographique a été orienté par le mode de pompage non électrocinétique. Il a été d'utiliser une phase stationnaire vraie, appropriée à ce contexte microfluidique. La phase stationnaire est de nature macromoléculaire, dite monolithique (Figure 46) ; elle est préparée in situ dans le microcanal, une fois le microsystème fini, par voie

photochimique. Le deuxième chapitre de ce manuscrit est consacré à la problématique de la réalisation de ce module chromatographique dans un microcanal. Précisons, néanmoins, que ce type de phases monolithiques peut être utilisé à d'autres fins, comme celle de la réalisation d'un microréacteur enzymatique de digestion des protéines.

Le module de connexion à l'ESI-SM doit être intégré sur le système en vue de l'optimisation du couplage. Notre choix final s'est porté sur une source d'ionisation ayant une géométrie inspirée de celle de plumes de calligraphie avec l'introduction d'une fente capillaire et d'une structure en pointe à la sortie du microcanal (Figure 47). La conception, la fabrication et l'étude de ce module de couplage avec la spectrométrie de masse sont traitées en détails dans le troisième chapitre.

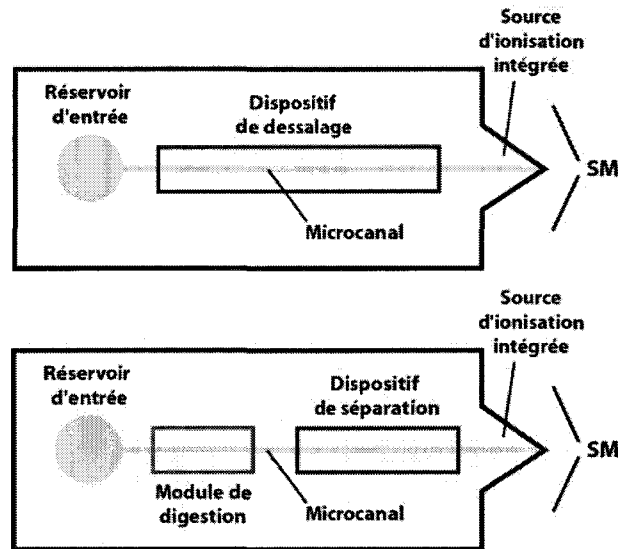


Figure 48 : Deux niveaux de complexité pour réaliser le dispositif dédié à l'ESI-SM ; un dispositif de dessalage simple (en haut) et un dispositif de digestion/séparation-dessalage (en bas).

Nous envisageons deux générations de systèmes, pour la réalisation de ce dispositif, avec une complexification des opérations. Le premier dispositif associera un dessalage des échantillons protéiques à leur ionisation par électronebulisation avant leur analyse par spectrométrie de masse (Figure 48, en haut). Le deuxième dispositif, plus complet, intégrera, en amont de l'étape chromatographique, qui consistera en un dessalage simple ou une séparation des composés, une étape de digestion des échantillons protéiques (Figure 48, en bas). Ainsi, le système dit plus complet assurera-t-il une étape supplémentaire dans le traitement des échantillons. L'intégration de la colonne monolithique avec une source d'ionisation de type plume sera envisagée à la fin du chapitre 2.

B. Dispositif MALDI

La technique d'ionisation MALDI est appliquée à des échantillons sous forme de cristaux solides. Cette technique est plutôt associée à la manipulation de gouttes de liquide. Le passage d'un flux sous forme de colonne continue à un flux sous forme de gouttes n'étant pas trivial, il apparaît plus logique de travailler sur des gouttes de liquide dans tout le système d'analyse. Le choix s'est donc porté vers une technique de pompage dite discrète, visant à déplacer le liquide sous forme de gouttelettes au sein du système. L'électromouillage permet le déplacement de gouttelettes sur une surface, garnie d'électrodes, chaque électrode constituant un demi condensateur.¹⁴⁰ Ce mode de déplacement de liquide sur des électrodes en métal est particulièrement approprié pour des liquides isolants ayant une forte constante diélectrique: ils peuvent être « aspirés » entre deux plaques d'un condensateur. En revanche, le principe ne peut pas être directement appliqué à des solutions conductrices comme les solutions usuelles d'analyse biologique, qui sont équivalentes à de l'eau chargée en sels. Ces solutions donnent lieu à des phénomènes d'électrolyse, une fois soumises à des tensions de l'ordre de la centaine de volts : la solution « bulle » mais ne se déplace pas. La conception du système doit être revue avec l'intégration d'une couche de matériau isolant. Ce matériau devrait, cependant, annihiler le champ et empêcher le mouvement des gouttes. En réalité, le déplacement résulte d'une variation de la mouillabilité de la surface liée à l'apparition de charges en surface due au champ électrique. Le matériau isolant usuel est un téflon, dont la composition inclut, en plus du tétrafluoroéthylène ($\text{CF}_2=\text{CF}_2$), du 4,5-difluoro-2,2-bis-(trifluorométhyl)-1,3-dioxole ($-\text{OCF}=\text{CFO}-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$). Ce dernier semble s'hydrolyser au contact de l'eau pour donner des alcools très acides.

L'architecture, la conception du dispositif dédié à une analyse MALDI-SM ainsi que la réalisation des différents modules fonctionnels de traitement des échantillons, découlent de ce système de déplacement de gouttes. En particulier, comme le liquide se déplace sur la surface, toutes les interactions entre les composés et une phase stationnaire ou une quelconque fonctionnalisation, doivent avoir lieu en surface. Une autre limitation provient de l'utilisation d'une couche de téflon, dont on ne peut varier la composition et qui ne peut pas être fonctionnalisée.

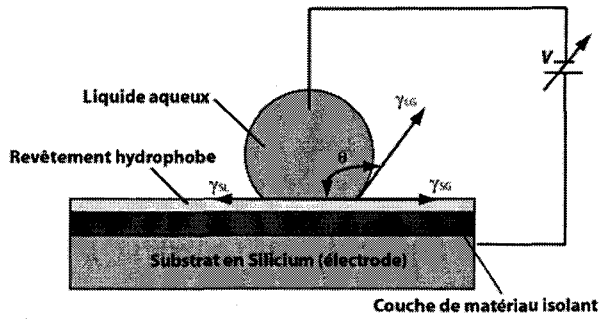


Figure 49 : Architecture du dispositif MALDI

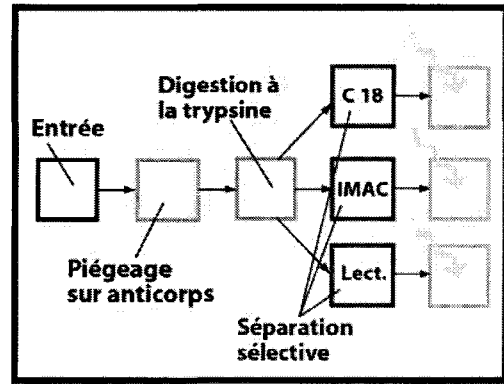


Figure 50 : Principe de fonctionnement du dispositif dédié à une analyse par MALDI-SM

Les différents modules de traitement de l'échantillon reposent sur cette approche de fonctionnalisation de surface avec l'immobilisation, par exemple, d'anticorps pour le piégeage sélectif de certaines protéines, d'enzymes protéolytiques pour la digestion des protéines, de chaînes aliphatiques en C18 pour le dessalage final des échantillons traités avant leur analyse par MALDI-SM. En sortie de puce, les solutions sont amenées sur des zones d'analyse, constituant les cibles MALDI. Une fois la solution à analyser acheminée sur ces plots, la solution de matrice est ajoutée, elle aussi, selon le même principe de déplacement des gouttelettes. La Figure 50 montre le schéma d'un dispositif MALDI, comprenant différentes zones de traitement de l'échantillon : une zone de sélection des protéines, une zone de digestion tryptique, des zones de rétention sélective des peptides en vue du fractionnement de l'échantillon et une zone d'analyse MALDI.

REFERENCES

- [1] Voldman, Joel; Gray, Martha L.; Schmidt, Martin A. Microfabrication in biology and medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering* **1999**, *1*, 401-425.
- [2] Polla, Dennis L.; Erdman, Arthur G.; Robbins, William P.; Markus, David T.; Diaz-Diaz, Jorge; Rizq, Raed; Nam, Yunwoo; Brickner, Hui Tao; Wang, Amy; Krulevitch, Peter. Microdevices in medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2000**, *2*, 551-576.
- [3] Tokeshi, Manabu; Kikutani, Yoshikuni; Hibara, Akihide; Sato, Kiichi; Hisamoto, Hideaki; Kitamori, Takehiko. Chemical processing on microchips for analysis, synthesis, and bioassay. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3583-3594.
- [4] Watts, Paul; Haswell, Stephen J. Microfluidic combinatorial chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, *7*, 380-387.
- [5] Fletcher, P. D. I.; Haswell, S. J.; Watts, P.; Wong, S. Y. F. Synthesis in micro reactors using electro-osmotic flow. *Lab-on-a-Chip* **2003**, 309-333.
- [6] Auroux, Pierre-Alain; Iossifidis, Dimitri; Reyes, Darwin R.; Manz, Andreas. Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 2637-2652.
- [7] Reyes, Darwin R.; Iossifidis, Dimitri; Auroux, Pierre-Alain; Manz, Andreas. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 2623-2636.
- [8] Sato, Kiichi; Hibara, Akihide; Tokeshi, Manabu; Hisamoto, Hideaki; Kitamori, Takehiko. Microchip-based chemical and biochemical analysis systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 379-391.
- [9] Sia, Samuel K.; Whitesides, George M. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3563-3576.
- [10] Verpoorte, Elisabeth. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 677-712.
- [11] Effenhauser, Carlo S., in *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science, Vol. 194* (Eds.: Manz A, Becker H), Topics in current chemistry, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **1998**, pp. 51-82.
- [12] Ehrfeld, W.; Hessel, V.; Lehr, H., in *Microsystems Technology in Chemistry and Life Sciences, Vol. 194* (Eds.: Manz A, Becker H), Topics in current chemistry, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **1998**, pp. 233-250.
- [13] Pirrung, Michael C. How to make a DNA chip. *Angewandte Chemie, International Edition* **2002**, *41*, 1276-1289.
- [14] Lion, Niels; Rohner, Tatiana C.; Dayon, Loic; Arnaud, Isabelle L.; Damoc, Eugen; Youhnovski, Nikolay; Wu, Zhi-yong; Roussel, Christophe; Jossierand, Jacques; Jensen, Henrik; Rossier, Joel S.; Przybylski, Michael; Girault, Hubert H. Microfluidic systems in proteomics. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3533-3562.
- [15] Zhang, C. X.; Manz, A. Trends in microfluidic devices for analytical chemistry. *Biochips* **2003**, 101-134.
- [16] Cuzin, M. DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Société française de transfusion sanguine* **2001**, *8*, 291-296.
- [17] Walter, G.; Bussow, K.; Cahill, D.; Lueking, A.; Lehrach, H. Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening. *Current opinion in microbiology* **2000**, *3*, 298-302.
- [18] Cahill, D. J. Protein and antibody arrays and their medical applications. *Journal of Immunological Methods* **2001**, *250*, 81-91.
- [19] Lueking, Angelika; Konthur, Zoltan; Eickhoff, Holger; Bussow, Konrad; Lehrach, Hans; Cahill, Dolores J. Protein microarrays - a tool for the post-genomic era. *Current Genomics* **2001**, *2*, 151-159.
- [20] Cutler, Paul. Protein arrays: The current state-of-the-art. *Proteomics* **2003**, *3*, 3-18.
- [21] Kodadek, Thomas. Protein microarrays: prospects and problems. *Chemistry & Biology* **2001**, *8*, 105-115.
- [22] Korbel, Gregory A.; Lalic, Gojko; Shair, Matthew D. Reaction microarrays: a method for rapidly determining the enantiomeric excess of thousands of samples. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 361-362.
- [23] Rossier, J. S.; Ferrigno, R.; Girault, H. H. Electrophoresis with electrochemical detection in a polymer microdevice. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2000**, *492*, 15-22.
- [24] Rossier, J. S.; Roberts, M. A.; Ferrigno, R.; Girault, H. H. Electrochemical detection in polymer microchannels. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 4294-4299.
- [25] Wang, Joseph. Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review. *Talanta* **2002**, *56*, 223-231.
- [26] Oleschuk, R. D.; Harrison, D. J. Analytical microdevices for mass spectrometry. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **2000**, *19*, 379-388.
- [27] Andersson, Helene; van den Berg, Albert. Microtechnologies and nanotechnologies for single-cell analysis. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *15*, 44-49.

- [28] Andersson, Helene; van den Berg, Albert. Microfluidic devices for cellomics: a review. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2003**, *B92*, 315-325.
- [29] Spearing, S. M. Materials issues in microelectromechanical systems (MEMS). *Acta Materialia* **2000**, *48*, 179-196.
- [30] Harrison, D. Jed; Glavina, P. G.; Manz, Andreas. Towards miniaturized electrophoresis and chemical analysis systems on silicon: an alternative to chemical sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1993**, *B10*, 107-116.
- [31] Fintschenko, Yolanda; Van Den Berg, Albert. Silicon microtechnology and microstructures in separation science. *Journal of Chromatography, A* **1998**, *819*, 3-12.
- [32] Daridon, Antoine; Fascio, Valia; Lichtenberg, Jan; Wuetrich, Rolf; Langen, Hans; Verpoorte, Elisabeth; de Rooij, Nico F. Multi-layer microfluidic glass chips for microanalytical applications. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *371*, 261-269.
- [33] Chartier, Isabelle; Bory, Cecile; Fuchs, Alexandra; Freida, Delphine; Manaresi, Nicolo; Ruty, Marine; Bablet, Jacqueline; Gilbert, Karine; Sarrut, Nicolas; Baleras, Francois; Villiers, Christian; Fulbert, Laurent. Fabrication of hybrid plastic-silicon microfluidic devices for individual cell manipulation by dielectrophoresis. *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering* **2004**, *5345*, 7-16.
- [34] Xia, Younan; Rogers, John A.; Paul, Kateri E.; Whitesides, George M. Unconventional methods for fabricating and patterning nanostructures. *Chemical Reviews (Washington, D. C.)* **1999**, *99*, 1823-1848.
- [35] Becker, Holger; Locascio, Laurie E. Polymer microfluidic devices. *Talanta* **2002**, *56*, 267-287.
- [36] Xia, Younan; Whitesides, George M. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science* **1998**, *28*, 153-184.
- [37] Becker, Holger; Gartner, Claudia. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 12-26.
- [38] Henry, Charles S.; Zhong, Min; Lunte, Susan M.; Kim, Moon; Bau, Haim; Santiago, Jorge J. Ceramic microchips for capillary electrophoresis-electrochemistry. *Analytical Communications* **1999**, *36*, 305-307.
- [39] Yang, Hong; Deschatelets, Pascal; Brittain, Scott T.; Whitesides, George M. Fabrication of high performance ceramic microstructures from a polymeric precursor using soft lithography. *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* **2001**, *13*, 54-58.
- [40] Heule, Martin; Vuillemin, Sibylle; Gauckler, Ludwig J. Powder-based ceramic meso- and microscale fabrication processes. *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* **2003**, *15*, 1237-1245.
- [41] Koch, Michael; Evans, Alan; Brunnschweiler, Arthur, in *Microtechnology Technology and Applications, Vol. chapter 5* (Ed.:), Research Studies Press, LTD, Baldock, Hertfordshire, England, **2000**, pp. 106-148.
- [42] Tabourier, Pierre; Druon, Christian; Rolando, Christian; Lefebvre, Patricia. On-Chip Microfluidics for Proteomic Analysis by ESI/Mass Spectrometry. *1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference in Medicine & Biology* **2000**, 439-444.
- [43] Guijt, Rosanne M.; Baltussen, Erik; Van der Steen, Gert; Schasfoort, Richard B. M.; Schlautmann, Stefan; Billiet, Hugo A. H.; Frank, Johannes; Van Dedem, Gijs W. K.; Van den Berg, Albert. New approaches for fabrication of microfluidic capillary electrophoresis devices with on-chip conductivity detection. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 235-241.
- [44] Brivio, Monica; Fokkens, Roel H.; Verboom, Willem; Reinhoudt, David N.; Tas, Niels R.; Goedbloed, Martijn; van den Berg, Albert. Integrated Microfluidic System Enabling (Bio)chemical Reactions with On-Line MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 3972-3976.
- [45] Kupka, R. K.; Bouamrane, F.; Cremers, C.; Megtert, S. Microfabrication: LIGA-X and applications. *Applied Surface Science* **2000**, *164*, 97-110.
- [46] Deng, Tao; Wu, Hongkai; Brittain, Scott T.; Whitesides, George M. Prototyping of masks, masters, and stamps/molds for soft lithography using an office printer and photographic reduction. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3176-3180.
- [47] Duffy, David C.; Schueller, Olivier J. A.; Brittain, Scott T.; Whitesides, George M. Rapid prototyping of microfluidic switches in poly(dimethylsiloxane) and their actuation by electro-osmotic flow. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **1999**, *9*, 211-217.
- [48] Linder, Vincent; Wu, Hongkai; Jiang, Xingyu; Whitesides, George M. Rapid Prototyping of 2D Structures with Feature Sizes Larger than 8 μm . *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 2522-2527.
- [49] Duffy, David C.; McDonald, J. Cooper; Schueller, Olivier J. A.; Whitesides, George M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 4974-4984.
- [50] McDonald, J. Cooper; Chabinyk, Michael L.; Metallo, Steven J.; Anderson, Janelle R.; Stroock, Abraham D.; Whitesides, George M. Prototyping of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) using solid-object printing. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 1537-1545.

Chapitre 1: « Généralités »

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM

- [51] Whitesides, George M.; Ostuni, Emanuele; Takayama, Shuichi; Jiang, Xingyu; Ingber, Donald E. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2001**, *3*, 335-373.
- [52] Zhao, Xiao-Mei; Xia, Younan; Whitesides, George M. Soft lithographic methods for nano-fabrication. *Journal of Materials Chemistry* **1997**, *7*, 1069-1074.
- [53] Love, J. Christopher; Wolfe, Daniel B.; Jacobs, Heiko O.; Whitesides, George M. Microscope Projection Photolithography for Rapid Prototyping of Masters with Micron-Scale Features for Use in Soft Lithography. *Langmuir* **2001**, *17*, 6005-6012.
- [54] Wilbur, James L.; Kumar, Amit; Biebuyck, Hans A.; Kim, Enoch; Whitesides, George M. Microcontact printing of self-assembled monolayers: applications in microfabrication. *Nanotechnology* **1996**, *7*, 452-457.
- [55] Whidden, Thomas K.; Ferry, David K.; Kozicki, Michael N.; Kim, Enoch; Kumar, Amit; Wilbur, James; Whitesides, George M. Pattern transfer to silicon by microcontact printing and RIE. *Nanotechnology* **1996**, *7*, 447-451.
- [56] Lahiri, Joydeep; Ostuni, Emanuele; Whitesides, George M. Patterning Ligands on Reactive SAMs by Microcontact Printing. *Langmuir* **1999**, *15*, 2055-2060.
- [57] Xia, Younan; Kim, Enoch; Whitesides, George M. Micromolding of Polymers in Capillaries: Applications in Microfabrication. *Chemistry of Materials* **1996**, *8*, 1558-1567.
- [58] Wolfe, Daniel B.; Ashcom, Jonathan B.; Hwang, Jeremy C.; Schaffer, Chris B.; Mazur, Eric; Whitesides, George M. Customization of poly(dimethylsiloxane) stamps by micromachining using a femtosecond-pulsed laser. *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* **2003**, *15*, 62-65.
- [59] Xia, Younan; Tien, Joe; Qin, Dong; Whitesides, George M. Non-Photolithographic Methods for Fabrication of Elastomeric Stamps for Use in Microcontact Printing. *Langmuir* **1996**, *12*, 4033-4038.
- [60] Kumar, Amit; Biebuyck, Hans A.; Whitesides, George M. Patterning Self-Assembled Monolayers: Applications in Materials Science. *Langmuir* **1994**, *10*, 1498-1511.
- [61] Qin, Dong; Xia, Younan; Rogers, John A.; Jackman, Rebecca J.; Zhao, Xiao-Mei; Whitesides, George M., in *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science, Vol. 194* (Eds.: Manz A, Becker H), Topics in current chemistry, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **1998**, pp. 1-20.
- [62] Black, Andrew J.; Paul, Kateri E.; Aizenberg, Joanna; Whitesides, George M. Patterning disorder in monolayer resists for the fabrication of sub-100-nm structures in silver, gold, silicon, and aluminum. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 8356-8365.
- [63] Laibinis, Paul E.; Whitesides, George M.; Allara, David L.; Tao, Yu Tai; Parikh, Atul N.; Nuzzo, Ralph G. Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 7152-7167.
- [64] Xia, Younan; Qin, Dong; Whitesides, George M. Microcontact printing with a cylindrical rolling stamp. A practical step toward automatic manufacturing of patterns with submicrometer-sized features. *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* **1996**, *8*, 1015-1017.
- [65] Huck, Wilhelm T. S.; Yan, Lin; Stroock, Abe; Haag, Rainer; Whitesides, George M. Patterned Polymer Multilayers as Etch Resists. *Langmuir* **1999**, *15*, 6862-6867.
- [66] Kumar, Amit; Biebuyck, Hans A.; Abbott, Nicholas L.; Whitesides, George M. The use of self-assembled monolayers and a selective etch to generate patterned gold features. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 9188-9189.
- [67] Love, J. Christopher; Wolfe, Daniel B.; Chabynyc, Michael L.; Paul, Kateri E.; Whitesides, George M. Self-assembled monolayers of alkanethiolates on palladium are good etch resists. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 1576-1577.
- [68] Harendt, Christine; Graf, Heinz Gerd; Hoefflinger, Bernd; Penteker, Elisabeth. Silicon fusion bonding and its characterization. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **1992**, *2*, 113-116.
- [69] Lasky, J. B. Wafer bonding for silicon-on-insulator technologies. *Applied Physics Letters* **1986**, *48*, 78-80.
- [70] Folta, James A.; Hunt, Charles E.; Farrens, Shari N. Low-temperature wafer bonding of surfaces using a reactive sputtered oxide. *Journal of the Electrochemical Society* **1994**, *141*, 2157-2160.
- [71] Schjolberg-Henriksen, K.; Visser Taklo, M. M.; Hanneborg, A.; Jensen, G. U. Oxide charges induced by plasma activation for wafer bonding. *Sensors and Actuators, A: Physical* **2002**, *A102*, 99-105.
- [72] Hanneborg, Anders; Nese, Martin; Oehlckers, Per. Silicon-to-silicon anodic bonding with a borosilicate glass layer. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **1991**, *1*, 139-144.
- [73] Pan, C. T.; Yang, H.; Shen, S. C.; Chou, M. C.; Chou, H. P. A low-temperature wafer bonding technique using patternable materials. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2002**, *12*, 611-615.

- [74] Eaton, William P.; Risbud, Subhash H.; Smith, Rosemary L. Silicon wafer-to-wafer bonding at T<200 DegC with poly(methyl methacrylate). *Applied Physics Letters* **1994**, *65*, 439-441.
- [75] Legtenberg, Rob; Bouwstra, Siebe; Elwenspoek, Miko. Low-temperature glass bonding for sensor applications using boron oxide thin films. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **1991**, *1*, 157-160.
- [76] Berthold, A.; Nicola, L.; Sarro, P. M.; Vellekoop, M. J. Glass-to-glass anodic bonding with standard IC technology thin films as intermediate layers. *Sensors and Actuators, A: Physical* **2000**, *A82*, 224-228.
- [77] Carlier, Julien; Arscott, Steve; Thomy, Vincent; Fourier, Jean-Christophe; Caron, François; Camart, Jean-Christophe; Druon, Christian; Tabourier, Pierre. Integrated microfluidics based on multi-layered SU-8 for mass spectrometry analysis. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2004**, *14*, 619-624.
- [78] Spierings, G. A. C. M.; Haisma, J.; van der Kruijs, F. J. H. M. Direct bonding of organic polymeric materials. *Philips Journal of Research* **1995**, *49*, 139-149.
- [79] Spierings, G. A. C. M.; Haisma, J. Direct bonding of organic materials. *Applied Physics Letters* **1994**, *64*, 3246-3248.
- [80] Manz, Andreas; Effenhauser, Carlo S.; Burggraf, Norbert; Harrison, D. Jed; Seiler, Kurt; Fluri, Karl. Electroosmotic pumping and electrophoretic separations for miniaturized chemical analysis systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **1994**, *4*, 257-265.
- [81] Kellogg, Gregory J.; Arnold, Todd E.; Carvalho, Bruce L.; Duffy, David C.; Sheppard, Norman F., Jr. Centrifugal microfluidics: Applications. *Micro Total Analysis Systems 2000, Proceedings of the mTAS Symposium, 4th, Enschede, Netherlands, May 14-18, 2000* **2000**, 239-242.
- [82] Duffy, David C.; Gillis, Heather L.; Lin, Joe; Sheppard, Norman F., Jr.; Kellogg, Gregory J. Microfabricated Centrifugal Microfluidic Systems: Characterization and Multiple Enzymatic Assays. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 4669-4678.
- [83] Tsai, Jr-Hung; Lin, Liwei. A thermal-bubble-actuated micronozzle-diffuser pump. *Journal of Microelectromechanical Systems* **2002**, *11*, 665-671.
- [84] Tsai, Jr-Hung; Lin, Liwei. Active microfluidic mixer and gas bubble filter driven by thermal bubble micropump. *Sensors and Actuators, A: Physical* **2002**, *A97-98*, 665-671.
- [85] Olsson, Anders; Stemme, Goeran; Stemme, Erik. A valve-less planar fluid pump with two pump chambers. *Sensors and Actuators, A: Physical* **1995**, *A47*, 549-556.
- [86] Stemme, Erik; Stemme, Goeran. A valveless diffuser/nozzle-based fluid pump. *Sensors and Actuators, A: Physical* **1993**, *39*, 159-167.
- [87] Matsumoto, S.; Maeda, R.; Klein, A. Characterization of a valveless micropump based on liquid viscosity. *Microscale Thermophysical Engineering* **1999**, *3*, 31-42.
- [88] Matsumoto, S.; Klein, A.; Maeda, R. Development of bi-directional valve-less micropump for liquid. *IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Technical Digest, 12th, Orlando, Fla., Jan. 17-21, 1999* **1999**, 141-146.
- [89] Gravesen, Peter; Branebjerg, Jens; Soendergaard Jensen, Ole. Microfluidics - a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **1993**, *3*, 168-182.
- [90] Salimi-Moosavi, Hossein; Tang, Thompson; Harrison, D. Jed. Electroosmotic Pumping of Organic Solvents and Reagents in Microfabricated Reactor Chips. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 8716-8717.
- [91] Arora, Arun; de Mello, Andrew J.; Manz, Andreas. Sub-microliter Electrochemiluminescence Detector-A Model for Small Volume Analysis Systems. *Analytical Communications* **1997**, *34*, 393-395.
- [92] Gavin, Peter F.; Ewing, Andrew G. Continuous Separations with Microfabricated Electrophoresis-Electrochemical Array Detection. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 8932-8936.
- [93] Woolley, Adam T.; Lao, Kaiqin; Glazer, Alexander N.; Mathies, Richard A. Capillary Electrophoresis Chips with Integrated Electrochemical Detection. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 684-688.
- [94] Wang, Joseph; Tian, Baomin; Sahlin, Eskil. Micromachined electrophoresis chips with thick-film electrochemical detectors. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 5436-5440.
- [95] Ontko, Allyn C.; Armistead, Paul M.; Kircus, Sandra R.; Thorp, H. Holden. Electrochemical Detection of Single-Stranded DNA Using Polymer-Modified Electrodes. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38*, 1842-1846.
- [96] Martin, R. Scott; Gawron, Andrew J.; Lunte, Susan M.; Henry, Charles S. Dual-Electrode Electrochemical Detection for Poly(dimethylsiloxane)-Fabricated Capillary Electrophoresis Microchips. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3196-3202.
- [97] Gawron, Andrew J.; Martin, R. Scott; Lunte, Susan M. Fabrication and evaluation of a carbon-based dual-electrode detector for poly(dimethylsiloxane) electrophoresis chips. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 242-248.

Chapitre 1: « Généralités »

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM

- [98] Fenn, John B.; Mann, Matthias; Meng, Chin Kai; Wong, Shek Fu; Whitehouse, Craig M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (Washington, DC, United States)* **1989**, *246*, 64-71.
- [99] Tomer, Kenneth B. Separations Combined with Mass Spectrometry. *Chemical Reviews (Washington, D. C.)* **2001**, *101*, 297-328.
- [100] Anon. Focus: Chip-MS: coupling the large with the small. *Lab on a Chip* **2001**, *1*, 7N-12N.
- [101] Fletcher, Paul D. I.; Haswell, Stephen J.; Pombo-Villar, Esteban; Warrington, Brian H.; Watts, Paul; Wong, Stephanie Y. F.; Zhang, Xunli. Micro reactors: principles and applications in organic synthesis. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4735-4757.
- [102] Watts, Paul; Haswell, Stephen J. Continuous flow reactors for drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 586-593.
- [103] Tokeshi, Manabu; Minagawa, Tomoko; Uchiyama, Kenji; Hibara, Akihide; Sato, Kiichi; Hisamoto, Hideaki; Kitamori, Takehiko. Continuous-Flow Chemical Processing on a Microchip by Combining Microunit Operations and a Multiphase Flow Network. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 1565-1571.
- [104] Wiessmeier, Georg; Hoenicke, Dieter. Microfabricated components for heterogeneously catalyzed reactions. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **1996**, *6*, 285-289.
- [105] Ueno, Masaharu; Hisamoto, Hideaki; Kitamori, Takehiko; Kobayashi, Shu. Phase-transfer alkylation reactions using microreactors. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **2003**, 936-937.
- [106] Leamon, John H.; Lee, William L.; Tartaro, Karrie R.; Lanza, Janna R.; Sarkis, Gary J.; deWinter, Alex D.; Berka, Jan; Lohman, Kenton L. A massively parallel PicoTiterPlate based platform for discrete picoliter-scale polymerase chain reactions. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3769-3777.
- [107] Bousse, Luc; Mouradian, Stephane; Minalla, Abdel; Yee, Herman; Williams, Kathi; Dubrow, Robert. Protein sizing on a microchip. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 1207-1212.
- [108] Mouradian, Stephane. Lab-on-a-chip: applications in proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 51-56.
- [109] Marko-varga, Gyoergy; Nilsson, Johan; Laurell, Thomas. New directions of miniaturization within the proteomics research area. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3521-3532.
- [110] Wheeler, Aaron R.; Thronset, William R.; Whelan, Rebecca J.; Leach, Andrew M.; Zare, Richard N.; Liao, Yish Hann; Farrell, Kevin; Manger, Ian D.; Daridon, Antoine. Microfluidic device for single-cell analysis. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3581-3586.
- [111] Bousse, Luc. Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1996**, *B34*, 270-275.
- [112] Gao, Jian; Yin, Xue-Feng; Fang, Zhao-Lun. Integration of single cell injection, cell lysis, separation and detection of intracellular constituents on a microfluidic chip. *Lab on a Chip* **2004**, *4*, 47-52.
- [113] Armstrong, Daniel W.; He, Lingfeng. Determination of cell viability in single or mixed samples using capillary electrophoresis laser-induced fluorescence microfluidic systems. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 4551-4557.
- [114] Fu, Anne Y.; Chou, Hou-Pu; Spence, Charles; Arnold, Frances H.; Quake, Stephen R. An integrated microfabricated cell sorter. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 2451-2457.
- [115] Huang, Yong; Rubinsky, Boris. Flow-through micro-electroporation chip for high efficiency single-cell genetic manipulation. *Sensors and Actuators, A: Physical* **2003**, *A104*, 205-212.
- [116] Le Pioufle, B.; Surbled, P.; Nagai, H.; Murakami, Y.; Chun, K. S.; Tamiya, E.; Fujita, H. Living cells captured on a bio-microsystem devoted to DNA injection. *Materials Science & Engineering, C: Biomimetic and Supramolecular Systems* **2000**, *C12*, 77-81.
- [117] Tang, Ning; Tornatore, Pete; Weinberger, Scot R. Current developments in SELDI Affinity technology. *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *23*, 34-44.
- [118] Weinberger, Scot R.; Dalmaso, Enrique A.; Fung, Eric T. Current achievements using ProteinChip Array technology. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 86-91.
- [119] Mueller, Odilo; Hahnenberger, Karen; Dittmann, Monika; Yee, Herman; Dubrow, Robert; Nagle, Rob; Ilsley, Diane. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 128-134.
- [120] Gustafsson, Magnus; Hirschberg, Daniel; Palmberg, Carina; Joernvall, Hans; Bergman, Tomas. Integrated sample preparation and MALDI mass spectrometry on a microfluidic compact disk. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 345-350.
- [121] Issaq Haleem, J.; Conrads Thomas, P.; Prieto DaRue, A.; Tirumalai, Radhakrishna; Veenstra Timothy, D. SELDI-TOF MS for diagnostic proteomics. *Analytical chemistry FIELD Publication Date:2003 Apr 1*, *75*, 148A-155A. FIELD Reference Number: FIELD Journal Code:0370536 FIELD Call Number:.

- [122] Diamond, Deborah L.; Zhang, Yanni; Gaiger, Alexander; Smithgall, Molly; Vedvick, Thomas S.; Carter, Darrick. Use of proteinchip? array surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (seldi-tof ms) to identify thymosin b-4, a differentially secreted protein from lymphoblastoid cell lines. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *14*, 760-765.
- [123] Fung, Eric T.; Thulasiraman, Vanitha; Weinberger, Scot R.; Dalmasso, Enrique A. Protein biochips for differential profiling. *Current Opinion in Biotechnology* **2001**, *12*, 65-69.
- [124] Kitagawa, Naotaka, in *PCT Int. Appl.*, (CIPHERGEN Biosystems, Inc., USA). Wo, **2003**, p. 91 pp.
- [125] Weinberger, S. R.; Boschetti, E.; Santambien, P.; Brenac, V. Surface-enhanced laser desorption-ionization retentate chromatography mass spectrometry (SELDI-RC-MS): a new method for rapid development of process chromatography conditions. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2002**, *782*, 307-316.
- [126] Lin, Shanhua; Tornatore, Pete; King, Daniel; Orlando, Ron; Weinberger, Scot R. Limited acid hydrolysis as a means of fragmenting proteins isolated upon ProteinChip array surfaces. *Proteomics* **2001**, *1*, 1172-1184.
- [127] Chapman, K. The ProteinChip biomarker system from ciphergen biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochemical Society Transactions* **2002**, *30*, 82-87.
- [128] Dayal, Bishambar; Ertel, Norman H. ProteinChip technology: A new and facile method for the identification and measurement of high-density lipoproteins apoA-I and apoA-II and their glycosylated products in patients with diabetes and cardiovascular disease. *Journal of Proteome Research* **2002**, *1*, 375-380.
- [129] Felton, Michael J. CD simplicity. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 302A-306A.
- [130] Amatore, Christian; Arbault, Stephane; Bruce, Delphine; de Oliveira, Pedro; Erard, Marie; Vuillaume, Monique. Analysis of individual biochemical events based on artificial synapses using ultramicroelectrodes: cellular oxidative burst. *Faraday Discussions* **2000**, *116*, 319-333.
- [131] Fromherz, P.; Offenhausser, A.; Vetter, T.; Weis, J. A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science* **1991** *31*, *252*, 1290-1293.
- [132] Fromherz, Peter; Stett, Alfred. Silicon-neuron junction: capacitive stimulation of an individual neuron on a silicon chip. *Physical Review Letters* **1995**, *75*, 1670-1673.
- [133] Chiquet, Matthias; Masuda-Nakagawa, Liria; Beck, Konrad. Attachment to an endogenous laminin-like protein initiates sprouting by leech neurons. *Journal of Cell Biology* **1988**, *107*, 1189-1198.
- [134] Chiquet, M.; Nicholls, J. G. Neurite outgrowth and synapse formation by identified leech neurones in culture. *Journal of experimental biology* **1987**, *132*, 191-206.
- [135] Fromherz, P.; Schaden, H.; Vetter, T. Guided outgrowth of leech neurons in culture. *Neuroscience letters* **1991** *5*, *129*, 77-80.
- [136] Jenkner, M.; Muller, B.; Fromherz, P. Interfacing a silicon chip to pairs of snail neurons connected by electrical synapses. *Biological cybernetics* **2001**, *84*, 239-249..
- [137] Zeck, Gunther; Fromherz, Peter. Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 10457-10462.
- [138] Kaul, R. Alexander; Syed, Naweel I.; Fromherz, Peter. Neuron-Semiconductor Chip with Chemical Synapse between Identified Neurons. *Physical Review Letters* **2004**, *92*, 038102/038101-038102/038104.
- [139] Folch, Albert; Toner, Mehmet. Cellular Micropatterns on Biocompatible Materials. *Biotechnology Progress* **1998**, *14*, 388-392.
- [140] Lee, Junghoon; Moon, Hyejin; Fowler, Jesse; Schoellhammer, Thomas; Kim, Chang-Jin. Electrowetting and electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling. *Sensors and Actuators, A: Physical* **2002**, *A95*, 259-268.

*Dispositif
chromatographique
basé sur une phase
monolithique polymère*

I. Présentation du problème/ problématique

A. Problématique

Le microsystème fluidique dédié à l'ESI-SM prend en charge la préparation et le traitement d'échantillons avant leur analyse en ligne. De ce fait, il inclut un module chromatographique dont la conception et le mode de fonctionnement doivent être en adéquation avec le contexte microfluidique. Différents niveaux de fonctions sont envisagés pour la préparation de l'échantillon, comme il a été envisagé en fin de Chapitre I : soit un dessalage simple, soit une purification combinée à une séparation des analytes. L'ionisation par électronébulisation est sensible à la présence de sels et à la concentration de l'échantillon.¹ Il est donc primordial, au minimum, de dessaler et concentrer les solutions avant leur analyse. Un deuxième niveau de préparation est la séparation des analytes. Néanmoins, cette opération reste plus ardue à mettre en place sur un système microfluidique, comme nous le verrons par la suite.

Une première voie décrite dans la littérature consiste à utiliser un module externe au microsystème et connecté au microcanal à l'aide d'un capillaire de transfert. Ainsi, Figeys et al. ont-ils inséré une cartouche d'extraction en phase solide (SPE) commerciale entre la sortie du microsystème et la source de nano-électronébulisation (Figure 1).² Cette dernière solution induit la création de volumes morts et, de plus, est non optimisée puisque les raccords microsystème/capillaire sont effectués manuellement, ce qui exclut toute production en masse de dispositifs microfluidiques.

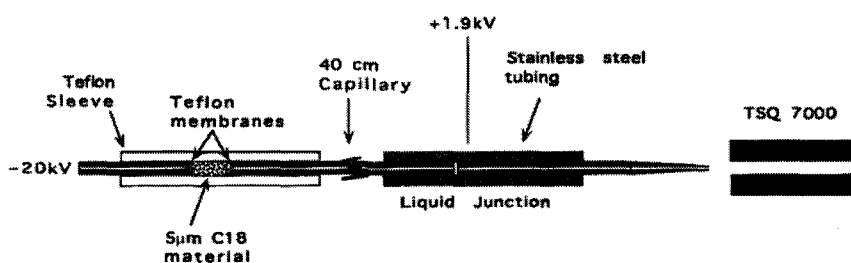


Figure 1 : Insertion d'une cartouche d'extraction en phase solide entre le microsystème et la source d'ionisation afin de réaliser un dessalage de l'échantillon avant son analyse par ESI-SM.

L'intégration du module chromatographique sur le microsystème est donc préférable. Dans ce cas de figure, il apparaît rapidement que le choix du module chromatographique et de son mode de fonctionnement est conditionné par les autres choix technologiques pour la réalisation du microsystème et, en particulier, par celui du mode de pompage des fluides.

B. Alternatives de la littérature pour la réalisation d'un module chromatographique sur microsysteme

1. Pompage par électro-osmose

La majeure partie des références bibliographiques pour des microsystèmes analytiques repose sur un mode de pompage électrocinétique régi par un champ électrique et un flux électro-osmotique. Ce type de pompage est, tout d'abord, plus facile à mettre en oeuvre à l'échelle d'un microcanal qu'un système mécanique induit par l'action de pistons. Ensuite, le profil de progression du liquide généré par un flux électro-osmotique est plat, ce qui a l'avantage de ne pas perturber la séparation de composés. A l'inverse, avec un pompage mécanique, le profil de progression est parabolique, ce qui s'accompagne théoriquement d'un étalement des composés et d'une diminution de la résolution en séparation.

Electrophorèse capillaire

Ainsi, une première possibilité de module chromatographique repose-t-elle sur une séparation par électrophorèse capillaire.^{3,4} Les molécules sont séparées sous l'action d'un champ électrique, le pompage étant électrocinétique, dans un microcanal « nu », i.e. dépourvu de phase stationnaire. La séparation est gouvernée par la mobilité des molécules. Cette dernière résulte des contributions électro-osmotique et électrophorétique, la première étant apportée par le flux électro-osmotique et la deuxième dépendant de la charge et du poids moléculaire de l'espèce. Cette technique de séparation est améliorée par le traitement des parois du microcanal et l'introduction d'un revêtement visant à promouvoir le flux électro-osmotique tout en réduisant les adsorptions non spécifiques éventuelles.⁵

Electrochromatographie

La technique d'électrochromatographie est une autre technique de séparation fonctionnant avec un pompage électrocinétique. Cette méthode de séparation "hybride" entre chromatographie et électrophorèse inventée au début des années 1970, combine des interactions avec une phase stationnaire comme en chromatographie et un écoulement des fluides régi par un champ électrique, comme en électrophorèse. Les phases stationnaires d'électrochromatographie sont donc identiques à celles de chromatographie classique, qui seront évoquées ci-après, si ce n'est qu'elles diffèrent par un ajout de charges de surface destinées à favoriser le flux électro-osmotique.

Une autre voie de séparation, qui a été décrite en format microfluidique est la chromatographie sur colonne ouverte (OTC pour *Open Tubular Chromatography*). Le microcanal est garni d'une

phase stationnaire en surface, i.e. un film épais qui tapisse les parois internes du microcanal. Ainsi, Jacobson et al. ont-ils introduit une phase de type film à partir de chlorodiméthyl-octadécylsilane.⁶ Le mode d'utilisation de ce dispositif chromatographique repose sur un pompage électrocinétique et rejoint celui de dispositifs d'électrophorèse capillaire sur une puce.

2. *Pompage non électro-osmotique*

Pour certaines applications, un autre système de pompage est préféré, un pompage externe, une actuation piézoélectrique, un pompage induit par des effets thermiques ou par la vibration d'une membrane, un pompage péristaltique... Dans ce cas, le microcanal doit être structuré et garni d'une phase stationnaire « vraie » afin de générer une grande surface d'échange et de créer une fonctionnalisation en vue des interactions avec les analytes en solution.

Particules poreuses

Les phases stationnaires conventionnelles sont constituées de billes poreuses, à base de silice ou polymère, sur lesquelles sont greffées les groupements impliqués dans la séparation, par exemple, des chaînes aliphatiques sur une phase inverse. Les particules sphériques sont tassées dans la zone choisie pour réaliser la future colonne (Figure 2), i.e. un capillaire ou une portion de microcanal.⁷

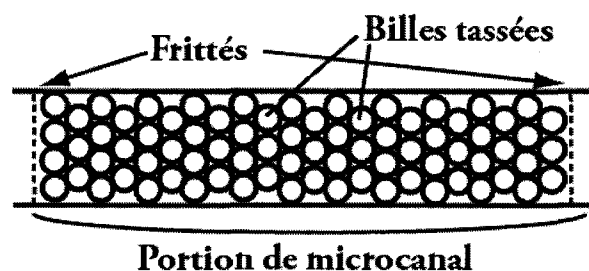


Figure 2 : Schéma d'un dispositif chromatographique constitué de billes poreuses tassées dans une portion de cale et définie par deux frittés.

Cependant, ces phases conventionnelles sont peu adaptées à des applications microfluidiques. En premier lieu, la préparation de la colonne est ardue : les billes sont difficiles à tasser dans une portion de microcanal, cette opération nécessitant une forte pression et la densité des billes étant mal contrôlée. En second lieu, des frittés sont nécessaires de part et d'autre de la colonne afin de maintenir les billes et de conserver leur densité de tassement. Ces frittés sont difficiles à créer ou à introduire dans un microcanal et leur obstruction est fréquente. Ils sont, de plus, le siège de formation de bulles d'air qui perturbent l'écoulement fluide et qui dégradent la qualité de la

séparation. Une alternative pour des applications de microsystèmes fluidiques est de créer une barrière microtechnologique à la fuite des particules. Les frittés peuvent être remplacés par un réseau de piliers empêchant la fuite des particules (Figure 3, en bas à gauche).⁸ Un goulot d'étranglement peut être créé au sein du microcanal (Figure 3, en bas et à droite).⁹ Enfin, les particules peuvent être placées dans un renfonceur usiné dans le microcanal (Figure 3, en haut).¹⁰ Néanmoins, dans les différents cas, le capotage du système est réalisé après introduction et tassement des particules dans le microcanal, ce qui peut restreindre le choix de la technique de scellement du couvercle.

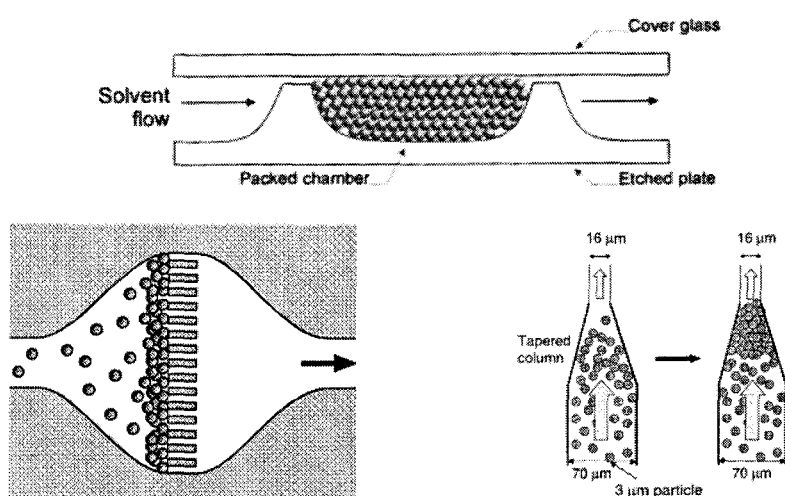


Figure 3 : Alternatives décrites dans la littérature pour remplacer les frittés conventionnels

En haut : les particules poreuses sont tassées dans une chambre creusée dans le microcanal : les parois en amont et en aval du dispositif chromatographique préviennent toute fuite des particules.¹⁰

En bas à gauche : une barrière micro-usinée et formée de piliers joue le rôle de frittés en aval de la colonne ; en amont, le flux pousse les particules contre cette barrière.⁸

En bas à droite : un goulot d'étranglement est créé en sortie du dispositif chromatographique pour retenir les particules poreuses.⁹

En troisième lieu, la résistance au transfert de masse avec ce type de phase stationnaire est très élevée et la colonne fonctionne sous une forte pression, ce qui est d'autant plus marqué que les particules sont petites et que leur tassement est dense. Par conséquent, ces particules ne sont pas compatibles avec un système de pompage microfluidique, non électrocinétique. Enfin, les billes ont typiquement un diamètre de 3-5 μm , dimension qui n'est pas adaptée à une descente en échelle des microsystèmes vers des microcanaux de la dizaine de microns de largeur et de

profondeur. L'utilisation de particules plus petites, de diamètre moyen de 1 μm , y remédierait mais elle s'accompagnerait néanmoins de l'accentuation des problèmes cités précédemment.

Structuration par voie microtechnologique d'un microcanal

Une autre alternative est d'utiliser une phase stationnaire micro-usinée dans le canal et constituée d'un réseau de plots ou piliers fabriqués par voie microtechnologique (Figure 4).^{11,12} Cette méthode élégante permet de s'affranchir des limitations observées avec les phases conventionnelles. De plus, le recours à des techniques de microtechnologie assure une très forte régularité et la reproductibilité des phases. Néanmoins, l'aire spécifique développée avec ce mode de structuration du canal n'est pas suffisante pour des applications chromatographiques.¹¹

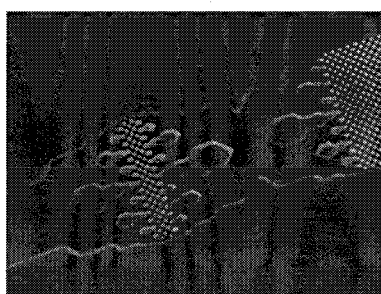


Figure 4 : Microstructuration d'un canal en PDMS : le dispositif chromatographique est constitué de piliers de 5 μm de largeur et de hauteur et les canaux sont de 3 μm de largeur. La même technologie sert à l'élaboration de frittés pour retenir les particules.¹³

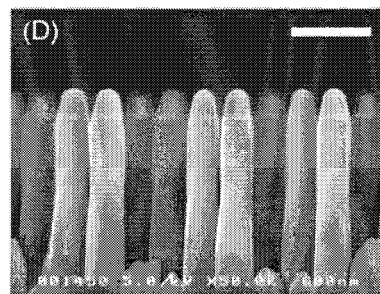
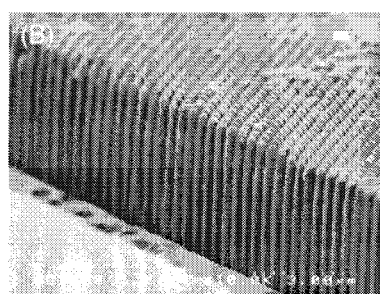


Figure 5 : Dispositif chromatographie destiné à la séparation de brins d'ADN en fonction de leur longueur. Le microcanal est garni d'un réseau de piliers régulièrement espacés et gravés dans le quartz à l'aide de techniques de gravure profonde.

A gauche : piliers de 4000 nm de hauteur et de 200 nm de largeur et d'espacement (rapport d'aspect de 20) ;

A droite, piliers de 1200 nm hauteur et de 200 nm de largeur et d'espacement (rapport d'aspect de 6).¹⁴

Il faut donc compléter cette approche par une fonctionnalisation plus complexe « en volume » de la surface générée sur les piliers. Les limitations de cette approche sont liées à la résolution obtenue en routine en microfabrication. Une structuration plus petite des microcanaux, à une échelle nanométrique, nécessite des processus de fabrication « lourds », complexes à mettre en œuvre (Figure 5). De plus, elle va de pair avec l'utilisation d'un matériau plus onéreux, comme le quartz, qui se prête au processus de fabrication.¹⁴

Phase stationnaire monobloc

D'autres phases stationnaires sont dites monobloc ou monolithiques pour les distinguer des phases particulières. L'optimal est de travailler avec une phase stationnaire de ce type présentant

une haute surface d'échange et préparée de façon locale dans le microcanal. Dans ce sens, une possibilité est d'utiliser une phase monobloc de type gel qui présente les fonctionnalités appropriées.^{15,16} Les gels sont cependant fortement sensibles au solvant utilisé, qui a une influence non négligeable sur leur gonflement et leur rétraction. Si le gonflement est trop important, l'écoulement du liquide n'est plus possible. Si, par ailleurs, la rétraction est trop marquée, la phase se décolle des parois et peut se déplacer. Il faut donc la maintenir en place, de même que les particules poreuses, à l'aide de frittés.

D'autres matériaux dits monolithiques, de nature inorganique¹⁷ ou organique,¹⁸ ne présentent pas cette sensibilité au solvant. Leur structure poreuse est permanente. Par conséquent, ces monolithes à base de silice ou de polymère se prêtent bien à des applications microfluidiques et ne présentent pas les inconvénients rencontrés avec des phases conventionnelles ou de type gel.

C. Notre choix

Nous avons choisi un mode de pompage non électrocinétique pour le microsystème dédié à une analyse ESI-SM, puisque un tel mode de pompage nécessite un ajout de charges en solution pour l'établissement du flux électro-osmotique et que ces charges sont incompatibles, ou tout du moins, perturbent l'ionisation par électronébulisation.

Comme nous l'avons vu précédemment, le choix d'un autre mode pompage impose la présence d'une phase stationnaire pour le module chromatographique, adaptée au contexte microfluidique. D'après la revue bibliographique précédente, l'optimal est d'utiliser un support monolithique, qui permet de s'affranchir des problèmes de frittés et de préparation des phases, puisque le monolithe est élaboré in situ et, éventuellement, localement, sur une zone bien définie. De plus, les propriétés physico-chimiques du support monolithique peuvent être modulées. Nous avons opté pour des monolithes de nature macromoléculaire, car leurs analogues inorganiques sont plus fragiles et présentent une tolérance moindre à des solutions chimiques agressives. En particulier, les phases à base de silice se dissolvent en milieu fortement basique. Ensuite, la chimie de surface de supports de type polymère nous est apparue plus facile à moduler. Un simple changement de la composition en monomères du mélange réactionnel permet de préparer des modules de chromatographie pour des modes de séparation/purification variés. Enfin, le contrôle spatial de la préparation des supports de type polymère est plus facile à mettre en œuvre que pour des supports à base de silice.

II. Les monolithes

A. Généralités

1. Matériau de nature macromoléculaire

Les monolithes macroporeux de nature macromoléculaire sont obtenus par polymérisation radicalaire. Ils présentent une structure poreuse permanente qui persiste même à l'état sec et qui est constituée de pores de tailles diverses et interconnectés.^{19,20} La rigidité de l'édifice global est assurée par une réticulation intense du matériau. Ces matériaux s'apparentent à leurs analogues sous forme particulaire, préparés en émulsion même si les processus régissant la formation de la structure poreuse ne sont pas les mêmes et si les propriétés de porosité ne sont pas les mêmes, pour une composition de mélange réactionnel, par ailleurs, équivalente.¹⁹

2. Porosité des monolithes

Les monolithes présentent une porosité bimodale, qui allie petits et larges pores.

Les larges pores, dont la taille caractéristique est de 600 à 3000 nm, interviennent dans l'écoulement des fluides à travers le matériau. Ainsi, la teneur en macropores est-elle directement liée aux propriétés fluidiques et à la vitesse d'écoulement à travers le matériau : elle conditionne la chute de pression ou le retour de pression obtenu sur la phase monolithique. Plus la teneur en macro-pores, ou macroporosité, du matériau est grande, plus la chute de pression aux bornes du matériau est faible, plus l'écoulement est facile et donc plus le débit de fluide est grand.

Les petits pores, dont la taille est inférieure à 2 nm, sont le siège des interactions moléculaires entre le support solide monolithique et les analytes ou molécules en solution. En effet, ils sont principalement responsables de la surface développée sur la phase monolithique : plus ces petits pores sont nombreux, plus la surface développée est grande. Les mésopores participent également à l'aire d'échange entre solution et phase solide. En revanche, les macropores n'ont aucune contribution sur cette surface d'échange.

L'idéal est donc de trouver un compromis, suivant l'application visée, entre les teneurs respectives en micro- et macropores qui vont respectivement donner soit une grande surface d'échange, soit des propriétés fluidiques intéressantes. Si l'écoulement est privilégié, la formation de macropores sera favorisée, en particulier, si la phase monolithique est destinée à des applications mettant en jeu de grosses molécules comme de longs brins d'oligonucléotides ou des protéines. Si, au contraire, la phase monolithique est dédiée à des applications de type

chromatographiques, une forte teneur en micropores sera nécessaire afin de promouvoir les interactions entre les analytes en solution et la phase stationnaire via une surface d'échange étendue. Ce ratio entre micro- et macroporosité du matériau monolithique peut être affiné et ajusté en modulant la composition du mélange réactionnel et en changeant les conditions et les paramètres de polymérisation.²¹

3. Perméabilité des monolithes ou propriétés d'écoulement

Les propriétés de macroporosité des monolithes se traduisent par une plus grande perméabilité du matériau, en comparaison avec des supports particulaires conventionnels.

Les phases stationnaires particulaires présentent de larges vides interstitiels entre les particules qui sont un chemin préférentiel pour l'écoulement des fluides à travers la phase.²⁰ Par ailleurs, la porosité intra-particulaire est plus faible et les interactions entre les composés en solution et la phase stationnaire sont uniquement régies par la diffusion des espèces au sein des particules. Il en résulte que le flux principal du liquide s'établit autour des particules et non à travers la phase fonctionnalisée, ce qui limite les interactions des composés en solution avec la phase stationnaire.

Les monolithes, à l'inverse, présentent une structure poreuse différente avec un meilleur équilibre entre micro- et macropores, ces deux types de pores étant, de plus, interconnectés entre eux de façon intime. Ainsi, le flux de liquide a-t-il lieu *à travers* la phase monolithique et les zones fonctionnalisées²⁰ et non *autour* de la phase, comme c'est le cas pour les phases particulaires. Cette caractéristique structurale des monolithes conduit, d'une part, à une diminution de la chute de pression observée de part et d'autre de la phase suite à une amélioration des propriétés fluidiques et, d'autre part, à un plus grand nombre d'interactions entre la phase stationnaire et les composés. La porosité totale des phases particulaires est estimée à 30 % environ contre 60 % approximativement pour une phase monolithique préparée à partir d'un mélange réactionnel contenant 60% volumique de porogène, ce qui justifie la perméabilité plus grande des phases monolithiques et leurs meilleures propriétés en écoulement.

4. Phénomènes de transfert de masse : diffusion vs convection

Dans un support conventionnel constitué de particules poreuses, les interactions dépendent uniquement de la diffusion des composés vers les groupements fonctionnels de la phase stationnaire, au sein des particules. Par contre, si le support monolithique renferme des larges pores de taille supérieure à 600 nm, il a été montré que des phénomènes de convection participent au transfert de masse en complément des phénomènes de diffusion.²²⁻²⁴ Le rendement

et l'efficacité du transfert de masse sont accrus, de même que les interactions entre la phase stationnaire et les composés.

Par ailleurs, d'après la loi de Hagen-Poiseuille, la résistance au transfert de masse peut être exprimée en fonction de la taille des macropores du monolithe à travers lesquels s'écoule le liquide :

$$\frac{\Delta P}{v} = \frac{8\eta L}{r^2}$$

où $\Delta P/v$ est la perte de charge par unité de débit de liquide, η la viscosité du liquide, L la longueur de la colonne et r la taille caractéristique des pores d'écoulement du liquide. Ceci démontre que la résistance au transfert de masse sur une colonne monolithique qui présente de plus larges pores, est moindre puisqu'elle varie de façon inversement proportionnelle au carré de la taille des pores.²⁵

Ces propriétés fluidiques conduisant à une amélioration du transfert de masse, sont de prime importance pour des applications mettant en jeu de grosses molécules comme des protéines qui ont des coefficients de diffusion très faibles.

Dans le cas d'un microréacteur de digestion basé sur un support monolithique pour l'immobilisation de l'enzyme, il découle de ce qui précède une plus grande efficacité de digestion si l'on utilise un support monolithique et non particulaire. En effet, l'étape limitante à la digestion est celle de la diffusion du substrat vers le site actif de l'enzyme. Si ce dernier est peu accessible et que le transfert de masse au sein du microréacteur est médiocre, l'efficacité apparente de digestion sera dès lors très faible. Si, par contre, le transfert de masse est promu, alors la digestion sera apparemment plus efficace.

Une autre application intéressante des phases monolithiques au regard de leurs propriétés de transfert de masse concerne les séparations par chromatographie. En effet, l'efficacité de la séparation est mesurée selon une hauteur de plateau théorique, H , qui s'exprime sous la forme de l'équation de van Deemeter :²⁶

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

où H est la hauteur de plateau théorique de la colonne, A , B , C des coefficients et u la vitesse linéaire de la phase mobile à travers la colonne. Cette équation tient compte de trois contributions principales à l'efficacité de séparation d'une colonne de chromatographie, et exprimées dans les trois termes. Le premier terme correspond à la dispersion d'Eddy de la colonne, le deuxième à la diffusion longitudinale des solutés et le troisième au transfert de masse. L'allure de ces trois contributions est donnée sur le graphe ci-dessous (Figure 6).

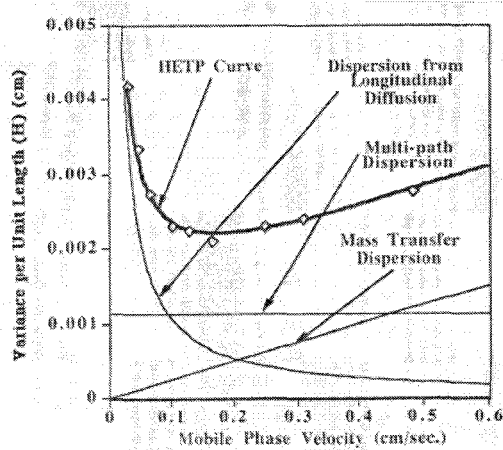


Figure 6 : Contribution des trois termes

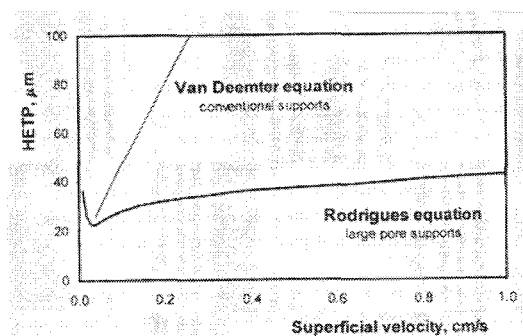


Figure 7 : Allure de $H = f(u)$ pour phases monolithique et particulaire

Comme pour les monolithes, le troisième terme est négligeable puisque les propriétés de transfert de masse sont bien meilleures qu'avec une phase conventionnelle, l'allure de la courbe $H = f(u)$ est plus plate pour des valeurs élevées de u . En d'autres termes, un accroissement de la vitesse du fluide ne détériore pas la qualité et la résolution de la séparation. Le graphe $H = f(u)$ est plus aplati pour des hautes valeurs de u , son allure atteint presque celle d'une droite, comme l'illustre la Figure 7.

B. Formation des monolithes

Les monolithes macroporeux de nature macromoléculaires sont obtenus par polymérisation radicalaire amorcée par voie thermique ou photochimique avec, respectivement, le chauffage ou l'irradiation UV du mélange réactionnel.

1. Composition du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel se compose typiquement de monomères mono-vinyls et poly-vinyls, d'un solvant appelé porogène et d'un amorceur radicalaire. A cet ensemble peuvent

aussi être ajoutées des particules, solubles ou non solubles ;²⁷ ces dernières permettent de modifier la porosité du matériau. Par exemple, la présence de « grosses » particules, qui sont éliminées en fin de processus de polymérisation, conduit à la formation de larges pores.

Les monomères

Les monomères sont de deux types, mono-vinyls et poly-vinyls. Les premiers portent la fonctionnalité définitive de la phase ou un groupement réactif mis en jeu ultérieurement lors de la fonctionnalisation du support monolithique. Les seconds, poly-vinyls, assurent la réticulation du matériau formé. Les monomères peuvent appartenir à différentes familles de composés, les composés de type acrylate,²⁸ de types vinyliques (styrène, divinylbenzène)²⁹ ou encore les éthers de vinyl.

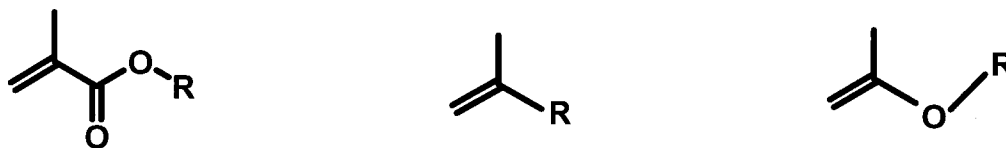


Figure 8 : Monomères utilisés pour la préparation de phases monolithiques.

De gauche à droite, les composés de type acrylate (ici, méthacrylate), de type vinylique et de type éther de vinyl.

Le porogène

Le porogène est un solvant ou, le plus souvent, un mélange de solvants inertes vis-à-vis du polymère en formation (alcools, hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques, cétones, éthers...). Le porogène contrôle les propriétés de porosité de la phase monolithique par sa teneur dans le mélange réactionnel et par sa composition. Plus la teneur en porogène dans le mélange réactionnel est grande, plus le matériau monolithique est poreux. Par ailleurs, son pouvoir solvant vis-à-vis des monomères, d'une part, et du polymère et des chaînes de polymère en formation, d'autre part, influe sur le déroulement des processus de polymérisation et, par conséquent, sur la morphologie du matériau obtenu. Ainsi, comme nous le verrons plus tard, le porogène et sa composition sont-ils choisis en vue de l'application visée pour le support monolithique et des propriétés de porosité désirées. En effet, il est possible de prédire le comportement du porogène vis-à-vis du polymère à l'aide des paramètres de solubilité du porogène et du polymère et de la différence entre ces deux valeurs, comme nous le verrons plus tard.

L'amorceur radicalaire

L'amorceur radicalaire utilisé pour la préparation de monolithes est classique. Il s'agit généralement de peroxydes tels que le peroxyde de benzoyle, le dipropylperoxydicarbonate ou de composés dits « azo » comme l' azobisisobutyronitrile, le 2,2'-azobis(isobutyramide)dihydrate. La nature de l'amorceur radicalaire est un facteur influençant également la distribution des pores au sein du matériau final de par sa réactivité.

Particules de polymère

Le mélange réactionnel peut également renfermer des particules de polymère, solubles ou non. Elles ne prennent pas part aux processus de polymérisation mais leur présence est un facteur supplémentaire de contrôle de la porosité. Solubles, ces particules se comportent comme un porogène de nature macromoléculaire ; elles sont dissoutes en fin de polymérisation par un lavage adéquat du matériau ou par une séquence de lavages. Ainsi, Remcho et al. ont-ils introduit dans leur mélange réactionnel, des billes de silice greffées avec des groupements octadécyl jouant le rôle de porogène.²⁷ Elles gouvernent donc la porosité du matériau. En outre, elles influencent le processus de polymérisation en orientant les monomères en solution via des interactions hydrophobes établies entre les monomères et les groupements octadécyl portés par les billes de silice. Non solubles, les particules ont pour rôle de limiter la contraction du matériau monolithique en fin de réaction. Dans ce cas, elles sont constituées de co-polymère réticulé de composition similaire à celui préparé. Globalement, la taille des particules de polymère ajoutées au mélange réactionnel est irrégulière et varie dans une gamme allant de 1 à 1000 µm. Il est préférable que ces particules n'interviennent pas dans les processus radicalaires de formation du monolithe ; elles sont donc isolées du mélange réactionnel à l'aide d'un solvant adéquat non miscible avec le mélange réactionnel. De ce fait, toute polymérisation est « prévenue » au sein des particules de polymère.

Ces différents constituants sont introduits dans le mélange réactionnel en des proportions contrôlées, variant sur une gamme définie. Les quantités sont ajustées en fonction des conditions de polymérisation et, surtout, en fonction des propriétés finales désirées. Tout d'abord, l'amorceur représente de 0,2 à 5 % en masse de la quantité totale de monomères introduite. Le volume de porogène correspond environ au volume poreux total final du matériau monolithique ; le volume de porogène est choisi en fonction de la porosité finale souhaitée. Typiquement, le mélange réactionnel comprend 40 à 90 %, voire plutôt, 60 à 80 % en volume de porogène. Par conséquent, le volume de monomères varie de 50 à 10 % du volume réactionnel total, avec une

préférence pour la gamme 20 à 40 %. D'autre part, les quantités respectives de monomères mono- et polyvinyliques jouent également sur la réticulation du monolithe, sur sa morphologie et ses propriétés de porosité. Le monomère polyvinylique est introduit à raison de 20 à 50 % molaires typiquement contre 50 à 80 % de monomères fonctionnels ; plus le ratio poly/mono est grand, plus le réseau est dense et plus la distribution de la taille des pores est décalée vers les plus faibles valeurs. Ces différentes proportions sont à ajuster en fonction des applications visées afin d'optimiser l'utilisation du support monolithique.

2. Protocole type de préparation d'un support monolithique

Dans certains cas, et, en particulier, pour des applications microfluidiques, un ancrage covalent du monolithe sur les parois internes du tube est requis.³⁰ Dans ce cas, les parois internes subissent un traitement chimique préalable à l'injection du mélange réactionnel consistant à introduire des réactifs hétérobifonctionnels qui réagissent, d'une part, avec les groupements situés en surface des parois internes et, d'autre part, lors de la polymérisation (acrylate, vinyle.....). Dans le cas de capillaires ou microcanaux en verre, silice fondue ou silicium, ce traitement de parois fait intervenir les groupements silanols présents en surface du matériau. Il est effectué à l'aide d'un monomère mono-vinylique présentant un groupement silane.³⁰

Une fois les capillaires ou microcanaux pré-traités, le mélange réactionnel est dégazé par bullage d'azote ou d'argon afin d'éliminer l'oxygène présent en solution. Ensuite, le mélange réactionnel est introduit dans un tube scellé, par la suite, en ses deux extrémités (ou tout « récipient » fermé). La réaction de polymérisation peut alors commencer ; le tube est soit chauffé (50 à 90°C), soit placé sous irradiation UV pour une durée à définir suivant la composition du mélange réactionnel, l'épaisseur à polymériser et d'autres paramètres réactionnels, sous atmosphère contrôlée si possible (argon ou azote). Une fois la réaction terminée, le monolithe est lavé abondamment afin d'éliminer toute trace de mélange réactionnel (porogène, amorceur, monomères n'ayant pas réagi éventuellement) et de dissoudre les éventuelles particules de polymère. Cette étape de lavage 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, acétone, toluène, par exemple. Une étape ultérieure de fonctionnalisation du support monolithique est possible en vue de l'introduction de groupements fonctionnels intéressants ou bien du greffage de molécules.

3. *Processus mis en jeu lors de la formation des monolithes*

La décomposition de l'amorceur marque le début de la polymérisation avec la formation des radicaux libres qui initient le processus de polymérisation. Les chaînes de polymère précipitent pour former des nuclei. Cette séparation de phases est due conjointement à deux phénomènes : d'une part, la réticulation du polymère, qui diminue la solubilité du matériau et, d'autre part, l'augmentation de la masse moléculaire des chaînes de polymère. Les monomères sont un meilleur solvant que le porogène, du point de vue thermodynamique, pour les chaînes de polymère en formation. Il en résulte un gonflement des nuclei dans la solution de monomères. La polymérisation continue principalement dans ces nuclei, où la concentration en monomères est la plus forte. Par conséquent, les nuclei grossissent suite à la capture de chaînes de polymère et à l'élongation de celles préexistantes au sein des microglobules. Les nuclei coalescent enfin, suite à leur interpénétration. Des clusters de nuclei, réticulés entre eux, se forment. Ces clusters restent dispersés, isolés dans la phase liquide et continuent de croître.

Dans les phases finales de la polymérisation, la taille des agglomérats est suffisamment grande pour qu'ils rentrent en contact avec un grand nombre de nuclei voisins, formant de cette façon une matrice interconnectée au sein du système de polymérisation. Cette matrice interconnectée est renforcée, d'une part, par la réticulation interglobulaire, et, d'autre part, par la capture des chaînes en cours de polymérisation dans la solution, ce qui conduit à un corps polymère poreux. Le volume poreux de ce polymère est, en fin de polymérisation, proche du volume de porogène introduit dans le mélange réactionnel initial. Ces processus de polymérisation et de formation de la structure macroporeuse sont influencés par différents facteurs expérimentaux tels que la température de réaction si la polymérisation est initiée par voie thermique, les teneurs relatives en monomères mono- et poly-vinylés, le porogène (composition et teneur) et enfin l'amorceur (qualité et quantité introduite). L'influence se manifeste, tout d'abord, au niveau de la vitesse de nucléation ou de la séparation de phases, qui est plus ou moins précoce. Ensuite, elle affecte la taille des globules formés et leur coalescence. Ceci se répercute, enfin, sur la porosité finale de la phase et la porosité intra-particulaire (liée à la réticulation du monolithe au sein des microglobules).

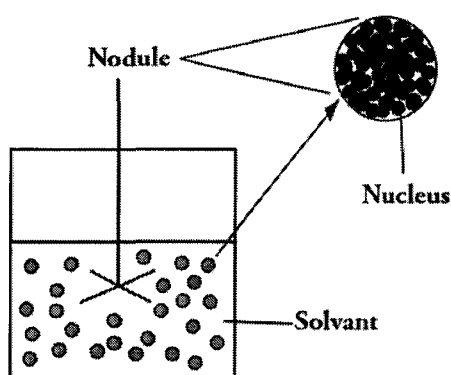


Figure 9 : Polymérisation en émulsion ou suspension : préparation de particules de taille plus ou moins calibrée

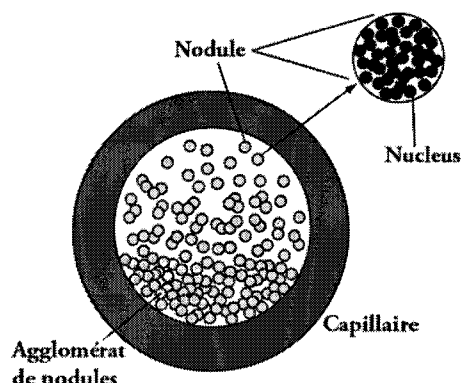


Figure 10 : Polymérisation en moule : préparation d'une phase monolithique dans un capillaire

Si le mécanisme de formation de pores mis en jeu lors d'une polymérisation en émulsion est bien documenté, la connaissance actuelle des facteurs qui contrôlent la taille des pores pour une polymérisation en moule reste encore fort empirique. En effet, la distribution de la taille des pores dans le deuxième cas, est décalée vers les larges pores, comparée à une polymérisation en émulsion, à mélange réactionnel équivalent (Figure 11).¹⁹

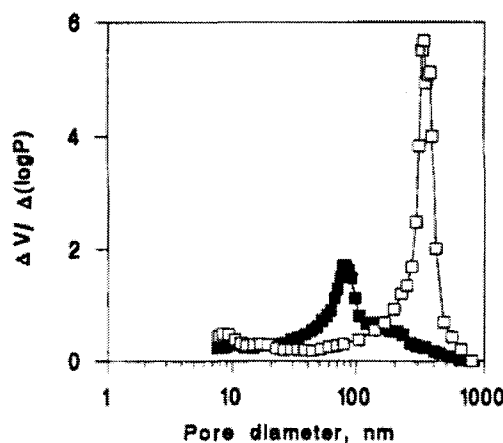


Figure 11 : Différence dans la distribution de la taille des pores pour une polymérisation menée soit en suspension (courbe noire) soit en monolithe (courbe blanche).¹⁹

Pour une polymérisation en émulsion, le volume du milieu réactionnel est largement supérieur à celui du polymère formé, alors que pour une polymérisation sous forme monolithique le volume du milieu réactionnel définit celui de la structure poreuse de polymère obtenue. Par conséquent, les processus de polymérisation respectifs diffèrent, en particulier, sur deux aspects. En moule, le

mélange est statique et il existe une seule phase, organique, alors qu'en émulsion, le mélange est sous agitation et il est biphasique. Par conséquent, il existe une tension à la surface liquide-liquide entre les deux phases, caractéristique d'une polymérisation en suspension ou en émulsion. La dynamique de la polymérisation n'est pas la même. Le deuxième aspect concerne la rétraction du matériau formé qui existe en émulsion et non, ou peu, en moule.

Dans le cas d'une polymérisation en moule, où le mélange réactionnel est statique (i.e. pas d'agitation), les nuclei dont la densité est plus grande que celle du milieu réactionnel, s'accumulent sur le fond du récipient. Ils y sédimentent pour donner une structure très poreuse, faiblement organisée, à ce stade de la polymérisation. Au fur et à mesure, ce manque d'organisation disparaît ; les nuclei viennent au contact les uns des autres. De nouvelles chaînes de polymère, qui les relient entre eux, croissent pour donner une matrice interconnectée. La polymérisation continue, à la fois en solution et dans les nuclei gonflés par des monomères. De nouveaux nuclei apparaissent et ceux préexistants grossissent. Il en résulte, d'après Fréchet et al., (i) une disparition des larges pores qui, en fin de polymérisation, dépend linéairement du taux de conversion des monomères et (ii) la perte d'individualité des nuclei suite à la capture de chaînes de polymère en formation et à leur gonflement. Cette perte d'individualité est plus précoce que pour une polymérisation en émulsion. Ainsi, en émulsion, les nuclei qui coalescent sont-ils plus organisés, plus denses et présentent-ils des pores plus petits qu'en moule.

Le deuxième aspect est l'absence de contraction radiale du monolithe à laquelle sont sujettes les particules préparées en émulsion. Ceci est dû, d'une part, aux interactions entre le monolithe et les parois du moule, en particulier si ces dernières ont été traitées au préalable, et, d'autre part, à l'absence de tension interfaciale conduisant à une compression du matériau au cours de sa formation. Notons que cette absence de contraction radiale explique le décalage de la distribution de la taille des pores vers les plus grandes tailles. Globalement, la contraction du monolithe est estimée à 6% seulement. Elle se produit, tout d'abord, en début de polymérisation sur des nuclei à peine formés. Ceci n'affecte pas la structure monolithique puisqu'elle n'existe pas encore. Ensuite, elle peut avoir lieu en fin de polymérisation, mais cette fois, la réticulation intense prévient toute modification de volume notable du monolithe et son « décollage » de la paroi.

En dépit de ces différences dans le déroulement de la polymérisation, l'influence de plusieurs paramètres réactionnels sur la structure finale du monolithe a été identifiée et décrite.

Effet de la température

Nous discuterons ici de l'effet de la température uniquement dans le cas d'une polymérisation radicalaire amorcée par voie thermique.

La température de réaction affecte conjointement le taux de nucléation et le pouvoir solvant du porogène, ce dernier effet étant, le plus souvent, négligeable. L'effet de la température se manifeste lors de l'amorçage de la polymérisation, dont l'énergie d'activation dépend de la température. Si la température de réaction est plus élevée, le nombre de radicaux libres formés augmente. Par conséquent, il y a plus de nuclei et de globules : le taux de nucléation est plus rapide que le gonflement des nuclei. A quantité initiale en monomères constante, la taille des globules est nécessairement plus petite et les pores ou vides interstitiels plus petits, ce qui explique le décalage observé dans la distribution de la taille des pores. Globalement, la taille des pores est inversement proportionnelle à la valeur de la température de polymérisation dans le cas d'un amorçage thermique de cette dernière. Notons que pour une polymérisation en moule, la température est plus basse, le taux de nucléation est donc plus faible, ce qui se traduit par la présence de pores plus larges dans la structure finale. Parallèlement, la qualité du solvant est légèrement affectée par un changement de température ; une élévation de la température augmente le pouvoir solvant, qui commande la séparation de phases et la formation des nuclei, et favorise ainsi la dissolution des chaînes de polymère dans le porogène.

De la même façon, un changement dans les conditions d'initiation photochimique modifie le processus de polymérisation, mais uniquement dans un sens, car le pouvoir solvant du porogène n'est *a priori* pas modifié. Ainsi, l'utilisation d'un photoamorceur plus réactif, plus puissant se traduit-il par un accroissement du taux de nucléation et donc un décalage de la distribution des pores vers les plus faibles valeurs. L'efficacité de l'amorceur peut, de la même façon, être modulée en changeant la longueur d'onde d'irradiation du mélange réactionnel : l'amorceur sera d'autant plus réactif que la longueur d'onde d'irradiation sera proche de son maximum d'absorption.

Effet de la composition du porogène

Le porogène est constitué d'un ou de plusieurs solvants. Leur comportement vis-à-vis des chaînes de polymère en formation joue sur le processus de polymérisation. La formation de la structure poreuse est conditionnée par la séparation de phase, conduisant à la précipitation des nuclei réticulés. Le porogène va donc influencer la structure poreuse du monolithe, par son pouvoir de

solvation, qui va gouverner l'apparition de la séparation de phase et par sa teneur relative dans le mélange réactionnel. Notons que le pouvoir de solvation global du porogène change durant la polymérisation puisque la composition du mélange réactionnel évolue, suite à la consommation des monomères et à la croissance des chaînes de polymère.

Si le porogène est un mauvais solvant pour les chaînes de polymère en croissance, la séparation de phase est précoce. Elle est provoquée par l'accroissement de la masse moléculaire des chaînes de polymère. La polymérisation continue uniquement au sein des nuclei qui coalescent pour donner des globules de taille supérieure. Ces derniers peuvent aussi absorber de nouveaux petits nuclei. Les globules qui forment la structure monolithique sont, dans ce cas de figure, plus gros et séparés par de plus larges vides. La structure monolithique poreuse renferme principalement des méso- et des macropores.

Si, au contraire, le porogène est un bon solvant pour le polymère, les petits nuclei et la solution de polymérisation sont en compétition pour le déroulement du processus de polymérisation. La séparation de phases est plus tardive. Elle est uniquement régie par la réticulation du matériau au sein des nuclei. Globalement, les nuclei sont plus nombreux et plus petits que dans le cas précédent. Cette fois la distribution de la taille des pores est caractérisée par une grande proportion de micropores. Le matériau présente une aire spécifique considérable et un faible volume poreux.

Par conséquent, le porogène utilisé se compose en général d'un bon solvant et d'un mauvais solvant pour le polymère afin que le matériau final allie micro- et macropores. Le bon solvant, ou microporogène, favorise la formation de micropores, alors que le mauvais solvant, ou macroporogène, celle de macropores. Le choix des teneurs respectives en bon et mauvais solvant permet d'ajuster les propriétés de porosité de la phase.

Effet de la teneur en agent réticulant

La teneur en agent réticulant ou monomères polyvinyliques affecte conjointement la porosité du matériau et sa composition chimique. Avec une teneur en agent réticulant plus importante, les globules qui apparaissent dans le milieu sont plus réticulés et la séparation de phases est plus précoce ; l'effet est identique à celui d'un solvant « pauvre ». Cependant, les nuclei qui sont plus réticulés ont moins tendance à coalescer. Les globules plus réticulés sont de moins bons solvants pour les monomères : la coalescence est moindre, les nuclei sont plus nombreux, plus petits et les pores sont, de même, plus petits. La distribution de la taille moyenne des pores est décalée vers

les plus faibles valeurs. Les matériaux monolithiques préparés avec un fort pourcentage en agent réticulant sont peu perméables et ne sont pas opérationnels sous des pressions raisonnables.

C. Applications courantes des monolithes

Les monolithes polymères rigides ont trouvé de nombreuses applications en raison de leur structure poreuse fixe, de leur plus faible résistance au transfert de masse et de leur aire spécifique élevée en comparaison avec d'autres matériaux poreux.

1. Phases stationnaires de chromatographie liquide à haute performance

Du fait de leur double porosité, les supports monolithiques sont utilisés comme phases stationnaires de chromatographie ; les larges pores servent à l'écoulement des solvants et les micropores sont le siège des interactions entre phase stationnaire et analytes.

Ces applications chromatographiques concernent différents types de séparations, des séparations en conditions normales^{31,32} ou inverses,^{33,34} des séparations basées sur des échanges d'ions³⁵ ou de l'affinité,³⁶⁻³⁸ entre autres. Du fait de la souplesse de ces matériaux en termes de fonctionnalité, une grande variété de phases stationnaires monolithiques est envisageable. Les phases inverses sont préparées à partir de monomères fonctionnels portant une longue chaîne aliphatique ou à partir de mélanges styrène/divinylbenzène,²⁹ les phases d'échanges d'ions à partir de monomères présentant un groupement chargé comme des groupements ammonium quaternaire. Ainsi, les monolithes ont-ils été utilisés pour des séparations de peptides,³⁹ de protéines,³⁴ d'oligonucléotides⁴⁰⁻⁴² et même de petites molécules organiques.⁴³

Un avantage majeur des phases monolithiques pour ce type d'applications est, outre leur souplesse en termes de fonctionnalité, la plus grande vitesse de séparation en comparaison avec des phases constituées de billes tassées, sans que cela ait pour autant des répercussions sur la qualité et l'efficacité de la séparation. Cette diminution des temps de séparation s'explique par la plus faible résistance au transfert de masse de monolithes.

2. Phases stationnaires d'électrochromatographie capillaire (ECC)

L'électrochromatographie capillaire est une méthode de séparation "hybride" entre chromatographie et électrophorèse. Cette technique repose sur des interactions avec une phase stationnaire comme en chromatographie, le déplacement des liquides étant induit par un champ électrique comme en électrophorèse. Pour favoriser la formation du flux électro-osmotique, la

phase stationnaire doit comporter des charges de surface, en plus de sa fonctionnalité propre. Les phases stationnaires monolithiques sont donc identiques à celles utilisées en chromatographie, mais elles présentent également des charges de surface introduites avec l'ajout de monomères chargés dans le mélange réactionnel; l'AMPS (acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique)⁴⁴ ou l'acide vinylsulfonique⁴⁵ ou le sulfate de 2-(acryloyloxy)-éthyltriméthylammonium méthyl.⁴⁶

3. *Bioréacteur enzymatique à haut débit*

Les monolithes sont aussi utilisés comme supports de microréacteurs et, notamment, de réacteurs enzymatiques où l'enzyme est immobilisée. Les monomères fonctionnels comportent des groupements réactifs, sur lesquels l'enzyme est ancrée une fois le support monolithique formé. Ces groupements réactifs sont, par exemple, (i) un cycle époxy qui s'ouvre en présence d'un groupement amine présent à la périphérie de l'enzyme,⁴⁷ (ii) une fonction hydroxyl, facilement oxydable en aldéhyde ou en acide carboxylique qui réagit de même avec une fonction amine⁴⁸ ou encore (iii) un groupement azlactone qui s'ouvre en présence d'une amine.⁴⁹

Le premier avantage des phases monolithiques pour ce type d'applications est encore la présence de macropores et leur plus faible résistance au transfert de masse. Un des problèmes majeurs rencontrés avec les supports traditionnels (type billes de silice) est, en effet, une diminution de l'activité apparente de l'enzyme immobilisée puisque l'étape limitante dans ces microréacteurs est la diffusion des substrats de haut poids moléculaire vers les sites actifs des enzymes. Dans le cas des monolithes fortement poreux, l'augmentation du transfert de masse par convection permet de surmonter ce problème. Des études comparatives ont montré que l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur les monolithes est toujours plus grande que celle immobilisée sur des billes de silice même si celles-ci sont choisies de taille suffisamment petites (11µm) pour minimiser l'effet de la diffusion sur la vitesse de la réaction de digestion.

4. *Autres applications des monolithes*

En dehors de celles citées précédemment, les monolithes ont trouvé plusieurs autres utilisations. Nous citerons brièvement, pour finir, leur utilisation comme phase solide de détection par chimio-luminescence.^{50,51} La chimio-luminescence du peroxyoxalate est utilisée pour une détection directe du peroxyde d'hydrogène à l'aide d'un groupement fluorophore, ici immobilisé sur un support monolithique. Les réacteurs reposant sur un support de type monolithique, préparé *in situ* par polymérisation, exhibent une efficacité deux fois plus élevée que ceux constitués de particules

fonctionnalisées et tassées. Cette différence d'intensité de fluorescence et de sensibilité de détection est corrélée aux propriétés physiques du matériau et à sa macroporosité plus élevée.

D. Monolithes et microfluidique

1. Avantages dans le contexte microfluidique

Ces dernières années, plusieurs articles sont parus décrivant l'utilisation de structures monolithiques pour des applications microfluidiques sur des microsystèmes.^{30,52} Ce type de supports présente de grands avantages dans un contexte microfluidique comparé à d'autres technologies plus classiques, ce qui explique leur succès pour de telles applications. Leur préparation est facile et ne nécessite pas de contrôle de la densité de tassement, ni de hautes pressions, ni de frittés. Le monolithe est préparé in situ par polymérisation radicalaire après injection du mélange réactionnel dans le microcanal ou dans un support capillaire. La réaction de polymérisation est alors initiée par irradiation UV du mélange réactionnel, afin de contrôler spatialement la formation du monolithe sur une longueur donnée. Ainsi, la préparation successive de différents supports monolithes, dans des zones définies, et dédiés à différentes applications (digestion, séparation...) est-elle possible. Les propriétés finales de la phase sont facilement ajustables, sa morphologie ou fonctionnalité mais surtout sa porosité afin de former une phase très perméable et adaptée à un système de pompage sur puce. A cette échelle de l'ordre du micron, une étape de traitement de parois préliminaire est indispensable afin d'assurer la covalence du monolithe dans son support, capillaire ou microcanal.³⁰

2. Applications en microfluidique

Phase de SPE

La première utilisation est la réalisation d'un module d'extraction en phase solide intégré sur un microsystème à partir de monomères acrylate.⁵³ L'extraction en phase solide a pour but de retenir sélectivement des analytes pour les libérer ultérieurement en solution plus concentrée. Son utilisation majeure est le dessalage ou la purification de solutions d'analytes conjointement à leur concentration. Les monolithes sont idéalement adaptés aux applications d'extraction en phase solide du fait de leur aire spécifique élevée qui leur confère une capacité élevée d'adsorption des analytes. Les excellentes propriétés de transfert de masse de ces monolithes ont fourni une capacité acceptable et même une vitesse d'écoulement remarquablement élevée.

Mélangeur

Une autre application originale d'une structure monolithique consiste en un mélangeur réalisé sur un microsystème :⁵⁴ la morphologie des monolithes et, en particulier, leurs propriétés de porosité, ont permis de créer un écoulement turbulent à l'intérieur de canaux des microsystèmes. Pour ce type d'applications, la structure monolithique préparée est très poreuse. La porosité totale est de 90 à 95 % en volume, puisque le but est de forcer le liquide à se séparer et à se rencontrer pour effectuer un mélange.

Phase stationnaire d'électrochromatographie

Une phase stationnaire d'électrochromatographie a été préparée dans un format microfluidique à base de monomères acrylate.^{55,56} Cette phase d'électrochromatographie, préparée à base de méthacrylates et d'AMPS comme monomère porteur de charge, a été éprouvée pour la séparation, dans des conditions de phase inverse, de peptides et d'acides aminés couplés à un groupement fluorescent. La détection est effectuée par fluorescence induite par une irradiation laser.

Valves

Les monolithes ont également servi de support, dans un microsystème fluidique pour la réalisation de valves en polymère thermosensible (polyNIPAAm), greffé sur le monolithe.^{57,58} Le polyNIPAAm exhibe une transition de phase à une température donnée nommée T_c ou température critique du matériau. En deçà de T_c , le polymère est hydrophile et gonflé, alors qu'au-delà de T_c , il devient hydrophobe et se rétracte. Le greffage de chaînes de polyNIPAAm dans un microcanal permet donc de réguler l'écoulement des liquides par un simple changement de température.

Microréacteur de digestion enzymatique

Enfin, un microréacteur de digestion enzymatique a été décrit dans une structure microfluidique.^{59,60} Le monolithe comprend des monomères vinyl-4,4-diméthylazlactone sur lesquels peut être immobilisée l'enzyme protéolytique, la trypsine, de façon covalente, de la même façon que dans un support macroscopique.

III. Etudes en support capillaire de phases inverses de séparation et dessalage

A. *Présentation des phases élaborées et du protocole de préparation*

1. *Nature des phases préparées*

Nous nous sommes principalement intéressés à la préparation de phases hydrophobes, dédiées à du dessalage ou de la séparation en conditions inverses. En effet, les phases usuellement consacrées à ce type d'applications sont constituées de billes poreuses fonctionnalisées en surface par des chaînes aliphatiques de longueur variable. Ces phases sont dites en C4, C8, C18 pour désigner la longueur de la chaîne carbonée greffée sur les particules. Nous avons appliqué cette stratégie pour la préparation de phases monolithiques en utilisant des monomères monovinylés avec un groupement fonctionnel de ce type, i.e. une chaîne aliphatique en Cn. Le monomère fonctionnel est un méthacrylate d'alkyl, le méthacrylate de butyl ou de lauryl pour la préparation de phases, respectivement, en C4 ou C12. Dans les deux cas, le monomère réticulant est le diméthacrylate d'éthylène. Les phases en C4 ont principalement été testées pour le dessalage d'échantillons biologiques et les phases en C12 pour de la séparation.

2. *Composition des mélanges réactionnels*

a. *Phases de dessalage*

Les phases de dessalage sont préparées à partir d'un monomère en C4, le méthacrylate de butyl et de diméthacrylate d'éthylène, introduits dans un rapport équimolaire. Le porogène utilisé a d'abord été ternaire et composé de pronan-1-ol, butanediol et d'eau dans divers rapports volumiques, puis binaire avec la suppression de la composante aqueuse pour donner un mélange pronan-1-ol/butanediol. Ces deux solutions, le mélange de monomères et le porogène sont ensuite mélangés dans un rapport volumique 70/30, le porogène étant introduit en plus grande quantité.

Le choix du porogène a été motivé par une publication de Fréchet et al. qui décrit l'utilisation de porogène ternaire pour la préparation de phases monolithiques en C4 par voie photochimique.³⁰ En effet, il ressort de la littérature que pour des polymérisations par voie photochimique, des porogènes plus légers peuvent être utilisés, avec des composantes plus petites comme des alcools courts, qui sont exclus des polymérisations par voie thermique du fait de leur plus forte volatilité. De plus, ici, le monomère fonctionnel en C4 est bien soluble dans ce mélange porogénique, ce qui n'est pas le cas de monomères ayant comme fonctionnalité une chaîne aliphatique plus longue. La composante aqueuse a été supprimée dans un second temps. En effet, l'eau est en

général ajoutée au porogène pour faciliter la solubilisation de monomères chargés, comme l'AMPS. Ces derniers sont introduits dans les mélanges réactionnels destinés à former des phases stationnaires d'électrochromatographie ; leur rôle est de favoriser le flux électro-osmotique. L'ajout d'eau est inutile ici, puisque le monolithe n'est pas destiné à des applications d'électrochromatographie et que le mélange réactionnel ne comprend pas de monomères chargés comme l'AMPS. Enfin, l'amorceur, l'azobisisobutyronitrile, est introduit à raison de 1-2% par rapport à la masse totale en monomères.

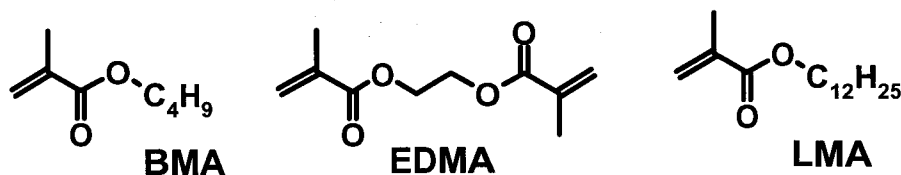


Figure 12: Monomères utilisés, ici, pour la préparation de phases monolithiques : l'EDMA ou diméthacrylate d'éthylène comme agent réticulant et les méthacrylates de butyl et de lauryl comme monomères fonctionnels.

b. Phases séparatives

Les phases séparatives sont préparées à partir d'un monomère fonctionnel plus hydrophobe, le méthacrylate de lauryl et le diméthacrylate d'éthylène comme agent réticulant. Ils sont introduits dans un rapport molaire différent, avec 35% mol d'agent réticulant seulement. Une teneur plus grande en agent réticulant conduit à la formation d'un réseau trop dense.

Divers porogènes ont été testés pour la préparation de phases en C12, comme le résume la Table 1. Tout d'abord, un porogène binaire constitué de petits alcools a été utilisé, un mélange méthanol/butanol, à l'image des phases préparées pour des applications de dessalage. Néanmoins, ces petits alcools se sont avérés peu adaptés pour la solubilisation du méthacrylate de lauryl qui présente une chaîne aliphatique plus longue que son analogue butyl. Nous nous sommes donc tournés vers un porogène ternaire composé de solvants plus lourds, le cyclohexanol et l'éthylène glycol, et d'eau. En effet, El Rassi et al. décrivent l'utilisation d'un tel mélange ternaire pour l'élaboration de phases d'électrochromatographie à partir de monomères en C17.⁴³ Ici, trois phases ont été préparées avec un porogène ternaire à base de ces trois constituants, introduits dans des proportions variables. Les compositions sont résumées dans la Table 1. Enfin, de même que pour les phases de dessalage, la composante aqueuse a finalement été supprimée du porogène du fait de l'absence de monomères chargés dans le mélange

réactionnel Notons, en effet, que l'eau est un très mauvais solvant pour le monolithe préparé et que sa présence influe fortement sur le déroulement des processus de polymérisation.

Pour les phases séparatives, la teneur volumique en porogène est de 60 à 65% pour une teneur en solutions de monomères respective de 40 à 35%. En effet, si la teneur en porogène est trop forte, la phase est trop poreuse et la séparation en est dégradée. Le liquide s'écoule à travers la colonne et interagit moins avec la phase stationnaire.

Enfin, de même que précédemment, l'amorceur, l'azobisisobutyronitrile (AIBN), est introduit à raison de 1-2% par rapport à la masse totale en monomères.

Table 1: Composition des mélanges réactionnels utilisés pour préparer des phases stationnaires monolithiques de chromatographie, à des fins séparatives.

	Composition du porogène	Teneur vol en porogène
Colonne 1	Butanol/Methanol 60/40	60%
Colonne 2	Cyclohexanol/Ethylène glycol/H ₂ O 77/20/3	65%
Colonne 3	Cyclohexanol/Ethylène glycol/H ₂ O 77/20/3	60%
Colonne 4	Cyclohexanol/Ethylène glycol/H ₂ O 75/20/5	60%
Colonne 5	Cyclohexanol/Ethylène glycol 80/20	60%

3. Protocole de préparation des phases monolithiques

a. Etudes préliminaires dans un support capillaire

Les études préliminaires de préparation et de caractérisation des phases monolithiques, avant le passage à des microcanaux usinés, ont été effectuées dans des capillaires standard. Ces capillaires en silice fondue sont transparents aux irradiations UV pour être compatibles avec une préparation de monolithes par voie photochimique ; ainsi, ces capillaires sont-ils couverts d'un revêtement téflon au lieu du revêtement polyimide conventionnel. Ils sont rigides au lieu d'être souples et la présence de monolithes peut être visualisée à travers le capillaire. Ce support capillaire est adapté à ces études préliminaires. Tout d'abord, les capillaires sont facilement

manipulables et se connectent sur les systèmes de pompage usuels, sur les chaînes de nanoLC, sur les pousses-seringues à l'aide de raccords UpChurch Scientific, aussi bien pour l'élaboration des phases que leurs tests ultérieurs. Ensuite, les dimensions des capillaires sont proches des dimensions des microcanaux dans lesquels seront réalisées in fine les phases monolithiques. Le capillaire utilisé ici a un diamètre externe de 360 μm pour un diamètre interne inférieur ou égal à 75 μm . Les colonnes capillaires monolithiques préparées ont une longueur de 15-20 cm pour mimer les colonnes commerciales (PepMap, LC Packings, i.d. 75 μm , L = 15 cm) et, de ce fait, faciliter la comparaison des performances observées.

b. Protocole détaillé de l'élaboration des phases

L'élaboration des phases monolithiques est effectuée selon un protocole standard, comme décrit précédemment.

Dans un premier temps, les parois internes du capillaire sont traitées, avant l'injection du mélange réactionnel, afin de garantir l'ancrage covalent de la phase monolithique dans son support capillaire. Cette étape de préparation des capillaires repose sur l'utilisation d'un agent de couplage hétérobifonctionnel qui réagit, d'une part, avec les groupements silanol présents sur la surface de silice fondue et, d'autre part, avec les monomères introduits dans le mélange réactionnel. Ici, l'agent de traitement de parois est le 3-(triméthoxysilylpropyl)méthacrylate. Le traitement de parois est composé d'une série de lavages séquentiels.³⁰ Après activation des parois successivement en milieu basique (NaOH pour hydrolyser les fonctions silanols) et en milieu acide (HCl), le réactif de traitement de parois est introduit dans une solution à 30 % volumique dans l'acétone.

Une fois les capillaires traités, le mélange réactionnel est préparé. Le porogène et le mélange de monomères sont constitués séparément, puis mélangés dans les proportions souhaitées. L'amorceur est ajouté et l'ensemble obtenu est soumis aux ultra-sons pendant 5 minutes puis dégazé à l'argon. Le mélange est injecté à l'aide d'un pousse-seringue dans le capillaire, qui, une fois rempli, est bouché et placé sous irradiation UV ($\ll = 365 \text{ nm}$) pendant 2 heures environ. Lorsque la polymérisation est terminée, le monolithe obtenu est lavé abondamment au méthanol pour éliminer toute trace du mélange réactionnel et séché à l'étuve une nuit (80 °C).

B. Etude physico-chimique des matériaux

1. Etude morphologique qualitative MEB

Dans un premier temps, les phases monolithiques obtenues ont été observées en microscopie électronique à balayage (MEB) : cette observation donne des informations qualitatives sur la morphologie du monolithe. A cette fin, les capillaires sont coupés proprement à l'aide d'un outil adéquat de façon à générer une section nette, qui est alors observée. Ici, nous avons utilisé un microscope dont le filament est à basse tension, ce qui permet de s'affranchir de l'étape préliminaire de métallisation du matériau.

Notons tout d'abord, que cette étude MEB permet de vérifier l'ancrage du monolithe dans son support capillaire. La Figure 13 représente une vue agrandie de la phase monolithique au voisinage de la paroi ; elle montre qu'il n'existe pas de larges fissures ou failles entre le matériau monolithique et la paroi du capillaire et que, par conséquent, le traitement des parois a été efficace.

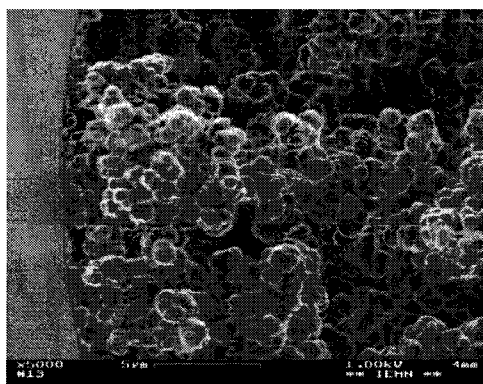


Figure 13 : Vue agrandie de la phase monolithique au voisinage de la paroi du capillaire : le monolithe est accroché de façon covalente sur la paroi, il n'y a pas de « failles » comme on l'observe en absence de traitement des parois du capillaire.

La Figure 14 présente les photographies de microscopie électronique obtenues pour trois des phases séparatives à base de LMA, les phases numérotées 1, 2 et 5 dans la Table 1. Ces photographies montrent la structure typique des matériaux monolithiques, formée d'un réseau de nodules connectés entre eux et formant une structure poreuse. La phase monolithique se situe au centre de la photo principale et est entourée d'une gaine de capillaire. L'encart en haut à droite montre une vue plus agrandie de la phase monolithique ($\times 5000$ contre $\times 1000$ pour la photo globale du capillaire), renseignant sur les tailles des nodules et des pores de la phase.

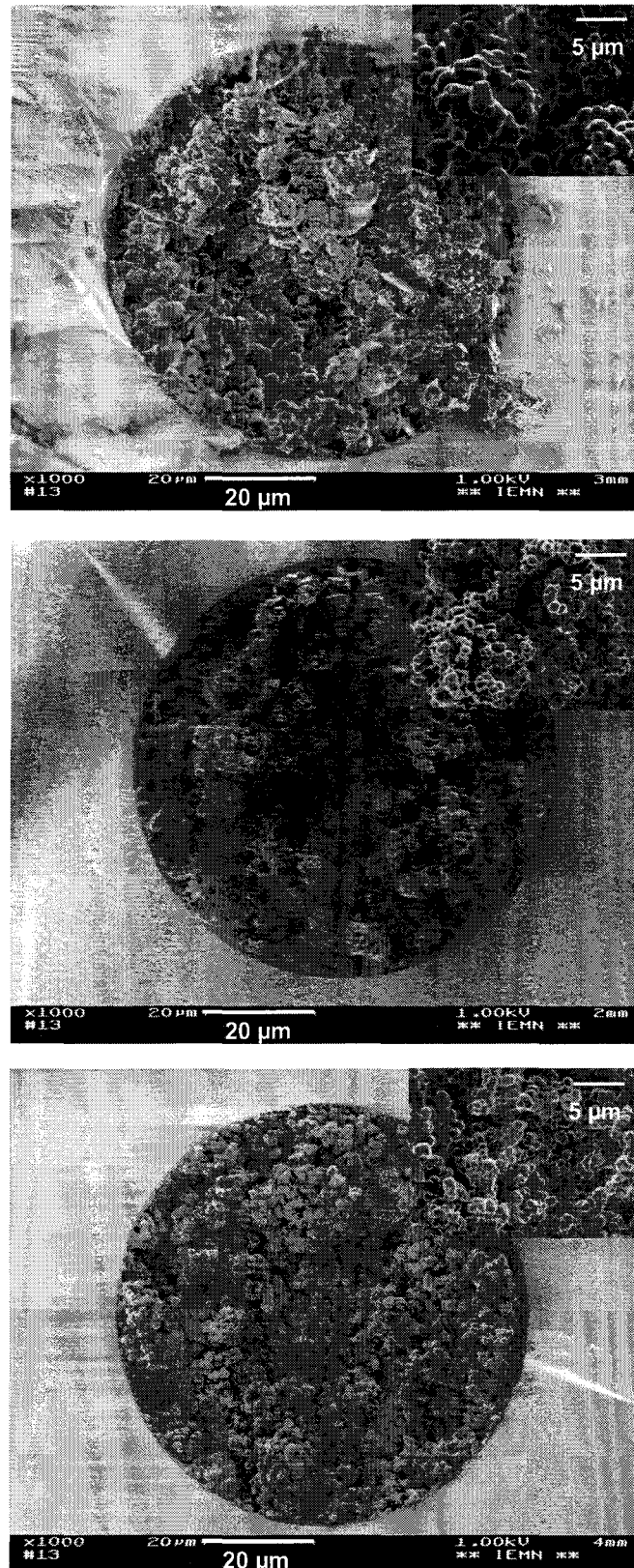


Figure 14 : Photographies de microscopie électronique des phases monolithique présentées ici (barre d'échelle 20 µm).

De bas en haut à droite ; phase 1, phase 2 et phase 5.

En encart ; vue agrandie du matériau (barre d'échelle 5 µm)

La phase 1, préparée avec un porogène binaire composé de petits alcools (MeOH/BuOH 80/20) dont la teneur dans le mélange réactionnel est de 60 %, présente une apparence non homogène ; elle mêle quelques rares petits nodules (0,6 μm) à une majorité de gros nodules (3 μm). D'autre part, la porosité apparente de la phase est élevée.

La phase 2, elle, préparée à partir d'un porogène ternaire (CyOH/EG/H₂O 77/20/3) introduit à raison de 65 % volumique dans le mélange réactionnel, présente une apparence toute autre. Le monolithe est constitué de tous petits nodules (0,35-1,2 μm), plus réguliers que précédemment. La forte teneur apparente en macropores est une signature du pourcentage volumique plus élevé de porogène dans le mélange réactionnel et laisse entrevoir une porosité intra-particulaire (micropores) faible voire nulle.

La phase 5, préparée avec 65 % volumique d'un porogène binaire composé d'alcools lourds (CyOH/EG 80/20), présente une apparence très homogène. Les nodules sont très réguliers en taille et en répartition sur la toute section du capillaire et quasi-sphériques ; leur taille est approximativement de 0,6-1,25 μm d'après la photographie de microscopie agrandie ($\times 5000$) placée en encart. L'apparence de cette phase est a priori « sympathique » pour des applications chromatographiques, puisqu'elle ne révèle pas l'existence de chemins préférentiels (macropores) pour l'écoulement des liquides, qui ne verraient de ce fait pas la phase stationnaire.

Notons enfin que la taille des nodules, estimée à partir de photographies MEB agrandies ($\times 5000$) pour les différentes phases, est inférieure à celle des particules poreuses standard, de silice ou de polymère, conventionnellement utilisées pour préparer des colonnes séparatives et ayant un diamètre d'environ 3 μm . Ceci illustre la compatibilité et l'adéquation des matériaux monolithiques pour la préparation de phases stationnaires dans des supports très étroits ($\sim 10 \mu\text{m}$). Par ailleurs, la perméabilité des monolithes reste supérieure à celle des phases conventionnelles du fait de la présence de macropores, facilitant l'écoulement des fluides.

2. *Etude en fluidique*

a. *Mesure de la perte de charge au cours d'une expérience de séparation*

L'allure typique de la perte de charge observée lors d'une expérience de séparation $P = f(t)$ est représentée en Figure 15. Elle se caractérise par un plateau en début et en fin de gradient et par une dépression apparaissant lorsque la teneur en acétonitrile dans l'éluant augmente ; ceci met en évidence le plus fort gonflement du monolithe en milieu aqueux que dans l'acétonitrile. La perte de charge renseigne sur deux propriétés de la phase monolithique, sa résistance à l'écoulement

donnée par la valeur maximale de la chute de pression et sa sensibilité à la composition de l'éluant donnée par l'amplitude de la dépression.

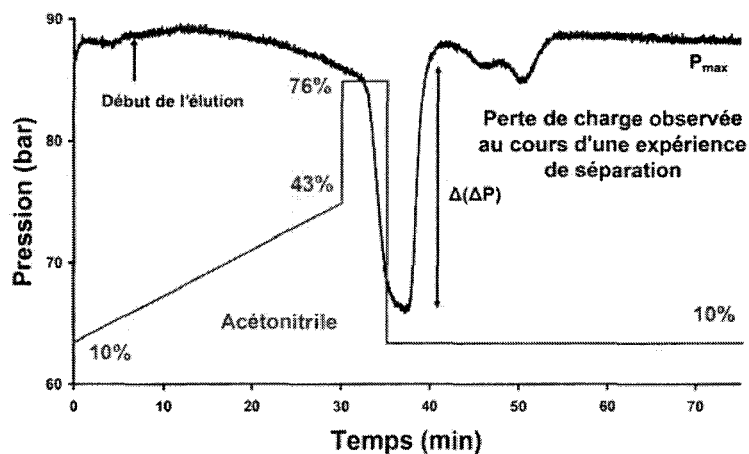


Figure 15 : Allure de la perte de charge observée lors d'une expérience de séparation sur une colonne monolithique

Les valeurs de la perte de charge maximale mesurée pour les 5 colonnes monolithiques discutées ici sont présentées dans la Table 3 ; ces valeurs varient dans une gamme allant de 40 à 90 bar environ pour des longueurs de colonnes de 14 à 19 cm, comme l'indique le tableau 3. Ces valeurs de chute de pression sont nettement inférieures à celle obtenue pour une colonne commerciale particulière (PepMap, LC Packings) qui est, elle, de 125 bar pour une longueur de 15 cm. Les plus faibles valeurs observées sur des colonnes monolithiques s'expliquent par l'existence d'une macroporosité dans ces matériaux, en opposition aux phases particulières. Ce caractère macroporeux confère à la phase une résistance à l'écoulement moindre. L'écoulement est favorisé suite à la plus forte porosité totale de la phase et à une meilleure répartition des pores. Plus la chute de pression est faible, plus la macroporosité de la colonne est élevée, puisque les chemins préférentiels pour le liquide sont plus nombreux et plus larges. Ce concept de macroporosité n'existe pas et ne s'applique pas pour une colonne particulière : le liquide s'écoule préférentiellement autour des particules et la chute de pression est plus élevée. La valeur de la chute de pression, seule, ne permet pas de comparer les colonnes monolithiques entre elles, puisque les longueurs des colonnes ne sont pas les mêmes ; il est donc préférable d'utiliser une grandeur rapportée aux différents paramètres géométriques des colonnes, comme la perméabilité de la phase monolithique.

b. Perméabilité des monolithes

Nous nous sommes intéressés à la perméabilité des phases monolithique présentées ici, entre elles d'une part, et comparé à une phase particulaire d'autre part. A cette fin, nous avons calculé pour les 6 colonnes, les 5 colonnes monolithiques et la colonne commerciale de référence, la perméabilité B_0 de la phase stationnaire en utilisant la loi de Darcy.

$$B_0 = \frac{\eta L Q}{A \Delta P}$$

Loi de Darcy

où B_0 est la perméabilité de la colonne, η la viscosité de l'éluant, L la longueur de la colonne, Q le débit de fluide à travers la colonne, A l'aire de la section de la colonne et ΔP la perte de charge mesurée aux bornes de la colonne et exprimée en Pa.

Pour le calcul de la perméabilité des colonne, nous avons utilisé les valeurs de η et de ΔP correspondant au plateau observé sur la courbe de la chute de pression (début ou fin de test), où la composition de l'éluant est 90,5 % d'eau et 9,5 % d'acétonitrile. La viscosité de cette solution a été calculée ; elle est égale à 0,94 mPa.s.

La Table 2 rassemble les dimensions des colonnes (L longueur, A aire de la section), les paramètres des tests de séparation (Q débit de liquide, ΔP chute de pression) ainsi que les propriétés physiques des colonnes qui ont été calculées.

Ces valeurs confirment d'abord la plus grande perméabilité des colonnes monolithiques comparées à celles conventionnelles, constituées de particules poreuses (colonne PepMap) et que le transfert de masse y est accru. Par ailleurs, ces valeurs sont en accord avec celles présentées dans la littérature.

Ensuite, les valeurs de B_0 calculées ont servi à estimer le diamètre moyen des pores ou de canal en utilisant l'équation de Kozeny-Carman.

$$d_p = 2 \times \sqrt{\frac{5 \times B_0}{\varepsilon_T}}$$

Equation de Kozeny-Carman

où d_p représente le diamètre moyen des pores, B_o la perméabilité de la colonnes et ε_T la fraction volumique poreuse. Cette dernière a été prise, en première approximation, égale, pour les colonnes monolithiques, à la fraction volumique de porogène introduit dans le mélange réactionnel, i.e. 0,6 pour une colonne préparée avec 60% volumique de porogène et 0,65 si la teneur en porogène était de 65% et égale à 0,3 pour la colonne dite conventionnelle (PepMap). Dans cette équation, le coefficient 2 est lié à la géométrie des pores, qui sont supposés cylindriques. Le facteur 5 est un coefficient empirique de Kozeny ; cette valeur reflète une structure composée de particules sphériques tassées. Les valeurs de d_p calculées pour les différentes colonnes sont aussi rassemblées dans la Table 2.

Table 2: Comparaison des cinq colonnes monolithiques entre elles et avec une colonne conventionnelle constituée de particules tassées PepMap; dimensions des colonnes (longueur L et aire de la section A), paramètres des tests de séparation (débit Q et valeur maximale de la perte de charge ΔP) ainsi que les propriétés physiques calculées pour ces colonnes (perméabilité B_o et diamètre de pores médian d_p).

	L (cm)	A (μm^2)	Q (nL/min)	ε_T	ΔP (Bar)	B_o (μm^2)	d_p (μm)
Colonne 1	17	$0,44 \times 10^4$	200	0,6	45	$2,69 \times 10^{-2}$	0,95
Colonne 2	19	$0,44 \times 10^4$	200	0,65	42	$3,22 \times 10^{-2}$	0,99
Colonne 3	14,5	$0,44 \times 10^4$	200	0,6	70	$1,47 \times 10^{-2}$	0,7
Colonne 4	19,5	$0,44 \times 10^4$	200	0,6	80	$1,73 \times 10^{-2}$	0,76
Colonne 5	17	$0,44 \times 10^4$	200	0,6	85	$1,51 \times 10^{-2}$	0,7
Colonne PepMap	15	$0,44 \times 10^4$	100	0,3	125	$0,4 \times 10^{-2}$	0,5

On note tout d'abord une corrélation entre les valeurs de B_o et d_p et des variations de ces valeurs intimement liées, ce qui est naturel puisque la valeur de B_o conditionne celle de d_p , diamètre moyen des pores.

Comparons tout d'abord les valeurs obtenues pour ces deux grandeurs pour les cinq colonnes monolithiques. La perméabilité B_o est la plus forte ($3,22 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$) pour la colonne 2 pour laquelle la teneur en porogène est la plus élevée, i.e. 65% volumique contre 60% volumique pour les autres colonnes monolithiques. La porosité totale est plus forte et il en est de même, par conséquent, de la perméabilité de la phase. La valeur de la chute de pression ΔP mesurée lors d'une expérience de séparation (42 bar) conforte ces résultats. De la même façon, pour cette colonne, le diamètre moyen des pores est estimé, avec l'équation de Kozeny-Carman, à 0,99 μm ,

valeur maximale pour cette série de colonnes. Vient ensuite la colonne 1, pour laquelle la perméabilité est de $2,69 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, valeur légèrement inférieure à celle de la colonne 2. Le diamètre moyen des pores est aussi assez proche, de $0,9 \mu\text{m}$, ainsi que la chute de pression observée, qui est de 45 bar. Les colonnes 3, 4 et 5 ont un comportement fluide assez proche ; les chutes de pression sont plus élevées, de 70 à 85 bar, et les valeurs de B_o et d_p sont voisines, respectivement de $1,5 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$ et $0,7 \mu\text{m}$ approximativement.

Comparons maintenant une colonne commerciale particulière aux colonnes monolithiques. Pour la colonne commerciale PepMap, l'ordre de grandeur des valeurs reste le même, mais les valeurs estimées pour la perméabilité B_o et pour le diamètre moyen des pores d_p sont beaucoup plus faibles, de $0,4 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$ (4 à 7 fois moins que pour une colonne monolithique) et $0,5 \mu\text{m}$ respectivement. Cette observation corrèle bien avec la plus forte chute de pression obtenue lors d'une expérience de séparation.

Notons néanmoins que l'équation de Kozeny-Carman varie selon la porosité totale de la phase, son type de structure et la géométrie des pores, ce qui intervient dans le choix de la valeur des coefficients. Ici, nous avons utilisé une forme de cette équation qui s'applique pour des phases de porosité moyenne et, en supposant une structure composée de billes sphériques régulières. D'après Vervoort et al., cette forme de l'équation de Kozeny-Carman n'est plus valide lorsque la porosité de la phase devient trop forte ($\varepsilon_T > 0,8$).⁶¹ Néanmoins, elle nous a permis de comparer les phases entre elles, d'étudier une tendance, plus que de calculer des valeurs précises et exactes des tailles moyennes de pores. Notons enfin que ces valeurs ne sont pas vérifiables sur les photographies de microscopie électronique ; ces dernières sont prises sur une phase à l'état sec alors que les valeurs de B_o et d_p sont calculées à partir de grandeurs mesurées au cours d'expériences de séparation ($\Delta P, Q$), la phase étant mouillée, voire gonflée dans du solvant ayant une viscosité donnée, η .

c. Utilisation des paramètres de solubilité

Les propriétés de porosité de la phase monolithiques peuvent plus ou moins être prédites à l'aide des paramètres de solubilité du porogène, d'une part, et du monolithe, d'autre part. Ces paramètres « mesurent » le pouvoir solvant du porogène vis-à-vis du polymère et, comme le pouvoir solvant du porogène influe sur le déroulement des processus de polymérisation, la connaissance des paramètres de solubilité du monolithe et du porogène permet de mieux appréhender les processus de polymérisation et d'expliquer les propriétés de porosité de la phase.

La théorie prédit que si le paramètre de solubilité du porogène est très différent de celui du polymère, alors le porogène est un mauvais solvant et il favorise la formation de macropores. Inversement, si les paramètres de solubilité sont proches, le porogène est un bon solvant et les petits pores sont favorisés dans la structure finale. Néanmoins, cette théorie des paramètres de solubilité s'applique plus particulièrement à des polymérisations en suspension et non en moule, puisque les processus de polymérisation ne sont pas tout à fait les mêmes et que les caractéristiques des phases en sont changées. Pour les polymérisations en moule, la distribution de la taille des pores est décalée vers des valeurs plus grandes. Néanmoins, une confrontation des résultats expérimentaux aux valeurs des paramètres de solubilité permet de faire le lien entre la qualité du porogène utilisé et les propriétés d'écoulement de la phase.

L'utilisation des paramètres de solubilité se limitera donc, ici, à la vérification et l'explication de certaines propriétés fluidiques observées. Nous avons calculé les paramètres de solubilité pour la phase monolithique LMA/EDMA 65/35 mol et pour les différents systèmes porogéniques utilisés. A cette fin, le modèle tridimensionnel de Van Krevelen a été utilisé ; il tient compte de trois composantes pour le paramètre de solubilité, une composante due aux forces de dispersion δ_d , une composante polaire δ_p et une composante due aux liaisons hydrogène δ_h .

$$\delta = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2}$$

$$\delta_d = \frac{\sqrt{F_{di}}}{V} \qquad \delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}^2}}{V} \qquad \delta_h = \frac{\sqrt{\sum E_{hi}}}{V}$$

δ : Paramètre de solubilité (MPa^{1/2})

δ_d : Composante due aux forces de dispersion (MPa^{1/2})

δ_p : Composante polaire (MPa^{1/2})

δ_h : Composante due aux liaisons hydrogène (MPa^{1/2})

F_{di} : Constante d'attraction molaire de la force de dispersion (MPa^{1/2}cm³.mol⁻¹)

F_{pi} : Constante d'attraction molaire polaire (MPa^{1/2}cm³.mol⁻¹)

E_{hi} : Energie cohésive (J.mol⁻¹)

V : Volume molaire (cm³.mol⁻¹)

Les valeurs de F_{di} , F_{pi} , E_{hi} et V ont été relevées dans les tables du *Handbook of Polymer*, édition 1999, de même que les paramètres de solubilité des solvants.

*Table 3 : Propriétés des cinq colonnes monolithiques présentées, en termes de porosité et des facteurs liés à la porosité : la composition du porogène, sa teneur dans le mélange réactionnel, la perte de charge observée de part et d'autre de la colonne en début et en fin d'expérience de séparation P_{max} , les paramètres de solubilité calculés pour la phase monolithique / *monolithe* et le porogène / *porogène*, le différentiel de paramètres de solubilité (φ) et enfin les paramètres de solubilité des solvants introduits dans le porogène / *solvants*.*

	Colonne 1	Colonne 2	Colonne 3	Colonne 4	Colonne 5
Composition du porogène	BuOH/MeOH	CyOH/EG/H ₂ O			CyOH/EG
	60/40	77/20/3	77/20/3	75/20/5	80/20
Teneur vol en porogène	60%	65%	60%	60%	65%
P_{max} (Bar)	45	42	70	80	85
Longueur L de colonne (cm)	17	19	14,5	19,5	17
/ <i>monolithe</i>	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
/ <i>porogène</i>	25,74	25,34	25,34	25,74	25,34
$(\varphi) =$ / <i>por</i> - / <i>mon</i>	8,24	7,84	7,84	8,24	7,84
/ <i>solvants</i>	/ BuOH = 23,1 / MeOH = 29,7	/ CyOH = 22,5 / EG = 32,9 / H ₂ O = 47,9			/ CyOH = 22,5 / EG = 32,9

Pour les cinq colonnes monolithiques, les paramètres de solubilité des porogènes sont assez semblables. Pour la colonne 5 cependant, le paramètre de solubilité du porogène est plus faible et plus proche de celle du polymère. Le porogène utilisé CyOH/EG 80/20 est donc globalement un meilleur solvant et il favorise plus la formation de micropores. Ceci est vérifié, puisque, pour cette colonne, la chute de pression observée était la plus forte et égale à 85 bar, d_p était de 0,7 μm et la perméabilité plus faible.

Pour la colonne 1, le porogène est a priori un mauvais solvant pour le polymère, puisqu'il se compose de petits alcools (MeOH et BuOH) qui solubilisent mal les monomères utilisés, et, en particulier le méthacrylate de lauryl. Ceci explique donc la faible chute de pression observée, de 45 bar, la forte perméabilité calculée à l'aide de la loi Darcy ainsi qu'un diamètre moyen de pores, estimé à 0,99 μm .

Pour les colonnes 2, 3 et 4, le porogène a une composante aqueuse qui est un très mauvais solvant pour les monomères non chargés, utilisés ici. Cette composante aqueuse va promouvoir

la formation de macropores. La teneur en eau est la même pour les colonnes 2 et 3, mais la quantité de porogène est plus grande pour la colonne 2, ce qui explique la plus forte perméabilité de cette phase et la chute de pression plus faible observée en dépit de sa plus grande longueur. Comparons les colonnes 3 et 4 : elles ont une porosité totale équivalente (60 %), mais la teneur en eau est plus importante pour la colonne 4, il y a plus de macropores et la perméabilité est plus grande. Les valeurs des chutes de pression ne sont pas significatives du fait de la différence de longueur de ces deux colonnes.

3. *Etude de porosité*

Différentes techniques sont disponibles pour étudier les propriétés de porosité des matériaux. Chaque technique a un domaine d'application propre et fournit des informations différentes et complémentaires sur la porosité des matériaux. Ces techniques sont regroupées en trois familles majeures, les techniques dites d'intrusion, celles dites d'extrusion et enfin celles reposant sur l'adsorption d'un gaz. La Figure 16 liste ces différentes techniques.

Techniques macroscopiques		
1. Extrusion de liquide	2. Intrusion de liquide	3. Adsorption de gaz
1.1 Porométrie d'extrusion de flux	2.1 Porosimétrie d'intrusion de mercure	3.1 Adsorption de vapeur
1.2 Porosimétrie d'exclusion	2.2 Porosimétrie d'intrusion sans mercure	3.2 Condensation de vapeur

Figure 16 : Techniques de caractérisation de porosité

Les paramètres de porosité accessibles sont nombreux et variés ; on peut déterminer la taille des pores (le plus petit pore, le plus grand pore et la valeur médiane de la taille des pores), la distribution des tailles de pores, l'aire de surface spécifique, le volume poreux total, la contribution à ce volume de chaque type de pores....Seule la combinaison de toutes les techniques d'étude de porosité permet de remonter à toutes ces grandeurs.

Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser la technique de « porométrie à flux capillaire » pour sa facilité de mise en œuvre et la disponibilité de l'appareillage nécessaire. En effet, la technique la plus courante pour caractériser les structures monolithiques est la porosimétrie à intrusion de mercure, qui est peu à peu abandonnée en raison de la toxicité du mercure. La technique de « porométrie à flux capillaire » est une technique dite d'extrusion. Elle consiste à remplir le

volume poreux avec un liquide mouillant qui est ensuite chassé par application d'une pression (Figure 17 à gauche). La valeur de la pression à exercer pour chasser le liquide de la structure poreuse permet de déterminer le diamètre des pores (Figure 17 à droite).

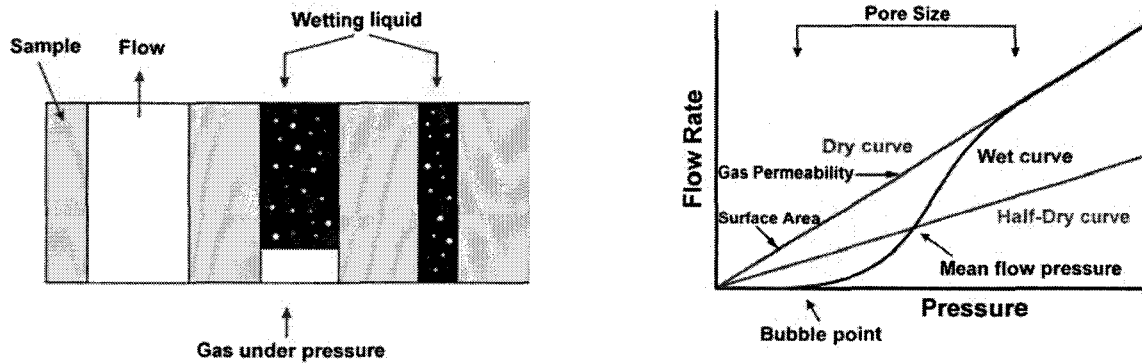


Figure 17 : Principe de la technique de porosimétrie à flux capillaire. Le matériau poreux est rempli de liquide mouillant qui est ensuite chassé du matériau par application d'une pression (gaz).

La courbe obtenue qui donne le débit de fluide (mesuré) en fonction de la pression exercée permet de remonter aux caractéristiques de porosité du matériau.

Une variante de cette technique est de jouer sur le caractère mouillant du liquide pour la phase étudiée, ce qui permet d'étudier le caractère plus ou moins hydrophobe des pores et cavités du matériau et la teneur en ces différents pores.

Ces études sont en cours ; nous n'avons pas encore reçu les résultats des analyses. Elles sont réalisées par la société PMI (Porous Materials Inc.) aux Etats-Unis (Ithaca, NY).

C. Etude en séparation des phases monolithiques

1. Protocole et conditions de test

Séparation

Les expériences de séparation sont menées sur des phases monolithiques plus conséquentes, préparées dans des capillaires et ayant des dimensions comparables à celles des colonnes conventionnelles, un diamètre interne de 75 μm et une longueur de 15 à 20 cm.

Table 4 : Liste des fragments présents dans le digestat de Cytochrome C commercial avec leur localisation dans la protéine, leur séquence, leur poids moléculaire, la valeur de leur point isoélectrique (pI) ainsi que leur degré d'hydrophobie dans l'échelle de Kyte-Doolittle et calculé à l'aide du logiciel *Expasy*.

Fragment	Séquence du fragment	Masse (M+H) ⁺	Point isoélectrique pI	Hydrophobie log P
56-73	GITWGEETLMEYLENPKK	2138,05	4,49	-0,961
56-72	GITWGEETLMEYLENPK	2009,95	4,09	-0,788
9-22	IFVQKCAQCHTVEK	1633,82	8,06	0,021
39-53	KTGQAPGFSYTDANK	1584,77	8,5	-1,187
40-53	TGQAPGFSYTDANK	1456,67	5,5	-0,993
26-38	HKTGPNLHGLFGR	1433,78	11	-0,877
89-99	GEREDLIAYLK	1306,7	4,68	-0,609
28-38	TGPNLHGLFGR	1168,62	9,44	-0,391
92-99	EDLIAYLK	964,53	4,13	0,212
80-86	MIFAGIK	779,45	8,5	1,6
74-79	YIPGTK	678,36	8,59	-0,567
9-13	IFVQK	634,39	8,75	0,82

Les colonnes capillaires monolithiques sont testées en couplage entre une chaîne de nano-chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse de type nanoESI-SM, ou couplage nanoLC-SM. La solution sortie de la colonne est donc analysée en ligne par spectrométrie de masse sur un appareil nanoESI-Q-q-TOF (API Pulsar QStar, Applied Biosystems). L'échantillon utilisé pour les tests en séparation consiste en un digestat de Cytochrome C commercial constitué d'une bonne douzaine de peptides (Table 4). L'intérêt de cet échantillon, couramment utilisé comme témoin sur les colonnes commerciales en vue de mettre au point les gradients de séparation, réside dans sa diversité : les peptides le constituant présentent des propriétés physico-chimiques variées (longueur et poids moléculaire, point isoélectrique, degré d'hydrophobie) ce qui

en fait un bon échantillon modèle pour la caractérisation de nouvelles colonnes. 800 fmol de ce digestat sont utilisés pour les premiers tests. Lorsque les résultats sont convaincants, la quantité injectée est diminuée d'un facteur dix, progressivement : 80 fmol, puis 8 fmol et ainsi de suite.

La chaîne de nanoLC utilisée (LC Packings Dionex, Pays-Bas) se compose de trois blocs. Un bloc de micro-pompe *Ultimate* muni d'un diviseur de débit *Accurate* servant à pomper les solvants au travers de la colonne. L'injection des échantillons est réalisée à l'aide du bloc *Famos*. Le dernier bloc du montage est le *Switchos*, prenant en charge l'étape de pré-concentration des échantillons sur une pré-colonne située en amont de la colonne de séparation. En général, 10 μL d'échantillon sont injectés sur la pré-colonne (PepMap pre-column, LC Packings Dionex, Pays-Bas) à l'aide d'une boucle d'injection dédiée à cet effet. La solution éluée est alors directement injectée sur la colonne de séparation. Ici, la majorité des tests a été effectuée sans pré-concentration préalable des échantillons. Dans ce cas, une boucle d'injection de 1 μL est utilisée : elle charge l'échantillon directement sur la colonne de séparation. Au cours des expériences de séparation, la perte de charge observée de part et d'autre de la colonne est mesurée à l'aide du premier bloc, *Ultimate*.

Les séparations sont effectuées dans des conditions de gradient de solvants, entre deux solvants consistant en des mélanges eau-acétonitrile et acidifiés avec 0,1% d'acide formique. Le solvant A est constitué de 95% d'eau pour 5% d'acétonitrile et le solvant B de 5% d'eau pour 95% d'acétonitrile. Dans un premier temps, le gradient utilisé est celui mis au point pour les séparations sur les colonnes particulières commerciales, PepMap. La teneur en solvant B est accrue de 5 à 50% en 30 minutes, puis, en 1 minute, de 50 à 95%. Cette composition de l'éluant est conservée pendant 5 minutes, puis la teneur en B est de nouveau diminuée à 5% en 1 minute. Pendant les 40 minutes suivantes, la colonne est laissée pour qu'elle se ré-équilibre avec un éluant contenant 5% en solvant B.

Ensuite, ce gradient a été affiné avec une montée plus lente en solvant B en début de gradient afin d'améliorer les performances en séparation, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. La montée en acétonitrile s'étale, pour ce gradient plus lent, sur 41 minutes contre 31 minutes pour le premier gradient testé.

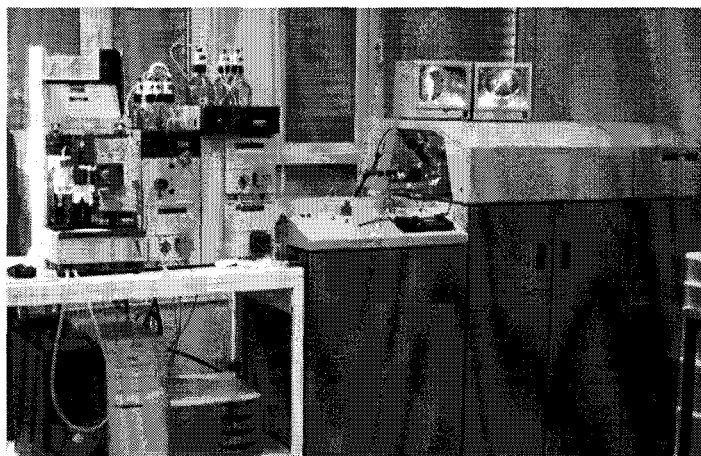


Figure 18 : Photographie du couplage nanoLC-SM. L'appareil de nanoLC provient de la société Dionex/LC Packings et le spectromètre de masse est un appareil QqTOF QStar Pulstar de la société Applied Biosystems

La détection en sortie de colonne est uniquement effectuée par spectrométrie de masse et non par UV : le détecteur UV est éteint. La spectrométrie de masse est d'une part plus sensible que la technique de détection UV et, d'autre part, elle est plus « complète » pour des analyses de peptides puisqu'elle fournit le poids moléculaire de l'espèce détectée ainsi que des informations structurales sur le peptide, comme sa séquence en mode de détection en tandem (SM/SM). La colonne capillaire est connectée à une source de nanoélectronébulisation (20 μm d.i. ; 360 μm d.e. ; 15 μm d.i. à son extrémité ; PicoTip, New Objective) par l'intermédiaire de 20 cm environ de capillaire standard en silice fondue et recouvert de polyimide (d.i. 20 μm ; d.e. 280 μm) et à l'aide de raccords en téflon optimisés pour éviter la création de volume mort. La position de la source de nanoélectronébulisation est ajustée à 1 à 2 mm devant l'entrée du spectromètre de masse.

La détection est effectuée en mode positif, la tension d'ionisation étant égale à 2,2-2,5 kV. Les spectres de masse sont enregistrés sur la gamme m/z 300-2000. L'acquisition des données est pilotée par le logiciel *Analyst* (Applied Biosystems) en mode IDA (pour *Information Dependent Acquisition*) avec un cycle de détection de 10 secondes. Les espèces détectées avec un niveau d'intensité supérieur à un seuil de 30 coups sont fragmentées à l'aide d'un gaz inerte, l'argon, l'énergie de collision relative fournie ayant été calculée en fonction de l'état de charge de l'espèce. Une fois sélectionnées pour la fragmentation et fragmentées, les espèces sont exclues de la sélection SM/SM pendant une minute : la fenêtre d'exclusion est définie avec un écart de $\pm 0,5$ Da autour de la valeur de m/z de l'espèce.

2. Résultats

a. Evaluation des performances des 5 colonnes

Les tests en séparation ont été menés sur 5 colonnes monolithiques capillaires différentes, présentées dans la Table 1 de ce chapitre. Elles sont toutes cinq à base de méthacrylate de lauryl et de diméthacrylate d'éthylène. Elles ne diffèrent entre elles que par la teneur et la nature du solvant porogénique utilisé. Le comportement fluidique et la morphologie de ces 5 phases ont été étudiés ; cette étude a révélé une forte disparité entre les différentes colonnes, liée à la qualité et à la composition du solvant porogénique utilisé pour leur préparation. L'influence du porogène se manifeste également au niveau de la qualité de la séparation du digestat de cytochrome c .

Colonne 1

La colonne 1, préparée à partir d'un porogène binaire à base de méthanol et de butanol, ne donne aucune séparation des fragments contenus dans le digestat de cytochrome c . Tous les peptides sont élués sous forme d'un pic très large dans le front de solvant, comme le montre la trace de la séparation obtenue sur le spectromètre de masse (Figure 19). Ce résultat corrèle bien avec les études de morphologie et de porosité précédentes. La phase monolithique 1 comprend principalement des macropores et très peu de micropores, la surface d'échange est faible et l'écoulement des fluides est facile. L'échantillon de cytochrome c passe donc à travers la colonne sans voir la phase stationnaire ; il n'est pas retenu sur la colonne et par conséquent, il n'est pas séparé.

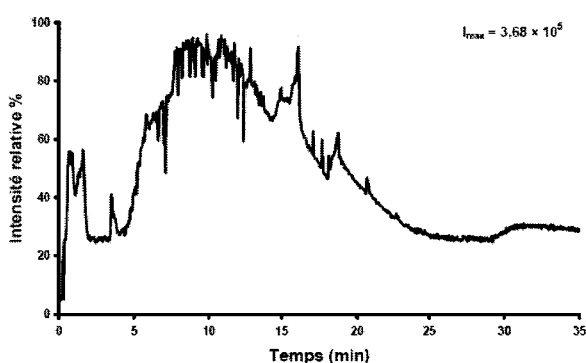


Figure 19 : Trace de la séparation obtenue en ESI-SM pour le test de la colonne 1 sur 800 fmol de digestat de Cyt C.

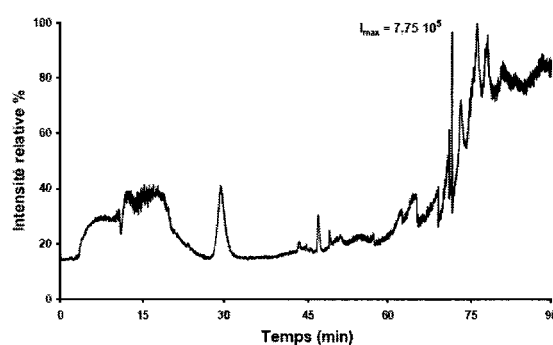


Figure 20 : Trace de la séparation obtenue en ESI-SM pour le test de la colonne 2 sur 800 fmol de digestat de Cyt C.

Colonne 2

La colonne 2 donne des résultats légèrement meilleurs. Les peptides les plus gros et hydrophobes sont retenus et séparés. Les autres sont élués dans le pic d'injection, comme le montre le graphe de séparation (Figure 20). Ici, encore, les observations précédentes corrélient avec ces résultats en séparation. La basse perte de charge mesurée sur cette colonne montre sa forte porosité, liée ici au pourcentage volumique élevé en porogène utilisé. Il en résulte une surface d'échange trop faible pour que la phase soit efficace en séparation ; les interactions entre la phase stationnaire et les composés en solution ne sont pas assez nombreuses pour que tout l'échantillon soit retenu sur la colonne monolithique. L'échantillon est partiellement séparé, les pics sont très larges. Néanmoins, cette expérience a montré que ce porogène ternaire, constitué de cyclohexanol, d'éthylène glycol et d'eau était intéressant du point de vue des propriétés de porosité de la phase. Introduit en quantité moindre, il devrait permettre la préparation de phases monolithiques avec un pouvoir séparateur plus grand.

Pour les trois autres phases, 3, 4 et 5, la trace obtenue en spectrométrie de masse pour la séparation du digestat de cytochrome *c* est belle et montre la séparation effective des différents fragments. Nous nous sommes alors intéressés à caractériser cette séparation en calculant les efficacités de séparation pour les différents fragments.

Colonnes 3 et 4

Ces colonnes donnent une assez bonne séparation des différents peptides présents dans l'échantillon de digestat de cytochrome *c* utilisé. Les Figures 21 et 22 ci-dessous représentent les traces de la séparation détectées en spectrométrie de masse.

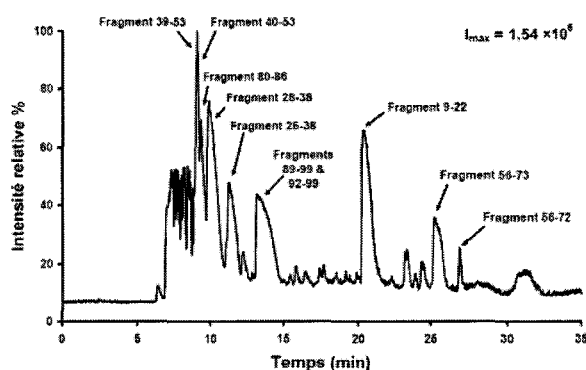


Figure 21 : Trace de la séparation obtenue en ESI-SM pour le test de la colonne 3 sur 800 fmol de digestat de Cyt C. T_0 est indiqué par une flèche en début d'éluion.

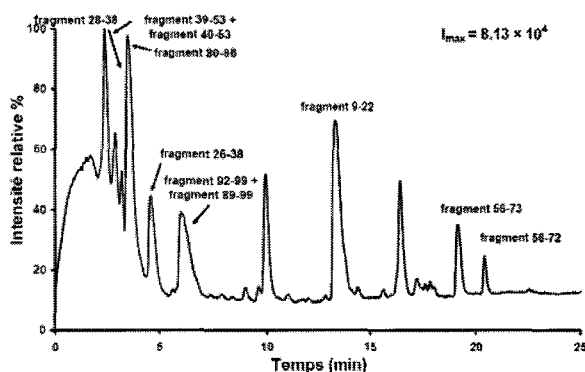


Figure 22 : Trace de la séparation obtenue en ESI-SM pour le test de la colonne 4 sur 800 fmol de digestat de Cyt C. T_0 est indiqué par une flèche en début d'éluion.

Pour chaque peptide, nous avons tracé le chromatogramme reconstitué ainsi que le spectre de masse correspondant ; ces deux graphes sont obtenus avec un « appel d'ion » sur le logiciel *Analyst*. Le premier nous a servi à déterminer précisément la valeur du temps de rétention du peptide ainsi que l'efficacité de la séparation. Nous avons choisi, non pas de calculer les temps de rétention absolus, à partir de $T = 0$ sur le chromatogramme, mais d'utiliser des temps de rétention relatifs, définis par $T_r = T_{\text{app}} - T_0$, où T_0 correspond au début de l'élution. Nous avons pu ainsi nous affranchir des temps morts et des volumes morts créés lors du couplage de la colonne monolithique au spectromètre de masse à l'aide d'une longueur de capillaire (environ 20 cm), ce capillaire conduisant à une sur-estimation des valeurs des temps de rétention. Les efficacités de séparation ont été calculées à l'aide de l'expression suivante, en supposant un profil gaussien pour les pics :

$$N_{\text{rel}} = 5.54 \frac{(T_r - T_0)^2}{w^2}$$

où $(T_r - T_0)$ et w sont respectivement le temps de rétention relatif et la largeur du pic à mi-hauteur et où N_{rel} est exprimée en nombres de plateaux absolus. Pour obtenir une efficacité exprimée en plateaux/m, cette valeur est divisée par la longueur de la colonne. Il est important de noter que l'utilisation de valeurs relatives de temps de rétention conduit à des valeurs des efficacités de séparation plus faibles que si elles avaient été calculées à partir de temps de rétention absolus (apparents) ; elles sont sous-estimées, en quelque sorte.

La Table 5 résume les résultats en séparation obtenus sur ces deux colonnes ; les efficacités de séparation sont données en nombre total de plateaux, ainsi qu'en nombre de plateaux par mètre.

Ces valeurs montrent néanmoins que le pouvoir séparatif de la colonne 3 est plus grand que celui de la colonne 4, en dépit de la longueur plus grande de la deuxième (colonne 4). Cette observation peut être corrélée à la composition des porogènes utilisés pour préparer ces colonnes ; la teneur en eau est plus importante pour la colonne 4 que la colonne 3, 5% vol contre 3% vol. Le rapport entre macroporosité et microporosité pour la colonne 4 doit, par conséquent, être plus grand et donner une phase moins séparative.

Table 5 : Table résumant les performances en séparation des colonnes monolithiques 3 et 4, avec les valeurs des temps de rétention relatifs ($T_r - T_0$), les efficacités relatives N_{rel} en nombre de plateaux pour la colonne et les efficacités relatives en nombre de plateaux par mètre.

Fragment	Colonne 3			Colonne 4		
	$(T_r - T_0)^a$ (min)	N_{rel}^a (10 ³ plateaux)	$N_{rel}^{a,c}$ (10 ³ plateaux/m)	$(T_r - T_0)^b$ (min)	N_{rel}^b (10 ³ plateaux)	$N_{rel}^{b,c}$ (10 ³ plateaux/m)
56-73	19,37 ± 0,30	28,6 ± 1,79	150,5 ± 9,42	18,51 ± 0,04	3,78 ± 0,15	26,07 ± 1,07
56-72	20,64 ± 0,27	92,68 ± 9,85	487,81 ± 51,83	20,15 ± 0,02	61,43 ± 2,08	423,66 ± 14,36
9-22	13,54 ± 0,35	5,285 ± 1,79	27,82 ± 9,40	13,49 ± 0,15	2,84 ± 1,19	19,62 ± 8,20
39-53	2,39 ± 0,18	3,79 ± 3,85	19,96 ± 20,24	2,20 ± 0,01	1,58 ± 1,13	10,89 ± 7,76
40-53	2,49 ± 0,19	7,18 ± 10,61	37,78 ± 55,84	2,28 ± 0,02	0,76 ± 0,05	5,26 ± 0,32
26-38	4,81 ± 0,27	1,46 ± 0,97	7,67 ± 5,10	4,68 ± 0,11	0,41 ± 0,13	2,83 ± 0,87
28-38	3,56 ± 0,20	1,21 ± 1,10	6,38 ± 5,81	3,28 ± 0,17	0,23 ± 0,03	1,60 ± 0,18
92-99	6,23 ± 0,18	0,75 ± 0,40	3,97 ± 2,08	6,55 ± 0,05	0,39 ± 0,05	2,72 ± 0,37
80-86	2,93 ± 0,17	3,10 ± 2,84	16,29 ± 14,97	2,56 ± 0,01	1,05 ± 0,006	7,27 ± 0,04

^a Valeurs moyennes et marges d'erreurs calculées sur trois test consécutifs

^b valeurs moyennes et marges d'erreurs calculées sur deux test consécutifs

^c Valeurs calculées par rapport aux efficacités en nombre de plateaux en tenant compte de la longueur de la colonne (19 cm pour la colonne 2 contre 14,5 cm pour la colonne 3)

Colonne 5

La dernière colonne testée est celle qui a donné les meilleurs résultats en séparation. La Figure 23 représente la trace de la séparation enregistrée sur le spectromètre de masse. Il montre que la majeure partie des peptides est bien séparée sur la colonne 5.

Les chromatogrammes reconstitués ont été tracés pour les différents peptides, ainsi que les spectres de masse correspondant. La Figure 24 ci-dessous représente les « appels d'ion » pour les Fragments 56-72 et 9-22 ainsi que les spectres de masse correspondant.

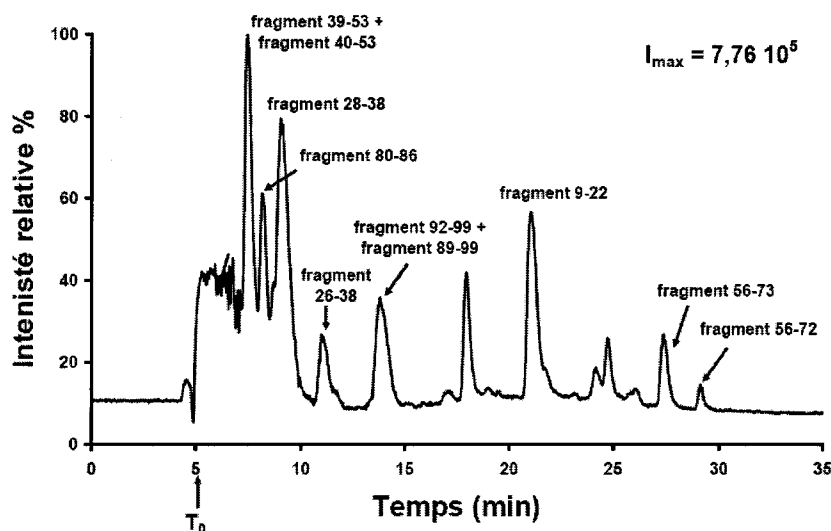


Figure 23 : Trace de la séparation obtenue sur la colonne 5 pour 800 fmol d'un échantillon de digestat de Cyt C. T_0 est indiqué par une flèche en début d'élution.

La reproductibilité des expériences inter-test a été étudiée ; les valeurs présentées dans la Table 6 reflètent trois tests consécutifs de la colonne dans les mêmes conditions avec la précision de la dispersion observée pour les résultats. Nous nous sommes aussi intéressés à la reproductibilité des expériences d'un jour sur l'autre ; les tests sont comparables en termes de temps de rétention et d'efficacité de séparation. Le tableau ci-dessous présente les résultats en séparation pour cette dernière colonne capillaire monolithique sur le digestat de cytochrome c à 800 fmol.

Les spectres de masse révèlent si les peptides sont co-élus ou non et si les pics sur le chromatogramme se chevauchent. Cette colonne 5 donne de très bons résultats pour la séparation des différents peptides du digestat de cytochrome c , les valeurs des efficacités calculées étant proches de celles observées avec une colonne conventionnelle PepMap. Cependant, les peptides les plus courts (Fragments 74-79, 9-13) sont élués dans le pic d'injection (ils ne sont pas indiqués dans la Table 6 qui rassemble les résultats en séparation) et deux fragments (Fragments 39-53 et 40-53) sont co-élus, comme le montrent les spectres de masse leur correspondant. Enfin, l'ordre d'élution des peptides est similaire à celui obtenu sur une colonne conventionnelle et suit les modèles standard,⁶²⁻⁶⁴ qui prédisent l'élution des espèces peptidiques en fonction de leur taille et de leur hydrophobie.

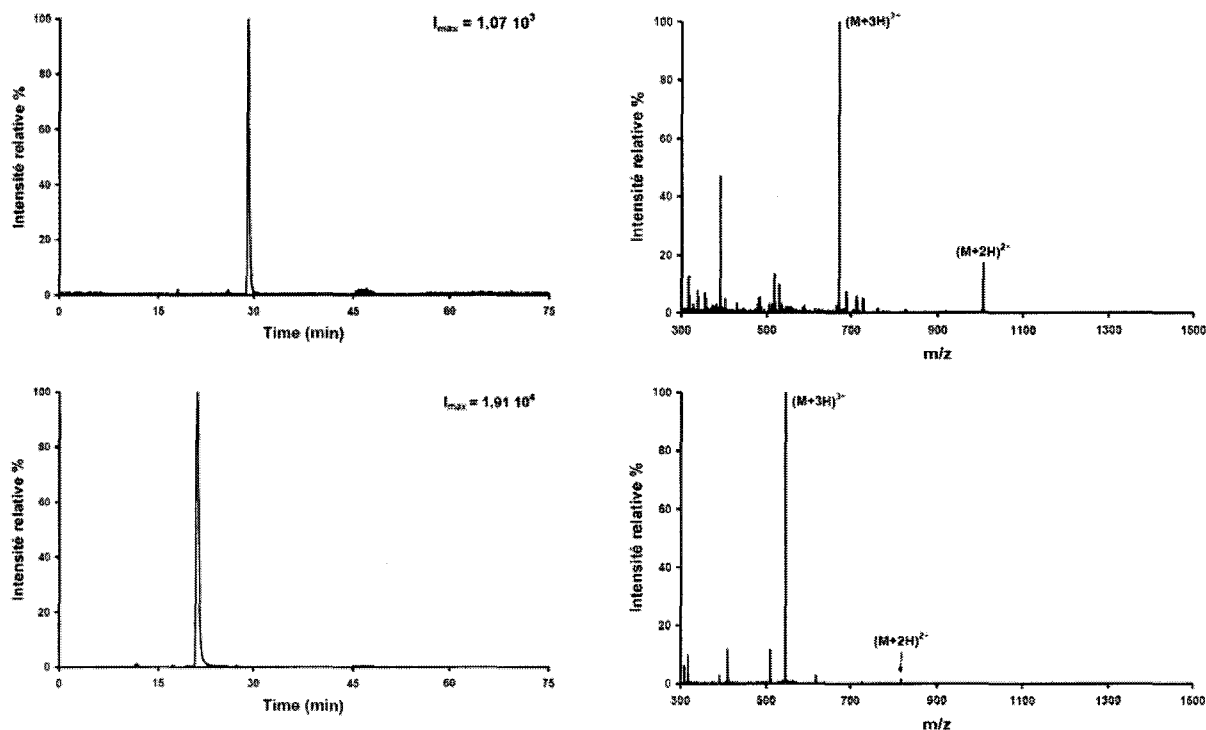


Figure 24 : Chromatogrammes reconstitués (à gauche) et spectres de masse correspondant (à droite) pour deux fragments du digestat de Cyt C pour une séparation effectuée sur 800 fmol d'échantillon.

En haut : Fragments 56-72 ($T_r - T_0 = 22,06$ min; $N_{rel} = 145$ u 10^3 plat/m)

En bas : 9-22 ($T_r - T_0 = 16,08$ min; $N_{rel} = 66$ u 10^3 plat/m).

Notons enfin que la rigueur impose de calculer des efficacités de séparation N , non pas lors d'expérience en gradient, mais en conditions isocratiques, contrairement à ce que nous avons fait, ici. Néanmoins, les résultats observés lors d'une séparation menée dans des conditions de gradient peuvent être corrélés à ceux obtenus dans des conditions isocratiques à l'aide du modèle LSS⁶⁵ afin de corriger les valeurs d'efficacité obtenues. Les résultats en séparation présentés dans la Table 6 corréleront bien avec ce modèle et la courbe $N_{rel} = f(T_r - T_0)$ donne une courbe exponentielle avec un facteur de corrélation de 0,9224.

Au vu des excellents résultats en séparation obtenus sur cette dernière colonne, nous avons poursuivi les tests en nanoLC-SM. Tout d'abord, la concentration en échantillon a été diminuée d'un facteur 10 et une expérience de séparation sur 80 fmol de cytochrome *c* a été menée. La trace en spectrométrie de masse de cette séparation n'est pas aussi belle qu'auparavant, l'échantillon étant plus concentré. Néanmoins, les différents peptides sont bien retenus sur la colonne et la séparation est effective. De même qu'auparavant, nous avons tracé les chromatogrammes reconstitués pour les différentes espèces peptidiques contenues dans le digestat, ainsi que les spectres de masse correspondant. La Figure 25 représente quelques-uns des

chromatogrammes reconstitués tracés pour les Fragments 56-73, 9-22, 28-38 et 92-99 du digestat de cytochrome *c*.

Table 6 : Résultats en séparation obtenus sur la colonne monolithique 5 pour 800 fmol de digestat de cytochrome *c* injecté directement sur la colonne.

Fragment	Temps de rétention relatif ($T_r - T_0$) (min) ^{a,d}	Efficacité relative N_{rel} (nombre de plateaux) ^{b,d}	Efficacité relative N_{rel} (10^3 plateaux/m) ^{c,d}
56-72	23,72 ± 0,32	49615 ± 7980	292 ± 47
56-73	22,03 ± 0,26	22599 ± 2761	133 ± 16
9-22	16,04 ± 0,04	9087 ± 2064	53 ± 12
89-99	9,16 ± 0,06	2452 ± 699	14 ± 4
92-99	8,79 ± 0,02	945 ± 33	5,6 ± 0,2
26-38	6,12 ± 0,12	881 ± 79	5,2 ± 0,5
28-38	4,18 ± 0,04	809 ± 332	4,8 ± 1,9
80-86	3,27 ± 0,09	1513 ± 854	8,9 ± 5
40-53	2,64 ± 0,09	532 ± 75	3,1 ± 0,4
39-53	2,49 ± 0,08	1038 ± 81	6,1 ± 0,5

^a Temps de rétention relatifs calculés à l'aide des chromatogrammes reconstitués et définis par $(T_r - T_0)$ où T_0 correspond au début de l'élution.

^b Efficacité relative de séparation en nombre de plateaux calculée à partir de la largeur du pic à mi-hauteur w et le temps de rétention relative. $(T_r - T_0)$; $N_{rel} = 5.54 \cdot ((T_r - T_0) / w)^2$

^c Efficacité de séparation en nombre de plateaux par mètre calculée à l'aide de la longueur de la colonne ($L = 17$ cm)

^d Dispersion calculée sur 3 tests consécutifs de séparation menés sur la même colonne et dans des conditions identiques.

Nous avons également calculé les valeurs des temps de rétention relatifs obtenus $(T_r - T_0)$ ainsi que les valeurs des efficacités de séparation relatives N_{rel} , en tenant compte de la dispersion observée entre les différentes expériences. Ces différentes valeurs sont rassemblées dans le tableau ci-dessous (Table 7). Globalement, les résultats sont similaires à ceux obtenus avec un échantillon plus concentré : les peptides les plus courts sont élués dans le pic d'injection et les Fragments 39-53 et 40-53 sont co-élus.

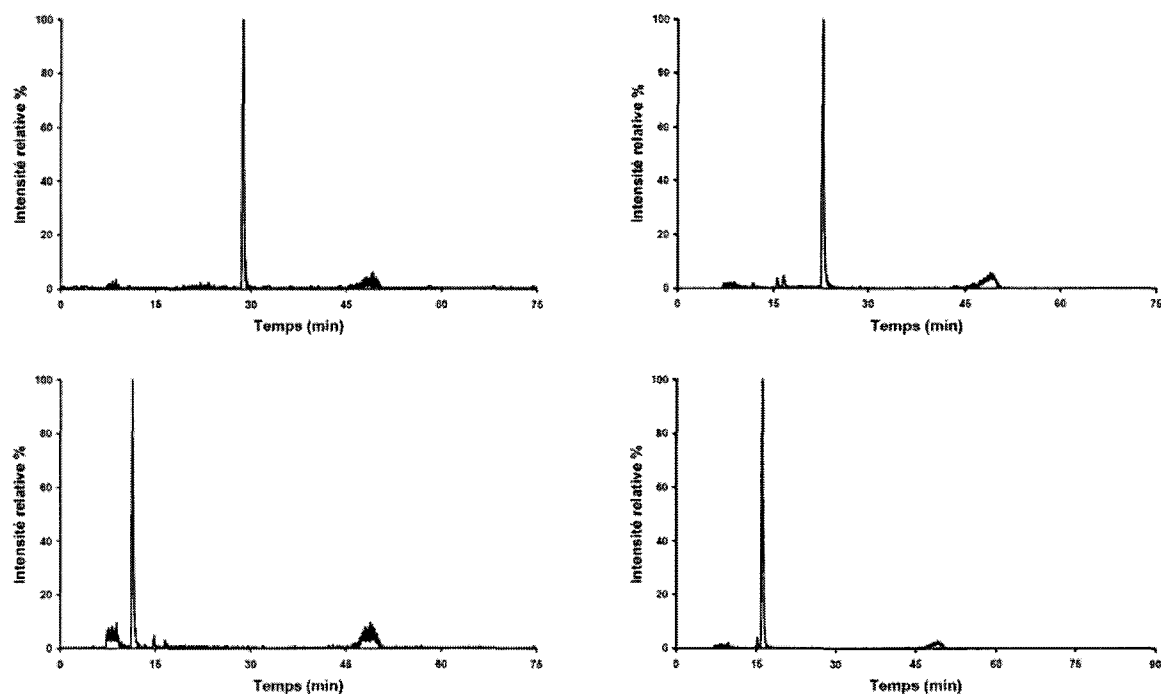


Figure 25: Exemples de chromatogrammes reconstitués pour plusieurs fragments du Cyt C lors d'une séparation en nanoLC de 80 fmol du digestat sur la colonne 5.

De gauche à droite et de haut en bas ; Fragment 56-73 ($T_r-T_0 = 21,68$ min; $N_{rel} = 325$ u 10^3 plat/m), Fragment 9-22 ($T_r-T_0 = 16,05$ min; $N_{rel} = 97,1$ u 10^3 plat/m), Fragment 28-38 ($T_r-T_0 = 4,58$ min; $N_{rel} = 9,5$ u 10^3 plat/m), Fragment 92-99 ($T_r-T_0 = 9,39$ min; $N_{rel} = 30,4$ u 10^3 plat/m).

Cependant, les efficacités de séparation N_{rel} calculées sont supérieures à précédemment, ce qui laisse penser que la colonne était saturée lors du test précédent effectué sur 800 fmol de digestat de cytochrome *c*. Le graphe $N_{rel} = f(T_r-T_0)$ correspond à une courbe exponentielle, représentée en Figure 26, avec un facteur de corrélation de 0,9567. Ceci montre que les résultats obtenus vérifient le modèle LSS qui corrèle les résultats dans des conditions de gradient avec ceux obtenus en conditions isocratiques.⁶⁴⁻⁶⁸ La valeur des efficacités de séparation en conditions isocratiques peut être estimée aux environs de 500 plateaux, d'après ce modèle et la courbe obtenue. Une conclusion qui s'impose alors, est que l'efficacité de séparation peut être améliorée si le gradient est modifié avec une montée en acétonitrile moins forte en début de séparation.

Table 7: Résultats en séparation obtenus sur la colonne monolithique 5 pour 80 fmol de digestat de Cytochrome C injecté directement sur la colonne.

Fragment	Temps de rétention relatif ($T_r - T_0$) (min) ^{a,d}	Efficacité relative N_{rel} (nombre de plateaux) ^{b,d}	Efficacité relative N_{rel} (10^3 plateaux/m) ^{c,d}
56-72	23,06 ± 0,04	43459 ± 5229	256 ± 31
56-73	21,65 ± 0,05	** ^e	** ^e
9-22	15,91 ± 0,11	16824 ± 3215	99 ± 19
89-99	9,17 ± 0,16	4485 ± 44	26,4 ± 0,3
92-99	9,11 ± 0,10	** ^e	** ^e
26-38	6,35 ± 0,12	2461 ± 44	14 ± 0,3
28-38	4,56 ± 0,05	1530 ± 189	9 ± 1,1
80-86	3,44 ± 0,07	504 ± 3	3,0 ± 0,02
40-53	2,68 ± 0,08	1002 ± 15	5,9 ± 0,09
39-53	2,54 ± 0,09	990 ± 30	5,8 ± 0,2

^a Temps de rétention relatifs calculés à l'aide des chromatogrammes reconstitués et définis par ($T_r - T_0$) où T_0 correspond au début de l'élution.

^b Efficacité relative de séparation en nombre de plateaux calculée à partir de la largeur du pic à mi-hauteur w et le temps de rétention relative. ($T_r - T_0$); $N_{rel} = 5.54 u ((T_r - T_0) / w)^2$

^c Efficacité de séparation en nombre de plateaux par mètre calculée à l'aide de la longueur de la colonne ($L = 17$ cm)

^d Dispersion calculée sur 3 tests consécutifs de séparation menés sur la même colonne et dans des conditions identiques.

^e Non déterminé

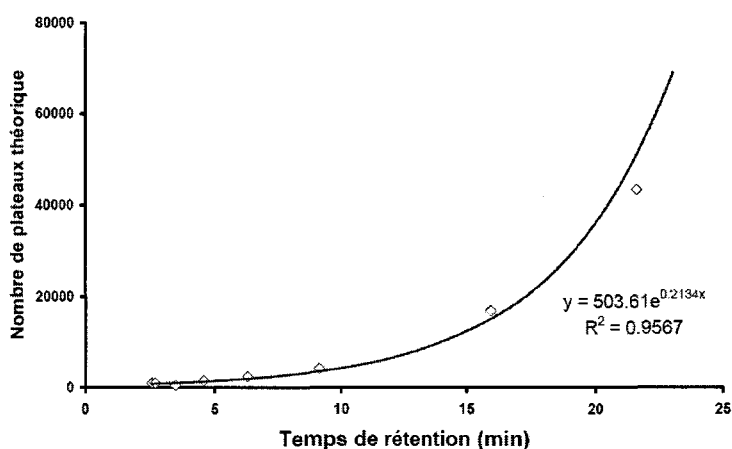


Figure 26 : Corrélation entre les valeurs d'efficacité de séparation calculées et les temps de rétention relatifs, en supposant une dépendance logarithmique des temps de rétention pour la gradient linéaire utilisé. Courbe de corrélation tracée pour une expérience de séparation menée sur 80 fmol d'un digestat de cytochrome c.

Suite à cette observation, le gradient a été changé ; la montée en acétonitrile est plus lente. En début de gradient, la teneur de solvant B est égale à 2%. Elle atteint 15 % en 15 minutes, de $t = 2$ min à $t = 17$ min, puis 50% à $t = 40$ min et enfin 95% en 1 min ($t = 41$ min). Après un palier à 95% pendant 5 minutes, elle est abaissée à 2%, son niveau de départ en 1 min. Désormais, les tests en séparation seront menés avec l'un des deux gradients, celui initial, appelé gradient « pentu » et ce nouveau gradient, dit « plat ».

b. Etude de l'influence de la longueur de la colonne

Nous avons étudié l'influence de la longueur de la colonne sur ses performances en séparation. A cette fin, quatre colonnes ont été préparées simultanément, à partir du même mélange réactionnel, celui ayant servi à l'élaboration de la colonne 5. Ces quatre colonnes ont des longueurs égales à 8, 16, 24 et 32 cm. Ces colonnes ont été testées dans des conditions similaires à précédemment, avec les deux types de gradients dits « pentu » et « plat », sur un échantillon de digestat de cytochrome c à 800 fmol, 80 fmol, 8 fmol et 0,8 fmol.

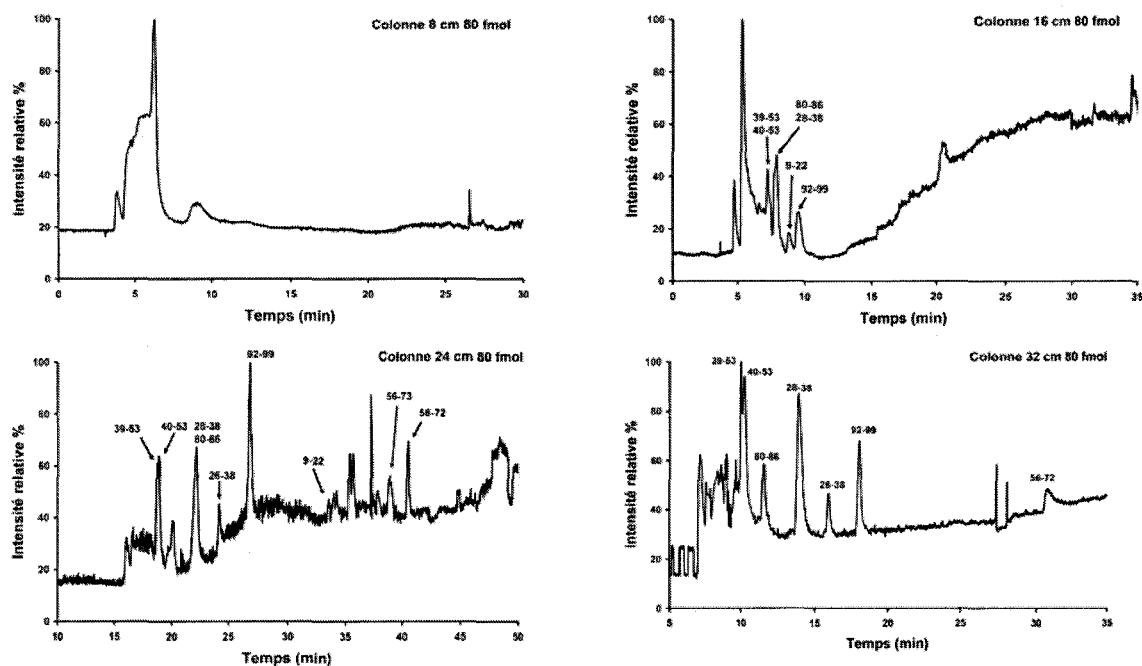


Figure 27 : Traces enregistrées en spectrométrie de masse des séparations effectuées sur quatre colonnes de longueurs différentes.

De gauche à droite, puis de haut en bas ; colonne de 8 cm, 16 cm, 24 cm puis 32 cm. Séparations menées sur 80 fmol de digestat de cytochrome c avec une montée rapide en acétonitrile (gradient « pentu »).

De même que précédemment, pour les différentes expériences en séparation, nous avons tracé les chromatogrammes reconstitués pour chaque fragment contenu dans le digestat modèle de cytochrome c . Ces graphes ont servi à déterminer le temps de rétention précis pour chaque

espèce ainsi que l'efficacité de séparation. Nous avons, une fois encore, utilisé des valeurs relatives, un temps de rétention relatif défini par rapport au début de l'élution ($T_r - T_0$) et une efficacité relative N_{rel} , calculée à partir de ce temps de rétention relatif, comme défini précédemment.

Les quatre colonnes de 8, 16, 24 et 32 cm, sont comparées ici pour la séparation de 80 fmol de digestat de cytochrome c , en utilisant un gradient de séparation « pentu » (montée rapide en acétonitrile), comme pour les expériences décrites précédemment. La Figure 27 présente les traces des séparations enregistrées par spectrométrie de masse pour les quatre colonnes. Ces expériences de séparation ont également été réalisées pour 800 fmol de digestat de cytochrome c mais les résultats ne sont pas détaillés ici. Pour les colonnes les plus courtes, ce graphe n'est pas « beau » et les fragments n'apparaissent pas de façon visible sur la trace globale de la séparation. Néanmoins, les différents fragments se retrouvent lors des appels d'ions aux valeurs de m/z correspondantes, ce qui permet de tracer les chromatogrammes reconstitués de chaque ion. La qualité de la séparation peut ainsi être évaluée.

La longueur de la colonne influence clairement la qualité de la séparation, comme le montrent les traces présentées en Figure 27. La colonne de 8 cm de longueur ne sépare pas bien tout le digestat de cytochrome c . Seuls 4 fragments (Fragments 56-75, 56-73, 9-22 et 92-99) sont séparés. Les autres fragments sont élués dans le pic d'injection.

Les Figures 28 et 29 illustrent les résultats en séparation obtenus sur la colonne de 8 cm pour des séparations de 80 et 800 fmol de digestat de cytochrome c . Les fragments du cytochrome c séparés ne sont pas identifiables sur la trace totale de la séparation mesurée en spectrométrie de masse pour une injection de 80 fmol de digestat de cytochrome c . Néanmoins, les appels de ces ions montrent leur séparation effective. Par contre, lorsque 800 fmol de digestat sont injectés sur la colonne, la trace enregistrée en spectrométrie de masse présente des pics correspondant à l'élution des fragments séparés. La qualité de la séparation est globalement la même pour une injection de 800 et de 80 fmol de digestat.

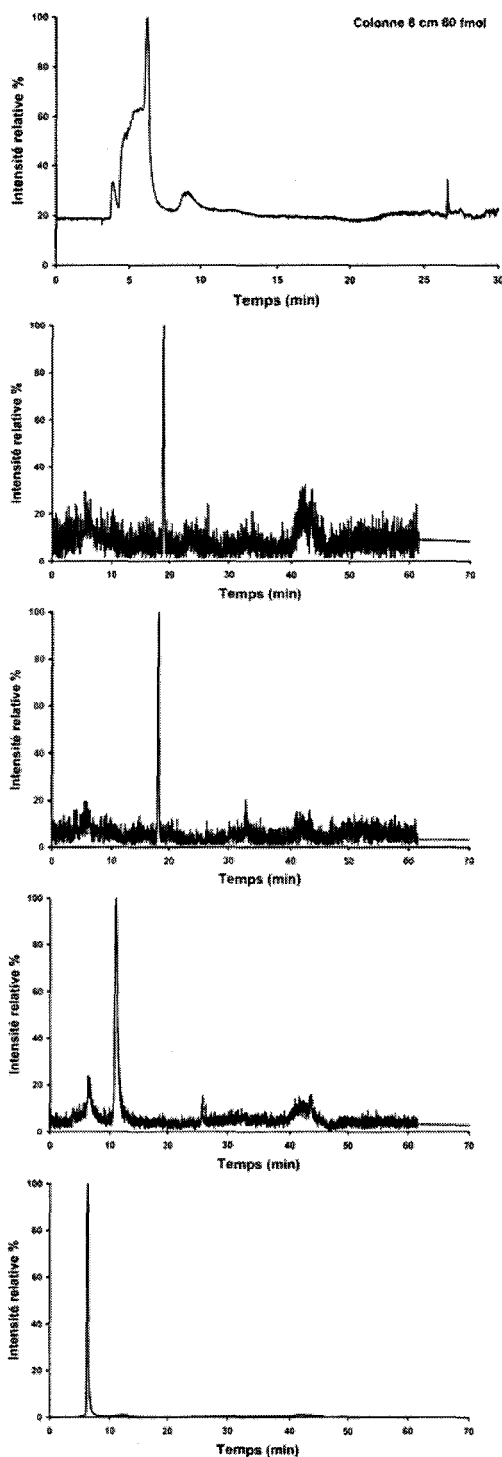


Figure 28 : Séparation de 80 fmol de digestat de Cyt C sur une colonne monolithique de 8 cm.

De haut en bas : trace de la séparation en SM ; chromatogrammes pour les Fragments :
 56-72 ($T_r = 15,09$ min ; $N_{rel} = 329 \times 10^3$ plat/m),
 56-73 ($T_r = 14,39$ min ; $N_{rel} = 321 \times 10^3$ plat/m),
 9-22 ($T_r = 7,2$ min ; $N_{rel} = 13,1 \times 10^3$ plat/m) et
 92-99 ($T_r = 2,45$ min ; $N_{rel} = 8,3 \times 10^3$ plat/m).

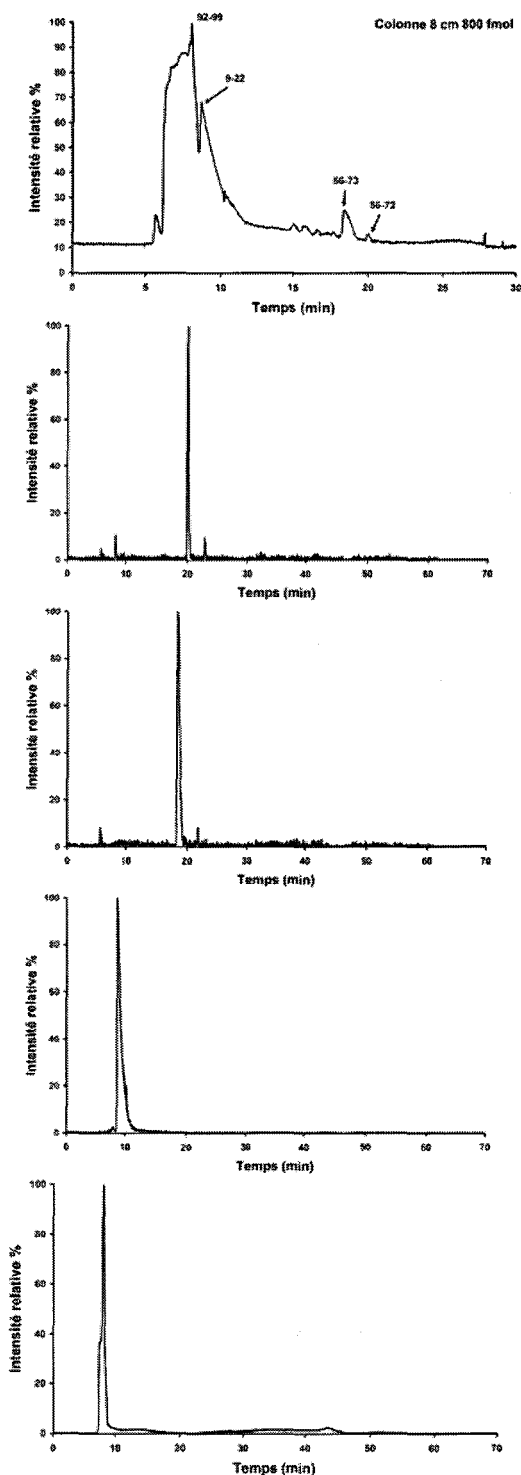


Figure 29 : Séparation de 800 fmol de digestat de Cyt C sur une colonne monolithique de 8 cm.

De haut en bas : trace de la séparation en SM ; chromatogrammes pour les Fragments :
 56-72 ($T_r = 14,54$ min ; $N_{rel} = 345 \times 10^3$ plat/m),
 56-73 ($T_r = 12,9$ min ; $N_{rel} = 48 \times 10^3$ plat/m),
 9-22 ($T_r = 3,22$ min ; $N_{rel} = 1,5 \times 10^3$ plat/m) et
 92-99 ($T_r = 2,51$ min ; $N_{rel} = 11,3 \times 10^3$ plat/m).

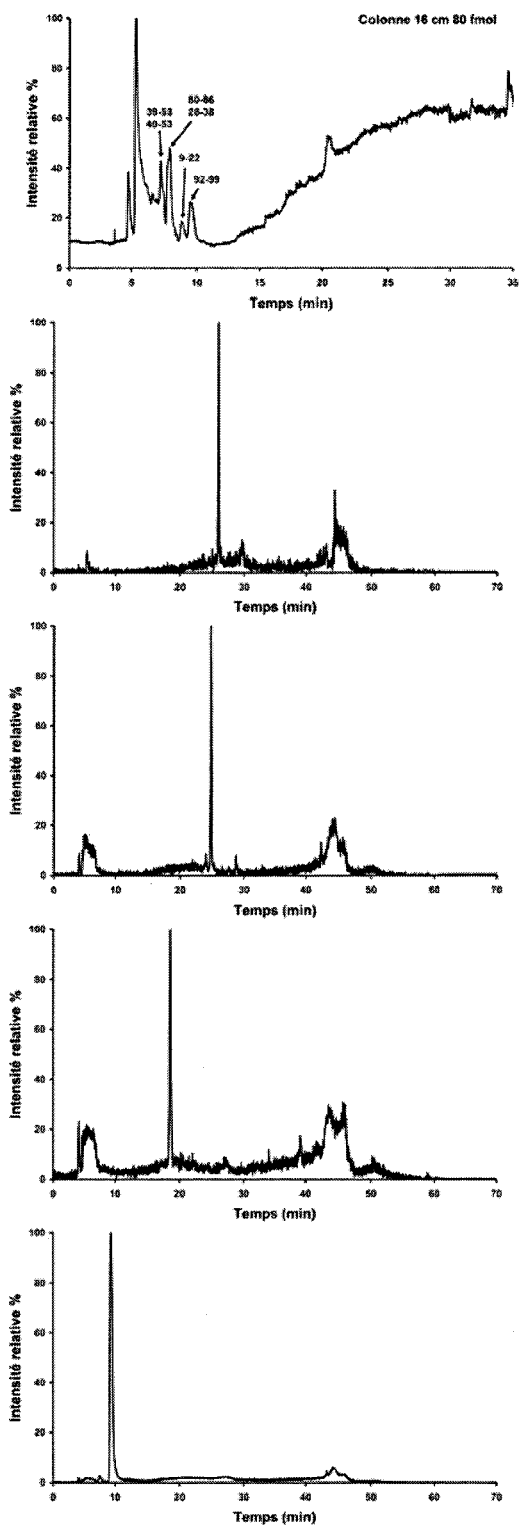


Figure 30 : Séparation de 80 fmol de digestat de Cyt C sur une colonne monolithique de 16 cm.

De haut en bas : trace de la séparation en SM ; chromatogrammes des Fragments :

- 56-72 ($T_r = 21,38$ min ; $N_{rel} = 108 \times 10^3$ plat/m),
- 56-73 ($T_r = 20,34$ min ; $N_{rel} = 560 \times 10^3$ plat/m),
- 9-22 ($T_r = 8,48$ min ; $N_{rel} = 10,5 \times 10^3$ plat/m)
- 92-99 ($T_r = 5,08$ min ; $N_{rel} = 4,7 \times 10^3$ plat/m).

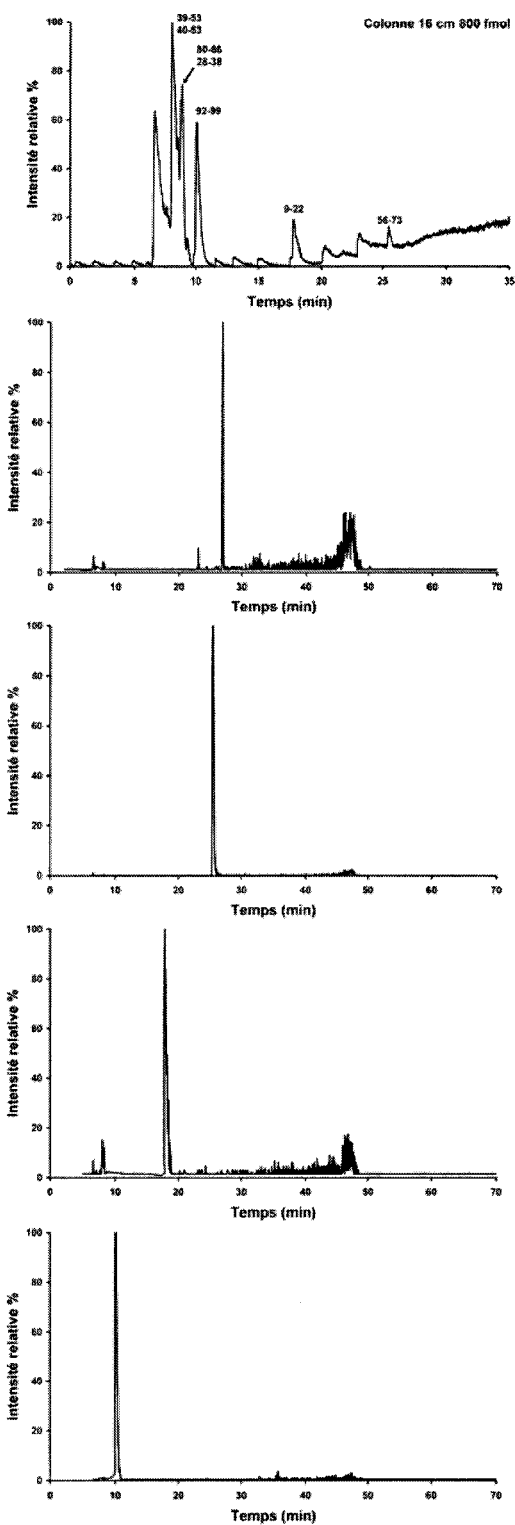


Figure 31 : Séparation de 800 fmol de digestat de Cyt C sur une colonne monolithique de 16 cm.

De haut en bas : trace de la séparation en SM ; chromatogrammes des Fragments :

- 56-72 ($T_r = 21,4$ min ; $N_{rel} = 787 \times 10^3$ plat/m),
- 56-73 ($T_r = 20,01$ min ; $N_{rel} = 200 \times 10^3$ plat/m),
- 9-22 ($T_r = 12,55$ min ; $N_{rel} = 6,5 \times 10^3$ plat/m)
- 92-99 ($T_r = 4,57$ min ; $N_{rel} = 2,8 \times 10^3$ plat/m).

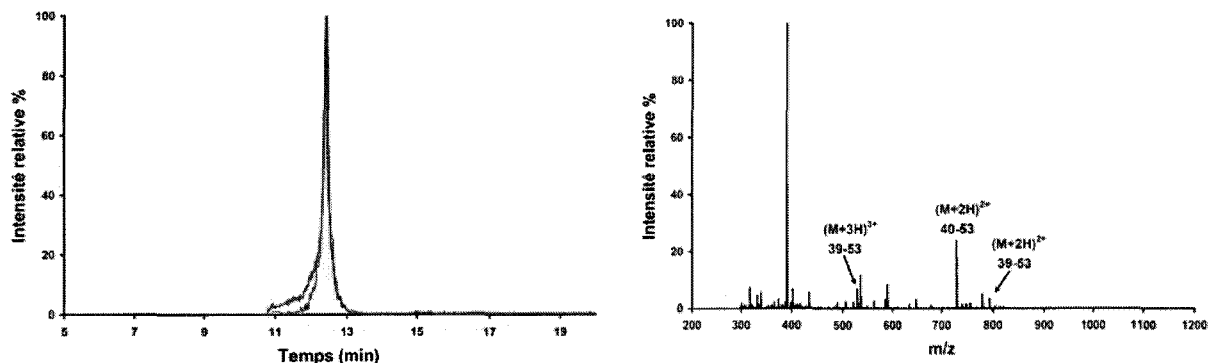


Figure 32 : Résultats en séparation sur la colonne de 16 cm de longueur des Fragments 39-53 et 40-53 (gradient « pentu », injection de 800 fmol de digestat de Cyt C).

A gauche : Superposition des chromatogrammes reconstitués pour les Fragments 39-53 (bleu) et 40-53 (rouge) $T_r = 2,87$ min ; $N_{rel} = 12 \times 10^3$ plat/m

A droite : Spectre de masse correspondant.

Les résultats observés sur la colonne de 16 cm sont similaires à ceux obtenus précédemment sur la colonne 5 de la série de colonnes étudiée dans le paragraphe III-C-2. Les différents fragments sont bien séparés sauf les Fragments 39-53 et 40-53 qui sont co-élus. Les Figures 30 et 31 détaillent les résultats en séparation observés sur la colonne de 16 cm de longueur pour une injection de 800 ou de 80 fmol de digestat de cytochrome c . Ces figures présentent les chromatogrammes reconstitués pour quatre fragments, les Fragments 56-72, 56-73, 9-22 et 92-99. La Figure 32 détaille les résultats obtenus pour les Fragments 39-53 et 40-53, les chromatogrammes reconstitués pour ces deux fragments et le spectre de masse correspondant à l'élution simultanée de ces deux fragments.

Les colonnes de 24 et de 32 cm donnent de biens meilleurs résultats en séparation, la séparation la plus belle étant réalisée sur la colonne la plus longue. Tous les peptides sont séparés, y compris les deux Fragments 39-53 et 40-53 qui ne sont plus élués conjointement.

Des résultats un peu plus détaillés pour la séparation sur la colonne de 24 cm pour 80 fmol de digestat de cytochrome c sont présentés dans la Figure 33 avec les chromatogrammes reconstitués de quelques fragments (Fragments 56-73, 56-72, 39-53 et 40-53). Ce dernier graphe met en particulier en évidence la séparation partielle des Fragments 39-53 et 40-53 sur une colonne de 24 cm avec le gradient « pentu ». La scission des deux pics correspondant à l'élution de ces deux fragments est plus marquée lorsque la longueur de la colonne augmente encore.

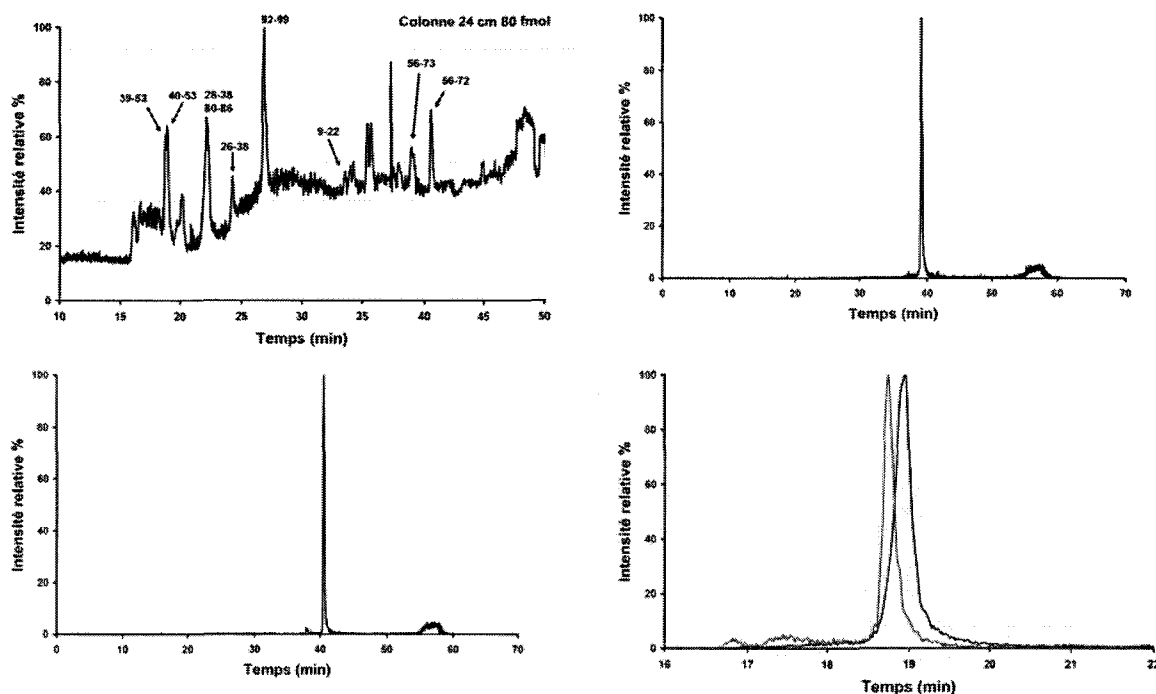


Figure 33 : Séparation de 80 fmoles de digestat de Cyt C sur une colonne monolithique de 24 cm de longueur.

De haut en bas et de gauche à droite : Trace en SM de la séparation, Chromatogrammes reconstitués pour les Fragments 56-73 ($T_r = 23$ min ; $N_{rel} = 232 \times 10^3$ plat/m), 56-72 ($T_r = 24,53$ min ; $N_{rel} = 374 \times 10^3$ plat/m) et 39-53 (rouge) ($T_r = 2,75$ min ; $N_{rel} = 9,2 \times 10^3$ plat/m) et 40-53 (noir) ($T_r = 2,95$ min ; $N_{rel} = 4,3 \times 10^3$ plat/m). Zoom sur la zone 16-22 min.

En effet, lorsque la longueur de la colonne est de 32 cm, l'élution des deux peptides donne deux pics distincts, comme l'illustre la Figure 34. Cette figure présente les chromatogrammes reconstitués pour les deux Fragments 39-53 et 40-53 ainsi que les spectres de masse correspondants obtenus sur la colonne de 32 cm de longueur pour 80 fmoles de digestat de cytochrome c injectés.

Les résultats de la séparation observée sur la colonne de 32 cm de longueur de sont pas détaillés ici : cette colonne fait l'objet d'une étude plus poussée dans la suite de ce paragraphe.

La Table 8 résume les résultats en séparation pour 80 fmoles de digestat de cytochrome c obtenus sur les quatre colonnes de longueurs différentes de 8 à 32 cm. Elle présente, pour tous les fragments du cytochrome c , les temps de rétention relatifs (en min), les efficacités de séparation calculées et exprimées en nombre total de plateaux et en nombre de plateaux par mètre.

Table 8 : Résultats en séparation obtenus pour 80 fmol de digestat de cytochrome *c* sur quatre colonnes monolithiques de longueurs différentes (8, 16, 24 et 32 cm) mais de composition identique. Temps de rétention relatifs T_r , calculés en utilisant les chromatogrammes reconstitués et, par rapport au début de l'élution et efficacités relatives N_{rel} en découlant en nombre de plateaux et en nombre de plateaux par mètre.

Fragment	Col de 8 cm	Col de 16 cm	Col de 24 cm	Col de 32 cm	
56-72	15,09	21,38	24,53	22,45	T_r-T_0 (min)
	$26,3 \times 10^3$	108×10^3	90×10^3	158×10^3	N_{rel} (plat)
	329×10^3	677×10^3	374×10^3	494×10^3	N_{rel} (plat/m)
56-73	14,39	20,34	23	21,16	T_r-T_0 (min)
	$25,7 \times 10^3$	90×10^3	56×10^3	79×10^3	N_{rel} (plat)
	321×10^3	560×10^3	232×10^3	247×10^3	N_{rel} (plat/m)
9-22	7,2	8,48	17,55		T_r-T_0 (min)
	$1,05 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	26×10^3		N_{rel} (plat)
	$13,1 \times 10^3$	$10,5 \times 10^3$	109×10^3		N_{rel} (plat/m)
89-99		6,06	10,6	11,20	T_r-T_0 (min)
		$1,7 \times 10^3$	$9,6 \times 10^3$	22×10^3	N_{rel} (plat)
		$10,8 \times 10^3$	40×10^3	68×10^3	N_{rel} (plat/m)
92-99	2,45	5,08	10,8	11,24	T_r-T_0 (min)
	$0,66 \times 10^3$	$0,75 \times 10^3$	12×10^3	20×10^3	N_{rel} (plat)
	$8,3 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$	50×10^3	62×10^3	N_{rel} (plat/m)
26-38		4,44	8,29	9,20	T_r-T_0 (min)
		$0,77 \times 10^3$	$4,4 \times 10^3$	$9,2 \times 10^3$	N_{rel} (plat)
		$4,8 \times 10^3$	18×10^3	29×10^3	N_{rel} (plat/m)
28-38		3,46	6,24	7,15	T_r-T_0 (min)
		$0,54 \times 10^3$	$1,03 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	N_{rel} (plat)
		$3,4 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$	N_{rel} (plat/m)
80-86		2,97	4,1	4,80	T_r-T_0 (min)
		$0,44 \times 10^3$	$0,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	N_{rel} (plat)
		$2,7 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$3,96 \times 10^3$	N_{rel} (plat/m)
40-53		2,76	2,95	3,45	T_r-T_0 (min)
		$2,5 \times 10^3$	$1,03 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$	N_{rel} (plat)
		$15,6 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$11,8 \times 10^3$	N_{rel} (plat/m)
39-53		2,73	2,75	3,14	T_r-T_0 (min)
		$2,5 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	N_{rel} (plat)
		$15,5 \times 10^3$	$9,2 \times 10^3$	$8,4 \times 10^3$	N_{rel} (plat/m)

Ce tableau met en évidence que l'efficacité de séparation est d'autant plus grande que la colonne est longue. Le nombre de plateaux est plus élevé pour un fragment donné lorsque la longueur de la colonne augmente. Par ailleurs, pour toutes les colonnes, si l'on compare la séparation de 80 fmol de digestat de cytochrome c et de 800 fmol, les valeurs des efficacités sont bien meilleures pour la deuxième séparation, effectuée sur dix fois moins de matériel ; les pics sont beaucoup plus fins (résultats non présentés).

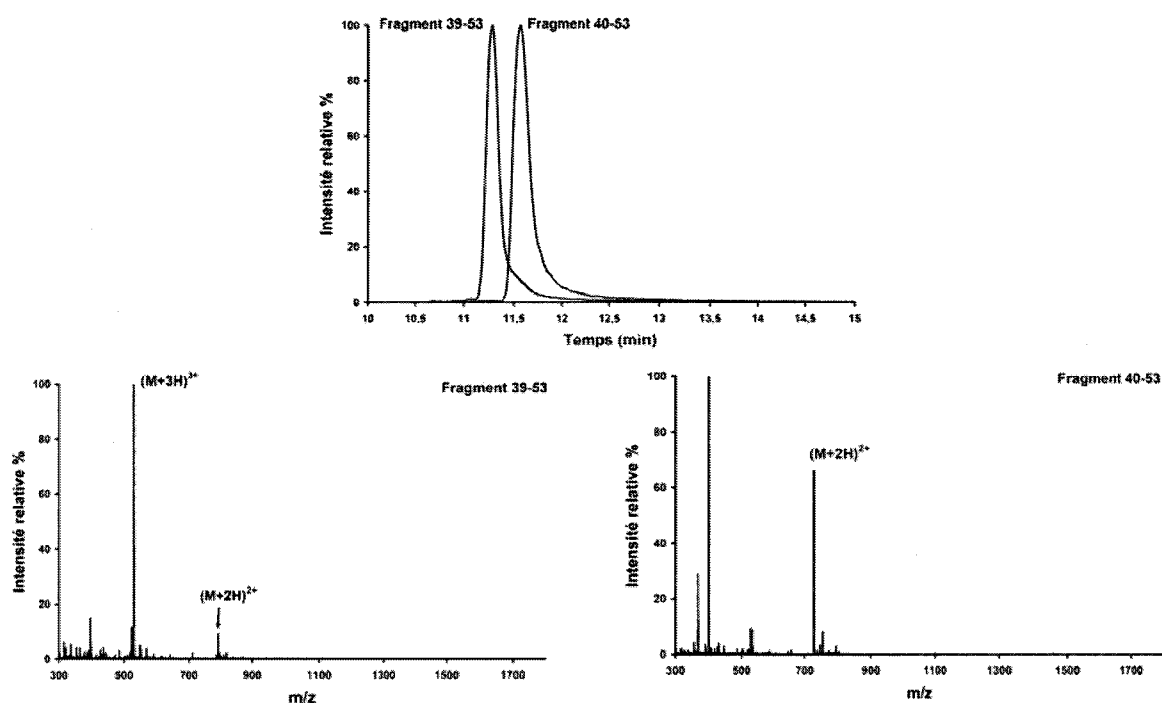


Figure 34 : Séparation des Fragments 39-53 et 40-53 du cytochrome c sur une colonne de 32 cm de longueur. Expérience réalisée sur 80 fmol de digestat de cytochrome c avec un gradient « pentu ».

En haut : Chromatogrammes reconstitués et superposés pour ces deux fragments (zoom sur la zone $T = 10$ à 15 min).

En bas : Spectres de masse correspondants ; à droite, spectre de masse correspondant au fragment 39-53 ; à gauche : spectre de masse correspondant au fragment 40-53.

Sensibilité de l'analyse et réponse détectée en spectrométrie de masse en fonction de la quantité d'échantillon injectée

Un autre point important qui a été étudié est la sensibilité de l'analyse et la réponse de la colonne en fonction de la quantité d'échantillon injectée. Lors du test de la série précédente de colonnes préparées à partir de phases différentes, la sensibilité en séparation était de 80 fmol, dans le meilleur des cas (colonne 5). Pour les colonnes plus longues, par contre, la sensibilité de l'analyse se révèle bien meilleure. Pour la colonne de 32 cm de longueur, en particulier, la séparation est effective jusqu'à 0,8 fmol de digestat de cytochrome c injecté. Cette colonne a donc été choisie

pour cette discussion. Les Figures 36 et 37 représentent les chromatogrammes reconstitués pour divers fragments du digestat pour des séparations effectuées sur 8 fmol et 0,8 fmol de digestat injecté sur la colonne.

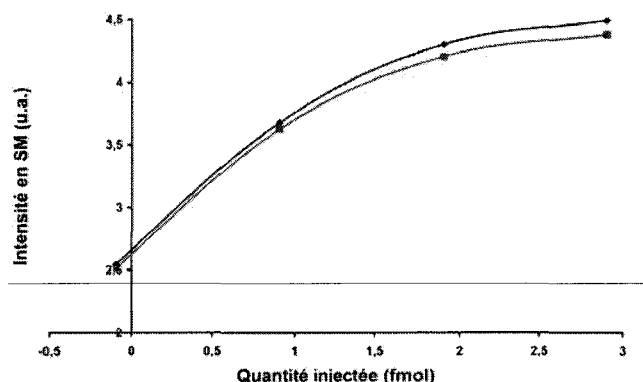


Figure 35 : Variation de l'intensité du signal en spectrométrie de masse pour deux peptides en fonction de la quantité de digestat de cytochrome *c* injectée (0,8-8-80-800 fmol ; intensité en unités arbitraires, courbe log-log). Fragments 39-53 et 40-53.

Nous nous sommes aussi intéressés à la réponse enregistrée en spectrométrie de masse en fonction de la quantité de digestat de cytochrome *c* injectée sur la colonne de 32 cm : 800, 80, 8 ou 0,8 fmol. La séparation a été effectuée en utilisant un gradient « pentu ». Le graphe donnant l'intensité mesurée en spectrométrie de masse en fonction de la quantité de digestat injectée a été tracé en échelle doublement logarithmique, pour deux fragments précis, les Fragments 39-53 et 40-53. Cette courbe est représentée en Figure 35. Jusqu'à une quantité de 8 fmol injectée sur la colonne, la variation de l'intensité est linéaire en fonction de la quantité d'échantillon : le graphe correspond à une droite. Pour une quantité d'échantillon injectée plus importante, la courbe s'aplatit : la colonne sature.

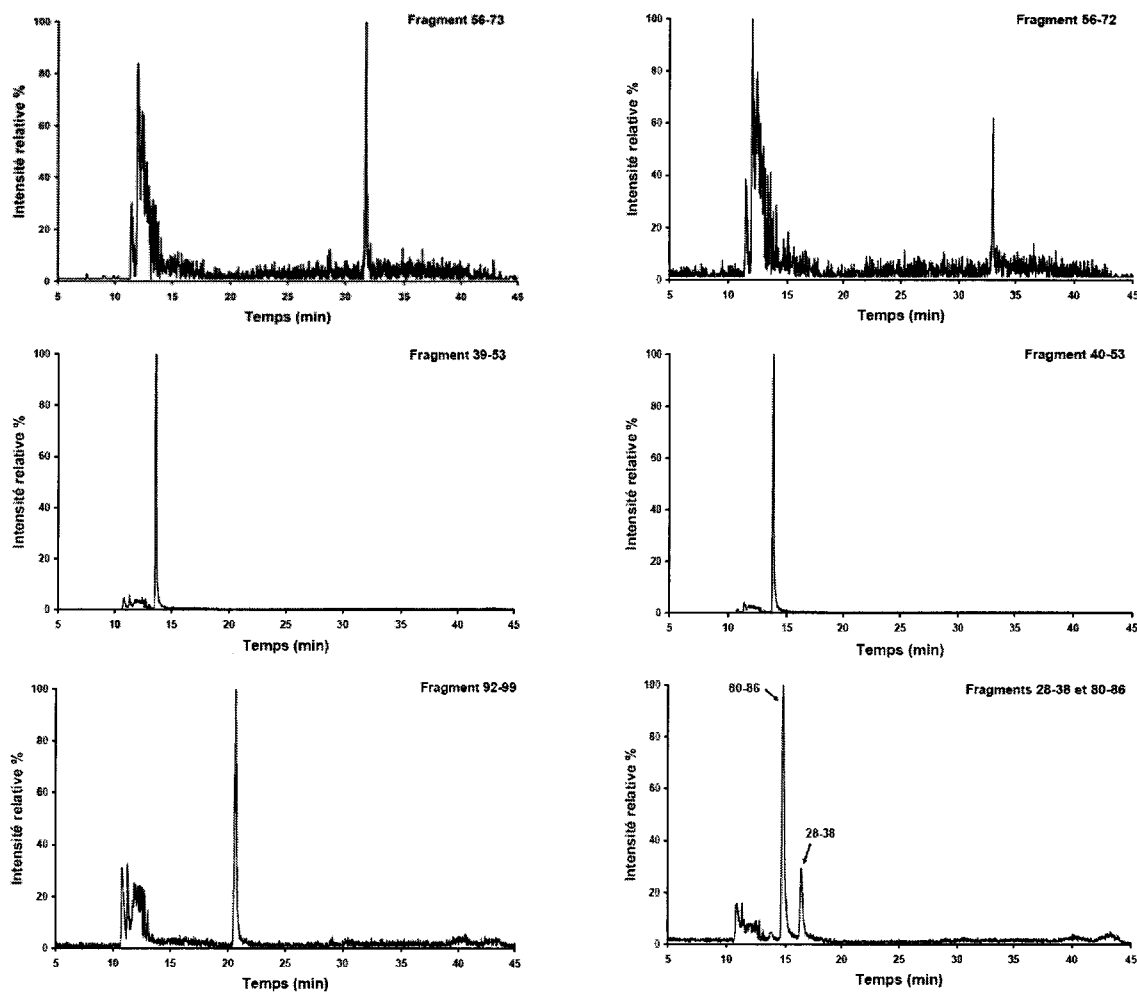


Figure 36 : Exemples de chromatogrammes reconstitués pour plusieurs fragments du Cyt C pour une injection de 8 fmol du digestat sur la colonne de 32 cm de longueur.

De haut en bas ; Fragment 56-73 ($T_r - T_0 = 20,44$ min; $N_{rel} = 885$ u 10^3 plat/m), Fragment 56-72 ($T_r - T_0 = 21,7$ min; $N_{rel} = 1800$ u 10^3 plat/m), Fragment 39-53 ($T_r - T_0 = 2,96$ min; $N_{rel} = 14,5$ u 10^3 plat/m), Fragment 40-53 ($T_r - T_0 = 3,14$ min; $N_{rel} = 13,7$ u 10^3 plat/m), Fragment 92-99 ($T_r - T_0 = 9,93$ min; $N_{rel} = 33$ u 10^3 plat/m), Fragments 28-38 et 80-86 ($T_r - T_0 = 5,71$ min; $N_{rel} = 15$ u 10^3 plat/m et $T_r - T_0 = 4,07$ min; $N_{rel} = 5,4$ u 10^3 plat/m).

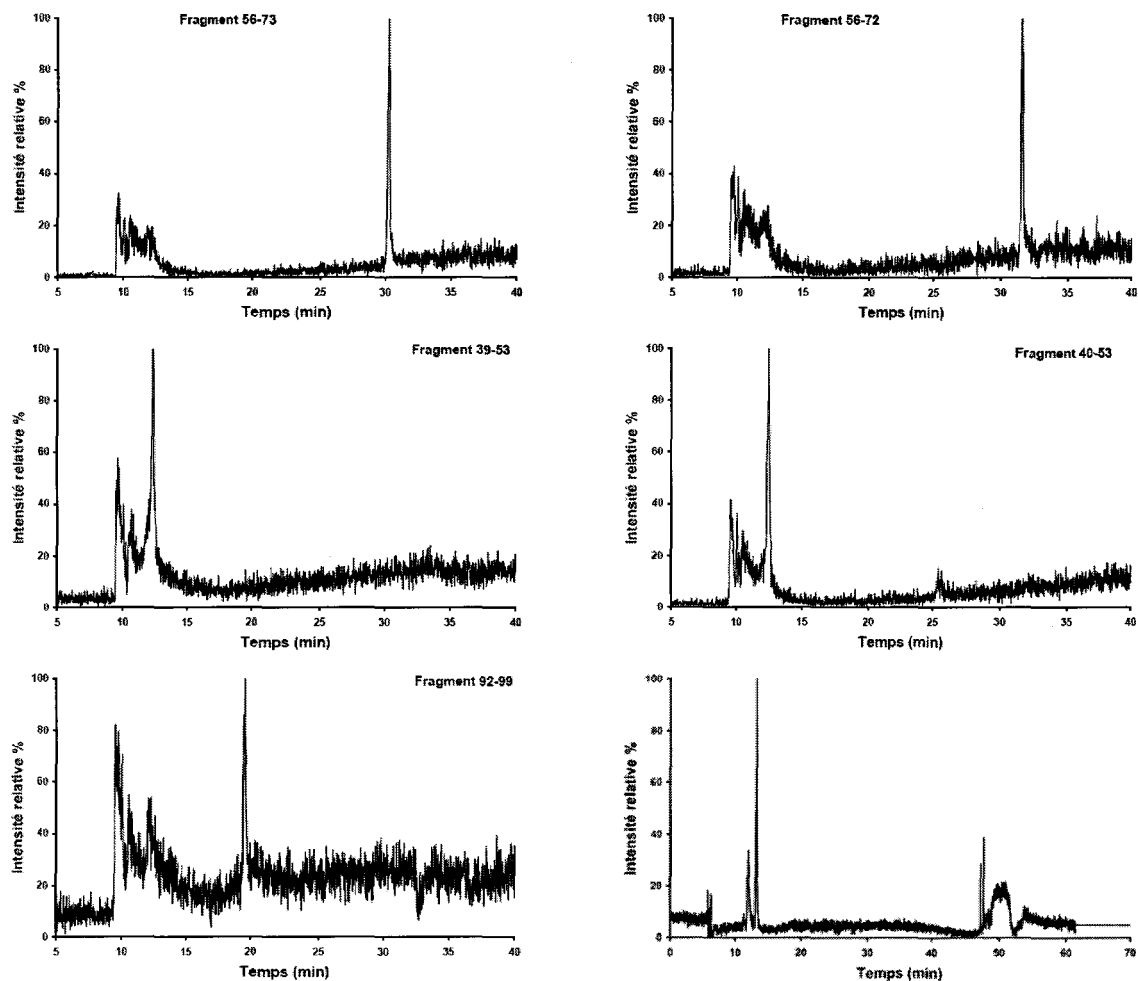


Figure 37 : Exemples de chromatogrammes reconstitués pour plusieurs fragments du Cyt C pour une injection de 0,8 fmol du digestat sur la colonne de 32 cm de longueur.

De haut en bas ; Fragment 56-73 ($T_r-T_0 = 21,63$ min; $N_{rel} = 303$ u 10^3 plat/m), Fragment 56-72 ($T_r-T_0 = 21,24$ min; $N_{rel} = 436$ u 10^3 plat/m), Fragment 39-53 ($T_r-T_0 = 2,45$ min; $N_{rel} = 9,85$ u 10^3 plat/m), Fragment 40-53 ($T_r-T_0 = 2,62$ min; $N_{rel} = 9,52$ u 10^3 plat/m), Fragment 92-99 ($T_r-T_0 = 9,44$ min; $N_{rel} = 45,7$ u 10^3 plat/m), Fragments 28-38 et 80-86 ($T_r-T_0 = 5,18$ min; $N_{rel} = 5,7$ u 10^3 plat/m et $T_r-T_0 = 3,55$ min; $N_{rel} = 3,8$ u 10^3 plat/m).

Influence du gradient sur la séparation

A la fin de l'étude des colonnes préparées à base de phases monolithiques différentes, nous avons conclu quant à une montée trop brusque en acétonitrile : une montée plus lente semblait donner de meilleurs résultats en séparation d'après le modèle LSS. Le test des colonnes monolithiques de longueurs variables a alors été effectué en général, en utilisant deux gradients, le gradient d'origine dit « pentu » et un autre gradient plus « plat », où la montée en acétonitrile est effectuée plus lentement (40 au lieu de 30 minutes).

Nous présenterons ici les résultats et les différences observés sur la colonne de 32 cm. La Figure 38 présente les graphes de séparation enregistrés en spectrométrie de masse sur la colonne de 32 cm, pour des échantillons de Cyt C de 80 ou de 800 fmol et pour les deux types de gradients.

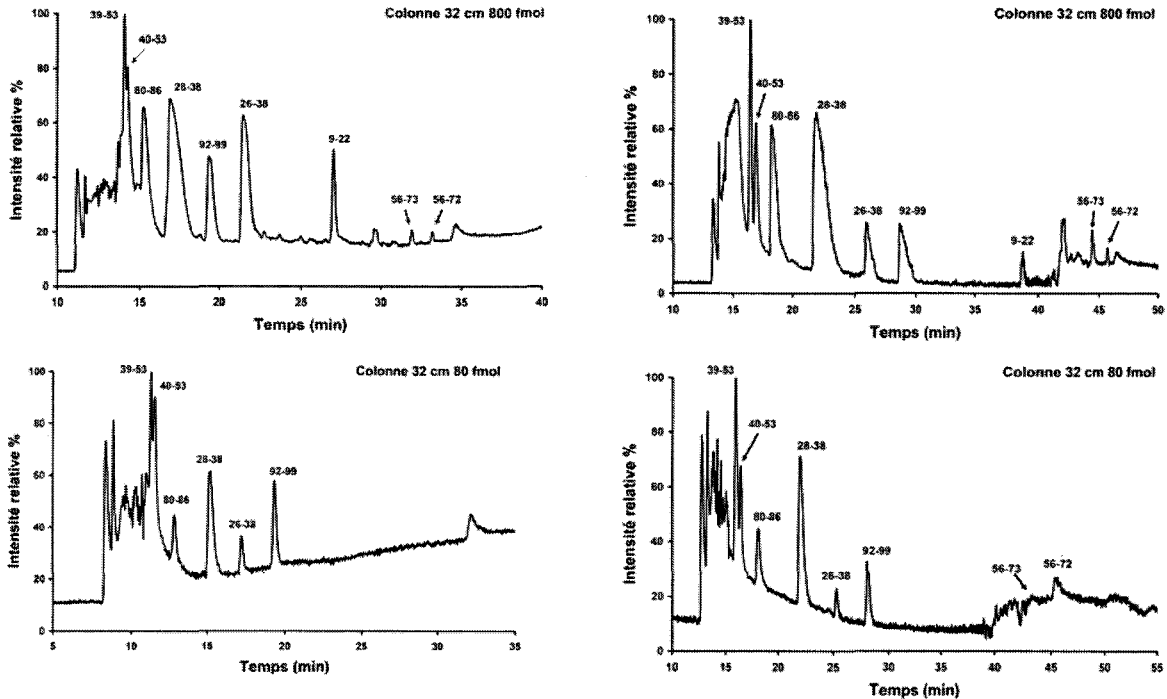


Figure 38 : Influence du gradient sur la qualité de la séparation.

Traces de la séparation d'un digestat de Cyt C sur une colonne de 32 cm de longueur, pour, en haut, une injection de 800 fmol d'échantillon et, en bas, 80 fmol d'échantillon, en utilisant un gradient « plat », à droite, ou « pentu » à gauche.

Dans les différents cas, la séparation est effective et elle est visible sur les traces de la séparation (Figure 38). Néanmoins, l'éluion est plus étalée si le gradient est plus plat ; de 35 minutes pour un gradient plat contre 25 minutes seulement pour un gradient plus abrupt. L'influence des conditions de la séparation sur sa qualité a été étudiée plus finement avec le calcul des temps de rétention relatifs pour les différents fragments ainsi que celle des valeurs des efficacités de séparation, pour une injection de 80 ou de 800 fmol d'échantillon. Ces valeurs sont présentées dans la Table 9.

Table 9 : Influence du gradient sur la séparation du digestat de cytochrome *c* sur la colonne de 32 cm. Résultats en séparation (temps de rétention et efficacité de séparation en nombre de plateaux par mètre) obtenus pour la séparation de 80 fmol ou 800 fmol de digestat de cytochrome *c* en utilisant un gradient « plat » (montée en acétonitrile en 40 minutes) ou « pentu » (montée en acétonitrile en 30 minutes).

Fragment	800 fmol		80 fmol		
	Grad pentu	Grad plat	Grad pentu	Grad plat	
56-72	22,25 393×10^3	32,7 970×10^3	22,45 454×10^3	32,1 1668×10^3	T_r (min) N_{rel} (plat/m)
56-73	21,00 407×10^3	31,43 748×10^3	21,16 297×10^3	30,88 565×10^3	T_r (min) N_{rel} (plat/m)
9-22	16 137×10^3	25,79 294×10^3			T_r (min) N_{rel} (plat/m)
89-99	10,66 18×10^3	16,65 80×10^3	11,05 60×10^3	15,98 88×10^3	T_r (min) N_{rel} (plat/m)
92-99	10,49 12×10^3	15,68 16×10^3	11,16 57×10^3	15,51 118×10^3	T_r (min) N_{rel} (plat/m)
26-38	8,36 $7,1 \times 10^3$	12,96 17×10^3	9,06 30×10^3	12,8 42×10^3	T_r (min) N_{rel} (plat/m)
28-38	5,9 $0,8 \times 10^3$	8,9 $1,3 \times 10^3$	7 $4,1 \times 10^3$	9,53 10×10^3	T_r (min) N_{rel} (plat/m)
80-86	4,21 3×10^3	5,33 $2,9 \times 10^3$	4,63 $9,8 \times 10^3$	5,67 $4,9 \times 10^3$	T_r (min) N_{rel} (plat/m)
40-53	3,3 $6,6 \times 10^3$	3,96 $7,3 \times 10^3$	3,36 10×10^3	4 $6,9 \times 10^3$	T_r (min) N_{rel} (plat/m)
39-53	3,06 $9,2 \times 10^3$	3,47 $7,4 \times 10^3$	2,08 4×10^3	3,44 19×10^3	T_r (min) N_{rel} (plat/m)

Ce tableau montre d'une part, l'influence de la quantité chargée sur la colonne sur les résultats de la séparation, notamment l'efficacité de la séparation, et d'autre part, l'influence du gradient utilisé sur la séparation. Ainsi que les traces des séparations mesurées en spectrométrie de masse le montraient (Figure 37), la colonne de 32 cm est surchargée pour une injection de 800 fmol de digestat de cytochrome *c*. Il en résulte un élargissement des pics et par conséquent, des efficacités de séparation plus faibles que lorsque 80 fmol seulement sont injectés sur la colonne. Ce propos est illustré par les comparaisons des colonnes 1 et 3 de la Table 9 et des colonnes 2 et 4, entre elles. Par ailleurs, à quantité équivalente d'échantillons injectée (80 fmol ou 800 fmol), l'utilisation d'un gradient plus plat avec une montée plus lente en acétonitrile, améliore grandement les

résultats en séparation : les valeurs des efficacités de séparations sont plus élevées. Ces résultats renforcent l'hypothèse émise à la fin du paragraphe C.2.a que le gradient de la séparation gagnerait à être aplati en vue d'une amélioration globale de l'efficacité de la séparation.

Nous avons enfin étudié l'influence du gradient utilisé et de la quantité injectée sur la colonne sur la séparation des deux fragments 39-53 et 40-53. La Figure 39 montre les chromatogrammes reconstitués pour ces deux peptides dans les différents cas de figures, l'injection de 80 ou de 800 fmol de digestat de cytochrome *c* et l'utilisation d'un gradient « pentu » ou « aplati ».

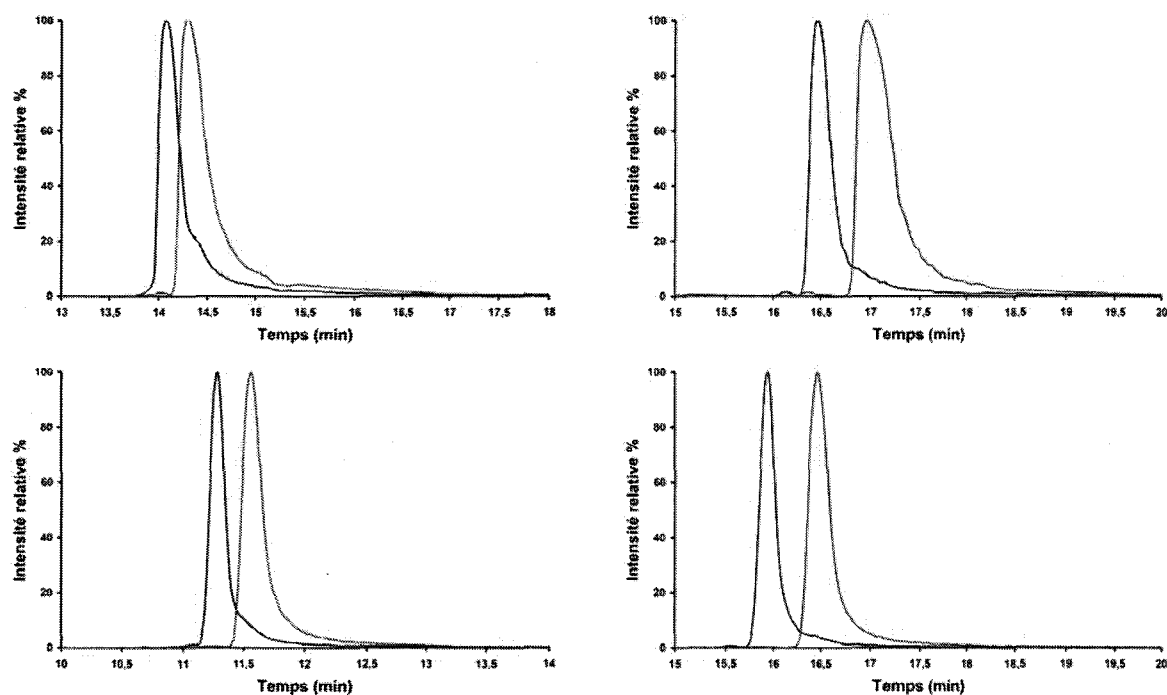


Figure 39 : Influence du gradient sur la qualité de la séparation : étude plus approfondie de la séparation des Fragments 39-53 (bleu) et 40-53 (rouge).

Chromatogrammes reconstitués de ces deux fragments pour une injection de 80 (en bas) ou 800 fmol (en haut) et pour un gradient « plat » (à droite) ou « pentu » (à gauche).

Tout d'abord, pour 800 fmol de digestat injecté, les pics sont beaucoup plus larges que pour 80 fmol injecté, comme nous l'avons déjà évoqué, et plus les pics sont larges, plus ils sont difficiles à séparer. Ainsi, pour une injection de 800 fmol, les fragments 39-53 et 40-53 sont-ils à peine séparés si la montée en acétonitrile est plus rapide (Figure 38 en haut à gauche). Si cette montée est plus lente, les deux fragments sont effectivement séparés (Figure 38 en haut à droite). La même observation peut être faite pour une injection de 80 fmol d'échantillon ; néanmoins, l'écart entre les deux pics est plus marqué, même si la montée en acétonitrile est plus rapide (Figure 38 en bas à gauche).

Les tests sur ces colonnes de différentes longueurs auront permis de mettre en évidence quelques facteurs-clés dans la préparation des monolithes et leurs tests en vue de l'optimisation des séparations. Curieusement, les meilleurs résultats sont obtenus avec la colonne la plus longue, de 32 cm, qui permet la séparation des échantillons les moins concentrés, jusqu'à 0,8 fmol. De surcroît, la perte de charge observée sur cette colonne s'est révélée fort raisonnable et n'a pas atteint les valeurs élevées attendues, qui auraient mis en péril son test sur une chaîne de nanoLC.

3. Conclusion

La préparation de phases monolithiques à des fins séparatives, dans un format capillaire et à partir d'un processus de photopolymérisation a été concluante. Une étude de la morphologie des phases et de leur porosité nous a renseignés sur la structure microscopique du matériau et a mis en évidence l'influence des paramètres de polymérisation et de la composition du mélange réactionnel sur les propriétés physico-chimiques des monolithes.

Les tests en nanoLC de diverses phases nous ont permis de vérifier le côté opérationnel de ces phases pour la séparation d'un échantillon protéomique et de définir une composition de monolithe appropriée comme phase inverse de séparation. La constitution du porogène à utiliser pour la préparation de la phase monolithique s'est révélée être un facteur important dans la qualité de la phase et son pouvoir séparateur. Ces observations corrént avec les études de porosité et de morphologie menées conjointement.

Enfin, une étude plus poussée sur la phase la plus séparative nous a permis d'étudier l'influence des dimensions de la colonne sur son pouvoir séparatif. Cette étude sur les dimensions de la colonne sera profitable pour l'étape de ce travail, consistant en la transposition des phases monolithiques au format d'un microsysteme.

III. Prolongement des études sur des phases monolithiques

A. Phases inverses en microsystèmes intégrés

1. Polymérisation dans un microsysteme

Une fois le protocole de préparation de phases monolithiques mis au point et éprouvé dans un format capillaire, nous nous sommes intéressés à des polymérisations dans des canaux de microsystèmes. A cette fin, nous avons utilisé des microsystèmes en résine SU-8, comme il a été décrit en fin de premier chapitre (Figures 40 et 41).

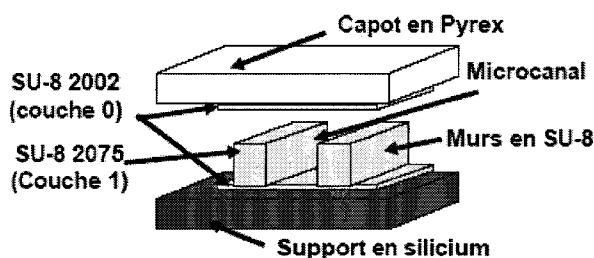


Figure 40 : Schéma de la structure multi-couche utilisée pour la réalisation de microcanaux simples dans de la résine SU-8

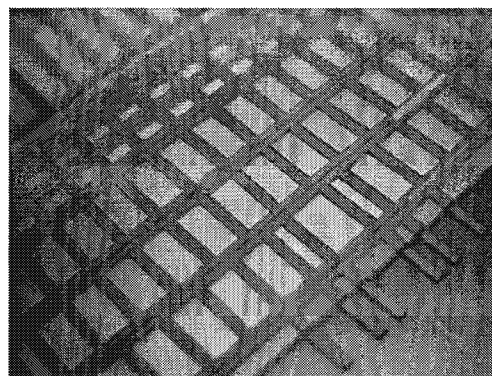


Figure 41 : Photographie d'un microsysteme réalisé selon une filière multi-matériau avec des microcanaux emmurés et des piliers pour soutenir le couvercle en Pyrex.

Le protocole de polymérisation est presque inchangé par rapport au format capillaire. Néanmoins, l'étape préliminaire de traitement des parois internes a été supprimée. En effet, le protocole utilisé jusqu'alors est adapté à des parois de type verre, silice fondue ou silicium puisqu'il met en jeu des groupements silanols présents à la surface du matériau. Ces groupements sont absents de la surface de la résine SU-8 : le traitement de parois tel que nous l'avons pratiqué, n'est pas adapté aux microsystèmes en SU-8. De surcroît, les canaux se terminent sur un capillaire en silice fondue qui fait obstruction à toute fuite du polymère en dehors du microcanal si une pression est exercée sur la phase. Le mélange réactionnel est similaire à celui utilisé pour l'élaboration de la colonne 5 avec un mélange de monomères réticulant et fonctionnel (méthacrylate de lauryl) dans un rapport molaire 35/65 et un porogène binaire à base de cyclohexanol et d'éthylène glycol dans un rapport 80/20, mais la teneur en porogène est augmentée à 70% au lieu de 60% afin d'augmenter la porosité de la phase et, ce, de faciliter l'écoulement des fluides à travers la colonne monolithique. Ceci vise à ne pas mettre en péril le scellement du couvercle sur le socle du microsysteme comme cela pourrait être le cas en exerçant

de trop fortes pressions. La rupture du scellement du couvercle est décelée avec l'apparition d'irisations entre les microcanaux, dues à la fuite du liquide en dehors des microcanaux.

La polymérisation est, là encore, initiée par voie photochimique avec l'irradiation du mélange réactionnel par une lampe UV. Nous avons, de plus, testé le contrôle spatial de la réaction ; un masque optique permet de définir une zone d'irradiation de 2,2 cm de longueur dans le microcanal dont la longueur totale est de 2,8 cm.

Après irradiation UV de l'ensemble pendant 2 heures, une colonne monolithique est obtenue sur la zone irradiée, comme le montre la photographie ci-dessous (Figure 42). Le trait blanc dans le microcanal correspond à la phase monolithique.

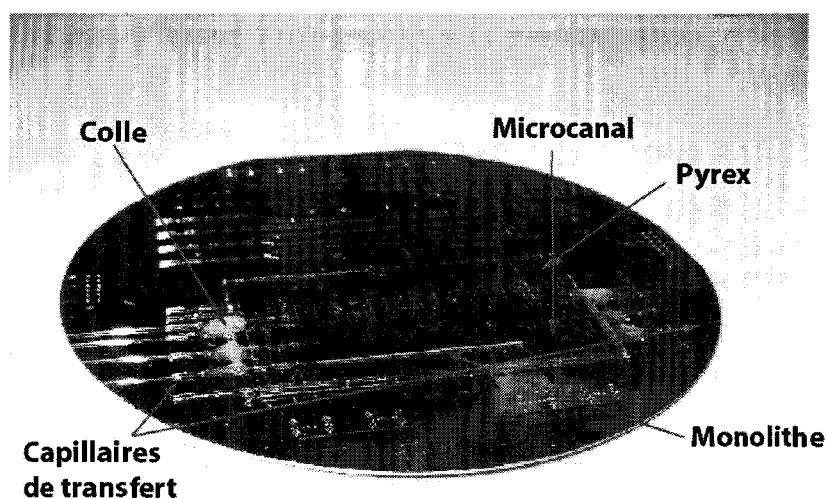


Figure 42 : Photographie d'un microsysteme en SU-8 dans lequel a été réalisée une microcolonne à base de matériau monolithique; cette dernière est visualisable sur la photographie sous forme d'un trait blanc, dans le canal le plus proche.

Tout d'abord, nous avons vérifié qu'une polymérisation initiée par voie photochimique était possible dans un microcanal en SU-8 : la lumière UV passe à travers le couvercle en Pyrex tapissé d'une fine couche de SU-8. Ce point n'était pas trivial a priori, puisque de nombreux matériaux plastiques ou élastomères ne sont pas transparents aux irradiations UV.

Ensuite, nous n'avons observé aucune rupture du couvercle du microsysteme, ni de son scellement, lors de la préparation de la phase monolithique et de son test en nanoLC. Le microsysteme a résisté aux différents produits chimiques utilisés pour la préparation de la phase

monolithique (monomères + porogène + amorceur), pour son lavage (méthanol, eau) et pour son test (mélange eau-acétonitrile acidifié avec 0,1% d'acide formique). Le système a également très bien supporté la pression exercée pour l'écoulement du liquide lors du test de séparation en nanoLC. Il a en particulier été soumis, sans aucun dommage, à une nuit de tests de séparation sous une pression mesurée égale à environ 50 bar, comme le montre le graphe ci-dessous (Figure 43).

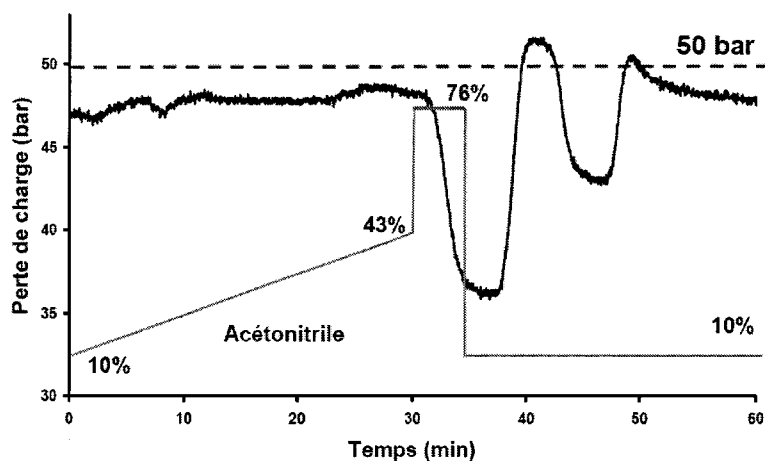


Figure 43 : Perte de charge mesurée le long d'une colonne monolithique préparée dans un microcanal en SU-8, lors d'un test de séparation mené en conditions de couplage nanoLC-SM.

2. Tests en séparation

Les conditions de test de la colonne monolithique préparée dans le microcanal sont les mêmes que pour des colonnes capillaires monolithiques. L'échantillon testé est le même digestat commercial de cytochrome c , à diverses concentrations entre 800 et 0,8 fmol/ μ L, et injecté directement sur la colonne, à raison de 1 μ L. Le gradient de séparation est le premier gradient testé sur les colonnes capillaires, le gradient le plus « pentu ».

Les résultats en séparation, pour le microsystème, sont plus pauvres que pour les colonnes capillaires, en dépit de la forte perte de charge enregistrée au cours de l'expérience. La plupart des fragments peptidiques sont élués dans le pic d'injection, comme le montre la Figure 44 qui représente le spectre de masse correspondant au pic d'injection. Ces peptides ont néanmoins été dessalés lors de leur passage sur la colonne monolithique.

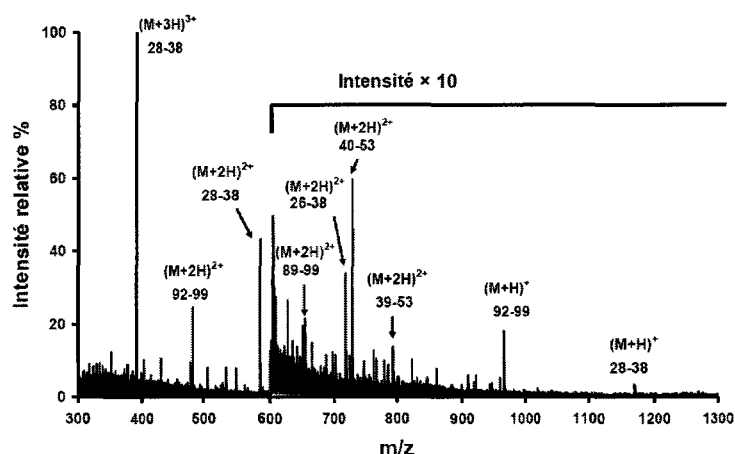


Figure 44 : Spectre de masse correspondant au pic d'injection lors du test de séparation du digestat de Cyt C sur la colonne monolithique intégrée sur le microsystème.

Cette perte de séparation peut être expliquée par diverses raisons ou plusieurs différences, entre le format capillaire et celui du microcanal. Tout d'abord, la porosité de la phase monolithique n'est pas la même. La porosité totale de la phase monolithique est de 60% dans le format capillaire contre 70% dans les microcanaux, en supposant que la teneur en porogène utilisée corresponde à la porosité totale de la phase. La porosité affecte la qualité de la séparation : une phase plus poreuse a un pouvoir séparatif moindre, ce qui a notamment été vérifié pour les colonnes capillaires 2 et 3. Ensuite, l'étape de traitement de parois a été supprimée pour l'élaboration des monolithes dans un microsystème. La phase monolithique n'est pas ancrée de façon covalente dans le microcanal. Des fissures peuvent alors apparaître dans la phase monolithique, au voisinage de la paroi, créant ainsi des chemins préférentiels pour l'écoulement des liquides, qui interagissent en moindre mesure avec la phase stationnaire et ses groupements hydrophobe. Enfin, les caractéristiques géométriques de la phase ne sont pas les mêmes. Dans le format capillaire, les dimensions de la colonne sont une longueur de 17 cm (pour la phase 5) et une section circulaire de diamètre égal à 75 μm ($A = r^2$ ou $0,44 \times 10^4 \mu\text{m}^2$). Dans le microsystème, les dimensions de la phase monolithique sont autres : la longueur de la colonne est plus petite, 2,2 cm seulement et sa section est rectangulaire, de 100 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ ($A = l \times d$ ou $2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$).

Table 10 : Résumé des dimensions des colonnes monolithiques dans un format capillaire et un format microsystème, longueur de la colonne L , Aire de la section de la colonne $A_{section}$ et rapport de cette aire sur la section $A_{section}/L$.

	L	$A_{section}$	Ratio $A_{section}/L$
Colonne capillaire	17 cm	$0.44 \times 10^4 \mu\text{m}^2$	$2,59 \cdot 10^{-8}$
Microsystème	2.2 cm	$2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$	$90,9 \cdot 10^{-8}$

Or, il est bien connu que les techniques de séparation chromatographique sont sensibles au rapport A/L , où A est l'aire de la section de la colonne et L sa longueur, les performances les meilleures étant atteintes lorsque ce rapport diminue. Ici, si l'on compare la colonne capillaire et la colonne sur le microsystème, ce rapport augmente d'un facteur 35, ce qui pourrait être la raison majeure de la perte de séparation lorsqu'on passe d'un capillaire à un microcanal.

Du fait de cette constatation, que les dimensions des colonnes préparées dans les microsystèmes ne donnaient pas de résultats probants en séparation, nous avons décidé de nous focaliser sur des tests en dessalage d'échantillons peptidiques.

Les phases de dessalage correspondent aux phases testées dans des cônes de micropipettes (phases en C4) et le protocole de test est adapté de celui proposé pour les supports commerciaux *ZipTip* (Millipore).

3. Dessalage et analyse en ligne par électronébulisation et spectrométrie de masse

La dernière étape de développement de phases monolithiques séparatives a consisté à coupler la phase d'éluion monolithique à une analyse en ligne par électronébulisation et spectrométrie de masse pour donner un système partiellement intégré. A cette fin, des microsystèmes intégrés en SU-8 sont utilisés. La source d'électronébulisation est réalisée sur le microsystème et est incluse en continuité du microcanal. La source d'électronébulisation est une plume, comme nous le verrons en détails dans le chapitre suivant ; elle est fabriquée dans la première couche de SU-8 déposée sur le support en silicium à la base du microsystème. Le procédé de fabrication global des systèmes intégrés s'inspire de ceux de fabrication des plumes et des microsystèmes en SU-8. Les figures ci-dessous représentent un masque utilisé pour fabriquer un microsystème intégré (Figure 45) et une photographie de microsystème incluant une plume (Figures 46, 47).

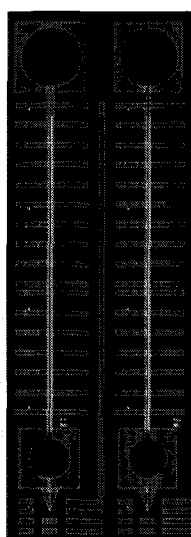


Figure 45 : Masque pour la fabrication de microsystèmes intégrés en SU-8 incluant une source de type plume en sortie de microcanal (bas du masque). Les microcanaux sont définis entre deux rangées de piliers qui aident à « porter » le couvercle du système.

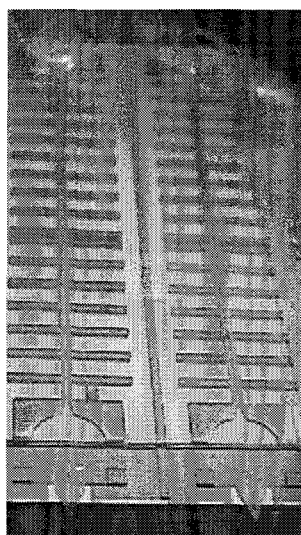


Figure 46 : Photographie d'un microsystème intégré en SU-8 : vue de deux dispositifs en particulier. Le canal est situé entre deux rangées de plots. Enfin, en bas de la photographie, les plumes se distinguent clairement.

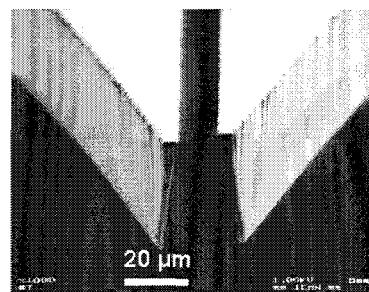
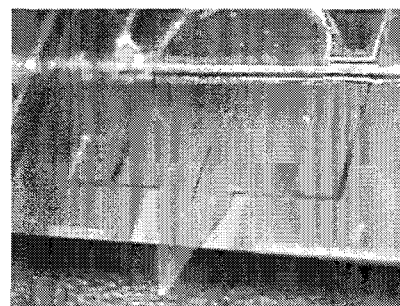


Figure 47 : Vues agrandies de la pointe de la plume intégrée sur le microsystème.

En haut : Photographie de la sortie du microcanal qui débouche sur la pointe de la plume.

En bas : Photographie de microscopie électronique de la section de sortie de la plume, dont la largeur est d'environ 20 μm .

Ces systèmes sont raccordés à l'aide de capillaires pour la préparation des phases monolithiques, l'un servant à alimenter le canal et l'autre à évacuer les solvants, de façon à ne pas abîmer la plume lors des étapes d'élaboration de la phase monolithique. Le capillaire de sortie est coupé lorsque la colonne est prête ; la sortie a lieu sur la plume d'électronébulisation. La photographie ci-dessous représente un microsystème intégré incluant une phase monolithique qui a été préparée in situ (trait blanc dans le canal le plus proche) (Figure 48).

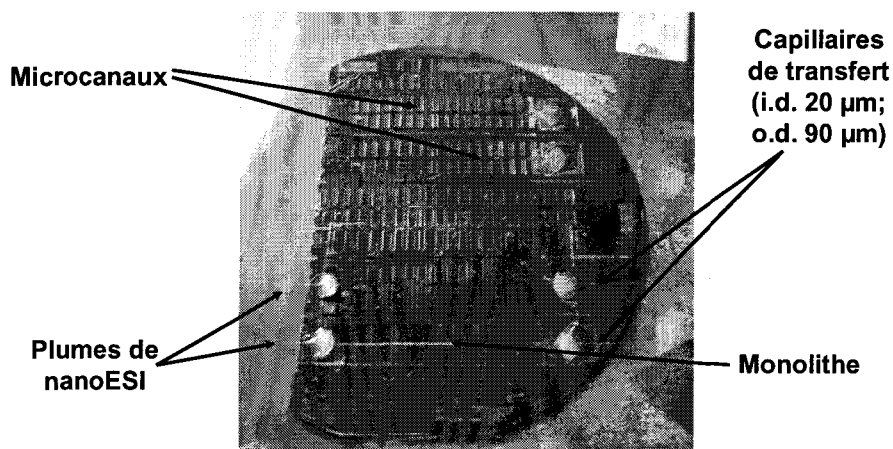


Figure 48 : Photographie d'un microsysteme integre comportant 4 dispositifs identiques et realise dans la resine SU-8.

Les microcanaux sont connectes de part et d'autre a des capillaires de transfert qui sont collés sur le systeme ; en sortie de microcanal se trouve une plume d'électronébulisation. Le premier canal a servi a la polymérisation d'une phase monolithique.

Les phases monolithiques de dessalage (phases en C4) ont été testées sur ces microsystèmes intégrés afin de coupler une analyse en ligne à l'étape préliminaire de préparation des échantillons. L'objectif de l'étude en dessalage était de regarder l'influence de la porosité de la phase monolithique et de son hydrophobie sur les performances en dessalage de cette dernière. Quatre types de phases devaient ainsi être conjointement réalisés et testés, deux phases en C12 et deux phases en C4 avec des porosité de 70 ou 65% (teneur en porogène dans le mélange réactionnel). La Table 11 ci-dessous présente les compositions des mélanges réactionnels utilisés.

Table 11 : Composition des mélanges réactionnels de polymérisation utilisés pour la préparation de phases monolithiques de dessalage dans un microsysteme.

	Composition en monomères	Composition du porogène	Teneur vol en porogène
Phase 1	BMA/EDMA 50/50	Butanediol/Propanol 20/80	65%
Phase 2	BMA/EDMA 50/50	Butanediol/Propanol 20/80	70%
Phase 3	LMA/EDMA 65/35	Ethylène glycol/Cyclohexanol 20/80	65%
Phase 4	LMA/EDMA 65/35	Ethylène glycol/Cyclohexanol 20/80	70%

Ces différentes phases ont été préparées dans des microcanaux de systèmes intégrés et testées pour le dessalage de solutions de peptides standard « salés ». Les tests de dessalage ont été menés

selon un protocole proche de celui de tests des cônes monolithiques de dessalage. Après équilibrage de la phase (10 μL AcCN/H₂O 50/50, 0,1% TFA puis 10 μL H₂O, 0,1% TFA ; 200 nL/min), la solution de peptides à 1 μM est chargée dans le microsystème (10 μL ; 200 nL/min). La colonne est ensuite lavée en milieu acide (H₂O, 0,1% TFA ; 10 μL , 200 nL/min) et l'éluion est réalisée en deux temps, avec une première solution (AcCN/H₂O 50/50, 0,1% TFA ; 5 μL à 200 nL/min) et un deuxième éluant plus polaire (AcCN/H₂O 75/25, 0,1% TFA ; 5 μL à 200 nL/min). Les différentes solutions éluées de la colonne sont recueillies séparément et analysées en spectrométrie de masse MALDI-TOF, dans un premier temps (matrice DHB).

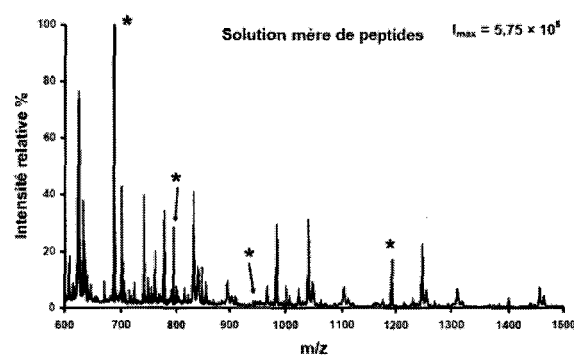


Figure 49 : Spectre de masse de la solution de peptides standard au sortir du congélateur, avant passage sur la phase monolithique.

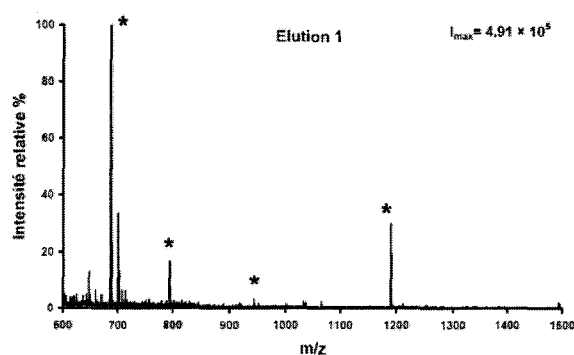


Figure 50 : Spectre de masse de la solution éluée de la colonne monolithique : les contaminations ainsi que les adduits salins ont disparu.

Les premiers tests que nous avons effectués ne nous ont pas permis d'optimiser le protocole de dessalage (quantité d'échantillon peptidique chargée, débit des fluides...). Néanmoins, la solution de peptides standard que nous avons utilisée pour ces tests avait mal vieilli et était fortement contaminée par des polymères provenant du microtubule dans lequel elle était conservée. Le passage sur une phase monolithique a permis de la nettoyer comme le montrent les deux spectres de masse présentés ci-dessus et correspondant à la solution native (Figure 49) et à la solution passée sur une colonne monolithique (Figure 50). Sur la première, les peptides sont à peine identifiables alors que sur le deuxième, ils ressortent nettement.

4. Conclusion

Les premiers tests de polymérisation dans un format de microsysteme ont été concluants ; la polymérisation a lieu et la présence des phases est compatible avec la structure du microsysteme et les matériaux qui le constituent.

Les tests de ces phases monolithiques sont en cours d'optimisation. Une séparation n'est a priori pas envisageable du fait des dimensions des colonnes préparées et du rapport entre ces dimensions, comme nous l'avons discuté auparavant. A l'inverse, une phase de dessalage est tout à fait envisageable et l'optimisation de la composition de la phase d'une part, et des conditions de tests en dessalage d'autre part, est en cours.

B. Phases de digestion monolithiques

1. Problématique

En fin de Chapitre 1, on a vu que la conception du module dédié à une analyse par électronébulisation pouvait se faire à différents niveaux ; le niveau le plus complexe envisagé comporte une étape de digestion protéique sur la puce en amont de la colonne chromatographique.

La réalisation d'un microréacteur enzymatique intégré sur un microsysteme peut faire appel à différentes approches. La plus simple est de conduire la réaction de digestion en solution. Cependant, il faut se débarrasser, ensuite, de l'enzyme, en solution et des produits de dégradation de l'enzyme avant de passer sur la colonne chromatographie. Une alternative à cette technologie en solution est d'immobiliser l'enzyme afin de pallier ces problèmes de « contamination » ultérieure de la solution de digestat peptidique. Si l'enzyme est simplement immobilisée sur les parois des microcanaux ou d'une chambre de réaction, il apparaît évident que la quantité d'enzyme (i.e. le nombre de molécules d'enzyme) immobilisée est insuffisante. La problématique est ramenée à celle de la conception d'un dispositif de chromatographie où l'aire d'échange développée doit être suffisante pour satisfaire aux exigences du module. Les supports d'immobilisation d'enzymes sont classiques, des particules poreuses fonctionnalisées, le plus souvent. Ainsi, avons-nous, de même que précédemment, remplacé ces supports conventionnels par un support monolithique, préparé de façon similaire à ceux dédiés à de la séparation.

La nature des monomères mis en jeu pour la préparation de supports solides monolithiques ne sont pour autant pas les mêmes ; ils comportent un groupement réactif, qui leur tient lieu de

fonctionnalité et sur lequel pourra être ultérieurement greffée l'enzyme. Les groupements de l'enzyme impliqués dans l'ancrage de cette dernière sur le support monolithique sont des fonctions amines, qui sont largement présentes à la périphérie de l'enzyme. Ces groupements amine peuvent facilement réagir avec un grand nombre de fonctions pour donner des liaisons covalentes. La littérature comporte plusieurs exemples de supports monolithiques dédiés à l'immobilisation de molécules, de protéines et donc d'enzymes. Les trois alternatives majeures sont l'utilisation de monomères fonctionnalisés avec un groupement époxy, aldéhyde ou encore vinylazlactone. Les monomères les plus utilisés pour former un support solide monolithique sont donc :

(i) le méthacrylate de glycidyl, qui possède un cycle époxy qui s'ouvre en réagissant avec un groupement amine (schéma 1)

(ii) le méthacrylate d'hydroxyéthyl, qui peut être oxydé en aldéhyde ou en acide carboxylique, groupements qui réagiront alors avec un groupement $-NH_2$ pour donner une base de Schiff ou une liaison amide. (schéma 2)

(iii) le vinylazlactone (schéma 3), monomère peu décrit dans la littérature

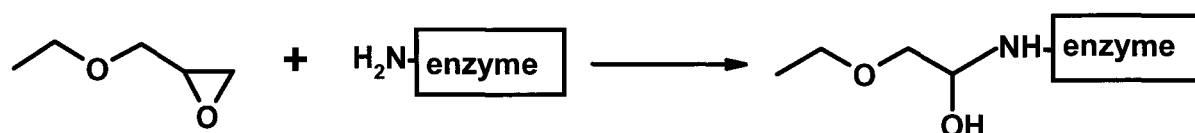


Schéma 1

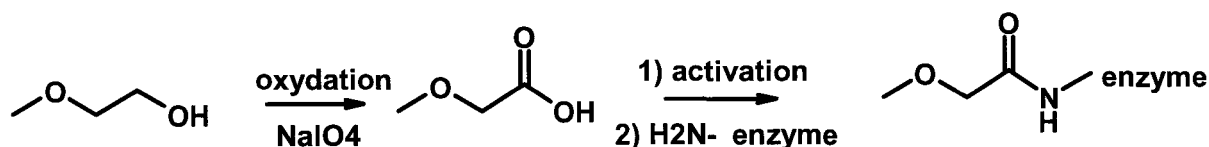


Schéma 2

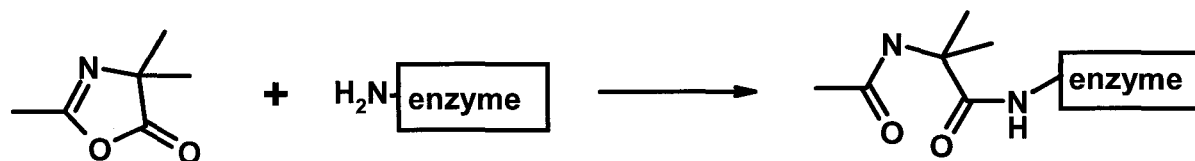


Schéma 3

Figure 51 : Schémas réactionnels d'immobilisation d'enzymes sur un support monolithique

En termes de porosité, la phase monolithique ici doit présenter de plus gros pores que dans le cas des dispositifs chromatographiques puisque les objets ici sont des protéines. De plus, la taille des

objets à greffer sur le support (i.e molécules de trypsine) est comparable à celle des nodules formant la phase ; par conséquent, l'ancrage des molécules de trypsine sur le support monolithique se traduit par une forte diminution de la porosité ce qui explique que la phase monolithique de départ doit être fortement poreuse.

2. Préparation de la phase monolithique de digestion

Les phases monolithiques dédiées à l'ancrage de trypsine en vue de la préparation d'un microréacteur de digestion enzymatique sont préparées similairement aux phases monolithiques de séparation.

Dans un premier temps, nous avons opté, ici aussi, pour des études dans un format capillaire. Ces capillaires ont les mêmes dimensions que précédemment, un diamètre interne de 75 μm pour une longueur de 15 à 20 cm pour un microréacteur. Ils sont transparents aux irradiations UVs, puisque, ici aussi, la phase est préparée par photopolymérisation.

Le mélange réactionnel est constitué de monomères fonctionnels présentant un groupement réactif, le méthacrylate de glycidyle, de monomères réticulants, d'un porogène binaire cyclohexanol/dodécanol et d'AIBN pour amorcer la réaction de polymérisation. Les mélanges réactionnels utilisés pour la préparation de microréacteurs sont beaucoup plus riches en porogène (> 70% vol) et ont une teneur relative en monomère réticulant moindre, ceci en vue de former un support plus poreux et moins réticulé afin de favoriser le passage des enzymes à immobiliser sur le support et des protéines à digérer.

Table 12 : Mélange réactionnel utilisé pour la préparation des supports monolithiques destinés à la réalisation de microréacteurs enzymatiques.

Monomères (% vol)	Porogène (% vol)	% vol de porogène	Amorceur
GMA/EDMA 75/25	Dodécanol / cyclohexanol 11/1	> 75 %	AIBN 1% mt

Après l'étape de traitement de parois, le mélange réactionnel, dégazé, est injecté dans les capillaires. Ces derniers sont placés sous irradiation UV puis lavés en fin de polymérisation. Le support monolithique est prêt.

L'immobilisation de la trypsine a été effectuée selon une procédure décrite dans la littérature, qui est la suivante : la trypsine est dissoute dans une solution aqueuse contenant 0,5 mol/L de sulfate de sodium, et 0,1 mol/L de carbonate de sodium ainsi que 0,01 mol/L de benzamide. Ce dernier est ajouté afin de limiter les phénomènes d'autodigestion de la trypsine. La concentration de trypsine dans cette solution est de 10 mg/mL. La solution d'immobilisation est pompée à travers le capillaire garni de monolithe pendant 5 heures. Enfin, la colonne est équilibrée avec une solution Tris 20 mol/L (pH = 8) dans laquelle le réacteur est conservé jusque son utilisation. Pour ces différentes étapes, l'écoulement des solutions est assuré par un pousse-seringue connecté au capillaire en amont.

3. *Test de digestion dans un microréacteur monolithique*

Les tests des réacteurs enzymatiques ainsi obtenus sont réalisés sur des protéines standard, le cytochrome *c* (cheval) et l'albumine de sérum bovin (BSA) (*Bos taurus*), de poids moléculaires respectifs de 11,7 et 69,29 kDa. Ces protéines sont en solutions à 20 μ M (20 pmol/ μ L) dans un tampon Tris 50 mM (pH=8). Cette solution est pompée à travers le microréacteur enzymatique à un débit de 0.2 à 9 μ l/min ; ce débit est ajusté en fonction de la porosité de la phase utilisée, à l'aide d'un pousse-seringue. La solution sortie de la colonne est collectée pendant 5 minutes au maximum. Les fractions récoltées en sortie du microréacteur pour les différents tests de digestion sont analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un appareil Voyager DE de chez *Perseptive Biosystems*. La matrice utilisée pour ces analyses est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque ou DHB. La solution de matrice est préparée dans un mélange équimoléculaire eau-méthanol une concentration de 10 mg/mL de DHB solide. Cette solution de matrice est conservée au réfrigérateur entre les utilisations. Les dépôts pour les analyses sont réalisés avec 1 μ L de solution de matrice et 1 μ L de solution à analyser ; le dépôt est ensuite séché et cristallisé puis la cible MALDI est introduite dans le spectromètre de masse. Les analyses sont réalisées en mode positif et réflectron sur une large gamme de m/z dépendant de la protéine-test utilisée.

Tous les spectres de masse enregistrés sont d'abord interprétés manuellement à partir de la séquence de la protéine et d'une digestion théorique donnée par un serveur de protéomique (www.expasy.org). Les différents pics sont analysés pour déterminer s'il s'agit de fragments peptidiques, spécifiques ou non, de la protéine digérée. Dans un deuxième temps, la liste de pics obtenus sur le spectre de masse est soumise à une base de données pour vérifier que cette base

est capable de reconnaître la protéine utilisée pour le test de digestion à partir de la liste des fragments obtenus.

4. Résultats

a. Dépouillement manuel des spectres de masse

(i) Cytochrome *c* de cheval

Le spectre de masse est enregistré sur une gamme de m/z allant de 700 à 15000 afin de couvrir les gammes de masse des peptides et de la protéine native. Le spectre montre qu'il reste de la protéine native non digérée après passage sur la colonne monolithique ; elle est détectée sous forme d'un large pic à m/z 12,8 kDa ; la digestion sur le réacteur enzymatique n'a pas été totale. La Figure 52 représente le spectre de masse total obtenu pour la digestion du cytochrome *c* de cheval sur un réacteur monolithique.

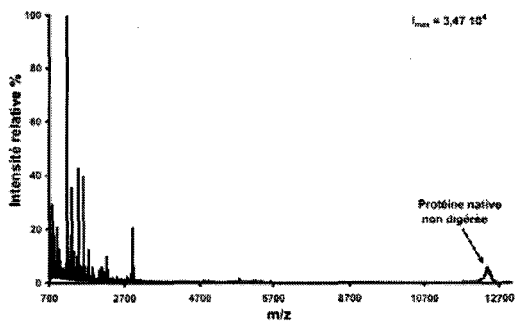


Figure 52 : Spectre de masse MALDI-TOF total obtenu pour le digestat de cytochrome *c* (cheval) sur un microréacteur enzymatique monolithique.

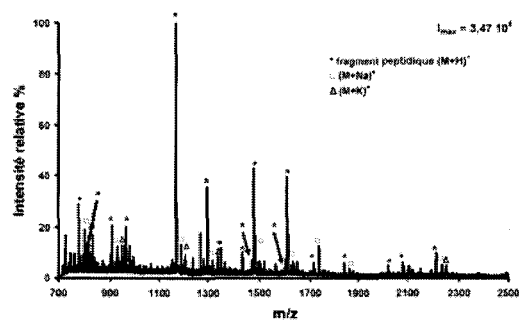


Figure 53 : Zoom sur la gamme m/z 700-2500 du spectre de masse MALDI-TOF obtenu pour le digestat de cytochrome *c* (cheval) sur un microréacteur enzymatique monolithique.

La deuxième plage de masse qui comporte des pics est la zone des m/z 700-2500, zone des pics correspondant aux peptides issus de la digestion de la protéine. La Figure 53 correspond à un agrandissement de la zone 700-2500 du spectre présenté en Figure 52 ; les pics correspondant à des peptides issus de la digestion du cytochrome *c* sont indexés. L'abondance de pics sur cet agrandissement montre que la digestion du cytochrome *c* est effective ; par conséquent, les molécules de trypsine ont bien été retenues sur la phase monolithique et que par ailleurs cette immobilisation de la trypsine n'a pas entraîné une quelconque perte de son activité. La Table 13 liste les pics observés sur le spectre de masse et indique s'il s'agit d'un peptide issu de la digestion du cytochrome *c*, la séquence de ce peptide et le nombre de sites de clivage enzymatique ignorés.

Table 13 : Espèces peptidiques identifiées sur le spectre MALDI-TOF SM du digestat de cytochrome c (cheval) obtenu après passage de la protéine sur le micro-réacteur enzymatique monolithique.

m/z	Fragment peptidique	Nombre de sites de clivage ignorés	Séquence correspondante	Nature de l'ion
779,43	80-86	0	MIFAGIK	(M+H) ⁺
801,48				(M+Na) ⁺
817,42				(M+K) ⁺
795,45	80-86, Met Ox	0	MIFAGIK	(M+H) ⁺
806,44	73-79	1	KYIPGTK	(M+H) ⁺
907,51	80-87	1	MIFAGIKK	(M+H) ⁺
929,62				(M+Na) ⁺
945,60				(M+K) ⁺
923,56	80-87, Met Ox	1	MIFAGIKK	(M+H) ⁺
964,52	92-99	0	EDLIAYLK	(M+H) ⁺
1168,66	28-38	0	TGPNLHGLFGR	(M+H) ⁺
1190,62				(M+Na) ⁺
1206,52				(M+K) ⁺
1296,72	28-39	1	TGPNLHGLFGRK	(M+H) ⁺
1318,73				(M+Na) ⁺
1334,66				(M+K) ⁺
1350,68	89-99	1	TEREDLIAYLK	(M+H) ⁺
1433,77	26-38	1	HKTGPNLHGLFGR	(M+H) ⁺
1470,63	40-53	0	TGQAPGFTYTDANK	(M+H) ⁺
1492,62				(M+Na) ⁺
1509,66				(M+K) ⁺
1478,82	88-99 ou 89-100	2	KTEREDLIAYLK ou TEREDLIAYLKK	(M+H) ⁺
1500,86				(M+Na) ⁺
1561,82	26-39	2	HKTGPNLHGLFGRK	(M+H) ⁺
1598,75	39-53	1	KTGQAPGFTYTDANK	(M+H) ⁺
1620,68				(M+Na) ⁺
1606,85	87-99 ou 88-100	3	KKTEREDLIAYLK ou KTEREDLIAYLKK	(M+H) ⁺
1628,83				(M+Na) ⁺
1644,86				(M+K) ⁺
1712,82	40-55	1	TGQAPGFTYTDANKNK	(M+H) ⁺
1734,83				(M+Na) ⁺
1840,89	39-55	2	KTGQAPGFTYTDANKNK	(M+H) ⁺
1862,88				(M+Na) ⁺
2022,07	88-104	4	KTEREDLIAYLKKATNE	(M+H) ⁺
2080,99	56-72	1	GITWKEETLMEYLENPK	(M+H) ⁺
2209,06	56-73	2	GITWKEETLMEYLENPKK	(M+H) ⁺
2231,08				(M+Na) ⁺
2249,18				(M+K) ⁺

(ii) BSA (Albumine de sérum bovin)

Le spectre de masse a été enregistré ici sur un gamme de m/z allant jusque 70 kDa, afin de couvrir la masse correspondant à la protéine. Cette zone de hautes masses moléculaires ne comporte, contrairement à précédemment, aucun pic indicatif de la présence de protéine native non digérée. Le spectre de masse complet de la digestion de la BSA obtenu lors de cette expérience est présenté en Figure 54 (gamme m/z 7000-20000).

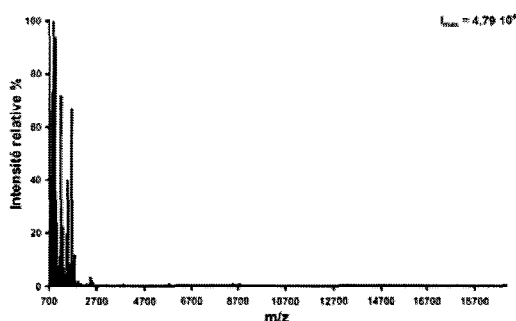


Figure 54 : Spectre de masse MALDI-TOF total obtenu pour le digestat de BSA (*Bos taurus*) sur un microréacteur enzymatique monolithique.

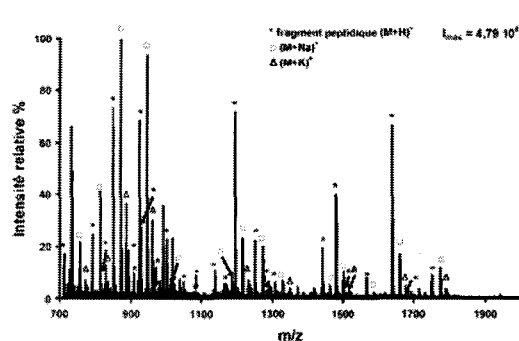


Figure 55 : Zoom sur la gamme m/z 700-2000 du spectre de masse MALDI-TOF obtenu pour le digestat de BSA (*Bos taurus*) sur un microréacteur enzymatique monolithique.

La zone de m/z 700-2000 comprend de nombreux pics correspondant à des fragments de BSA digérée. La Figure 55 est un agrandissement de cette zone et les pics identifiés comme des fragments digérés sont indexés avec leur séquence. La Table 14 résume les espèces identifiées dans la zone de m/z 700-2000 avec leur séquence si ce sont des fragments de BSA. Là encore, la molécule de trypsine a bien été immobilisée sur le support monolithique et est capable de digérer une protéine.

Il est intéressant de noter que les spectres de masse révèlent la présence de sels, ce qui se traduit par de nombreux adduits salins sur les peptides analysés et l'apparition de pics correspondant à des espèces de type $(M+Na)^+$ ou $(M+K)^+$. Ceci est dû au fait que le milieu de digestion est fortement salin ; l'immobilisation de la trypsine a lieu en présence de sulfate de sodium et la digestion est menée dans un tampon Tris. Nous avons cherché à éliminer ces adduits en effectuant une étape de dessalage des digestats obtenus avant leur analyse en spectrométrie de masse sur des supports appropriés. Malheureusement, cette étape de dessalage n'a pas donné pour l'instant les résultats espérés.

Table 14 : Espèces peptidiques identifiées sur le spectre MALDI-TOF SM du digestat de BSA (*Bos taurus*) obtenu après passage de la protéine sur le microréacteur enzymatique monolithique.

<i>m/z</i>	Fragment peptidique	Nombre de sites de clivage ignorés	Séquence correspondant	Nature de l'ion
712,37	581-587	0	CCAADDK	(M+H) ⁺
733,38	?	?	?	(M+H) ⁺
755,37				(M+Na) ⁺
				(M+K) ⁺
789,47	257-263	0	LVTDLTK	(M+H) ⁺
811,50				(M+Na) ⁺
827,46				(M+K) ⁺
818,44	562-568	0	ATEEQLK	(M+H) ⁺
847,47	242-248	1	LSQKFPK	(M+H) ⁺
869,48				(M+Na) ⁺
885,43				(M+K) ⁺
891,45				2 Na
906,45	205-211	1	IETMREK	(M+H) ⁺
918,50	221-228	1	LRCASIQK	(M+H) ⁺
940,58				(M+Na) ⁺
922,48	249-256	0	AEFVEVTK	(M+H) ⁺
944,52				(M+Na) ⁺
960,46				(M+K) ⁺
966,39				
927,46	221-228	1	LRCASIQK	(M+H) ⁺
977,45	123-130	0	NECFLSHK	(M+H) ⁺
990,58				(M+H) ⁺
1012,46				(M+H) ⁺
1001,54	233-241	1	ALKAWSVAR	(M+H) ⁺
1023,54				(M+Na) ⁺
1017,60				(M+H) ⁺
1039,51				+ Na
1050,46	460-468	0	CCTKPESER	(M+H) ⁺
	588-597	0	EACFAVEGPK	(M+H) ⁺
1083,58	161-168	1	YLYEIARR	(M+H) ⁺
1138,59	223-232	1	CASIQKFGER	(M+H) ⁺
1163,62	66-75	0	LVNELTEFAK	(M+H) ⁺
1185,62				(M+Na) ⁺
1193,64	25-34	1	DTHKSEIAHR	(M+H) ⁺
1215,54				(M+Na) ⁺
1231,51				(M+K) ⁺
1249,60	35-44	1	FKDLGEEHFK	(M+H) ⁺
1271,53				(M+Na) ⁺
1283,64	361-371	0	HPEYAVSVLLR	(M+H) ⁺
1305,66	402-412	0	HLVDEPQNLIK	(M+H) ⁺
1327,67				(M+Na) ⁺
1343,65				(M+K) ⁺
1369,52				
1439,77	360-371	1	RHPEYAVSVLLR	(M+H) ⁺
1461,73				(M+Na) ⁺
1479,75	421-433	0	LGEYGFQNALIVR	(M+H) ⁺
1501,70				(M+Na) ⁺

1517,73				(M+K) ⁺
1567,74	347-359	0	DAFLGSFLYEYSR	(M+H) ⁺
1589,57				(M+Na) ⁺
1639,90	437-451	1	KVPQVSTPTLVEVSR	(M+H) ⁺
1661,84				(M+Na) ⁺
1677,80				(M+K) ⁺
1692,95	249-263	1	AEFVEVTKLVTDLTK	(M+H) ⁺
1750,89	242-256	2	LSQKFPKAEFVEVTK	(M+H) ⁺
				(M+Na) ⁺
1772,91				(M+K) ⁺
1788,93				2 Na
1794,96				

b. Confrontation aux banques de données

Dans un deuxième temps, la liste des pics observés sur le spectre de masse a été soumise à un moteur de recherche protéomique (www.prospector.ucsf.edu) pour s'assurer que la protéine initiale était identifiable à partir de la série de fragments obtenus. Pour ce test, il a été indiqué au moteur de recherche de considérer les peptides obtenus avec au plus un site de clivage ignoré.

(i) Cytochrome c de cheval

Pour le cytochrome *c* de cheval, le moteur de recherche identifie 12 espèces correspondant à des fragments peptidiques issus de la digestion de la protéine initiale. La Table 15 ci-dessous résume ces résultats d'identification.

Si un site de clivage est ignoré pour la digestion du cytochrome *c*, 80 espèces peptidiques différentes sont possibles ; ici, 12 espèces parmi les 80 possibles sont identifiées par le moteur de recherche, soit 15 % des espèces attendues. Ces 12 espèces couvrent néanmoins 70 % de la séquence de la protéine soit 73 des 104 acides aminés constituant la protéine de cytochrome *c*. La Figure 56 montre la couverture de la séquence du cytochrome *c* par les peptides identifiés lors de ce test.

Table 15 : Peptides identifiés par le moteur de recherche pour une identification automatique de la protéine digérée (cytochrome *c*) sur un microréacteur enzymatique à partir de la liste des pics (m/z) détectés en MALDI-TOF SM.

m/z mesuré	m/z théorique	Delta ppm	Fragment	Séquence
779,4819	779,4490	42	80-86	MIFAGIK
795,4574	795,4439	17	80-86	MIFAGIK
806,4792	806,4776	2	73-79	KYIPGTK
907,5547	907,5439	12	80-87	MIFAGIKK
1168,6407	1168,6227	15	28-38	TGPNLHGLFGR
1296,7217	1296,7177	3.1	28-39	TGPNLHGLFGRK
1350,7224	1350,7269	-3.3	89-99	TEREDLIAYLK
1433,7632	1433,7766	-9.3	26-39	HKTGPNLHGLFGRK
1470,6404	1470,6865	-31	40-53	TGQAPGFTYTDANK
1598,7565	1598,7815	-16	39-53	KTGQAPGFTYTDANK
1712,7705	1712,8244	-31	40-55	TGQAPGFTYTDANKNK
2080,9314	2081,0265	-46	56-72	GITWKEETLMEYLENPK

L'exploitation manuelle des résultats a conduit à l'identification d'un plus grand nombre d'espèces que celles reconnues par le moteur de recherche ; en effet, pour la recherche automatique, seul un site de clivage ignoré a été toléré alors que manuellement des fragments comportant 2 sites de clivages ou plus manqués ont été identifiés. L'exploitation manuelle des résultats a conduit à 75 % de couverture de la séquence du cytochrome *c*.

Nous devons cependant insister sur le fait que les spectres de masse obtenus révélaient la présence d'une quantité non négligeable de sels. La présence de sels ne donne pas des conditions optimales d'analyse puisque le sel est un des ennemis de l'analyse en spectrométrie de masse ; il est donc fort possible que des espèces peptidiques produites par la digestion sur réacteur monolithique n'aient pas été détectées lors de ces expériences.

1	11	21	31	41	
GDVEKGGKKIF	VQKCAQCHTV	EKGGKHKTGP	NLHGLFGRKT	GQAPGFYTYD	
51	61	71	81	91	101
ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	PKKYIPGTKM	IFAGIKKKTE	REDLIAYLKK	ATNE

Figure 56 : Séquence du cytochrome *c* (cheval) ; les résidus soulignés correspondent aux résidus identifiés lors de cette expérience de digestion (exploitation manuelle des résultats).

(ii) *Albumine de sérum bovin*

Pour la BSA, 19 espèces peptidiques sont identifiées parmi la liste de pics soumise au moteur de recherche comme des fragments issus de la digestion de la protéine. La Table 16 ci-dessous présente ces résultats d'identification.

De même que précédemment, en ignorant un site de clivage de la trypsine, 84 espèces peptidiques distinctes peuvent être générées. Ici, 19 d'entre elles soit 22% sont reconnues par le moteur de recherche, ce qui correspond à 151 des 607 résidus constituant la BSA et à 24% de couverture de la séquence totale, comme le montre la Figure 57 ci-dessous.

Ici encore, manuellement, plus de peptides ont été identifiés : la couverture de séquence manuelle est de 24 %. Une étape de dessalage avant l'analyse MALDI devrait encore permettre d'améliorer ces résultats, d'autant plus que la présence de sels était a priori plus importante pour cette expérience que la précédente avec le cytochrome *c*.

Table 16: Peptides identifiés par le moteur de recherche pour une identification automatique de la protéine digérée (BSA) sur un microréacteur enzymatique à partir de la liste des pics (m/z) détectés en MALDI-TOF SM.

m/z mesuré	m/z théorique	Delta ppm	Fragment	Séquence
712,3843	712,3742	14	29-34	SEIAHR
789,4714	789,4722	-1	257-263	LVTDLTK
847,4919	847,5042	-14	242-248	LSQKFPK
918,5337	918,5195	15	221-228	LRCASIQK
922,4759	922,4668	9,9	205-211	IETMREK
922,4759	922,4886	-14	249-256	AEFVEVTK
927,4911	927,4940	-3,1	161-167	YLYEJAR
1001,5751	1001,5892	-15	233-241	ALKAWSVAR
1138,5588	1138,5679	-8	223-232	CASIQKFGER
163,5995	1163,6312	-27	66-75	LVNELTEFAK
1193,5947	1193,6027	-6,7	25-34	DTHKSEIAHR
1249,5904	1249,6217	-25	35-44	FKDLGEEHFK
1283,6802	1283,7112	-24	361-371	HPEYAVSVLLR
1305,6709	1305,7167	-35	402-412	HLVDEPQNLIK
1439,7647	1439,8123	-33	360-371	RHPEYAVSVLLR
1479,7664	1479,7960	-20	421-433	LGEYGFQNALIVR
1511,7788	1511,8433	-43	438-451	VPQVSTPTLVEVSR
1567,6996	1567,7433	-28	347-359	DAFLGSFLYEYSR
1639,9010	1639,9383	-23	437-451	KVPQVSTPTLVEVSR
1692,8686	1692,9424	-44	249-263	AEFVEVTKLVTDLTK

1	11	21	31	41	51	61	71
MKWVTFISLL	LLFSSAYS <u>SRG</u>	V <u>FRRD</u> <u>THKSE</u>	<u>IAHR</u> <u>FKDLGE</u>	<u>EHFK</u> <u>G</u> <u>LVLIA</u>	FSQYLQQCPF	DEHV <u>KLVNEL</u>	<u>TEFAK</u> <u>TCVAD</u>
81	91	101	111	121	131	141	151
ESHAGCE <u>KSL</u>	HTLFG <u>DELCK</u>	VASL <u>RETYGD</u>	MADCCE <u>KQEP</u>	ER <u>NECF</u> <u>LSHK</u>	DDSPDL <u>P</u> <u>KLK</u>	PDPNTLCDEF	<u>KADEK</u> <u>KFWGK</u>
161	171	181	191	201	211	221	231
<u>YLYE</u> <u>IARRHP</u>	YFYAPELLLY	ANKYNGVFQE	CCQAED <u>KGAC</u>	LLPK <u>IETMRE</u>	<u>KVLASSARQR</u>	<u>LRCASIQKFG</u>	<u>ERALKAWSVA</u>
241	251	261	271	281	291	301	311
<u>RLSQ</u> <u>KFPKAE</u>	<u>FVEVTKLVTD</u>	<u>LTKVHKECCH</u>	GDLLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISS <u>KLKE</u>	CCDKPLLE <u>KS</u>	HCIAEVE <u>KDA</u>
321	331	341	351	361	371	381	391
IPENLPPLTA	DFAED <u>KDVCK</u>	NYQEAK <u>DAFL</u>	<u>GSFLYEYSRR</u>	<u>HPEYAVSVLL</u>	<u>RLAKEYEATL</u>	EECCA <u>KDDPH</u>	ACYSTVFD <u>KL</u>
401	411	421	431	441	451	461	471
<u>KHLVDEPQNL</u>	<u>IKQNCDOFEK</u>	<u>LGEYGFQNAL</u>	<u>IVRYTRKVPQ</u>	<u>VSTPTLVEVS</u>	<u>RSLGKVGTRC</u>	<u>CTKPESERMP</u>	CTEDYLSLIL
481	491	501	511	521	531	541	551
NRLCVLHEKT	PVSE <u>KVTKCC</u>	TESLVN <u>RRPC</u>	FSALTPDETY	VPKAF <u>DEKLF</u>	TFHADICTLP	DTEK <u>QIKKQT</u>	ALVELLK <u>HKP</u>
561	571	581	591	601			
<u>KATEEQ</u> <u>LKTV</u>	MENFVAFV <u>DK</u>	<u>CCAADDKEAC</u>	FAVEGPKLVV	STQTALA			

Figure 57 : Séquence de la BSA (*Bos taurus*) ; les résidus soulignés correspondent aux résidus identifiés lors de cette expérience de digestion (exploitation manuelle des résultats).

5. Conclusion

Nous avons ainsi préparé un microréacteur de digestion enzymatique à partir d'un support monolithique sur lequel est greffée l'enzyme de digestion, la trypsine. Le réacteur est préparé dans un support capillaire, à partir du méthacrylate de glycidyl comme monomère fonctionnel. Le réacteur, une fois préparé, est mis en œuvre dans ces conditions classiques. Il a été éprouvé pour la digestion de deux protéines standard ayant des poids moléculaires fort différents.

La digestion effective des protéines sur le microréacteur est révélée par la présence de nombreux fragments peptidiques, détectés lors de l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF. Pour le test du cytochrome c , la protéine native est néanmoins détectée sous forme d'un large pic à 12,9 kDa, ce qui n'est pas le cas de la BSA. Pour cette dernière, il est fort probable que l'absence de protéine native ne signifie pas que toute la protéine a été digérée mais qu'elle est retenue sur la phase, dont la porosité est trop faible pour laisser passer une protéine aussi grosse.

Dans les deux cas, la plupart des peptides détectés sont issus de la digestion de la protéine, mais certains peptides sont non spécifiques : ils relèvent d'une action de la chimiotrypsine et non de la trypsine. Un traitement préliminaire de l'enzyme pallierait ce phénomène. De plus, on note la présence abondante d'adduits salins sur les espèces peptidiques détectées en masse ; ceci gêne d'une part, à l'identification des peptides et d'autre part, perturbe l'analyse en spectrométrie de masse. Ce phénomène est particulièrement marqué pour la deuxième protéine testée, l'albumine de sérum bovin, pour laquelle les intensités des peptides avec des adduits salins sont plus grandes que celles des peptides « nus » et protonés.

Ces études de digestion ont été continuées au laboratoire en tenant compte de ces observations. Une étape de dessalage a notamment été incluse avant l'analyse en spectrométrie de masse. Ce dessalage, effectué sur un support *ZipTip* améliore grandement les conditions d'analyse : les adduits salins « disparaissent ».

Par ailleurs, l'influence de la vitesse de pompage à travers le microréacteur a été étudiée ; la vitesse d'écoulement du liquide influe sur la nature des espèces détectées en spectrométrie de masse. Lorsque l'écoulement est rapide, le temps de séjour dans le microréacteur est « court », la digestion est partielle. Si au contraire, l'écoulement est plus lent, le temps de séjour dans le microréacteur est plus lent et la digestion est plus poussée. Il en résulte, qu'à couverture de la séquence protéique équivalente, les espèces peptidiques ne sont pas les mêmes. Dans le premier cas, les fragments sont plus longs et comportent plusieurs sites de clivage manqués alors que dans

le deuxième cas, les peptides obtenus sont plus courts et présentent au maximum un site de clivage manqué.

REFERENCES

- [1] Constantopoulos, Terri L.; Jackson, George S.; Enke, Christie G. Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10*, 625-634.
- [2] Figeys, Daniel; Aebersold, Ruedi. Nanoflow Solvent Gradient Delivery from a Microfabricated Device for Protein Identifications by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 3721-3727.
- [3] Manz, Andreas; Harrison, D. Jed; Verpoorte, Elisabeth M. J.; Fetting, James C.; Paulus, Aran; Luedi, Hans; Widmer, H. Michael. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems. Capillary electrophoresis on a chip. *Journal of Chromatography* **1992**, *593*, 253-258.
- [4] Harrison, D. Jed; Glavina, P. G.; Manz, Andreas. Towards miniaturized electrophoresis and chemical analysis systems on silicon: an alternative to chemical sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1993**, *B10*, 107-116.
- [5] Effenhauser, Carlo S.; Bruin, Gerard J. M.; Paulus, Aran. Integrated chip-based capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2203-2213.
- [6] Jacobson, Stephen C.; Hergenroeder, Roland; Koutny, Lance B.; Ramsey, J. Michael. Open Channel Electrochromatography on a Microchip. *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 2369-2373.
- [7] Ocvirk, Gregor; Verpoorte, Elisabeth; Manz, Andreas; Grasserbauer, Manfred; Widmer, H. Michael. High performance liquid chromatography partially integrated onto a silicon chip. *Analytical Methods & Instrumentation* **1995**, *2*, 74-82.
- [8] Andersson, Helene; Van der Wijngaart, Wouter; Stemme, Goran. Micromachined filter-chamber array with passive valves for biochemical assays on beads. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 249-257.
- [9] Ceriotti, Laura; de Rooij, Nico F.; Verpoorte, Elisabeth. An integrated fritless column for on-chip capillary electrochromatography with conventional stationary phases. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 639-647.
- [10] Oleschuk, Richard D.; Shultz-Lockyear, Loranelle L.; Ning, Yuebin; Harrison, D. Jed. Trapping of bead-based reagents within microfluidic systems. On-chip solid-phase extraction and electrochromatography. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 585-590.
- [11] He, Bing; Tait, Niall; Regnier, Fred. Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 3790-3797.
- [12] He, Bing; Regnier, Fred. Microfabricated liquid chromatography columns based on collocated monolith support structures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1998**, *17*, 925-932.
- [13] Slentz, Benjamin E.; Penner, Natalia A.; Regnier, Fred E. Protein proteolysis and the multi-dimensional electrochromatographic separation of histidine-containing peptide fragments on a chip. *Journal of Chromatography, A* **2003**, *984*, 97-107.
- [14] Kaji, Noritada; Tezuka, Yojiro; Takamura, Yuzuru; Ueda, Masanori; Nishimoto, Takahiro; Nakanishi, Hiroaki; Horiike, Yasuhiro; Baba, Yoshinobu. Separation of Long DNA Molecules by Quartz Nanopillar Chips under a Direct Current Electric Field. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 15-22.
- [15] Fujimoto, Chuzo; Fujise, Yutaka; Matsuzawa, Eiji. Fritless Packed Columns for Capillary Electrochromatography: Separation of Uncharged Compounds on Hydrophobic Hydrogels. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 2753-2757.
- [16] Fujimoto, Chuzo; Kino, Jun; Sawada, Hirokazu. Capillary electrochromatography of small molecules in polyacrylamide gels with electroosmotic flow. *Journal of Chromatography, A* **1995**, *716*, 107-113.
- [17] Barroso, Begona; Lubda, Dieter; Bischoff, Rainer. Applications of monolithic silica capillary columns in proteomics. *Journal of Proteome Research* **2003**, *2*, 633-642.
- [18] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. "Molded" rods of macroporous polymer for preparation separations of biological products. *Biotechnology and Bioengineering* **1995**, *48*, 476-480.
- [19] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of "Molded" Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations or Catalysis. *Chemistry of Materials* **1995**, *7*, 707-715.
- [20] Peters, Eric C.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Rigid macroporous polymer monoliths. *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* **1999**, *11*, 1169-1181.
- [21] Peters, Eric C.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Preparation of large-diameter "molded" porous polymer monoliths and the control of pore structure homogeneity. *Chemistry of Materials* **1997**, *9*, 1898-1902.
- [22] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers. *Macromolecules* **1995**, *28*, 7580-7582.
- [23] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. New porous polymer monoliths with enhanced properties: supports for rapid and efficient separations. *Polymeric Materials Science and Engineering* **1999**, *81*, 544-545.
- [24] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Molded Rigid Monolithic Porous Polymers: An Inexpensive, Efficient, and Versatile Alternative to Beads for the Design of Materials for Numerous Applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1999**, *38*, 34-48.

- [25] Viklund, Camilla; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J.; Irgum, Knut. Monolithic, "Molded", Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties during Polymerization. *Chemistry of Materials* **1996**, *8*, 744-750.
- [26] van Deemter, J. J.; Zuiderweg, F. J.; Klinkenberg, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science* **1956**, *5*, 271-289.
- [27] Chirica, G. S.; Remcho, V. T. Novel monolithic columns with templated porosity. *Journal of Chromatography, A* **2001**, *924*, 223-232.
- [28] Xie, Shaofeng; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Rigid porous polyacrylamide-based monolithic columns containing butyl methacrylate as a separation medium for the rapid hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Chromatography, A* **1997**, *775*, 65-72.
- [29] Premstaller, Andreas; Oberacher, Herbert; Walcher, Wolfgang; Timperio, Anna Maria; Zolla, Lello; Chervet, Jean-Pierre; Cavusoglu, Nukhet; van Dorselaer, Alain; Huber, Christian G. High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using monolithic capillary columns for proteomic studies. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 2390-2396.
- [30] Yu, Cong; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. 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* **2000**, *21*, 120-127.
- [31] Xu, Mingcheng; Peterson, Dominic S.; Rohr, Thomas; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Polar polymeric stationary phases for normal-phase HPLC based on monodisperse macroporous poly(2,3-dihydroxypropyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) beads. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 1011-1021.
- [32] Xie, Shaofeng; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. 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* **1997**, *35*, 1013-1021.
- [33] Ivanov, Alexander R.; Zang, Li; Karger, Barry L. Low-attomole electrospray ionization MS and MS/MS analysis of protein tryptic digests using 20- μ m-i.d. Polystyrene-divinylbenzene monolithic capillary columns. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 5306-5316.
- [34] Wang, Q. Ching; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 2243-2248.
- [35] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Modified poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) continuous rod columns for preparative-scale ion-exchange chromatography of proteins. *Journal of Chromatography, A* **1995**, *702*, 89-95.
- [36] Pan, Zaifa; Zou, Hanfa; Mo, Weimin; Huang, Xiaodong; Wu, Renan. Protein A immobilized monolithic capillary column for affinity chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *466*, 141-150.
- [37] Hahn, R.; Podgornik, A.; Merhar, M.; Schallaun, E.; Jungbauer, A. Affinity monoliths generated by in situ polymerization of the ligand. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5126-5132.
- [38] Luo, Quanzhou; Zou, Hanfa; Zhang, Qiang; Xiao, Xiangzhu; Ni, Jianyi. High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, *80*, 481-489.
- [39] Wang, Q. Ching; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Reversed-phase chromatography of small molecules and peptides on a continuous rod of macroporous poly(styrene-co-divinylbenzene). *Journal of Chromatography, A* **1994**, *669*, 230-235.
- [40] Premstaller, Andreas; Oefner, Peter J.; Oberacher, Herbert; Huber, Christian G. Capillary Array High-Performance Liquid Chromatography of Nucleic Acids and Proteins. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4688-4693.
- [41] Podgornik, Ales; Barut, Milos; Jancar, Janez; Strancar, Ales. Isocratic separations on thin glycidyl methacrylate-ethylenedimethacrylate monoliths. *Journal of Chromatography, A* **1999**, *848*, 51-60.
- [42] Sykora, David; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Separation of oligonucleotides on novel monolithic columns with ion-exchange functional surfaces. *Journal of Chromatography, A* **1999**, *852*, 297-304.
- [43] Bedair, Mohamed; El Rassi, Ziad. Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: 1. Preparation of sulfonated stearyl acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization with neutral and charged solutes. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2938-2948.
- [44] Peters, Eric C.; Petro, Miroslav; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 3646-3649.
- [45] Liao, Jia-Li; Chen, Nong; Ericson, Christer; Hjerten, Stellan. Preparation of Continuous Beds Derivatized with Alkyl and Sulfonate Groups for Capillary Electrochromatography. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 3468-3472.
- [46] Ngola, Sarah M.; Fintschenko, Yolanda; Choi, Wen-Yee; Shepodd, Timothy J. Conduct-as-cast polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 849-856.
- [47] Petro, Miroslav; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Immobilization of trypsin onto "molded" macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* **1996**, *49*, 355-363.

- [48] Bahar, Tahsin; Tuncel, Ali. Immobilization of α -chymotrypsin onto newly produced poly(hydroxypropyl methacrylate-co-methacrylic acid) hydrogel beads. *Reactive & Functional Polymers* **2000**, *44*, 71-78.
- [49] Xie, Shaofeng; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Monolithic poly(2-vinyl-4,4-dimethylazlactone-co-acrylamide-co-ethylene dimethacrylate) support for design of high throughput bioreactors. *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)* **1997**, *38*, 211-212.
- [50] Jain, Seema Rani; Borowska, Ewa; Davidsson, Richard; Tudorache, Madalina; Ponten, Einar; Emneus, Jenny. A chemiluminescence flow immunosensor based on a porous monolithic metacrylate and polyethylene composite disc modified with Protein G. *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, *19*, 795-803.
- [51] Ponten, Einar; Viklund, Camilla; Irgum, Knut; Bogen, Stein Tore; Lindgren, Aasa Nson. Solid Phase Chemiluminescence Detection Reactors Based on in Situ Polymerized Methacrylate Materials. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 4389-4396.
- [52] Yu, Cong; Xu, Mingcheng; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Preparation of monolithic polymers with controlled porous properties for microfluidic chip applications using photoinitiated free-radical polymerization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **2002**, *40*, 755-769.
- [53] Yu, Cong; Davey, Mark H.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Monolithic porous polymer for on-chip solid-phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5088-5096.
- [54] Rohr, Thomas; Yu, Cong; Davey, Mark H.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Porous polymer monoliths: simple and efficient mixers prepared by direct polymerization in the channels of microfluidic chips. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3959-3967.
- [55] Fintschenko, Yolanda; Choi, Wen-Yee; Ngola, Sarah M.; Shepodd, Timothy J. Chip electrochromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons on an acrylate-based UV-initiated porous polymer monolith. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *371*, 174-181.
- [56] Throckmorton, Daniel J.; Shepodd, Timothy J.; Singh, Anup K. Electrochromatography in microchips: reversed-phase separation of peptides and amino acids using photopatterned rigid polymer monoliths. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 784-789.
- [57] Luo, Quanzhou; Mutlu, Senol; Gianchandani, Yogesh B.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Monolithic valves for microfluidic chips based on thermoresponsive polymer gels. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3694-3702.
- [58] Yu, Cong; Mutlu, Senol; Selvaganapathy, Ponnambalam; Mastrangelo, Carlos H.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Flow Control Valves for Analytical Microfluidic Chips without Mechanical Parts Based on Thermally Responsive Monolithic Polymers. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 1958-1961.
- [59] Peterson, Dominic S.; Rohr, Thomas; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. High-Throughput Peptide Mass Mapping Using a Microdevice Containing Trypsin Immobilized on a Porous Polymer Monolith Coupled to MALDI TOF and ESI TOF Mass Spectrometers. *Journal of Proteome Research* **2002**, *1*, 563-568.
- [60] Peterson, Dominic S.; Rohr, Thomas; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Enzymatic microreactor-on-a-chip: Protein mapping using trypsin immobilized on porous polymer monoliths molded in channels of microfluidic devices. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4081-4088.
- [61] Vervoort, Nico; Gzil, Piotr; Baron, Gino V.; Desmet, Gert. A Correlation for the Pressure Drop in Monolithic Silica Columns. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 843-850.
- [62] Meek, James L. Prediction of peptide retention times in high-pressure liquid chromatography on the basis of amino acid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980**, *77*, 1632-1636.
- [63] Meek, James L.; Rossetti, Zvani L. Factors affecting retention and resolution of peptides in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **1981**, *211*, 15-28.
- [64] Browne, C. A.; Bennett, H. P. J.; Solomon, S. The isolation of peptides by high-performance liquid chromatography using predicted elution positions. *Analytical Biochemistry* **1982**, *124*, 201-208.
- [65] Wang, Aosheng; Carr, Peter W. Comparative study of the linear solvation energy relationship, linear solvent strength theory, and typical-conditions model for retention prediction in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A* **2002**, *965*, 3-23.
- [66] Kaliszan, Roman; Baczek, Tomasz; Bucinski, Adam; Buszewski, Boguslaw; Sztupecka, Malgorzata. Prediction of gradient retention from the linear solvent strength (LSS) model, quantitative structure-retention relationships (QSRR), and artificial neural networks (ANN). *Journal of Separation Science* **2003**, *26*, 271-282.
- [67] Wang, Aosheng; Tan, Lay Choo; Carr, Peter W. Global linear solvation energy relationships for retention prediction in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A* **1999**, *848*, 21-37.
- [68] Baczek, Tomasz; Kaliszan, Roman. Combination of linear solvent strength model and quantitative structure-retention relationships as a comprehensive procedure of approximate prediction of retention in gradient liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A* **2002**, *962*, 41-55.

*Interface avec la
spectrométrie de masse*

I. Présentation du problème/problématique

A. Description. Présentation de l'électronébulisation

1. Rôle de l'électronébulisation

L'électronébulisation consiste à transformer un liquide en un nébulisat formé de gouttelettes chargées suite à l'application d'une haute tension sur ce liquide. Le liquide arrive dans un capillaire où il est soumis à une haute tension continue ou alternative voire à une superposition des deux. Sous l'action de la tension, le liquide est nébulisé, à la sortie du capillaire, pour donner un gaz d'ions. Ce dernier est injecté dans le spectromètre de masse en vue de son analyse. Le rôle de l'électronébulisation est, ici, d'ioniser des molécules contenues dans une solution et les faire passer en phase gazeuse, en vue de leur analyse par spectrométrie de masse en fonction du rapport m/z où m est le poids moléculaire de la molécule et z sa charge.

L'ionisation par électronébulisation est, avec la technique MALDI d'ionisation et désorption assistées par une matrice et une irradiation laser, une méthode d'ionisation dite « douce ». En effet, ces deux méthodes permettent l'ionisation, et donc l'analyse, de grosses molécules (protéines, fragments oligonucléotidiques, polymère...) sans induire leur fragmentation. L'énergie fournie à l'échantillon est assez forte pour faire passer les molécules en phase gazeuse, sans être cependant trop élevée et induire la fragmentation des espèces ou les modifier, a priori. Ces méthodes d'ionisation constituent les voies les plus courantes, voire exclusives avant une analyse par spectrométrie de masse de grosses molécules, en particulier biologiques. Par conséquent, elles sont les deux techniques les plus utilisées à l'heure actuelle pour l'ionisation et leur essor est lié à celui du domaine des analyses biologiques et celui de la protéomique en particulier.¹

2. Phénomènes d'électronébulisation

Le nébulisat se forme lorsque les forces électriques dues à l'application de la tension et l'apparition de charges compensent et surpassent les forces de tension de surface du liquide à l'extrémité du capillaire, ce qui s'exprime sous la forme suivante :

$$\frac{1}{2} \left(\frac{q^2}{r} \right) = 4\pi\gamma r^2$$

où q est la charge de la gouttelette, r son rayon et γ le coefficient de tension superficielle.

Se forme, alors, un gaz de gouttelettes dont la taille dépend de celle de l'orifice de sortie du capillaire. Ces gouttelettes vont donner des ions en phase gazeuse en plusieurs étapes. Les

mécanismes sous-tendant les processus d'électronébulisation et l'obtention d'ions en phase gazeuse sont encore mal connus. Deux théories tentent de les expliquer, les modèles de Iribarne et de Kebarle. Seul le modèle de Kebarle sera présenté ici.

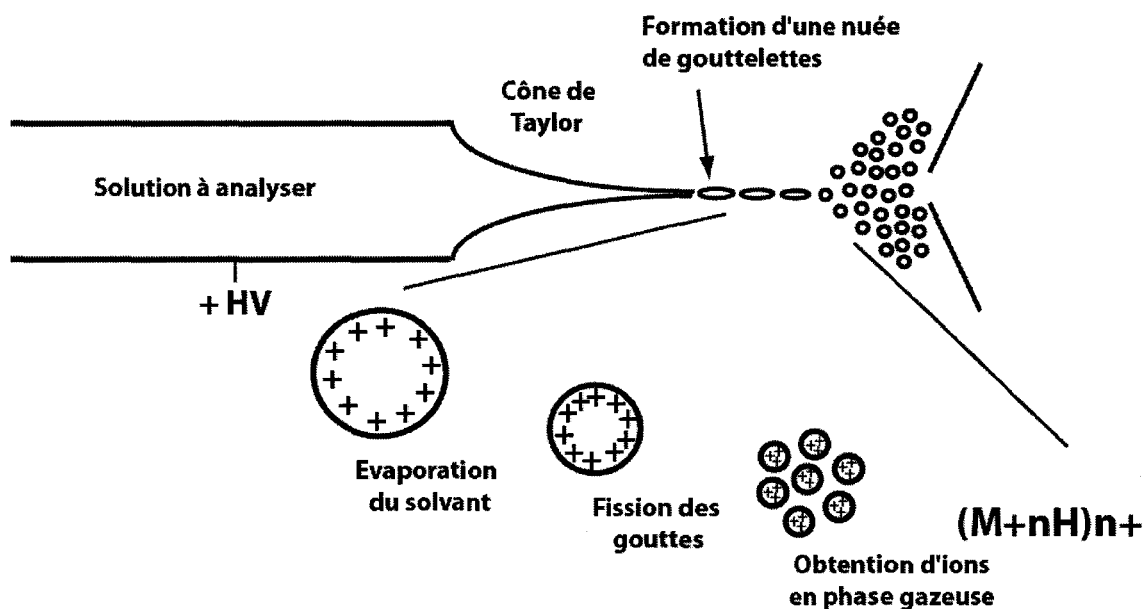


Figure 1 : Schéma de production d'ions en phase gazeuse, en trois étapes : (i) évaporation du solvant, (ii) fission des gouttes et (iii) formation d'ions en phase gazeuse.

Le liquide qui comprend une composante volatile (méthanol, acétonitrile) s'évapore : la taille des gouttelettes diminue jusqu'à atteindre une limite, appelée limite de Rayleigh, où les forces électriques compensent exactement les tensions de surface. A ce stade, les gouttelettes fissionnent en une multitude de gouttelettes plus petites, qui vont subir le même cycle d'évaporation/fission jusqu'à donner des ions en phase gazeuse. Les ions en phase gazeuse sont alors introduits dans le spectromètre de masse en vue de leur analyse.

3. Source d'ionisation

Classiquement, la source d'ionisation utilisée est un capillaire dont l'extrémité est effilée pour donner un orifice de sortie plus petit. La solution d'échantillon à analyser est chargée dans ce capillaire, soit en continu après connexion de ce capillaire, en amont, à un système de pompage et une arrivée de liquide, soit en quantité « limitée », à l'aide d'un embout effilé. Le capillaire d'ionisation est alors placé en regard de l'entrée du spectromètre de masse et la tension est appliquée sur le liquide.

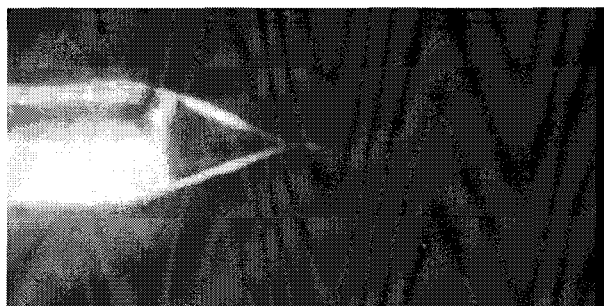


Figure 2 : Photographie d'un capillaire d'électronébulisation lors d'une expérience ; le cône de Taylor, preuve de l'établissement du nébulisat, est observé.

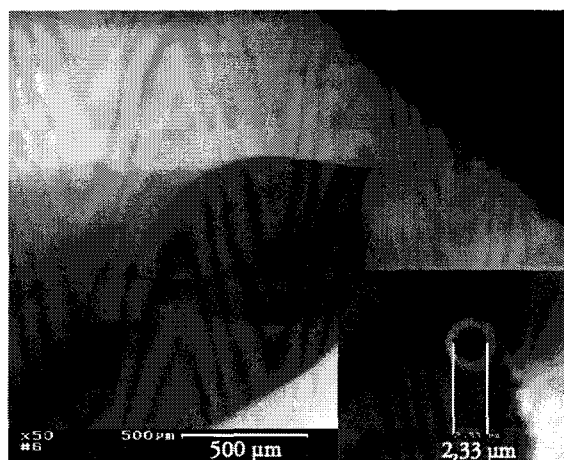


Figure 3 : Photographie de microscopie électronique d'un capillaire de nano-électronébulisation en verre (New Objective) (barre d'échelle à 500 µm) ; encart : vue agrandie de l'orifice de la source.

Ce contact électrique peut être réalisé de 3 façons au moins ; soit le capillaire est recouvert d'une couche de matériau conducteur (métal, carbone graphite, polymère conducteur), soit un fil métallique est introduit dans le capillaire, soit une jonction-liquide est créée en amont du capillaire, notamment dans le cas d'une alimentation en continu. La tension d'ionisation est respectivement appliquée sur le matériau conducteur, le fil métallique ou au niveau de la jonction-liquide, comme l'illustrent les schémas de la Figure 4.

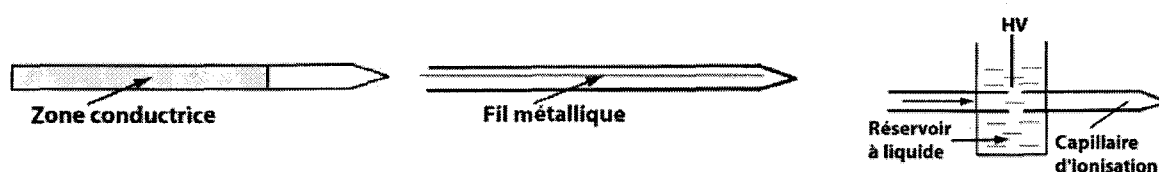


Figure 4 : Différents modes d'application de la tension d'ionisation sur l'échantillon à nébuliser et à analyser.

De gauche à droite : Utilisation d'une source recouverte d'un revêtement conducteur (métal, polymère conducteur...); Introduction d'un fil métallique dans le capillaire d'ionisation qui sert à l'application de la tension ; Création d'une jonction liquide en amont de la source d'ionisation.

4. Les régimes d'électronébulisation : ESI classique vs nanoESI

Comme évoqué précédemment, la taille de l'orifice de sortie du capillaire conditionne, d'une part, la taille des gouttelettes générées en sortie de capillaire qui forment le nébulisat, d'autre part, le

débit de liquide sortant du capillaire et enfin, la tension à appliquer pour observer la formation d'un nébulisat. Il existe ainsi deux régimes distincts d'électronébulisation qui diffèrent de par leurs caractéristiques d'établissement :

- le régime dit *classique* qui correspond à des orifices de sorties de capillaire d'environ 100 μm , des débits de fluide allant de 1 à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ et des hautes tensions de 3 à 4 kV,
- le régime dit de *nanoélectronébulisation* où toutes ces caractéristiques sont diminuées : les débits de liquide sont inférieurs à 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, la tension d'ionisation est de l'ordre de 1 kV et les diamètres internes de sortie des sources d'ionisation de 1 à 10 μm .²

La miniaturisation de la technique avec l'apparition de la nano-électronébulisation au début des années 90s a conduit à son amélioration, ainsi qu'à celle des analyses, du fait que la taille des gouttelettes générées en sortie de capillaire est moindre. Une première conséquence est que le nombre d'analytes par goutte diminue. Une autre conséquence est une augmentation en $1/r$ du rapport surface-sur-volume : les phénomènes d'évaporation sont favorisés et la densité de charges en surface des gouttelettes augmente ce qui promeut les processus de fissions coulombiennes des gouttes. Il en résulte un meilleur rendement d'ionisation. Ainsi, le rendement d'ionisation, qui est de 10^{-9} en régime classique, atteint-il 10^{-4} dans des conditions de nano-électronébulisation. En effet, l'équation donnant la concentration en charges q/V dans une gouttelette sphérique est la suivante, d'après l'équation précédente :

$$\frac{q}{V} = 3 \times \sqrt{\frac{\gamma}{8\pi r^3}}$$

Cette expression montre que la concentration en charges, et, par conséquent, le rendement d'ionisation augmente lorsque la taille de la goutte, donnée par r , diminue. Outre ce gain en sensibilité, l'analyse en régime de nano-électronébulisation apparaît présenter une plus forte tolérance vis-à-vis des sels.³ Les sels sont un des ennemis de l'analyse par électronébulisation ; ils induisent des effets de suppression de signal.⁴ Cependant, ces problèmes sont diminués lorsque l'électronébulisation est miniaturisée.

Il en résulte donc que la miniaturisation va de pair avec une amélioration des conditions d'analyse, un rendement d'ionisation accru, un gain en sensibilité lié à une diminution de la taille des gouttelettes initiales et une plus grande tolérance constatée à la composition de la solution.

B. Limites de la technique

1. « Qualité » des sources

Les sources d'électronébulisation, et surtout celles de nano-électronébulisation, présentent un certain nombre de faiblesses. Les premières faiblesses sont inhérentes aux sources mêmes et découlent de leur voie de fabrication. Elles sont peu robustes et leur reproductibilité est faible. Cette caractéristique est liée aux procédés et techniques généralement utilisés pour leur fabrication : un capillaire en verre ou en silice fondue est étiré à chaud pour donner une pointe effilée.² Ce mode de fabrication « artisanal » est mal contrôlé. Une étape d'usinage laser ultérieur de ces capillaires effilés accroît le contrôle des tailles d'orifice,⁵⁻⁷ mais cette étape supplémentaire génère un accroissement du coût de fabrication, qui empêche l'utilisation de ces sources en routine en laboratoire. De plus, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, les capillaires de nano-électronébulisation standard sont le plus souvent « bouchés » en leur extrémité ; ils doivent être cassés pour que le liquide s'écoule.

2. Mode utilisation de ces sources

Le mode d'utilisation des sources de nano-électronébulisation constitue également une des faiblesses actuelles de la technique. L'analyse par nanoESI-SM requiert un expérimentateur habile et familier de cette technique. Le liquide à analyser est introduit dans le capillaire de nano-électronébulisation (d.i. 20 μm) à l'aide d'un embout de pipette effilé. Les bulles d'air, qui peuvent perturber la stabilité du nébulisat et, de ce fait, induire un arrêt du signal, sont alors chassées en secouant vigoureusement le capillaire.² Enfin, le capillaire a, le plus souvent, un orifice de sortie trop petit pour permettre l'écoulement du liquide (Figure 5 à gauche) ; ainsi, une fois le capillaire monté en regard de l'entrée du spectromètre de masse, doit-il être cassé en son extrémité sur la plaque d'entrée du spectromètre de masse.² Cette étape d'ouverture de la source accroît encore le caractère aléatoire des dimensions de l'ouverture de sortie de la source : l'orifice cassé présente un profil irrégulier et des dimensions variables (Figure 5 à droite).

Il ressort de ce descriptif que les sources de nano-électronébulisation, à l'instar du processus de préparation de l'analyse, ne sont pas compatibles avec une nébulisation contrôlée, reproductible et de qualité. Elles ne sont pas non plus adaptées à une automatisation de l'analyse et l'utilisation d'une interface robotique en vue d'une analyse à haut débit. Cette constatation s'oppose aux besoins et aux demandes actuels dans le domaine de l'analyse, en particulier en spectrométrie de masse. En effet, suite à l'essor du domaine de la protéomique et de l'analyse biologique, de façon

plus générale, avec un grand nombre de composés à analyser et à caractériser, la demande en analyse automatisée et à haut débit devient pressante.

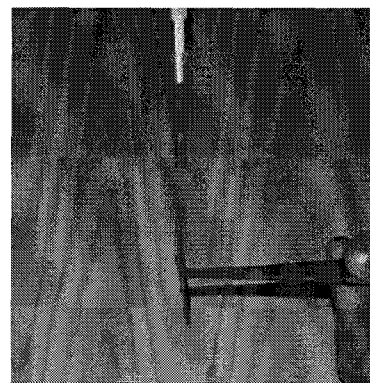
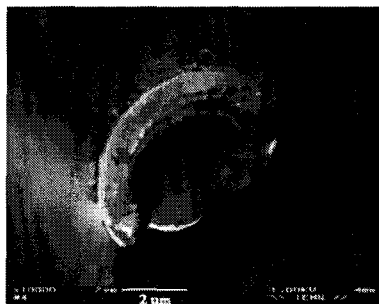
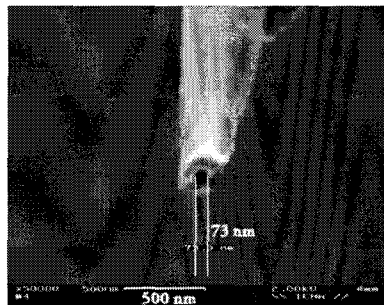


Figure 5 : Photographies de microscopie électronique d'un capillaire de nano-électronébulisation neuf (à gauche) et usagé (à droite). Le capillaire neuf est bouché (orifice < 80 nm) et celui usagé présente un profil irrégulier.

Figure 6 : Introduction de l'échantillon dans la source capillaire à l'aide d'une micropipette et d'un embout effilé adapté

3. Mode application HV : fragilité des revêtements

Une autre faiblesse des sources provient de la robustesse et la durabilité du revêtement conducteur enrobant les sources, qui sert à l'application de la tension. Lorsqu'on travaille en nano-électronébulisation, en mode d'infusion, l'utilisation d'une source tapissée d'un revêtement conducteur à l'extérieur est le moyen le plus simple et le plus courant. La jonction-liquide est réservée à des analyses en couplage et l'introduction d'un fil métallique dans un capillaire devient ardue lorsque le diamètre interne des sources est de quelques dizaines de microns.

Le plus souvent, le matériau conducteur est un métal, or ou argent, qui est déposé par techniques de pulvérisation/vaporisation/ ou *electroplating* sur le capillaire d'ionisation. Ces matériaux sont fragiles par nature : l'or et l'argent présentent de faibles résistances d'ordre, respectivement, physique et électrochimique.⁸ De plus, la couche de métal se détériore rapidement :⁸⁻¹⁰ après des usages répétés du capillaire ou suite à l'application de tensions trop élevées et à l'apparition de décharges corona, ou, enfin, lors de l'introduction sur la pièce prévue à cet effet à l'entrée du spectromètre de masse avec l'arrachage du matériau. Par ailleurs, la métallisation de la source avec le dépôt de la couche de métal est ardue et longue.

L'utilisation d'une autre méthode de dépôt du revêtement métallique participe à l'amélioration de la qualité de la couche conductrice. Ainsi, Barnidge *et al* ont-ils décrit une technique baptisée « fairy dust »¹¹ où l'or est introduit sous forme de particules de 2µm dispersées dans un autre

matériau, la résine polyimide, l'ensemble étant ensuite cuit. La couche de métal peut aussi être doublée d'une autre épaisseur de matériau ;¹²⁻¹⁴ soit au-dessous de la couche d'or, afin de favoriser l'adhésion de l'or sur le capillaire, soit au-dessus, pour protéger la couche d'or, à partir respectivement, de composés de type organosilanes¹³ ou d'un autre métal ou alliage ou d'oxydes de silicium.¹⁴ La nature du matériau conducteur a aussi été changée. Les métaux ont été abandonnés au profit de matériaux moins onéreux tels que des polymères conducteurs (polyaniline)¹⁵⁻²¹ ou un revêtement à base de poudre graphite.²²⁻²⁶ Le revêtement à base de polyaniline est plus facile et plus rapide à mettre en œuvre qu'un revêtement à base d'or ; le capillaire d'ionisation est enduit d'une dispersion de polyaniline dans de l'eau ou du xylène.¹⁵ Ce polymère est fortement conducteur, stable d'un point de vue mécanique et il présente des propriétés anti-corrosives. Enfin, la couche de polymère, plus épaisse d'une couche de métal, est plus stable et plus durable.¹⁹ Malheureusement, il ressort de nos tests au laboratoire, de différents types de sources (en verre alumino- ou borosilicate, en silice fondue ou en quartz) couvertes de PANI que la tension requise pour des analyses en conditions nano-électronébulisation peut facilement atteindre 2,5 à 2,8 kV, pour observer un signal stable et un nébulisat. Une autre alternative visant à baisser le coût de revient des sources de nanoélectronébulisation a consisté à utiliser le carbone comme matériau conducteur. Les particules d'or sont remplacées par des particules de graphite,²⁴ dans la technique « fairy dust » ; ces dernières sont dispersées dans la résine polyimide et l'ensemble est cuit à 250°C afin de durcir la résine. La stabilité de ce revêtement a été éprouvée par des stress oxydatifs (électrochimie). Outre leur forte résistance et leur durabilité, ces nouveaux revêtements ont un moindre coût de revient.

Les matériaux traditionnels constituant les sources, la silice fondue et le verre, ont été changées pour un autre matériau conducteur à base de polymère, le propylène, et de graphite.²³ Les sources de nano-électronébulisation dans ce matériau sont également fabriquées par étirement à chaud du polymère ; une fois le matériau refroidi, il est coupé pour donner le capillaire d'ionisation.

Une autre variante consiste à appliquer la tension d'électronébulisation sur de l'acier inoxydable,^{27,28} ce dernier constituant soit la source d'ionisation,²⁸ soit le capillaire situé en amont et alimentant la source d'ionisation en liquide.²⁷

Ces différentes propositions de changements, même si elles apportent une amélioration de la qualité du revêtement ou participent à diminuer le coût des sources, ne résolvent pas les faiblesses de base des sources d'ionisation, i.e. leur manque de robustesse et de reproductibilité et leur mode d'utilisation.

4. Couplage d'un microsysteme à l'ESI-SM

Nous nous intéressons ici au couplage d'un microsysteme fluidique à un spectromètre de masse avec une ionisation par électronébulisation. L'enjeu ici est donc d'optimiser la connexion entre la sortie du microsysteme, d'une part, et la source d'ionisation et l'entrée du spectromètre de masse, d'autre part. Les premières références bibliographiques décrivant le couplage d'un microsysteme fluidique à une analyse par spectrométrie de masse en ligne proposent la formation du nébulisat directement sur la tranche du microsysteme en sortie de microcanal, la tension étant appliquée au niveau du réservoir d'entrée du microsysteme.^{29,30}

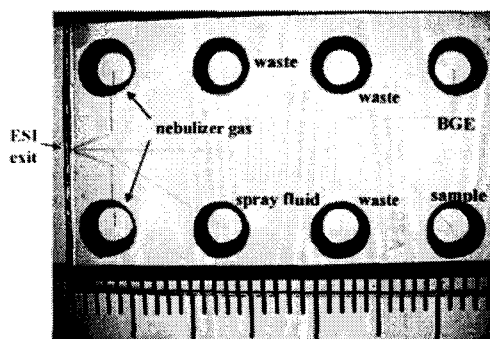


Figure 7 : Microsysteme fluidique avec une connexion à l'ESI-SM en sortie de microcanal : nébulisation sur la tranche du microsysteme assistée de façon pneumatique.

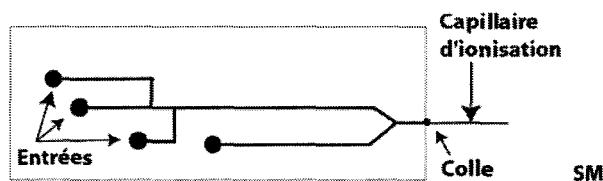


Figure 8 : Connexion du microsysteme à la spectrométrie de masse à l'aide d'un capillaire de transfert inséré dans le canal de sortie

Cependant, en l'absence d'une structure en pointe, le liquide a spontanément tendance à s'étaler sur la tranche du microsysteme, ce qui empêche la formation d'un nébulisat. Un traitement chimique de la surface de sortie^{29,30} et/ou une assistance pneumatique³¹ pallient ce phénomène ; ils forcent à l'établissement de l'électronébulisation et à la formation d'un gaz de gouttes qui sont éjectées en sortie de microcanal vers l'entrée du spectromètre de masse.

Une autre solution décrite dans la littérature est le couplage du microsysteme à une source conventionnelle de nano-électronébulisation par l'intermédiaire d'un capillaire de transfert. Ce capillaire est inséré en sortie de microcanal et connecté à la source de nano-électronébulisation à l'aide d'un raccord approprié,³²⁻³⁵ comme le montre la Figure 8. Cette solution n'est cependant pas optimale. Tout d'abord, elle présente les inconvénients inhérents à la qualité des sources. Ensuite, le capillaire est collé dans le microcanal pour le maintenir en place ; cependant, la colle se dissout dans les solvants organiques qui circulent dans les canaux et, de ce fait, induit du bruit chimique sur les spectres de masse.³⁶ Par ailleurs, les jonctions microcanal-capillaire d'une part, et

capillaire-source de nano-électronébulisation d'autre part, ne sont pas parfaites et présentent des volumes morts qui dégradent la qualité d'une éventuelle séparation menée en amont sur le microsystème.^{37,38}

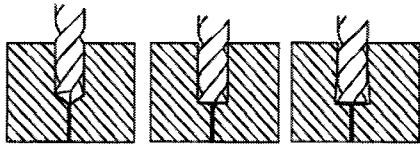


Figure 9: Mode de perçage du trou d'insertion du capillaire d'ionisation en vue de la minimisation du volume mort.

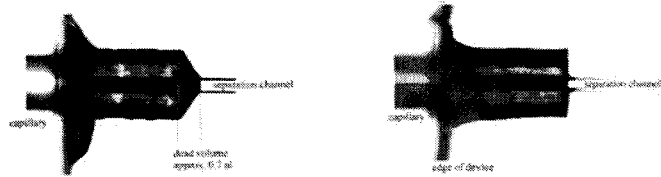


Figure 10 : à gauche, connexion usuelle entre un microcanal et un capillaire générant un volume mort (0,7 nL); à droite, nouvelle connexion visant à supprimer le volume mort à la jonction entre le microcanal et le capillaire

Li et al. ont décrit une méthode permettant de minimaliser un des volumes morts en créant une section franche à la sortie du microcanal au niveau de l'introduction du capillaire de sortie.³⁸ L'autre volume mort peut-être virtuellement supprimé en utilisant une jonction liquide pour connecter le capillaire de transfert à la source de nano-électronébulisation.³⁹ Enfin, la préparation des dispositifs complets inclut une étape manuelle, celle d'insertion du capillaire dans le microcanal de sortie et de son collage, qui interdit toute production en masse de microsystèmes d'analyse. Néanmoins, Foret et al. ont adopté cette solution pour développer des microsystèmes couplés à l'ESI-SM présentant une haute densité de dispositifs (96) pour faire une jonction entre des plaques d'analyse 96 puits et une analyse par ESI-SM.^{30,40,41}

5. Faiblesses et insuffisances des phénomènes d'électronébulisation

Les phénomènes d'électronébulisation sont pulsés et présentent une fréquence propre. Néanmoins, une étude plus poussée de ce caractère périodique révèle une instabilité globale du phénomène et un caractère capricieux. Une conséquence en est la non-reproductibilité des analyses qui ne sont pas effectuées dans des conditions optimales et reproductibles. Cette tendance à l'instabilité s'accroît lorsque l'analyse est miniaturisée et que le débit de fluide diminue. Ainsi, si cette instabilité n'a pas d'influence à l'échelle classique, perturbe-t-elle beaucoup plus fortement les analyses qui sont effectuées en conditions de nano-électronébulisation.

Une autre faiblesse de la technique d'électronébulisation concerne le rendement d'ionisation. Même si les performances en ionisation sont nettement améliorées en conditions « nano »

comparées aux conditions classiques, un rendement d'ionisation d'une molécule sur 10000 reste faible.

Il ressort de ces constatations que la technique d'électronébulisation et, a fortiori, celle de nano-électronébulisation, nécessite d'être améliorée en vue d'une qualité supérieure de l'analyse ; la stabilisation des phénomènes d'électronébulisation participerait à la reproductibilité des analyses et une augmentation du rendement d'ionisation conduisant à un accroissement de leur sensibilité.

C. Réponse(s) envisagée(s)

L'objectif premier ici est de coupler un microsysteme fluide à une ionisation par électronébulisation. Compte tenu des remarques consignées ci-dessus, cet objectif devient double. Il consiste, d'une part, à concevoir une source de nano-électronébulisation qui présente une qualité et des caractéristiques supérieures par rapport à celles des sources standard et commerciales et qui, de plus, est compatible avec un couplage microsysteme/spectrométrie de masse et d'autre part, à améliorer les conditions de l'analyse par électronébulisation et spectrométrie de masse ainsi que les performances atteintes par cette analyse.

1. Source microfabriquée

Le premier aspect de ce couplage microsysteme/spectrométrie de masse concerne la source elle-même.

Avoir recours aux techniques de microtechnologie pour la fabrication de la source de nano-électronébulisation est une alternative envisageable. Cette approche garantit le contrôle de la fabrication des sources de nano-électronébulisation et laisse espérer une diminution de leurs dimensions caractéristiques vers une gamme inférieure au micron, ces deux aspects allant, respectivement, de pair avec la reproductibilité de l'analyse et une amélioration de sa qualité. Enfin, les techniques de microtechnologie permettent une production en masse de structures rigoureusement identiques, qui peuvent être placées en parallèle sur un même dispositif en vue d'une analyse à haut débit.

Par ailleurs, la géométrie des sources issues de procédés de microfabrication peut être modifiée en vue d'une manipulation non plus entièrement manuelle mais automatisable ; la géométrie des sources n'est plus de type capillaire mais elle est compatible avec l'usage de robots.

Enfin, une source de nano-électronébulisation microfabriquée peut être réalisée simultanément à l'ensemble du microsystème fluidique. En effet, l'utilisation d'un capillaire de transfert et d'une source d'ionisation externe ne permet pas d'optimiser la connexion d'un microsystème fluidique à la spectrométrie de masse. L'idéal est d'intégrer la source sur le microsystème afin de s'affranchir des problèmes liés à l'usage de colle, de ceux de volume mort et d'insertion de capillaire de transfert et surtout des faiblesses inhérentes aux sources standard. La fabrication de sources d'ionisation à l'aide de processus microtechnologiques rend possible cette intégration de la source ; l'élaboration de la source d'ionisation est alors incluse dans le procédé de fabrication du microsystème.

2. Exemples de la littérature et performances observées de ces microstructures

La littérature comporte déjà plusieurs exemples de sources microfabriquées ou de structures de type aiguille, qui sont ou non intégrées à un système microfluidique plus complet. Deux approches distinctes dominent l'ensemble de ces références :

- une approche dite de type aiguille qui vise à reproduire la géométrie des sources conventionnelles à l'aide de techniques de microtechnologie, i.e. un microcapillaire fabriqué et le plus souvent de section circulaire. Dans cette classe peuvent également être incluses les aiguilles microfabriquées destinées à toute autre application comme celle de l'injection de substances chimiques ou de mesure de potentiels biologiques.
- une approche dite planaire qui consiste à usiner la sortie d'un microcanal sous forme d'une structure en pointe qui permet l'établissement d'un nébulisat après application d'une tension.

Approche de type aiguille

Selon la première approche qui mime les aiguilles conventionnelles, Lin et Pisano ont décrit, en 1999, des aiguilles connectées à un réseau microfluidique.⁴² Ces aiguilles, fabriquées en nitrure de silicium, présentent un orifice de sortie rectangulaire de dimensions $9 \times 30\text{-}50 \mu\text{m}$ et une hauteur de 1-6 mm. Leur application majeure est l'injection de substances chimiques in situ. Néanmoins, leur géométrie et leurs dimensions se rapprochent de celles des aiguilles de nano-électronébulisation.

Similairement, Lee et al. ont fabriqué des sources de nano-électronébulisation en nitrure de silicium à l'aide de techniques classiques de gravure et de photolithographie.^{43,44} Les dimensions de ces dispositifs sont les suivantes : une longueur de $40 \mu\text{m}$ pour un diamètre interne de l'orifice de sortie de $1\text{-}3 \mu\text{m}$. Ces sources ont été testées en spectrométrie de masse sur des solutions de

peptides standard à quelques micromolaires avec des tensions d'électronébulisation proches de 4 kV et un débit de liquide de 50 nL/min. La tension d'ionisation est appliquée ici en amont du dispositif, au niveau de la jonction avec un capillaire d'alimentation en liquide, et ce, sur une connexion métallique en platine.

La même équipe s'est également intéressée à la fabrication de sources de nano-électronébulisation en parylène, un matériau de type polymère et photolithographiable.⁴⁵ Ces sources en parylène ont un orifice de sortie de $5 \times 10 \mu\text{m}$ et font partie intégrante d'un microsysteme fluidique en silicium (Figure 11) : elles sont connectées à des microcanaux de $100 \mu\text{m}$ de largeur et de $5 \mu\text{m}$ de hauteur. La tension requise pour l'établissement d'un nébulisat est plus faible et de l'ordre de 1,2-1,8 kV dans des conditions de débit de fluide et de concentration des solutions, par ailleurs, équivalentes. Ici, la tension est appliquée sur un fil métallique mis en contact avec la solution à nébuliser.

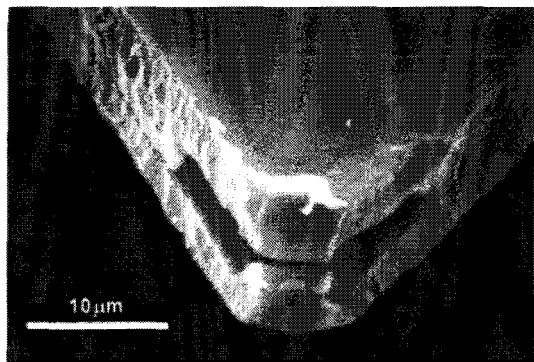


Figure 11 : Photographie de microscopie électronique d'une source de nano-électronébulisation microfabriquée, en parylène.

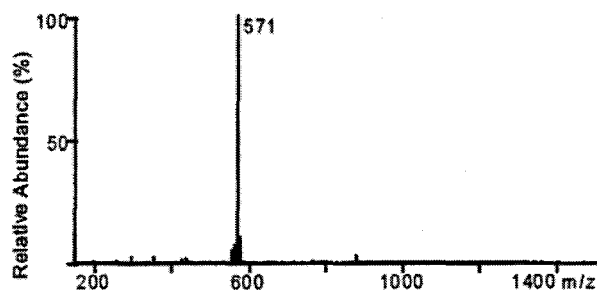


Figure 12 : Spectre de masse obtenu avec une source en parylène pour une solution de peptide standard (Gramicidine S) à $9 \mu\text{M}$ et sous une tension d'ionisation de 1,2-1,8 kV.

Le silicium a aussi été utilisé pour la microfabrication de sources de type aiguille. Schultz et al. ont réalisé un dispositif d'électronébulisation ayant la forme d'une cheminée,⁴⁶ ses diamètres interne et externe étant respectivement de $10 \mu\text{m}$ et $20 \mu\text{m}$ et sa hauteur de $50 \mu\text{m}$ (Figure 13). Ces cheminées résultent d'une voie de microfabrication par gravure physique dite profonde du matériau, technique qui permet de fabriquer des structures présentant un rapport d'aspect élevé. Le fonctionnement de ces sources est décrit avec l'application de tensions de 1,25 kV environ, la tension étant appliquée sur le capillaire d'alimentation en fluide constitué d'un matériau conducteur et situé à l'arrière de la source d'ionisation.

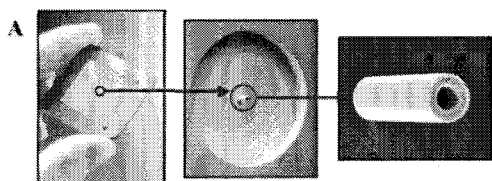


Figure 13 : Photographies de sources usinées en silicium. De gauche à droite : vue d'ensemble d'une plaque de silicium intégrant 100 sources indépendantes ; vue agrandie (MEB) d'une source de type cheminée située au centre d'une cuvette ; vue agrandie d'une cheminée gravée dans le silicium.

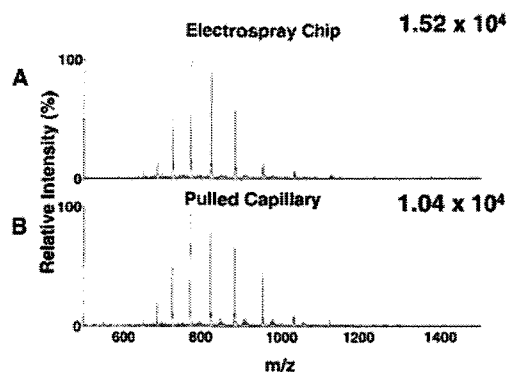


Figure 14 : Spectres de masse obtenus pour un échantillon de Cytochrome C à 100 nM (sommation du signal durant 1 min) pour une source microfabriquée en silicium sous une tension > 1,25 kV (en haut) et pour un capillaire standard sous une tension de 1 kV (en bas).

Ces structures de type cheminée ont été décrites intégrées sur une plaque de silicium, à raison de 100 sources d'ionisation indépendantes sur une même plaque de silicium. Ce modèle de sources a dépassé le stade de prototype et est commercialisé à l'heure actuelle par une petite société américaine, *Advion Biosciences*. Les plaques de 100 sources sont opérées à l'aide d'une interface robotisée qui s'adapte à l'entrée du spectromètre de masse. Le liquide est amené dans la source à l'aide du robot et d'un embout de micropipette en matériau conducteur sur lequel est appliquée la tension d'ionisation.

Stemme et al. ont décrit des structures voisines des sources-cheminées développées par Advion Biosciences.⁴⁷ Le matériau et le procédé de fabrication sont les mêmes, un matériau à base de silicium et un procédé de gravure profonde. Ces cheminées diffèrent néanmoins des précédentes sur deux aspects. Le premier concerne les champs d'application de ces dispositifs qui sont plus larges : l'électronébulisation d'une solution avant son analyse par spectrométrie de masse d'une part,⁴⁸ et la mesure de potentiels biologiques d'autre part.⁴⁹ Le deuxième aspect a trait au profil des structures de type cheminée : autant les structures développées et commercialisées par Advion Biosciences sont des cylindres parfaits, autant le profil des aiguilles décrites par Stemme *et al.* est modifié. Il s'arrondit pour les sources de nano-électronébulisation et se rétrécit au sommet de la cheminée (Figure 15), conduisant à une diminution du diamètre externe de la source au niveau de son orifice de sortie et il est plus effilé pour les aiguilles de mesure de potentiels (Figure 15, en encart).

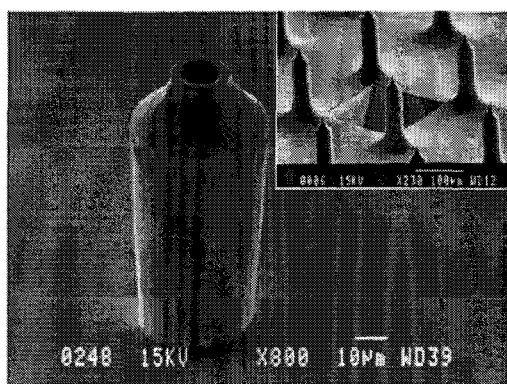


Figure 15: Photographies de microscopie électronique des cheminées gravées dans le silicium décrites par Stemme et al. et destinées à deux types d'applications. La vue principale représente une source d'électronébulisation et l'encart des aiguilles destinées à des mesures de potentiels.

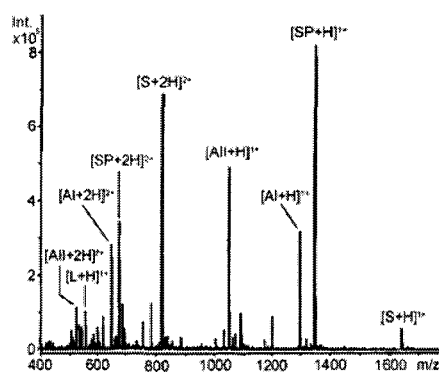


Figure 16: Spectre de masse obtenu avec une source microfabriquée dans le silicium et ayant une forme de cheminée ; la tension d'ionisation est de 3,7-3,8 kV. L'échantillon se compose d'un mélange de 5 peptides standard à 10 pmol/ μ L chacun.

Cependant, le procédé de fabrication de ces aiguilles en silicium à l'aide de techniques de gravure profonde est fort complexe. Il nécessite un appareillage coûteux et est difficile à maîtriser. En outre, les performances des structures obtenues en termes de valeur de tension d'électronébulisation à appliquer sont médiocres comparées à celles de sources conventionnelles : la tension est plus élevée. Par ailleurs, leur géométrie se prête mal à une intégration sur un microsystème. Les points forts de cette approche sont néanmoins l'automatisation de l'analyse rendue possible par sa robotisation et la mise en parallèle d'un grand nombre de sources sur une même plaque de matériau.

Enfin, selon cette même approche, des sources de géométrie cheminée ont été fabriquées dans un matériau plastique, le polycarbonate.⁵⁰ Le procédé technologique utilisé ici est fort complexe et repose sur une ablation laser du matériau. Le diamètre interne de ces sources est de 30 μ m pour une hauteur de 250 μ m (Figure 17). Ici encore, les dimensions des dispositifs sont trop grandes pour fonctionner en régime de nano-électronébulisation. Pour un débit de fluide estimé à 30 μ L/min, la tension requise pour observer un nébulisat est de 7 kV. L'avantage du dispositif est l'intégration de 3 \times 3 sources sur une même plaquette de matériau (Figure 18), les 9 sources fonctionnant simultanément pour conduire à une augmentation globale de la sensibilité de l'analyse.

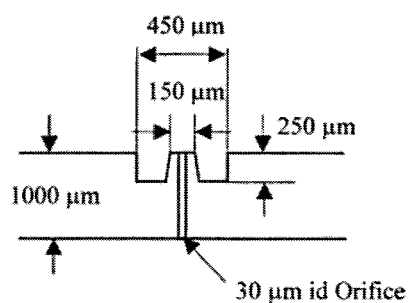


Figure 17 : Schéma d'une source d'ionisation usinée dans le polycarbonate et décrite par Smith et al.

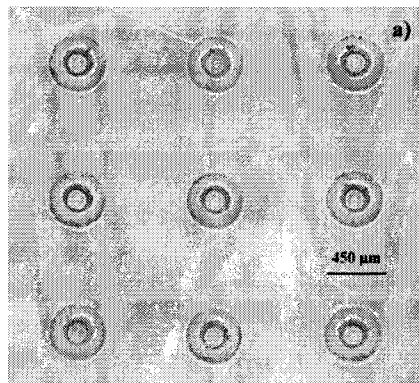


Figure 18 : Photographie d'une série de 9 sources indépendantes microfabriquées usinées dans le polycarbonate à l'aide d'un laser (d.i. 30 µm).

Approche « dans-le-plan »

La deuxième approche est de concevoir la source d'ionisation comme la sortie d'un microcanal, dont le profil a été effilé. Cette structure en pointe tient lieu de source d'ionisation. Notons que l'angle de la structure en pointe ne semble ni avoir d'influence sur le phénomène d'ionisation ni sur les conditions à utiliser pour la mise en œuvre de la source.⁵¹

L'effet de pointe requis pour l'observation d'un nébulisat peut être réalisé avec l'insertion d'une structure plane triangulaire à la sortie d'un microcanal, entre le socle et le couvercle du microsystème (Figure 19). Kameoka *et al.* ont ainsi utilisé une feuille de parylène de 5 µm d'épaisseur taillée en forme de triangle.⁵² Le dispositif complet présente quatre systèmes d'électronébulisation identiques et placés en parallèle. La tension d'ionisation requise est de 2,5-3 kV pour un débit de fluide de 300 nL/min ; aucune interférence inter-source n'a été observée.

Un dispositif en forme d'étoile à huit branches et réalisé en PMMA (polyméthylméthacrylate) a été imaginé par Yuan et Shiea.⁵¹ Chaque branche correspond à un système d'analyse indépendant (Figure 21). Les réservoirs d'entrée sont placés au centre de l'étoile et la structure en pointe située à l'extrémité des branches et formant un angle de 90°, est mise à profit en tant que source d'ionisation. Chaque branche intègre ainsi un microcanal de section 300 × 376 µm qui relie le réservoir d'entrée à la source d'ionisation.

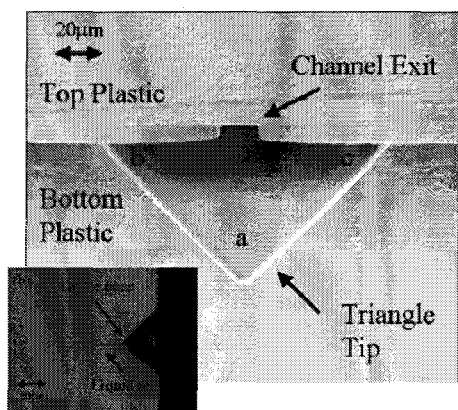


Figure 19: Photographie de microscopie électronique d'une pointe d'électronébulisation formée d'un triangle en parylène inséré entre le socle et le couvercle du microsystème, en sortie du microcanal. Barre d'échelle à 20 μm. En encart: photographie de la source dans l'entrée du spectromètre de masse lors d'un test en électronébulisation: visualisation du cône de Taylor.

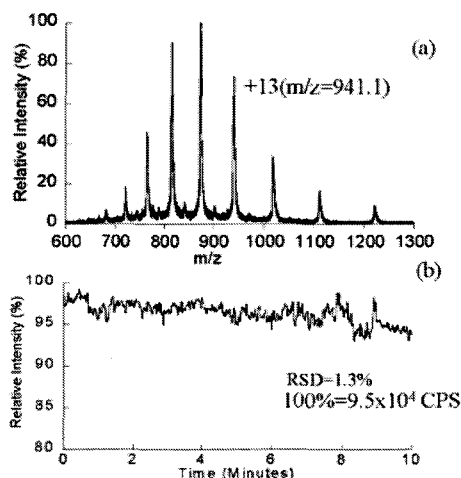


Figure 20: Spectre de masse et courant ionique total obtenus pour une expérience en électronébulisation utilisant une source décrite par Kameoka et al. Le premier correspond à 1s d'acquisition et le deuxième à 10 min d'acquisition. Echantillon de Cytochrome C de poulet à 5 μM; tension d'ionisation à de 2,5-3 kV.

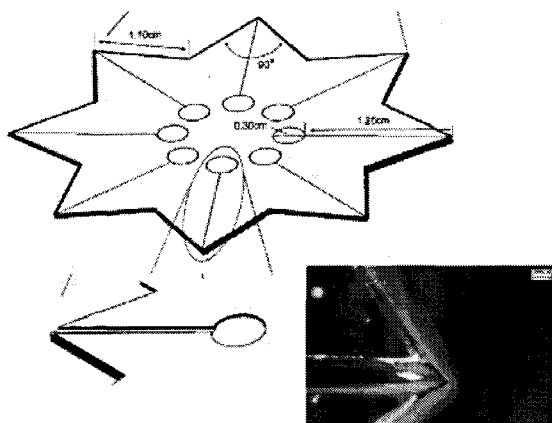


Figure 21: Dispositif microfluidique en PMMA en forme d'étoile, décrit par Yuan et Shiea; les pointes d'électronébulisation se situent à l'extrémité des branches de l'étoile. De bas en haut: Système complet; vue agrandie d'un système constitué d'un réservoir, d'un canal et d'une source; photographie de la source lors d'un test (barre échelle à 200 μm).

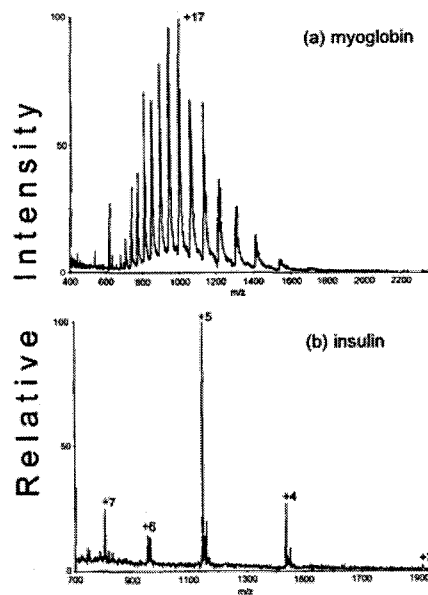


Figure 22: Exemples de spectres de masse obtenus avec la structure en étoile en PMMA. En haut, spectre de myoglobine à 1 μM; en bas: spectre d'insuline à 1 μM. Tension d'ionisation à 3,8 kV.

Le microcanal résulte d'un procédé de fabrication grossier, reposant sur un usinage du matériau à l'aide d'un couteau pointu. La tension appliquée pour l'établissement du nébulisat sous forme d'un cône de Taylor est élevée et égale à 3,8 kV, ce qui reflète les dimensions fort larges de la section du microcanal en son extrémité. En raison du procédé de fabrication grossier, les dimensions des sources et des microcanaux ne peuvent pas être miniaturisées afin d'améliorer les performances en électronébulisation du dispositif.

Un autre matériau de la classe des plastiques, le PDMS (polydiméthylsiloxane) a été utilisé pour la réalisation de structures en pointe (Figure 23) destinées à l'électronébulisation suivant trois procédés de microfabrication :⁵³⁻⁵⁵ (i) un procédé basé sur une ablation de matériau, (ii) un procédé utilisant une double couche de résine photolithographiable et enfin, (iii) un procédé de moulage de résine. L'orifice de nébulisation est rectangulaire et de dimensions variables allant de $30 \times 100 \mu\text{m}$ à $30 \times 50 \mu\text{m}$, selon le procédé de microfabrication utilisé. Dans les différents cas, la tension de nébulisation est dans la gamme de 2,5 à 3,7 kV pour des solutions de test à 1-10 μM et des débits élevés de quelques 100 nL/min à plusieurs $\mu\text{L}/\text{min}$.

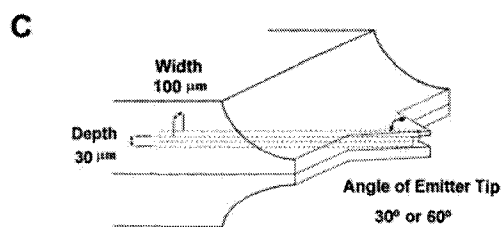


Figure 23 : Schéma représentant la source en PDMS décrite par Kim et Knapp ; une pointe est usinée à la sortie d'un microcanal de $100 \times 30 \mu\text{m}$ pour former la source d'ionisation.

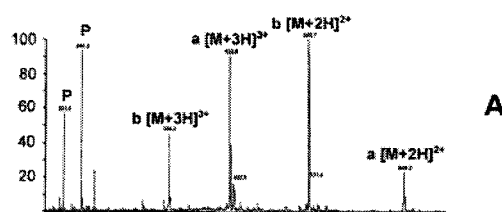


Figure 24 : Exemple de spectre de masse obtenu avec une pointe d'électronébulisation en PDMS ; analyse d'un mélange de deux peptides standard à 10 μM (angiotensine I [a] et bradykinine [b]) ; tension d'ionisation de 2,7 kV.

Enfin, le polyimide, autre matériau de la classe des polymères, qui est relativement hydrophobe a servi à la fabrication de sources de nébulisation⁵⁶ qui sont intégrées sur un microsystème ou qui sont, tout du moins, connectées à un microcanal situé en amont et qui a des dimensions égales à $120 \times 45 \mu\text{m}$. Le système complet est issu d'un procédé de gravure par plasma du matériau ; le couvercle du système est en polyéthylène/polyéthylène téréphtalate (PE/PET). Le fonctionnement de ces sources d'ionisation en polyimide a été validé pour des échantillons de peptides standard à 5 μM , s'écoulant à un débit de 140 nL/min à travers le système et pour des tensions de nébulisation de 1,6 à 1,8 kV.

Un autre dispositif fabriqué dans ce matériau a été présenté par la même équipe ; il diffère du précédent de par sa topologie ouverte et la finesse de l'épaisseur de polyimide utilisé pour sa fabrication.⁵⁷ Cette structure mince (Figure 25) a été testée pour des tensions d'ionisation plus basses de 1 à 2,3 kV, qui sont appliquées, ici, sur une électrode de carbone intégrée sur le dispositif.

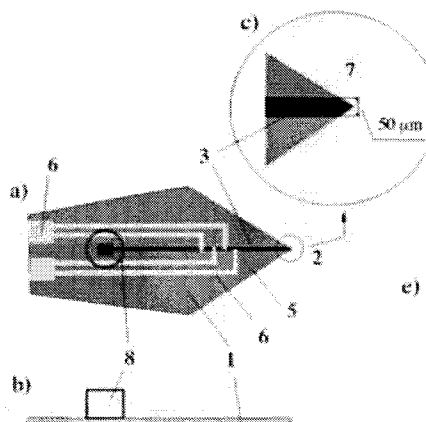


Figure 25 : Schéma de la source « fine » en polyimide décrite par Rossier et al. De bas en haut : vue latérale de la source ; vue aérienne de la source ; agrandissement de la pointe de la source au niveau de la sortie du microcanal. 1 : substrat en polyimide ; 2 : sortie de la source ; 3 : canal central ; 5 : électrode d'application de la tension d'ionisation ; 6 : contacts de l'électrode ; 7 : bout pointu réalisé par gravure plasma ; 8 : réservoir de la source.

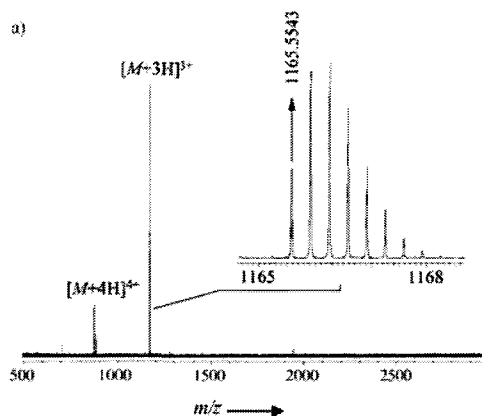


Figure 26 : Spectre de masse obtenu avec la source microfabriquée en polyimide décrite par Rossier et al. pour un échantillon de chaîne B de l'insuline bovine à 0,02 mg/mL (spectre obtenu sur un appareil FT-ICR)

Globalement, les dispositifs d'ionisation recensés ci-dessus et décrits dans la littérature ne fonctionnent pas en régime de nano-électronébulisation mais à l'aide de tensions bien plus élevées, conséquence de leurs dimensions fort grandes. Notons également pour la suite, que la tension d'ionisation est le plus souvent appliquée au niveau du réservoir du dispositif, si le système inclut un réservoir ou, dans le cas contraire, au niveau de l'alimentation en liquide qui est assurée par un capillaire connecté au dispositif. Soit le capillaire est en matériau conducteur (acier inoxydable par exemple), soit la connexion repose sur l'utilisation d'une union métallique. Seuls les travaux de Rossier et al. proposent l'intégration d'une électrode ou d'une zone conductrice pour l'application de la tension sur le dispositif de nébulisation.⁵⁸ Dans cet exemple, la zone conductrice est à base d'encre de carbone.

Amélioration des phénomènes de nano-électronébulisation

Le deuxième volet pour le couplage du microsystème à la spectrométrie de masse est l'amélioration de l'ionisation par électronébulisation. Ce volet comporte deux aspects : la stabilisation des phénomènes de nano-électronébulisation et l'augmentation du rendement d'ionisation. Ceci repose sur une assistance double, une assistance à la formation du nébulisat et à sa stabilisation d'un part, et, une aide à l'ionisation d'autre part.

L'assistance à la formation et à la stabilisation du nébulisat est effectuée selon le protocole décrit par Charbonnier et al. pour un régime classique d'électronébulisation.⁵⁹ Il consiste à synchroniser le signal pulsé d'électronébulisation sur un signal alternatif, dont la fréquence est proche de la fréquence moyenne et spontanée/naturelle du signal. Le signal d'électronébulisation se cale sur les maxima du signal alternatif imposé : il est ainsi stabilisé.

L'aide à l'ionisation peut être réalisée par voie électrochimique au niveau de la source d'ionisation. Elle peut viser par exemple, à une production supplémentaire de protons, dont la concentration plus grande va favoriser la protonation des espèces et donc leur ionisation en mode positif. Un autre objectif est de permettre la détection d'espèces neutres non ionisables ; si ces dernières sont susceptibles de subir une réaction d'électrochimie, elles se « transforment » pour donner des espèces analysables par spectrométrie de masse.

II. Microfabrication de sources de nanoESI en vue de leur intégration sur un microsystème

Dans cette partie, nous traiterons du premier aspect du couplage du microsystème à l'électronébulisation. Ce volet a trait à la source elle-même, qui est fabriquée par voie microtechnologique en vue de son intégration sur le microsystème. Nous décrivons les deux structures successivement envisagées, une structure dite cheminée et une structure présentant la géométrie d'une plume de calligraphie. Nous verrons ensuite la mise au point et l'étude plus poussée de la structure retenue à travers la conception, la fabrication et le test de trois générations de plumes d'électronébulisation.

A. Choix de la géométrie des sources microfabriquées

1. Approche cheminée

Notre première approche a été de s'inspirer des aiguilles de nano-électronébulisation conventionnelles pour concevoir une source d'ionisation en silicium. Les premières sources dites de type cheminées ont été fabriquées dans la centrale de microtechnologie de l'ESIEE à l'aide de techniques de gravure profonde. Ces cheminées sont intégrées sur une plaquette de silicium, à raison de quatre cheminées indépendantes par dispositif. La Figure 27 représente une vue d'ensemble d'un dispositif. Sur la face avant du système, celle placée en regard du spectromètre de masse, se trouvent les cheminées qui se situent au centre d'une cuvette (~ 1 mm de largeur) usinée lors de la fabrication des sources. Cette cuvette a pour but de dégager les sources tout en les protégeant. Les cheminées ont un diamètre interne de l'orifice de sortie de 20 μm pour un diamètre externe de 40 μm et une hauteur de 100 μm , comme l'illustre la vue agrandie d'une source (Figure 27). Sur la face arrière du dispositif se trouvent les connexions pour l'alimentation des sources, tant en liquide qu'en tension. Chaque source est liée à un réservoir gravé dans la face arrière de la plaquette de silicium qui est lui-même connecté à deux microcanaux et qui est fermé par un couvercle en Pyrex. Un des microcanaux sert à alimenter la source en liquide à l'aide d'un capillaire inséré et collé dans le microcanal, alors que l'autre microcanal est utilisé pour l'application de la tension d'ionisation. A cette fin, un fil de platine est introduit dans le canal et est placé en contact avec le liquide à nébuliser. La tension est appliquée par l'intermédiaire du liquide.

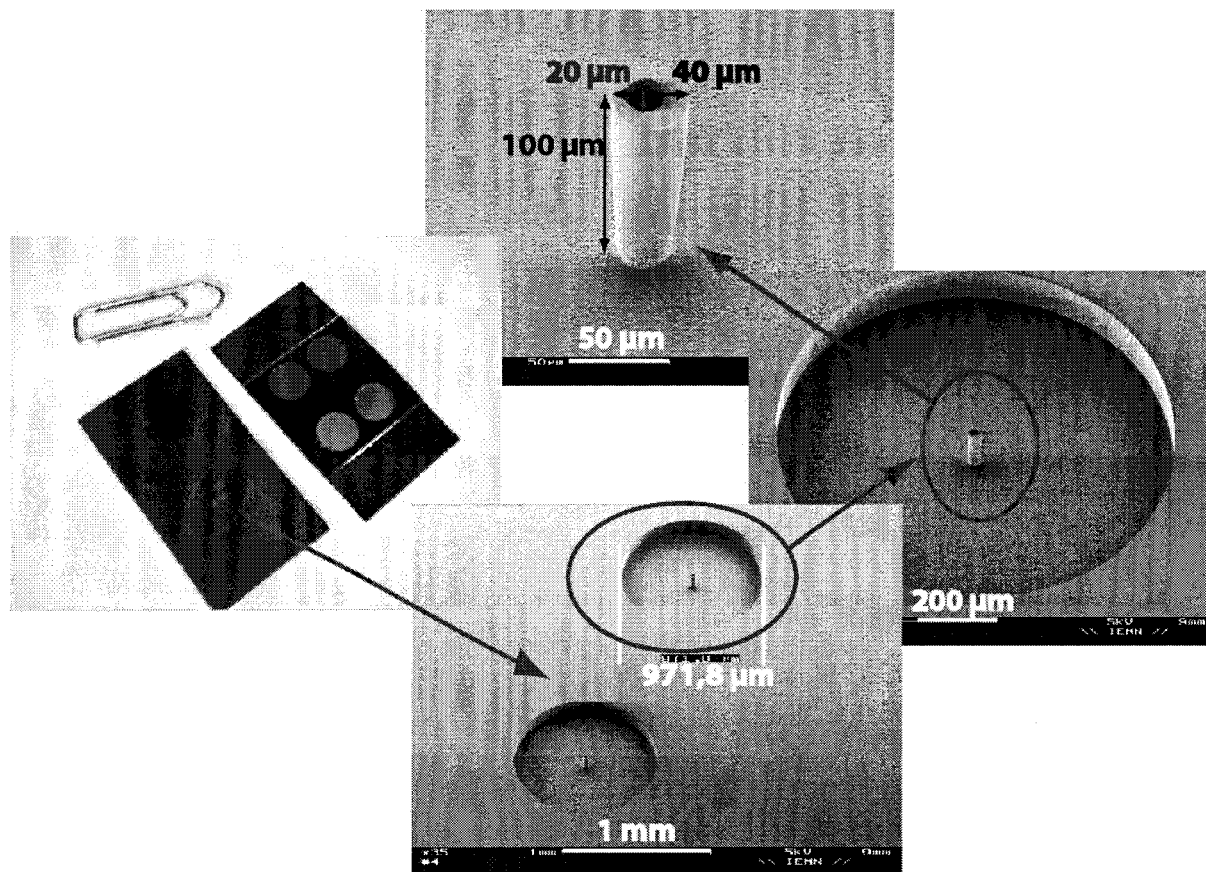


Figure 27 : Sources de nano-électronébulisation fabriquées en Silicium à l'aide de technique de gravure physique profonde (DRIE-ICP), selon une approche cheminée.

Dans le sens trigonométrique : une vue d'ensemble d'une plaquette en silicium incluant quatre sources indépendantes avec sa face avant (à gauche), placée en regard du spectromètre de masse, et sa face arrière (à droite), comprenant les réservoirs et les connexions ; une vue agrandie (microscopie électronique de deux sources voisines (barre d'échelle à 1 mm) ; une vue agrandie de microscopie électronique d'une source de type cheminée située au centre d'une cuvette gravée dans le matériau (barre d'échelle à 200 μm) ; vue agrandie prise au microscope électronique d'une cheminée sur laquelle les dimensions sont indiquées (barre d'échelle à 50 μm)

Ces sources de nano-électronébulisation, dont la structure est proche de celle décrite par Schultz et al., ont été testées en électronébulisation sur table, une plaque de cuivre tenant lieu de contre-électrode à la place de l'entrée du spectromètre de masse. Ces tests ont été peu concluants. Les conditions de tests sont loin de celles dites de nano-électronébulisation : la tension d'ionisation est supérieure à 2 kV, le débit de liquide élevé et, même dans ces conditions, le liquide a plus tendance à s'étaler sur la face avant du dispositif en remplissant la cuvette autour de la cheminée qu'à former un nébulisat. En effet, les dimensions des sources sont « grandes » comparé à celles de sources conventionnelles comme le montre la Figure 28 qui présente des vues agrandies de l'orifice de sortie d'une de nos cheminées en silicium et d'une source commerciale (PicoTip, New Objective) en silice fondue, issue d'une fabrication par usinage laser du matériau.

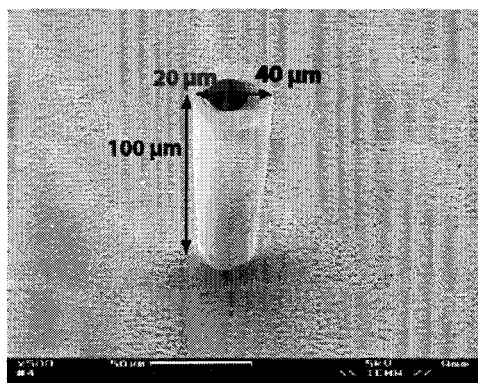


Figure 28A : Source cheminée microfabriquée dans le silicium à l'aide d'une technique de gravure profonde (photographie de microscopie électronique, barre d'échelle à 50µm)

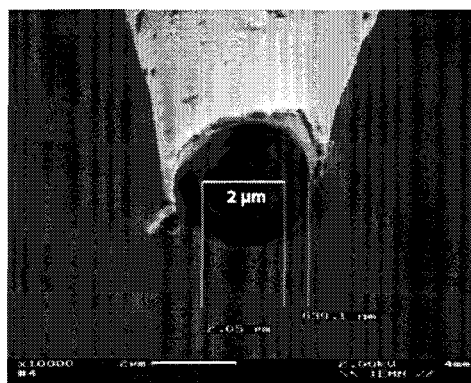


Figure 28B : Source standard en silice fondue (Picotip, New Objective) résultant d'un étirement à chaud de la silice et d'un usinage laser ultérieur (photographie de microscopie électronique, barre d'échelle à 2µm)

Nous avons validé la fabrication de ces sources cheminées, qui sont de belles structures d'un point de vue microtechnologique. Cependant, les procédés technologiques mis en jeu sont complexes et la géométrie et les dimensions de ces cheminées se sont révélées non adaptées à nos besoins et à notre objectif. Ces sources cheminées ne fonctionnent pas en régime de nano-électronébulisation et les analyses ne sont pas conduites dans des conditions optimales qui laissent espérer un gain en sensibilité. Par ailleurs, une fois ce travail initié, nous avons « découvert » l'existence d'équipes concurrentes sur cette approche et cette géométrie de sources. Ces différentes raisons nous ont décidés à abandonner cette voie de conception et microfabrication d'une nanosource intégrée au profit d'une géométrie plus originale, plus facile à mettre en œuvre et surtout compatible avec une descente en échelle de l'analyse.

2. Approche plume

La deuxième idée pour la fabrication d'une source d'électronébulisation s'inspire de la structure des plumes de stylo ou de calligraphie. Ces plumes comportent un réservoir à encre, une fente capillaire qui amène l'encre à la pointe du stylo où elle est éjectée sous l'action d'une pression exercée par son utilisateur (Figure 29). Ces différentes composantes, un réservoir, une fente capillaire et une structure en pointe se retrouvent sur les sources d'électronébulisation.

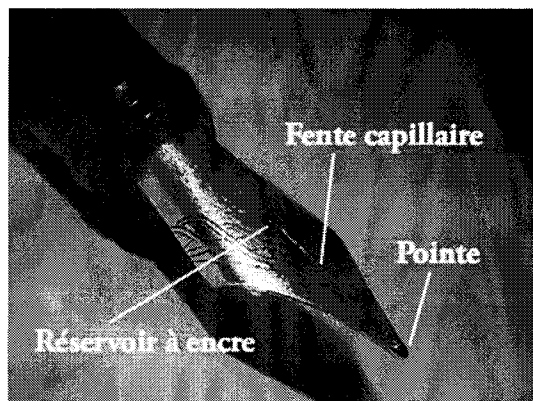


Figure 29 : Photographie d'une plume de stylo montrant ses différentes composantes : le réservoir à encre, la fente capillaire et la pointe.

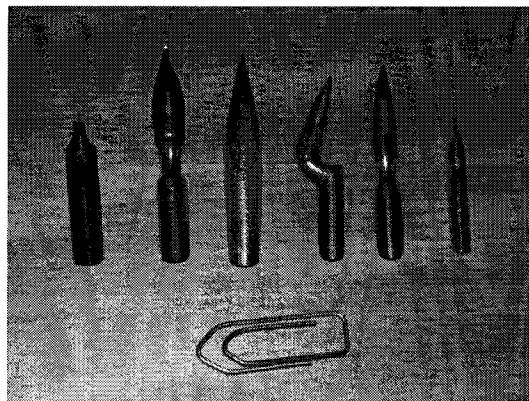


Figure 30 : Photographie de plumes d'écriture, testées en électronebulisation sur un spectromètre de masse pour valider le concept de plume d'électronebulisation

L'idée de plumes d'électronebulisation a été validée avec le test de plumes de calligraphie commerciales (Figure 30), sur un spectromètre de masse, en ionisation ; les plumes sont chargées avec un échantillon de peptides standard, placées à l'entrée du spectromètre de masse et la tension est appliquée sur le liquide à l'aide d'un fil de platine. La formation d'un nébulisat a été observée pour des tensions très élevées, de l'ordre de 3 kV, valeur qui est à lier aux dimensions des objets. Ces tests nous ont ainsi permis de valider le concept de plume d'électronebulisation. L'étape suivante a naturellement été la microfabrication de prototypes à l'aide de techniques de microtechnologie, présentant une géométrie voisine de celle d'une plume et comportant les trois composantes requises, réservoir, fente et structure en pointe.

B. Plumes de 1^{ère} génération

1. Description de la structure

La première série de prototypes de plumes d'électronebulisation est réalisée en résine négative photolithographiable, la SU-8,^{60,61} sur une plaquette de silicium qui lui tient lieu de support. La structure en SU-8 comporte un réservoir, un microcanal/fente capillaire qui se termine sur une pointe. Elle présente, par ailleurs, une géométrie dite 2D1/2 car l'extrémité de la plume pointe en l'air et est légèrement relevée, comme l'illustre la Figure 32.

Les dimensions de sortie de la plume sont une section d'environ 20 μm de largeur pour 30 μm d'épaisseur de SU-8 à l'extrémité de la plume et la longueur de la pointe est approximativement de 500 μm . Deux types de plumes ont été réalisés selon ce modèle, une série dont la surface est couverte d'une fine couche de SiO_2 (1000 Å) et une série qui est métallisée avec une couche de Ni

(500 Å). Le but était de tester deux modes d'application de la tension d'ionisation, soit à l'aide d'un fil métallique, dans le premier cas, soit directement sur la plume en utilisant le revêtement conducteur, dans le second cas.

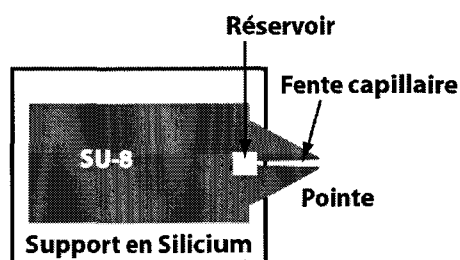


Figure 31: Schéma représentant une plume d'électronébulisation correspondant à la réalisation présentée à droite.

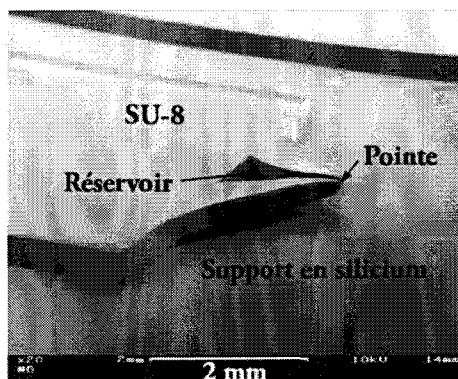


Figure 32: Photographie de microscopie électronique d'une plume d'électronébulisation fabriquée en résine SU-8 et placée sur un support en silicium (barre d'échelle à 2 mm).

2. Procédé de fabrication

Le procédé de fabrication a été mis au point à l'IEMN dans le cadre de la collaboration. Ce procédé repose principalement sur des techniques de photolithographie.⁶² Il est illustré en Figure 33. Brièvement, le support de silicium est enduit à la tournette d'une couche homogène de résine SU-8 (400 μm) (étape 1). L'ensemble est soumis à une double exposition aux UVs à l'aide de deux étapes d'irradiation UV et de deux masques appropriés. La première exposition vise à former l'ensemble de la plume, i.e. le réservoir et le microcanal et le temps d'exposition est choisi de façon à polymériser toute l'épaisseur de résine (étape 2). La deuxième exposition est plus courte afin que seule la partie supérieure de la couche de SU-8 polymérise ; elle sert à former la pointe de la plume qui est ainsi décollée de son support en silicium (étape 3). La résine est ensuite révélée afin de dégager tout le matériau qui n'a pas totalement polymérisé, i.e. sous la pointe de la plume, dans le réservoir et la fente capillaire, pour laisser la structure désirée, de géométrie plume. Comme la pointe est décollée du support, ce dernier peut être facilement clivé afin de libérer la pointe de la plume sans pour autant l'affecter ; ce clivage est opéré selon un plan cristallographique du silicium. Cette étape a pour but de la rendre fonctionnelle en électronébulisation (étape 4) en la dégageant de son support. Enfin, la surface de la structure est couverte soit de SiO_2 (1000 Å), soit de Ni (500 Å) par respectivement, déposition évaporation induite par voie chimique et plasma ou par pulvérisation RF.

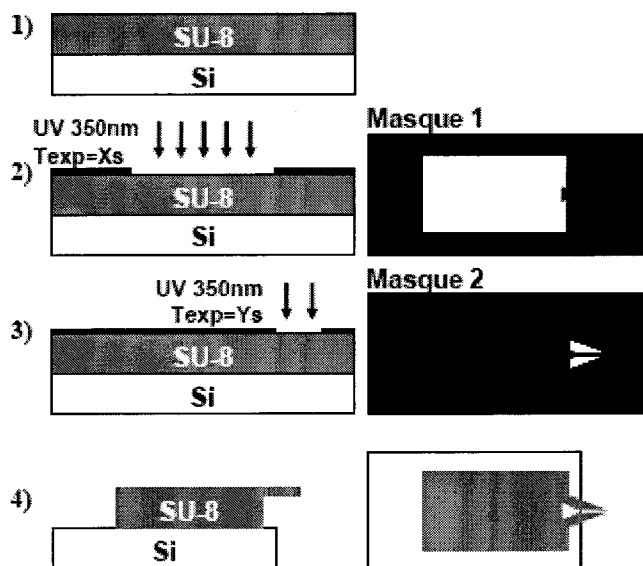


Figure 33 : Procédé de microfabrication des prototypes de première génération. *A gauche*, vue latérale ; *à droite*, vue de dessus.

Le support de silicium est couvert d'une couche homogène de résine SU-8 (35 μm) (1). Cette couche de SU-8 est soumise à deux étapes de photolithographie, la première visant à fabriquer le tronc de la plume (2) et la deuxième la pointe de la plume avec la fente capillaire (3). Après révélation de la résine, le support est clivé de façon à libérer la pointe de la plume (4).

3. Test en spectrométrie de masse : montage et conditions.

Les tests en électronébulisation⁶³ sont menés ici sur un spectromètre de masse de type trappe ionique. Cet appareil a été préféré au QStar, dans un premier temps, du fait que l'entrée du spectromètre de masse se prêtait mieux à l'introduction de la plume et qu'une pièce standard pouvait être utilisée pour y fixer la plume d'électronebulisation.

La plume et son support ont donc été fixés sur une pièce mobile dédiée à l'introduction d'aiguilles conventionnelles, en prenant soin de bien isoler électriquement le support en silicium de la zone métallique présente sur cette pièce, où est appliqué le voltage d'ionisation. Un fil de platine a servi à faire la jonction entre cette zone métallique et le liquide à nébuliser pour la plume qui a une surface couverte de dioxyde de silicium ; il est introduit dans le réservoir sous forme de crochet. Pour la plume couverte de Nickel, le contact électrique est fait entre le revêtement nickel et la zone métallique de la pièce mobile qui porte la plume. Une fois le réservoir chargé en solution à nébuliser, l'ensemble est introduit dans le spectromètre de masse et la tension est appliquée. Une caméra montée au-dessus de l'entrée de la trappe ionique nous a permis, tout d'abord, de positionner la plume en regard de l'entrée de la trappe et ensuite, de visualiser le

fonctionnement de la plume. Ces tests préliminaires, qui visaient à valider le fonctionnement de ces premiers prototypes et à en estimer le régime de fonctionnement, ont été effectués avec des solutions de peptides standard (Gramicidine S) de concentration décroissante, de 50 μM à 1 μM et des tensions d'ionisation qui ont été diminuées de 2,5 kV à 1,2 kV.

4. Tests en spectrométrie de masse : résultats

La résine SU-8 est un matériau qui n'est ni franchement hydrophile, ni hydrophobe ; l'angle de contact mesuré pour une goutte d'eau désionisée sur une surface de SU-8 est d'environ 80°. Ces propriétés de surface permettent un effet capillaire du liquide utilisé pour les tests (méthanol-eau 50/50, 0,1 % acide formique) dans la fente de la plume. Une fois déposé dans le réservoir, le liquide se déplace ainsi jusqu'à la pointe de la plume par capillarité.

L'électronébulisation est observée, après application de la tension, sous forme d'un cône de Taylor, comme le montrent les photographies de la Figure 34 obtenues avec et sans (encart) voltage appliqué sur le liquide. La durée des tests a été imposée par la capacité du réservoir et le temps nécessaire pour consommer ce volume, en supposant une consommation de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ environ.

Les deux types de plumes ont été testés consécutivement. Néanmoins, le revêtement en nickel de la série de plumes métallisées s'est révélé fragile au fur et à mesure des tests, à l'instar des revêtements métalliques ou conducteurs en général qui sont déposés sur les sources d'électronébulisation. A l'inverse, les plumes hydrophiles et recouvertes de SiO_2 n'ont pas été affectées par les multiples expériences en nano-électronébulisation et un plus grand nombre de tests a pu être réalisé avec la même plume. Par conséquent, nous nous concentrerons sur les tests et les résultats obtenus avec ces dernières plumes dites hydrophiles. Outre le fonctionnement des plumes en électronébulisation, ces tests ont montré d'une part, que la résine SU-8 n'induisait pas de pollution chimique des solutions testées qui se traduit généralement par l'apparition de bruit et de pics parasites sur les spectres de masse et d'autre part, que les peptides n'avaient pas tendance à s'adsorber sur la surface de la plume, qu'elles soient couvertes de nickel ou bien de SiO_2 .

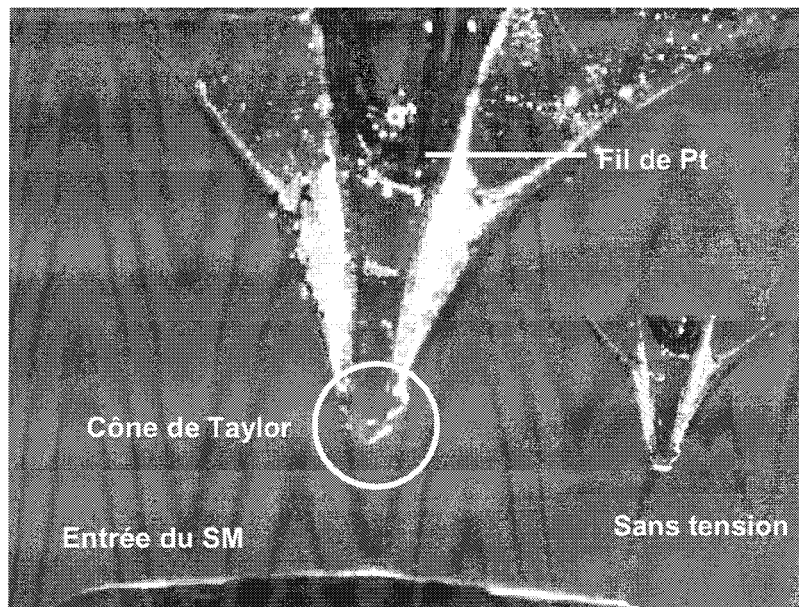


Figure 34 : Photographie d'une plume d'électronébulisation dans l'entrée du spectromètre de masse. La tension d'ionisation est appliquée sur le fil de Pt inséré dans le réservoir. La formation du cône de Taylor est visualisée après application de la tension d'ionisation ; la photographie placée en encart montre le liquide arrivé à l'extrémité de la fente capillaire avant application de la tension d'ionisation.

Pour commencer, nous avons utilisé des tensions très élevées ($> 2,5$ kV) et des échantillons peptidiques concentrés. Ces conditions ont été améliorées au fur et à mesure des tests vers des valeurs plus proches du régime de nano-électronébulisation. Au cours des tests, le signal a été accumulé sur des périodes d'acquisition de 2 minutes et les spectres de masse ont été moyennés sur cette période d'acquisition. Tout d'abord, le signal d'électronébulisation est stable, y compris pour les valeurs les plus faibles de la tension d'ionisation, i.e. de 1,2 kV et son intensité ne diminue pas de façon drastique lorsque la tension d'ionisation ou bien la concentration en peptide est décrie. La Table 1 rassemble les résultats obtenus au cours de ces tests avec en particulier l'intensité du courant ionique total pour des solutions de peptide de 50 à 1 μ M et des tensions d'ionisation de 2,5 à 1,5 kV.

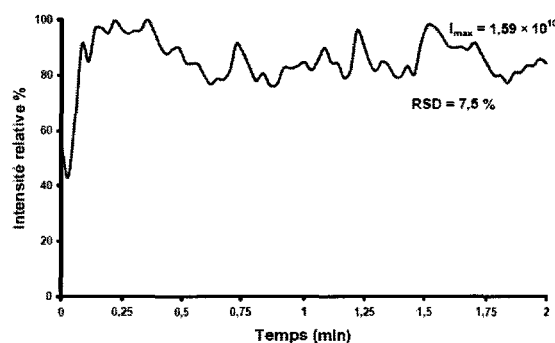


Figure 35 : Courant ionique total enregistré lors d'une expérience d'électronébulisation à l'aide d'une plume (tension d'ionisation de 2,2 kV, concentration en Gramicidine S de 20 μ M)

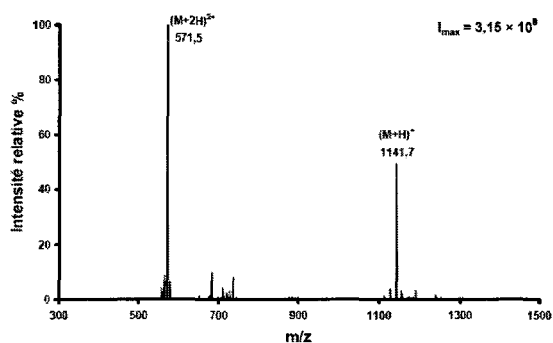


Figure 36 : Spectre de masse obtenu à l'aide d'une plume d'électronébulisation et moyenné sur une période d'acquisition de 2 minutes (tension d'ionisation de 2,2 kV, concentration en Gramicidine S de 5 μ M)

Table 1: Intensités maximales du signal de courant ionique total (TIC) et rapport d'intensité observé pour les espèces mono- et di-chargées de la Gramicidine S, $(M+H)^+$ et $(M+2H)^{2+}$. Spectres de masse moyennés sur une période d'acquisition du signal de 2 minutes.

Entrée	Concentration en Gramicidine S (μ M)	Tension appliquée (kV)	Intensité relative du TIC ^{a,b}	Intensité du spectre de masse ^{a,c}	Rapport d'intensité des espèces $(M+H)^+ / (M+2H)^{2+}$ ^a
1	50	2.5	1	1	1.21
2	50	2.2	1.1	1.06	1.23
3	50	2	1.6	1.23	1.15
4	20	2.5	3.9	1.85	0.92
5	20	2.2	5.0	3.39	0.87
6	20	2	5.0	3.42	0.87
8	5	2.2	7.8	17.41	0.50
9	5	2	8.8	11.80	0.45
10	5	1.8	7.8	10.50	0.29
11	1	1.8	13.2	22.98	0.37
12	1	1.5	7.9	8.76	0.45

^a Valeurs calculées avec une marge d'erreur de $\pm 10\%$

^b Valeurs relatives calculées en prenant comme référence l'intensité du courant ionique total observée pour une solution à 50 μ M et une tension d'ionisation de 2,5 kV (ligne 1) ; cette valeur de référence, prise égale à 1, a été mesurée comme égale à $3,17 \times 10^9$.

^c Valeurs relatives calculées par rapport à l'intensité du spectre de masse obtenu pour l'analyse de la solution à 50 μ M et une tension d'ionisation de 2,5 kV (ligne 1) ; cette valeur de référence, prise égale à 1, a été mesurée de $1,78 \times 10^7$.

La Figure 35 représente le courant ionique total (TIC) ou le signal obtenu en électronébulisation pour une solution de Gramicidine S à 20 μ M (ou pmol/ μ L) et une tension d'ionisation de 2,2 kV et enregistré sur une période de 2 min ; l'intensité du signal est de $1,59 \times 10^{10}$ et la déviation standard pour cette expérience est de 7,5 %.

Le spectre de masse typiquement obtenu avec ces plumes est représenté en Figure 36 ; il comporte deux pics intenses, l'un à m/z 1141,7 correspondant à l'espèce mono-chargée $(M+H)^+$ de la Gramicidine S et un autre pic à 571,5 correspondant à l'espèce di-chargée $(M+2H)^{2+}$ de la Gramicidine S. La Table 1 présente également l'intensité du spectre de masse et le rapport d'intensité mesuré pour les espèces mono- et di-chargées de la Gramicidine S dans diverses conditions de test. Ainsi, pouvons-nous observer deux grandes tendances lorsque la concentration en peptide diminue ; (i) l'intensité maximale du courant ionique augmente et (ii) le rapport d'intensité mesuré pour les espèces $(M+H)^+$ et $(M+2H)^{2+}$ diminue. Notons que lorsque la tension d'ionisation est plus faible, le positionnement de la plume doit être modifié pour observer la formation d'un cône de Taylor : la plume est rapprochée de l'entrée du spectromètre de masse. Les conditions d'électronébulisation et d'ionisation sont donc changées : le débit de liquide est accru et le nébulisat se forme dans une région où la température est plus élevée du fait que le capillaire d'entrée du spectromètre de masse est chauffé. Ainsi, le profil du spectre de masse rappelle-t-il celui obtenu dans des conditions d'APCI sans décharge corona. Par ailleurs, lorsque la concentration de la solution diminue, sa teneur en solvant organique augmente légèrement, de 40 à 50%. Ceci peut expliquer, à la fois, que l'intensité du spectre de masse augmente pour des solutions moins concentrées et que le rapport d'intensité pour les espèces mono- et di-chargées diminue suite à la réaction de l'espèce $(M+2H)^{2+}$ avec la vapeur d'eau pour donner l'espèce $(M+H)^+$.⁶⁴

Nous avons ensuite cherché à déterminer les limites de fonctionnement de ces premiers prototypes en termes de tensions d'ionisation et de concentrations des échantillons testés. La tension d'ionisation a ainsi été descendue de 1,8 kV jusqu'à 1,2 kV pour une solution de Gramicidine S à 10 μ M, sans que ni l'intensité du courant ionique, ni celle du spectre de masse ne diminue, après ajustement de la position de la plume dans l'entrée du spectromètre de masse. Enfin, une solution de peptide à 1 μ M a été testée, la tension d'ionisation étant ici de 1,5 ou 1,8 kV. La Figure 37 présente le spectre de masse obtenu avec l'échantillon de Gramicidine S à 1 μ M et une tension d'ionisation de 1,8 kV. Aux environs de m/z 700, le spectre de masse comporte un massif de pics, qui n'ont pu être attribués ni à la Gramicidine S, ni à aucune autre espèce. Il ne correspond pas non plus à du bruit chimique attribuable à la SU-8 qui se dissoudrait dans les solvants organiques, puisque ce massif disparaît si une autre solution est analysée (solvant ou autre peptide). Nous en avons conclu qu'il s'agirait d'une contamination présente dans la solution mère de ce peptide.

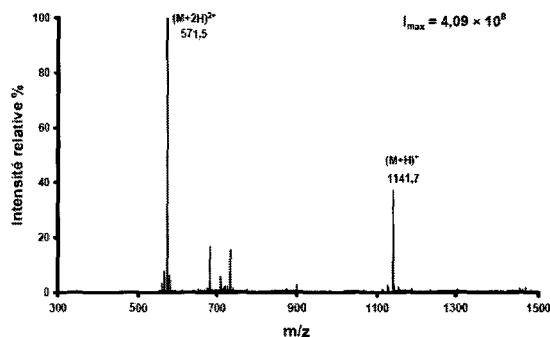


Figure 37 : Spectre de masse obtenu à l'aide d'une plume d'électronébulisation, moyenné sur une période d'acquisition de 2 minutes (tension d'ionisation de 1,8 kV, Gramicidine S à 10 μ M)

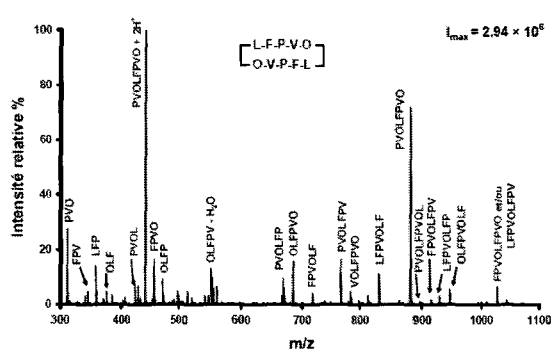


Figure 38 : Spectre de fragmentation de la Gramicidine S obtenu avec une plume d'électronébulisation (concentration en peptide de 10 μ M, tension d'ionisation de 1,8 kV).

Cette série de tests nous a permis de déterminer les conditions optimales de fonctionnement de ces premiers prototypes, qui correspondent à une tension d'ionisation de 1,8 kV et une solution de peptide à environ 10 μ M. Ces conditions optimales ont été retenues pour une expérience de fragmentation de la Gramicidine S sur une plume d'électronébulisation. L'espèce $(M+2H)^{2+}$ a été spécifiquement isolée dans la trappe avec une fenêtre d'isolement de 2 Th pour être fragmentée (paramètre de collision d'énergie normalisé de 30 %, facteur de fréquence d'activation Rf de 0,25). De même que précédemment, le signal a été acquis pendant une durée de 2 min, période durant laquelle le courant ionique total est tracé et le spectre de masse de fragmentation est moyenné. Les intensités observées respectivement sur le courant ionique total et le spectre de masse sont élevées et égales à 3×10^8 et 3×10^6 en unités arbitraires. La Figure 38 correspond au spectre de fragmentation obtenu dans les conditions décrites précédemment ; les pics sont annotés avec la séquence des fragments détectés.

Nous avons enfin comparé les performances de ces premiers prototypes de plumes d'électronébulisation à celles obtenues avec des sources standard en verre (borosilicate) recouvertes d'un alliage Au/Pd et ayant un diamètre interne « dit » de 1 μ m à leur orifice de sortie. Pour la source commerciale, les conditions de test ne sont pas les mêmes : la solution peptidique est à 1 μ M pour une tension d'ionisation de 1 kV. De plus, la source standard est positionnée plus loin de l'entrée de la trappe ionique que les plumes d'électronébulisation.

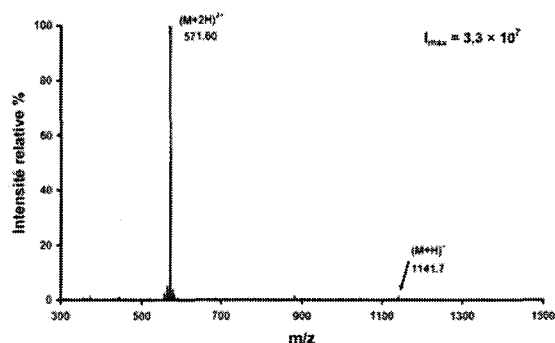


Figure 39: Spectre de masse obtenu avec une source d'ionisation standard Protana en borosilicate et métallisée avec un alliage Cr/Au. Echantillon de Gramicidine S à 1 μ M; tension d'ionisation à 1 kV

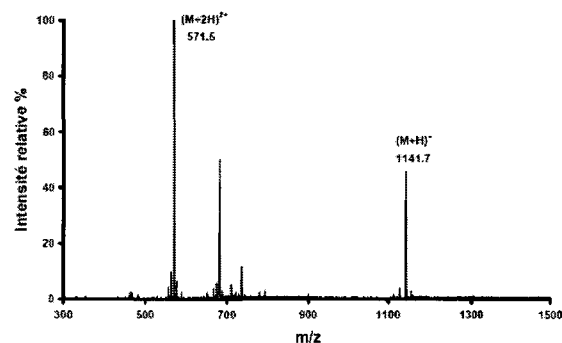


Figure 40: Spectre de masse obtenu à l'aide d'une plume d'électronébulisation, moyenné sur une période d'acquisition de 2 minutes (tension d'ionisation de 1,5 kV, Gramicidine S à 1 μ M)

Le profil du spectre de masse n'est pas le même que celui obtenu avec les premiers prototypes de plumes en termes de rapport d'intensité pour les espèces mono- et di-chargées. Ici, le spectre de masse (Figure 39) comporte un pic majoritaire correspondant à l'espèce di-chargée $(M+2H)^{2+}$ et un pic très peu intense, qui se devine, pour l'espèce mono-chargée $(M+H)^+$. Ce profil de spectre reflète les conditions d'ionisation qui sont d'autant meilleures que l'orifice de sortie est petit et que le débit de liquide est faible. Cette meilleure ionisation se traduit par un décalage du spectre vers les espèces multi-chargées. Une expérience de fragmentation a ensuite été effectuée sur une source standard ; cette expérience a montré que le profil de fragmentation est le même avec une plume d'électronébulisation et une aiguille standard. Les mêmes espèces sont détectées avec des intensités relatives comparables.

5. Conclusions sur la première génération de prototypes en SU-8

En conclusion, ces premiers prototypes nous ont permis de valider le concept de plumes d'électronébulisation à travers une série de tests sur un peptide standard, la Gramicidine S. Les conditions de tests sont néanmoins encore éloignées des conditions typiques de nano-électronébulisation, ce qui s'explique par les dimensions des sources qui sont encore assez « grandes » comparé aux sources commerciales : la section de l'orifice est de $30 \times 20 \mu\text{m}$ contre un orifice pseudo-circulaire de diamètre interne 1-5 μm pour une aiguille standard. Cette différence dans les dimensions de la section se reflète sur le profil des spectres de masse en termes de rapport d'intensité pour les espèces mono- et di-chargées. Le spectre de masse est décalé vers l'espèce mono-chargée de la Gramicidine S dans le cas de la plume d'électronébulisation. Le régime optimal de fonctionnement de ces premiers prototypes a été

déterminé comme étant une tension d'ionisation d'environ 1,8 kV pour des solutions de peptides standard de 5-10 μM .

Ces critiques et leçons tirées des tests des premiers prototypes ont été prises en compte pour la conception et la fabrication d'une deuxième génération de prototypes de plumes d'électronébulisation.

C. Plumes de 2^{me} génération

1. Description de la structure et modifications par rapport aux premiers prototypes

La structure de type plume et le procédé de fabrication ont légèrement évolué depuis la première génération.⁶⁵ Cependant, la plume est fabriquée dans la résine photolithographiable SU-8 sur un support en silicium, de même que pour la première génération. La première différence dans le dessin de la structure est la présence d'un microcanal inséré entre le réservoir d'entrée de la plume et la pointe, l'ensemble formé du canal et de la fente ayant une longueur de 2000 μm . Ce microcanal a une largeur supérieure à celle de la fente capillaire, comme le montre la photographie présentée en Figure 42. La diminution du canal accentue l'effet de capillarité à la naissance de la plume. Le réservoir est un carré de 2500 μm de côté et de 35 μm de profondeur. De plus, la structure plume est ici entièrement plane et non plus en géométrie 2D1/2, ce qui a des répercussions sur le procédé de fabrication. Enfin, les dimensions de la source en son orifice de sortie sont modifiées. Ici, la section de sortie est donnée par une largeur de fente plus petite, principalement de 8 ou 16 μm , pour une épaisseur de matériau de 35 μm . Ces dimensions sont critiques d'une part, pour l'alimentation en liquide de la pointe par capillarité et d'autre part, pour les performances en ionisation, comme nous le discuterons plus tard.

2. Procédé de fabrication

Le procédé de fabrication repose sur les mêmes matériaux et les mêmes techniques que précédemment (voir Figure 41), le silicium pour le support et la SU-8 pour fabriquer la plume elle-même, à l'aide de techniques de photolithographie.⁶⁵

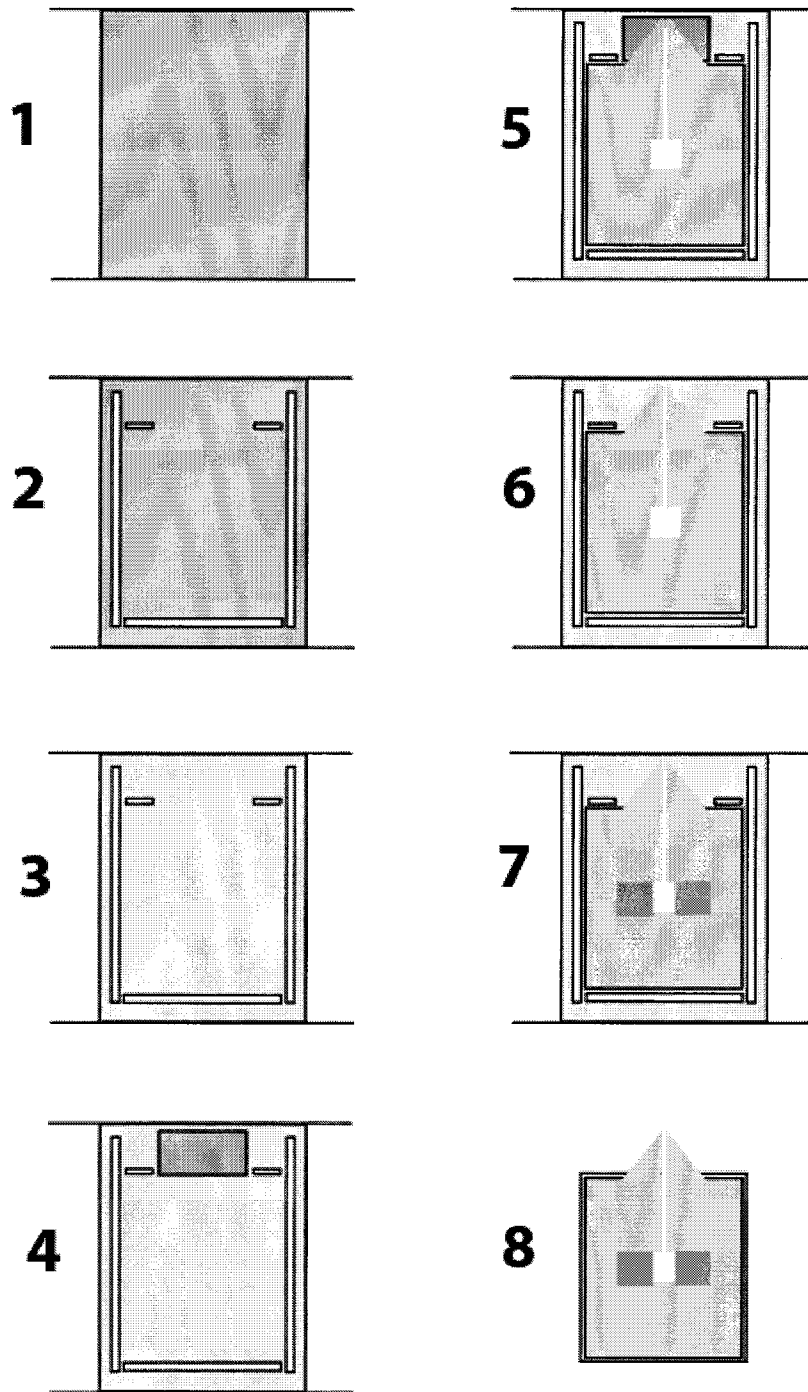


Figure 41 : Procédé de fabrication des plumes de deuxième génération

De haut en bas et de gauche à droite : La plaquette de silicium qui sert de support à la plume est couverte d'une couche de SiO_2 (1) dans laquelle sont matérialisées les lignes de clivage (2), alors transférées dans le support de silicium (3). Le motif de surélévation de la pointe de la plume est alors réalisé dans une couche de Nickel par des techniques de photolithographie (4). La structure de type plume est fabriquée dans une couche de SU-8 épaisse ($35 \mu\text{m}$) (5). Le Nickel servant à surélever la pointe de la plume est attaqué par une solution d'acide nitrique et éliminé (6). Des électrodes sont éventuellement incorporées à la structure plume au niveau de son réservoir ; elles correspondent à des métallisations locales (7). Enfin, le support en silicium est clivé selon les lignes matérialisées en début de procédé de fabrication (8) : la plume est prête à l'emploi.

Les premières étapes de ce procédé technologique sont décisives dans la réussite et la fin de la fabrication des plumes. Elles préparent la dernière étape de clivage du support de silicium sous la pointe de la plume afin de libérer cette dernière et permettre la nébulisation. Le support utilisé est une plaquette de silicium dopé n, d'orientation (100) et de 3 pouces ; sur une plaquette sont préparées simultanément 3×3 plumes. Une couche de 200 nm de SiO_2 est déposée sur le silicium. Elle est masquée par photolithographie et attaquée par une solution acide $\text{HF}/\text{H}_2\text{O}$ sur les zones non masquées. Le silicium exposé est alors attaqué par une solution de soude afin de matérialiser les lignes de clivage sur le support en silicium de la future plume d'électronébulisation. Une couche de nickel (200 nm) est alors déposée sur le silicium par une technique de pulvérisation sous argon. Cette couche de nickel est attaquée de façon locale par photolithographie UV (résine positive, solution acide de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ 1:3), de façon à laisser une couche sacrificielle de nickel uniquement sous la pointe de la future plume. Ainsi, la plume sera-t-elle décollée de son support en silicium, une fois la couche de nickel dégagée. La découpe du support en sera plus aisée et n'abîmera pas la pointe de la plume. Une fois la résine positive dégagée, le support silicium est nettoyé et déshydraté afin d'optimiser l'adhésion de la SU-8 sur le silicium. Une couche homogène de résine négative SU-8 (35 μm) est alors enduite à la tournette sur le support de silicium. La structure plume comprend un réservoir, un microcanal, une fente capillaire ayant un rapport d'aspect supérieur à 4 et une pointe. Elle est formée dans la couche de résine SU-8 par une unique étape de photolithographie classique et un unique masque. Après développement de la résine à l'aide du réactif approprié (acétate de 1-méthoxy-2-propanol, PGMEA), la couche de Nickel sacrificielle est dégagée à l'aide de la solution d'attaque acide décrite ci-dessus ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ 1:3). Cette étape n'affecte ni la résine SU-8, ni la structure de géométrie plume comme nous avons pu le vérifier. Enfin, une fois le dispositif séché, le support de silicium est clivé le long des lignes matérialisées en début de procédé de fabrication. Cette étape de découpe des composants n'endommage pas les plumes, car elles ont été auparavant décollées de leur support. Une photographie de microscopie à balayage d'une plume est présentée en Figure 42.

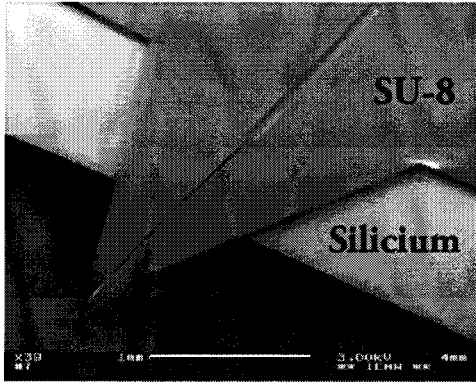


Figure 42: Photographie de microscopie électronique d'une plume de 2^{ème} génération : vue agrandie de la pointe (barre d'échelle à 1 mm)

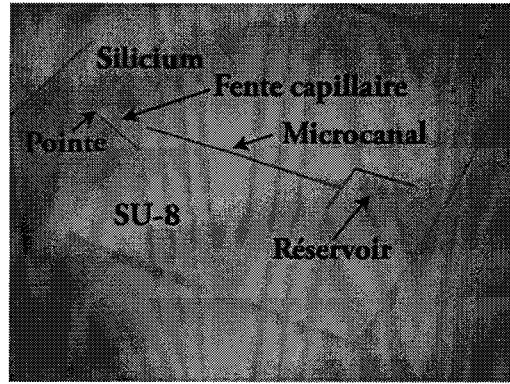


Figure 43: Vue d'ensemble d'une plume de deuxième génération composée d'un réservoir, d'une fente capillaire et d'une pointe

3. Discussion sur les dimensions des sources

Les premiers prototypes de plumes de deuxième génération ont des dimensions à leur extrémité de $8 \times 35 \mu\text{m}$ et $16 \times 35 \mu\text{m}$. Ces dimensions sont fonctionnelles pour une plume d'électronébulisation : le liquide remplit la fente par capillarité et un nébulisat se forme lorsqu'une tension est appliquée sur le liquide. Néanmoins, la section de sortie de la plume est encore « grande » si on la compare à celle de sources standard de nano-électronébulisation. La Figure 44 représente les deux types de sections obtenues pour un capillaire standard et une plume de deuxième génération, avec les dimensions respectives de ces deux types d'orifice de sortie.

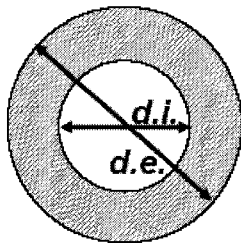


Figure 44A: Section de sortie d'un capillaire conventionnel « idéalisée » et supposée circulaire

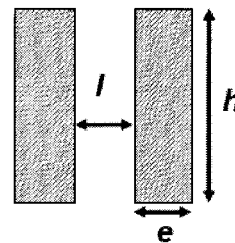


Figure 44B: Section de sortie d'une plume de nébulisation à l'extrémité de la fente capillaire

En effet, un des enjeux est ici de diminuer cette section puisque l'aire de cette dernière a des conséquences directes sur les performances en électronébulisation et en ionisation que l'on peut attendre de la source. Nous avons donc cherché à réduire cette aire de la section de sortie en diminuant, cette fois, l'épaisseur de matériau à l'extrémité de la plume, de 35 à $15 \mu\text{m}$, la largeur de la fente capillaire étant par ailleurs de $20 \mu\text{m}$ environ. Malheureusement, ces plumes n'ont pu

donner lieu à la formation d'un nébulisat ; il n'y avait pas de capillarité et, par conséquent, le liquide ne remplissait la fente. En effet, pour que cet effet de capillarité existe, il faut que les dimensions de la fente capillaire soient judicieusement choisies, notamment que la largeur de la fente soit inférieure à l'épaisseur de matériau à l'extrémité de la pointe. L'équation qui décrit le phénomène de capillarité dans un tube est l'équation de Laplace et elle s'écrit :

$$h_r = \frac{2\gamma \cos \alpha}{\rho g r}$$

Où h_r représente la hauteur à laquelle monte le liquide dans un tube capillaire, γ est la tension de surface du liquide, ρ est la densité du liquide, α l'angle que fait le liquide avec la surface et r le rayon du tube capillaire. Cette expression montre que pour qu'il y ait capillarité, il faut que le cosinus de l'angle de contact α soit positif, i.e. $\alpha < 90^\circ$. Cette condition impose, d'après l'équation de Young (équation E), que l'interaction solide-liquide soit favorisée comparée à celle solide-vapeur ou en d'autres termes $\gamma_{SV} > \gamma_{SL}$.

$$\gamma \cos \alpha = \gamma_{SV} - \gamma_{SL}$$

Cette équation conditionne le choix des matériaux à utiliser pour réaliser la plume.

Par ailleurs, l'équation de Laplace fait également apparaître le rayon du tube capillaire r , qui intervient également dans l'effet de capillarité. Dans notre cas, le remplissage de la fente par le liquide correspond à la formation d'un pont-liquide et r doit être remplacé, dans l'équation de Laplace, par les dimensions de la fente capillaire. Nous pouvons ainsi introduire une grandeur R ou facteur de forme de la fente capillaire défini comme le rapport entre la hauteur de matériau à la pointe de la plume et la largeur de la fente capillaire, $R = h/l$.

Il résulte de ce qui précède que le facteur R doit être supérieur à une valeur critique pour observer un effet capillaire dans la fente et pour que la formation d'un pont-liquide soit favorisée du point de vue énergétique.

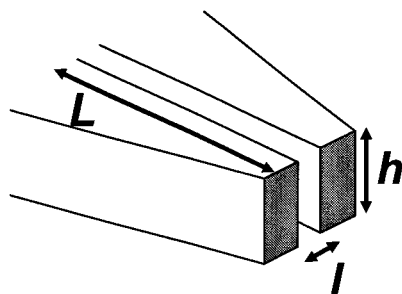


Figure 45 : Schéma de la pointe d'une plume avec l largeur de la fente et h hauteur de la fente capillaire

L'effet capillaire a lieu avec les prototypes ayant une section de $20 \times 15 \mu\text{m}$. Un autre prototype de deuxième génération et ayant une section de sortie plus petite s'est révélé fonctionnel en électronébulisation : la largeur de la fente capillaire l est ici de $6 \mu\text{m}$ pour une hauteur h de SU-8 de $25 \mu\text{m}$, ce qui conduit à une diminution d'un facteur 2 de la section de sortie. L'effet de capillarité est observé, la condition largeur < hauteur ($l < h$) est vérifiée.

En conclusion, pour diminuer l'aire de la section de sortie, il faut conjointement diminuer la largeur de la fente et l'épaisseur de matériau, et non une seule de ces grandeurs, tout en tenant compte de la condition imposée par la loi de Young-Laplace pour observer un effet de capillarité dans la fente.

3. Première série de tests en spectrométrie de masse : montage et résultats

Dans un premier temps, les plumes ont été testées en spectrométrie de masse comme précédemment.⁶⁶ Les plumes sont fixées sur une pièce mobile qui est introduite dans la trappe ionique. La tension d'ionisation est, de même, appliquée via le liquide à l'aide d'un fil de Pt qui assure le contact électrique entre la zone métallique située sur la pièce mobile introduite dans le spectromètre de masse et la solution à nébuliser, comme le montre le schéma 46.

La Gramicidine S est encore utilisée comme peptide standard pour évaluer le fonctionnement des plumes d'électronebulisation. Les deux types de plumes, avec une largeur de fente de 8 ou de $16 \mu\text{m}$, sont testés de façon similaire. Ici, le régime de fonctionnement de plumes est tout autre. La tension d'ionisation pour ces tests est dans une gamme allant de $1,5$ à $0,8 \text{ kV}$ et la concentration en peptide standard de $1-10 \mu\text{M}$ dans un premier temps. Le signal est acquis sur 2 minutes. Le spectre de masse est moyenné sur cette période de 2 minutes et tracé à l'aide du logiciel *Excalibur* sur une gamme de m/z allant de 300 à 1500 .

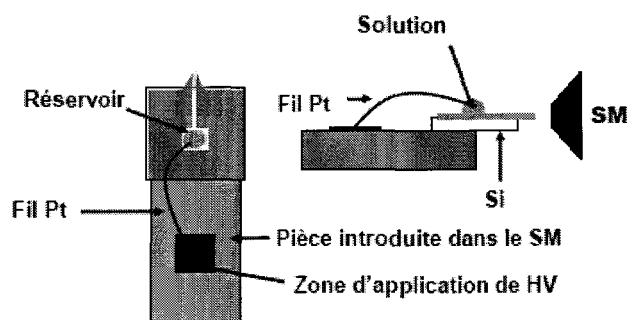


Figure 46 : Montage utilisé pour tester les plumes en spectrométrie de masse : le support de la plume est placé sur le porte-source introduit dans l'entrée du spectromètre de masse et la jonction électrique pour l'application de la tension d'ionisation est effectuée à l'aide d'un fil de Pt qui plonge dans la solution de test au niveau du réservoir de la plume.

Le signal d'électronébulisation obtenu est encore stable et présente une déviation standard typique de 6,9 % comme le montre la figure 47 qui représente le courant ionique total enregistré lors du test d'une plume ayant une fente de 8 μm de largeur, avec une solution de Gramicidine S à 5 μM et une tension d'ionisation de 0,8 kV.

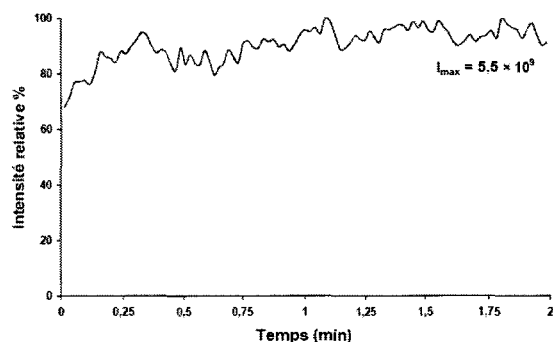


Figure 47 : Courant ionique total enregistré durant deux minutes lors du test d'un prototype de 2nde génération ($l = 8\mu\text{m}$) : Gramicidine S à 5 μM et tension d'ionisation de 0,8 kV, déviation standard calculée égale à 6,9%.

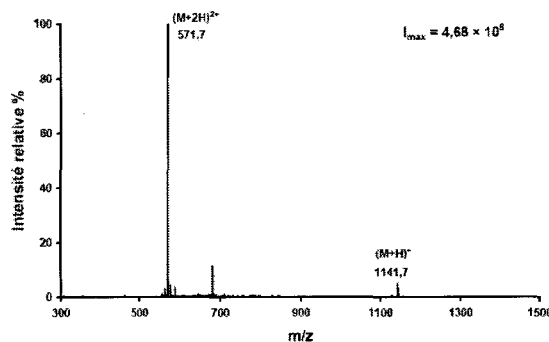


Figure 48 : Spectre de masse obtenu avec une plume de 2nde génération ($l = 8\mu\text{m}$) et moyenné sur une période d'acquisition de 2 minutes : Gramicidine S à 5 μM et tension d'ionisation de 1,2 kV.

Le spectre de masse présenté en Figure 48 a été obtenu dans des conditions analogues (plume de 8 μm de largeur, échantillon à 5 μM) mais avec une tension d'ionisation plus élevée de 1,2 kV. Le profil du spectre de masse diffère de celui généralement obtenu avec les premiers prototypes de plumes : le pic correspondant à l'espèce $(M+2H)^{2+}$ est majoritaire et le rapport d'intensité pour les deux espèces $(M+2H)^{2+}$ et $(M+H)^+$ est estimé à 0,053. Ce profil de spectre de masse se

rapproche de celui obtenu avec des sources conventionnelles commerciales (Proxeon) avec un pic dominant pour l'espèce mono-chargée, comme nous le discuterons ci-après.

Dépendance du profil du spectre de masse aux dimensions des sources-plumes

En effet, le profil du spectre de masse dépend grandement des conditions utilisées pour l'électronébulisation : la valeur de la tension d'ionisation, la concentration en peptide et particulièrement les dimensions de la source d'ionisation ou la largeur de la fente capillaire 8 ou 16 μm , ici. Les rapports d'intensité mesurés pour les espèces mono- et di-chargées de la Gramicidine S dans différentes conditions de nébulisation et pour les deux types de prototypes de deuxième génération (fente capillaire de 8 ou 16 μm) sont rassemblés dans le Tableau 2.

Table 2 : Rapport d'intensité pour les espèces mono- et di-chargées de la Gramicidine S et calculé dans différentes conditions de test indiquées dans le tableau (concentration en peptide, tension d'ionisation, largeur de la fente capillaire (cases ombrées = profil de spectre semblable à celui obtenu dans des conditions standard).

[GS]	Tension (kV)	8 μm	16 μm
1 μM	0,8		
	1	2,27	0,412
	1,2	0,61	3,77
	1,5	0,077	
5 μM	0,8	0,39	
	1	0,12	2,27
	1,2	0,053	0,51
	1,5	0,014	0,28
10 μM	0,8		7,63
	1		2,54
	1,2	0,039	
	1,5	0,027	

Deux profils de spectre de masse peuvent ainsi être définis ; un profil dit conventionnel, où l'espèce $(M+H)^+$ est majoritaire et où l'espèce $(M+2H)^{2+}$ est quasi-absente et un profil où les deux espèces ont des intensités comparables, ainsi qu'il a été observée pour les premiers prototypes de plumes d'électronébulisation. Le premier profil dit de type Protana est observé pour la majeure partie des tests avec la plume ayant une largeur de fente de 8 μm . Cependant, lorsque les conditions de tests deviennent extrêmes et sont proches des limites de fonctionnement de ces prototypes (1 $\mu\text{M}/1$ kV ; 1 $\mu\text{M}/1,2$ kV ; 5 $\mu\text{M}/0,8$ kV), la plume doit être amenée plus près de l'entrée de la trappe ionique, ce qui se traduit par une augmentation de l'intensité du pic à m/z 1141,7. A contrario, avec la plume dont la fente est plus large (16 μm), le

profil du spectre de masse exhibe un pic beaucoup plus intense pour l'espèce $(M+H)^+$, ce pic pouvant même être plus intense que l'autre pic à 571,7, qui correspond à l'espèce $(M+2H)^{2+}$. La Figure 49 présente les deux profils de spectre de masse possibles, obtenus respectivement avec les plumes à 8 et 16 μm , dans des conditions d'ionisation par ailleurs semblables, une solution de Gramicidine S à 5 μM et une tension d'ionisation à 1,2 kV.

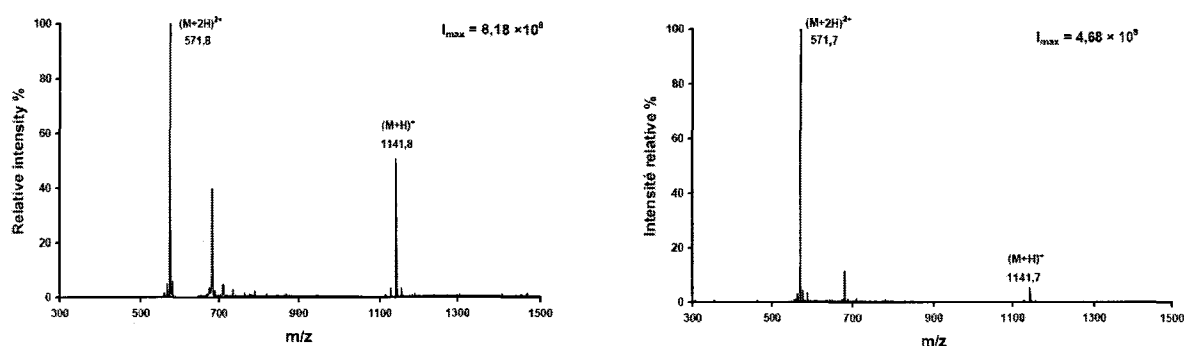


Figure 49 : Spectres de masse obtenus avec des plumes de 2nde génération pour une solution de Gramicidine S à 5 μM et une tension d'ionisation de 1,2 kV. A droite, spectre obtenu avec une plume à 16 μm et à gauche avec une plume à 8 μm .

Ces résultats mettent en évidence l'influence de la largeur de la fente capillaire de la plume sur les performances en électronébulisation et en ionisation de cette dernière. Une valeur plus petite de ce paramètre critique favorise la formation des espèces multi-chargées : ici, celle de l'espèce $(M+2H)^{2+}$ au détriment de celle de l'espèce $(M+H)^+$. Les dimensions de l'orifice de sortie conditionnent, en particulier, le débit de fluide en sortie de source : plus l'orifice de sortie est petit, plus le débit est bas et, par conséquent, plus les gouttelettes formées sont petites. Le débit est un paramètre majeur qui influence les conditions d'analyse. Ainsi, des spectres de masse fort différents ont-ils été obtenus avec des sources conventionnelles de diamètre interne ajusté de 1 à 10 μm , ainsi qu'il a été décrit dans la littérature. A bas débit de fluide et à petit orifice de sortie, les adduits salins disparaissent complètement du spectre de masse.³ De plus, il est bien connu que la formation de gouttelettes de taille plus réduite va de pair avec une ionisation plus efficace et un rendement d'ionisation plus élevé. Cependant, ici, dans les conditions extrêmes de fonctionnement des sources à 8 μm , le spectre de masse exhibe de nouveau deux pics. Dans ces conditions, la plume est rapprochée de l'entrée du spectromètre de masse pour observer la formation du nébulisat et les conditions d'ionisation sont changées, comme il a été discuté précédemment (paragraphe II B. 4).

Pour finir, des expériences de fragmentation ou SM/SM ont été conduites sur ces plumes de deuxième génération (largeur de fente de 8 ou 16 μm) dans différentes conditions de tension d'ionisation et de concentrations en Gramicidine S. Les paramètres de fragmentation sont inchangés par rapport à précédemment. Le spectre de masse est tracé après 2 min d'acquisition et il est moyenné sur cette période. La Figure 50 montre le spectre de fragmentation tracé pour une solution de Gramicidine S à 5 μM , une tension d'ionisation de 1,2 kV et la plume de 8 μm de largeur de fente ; son profil est similaire à celui présenté (précédemment) pour un prototype de première génération.

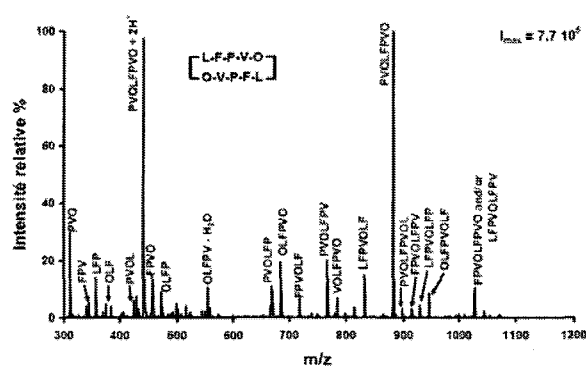


Figure 50: Spectre de masse de fragmentation obtenu lors du test en SM/SM d'une solution de Gramicidine S à 5 μM sous une tension d'ionisation de 1,2 kV ($l = 8\mu\text{m}$). Les fragments détectés sont indexés avec leur séquence.

Notons enfin que le rapport signal-sur-bruit, que nous avons estimé pour toutes ces expériences avec les plumes de deuxième génération, est très bon et supérieur à 40, y compris lorsque la tension d'ionisation est baissée à 0,8 kV pour des solutions peptidiques à 1 μM . Les performances en ionisation de cette deuxième série de prototypes sont comparables à celles de sources conventionnelles de type aiguille et commerciales.

Néanmoins, la consommation de ces prototypes de deuxième génération est encore fort élevée : elle est estimée à 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Nous pensons en effet que la topologie ouverte, i.e. sans couvercle, de la source favorise les phénomènes d'évaporation de la solution à analyser puisque cette dernière est en contact direct avec l'air et que le volume de liquide est réduit ($< 5 \mu\text{L}$). Ces phénomènes d'évaporation peuvent être limités par la présence d'un couvercle sur la source ou si un traitement de surface approprié permet de limiter la dispersion du liquide autour du réservoir et, ainsi, de réduire la surface de liquide en contact avec l'air. Enfin, le mode d'utilisation des plumes n'est pas optimisé. En particulier, l'introduction d'un fil de Pt dans le réservoir, pour

l'application de la tension d'ionisation, est entièrement manuelle et un bon contact électrique doit être établi entre le fil de Pt et la zone métallique d'une part, et entre le fil de Pt et le liquide d'autre part. Ceci nécessite un soin tout particulier de l'expérimentateur à la qualité du montage.

4. Deuxième série de tests en spectrométrie de masse : montage et résultats

a. Evolution du montage de test des plumes en spectrométrie de masse

Dans un deuxième temps, le protocole de test et le montage sont modifiés. Les propriétés semi-conductrices du support en silicium sont mises à profit pour y appliquer directement la tension d'ionisation.⁶⁷ Le schéma 51 illustre ce nouveau montage.

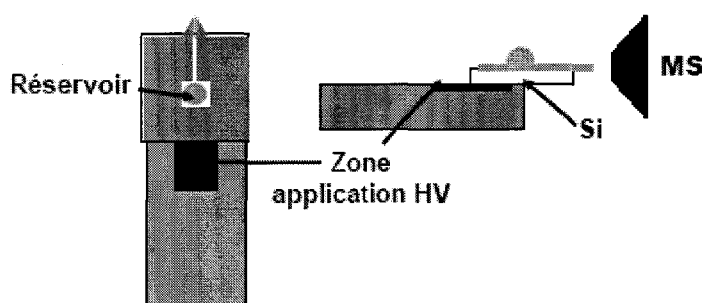


Figure 51 : Montage amélioré de test en spectrométrie de masse des plumes d'électronébulisation ; le support en silicium est placé sur le porte-source en contact intime avec la zone métallique d'application de la tension. La jonction électrique s'effectue à travers le support en silicium sur le liquide à nébuliser.

La plume est précautionneusement fixée sur le porte-source à l'aide d'un ruban de téflon ; elle est fermement maintenue de façon à assurer un bon contact électrique entre le support en silicium et la zone métallique présente sur le porte-source. Notons, tout d'abord, que ce montage est grandement simplifié comparé au précédent et qu'il se prête mieux à une production en masse de plumes d'électronébulisation. L'étape manuelle d'insertion d'un fil de Pt dans le réservoir visant à rendre la plume opérationnelle est supprimée. La majorité des expériences présentées dans ce paragraphe ont été réalisées avec une plume de deuxième génération ayant une largeur de fente capillaire de 8 μm . L'utilisation d'autres plumes est alors mentionnée.

b. Validation de ce nouveau montage de test

Ce nouveau montage est d'abord éprouvé sur des solutions de peptide standard, à commencer par la Gramicidine S. Ces premiers tests sur la Gramicidine S nous ont permis de comparer les deux montages en termes de performances en ionisation et de profil de spectre de masse. Les

paramètres de ces expériences en spectrométrie de masse en utilisant ce deuxième montage, sont une tension d'ionisation de 1,1 à 1,4 kV et des solutions en peptides de 1-5 μM . Le profil des spectres de masse obtenus avec ce mode d'application de la tension est conforme à celui dit conventionnel, avec un quasi-unique pic à 571,6 correspondant à l'espèce $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$. La Figure 52 représente le spectre de masse tracé pour une solution de Gramicidine S à 1 μM et une tension d'ionisation de 1,2 kV. Notons que, dans ces conditions de tests (1 μM , HV de 1-1,2 kV), lorsque la tension était appliquée sur un fil de Pt, le profil du spectre de masse était autre et présentait deux pics d'intensité comparable pour les deux espèces $(\text{M}+\text{H})^+$ et $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$.⁶⁶ Ainsi, ce nouveau montage est-il plus robuste et permet-il d'obtenir de meilleurs résultats en ionisation que le précédent qui utilisait un fil de Pt pour appliquer la tension d'ionisation.

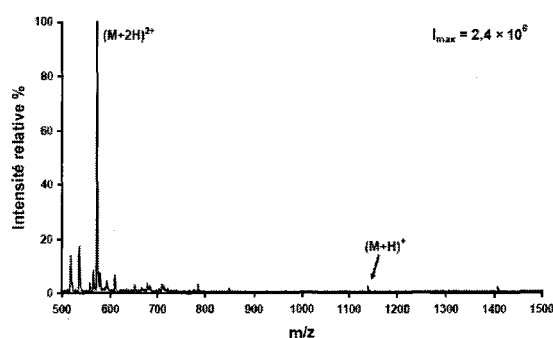


Figure 52 : Test d'une solution de Gramicidine S à 1 μM et sous une tension d'ionisation de 1,2 kV ; spectre de masse moyenné sur une période de 2 minutes d'acquisition et plume à $l = 8 \mu\text{m}$.

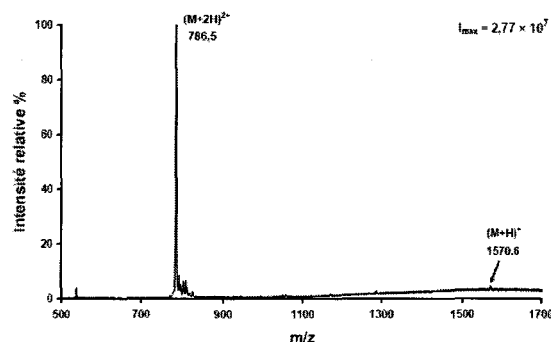


Figure 53 : Test d'un autre peptide standard, le Glu-Fibrinopeptide B à 1 μM , sous une tension de 1,2 kV ; spectre de masse moyenné sur une période de 6 minutes d'acquisition et plume à $l = 8 \mu\text{m}$

c. Test d'un autre standard : le Glu-Fibrinopeptide B

Un autre peptide standard, le Glu-Fibrinopeptide B, de poids moléculaire un peu plus élevé (1570,6) a ensuite été testé dans des conditions équivalentes, une tension d'ionisation de 1-1,4 kV et des concentrations en peptide inférieures à 5 μM . La Figure 53 montre le spectre typique obtenu avec ce peptide, qui est testé ici à une concentration de 1 μM , avec une tension d'ionisation de 1,2 kV et qui a été moyenné sur une période d'acquisition de 6 minutes. Ce spectre présente un pic unique à m/z 786,5 et un pic-nain à m/z 1570,6 pour l'espèce $(\text{M}+\text{H})^+$. Enfin, pour « finir » les tests de base avec cette plume ($l = 8 \mu\text{m}$), ces deux peptides ont été soumis à des expériences de fragmentation dans des conditions analogues à précédemment (isolation de l'espèce $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$ avec une tolérance de 2 Th, paramètre normalisé d'énergie de collision de 25 % et facteur de fréquence RF d'activation de 0,25). Les profils de fragmentation

sont identiques à ceux observés avec une aiguille standard (Proxeon) : les mêmes fragments et dans des proportions relatives équivalentes. La Figure 54 représente le spectre de fragmentation obtenu avec une plume d'électronébulisation ($l = 8 \mu\text{m}$) pour une solution de Glu-Fibrinopeptide B à $0,1 \mu\text{M}$ et une tension d'ionisation de $1,1 \text{ kV}$. Ces résultats observés sur des peptides standard, aussi bien pour des expériences de SM simples que des expériences de fragmentation sont en concordance avec les performances classiques de nano-électronébulisation qui sont atteintes avec des sources conventionnelles. Les profils des spectres de masse sont comparables pour des conditions de test par ailleurs semblables en termes de tension d'ionisation et de concentration en peptide.

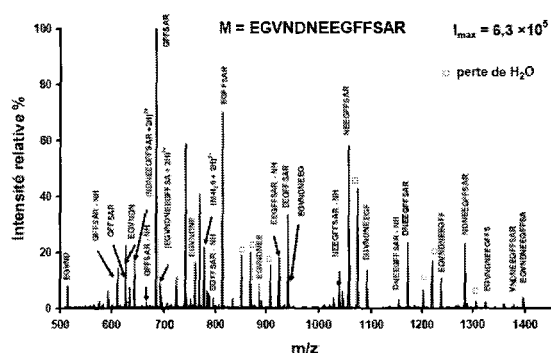


Figure 54 : Expérience de SM/SM effectuée sur un peptide standard, le Glu-Fibrinopeptide B, à $0,1 \mu\text{M}$ sous une tension de $1,1 \text{ kV}$; spectre de masse moyenné pour une acquisition de 2 minutes. Indexation des pics avec la séquence des fragments observés.

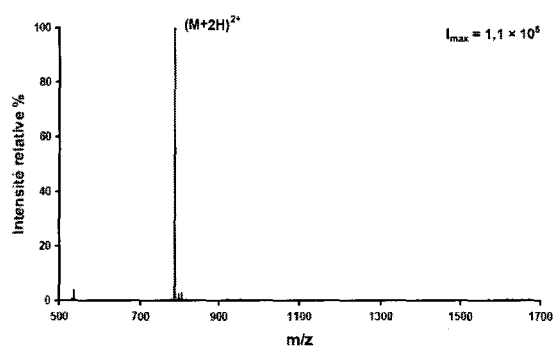


Figure 55 : Test d'une plume d'électronébulisation de section de sortie réduite, $l = 6 \mu\text{m}$, $b = 25 \mu\text{m}$. Spectre de masse obtenu avec une solution de Glu-Fibrinopeptide B à $1 \mu\text{M}$, sous une tension d'ionisation de $0,9 \text{ kV}$.

d. Test d'une plume ayant une section de sortie réduite

Précédemment, nous avons validé le fonctionnement en capillarité de plumes de deuxième génération et de section de sortie réduite d'un facteur deux : leur largeur de fente est de $6 \mu\text{m}$ et l'épaisseur de SU-8 en leur extrémité de $25 \mu\text{m}$. Ces plumes ont également été testées en spectrométrie de masse sur une solution de Glu-Fibrinopeptide B à $1 \mu\text{M}$. La tension d'ionisation nécessaire à la formation d'un nébulisat est inférieure à 1 kV . La Figure 55 présente le spectre de masse obtenu pour une période d'acquisition de 2 minutes avec cette plume, la tension d'ionisation ayant été fixée ici à $0,9 \text{ kV}$. Notons que l'intensité absolue du spectre est plus faible ($1,1 \times 10^5$) ; ceci résulte de la plus basse valeur de la tension. Néanmoins, le rapport signal-sur-bruit est excellent et trois fois plus élevé que pour le spectre présenté en figure 53 ($l = 8 \mu\text{m}$; $e = 35 \mu\text{m}$; $HT = 1,2 \text{ kV}$) ; ces rapports sont estimés à 300 et 100 respectivement.

e. Etude en sensibilité

L'étape suivante de nos études a concerné la détermination d'une limite de détection en termes de concentration du peptide. Le Glu-Fibrinopeptide B a été conservé pour cette série de tests et la plume d'électronébulisation utilisée a une fente capillaire de 8 μm de largeur et 35 μm d'épaisseur. Cette plume a d'abord été abondamment lavée pendant environ deux heures. Pour ce faire, elle a été montée sur la trappe ionique et chargée avec le solvant de dilution (méthanol-eau 50 :50, 0,1 % acide formique). Ces lavages ont été effectués jusqu'à ce qu'aucune trace de peptide ne soit plus détectée en spectrométrie de masse, puis le lavage a été continué pendant un certain temps par « sécurité ». Ensuite, des solutions diluées de Glu-Fibrinopeptide B de concentration allant jusqu'à 10^{-2} μM ont été préparées à l'aide du solvant de dilution et testées par ordre croissant de concentration. La Table 3 rassemble les résultats de ces tests en sensibilité, l'intensité du courant ionique, l'intensité du spectre de masse ainsi que le rapport signal-sur-bruit estimé pour chaque expérience.

Table 3 : Analyse par spectrométrie de masse de solutions de Glu-Fibrinopeptide B à différentes concentrations. Valeurs de la tension d'ionisation, intensités maximales mesurées sur les signaux TIC et les spectres de masse, estimation du rapport signal/ bruit et commentaires sur l'allure du spectre.

Concentration en peptide	Tension	I_{TIC}	I_{SM}	Rapport Signal-sur-Bruit	Commentaires
5 μM	1,2 kV	$1,16 \times 10^{10}$	$1,18 \times 10^8$	250	Espèce (M+H) ⁺ de faible intensité Mono/di = $4,3 \times 10^{-2}$
1 μM	1,2 kV	$9,7 \times 10^9$	$2,3 \times 10^7$	167	Espèce (M+H) ⁺ de faible intensité Mono/di = $1,5 \times 10^{-2}$
0,1 μM	1,1 kV	$1,19 \times 10^9$	$1,43 \times 10^6$	25	Adduits salins Espèce (M+H) ⁺ de faible intensité Mono/di = $1,46 \times 10^{-2}$
0,01 μM	1,1 kV	$5,07 \times 10^8$	$3,4 \times 10^5$	6	Adduits salins Pas d'espèce (M+H) ⁺

La courbe qui donne l'intensité du spectre de masse en fonction de la concentration de l'échantillon de Glu-Fibrinopeptide B à valeur constante de la tension d'ionisation et qui est tracée en échelle doublement logarithmique est une droite de pente unitaire, comme le montre la Figure 56. Ceci est en accord avec le modèle de Kebarle, qui prédit une variation linéaire du logarithme de l'intensité en fonction de celui de la concentration, la pente de cette droite étant environ égale à 1, pour des concentrations en peptide inférieures à 10 μM .⁶⁸

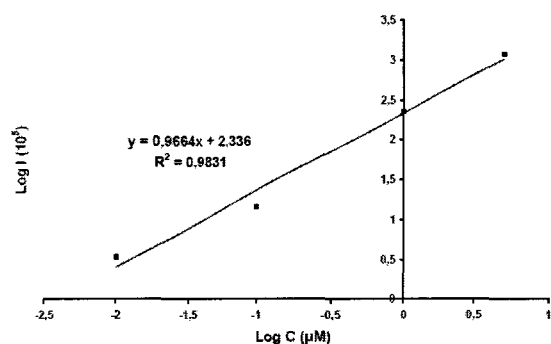


Figure 56 : Corrélation entre intensité maximale du spectre de masse et la concentration de peptide ; courbe en échelle doublement logarithmique obtenue pour un échantillon de Glu-Fibrinopeptide B à partir des valeurs rassemblées dans la Table 3.

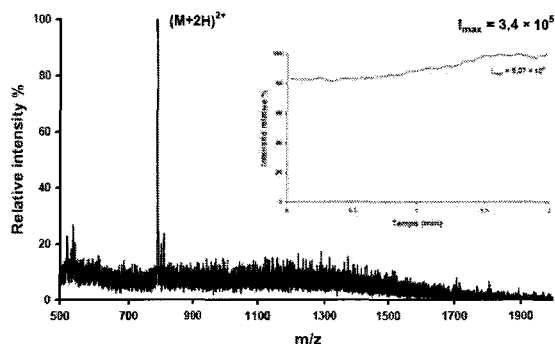


Figure 57 : Spectre de masse obtenu pour une solution de Glu-Fibrinopeptide B à 10^{-2} μM et sous une tension d'ionisation de 1,1 kV à l'aide d'une plume d'électronébulisation ($l = 8 \mu\text{m}$) ; en encart, courant ionique total correspondant.

La Figure 57 présente le spectre de masse obtenu avec une solution à 10^{-2} μM de Glu-Fibrinopeptide B pour une tension d'ionisation de 1,1 kV ainsi que le courant ionique total qui est placé en encart de la figure. On note la présence plus ou moins importante d'adduits salins sur l'espèce $(M+2H)^{2+}$ sur les spectres de masse obtenus avec des solutions à 0,1 et 0,01 μM . Cependant, mêmes à ces faibles concentrations, seule l'espèce $(M+2H)^{2+}$ est détectée en spectrométrie de masse, quelle que soit la position de la plume par rapport à l'entrée du spectromètre de masse. Nous pensons cependant que des phénomènes d'évaporation des solutions testées pourraient se produire dans l'entrée du spectromètre de masse, conduisant à une concentration des échantillons sur la source d'ionisation. Ces problèmes d'évaporation seront palliés dans le futur par l'inclusion d'un couvercle sur le réservoir d'entrée de la plume.

f. Diversification des analyses

Digestat modèle d'une protéine, le cytochrome c

Encouragés par ces résultats, nous avons décidé de tester non plus un peptide modèle d'ionisation facile, mais un mélange complexe de peptides. A cette fin, un digestat modèle de protéine, d'origine commerciale a été choisi. L'intérêt de ce digestat de cytochrome *c* bovin réside dans la diversité des fragments qui le constituent, tant du point de vue de leur taille ou poids moléculaire que du point de vue de leurs propriétés physico-chimiques comme leur hydrophobie ($\log P$) ou leur point isoélectrique (pI), par exemple. Cet échantillon est notamment utilisé comme témoin pour les séparations en nanoLC. Sa composition précise a été déterminée par une analyse par spectrométrie de masse avec une ionisation MALDI ; il contient 11 peptides différents qui sont présentés dans la Table 4 avec leurs poids moléculaires (MW), leurs points

isoélectriques (pI) ainsi que leurs valeurs de log P, mesure de leur hydrophobie selon l'échelle de Kyte-Doolittle. Ces valeurs ont été déterminées à l'aide du logiciel de protéomique *ExPASy*. La diversité de cet échantillon permet de tester les propriétés de surface de la plume et de voir s'il y a une adsorption potentielle de certains peptides sur la SU-8 conduisant à la suppression, ou tout du moins à la diminution de leur signal en électronebulisation. Nous avons également comparé le spectre de masse obtenu avec celui observé dans des conditions standard avec une aiguille Protana. La Figure 58 présente le spectre de masse obtenu avec une plume ($l = 8 \mu\text{m}$), sur une solution de digestat à $1 \mu\text{M}$ et sous une tension d'ionisation de 1,2 kV, ce spectre ayant été moyenné sur une période de 2 minutes d'acquisition du signal. Tous les peptides contenus dans le digestat sont détectés et apparaissent sur le spectre de masse sous une forme mono- ou di- ou multi-chargée. La comparaison des deux spectres obtenus avec une plume ou une aiguille standard révèle quelques différences dans le spectre : (i) les pics n'ont pas la même intensité relative sur les deux spectres et (ii) un peptide, le fragment 26-38, n'est pas détecté avec la source standard.

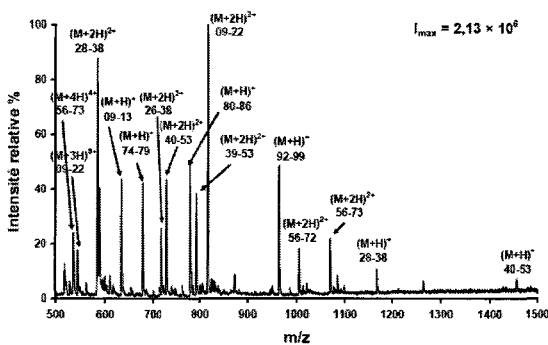


Figure 58 : Analyse d'un digestat protéique à l'aide d'une plume d'électronebulisation ($l = 8 \mu\text{m}$) ; digestat de Cyt C à $1 \mu\text{M}$ et tension d'ionisation de 1,2 kV. Spectre de masse moyenné sur une période d'acquisition de 2 minutes.

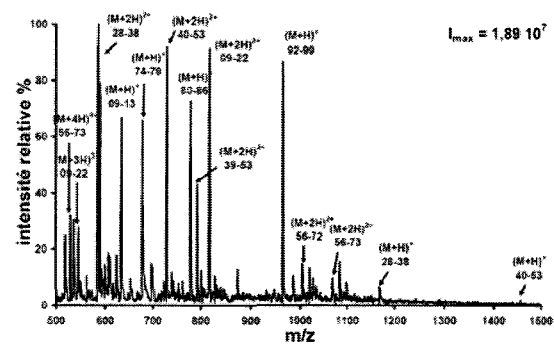


Figure 59 : Analyse d'un digestat protéique à l'aide d'une source standard en silice fondue (Proxeon) ; digestat de Cyt C à $1 \mu\text{M}$ et tension d'ionisation de 1 kV. Spectre de masse moyenné sur une période d'acquisition de 2 minutes.

La Table 4 présente les résultats de ces tests avec les deux types de sources d'ionisation, une source standard et une source de type plume de deuxième génération ; les intensités (en unités arbitraires) mesurées sur les spectres pour les différentes espèces détectées ainsi que le rapport d'intensité pour les deux sources $I_{\text{standard}}/I_{\text{plume}}$.

Table 4 : Comparaison d'une plume à une source standard pour l'analyse d'un digestat de Cyt C à 1 µM; liste des fragments contenus dans le digestat ainsi que leurs propriétés physico-chimiques (poids moléculaire MW, point isoélectrique pI, hydrophobie log P déterminée sur l'échelle de Kyle-Doolittle) et leurs temps de rétention sur une colonne de phase inverse, les intensités mesurées sur les spectres de masse et les rapports d'intensités $I_{\text{standard}}/I_{\text{plume}}$.

Espèces	Fragment	MW ^a	Log P ^a	pI ^a	I _{standard} ^b	I _{plumz} ^c	I _{standard} / I _{plume}	T _r ^d
(M+H) ⁺	40-53	1456,67	-0,993	5,5	338260	158035	2.14	2.64
	28-38	1168,62	-0,391	9,44	1199383	230390	5.21	4.18
	92-99	964,53	0,212	4,13	16201932	1040324	15.57	8.79
	80-86	779,45	1,6	8,5	135651604	1047777	129.47	3.27
	74-79	678,35	-0,567	8,59	12372904	900971	13.73	Inj ^f
	9-13	634,39	0,82	8,75	12524910	929420	13.48	Inj ^f
					Σ I _{mono} = 62015521	Σ I _{mono} = 4820912		
(M+2H) ²⁺	56-73	1069,52	-0,961	4,49	1785362	469729	3.80	22.03
	56-72	1005,48	-0,788	4,09	2722998	386983	7.04	23.72
	9-22	817,41	0,021	8,06	16892400	2129041	7.93	10.04
	39-53	792,88	-1,187	8,5	7959475	822769	9.67	2.49
	40-53	728,84	-0,993	5,5	17020072	925636	18.39	2.64
	26-38	717,39	-0,877	11	*** ^e	549978	0.00	6.12
	28-38	584,81	-0,391	9,44	18865064	1867862	10.10	4.18
					Σ I _{di} = 65245371	Σ I _{di} = 7151998		

^a Values théoriques des poids moléculaires des fragments de Cyt C.

^b Intensité en unités arbitraires mesurées sur les spectres de masses obtenus avec une source standard.

^c Intensité en unités arbitraires mesurées sur les spectres de masses obtenus avec une source plume.

^d Temps de rétention en minutes déterminés lors de la séparation du digestat de Cytochrome C sur une colonne monolithique.

^e Peptide non détecté avec une source standard.

^f Peptides élués dans le pic d'injection.

En premier lieu, le rapport signal-sur-bruit (S/B) est plus élevé avec la plume d'électronébulisation qu'avec une source standard, même si l'intensité maximale est plus forte avec cette dernière. Ces valeurs de S/B et d'intensité maximale sont respectivement de 20 et de $1,89 \times 10^7$ pour une source standard contre 35 et de $2,13 \times 10^6$ pour une plume d'électronébulisation.

En second lieu, nous nous sommes intéressés au type d'ions majoritairement formés. A cette fin, nous avons calculé, pour les deux types de sources d'ionisation, les rapports I_{Mono} et I_{Di} , définis comme il suit :

$$I_{Mono} = \frac{\sum I_{mono}}{\sum I_{di}} \quad I_{Di} = \frac{\sum I_{di}}{\sum I_{mono}}$$

Ces rapports, I_{Mono} et I_{Di} , sont respectivement égaux à 0,49 et 0,51 pour une source standard, contre 0,4 et 0,6 pour une plume d'électronébulisation. Ainsi, la formation d'espèces di-chargées $(M+2H)^{2+}$ est-elle favorisée avec les plumes d'électronébulisation comparé à une source standard, comme le montrent ces valeurs. En troisième lieu, les propriétés physico-chimiques des différents peptides ne semblent pas influencer sur leur réponse en ESI-SM et sur l'intensité des pics obtenus. La surface de la plume qui est en SU-8, qui est un matériau plus hydrophobe que le verre ou la silice fondue, n'influence pas les conditions d'analyse par ESI-SM. Les peptides ne sont adsorbés de façon non spécifique, même partiellement, sur la surface en SU-8. Néanmoins, la basicité des fragments semble intervenir dans les processus d'ionisation des espèces avec la source standard ; en effet, le fragment 26-38 qui n'est pas détecté à l'aide de la source standard, présente un pI élevé et égal à 11, qui est le plus grand pI pour cette série de peptides contenus dans l'échantillon testé. En dernier lieu, nous avons calculé pour les différents peptides détectés lors de ces tests le rapport $I_{standard}/I_{plume}$, aussi bien pour les espèces mono- que di-chargées, respectivement $(M+H)^+$ et $(M+2H)^{2+}$. Ces rapports d'intensité ne corrèlent pas avec l'évolution des valeurs de pI ou de log P calculées pour ces peptides. Par contre, nous avons déterminé, au préalable, les temps de rétention de ces différents peptides contenus dans le digestat de Cytochrome C sur une colonne de phase inverse, une colonne monolithique comme celles décrites dans le chapitre 2 de ce manuscrit ; ces valeurs sont indiquées dans le tableau 4. L'évolution des rapports $I_{standard}/I_{plume}$ pour les espèces di-chargées semble liée à celle des temps de rétention : plus le temps de rétention du peptide est grand, plus ce rapport est petit, ou en d'autres termes, la plume d'électronébulisation favorise l'ionisation, en comparaison avec une source standard, des espèces

qui sont plus retenues sur une colonne de phase inverse. Seul le fragment 39-53 du Cytochrome C ne semble pas suivre cette loi. Cette observation rappelle le modèle de Enke qui prédit l'intensité des pics de peptides en spectrométrie de masse en fonction de leur rétention sur une colonne de phase inverse :⁶⁹ plus le peptide est retenu, plus son intensité en ESI-SM est forte.

Protéine non digérée : l'apo-myoglobine

Une protéine native non digérée a aussi été testée en ionisation sur une plume d'électronébulisation ; il s'agit de l'apo-myoglobine de cheval qui a un poids moléculaire de 16,9 kDa et qui est la forme de la myoglobine démunie de son hème. Nous avons d'abord utilisé la plume ayant une largeur de fente capillaire de 8 μm , dont les performances sur des peptides standard, s'étant révélées supérieures puis une plume dont la fente est plus large et égale à 16 μm . Cette dernière a donné de meilleurs résultats, pour l'analyse d'entités plus larges, car elle a moins tendance à se boucher du fait de sa fente deux fois plus large. La figure 60 présente le spectre de masse obtenu pour une solution d'apo-myoglobine à 1 μM qui a été analysée sur une plume d'électronébulisation ($l = 16 \mu\text{m}$) à l'aide d'une tension d'ionisation de 1 kV ainsi que le spectre de masse déconvolué (Figure 61) calculé à l'aide du logiciel *BioWorks Browser* qui présente un pic à m/z 16953.

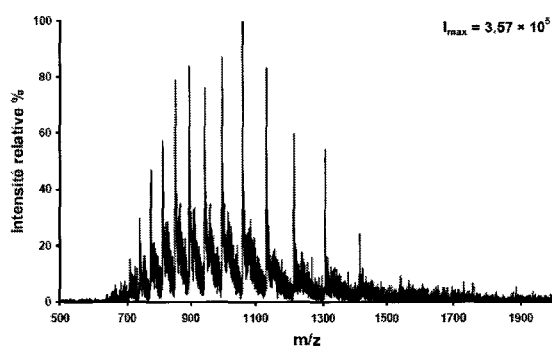


Figure 60 : Spectre de masse obtenu avec une plume d'électronébulisation ($l = 16 \mu\text{m}$) pour un échantillon de protéine à 1 μM (apo-myoglobine) et sous une tension d'ionisation de 1 kV.

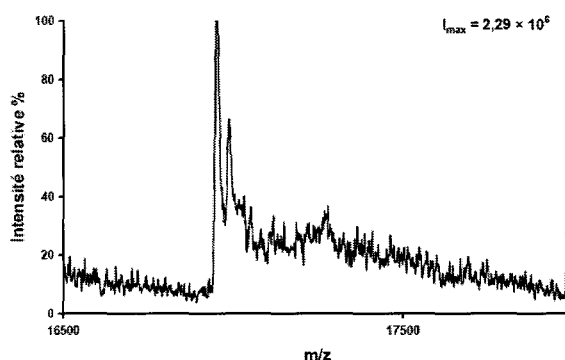


Figure 61 : Spectre de masse déconvolué à l'aide du logiciel *BioWorks Browser* pour une solution d'apo-myoglobine à 1 μM et ionisée sous une tension de 1 kV

La résolution du spectre de masse de la protéine (non déconvolué) est moins bonne que celle observée avec une source conventionnelle, mais ce spectre permet d'identifier correctement la protéine. De plus, le profil de protonation sur une plume d'électronébulisation est le même que sur une source conventionnelle, il n'y a pas de décalage du spectre vers les espèces moins chargées, comme ce qui avait été observé pour des peptides standard. Notons enfin, que même si

la plume plus large a été utilisée ici, l'analyse est toujours menée dans un régime de nano-électronébulisation puisque la tension est de 1 kV et la solution de protéine est à 1 μ M.

Neurotransmetteur : l'anandamide.

Pour finir, comme la surface de la plume a une hydrophobie qui peut être qualifiée de « neutre », nous nous sommes intéressés à l'analyse de petites molécules organiques réputées être très hydrophobes et difficiles à analyser. Il s'agit d'un neurotransmetteur, l'anandamide, qui possède de longues chaînes grasses.



Figure 62 : Structure de l'anandamide

L'analyse de ce composé a été réalisée sur une solution à 1 μ M en appliquant une tension d'ionisation de 1 à 1,2 kV, aussi bien pour une plume avec une fente à 8 μ m qu'à 16 μ m.

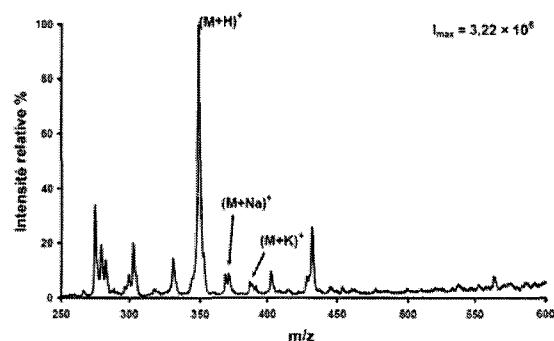


Figure 63 : Spectre de masse obtenu avec une plume d'électronébulisation (8 μ m) pour une solution d'anandamide à 1 μ M et sous une tension d'ionisation de 1 kV ; m/z de 250 à 600.

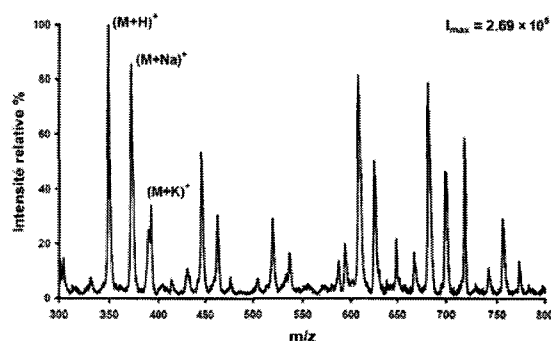


Figure 64 : Spectre de masse obtenu avec une aiguille conventionnelle (Protana) pour une solution d'anandamide à 1 μ M et sous une tension d'ionisation de 0,9 kV ; m/z de 300 à 800.

Le spectre de masse obtenu est présenté en Figure 63 ; l'intensité de ce spectre de masse moyenné sur une période de 2 minutes d'acquisition du signal est de 10^6 contre une intensité de 10^5 seulement pour une aiguille Protana utilisée dans des conditions analogues (solution à 1 μ M, tension d'ionisation de 1 kV) (Figure 64). De plus, sur le spectre obtenu avec l'aiguille standard, les adduits salins sont plus importants que sur celui obtenu avec une plume. Ces derniers tests

renforcent les résultats précédents qui montrent que les plumes d'électronébulisation exhibent de très bonnes performances pour l'analyse de molécules variées et que ses performances dépassent celles de sources conventionnelles.

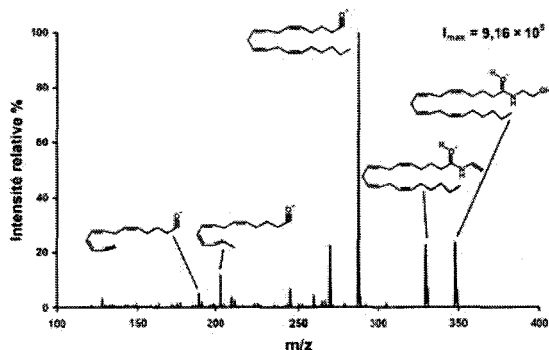


Figure 65 : Spectre de masse en tandem SM/SM obtenu avec une plume d'électronébulisation (8 μm) pour une solution d'anandamide à 1 μM et sous une tension d'ionisation de 1 kV, après sélection et isolement du composé à m/z 348 (33%).

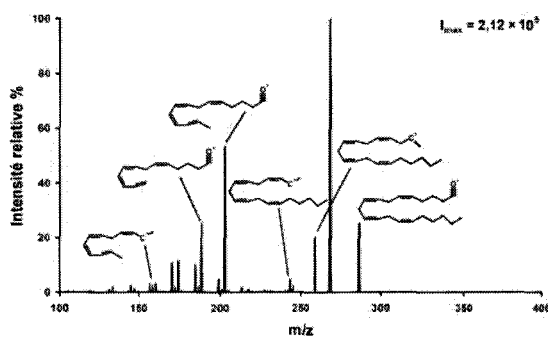


Figure 66 : Spectre de masse SM^3 obtenu avec une plume (8 μm) pour une solution d'anandamide à 1 μM et sous une tension d'ionisation de 1 kV, après sélection et isolement du composé à m/z 287,1 apparu de façon majoritaire sur le spectre de fragmentation (33% puis 35%).

De plus, les tests en SM/SM permettent de remonter à la structure du composé. Les Figures 65 et 66 présentent les spectres de masse obtenus en cascade, avec une source d'ionisation de type plume, en SM/SM puis SM/SM/SM, les structures des composés issus de la fragmentation de l'anandamide étant indiqués sur les graphes.

Par ailleurs, si l'analyse est effectuée à l'aide d'une plume d'électronébulisation, la présence de dimères est détectée par un large pic à m/z 695 (Figure 67). Ce phénomène révèle que la concentration est trop élevée pour optimiser son analyse ; le composé a tendance à former des agrégats comme des dimères du fait de cette forte concentration et du fait qu'il a plus d'affinité pour lui-même que pour la surface de la plume, qui n'est pas hydrophobe.

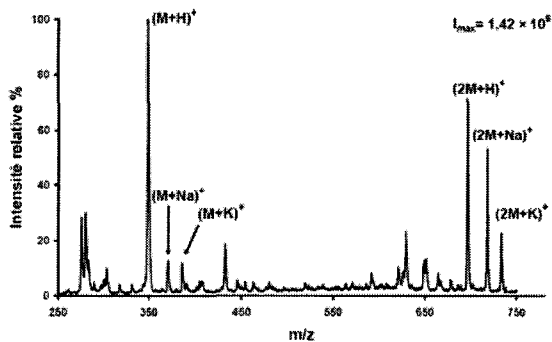


Figure 67 : Spectre de masse obtenu avec une plume d'électronébulisation (16 μm) pour une solution d'anandamide à 1 μM et sous une tension d'ionisation de 1 kV : le composé est aussi détecté sous forme de dimères, avec et sans adduits salins.

Ainsi, la concentration de la solution d'anandamide a-t-elle été diminuée. Si la concentration de la solution est abaissée d'un facteur dix (0,1 μM), le spectre complet ne permet pas de détecter le composé (Figure 68), mais il est facilement isolé et fragmenté pour donner des résultats équivalents à précédemment (Figure 69). La sensibilité de l'analyse est améliorée si l'ionisation est effectuée avec une plume plutôt qu'une source standard.

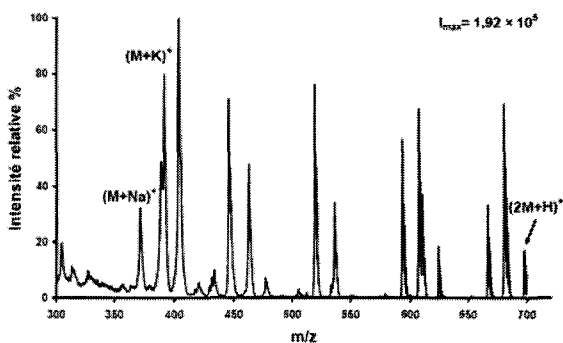


Figure 68 : Spectre de masse obtenu avec une plume d'électronébulisation (8 μm) pour une solution d'anandamide à 0,1 μM et sous une tension d'ionisation de 1,2 kV.

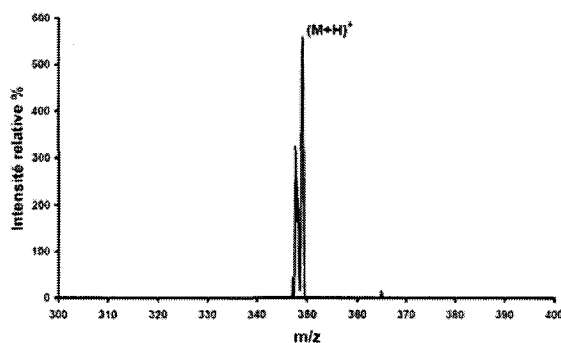


Figure 69 : Spectre de masse obtenu avec une plume (8 μm) pour une solution d'anandamide à 0,1 μM et sous une tension d'ionisation de 1,2 kV : isolement de l'ion à m/z 348.

5. Conclusion

Une deuxième génération de prototypes d'électronébulisation ayant une géométrie de type plume a été fabriquée, étudiée et testée ; leurs dimensions et géométrie ont globalement été améliorées par rapport aux prototypes de première génération à l'aide de nos observations sur ces dernières. Il est d'abord apparu que les dimensions des plumes devaient être judicieusement choisies pour

que le liquide puisse remplir la fente par capillarité ; l'épaisseur de SU-8 à l'extrémité de la pointe doit être supérieure à la largeur de la fente capillaire ($b > \lambda$). Ces plumes de deuxième génération ont été testées selon deux protocoles et deux montages sur une trappe ionique. La première série de tests, qui utilise un fil de Pt pour appliquer la tension d'ionisation via le liquide, a mis en évidence l'importance de diminuer les dimensions de l'orifice d'électronébulisation et l'influence de ces dimensions sur les performances en ionisation des plumes. La deuxième série de tests a été effectuée à l'aide d'un montage plus robuste qui se prête mieux à une automatisation de l'analyse et à une production en masse de plumes d'électronébulisation : le fil de Pt est supprimé et la tension est appliquée directement sur le support en silicium de la plume. Au cours de ces tests, non seulement les limites en fonctionnement des plumes ont pu être éprouvées en profondeur mais aussi une diversification de l'analyse a été possible. Les performances des plumes sont comparables à celles de sources conventionnelles, voire même meilleures. Néanmoins, ces prototypes en SU-8 ne permettent pas une évolution plus poussée de la structure de type plume. L'usage de la résine SU-8 impose des limitations quant aux dimensions espérées pour ces structures. Un autre matériau et une autre filière technologique doivent être envisagés pour une descente en échelle des plumes plus marquée. A cette fin, nous nous sommes tournés vers une filière de microfabrication reposant sur l'utilisation de matériaux à base de silicium, et, en particulier, le silicium polycristallin.

D. Plumes de 3^{ème} génération

1. Description

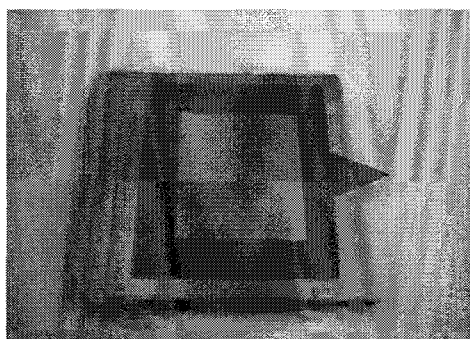


Figure 70 : Photographie d'une plume de troisième génération en silicium polycristallin réalisée sur un support en silicium.

La structure et la géométrie de la plume sont inchangées par rapport à précédemment et aux prototypes de deuxième génération. Néanmoins, la résine SU-8 est remplacée par un autre

matériau, compatible avec une descente en échelle des dimensions de la plume, en particulier de sa pointe.

Le silicium polycristallin (polySi) possède les caractéristiques adéquates à cette fin. Son module d'Young est d'environ 200 GPa, contre 20 GPa seulement pour la résine SU-8, ce qui se traduit par une aussi absence de contraintes sur le matériau et garantit la planéité de la partie de la plume surplombant le support. Le silicium polycristallin est non dopé (10^{14} cm^{-3}), ce qui en fait un matériau conducteur, au moins suffisamment pour nos applications qui utilisent des tensions continues. Il est hydrophile : l'angle de contact mesuré, pour une goutte d'eau, est égal à 60° . A priori, il peut donc y avoir capillarité dans la fente de la plume. Enfin, le silicium polycristallin se prête à la fabrication de petites structures aussi peu épaisses, comme celle que nous envisageons et l'équipement nécessaire est disponible localement.

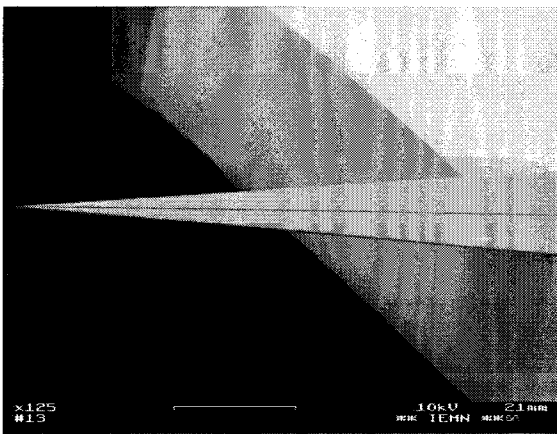


Figure 71 : Vue latérale de la pointe d'une plume de troisième génération en PolySi ; la longueur de la partie libre de la plume est de $800 \mu\text{m}$ (photographie MEB).

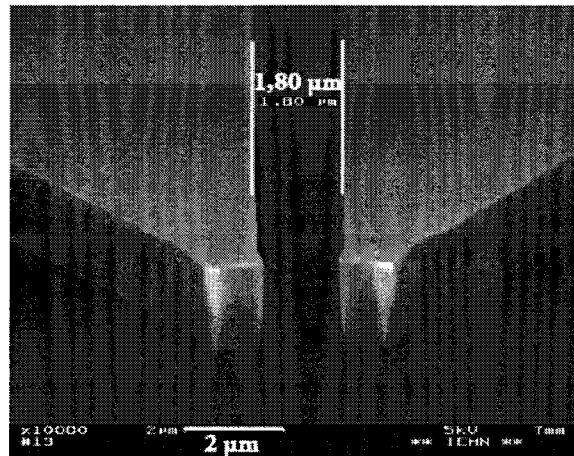


Figure 72 : Photographie de microscopie électronique de la fente capillaire d'une plume de troisième génération en PolySi avec une section de sortie de $2 \times 2 \mu\text{m}$ (barre d'échelle à $2 \mu\text{m}$)

Les plumes de troisième génération se composent, à l'instar des prototypes précédents, d'une structure de type plume avec un réservoir et une fente capillaire, fabriquée, ici, en silicium polycristallin et d'un support en silicium (type n). La pointe de la plume surplombe son support sur une longueur de quelques centaines de microns, comme le montrent les photographies de microscopie électronique présentées ci-dessus. Les dimensions de la fente, à la pointe de la plume, sont, par ailleurs, de quelques microns de hauteur et de largeur pour donner une section de sortie $b \times l$ de quelques μm^2 (Figure 72).

La pointe de la plume apparaît comme un cantilever parfait, pouvant être comparé à quelques monuments très célèbres, comme la Tour Eiffel ou le Golden Gate, du fait de l'analogie de leurs dimensions ou plutôt de leur rapport d'aspect.

2. Procédé de fabrication

Le procédé de fabrication s'inspire de celui développé pour les prototypes de seconde génération. Le changement de matériau, de la SU-8 vers le polySi, a néanmoins entraîné des modifications. Ce dernier matériau ne s'usinant pas par voie photolithographique, comme la résine SU-8, les étapes de formation de la plume ont été adaptées à ce nouveau matériau. La Figure 73 présente le procédé de fabrication, une fois adapté.

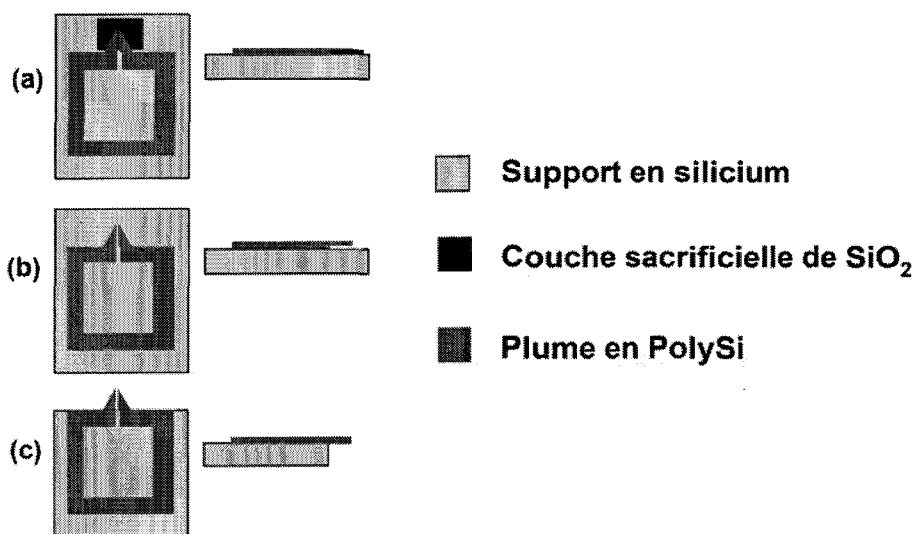


Figure 73 : Procédé de fabrication des plumes de troisième génération réalisées en PolySi.

(a) le support en silicium est pourvu d'un motif en SiO_2 servant de couche sacrificielle pour rehausser la pointe de la plume par rapport au plan du support en silicium ; la plume est formée par attaque sèche d'une couche uniforme de PolySi déposée par LPCVD sur le support en silicium ; (b) la couche sacrificielle de SiO_2 est enlevée par une étape d'attaque humide (HF) ; (c) le support en silicium est clivé au-dessous de la pointe de la plume afin de libérer cette dernière.

Après matérialisation des lignes de clivage sur le support en silicium, une fine couche de matériau sacrificiel est déposée sur le silicium ; il s'agit de dioxyde de silicium, SiO_2 , qui est déposé par voie thermique. Une étape de photolithographie, utilisant une résine positive, suivie d'une attaque humide avec une solution d'acide fluorhydrique laissent un rectangle de dioxyde de silicium sous la future pointe de la plume. Le polySi, non dopé (10^{14} cm^{-3}) est déposé sur le support en silicium

à l'aide de techniques de déposition d'une vapeur chimique (LPCVD pour *Low Pressure Chemical Vapor Deposition*), à 600°C ; une épaisseur homogène de 2 µm environ est ainsi obtenue sur tout le support en silicium. Les motifs constituant la plume sont transférés depuis un masque sur une couche de résine positive photosensible déposée sur le polySi, par des techniques de lithographie classiques. La couche de PolySi subit une attaque sèche, physique, à SF₆ afin de former les constituants de la plume, le réservoir, le microcanal et la fente capillaire. Notons que l'attaque est réalisée par voie physique, ce qui confère des parois verticales aux structures, comme le montre la vue de face agrandie de la pointe de la plume (Figure 72). Une fois la plume formée, le dioxyde de silicium résiduel est enlevé lors d'une étape d'attaque humique avec une solution HF/H₂O 50:50. La pointe de la plume est ensuite libérée et le support en silicium peut être clivé selon les lignes matérialisées, en début de procédé de fabrication, sur le support. La plume d'électronébulisation est terminée.

Dans un premier temps, le nitrure de silicium Si₃N₄ avait été utilisé comme matériau pour réaliser la structure de type plume, à la place du Silicium polycristallin. Ce matériau s'est cependant révélé non adapté : la pointe de la plume était soumise à un stress résiduel qui se traduisait par sa courbure, au-dessus du plan du support et un par endommagement de la qualité de la fente capillaire. Ces problèmes ont été résolus avec l'utilisation du polySi pour réaliser la plume, qui présente moins de contraintes.

Une autre variation a consisté en un traitement de la surface de la plume avec du dioxyde de silicium pour accroître son caractère hydrophile. Comme ce dernier est isolant et que la tension d'ionisation est appliquée par l'intermédiaire du liquide, à travers le support en silicium, la plume ne fonctionnait plus en nanoESI. Après un certain temps et avec l'érosion du SiO₂ suite à une application répétée de la tension, un signal a été observé. Les tests en spectrométrie de masse ont donc été effectués sur des plumes en polySi non traitées et l'idée de traitement hydrophile au SiO₂ a été abandonnée, car ce type de plume nécessite un fil de Pt pour appliquer la tension de façon fiable.

Plusieurs séries de plumes ayant des diverses dimensions ont été fabriquées et testées en spectrométrie de masse ; elles diffèrent entre elles par la longueur de la partie libre de la plume L et les dimensions de la section de sortie b et l . De même que nous l'avions observé pour les prototypes de deuxième génération, les valeurs de ces dimensions sont critiques dans le fonctionnement des plumes en électronébulisation, puisqu'elles régissent le phénomène de capillarité.

3. Tests en spectrométrie de masse : résultats

Les tests en spectrométrie de masse sont réalisés de la même façon que précédemment. Le support de la plume est placé sur le porte-source introduit dans l'entrée du spectromètre de masse. Le contact électrique est soigneusement établi entre le support en silicium de la plume et la zone métallique du porte-source. Une fois le montage prêt, l'ensemble est introduit dans l'entrée de la trappe ionique, l'échantillon chargé et la tension appliquée. Du fait des dimensions très petites de la source, la progression du liquide dans la fente capillaire et la formation du cône de Taylor ne peuvent pas être observées à l'aide de la caméra placée dans la source de la trappe (Figure 74).

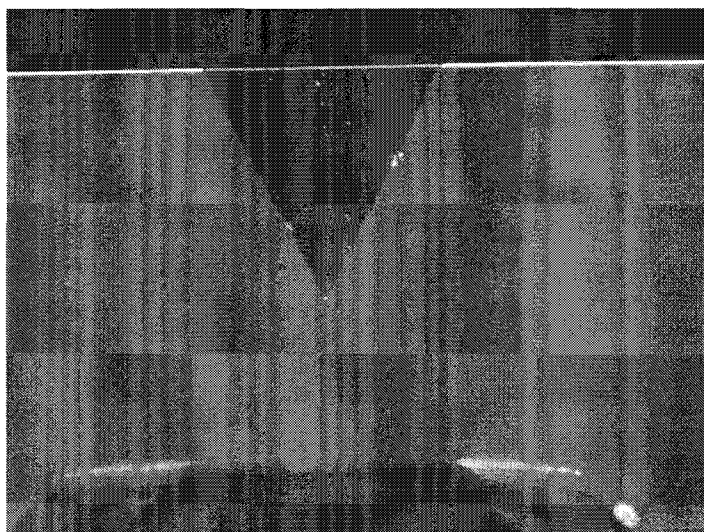


Figure 74 : Photographie d'une pointe de troisième génération ($L= 800 \mu\text{m}$; $b = l \sim 2 \mu\text{m}$) et couverte de SiO_2 , prise dans l'entrée de la trappe ionique

Les tests en électronebulisation de ces plumes en PolySi ont, pour l'instant, été limités à des peptides standard comme le Glu-Fibrinopeptide B. Sa concentration est de $1 \mu\text{M}$ pour tous les tests qui sont présentés ici. La tension nécessaire est inférieure à 1 kV. Pour les premiers tests, nous avons gardé le même solvant de dilution que précédemment, un mélange eau-méthanol 50/50 acidifié avec 0,1 % d'acide formique.

Le spectre de masse présenté en Figure 76 a été obtenu dans ces conditions, avec une solution de Glu-Fibrinopeptide B à $1 \mu\text{M}$; un solvant mi-aqueux mi-organique et une tension d'ionisation de 1 kV. A sa gauche, est présenté le courant ionique total correspondant et enregistré durant une minute (Figure 75). Ces deux graphes ont été obtenus pour le test d'une plume ayant une

longueur L de sa partie libre de $800\ \mu\text{m}$ et une section de sortie de la fente capillaire carrée de $2 \times 2\ \mu\text{m}$.

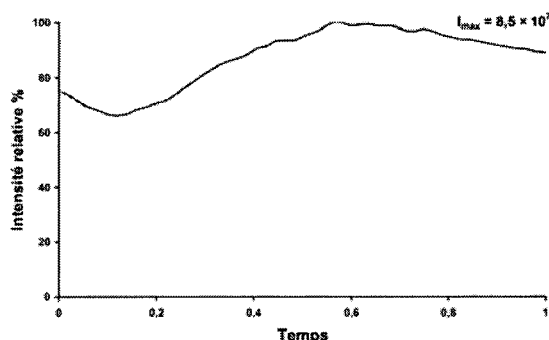


Figure 75 : Courant ionique total enregistré durant une minute pour une plume de troisième génération testés avec une solution de Glu-Fibrinopeptide B à $1\ \mu\text{M}$ et un solvant $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 50/50, 0,1% d'acide formique ; tension d'ionisation de 1 kV.

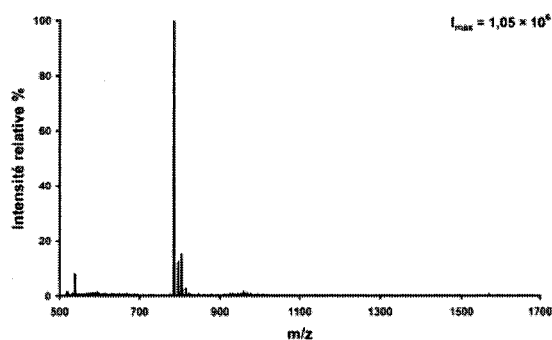


Figure 76 : Spectre de masse correspondant au courant ionique total présenté à gauche ; spectre moyenné sur toute la période d'acquisition (1 min).

Toujours avec la même plume ($L = 800\ \mu\text{m}$, section de $2 \times 2\ \mu\text{m}$), la composition du solvant de dilution a été modifiée en augmentant progressivement sa teneur en eau jusqu'à la valeur de 100% (i.e. plus de méthanol). Ceci nous a permis d'amorcer une étude systématique de la valeur des intensités du spectre de masse et du courant ionique, ainsi que de celle du rapport signal-sur-bruit en fonction de la composition de l'échantillon (% H_2O) et de la valeur de la tension d'ionisation appliquée.

Nous avons pu ainsi observer que ces plumes en silicium polycristallin toléraient une composition de solvant fortement aqueuse et que, globalement, l'augmentation de la teneur en eau du solvant de dilution ne s'accompagnait pas d'une détérioration notable des spectres de masse en termes d'intensité totale et de rapport signal-sur-bruit (Figures 77 et 78).

Nous avons enfin testé les plumes de Silicium polycristallin couvert d'une fine couche de dioxyde de silicium, qui ont des dimensions similaires à celles des plumes testées précédemment. Les premiers tests n'ont pas été concluants du fait que SiO_2 est un isolant : l'application de la tension d'ionisation était gênée. Après érosion partielle de ce revêtement, les tests ont été concluants. Les Figures 79 et 80 ci-dessous représentent le courant ionique total ainsi que le spectre de masse obtenus avec ces plumes pour un échantillon de Glu-Fibrinopeptide B à $1\ \mu\text{M}$ et une tension d'ionisation de 1 kV ; la composition du solvant de dilution est 95% d'eau pour 5% de méthanol avec 0,1 % d'acide formique.

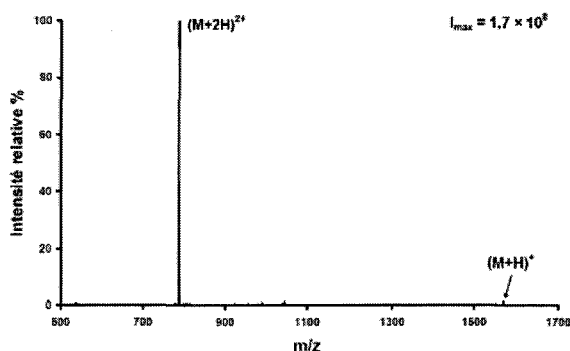


Figure 77 : Spectre de masse moyenné sur 2 min d'acquisition pour une plume en silicium polycristallin.

Solution de Glu-Fibrinopeptide B à 1 μM dans H_2O : MeOH 75/25, 0,1% acide formique ; tension d'ionisation de 0,7 kV.

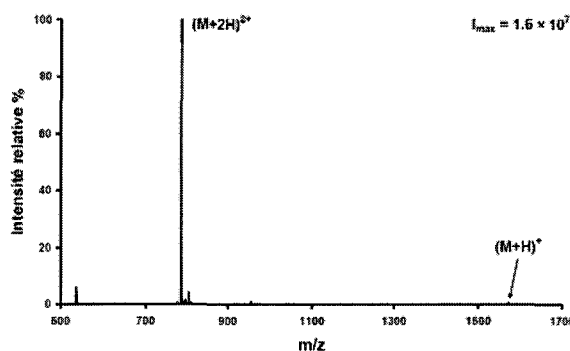


Figure 78 : Spectre de masse moyenné sur 2 min d'acquisition pour une plume en silicium polycristallin.

Solution de Glu-Fibrinopeptide B à 1 μM dans H_2O : MeOH 80/20, 0,1% acide formique ; tension d'ionisation de 1 kV.

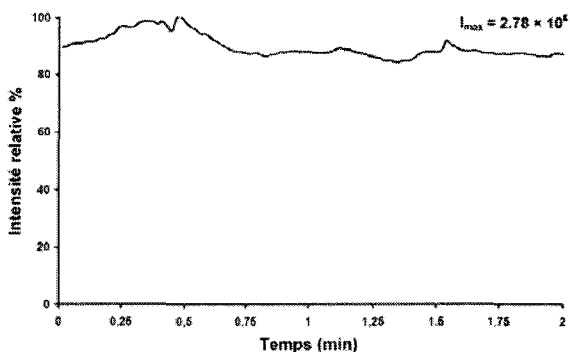


Figure 79 : Courant ionique total enregistré pendant deux minutes pour une plume en silicium polycristallin hydrophile.

Solution de Glu-Fibrinopeptide B à 1 μM dans H_2O : MeOH 95/5, 0,1% acide formique ; tension d'ionisation de 1 kV.

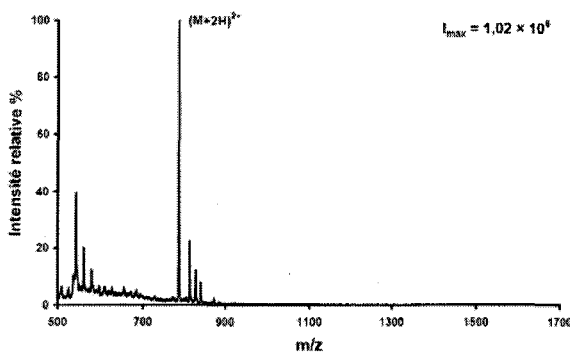


Figure 80 : Spectre de masse moyenné sur 2 min d'acquisition pour une plume en silicium polycristallin hydrophile.

Solution de Glu-Fibrinopeptide B à 1 μM dans H_2O : MeOH 95/5, 0,1% acide formique ; tension d'ionisation de 1 kV.

Le courant ionique total est très stable, comme le montre la Figure 79. Par contre, le spectre de masse présente un rapport signal-sur-bruit un peu moins bon que précédemment, ce qui peut s'expliquer soit pas le revêtement hydrophile et isolant, soit par la forte teneur en H_2O de la solution de dilution.

Sur ces premiers prototypes de troisième génération qui présentent un rapport de dimensions très grand et une section de sortie carrée ($2 \times 2 \mu\text{m}$), les tests en spectrométrie de masse ont été concluants dans la mesure où les spectres de masse obtenus sont beaux et où le rapport signal-sur-bruit est très élevé. Par contre, nous avons pu observer que la fente capillaire ne fonctionnait pas comme souhaité ; il n'y a pas d'effet de capillarité spontané pour les solutions testées. Si le

liquide est forcé à rentrer dans la fente, en l'introduisant manuellement à l'aide d'une micropipette en amont de la fente, il y a capillarité et le liquide passe par la fente. Si, par contre, la solution à tester est simplement déposée dans le réservoir de la plume, le liquide ne rentre pas dans la fente capillaire : il suit la pointe de la plume. Notre système fonctionne alors comme celui décrit par Kameoka et al., composé d'une feuille triangulaire insérée entre le support et le couvercle du microsystème.⁵² Le liquide passe par-dessus la pointe de la plume pour rentrer dans le spectromètre de masse. Les résultats d'analyse sont probants et d'autant plus spectaculaires que la plume est pointue. Les Figures 81 et 82 représentent le courant ionique et le spectre de masse obtenus pour une plume cassée, i.e. une micro-pointe ou une demi-plume. La solution de Glu-Fibrinopeptide B est à 1 μM dans un solvant eau-méthanol 80/20, 0,1 % d'acide formique. La tension d'ionisation n'est que de 0,5 kV, soit moitié moins que celle utilisée en routine en nano-électronébulisation.

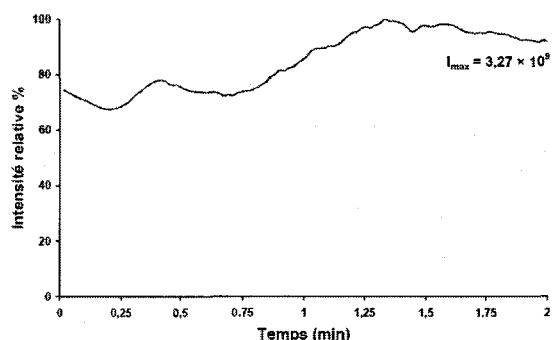


Figure 81 : Courant ionique total enregistré pendant deux minutes pour une pointe (demi-plume) testée avec une solution de Glu-Fibrinopeptide B à 1 μM et un solvant $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 80/20, 0,1% d'acide formique ; tension d'ionisation de 0,5 kV.

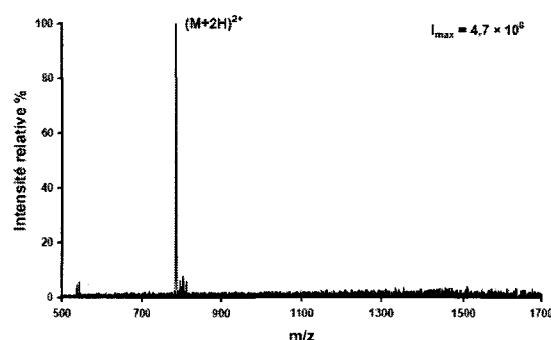


Figure 82 : Spectre de masse correspondant au courant ionique total présenté à gauche ; spectre moyenné sur toute la période d'acquisition (2 min).

Néanmoins, le fonctionnement de ces plumes n'est pas conforme à l'objet que nous voulions réaliser, où le passage du liquide s'effectue par la fente capillaire, cette dernière conditionnant le débit de fluide, la taille des gouttes formées et les conditions d'analyse.

Les dimensions de la fente de la plume ont été changées par la suite pour qu'elles soient compatibles avec le phénomène de capillarité qui alimente la plume en continu et de façon contrôlée. Les dimensions de la section de sortie sont alors une hauteur de 5 μm pour une largeur de la fente de 2,5 μm . Dans ces conditions et en utilisant des mélanges standard eau-méthanol, le remplissage spontané de la fente de la plume par capillarité a été observé sous une loupe binoculaire. Ces objets ont ensuite été testés sur la trappe ionique, dans des conditions analogues

à précédemment, une solution de Glu-Fibrinopeptide B à 1 μM avec des compositions de solvant de dilution à base d'eau et de méthanol variées.

La visualisation des tests grâce à la caméra montée dans l'entrée de la trappe ionique a conforté les premiers tests fluidiques effectués sous la loupe binoculaire ; le liquide passe bien par la fente et non par-dessus la pointe de la plume, comme ce que nous avons observé avec les premières plumes en PolySi.

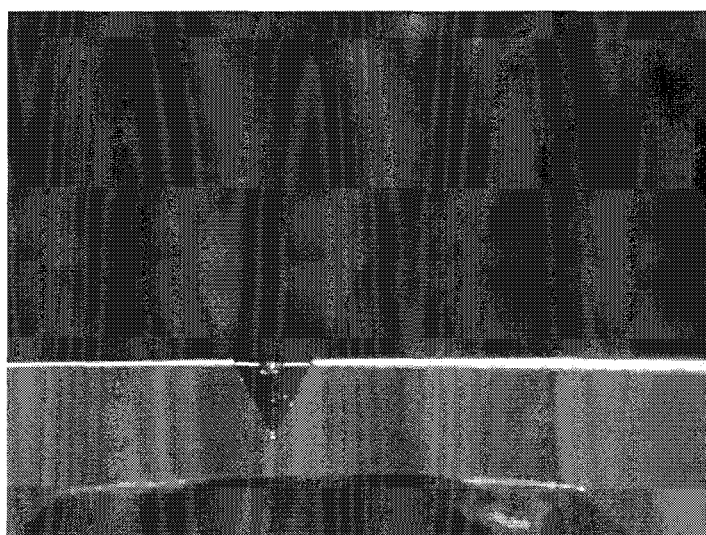


Figure 83 : Photographie d'une plume de troisième génération en PolySi ($L = 275 \mu\text{m}$; $l = 2,5 \mu\text{m}$ et $b = 5 \mu\text{m}$) dans l'entrée du spectromètre de masse.

Les tests en spectrométrie de masse ont été effectués sur une plume ayant une partie libre de 275 μm de longueur L , la section de sortie étant de $2,5 \times 5 \mu\text{m}$ ($l \times b$). La solution de test est un échantillon de Glu-Fibrinopeptide B à 1 μM dans un solvant eau-méthanol 50/50, 0,1 % acide formique, dans un premier temps, puis eau-méthanol 90/10, 0,1 % acide formique. Ces deux solvants de dilution ont d'abord servi pour mesurer les angles de contact que font ces solutions sur une surface de polysilicium ; ils sont respectivement de 55° et 25° . L'effet de capillarité est favorisé avec la solution ayant une teneur en H_2O plus forte, mais l'alimentation en liquide de la plume est moins bien contrôlée et les résultats en spectrométrie de masse moins bons. Les spectres de masse obtenus dans les deux cas de solvants sont présentés ci-dessous en Figures 84 et 85 : l'intensité du spectre de masse est 100 fois plus élevée pour la solution la plus aqueuse.

Les tensions d'ionisation requise pour tester cette plume en PolySi varient entre 0,8 et 1 kV ; en-dessous de 0,8 kV, l'analyse est difficile. Les Figures 86 et 87 présentent le courant ionique total

et le spectre de masse obtenus pour une solution de Glu-Fibrinopeptide B à 1 μM dans eau-méthanol 90/10, 0,1 % acide formique et sous une tension d'ionisation de 0,9 kV.

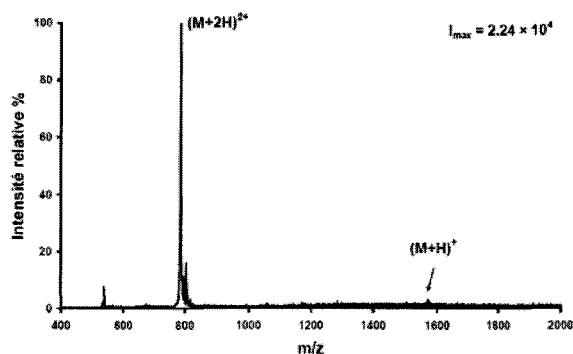


Figure 84 : Spectre de masse obtenu pour une plume en PolySi ayant des dimensions de $L = 275 \mu\text{m}$; $l = 2,5 \mu\text{m}$ et $b = 5 \mu\text{m}$ moyenné sur une durée d'acquisition de 2 minutes. La solution de test est un échantillon de GluFib B à 1 μM dans $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 50/50, 0,1% d'acide formique ; tension d'ionisation de 1 kV.

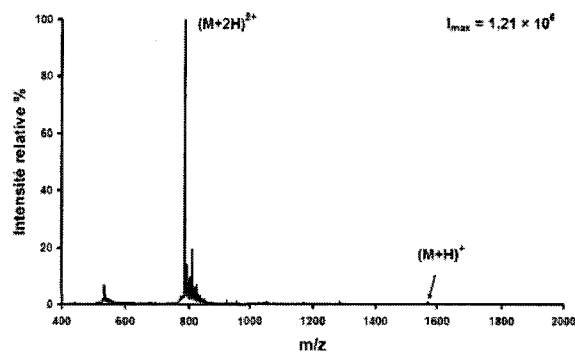


Figure 85 : Spectre de masse obtenu pour une plume en PolySi ayant des dimensions de $L = 275 \mu\text{m}$; $l = 2,5 \mu\text{m}$ et $b = 5 \mu\text{m}$ moyenné sur une durée d'acquisition de 2 minutes. La solution de test est un échantillon de GluFib B à 1 μM dans $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 90/10, 0,1% d'acide formique ; tension d'ionisation de 1 kV.

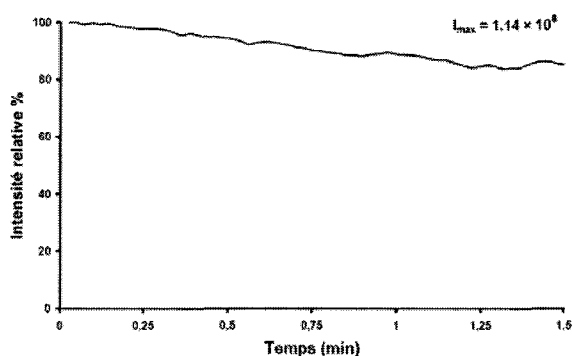


Figure 86 : Courant ionique total enregistré pendant 1,5 minutes sur une plume ($L = 275 \mu\text{m}$; $l = 2,5 \mu\text{m}$; $b = 5 \mu\text{m}$) avec une solution de Glu-Fibrinopeptide B à 1 μM et un solvant $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 90/10, 0,1% d'acide formique ; tension d'ionisation de 0,9 kV.

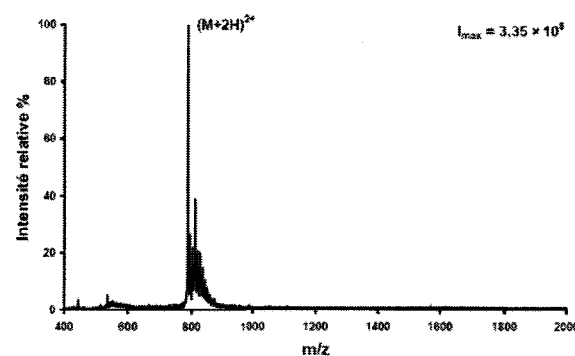


Figure 87 : Spectre de masse correspondant au courant ionique total présenté à gauche ; spectre moyenné sur toute la période d'acquisition (1,5 min).

4. Conclusion

Cette dernière génération de plumes d'électronébulisation, fabriquée selon un autre mode de fabrication et à partir d'autres matériaux apparaît comme plus finalisée. Les dimensions des plumes sont plus petites, proches de nos objectifs initiaux et comparables aux dimensions annoncées par les fournisseurs de capillaires standard. Elles sont un peu l'aboutissement de cette étude sur une interface robuste et fiable pour la nano-électronébulisation avant une analyse par spectrométrie de masse, initiée avec la fabrication et le test de deux générations de prototypes.

Les tests en spectrométrie de masse de ces plumes ont montré leurs performances exceptionnelles en ionisation ; les spectres de masse obtenus sont magnifiques, les valeurs du rapport signal-sur-bruit, même lorsque la teneur en eau de la solution est élevée sont très élevées. Une caractérisation plus poussée de ces plumes s'impose avec l'étude que nous avons projetée, systématique sur les performances en ionisation (intensité du courant ionique, intensité du spectre de masse, rapport signal-sur-bruit) et en analyse en fonction des paramètres de test (valeur de la tension d'ionisation, teneur en eau du solvant de dilution).

Cette génération de plumes a montré également deux régimes de fonctionnement distincts : lorsque les dimensions de la fente ne sont pas compatibles ($2 \times 2 \mu\text{m}$) avec un remplissage spontané de cette dernière par capillarité, le passage du liquide s'effectue par-dessus la pointe, comme s'il n'y avait pas de fente. Le fonctionnement de la plume est alors d'autant meilleur que la plume est pointue et en particulier si elle est « cassée » et dépourvue d'une de ses ailes. Le deuxième mode de fonctionnement est envisageable si les dimensions de la fente capillaire sont compatibles avec un remplissage spontané de cette dernière : le liquide passe par la fente. Ce mode de fonctionnement a été observé pour des plumes ayant une section de sortie de $3 \times 5 \mu\text{m}$.

Notons enfin que deux voies de fabrication/production des plumes ont été explorées, l'une à base de résine SU-8 et l'autre à base de polysilicium. Les deux voies ont leurs avantages et leurs inconvénients. La première donne des objets moins fragiles, mais de dimensions moins finalisées et la deuxième des structures magnifiques, exhibant des performances uniques en spectrométrie de masse mais de fabrication plus longue. Les deux voies de fabrication se prêtent à une production de masse. Ainsi, suivant la voie de fabrication finalement choisie pour réaliser le microsystème et les matériaux retenus, les deux types de plumes pourront-ils aussi bien être utilisés et intégrés sur les dispositifs microfluidiques finaux.

III. Etude et amélioration des phénomènes de nano-électronébulisation

Comme nous l'avons vu en fin de première partie de ce chapitre, le développement de l'interface avec la spectrométrie de masse comporte aussi une étude sur les phénomènes d'électronébulisation ainsi qu'une proposition pour les améliorer. Nous avons ainsi envisagé de stabiliser le nébulisat à l'aide de la méthodologie développée par Charbonnier et al.,⁵⁹ dans un premier temps, et ensuite, d'assister l'ionisation des analytes à l'aide de réactions électrochimiques effectuées dans la source. A cette fin, des plumes d'électronébulisation intègrent des électrodes au niveau de leur réservoir.

La méthode développée par Charbonnier et al. en vue de la stabilisation des phénomènes d'électronébulisation consiste à superposer à la tension d'ionisation un signal alternatif, de faible amplitude et de fréquence proche de celle spontanée et moyenne du signal d'électronébulisation (Figure 88).

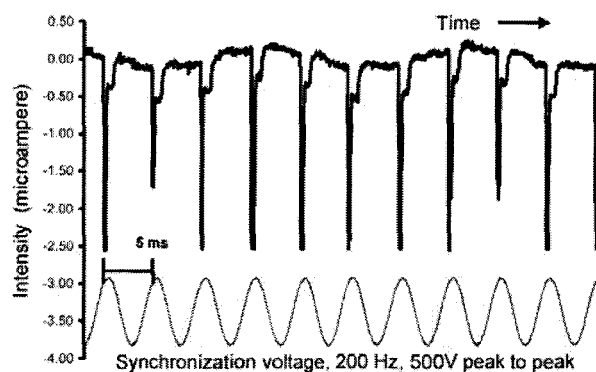


Figure 88 : Principe de la synchronisation du signal de nébulisation (en haut) sur un signal alternatif imposé.

Ce protocole a été repris ici et appliqué à des expériences de nano-électronébulisation. Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à caractériser les signaux de nano-électronébulisation observés avec une source standard et à les synchroniser. Dans un second temps, nous avons appliqué le même procédé à des sources de type plume.

A. Caractérisation et synchronisation : source conventionnelle

L'étude de stabilisation des phénomènes d'électronébulisation commence par leur caractérisation. Avant de procéder à la synchronisation des signaux, il faut d'abord les caractériser afin de savoir quelle fréquence de signal choisir pour la composante de synchronisation ajoutée à la tension d'ionisation.

1. Caractérisation

Les expériences de modélisation portant sur les sources standard sont effectuées sur un capillaire en silice fondue (PicoTip, New Objective). Le débit des solvants (Méthanol 0,1% TFA) est fixé à l'aide d'un pousse-seringue auquel le capillaire d'ionisation est connecté grâce à des raccords standard UpChurch Scientific. Ce raccord 'Tee' sert aussi à l'application de la tension d'ionisation, comme le montre le schéma ci-dessous (Figure 89).

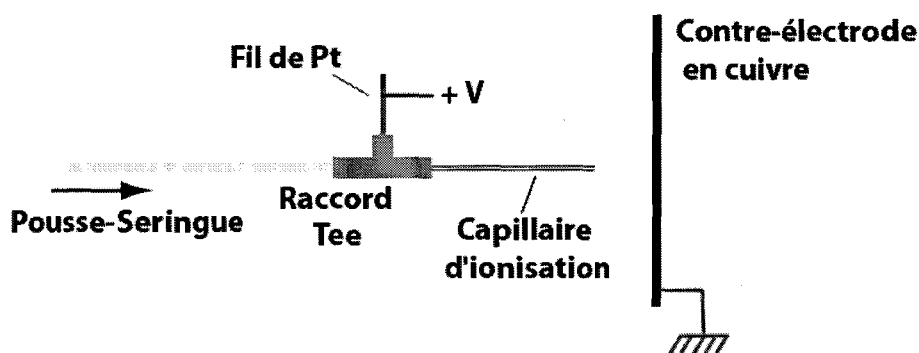


Figure 89: Montage de modélisation des expériences d'électronébulisation : le capillaire d'ionisation est alimenté à un débit fixé par un pousse-seringue. La tension d'ionisation est appliquée sur un fil de Pt. La contre-électrode consiste en une plaque de cuivre.

Le capillaire d'ionisation est placé face et de façon perpendiculaire, à une contre-électrode constituée d'une plaque de cuivre. Ces différents éléments sont inclus dans le montage de modélisation représenté ci-dessous.

La caractérisation des signaux de nano-électronébulisation a été effectuée sans utiliser le générateur de basse fréquence, dans des conditions usuelles de nano-électronébulisation. Elle consiste à déterminer la fréquence du signal de nano-électronébulisation en fonction de divers paramètres de test, tels que la distance entre le capillaire d'ionisation et la contre-électrode, le débit de fluide imposé et la valeur de la tension d'ionisation appliquée sur le capillaire. Le débit de fluide a été gardé constant et égal à 50 nL/min, la distance capillaire/ contre-électrode a varié entre 3 et 6 mm et la tension d'ionisation a balayé une gamme allant de 0,5 à 1,5 kV.

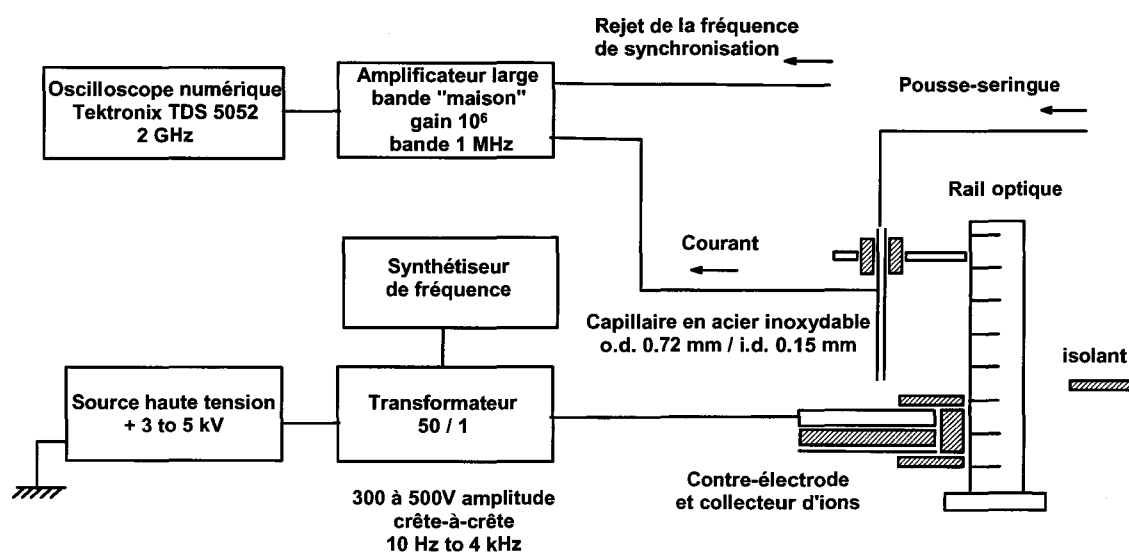


Figure 90 : Schéma de principe du montage de caractérisation et de synchronisation des signaux de nano-électronébulisation.

Le montage global inclut : (i) un générateur de basse fréquence qui fournit le signal de synchronisation, (ii) une source haute tension qui débite la tension d'ionisation, (iii) un oscilloscope numérique sur lequel sont visualisés les différents signaux, (iv) une « boîte noire » qui amplifie le signal de nano-électronébulisation mesuré sur la contre-électrode et le convertit en tension (gain 10^6 , convertisseur courant-tension), pour la suite des expériences, soustrait à ce signal la composante alternative imposée lors de l'électronébulisation et (v) un rail de déplacement uni-directionnel destiné à contrôler le positionnement de la source par rapport à la contre-électrode. Les signaux de nano-électronébulisation mesurés sont enregistrés et visualisés sur un oscilloscope numérique (TDS 5052, Tektronix).

La Figure 91 représente un exemple de signal de nano-électronébulisation observé lors de ces expériences avec un débit de fluide de 50 nL/min, une tension d'ionisation de 0,8 kV, la source étant placée à 5 mm devant la contre-électrode. Le signal est pulsé et de fréquence moyenne calculée égale à 1,7 kHz.

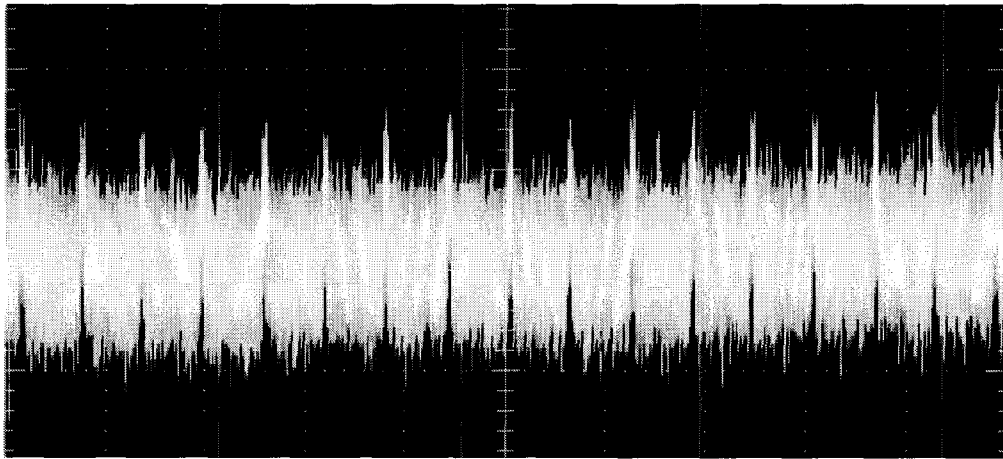


Figure 91 : Signal de nano-électronébulisation enregistré lors d'une expérience sur table avec un capillaire standard porté à une tension de 0,8 kV, le débit de fluide étant de 50 nL/min et la distance entre le capillaire et la contre-électrode de 5 mm.

La fréquence moyenne de ce signal est de 1,7 kHz.

Lors de ces expériences de caractérisation des signaux de nano-électronébulisation, nous avons observé deux régimes distincts dans la dépendance de la fréquence du signal de nanoESI à la tension d'ionisation appliquée, et ce, quelle que soit la distance entre la capillaire d'ionisation et la contre-électrode. La Figure 92 ci-dessus représente cette dépendance pour des tensions d'ionisation variant entre 0,5 et 1,5 kV environ. Ces deux régimes sont séparés par une valeur seuil de la tension d'ionisation qui varie selon la distance capillaire / contre-électrode. Le premier régime observé, pour une tension d'ionisation inférieure à la tension seuil correspond à une fréquence de nano-électronébulisation dans une gamme allant de 0,5 à 5 kHz. Cette zone du graphe est agrandie et montrée en encart de la Figure 85. Le deuxième régime, obtenu pour des valeurs de la tension supérieures à la tension-seuil, correspond à des fréquences de l'ordre de 50 kHz, comme le montre le graphe ci-dessous. Ces observations corrént avec les modes observés pour les phénomènes d'ionisation et décrit par Cloupeau et al..⁷⁰ Le premier régime correspond au mode mono-cône du nébulisat et le deuxième au mode multi-cône.

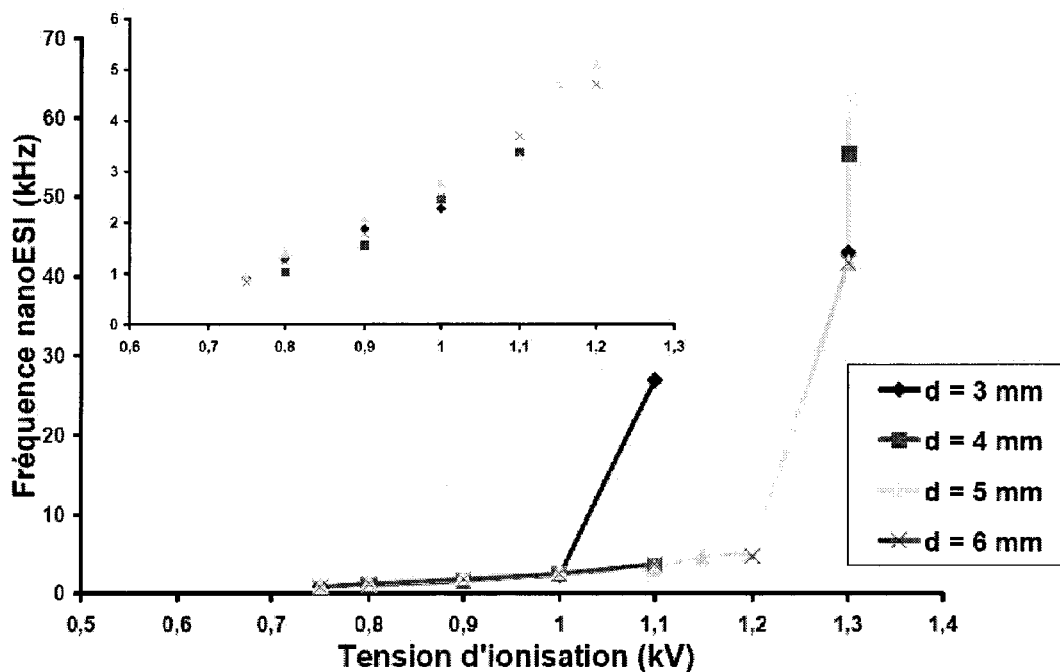


Figure 92 : Caractérisation des phénomènes de nano-électronébulisation.

Variation et dépendance de la fréquence du signal de nano-électronébulisation en fonction de la tension d'ionisation appliquée sur le capillaire, pour différentes valeurs de la distance entre le capillaire et la contre-électrode de cuivre.

En encart : Agrandissement de la zone de basse fréquence du signal de nano-électronébulisation (0,5 à 5 kHz) correspondant à des « faibles » valeurs de la tension d'ionisation ».

2. Synchronisation

La deuxième étape de ce travail est d'utiliser les résultats de caractérisation pour la stabilisation du nébulisat. Ces données aident à sélectionner la valeur de la fréquence du signal alternatif à ajouter à la tension d'ionisation.

Dans un premier temps, la fréquence du signal de nano-électronébulisation est déterminée (valeur moyenne). Un signal alternatif à cette fréquence est ajouté à la tension d'ionisation. La synchronisation et la stabilisation du signal de nano-électronébulisation sont atteintes en faisant varier la valeur de la fréquence du signal alternatif autour de celle choisie initialement.

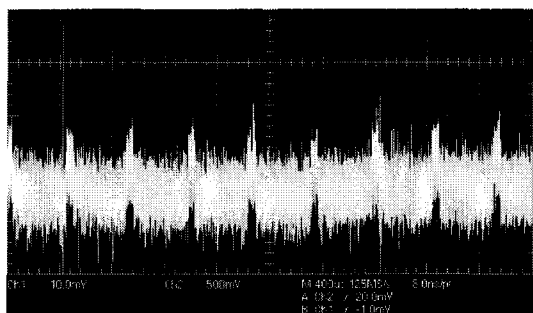


Figure 93 : Signal de nano-électronébulisation observé pour une tension d'ionisation de 0,9 kV, un débit de fluide de 50 nL/min et une distance capillaire/ contre-électrode de 5 mm. La fréquence moyenne est de 1,6 kHz.

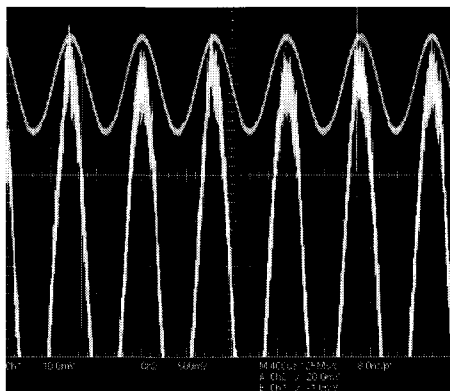


Figure 94 : Synchronisation de ce signal de nano-électronébulisation à l'aide d'un signal alternatif de fréquence proche de 1,6 kHz (bleu). Le signal de nanoESI (jaune) se cale sur les maxima du signal alternatif (bleu).

La Figure 93 représente le signal pulsé de nano-électronébulisation enregistré pour une tension de 0,9 kV, une distance de 5 mm entre le capillaire d'ionisation et la contre-électrode et un débit de fluide de 50 nL/min. La fréquence moyenne de ce signal pulsé est mesurée égale à 1,6 kHz. Le signal alternatif ajouté à la tension d'ionisation a alors une fréquence égale à 1,6 kHz. Cette fréquence est modifiée sur le générateur de basse fréquence jusqu'à ce que l'on observe la synchronisation des deux signaux, celui alternatif et celui de nano-électronébulisation, sur l'oscilloscope. La Figure 94 montre la synchronisation du signal de nano-électronébulisation (jaune) de la Figure 93 sur un signal alternatif (bleu).

3. Conclusion

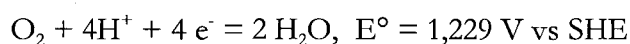
Nous avons tout d'abord caractérisé les signaux de nano-électronébulisation obtenus avec un capillaire standard d'ionisation. Les courbes de caractérisation de la fréquence de ce signal en fonction de la tension d'ionisation appliquée révèle l'existence de deux régimes qui correspondent aux deux modes de nano-électronébulisation décrits par Cloupeau et al., les modes de mono- et de multi-cône.

Ces données de caractérisation ont ensuite servi à la synchronisation du signal de nano-électronébulisation et à sa stabilisation, pour lesquelles nous avons obtenu des résultats préliminaires. Ces résultats doivent encore être étendus à des sources plumes telles que nous avons développées au cours de ce travail de thèse et la synchronisation des signaux d'électronébulisation doit être intégrée sur un microsystème fluidique.

B. Electrochimie

Trois types de processus électrochimiques mis en jeu lors de l'ESI : l'oxydation ou la réduction du solvant, la corrosion des électrodes (celle d'application de HV en particulier) et l'oxydation ou la réduction des analytes. Ces différents phénomènes peuvent être exploités afin d'améliorer et de mieux contrôler les processus d'électronébulisation et d'ionisation en résultant. Deux voies d'aide ou d'assistance à l'ionisation et reposant sur des processus électrochimiques peuvent être envisagées ; elles mettent en jeu des réactions de nature différente.

La première voie d'assistance à l'électronébulisation consiste à promouvoir l'ionisation et de ce fait, à augmenter le rendement d'ionisation. Les processus électrochimiques mis en jeu touchent les molécules de solvant. En mode positif, l'oxydation de H₂O sur l'anode conduit à la production de protons H⁺, selon la réaction suivante :



L'augmentation de la concentration en protons se traduit par une acidification du milieu, qui est, en théorie, dépendante du débit de liquide dans la source d'ionisation.

$$[H^+]_{ESI} = \frac{i_{ESI}}{nFv_f}$$

Où $[H^+]_{ESI}$ représente la concentration de protons produite par voie électrochimique lors de l'électronébulisation, i_{ESI} le courant d'électronébulisation, n le nombre de moles mis en jeu au cours des processus oxydatifs, F la constante de Faraday et v_f le débit de fluide volumétrique dans la source d'ionisation. Plus le débit de fluide est bas, plus la quantité de protons formée par oxydation de l'eau est grande.

L'augmentation de la concentration en protons dans le milieu favorise les processus de protonation des espèces et un plus grand nombre d'ions sont injectés dans le spectromètre de masse pour leur analyse ; il en résulte globalement une élévation du rendement d'ionisation. L'augmentation du rendement d'ionisation sera d'autant marquée que le débit de fluide sera bas.

La deuxième voie d'assistance à l'ionisation met en jeu les analytes. La technique d'analyse de spectrométrie de masse se limite à des espèces ionisables facilement et ne s'applique pas à des espèces neutres ne comportant pas de site d'ionisation. L'introduction d'étapes électrochimiques

Chapitre 3: *Interface avec la spectrométrie de masse*

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM

en amont de l'analyse par spectrométrie de masse conduit à la formation d'espèces oxydées ou réduites, qui sont elles ionisables et détectables par spectrométrie de masse.

REFERENCES

- [1] Fenn, John B.; Mann, Matthias; Meng, Chin Kai; Wong, Shek Fu; Whitehouse, Craig M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (Washington, DC, United States)* **1989**, *246*, 64-71.
- [2] Wilm, Matthias; Mann, Matthias. Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 1-8.
- [3] Juraschek, Reinhard; Dulcks, Thomas; Karas, Michael. Nanoelectrospray-more than just a minimized-flow electrospray ionization source. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10*, 300-308.
- [4] Constantopoulos, Terri L.; Jackson, George S.; Enke, Christie G. Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10*, 625-634.
- [5] Valaskovic, Gary A.; Kelleher, Neil L.; Little, Daniel P.; Aaserud, David J.; McLafferty, Fred W. Attomole-Sensitivity Electrospray Source for Large-Molecule Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 3802-3805.
- [6] Valaskovic, Gary A.; Kelleher, Neil L.; McLafferty, Fred W. Attomole protein characterization by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Science (Washington, D. C.)* **1996**, *273*, 1199-1202.
- [7] Valaskovic, Gary A.; McLafferty, Fred W. Long-lived metalized tips for nanoliter electrospray mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, *7*, 1270-1272.
- [8] Nilsson, Stefan; Svedberg, Malin; Pettersson, Jean; Bjoerefors, Fredrik; Markides, Karin; Nyholm, Leif. Evaluations of the Stability of Sheathless Electrospray Ionization Mass Spectrometry Emitters Using Electrochemical Techniques. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 4607-4616.
- [9] Feng, B.; Smith, R. D. A simple nanoelectrospray arrangement with controllable flowrate for mass analysis of submicroliter protein samples. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *11*, 94-99.
- [10] Alexander, James N.; Schultz, Gary A.; Polil, Janet B. Development of a nano-electrospray mass spectrometry source for nanoscale liquid chromatography and sheathless capillary electrophoresis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12*, 1187-1191.
- [11] Barnidge, David R.; Nilsson, Stefan; Markides, Karin E. A Design for Low-Flow Sheathless Electrospray Emitters. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 4115-4118.
- [12] Barnidge, David R.; Nilsson, Stefan; Markides, Karin E.; Rapp, Hakan; Hjort, Klas. Metallized sheathless electrospray emitters for use in capillary electrophoresis orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 994-1002.
- [13] Goss, Charles A.; Charych, Deborah H.; Majda, Marcin. Application of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane as a molecular adhesive in the fabrication of vapor-deposited gold electrodes on glass substrates. *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 85-88.
- [14] Kriger, M. Scott; Cook, Kelsey D.; Ramsey, Roswitha S. Durable Gold-Coated Fused Silica Capillaries for Use in Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 385-389.
- [15] Maziarz, E. P.; Lorenz, S. A.; White, T. P.; Wood, T. D. Polyaniline: a conductive polymer coating for durable nanospray emitters. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *11*, 659-663.
- [16] Wood, Troy D.; Lorenz, Sarah A.; Maziarz, E. Peter, III. Polyaniline-coated nanospray emitters: a route to low-flow separations mass spectrometry. *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering* **2000**, *3926*, 79-86.
- [17] Wood, Troy D.; Maziarz, Peter E., III; Lorenz, Sarah A.; White, Thomas P., in *PCT Int. Appl.*, (The Research Foundation of State University of New York, USA). Wo, **2001**, p. 39 pp.
- [18] White, Thomas P.; Wood, Troy D. An alternative emitter for low-flow electrospray ionization. *American Biotechnology Laboratory* **2002**, *20*, 16, 18.
- [19] Bigwarfe, Paul M., Jr.; White, Thomas P.; Wood, Troy D. Polyaniline-coated nanoelectrospray emitters: performance characteristics in the negative ion mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 2266-2272.
- [20] White, Thomas P.; Wood, Troy D. Reproducibility in Fabrication and Analytical Performance of Polyaniline-Coated Nanoelectrospray Emitters. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3660-3665.
- [21] Wood, Troy D.; Bigwarfe, Paul M., Jr.; Smith, Douglas R.; White, Thomas P. Nanoelectrospray using polyaniline-coated emitters. *Abstracts of Papers, 225th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, March 23-27, 2003* **2003**, ANYL-223.

- [22] Zhu, Xiaofeng; Thiam, Serigne; Valle, Bertha C.; Warner, Isiah M. A Colloidal Graphite-Coated Emitter for Sheathless Capillary Electrophoresis/Nanoelectrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 5405-5409.
- [23] Wetterhall, Magnus; Nilsson, Stefan; Markides, Karin E.; Bergquist, Jonas. A Conductive Polymeric Material Used for Nanospray Needle and Low-Flow Sheathless Electrospray Ionization Applications. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 239-245.
- [24] Nilsson, Stefan; Wetterhall, Magnus; Bergquist, Jonas; Nyholm, Leif; Markides, Karin E. A simple and robust conductive graphite coating for sheathless electrospray emitters used in capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, *15*, 1997-2000.
- [25] Chang, Yan Zin; Her, Guor Rong. Sheathless Capillary Electrophoresis/Electrospray Mass Spectrometry Using a Carbon-Coated Fused-Silica Capillary. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 626-630.
- [26] Chang, Yan Zin; Chen, Yet Ran; Her, Guor Rong. Sheathless capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry using a carbon-coated tapered fused-silica capillary with a beveled edge. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5083-5087.
- [27] Hannis, James C.; Muddiman, David C. Nanoelectrospray mass spectrometry using non-metalized, tapered (50 μm) fused-silica capillaries. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12*, 443-448.
- [28] Ishihama, Yasushi; Katayama, Hiroyuki; Asakawa, Naoki; Oda, Yoshiya. Highly robust stainless steel tips as microelectrospray emitters. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 913-918.
- [29] Ramsey, R. S.; Ramsey, J. M. Generating Electrospray from Microchip Devices Using Electroosmotic Pumping. *analytical chemistry* **1997**, *69*, 1174-1178.
- [30] Xue, Qifeng; Foret, Frantisek; Dunayevskiy, Yuri M.; Zavracky, Paul M.; McGruer, Nicol E.; Karger, Barry L. Multichannel Microchip Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 426-430.
- [31] Zhang, B.; Liu, H.; Karger, B. L.; Foret, F. Microfabricated Devices for Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 3258-3264.
- [32] Figeys, Daniel; Gygi, Steven P.; McKinnon, Graham; Aebersold, Ruedi. An Integrated Microfluidics-Tandem Mass Spectrometry System for Automated Protein Analysis. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 3728-3734.
- [33] Figeys, Daniel; Aebersold, Ruedi. Nanoflow Solvent Gradient Delivery from a Microfabricated Device for Protein Identifications by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 3721-3727.
- [34] Figeys, Daniel; Ning, Yuebin; Aebersold, Ruedi. A microfabricated device for rapid protein identification by microelectrospray ion trap mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 3153-3160.
- [35] Figeys, Daniel; Lock, Chris; Taylor, Lorne; Aebersold, Ruedi. Microfabricated device coupled with an electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometer: protein identifications based on enhanced-resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry data. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12*, 1435-1444.
- [36] Pinto, Devanand M.; Ning, Yuebin; Figeys, Daniel. An enhanced microfluidic chip coupled to an electrospray Qstar mass spectrometer for protein identification. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 181-190.
- [37] Bings, Nicolas H.; Wang, Can; Skinner, Cameron D.; Colyer, Christa L.; Thibault, Pierre; Harrison, D. Jed. Microfluidic devices connected to fused-silica capillaries with minimal dead volume. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 3292-3296.
- [38] Li, Jianjun; Thibault, Pierre; Bings, Nicolas H.; Skinner, Cameron D.; Wang, Can; Colyer, Christa; Harrison, Jed. Integration of Microfabricated Devices to Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry Using a Low Dead Volume Connection: Application to Rapid Analyses of Proteolytic Digests. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 3036-3045.
- [39] Zhang, Bailin; Foret, Frantisek; Karger, Barry L. A microdevice with integrated liquid junction for facile peptide and protein analysis by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 1015-1022.
- [40] Xue, Qifeng; Dunayevskiy, Yuri M.; Foret, Frantisek; Karger, Barry L. Integrated multichannel microchip electrospray ionization mass spectrometry: analysis of peptides from on-chip tryptic digestion of melittin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 1253-1256.
- [41] Liu, Hanghui; Felten, Chantal; Xue, Qifeng; Zhang, Bailin; Jedrzejewski, Paul; Karger, Barry L.; Foret, Frantisek. Development of multichannel devices for high-throughput mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3303-3310.
- [42] Lin, Liwei; Pisano, Albert P. Silicon-processed microneedles. *IEEE Journal of Microelectromechanical systems* **1999**, *8*, 78-84.

- [43] Desai, Amish; Tai, Yu-Chong; Davis, Michael T.; Lee, Terry D. A MEMS electro spray nozzle for mass spectroscopy. *Transducers 97, International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Chicago, June 16-19, 1997* **1997**, 2, 927-930.
- [44] Licklider, Larry; Wang, Xuan-Qi; Desai, Amish; Tai, Yu-Chong; Lee, Terry D. A micromachined chip-based electro spray source for mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **72**, 367-375.
- [45] Licklider, Larry; Wang, Xuan-Qi; Desai, Amish; Tai, Yu-Chong; Lee, Terry D. A Micromachined Chip-Based Electro spray Source for Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 367-375.
- [46] Schultz, Gary A.; Corso, Thomas N.; Prosser, Simon J.; Zhang, Sheng. A Fully Integrated Monolithic Microchip Electro spray Device for Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 4058-4063.
- [47] Griss, Patrick; Melin, Jessica; Sjoedahl, Johan; Roeraade, Johan; Stemme, Goeran. Development of micromachined hollow tips for protein analysis based on nanoelectro spray ionization mass spectrometry. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2002**, 12, 682-687.
- [48] Sjoedahl, Johan; Melin, Jessica; Griss, Patrick; Emmer, Asa; Stemme, Goran; Roeraade, Johan. Characterization of micromachined hollow tips for two-dimensional nanoelectro spray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, 17, 337-341.
- [49] Griss, Patrick; Stemme, Goeran. Novel, side opened out-of-plane microneedles for microfluidic transdermal interfacing. *IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Technical Digest, 15th, Las Vegas, NV, United States, Jan. 20-24, 2002* **2002**, 467-470.
- [50] Tang, Keqi; Lin, Yuche; Matson, Dean W.; Kim, Taeman; Smith, Richard D. Generation of multiple electro sprays using microfabricated emitter arrays for improved mass spectrometric sensitivity. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 1658-1663.
- [51] Yuan, Cheng-Hui; Shiea, Jentaie. Sequential Electro spray Analysis Using Sharp-Tip Channels Fabricated on a Plastic Chip. *analytical chemistry* **2001**, 73, 1080-1083.
- [52] Kameoka, Jun; Orth, Reid; Ilic, Bojan; Czaplewski, David; Wachs, Tim; Craighead, H. G. An electro spray ionization source for integration with microfluidics. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 5897-5901.
- [53] Kim, J. S.; Knapp, D. R. Microfabrication of polydimethylsiloxane electro spray ionization emitters. *Journal of Chromatography, A* **2001**, 924, 137-145.
- [54] Kim, J. S.; Knapp, D. R. Microfabricated PDMS multichannel emitter for electro spray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, 12, 463-469.
- [55] Kim, Jin-Sung; Knapp, Daniel R. Miniaturized multichannel electro spray ionization emitters on poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices. *Electrophoresis* **2001**, 22, 3993-3999.
- [56] Gobry, Veronique; Van Oostrum, Jan; Martinelli, Marco; Rohner, Tatiana C.; Reymond, Frederic; Rossier, Joel S.; Girault, Hubert H. Microfabricated polymer injector for direct mass spectrometry coupling. *Proteomics* **2002**, 2, 405-412.
- [57] Rossier, Joel S.; Youhnovski, Nikolay; Lion, Niels; Damoc, Eugen; Becker, Susanne; Reymond, Frederic; Girault, Hubert H.; Przybylski, Michael. Thin-chip micro spray system for high-performance Fourier-transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry of biopolymers. *Angewandte Chemie, International Edition* **2003**, 42, 54-58.
- [58] Rohner, Tatiana C.; Rossier, Joel S.; Girault, Hubert H. Polymer micro spray with an integrated thick-film microelectrode. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 5353-5357.
- [59] Charbonnier, Florence; Berthelot, Ludovic; Rolando, Christian. Differentiating between capillary and counter-electrode processes during Electro spray Ionization by Opening the Short-Circuit at the collector. *Analytical Chemistry* **1999**, 71, 1585-1591.
- [60] Lin, Che-Hsin; Lee, Gwo-Bin; Chang, Bao-Wen; Chang, Guan-Liang. A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photoresist. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2002**, 12, 590-597.
- [61] Zhang, J.; Tan, K. L.; Hong, G. D.; Yang, L. J.; Gong, H. Q. Polymerization optimization of SU-8 photoresist and its applications in microfluidic systems and MEMS. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2001**, 11, 20-26.
- [62] Arscott, Steve; Le Gac, Severine; Druon, Christian; Tabourier, Pierre; Rolando, Christian. A planar micro-nib interface for NanoESI-MS microfluidic applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2004**, 14, 310-316.
- [63] Le Gac, Severine; Cren-Olive, Cecile; Rolando, Christian; Arscott, Steve. A novel nib-like design for microfabricated nanospray tips. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, 15, 409-412.

- [64] Zhan, Dongliang; Fenn, John B. Gas phase hydration of electrospray ions from small peptides. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *219*, 1-10.
- [65] Arscott, Steve; Le Gac, Severine; Druon, Christian; Tabourier, Pierre; Rolando, Christian. A micro-nib nanoelectrospray source for mass spectrometry. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2004**, *98*, 140-147.
- [66] Le Gac, Severine; Arscott, Steve; Rolando, Christian. A planar microfabricated nanoelectrospray emitter tip based on a capillary slot. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3640-3647.
- [67] Le Gac, Severine; Arscott, Steve; Rolando, Christian. A robust microfabricated nib-like nanoelectrospray emitter tip on a conducting substrate. *Analytical Chemistry* **2004**, *submitted*.
- [68] Tang, Liang; Kebarle, Paul. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 3654-3668.
- [69] Cech, Nadja B.; Krone, Jennifer R.; Enke, Christie G. Predicting electrospray response from chromatographic retention time. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 208-213.
- [70] Cloupeau, Michel; Prunet-Foch, Bernard. Electrohydrodynamic spraying functioning modes: a critical review. *Journal of Aerosol Science* **1994**, *25*, 1021-1036.

Conclusion

I. Dispositif ESI : choix technologiques

Le but premier de ce travail était de concevoir et de fabriquer des microsystèmes intégrés opérationnels et originaux pour une analyse protéomique par spectrométrie de masse. Le projet global vise au développement de deux dispositifs distincts dédiés à deux modes d'ionisation, par électronébulisation ou par désorption laser, avant l'analyse par spectrométrie de masse. Ce travail a finalement concerné principalement le développement d'un seul dispositif, celui dédié à une analyse par électronébulisation et spectrométrie de masse. A priori, les développements effectués pour ce dispositif ne sont pas aisément transposables à l'autre dispositif puisque le mode de fonctionnement et en particulier le mode de déplacement des liquides envisagés pour les deux dispositifs sont radicalement différents. Par conséquent, le même principe de base n'est pas applicable pour la mise en œuvre des différents modules opérationnels.

Le dispositif dédié à une analyse par électronébulisation comporte plusieurs briques élémentaires, les modules principaux assurant le traitement des échantillons et l'interface avec l'électronebulisation et le spectromètre de masse. Le mode de pompage des liquides est continu ; il n'a pas été décrit en détails dans ce manuscrit puisqu'il fait l'objet du travail de recherche d'un autre doctorant dans le laboratoire de microtechnologie (IEMN). Ce mode de déplacement des liquides sous forme de colonnes continues conditionne la réalisation des modules opérationnels.

II. Module chromatographique

Pour le traitement des échantillons, une première étape envisagée consiste en une opération de dessalage et de concentration des analytes afin d'optimiser les conditions d'analyse par ESI-SM. A cette fin, nous avons développé et mis au point des phases stationnaires monolithiques de nature macromoléculaire qui sont préparées par photopolymérisation, in situ, dans les microcanaux ou des capillaires. Ces monolithes sont particulièrement appropriés dans ce contexte microfluidique du fait de la versatilité de leurs propriétés physico-chimiques et de leur facilité de préparation dans des microcanaux, y compris de façon locale. Des phases hydrophobes ont été préparées ; elles sont dédiées à un simple dessalage des échantillons (phases en C4) ou alors à la séparation des composés contenus dans l'échantillon à analyser (phases en C12). Ces phases ont été mises au point, dans un premier temps, dans un format capillaire, les capillaires utilisés étant transparents aux irradiations UVs et ayant un diamètre interne de 75 μm .

Une étude approfondie de plusieurs phases en C12, préparées à base de méthacrylate de lauryl et de diméthacrylate d'éthylène introduits dans un rapport molaire 65/35, nous ont permis de

Conclusion

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM

définir la composition d'un porogène ou solvant de polymérisation adéquat, donnant des propriétés de porosité souhaitées en terme de micro- et de macroporosité pour des applications séparatives. Ces phases monolithiques ont été caractérisées en termes de porosité et de morphologie à l'aide de diverses techniques (mesure de perte de charge, porométrie (en cours), observation au microscope électronique). Les tests en séparation de ces diverses phases monolithiques ont été effectués en couplage nanoLC-SM sur un échantillon modèle, un digestat commercial de cytochrome c . La caractérisation physique a corroboré nos observations en séparation. Nous avons alors choisi un porogène constitué de cyclohexanol et d'éthylène glycol introduits dans un rapport volumique 80/20.

Une fois cette phase intéressante pour des applications séparatives définie, une étude plus poussée portant sur les paramètres géométriques de la colonne (sa longueur, son diamètre interne) et sur les conditions de tests a été envisagée afin de regarder l'influence de ces divers paramètres sur les performances en séparation des colonnes monolithiques. Ainsi, plusieurs colonnes de longueurs égales à 8, 16, 24 et 32 cm ont-elles été préparées conjointement. Elles ont été testées sur le même échantillon de Cyt C, injecté à raison de 0,08 à 800 fmol, en utilisant deux gradients avec une montée lente (en 40 min) ou rapide (30 min) en acétonitrile. Tout d'abord, la préparation de colonnes beaucoup plus longues n'entraîne pas d'augmentation importante de la perte de charge. En outre, leur pouvoir séparatif est accru, y compris pour des échantillons contenant très peu de matériel, jusqu'à 0,8 fmol.

La transposition des phases monolithiques d'un support capillaire à des microcanaux a été ensuite abordée. Des phases monolithiques en C4 et en C12 ont été préparées avec succès dans des microcanaux fabriqués en résine SU-8 à l'aide de techniques de photolithographie. Les premiers tests de ces phases monolithiques ont montré que le passage d'un capillaire à un microcanal n'était pas si trivial : les dimensions des colonnes ne sont pas les mêmes, elles sont beaucoup plus courtes et plus larges qu'en format capillaire.

L'optimisation de l'étape de dessalage sur une phase monolithique intégrée dans un microsystème est en cours. Elle comprend le choix d'une phase appropriée pour ces applications de dessalage en termes de degré de réticulation et de fonctionnalité. De plus, le protocole doit être adapté au format du microsystème, par rapport aux supports usuels commerciaux.

Par ailleurs, l'étude physico-chimique des phases monolithiques doit être complétée par des mesures de porométrie ou de porosimétrie pour avoir une idée plus précise de la taille des

différents pores et de leur répartition au sein du matériau. Un autre point à vérifier est la morphologie du matériau entre différentes colonnes de longueurs variées : la mesure de la perte de charge aux bornes de la colonne semble montrer que la porosité de la colonne la plus longue est moindre.

III. Digestion

Une autre étape de traitement des échantillons envisagée est la digestion des protéines en un mélange de peptides. Cette opération peut être réalisée en amont du module chromatographique de dessalage ou de séparation des solutions d'analytes. Le même type de phases monolithiques a été utilisé. Elles servent de support solide pour l'immobilisation covalente de l'enzyme protéolytique, la trypsine, habituellement utilisée dans le protocole protéomique.

La digestion est efficace, même avec un temps de séjour court dans le microréacteur monolithique. Néanmoins, l'influence non négligeable de ce temps de séjour sur le processus de digestion a été observée : à court temps de séjour, les peptides issus de la digestion sont plus longs et présentent des sites de clivage ignorés alors qu'à temps de séjour plus long, les peptides obtenus sont plus courts et ne comportent pas de site de clivage manqué. En outre, le dessalage des digestats ou mélanges de peptides issus de la digestion, s'est révélé nécessaire pour une analyse par spectrométrie de masse optimale.

IV. Interface avec l'ESI-SM

Le dernier module de ce dispositif étudié au cours de ce travail est l'interface avec la spectrométrie de masse, qui se présente sous forme d'une source d'ionisation. La source d'ionisation est usuellement un capillaire en verre ou en silice fondue, qui rappelle des aiguilles. L'utilisation d'une telle source pour coupler un microsystème à un spectromètre de masse apparaît non optimisée. L'intégration de la source sur le microsystème et sa fabrication à l'aide de techniques de microtechnologie constituent une alternative préférable.

Une étude sur la géométrie de la source intégrée a montré que concevoir un nouveau type de sources prévalait à copier et à adopter un profil de type aiguille en fabriquant des sources ayant une géométrie rappelant celle d'une cheminée. La source intégrée sur le microsystème a une forme et un mode de fonctionnement proche de celui des plumes de calligraphie.

Au cours de ce travail, plusieurs séries de plumes d'électronébulisation ont été fabriquées en résine SU-8. Elles ont été testées en infusion sur différents types d'échantillons. La première série

Conclusion

Développements de microsystèmes fluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM

de plumes, dont les dimensions étaient encore fort grossières, a conforté notre idée de plume d'électronébulisation et les tests préliminaires de plumes commerciales. La deuxième série de plumes a conduit à une amélioration du fonctionnement et des performances de ces objets. Ces deux générations nous ont aussi permis de mieux appréhender quels paramètres, notamment géométriques, étaient cruciaux pour le fonctionnement et le régime de fonctionnement des plumes d'électronébulisation.

A la fin de ce travail, une dernière série de plumes a été fabriquée, à base de silicium polycristallin. Les dimensions de ces plumes sont plus proches du micron, ce qui conduit à une amélioration spectaculaire de leurs performances en électronébulisation et en ionisation. Leurs tests ont néanmoins montré que les dimensions de la fente capillaire et de la pointe influent sur le mode de fonctionnement des plumes ; le liquide passe soit par la fente, soit au dessus de la pointe de la plume.

Les premiers systèmes intégrés ont été fabriqués en résine SU-8 ; ils comprennent une interface de sortie de type plume pour coupler une étape de séparation ou de dessalage sur une phase monolithique à une analyse en ligne par électronébulisation et spectrométrie de masse. La fente de la plume apparaît comme la continuation du microcanal. Ces systèmes intégrés ont servi pour la préparation de phases monolithiques, a priori dédiées à du dessalage. Leur test est en cours.

La réalisation de l'interface de sortie du microsystème et avec la spectrométrie de masse comprend aussi une optimisation des phénomènes d'électronébulisation et d'ionisation des composés à analyser. Ce volet de l'interface comporte deux aspects, la stabilisation des phénomènes de nano-électronébulisation et une assistance à l'ionisation. Seul le premier aspect pu être abordé en pratique au cours de ce travail. La caractérisation des phénomènes de nano-électronébulisation a montré l'existence de deux régimes, un régime dit mono-cône et un régime dit multi-cône. La synchronisation des signaux de nano-électronébulisation en vue de leur stabilisation a ensuite été effectuée sur des sources capillaires standard.

Les travaux futurs seront, tout d'abord, une continuation de ces études de caractérisation et de stabilisation des phénomènes de nano-électronébulisation sur des sources microfabriquées de type plume. Une étude électrochimique de l'électronébulisation est ensuite envisagée. Le couplage de processus électrochimiques à l'électronébulisation au niveau de la source plume permettront d'assister l'ionisation : de la favoriser et d'augmenter le rendement d'ionisation d'une part, et de rendre possible l'analyse d'espèces non ionisables.

Articles

A planar on-chip micro-nib interface for NanoESI–MS microfluidic applications

Steve Arscott^{1,2}, Séverine Le Gac², Christian Druon¹,
Pierre Tabourier¹ and Christian Rolando²

¹ Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN), UMR CNRS 8520, Cité Scientifique, Avenue Poincaré, 59652 Villeneuve d'Ascq cedex, France

² Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (LCOM), UMR CNRS 8009, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

E-mail: Steve.Arscott@iemn.univ-lille1.fr

Received 13 May 2003, in final form 27 June 2003

Published 17 November 2003

Online at stacks.iop.org/JMM/14/310 (DOI: 10.1088/0960-1317/14/2/021)

Abstract

We present a novel nanoelectrospray emitter tip based on the principle of a nib rather than a nozzle for nano-electrospray ionization–mass spectrometry (ESI–MS) applications. The fabrication of the micro-nibs relies on micromachining techniques using the epoxy-based negative photoresist SU-8. A double exposure photolithographic process has been employed to form a nib in a membrane-like structure. The nibs contained a capillary slot measuring 20 μm at the tip end. The nib sources were successfully tested on an ion trap mass spectrometer using standard peptide samples at low concentrations, down to 1 μM . High voltage (HV) supply was achieved using platinum wire inserted in a liquid reservoir. A Taylor cone was clearly seen protruding from the nib tip and was determined by the dimensions of the capillary slot.

1. Introduction

With the shrinking size of chemical and biological analysis tools [1–3], the evolution of microfluidic technology is mirroring that of the microelectronics industry in the quest for 'smaller, faster and cheaper' devices and systems. There is, hence, a current need for the development of new easy-to-fabricate analytical devices including reliable world-to-device interfaces. Microfluidic devices are being particularly developed for biological applications [4–7] as decreasing the device dimensions inevitably leads to decreasing the analysis time and thus increasing the throughput rate [3, 4, 7]. One way to detect species at the microsystem outlet is to use mass spectrometry (MS) techniques [8, 9]; electrospray ionization mass spectrometry (ESI–MS) is of particular interest when working with protein samples as ESI is a soft ionization method appropriate for large biomolecules, and MS is currently the most powerful technique for protein analysis and identification.

The production of gas phase ions from macromolecules dissolved in a liquid by electrospraying was first demonstrated by Dole *et al* [10] and then popularized as an ion source

for mass spectrometry by Fenn *et al* [11]. Following this, nanoelectrospray ionization (nanoESI) sources were described using pulled silica [12, 13]. These sources currently serve as the standard nanoESI–MS interface, small nozzles being formed from silica-based capillary tubes by heat treatment and pulling techniques. Such techniques give typical nozzle end dimensions of the order of 1–5 μm . However, this method of fabrication is ill controlled and gives poor reproducibility of the sources.

Unfortunately, this capillary-based coupling methodology is not compatible with the production of high-density electrospray devices, i.e. multi-system fabrication on a single chip. Hence, fabricating a nanoESI–MS interface using microtechnology techniques which exhibit similar or even better performances than usual fused-silica needle-like interfaces is a current technological challenge. The use of micromachining techniques will also increase the source reproducibility and robustness and thus enhance the analysis conditions.

Two main approaches for the fabrication of nanoelectrospray emitter tips have been reported, either micromachining an emitter tip with the shape of a nozzle or electrospraying from a microchannel outlet.

The first approach is to micromachine an ionization source which resembles the usual electrospray emitter tips with a needle-like geometry; Lin and Pisano [14] described silicon nitride microneedles dedicated for drug delivery applications, and Lee *et al* [15] reported nozzles in silicon nitride and later needle structures in parylene [16]. Smith *et al* [17] described an array of nozzles fabricated in polycarbonate. Schultz *et al* [18] and Stemme *et al* [19, 20] developed similar monolithic silicon nozzles. The second approach gives better results in terms of the source dimensions; however, it should be noted that all the reported devices also worked under relatively high-ionization voltages and full integration of such sources into micro-systems has yet to be described.

The first attempt for electrospraying without needle-like usual emitter tips consisted of spraying directly from the outlet channel at the edge of the microsystem [21–23]; however, the liquid spread around the outlet and electrospray observation proved difficult. This was improved with a chemical treatment of the surface to render the channel output hydrophobic [21, 22], with a pneumatic assistance of the spray [23] or even by machining the edge of the system at the outlet so as to form a point-like structure [24–30]. In this way, Kameoka *et al* inserted a triangular parylene sheet between the two wafers so as to confine the liquid at the system outlet [24]. Yu and Shiea [25], Kim and Knapp [26–28] and Rossier *et al* [29, 30] have also explored the fabrication of such tapered structures to form an ionization source. However, in this approach the source dimensions are those of the microchannel and consequently, the high voltage (HV) value required to observe a spray was in the 2–3 kV range. This is a relatively high value compared to the lower voltages, e.g., 1 kV, required for nanospray experiments.

Our work concerns the development of microfabricated ionization sources that function in nanoelectrospray conditions, that is to say under an applied voltage of the order of 1 kV and with test liquid samples in the micromolar range. We present here a novel approach to this problem by the fabrication of a planar on-chip nib-like structure using the epoxy-based negative photoresist SU-8. The functioning of the micro-nib is much akin to that of a simple fountain pen in such that it contains a reservoir and an open capillary slot leading the test fluid to a nib point. An electrospray is then achieved by application of a high voltage as for any ESI source.

2. Fabrication technology

2.1. NanoESI micro-nib design

The micro-nibs have been fabricated on 3 inch silicon (100) wafers using the negative photoresist SU-8 (Microchem, MA). This photoresist is capable of producing very high aspect ratio features, and is thus starting to gain popularity with the microfluidics community [31, 32]. The micro-nib systems are composed of two parts: a main SU-8 feature fixed to the silicon wafer in order to support the micro-nib, and a second membrane-like feature containing a capillary slot which leads the protein sample to the end of the nib by capillary action. In addition, the main SU-8 incorporated a reservoir for the protein sample feeding the micro-nib during the MS test.

The fabrication of the micro-nibs is described in figure 1. A three inch silicon wafer was fully dehydrated

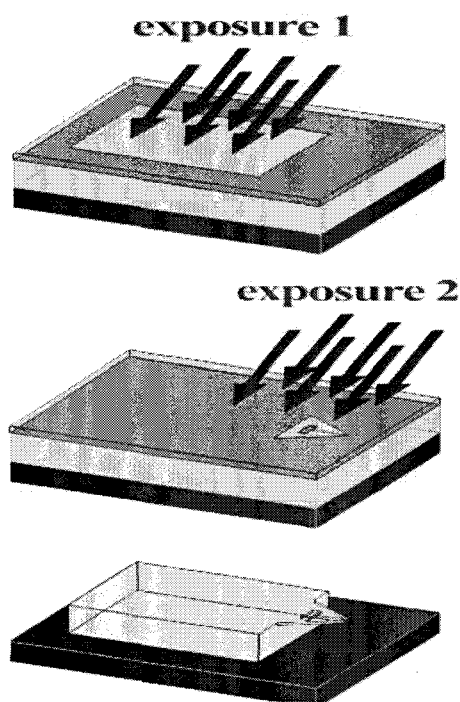


Figure 1. Fabrication steps for the fabrication of the micro-nibs. Exposure time 2 is less than exposure time 1 in order to form a membrane-like structure attached to the main SU-8 support feature.

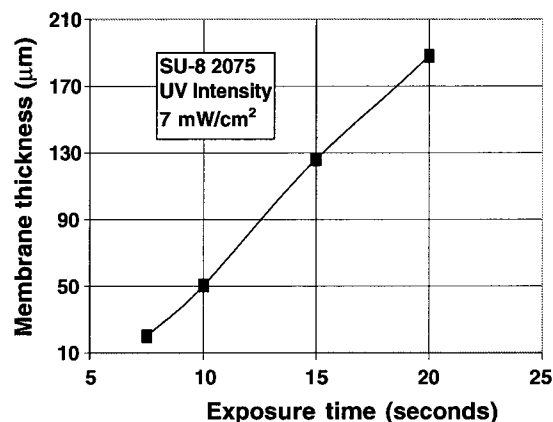
at 170 °C for 30 min in order to ensure good adhesion of the SU-8 to the silicon surface. Following this, a 400 μm thick layer of SU-8 2075 was deposited using standard spin-coating techniques in a class 100 clean-room. With such thick layers, special care is taken during the spread cycle in order to avoid bubble formation in the photoresist during the pre-bake. In addition, the hot-plate used for the pre- and post-bakes was made extremely leveled in order to ensure good planarity of the photoresist, this is essential in order to provide good wafer contact during the subsequent photolithographic steps. The initial nib support feature is formed in the SU-8 by using a single photolithographical masking step having an exposure time 1. This time ensures complete polymerization of the SU-8 through the whole volume. Following this, a membrane-like structure in a ‘diving board’ configuration is formed using techniques previously described by the authors [33]. This process involves the use of a second photolithographical masking stage and an exposure time 2. Exposure time 2 is less than exposure time 1 and has the effect of partial polymerization of the volume of the SU-8. The thickness of the resulting membrane-like structure has to be calibrated as a function of exposure time and the UV lamp intensity.

Figure 2 shows the thickness of the resulting SU-8 membrane-like structure as a function of exposure time at a lamp intensity of 7 mW cm^{-2} . Table 1 shows the processing parameters used to form the micro-nibs using the SU-8 technology.

Alignment of the support and the nib-like structure is made possible either by using the existing exposed SU-8 support features or pre-metallized features deposited onto the silicon wafer prior to the SU-8 deposition. The nibs were aligned square to the wafer flats, i.e. along the (100) planes in order to

Table 1. SU-8 processing parameters used for the fabrication of the planar micro-nibs.

Spread cycle			Spin cycle			Pre-bake (hot plate)		Exposure time 1	Exposure time 2	Post-bake (hot plate)	
Speed (rpm)	Acceleration (rpm s ⁻¹)	Time (s)	Speed (rpm)	Acceleration (rpm s ⁻¹)	Time (s)	Temperature (°C)	Time (min)	(14 mW cm ⁻²) (s)	(7 mW cm ⁻²) (s)	Temperature (°C)	Time (min)
500	100	60	700	300	60	95	60	45	7.5	95	10

**Figure 2.** Thickness of SU-8 membrane-like structures as a function of exposure time (UV intensity of 7 mW cm⁻¹).

ease the later wafer cleaving stage and thus leave the micro-nibs overhanging the wafer. In this way, we believe that many systems could be fabricated onto a single wafer either as world-to-chip interfaces or as stand-alone ESI-MS sources. The depth of the membrane-like structure was seen to be linearly proportional to the exposure time 2 and the exposure dose. A photoresist development step then releases the membrane-like micro-nib from the silicon wafer. It should be noted that the development time was not forced and some unexposed SU-8 was observed to be residual at the membrane-support feature interface.

Cleaving techniques are then employed to ensure that the micro-nibs hang over the edge of the Si wafer and ensure good interfacing to the mass spectrometer by avoiding possible arcing from the silicon substrate. Following the wafer dicing, the micro-nibs were seen to overhang the Si substrate by approximately 500 µm. Finally, a 100 nm thick layer of SiO₂ was deposited onto the nibs using plasma-enhanced chemical vapour deposition (PECVD) techniques. Figure 3 shows an SEM image of a typical micro-nib that has been fabricated for this study (SEM taken prior to wafer cleaving). The smallest slot width on the mask was 20 µm with a membrane depth at the tip of the micro-nib of around 30 µm. It should be noted that these were purposefully large dimensions compared to standard nanoESI-MS interface capillary tubes based on silica in order to facilitate the fabrication of prototype micro-nibs for these tests.

2.2. Mass spectrometry tests

The mass spectrometry tests were carried out on a LCQ Deca XP⁺ ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, WW). The nib sources were mounted on a *xyz* moving part of the MS machine. The HV is usually supplied on the metallic zone of the moving part; a platinum wire was used to make the

electrical contact between this metallic zone and the liquid dropped into the reservoir feature of the nib source. Once introduced in the ion trap inlet, the nib source position was adjusted in front of the mass spectrometer orifice using the *xyz* micropositioning translational stage of the mass spectrometer. The micro-nib was then fed with the sample to be analysed that was dropped onto the reservoir feature of the nib upstream to the capillary slot. We used standard peptide solutions for testing the nib sources, Gramicidin S samples (*Sigma*, L'Isle d'Abeau, France). The solutions were prepared by diluting an aqueous stock solution at 100 pmol µL⁻¹ using a MeOH:H₂O 50:50 solution acidified with 0.1% of formic acid. Hence, we tested Gramicidin S samples at 50, 20, 10, 5 and 1 µM. The spray formation was observed using the camera mounted on the ion trap mass spectrometer giving a top view of the ESI-MS source. For all MS tests, the total ion current (TIC) signal was recorded over a period of 2 min and used to plot the resulting mass spectra in the 300–1500 mass range using the Excalibur software. Comparison experiments were carried out with a Protana tip (Odensee, Denmark) in the standard conditions with the Gramicidin S sample at 1 µM and under a 1 kV ionization voltage.

3. Results and discussion

3.1. Micro-nib design

A first generation of nib sources have been designed and fabricated using the negative SU-8 photoresist; they were made hydrophilic by a 1000 Å thick layer of SiO₂ deposited on the resist. These sources consisted of the SU-8 structure on a silicon wafer with a reservoir feature and a capillary slot leading the liquid towards the nib point as seen on the schematic representation of a nib source in figure 3.

The capillary slot is of 20 µm width and 30 µm depth, which is relatively large for a nanoelectrospray source but as mentioned above, with this first generation of nibs, we aimed simply at validating the nib source concept and proving that such a geometry was compatible with electrospray experiments. We have used the SU-8 photoresist as material for fabricating the nib structure as this resist allows the fabrication of rapid prototypes. The second step of the work will consist in improving the nib features and dimensions to enhance their functioning.

It should be noted that such a nib geometry should lend well itself for an on-chip integration with the capillary slot of the nib being the continuation of a microchannel; the fluid will thus be lead to the MS in a planar way. Such sources are also compatible with the production of high-density arrays of sources on a single wafer. For these first tests, we have fabricated a batch of isolated sources that were tested one by one but we plan to fabricate a series of integrated nib sources

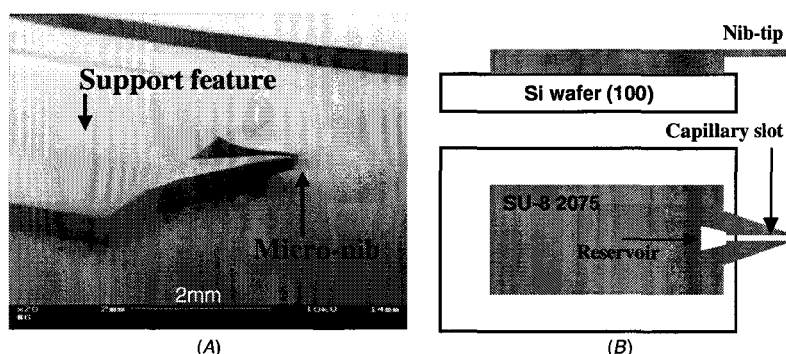


Figure 3. (A) SEM image of micro-nib fabricated in the SU-8 nib-like structure using the double exposure lithography technique described above; (B) schematic plan and side views of the micro-nibs.

on a single silicon wafer. These nib sources can as well be used without any coupling to a microfluidic network, i.e. in stand-alone conditions. In this case, they appear to be easier to fill in than usual needle-like electrospray emitter tips, e.g., the Protana tips. Using the micro-nibs, the sample solution is simply deposited onto the reservoir feature. As a consequence, such sources with an open configuration would be easier to interface to a robot for high-throughput ESI-MS analysis.

The nib sources have first been tested without coupling to a mass spectrometer; liquid was dropped onto the reservoir and we checked by observing under a binocular microscope that the fluid was moving towards the nib point by capillary action.

3.2. Mass spectrometry

The nib sources were tested using mass spectrometry on an ion trap mass spectrometer. A platinum wire was inserted in the reservoir feature of the nib for HV supply, following this the micro-nib source was introduced into the MS inlet. A peptide sample was dropped onto the reservoir feature using a micropipette, and HV was then applied. We were able to observe the nib source operation; the fluid circulation within the reservoir and the slot and the formation of the spray using the camera mounted on the ion trap. The resulting Taylor cone dimensions are those of the nib slot at its extremity as seen on the photograph of a nib source facing the MS inlet (figure 4); here the applied HV was of 1.2 kV, this implied that the micro-nib source has to be moved very close to the trap inlet, and the Taylor cone was seen to be very elongated.

Due to the relatively large dimensions of the sources and due to the fact that we endeavoured to work with as low ionization voltages as possible, the nib sources were brought very close to the MS inlet, much nearer than the usual Protana tips. We worked with ionization voltages in the 1.2 to 2.5 kV, and we observed that the lower the HV value, the closer to the MS inlet the nib source has to be moved.

Tests were performed using gramicidin samples at a variety of concentrations, from 50 pmol μL^{-1} down to 1 pmol μL^{-1} ; this last concentration value was observed to be the limit of detection for these first prototypes. For every experiment we carried out with the nib sources, we observed an overall stability of the total ion current (TIC) signal, which reflects the stability of the spray, and an intensity comparable to

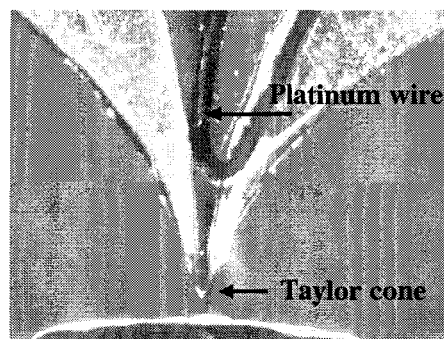


Figure 4. Photograph of nib during interfacing from the microsystem to MS with a 1.2 kV voltage; the source has to be closer to the inlet due to the source dimensions. Note the spray formation at the nib extremity.

this obtained in standard conditions (the Protana tip as nanoESI source).

Figure 5 presents the TIC signal obtained over a period of 2 min. with a nib source under a HV of 1.8 kV and with a gramicidin sample at 10 μM . Mass spectra were plotted using the Excalibur software from Thermo Finnigan as a result of 2 min acquisition of the signal.

Figure 6 presents the mass spectra obtained under an ionization voltage of 1.8 kV and with a solution of Gramicidin S at 5 μM (A) and 1 μM (B). As expected, the $(M + H)^+$ and the $(M + 2H)^{2+}$ species, respectively, at m/z 1141.7 and m/z 571.5 were detected with a very good signal-to-noise ratio. We compared the nib sources performances to those obtained in standard conditions on an ion trap mass spectrometer (Protana tip, 1 μM peptide sample, 1 kV ionization voltage). As already mentioned, the nib source position is different from this of the standard Protana tip as it was much closer to the inlet. Secondly, nib sources work with higher voltage values, as their optimal functioning was observed at 1.8 kV with 5–10 μM samples. This accounts for the fact that the mass spectrum pattern is not the same for both types of sources; only the $(M + 2H)^{2+}$ species at m/z 571.5 was detected with the Protana tip as both the singly and doubly charged species, respectively, $(M + H)^+$ at m/z 1141.7 and $(M + 2H)^{2+}$ at m/z 571.5 were detected with our nib-like sources with an intensity ratio depending on the HV value and the position of the nib in front of the MS inlet. However, the overall intensity was in the same range; the resolution was seen to

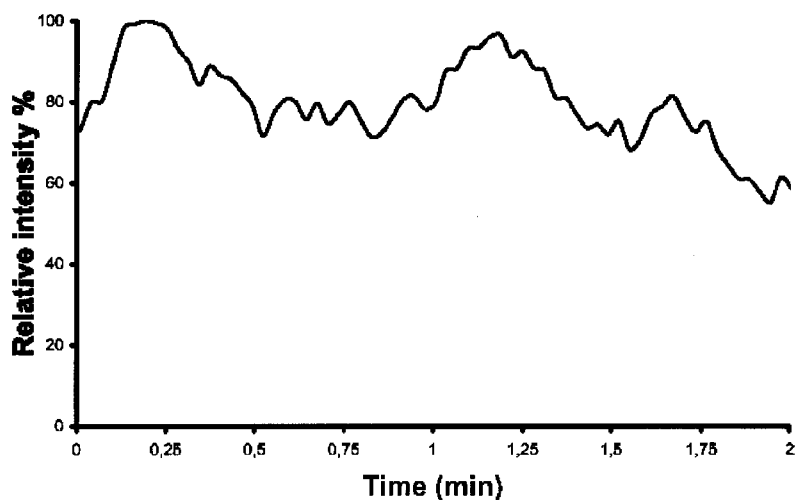


Figure 5. Total ion current (TIC) signal observed for a nib source facing the ion trap mass spectrometer; recording of the signal over a period of 2 min with a sample of Gramicidin S at $10 \mu\text{M}$ and under a HV of 1.8 kV.

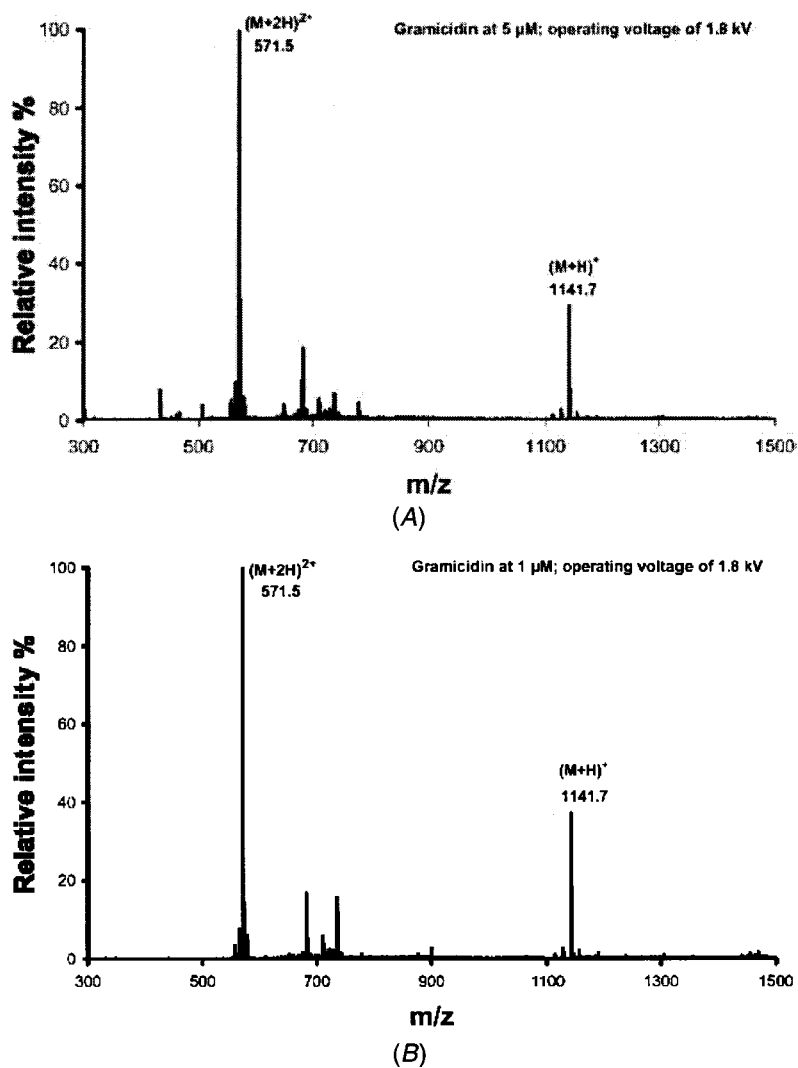


Figure 6. Mass spectra obtained with a solution of Gramicidin S and resulting from a 2 min acquisition of the signal. (A) sample at $5 \mu\text{M}$ and HV of 1.8 kV and (B) sample at $1 \mu\text{M}$ and HV of 1.8 kV. We detect in both cases the $(M+2H)^{2+}$ and the $(M+H)^+$ ionized species of the Gramicidin S, respectively, at m/z of 571.5 and m/z of 1141.7.

be similar in a zoomscan experiment, and the fragmentation spectrum presented a similar pattern with both types of sources. Nevertheless, even if the performances are much the same, we are aware that improving the design and dimensions of the nib sources is required so as to enhance the analysis conditions in nanospray-mass spectrometry.

4. Conclusion

We have proposed, fabricated and tested a novel nanoESI-MS world-to-chip interface. This interface is composed of a micro-nib and is based on the idea of a simple fountain pen in such that an open capillary slot feeds a test liquid from a reservoir to a nib tip. The capillary slot had dimensions of $20 \times 30 \mu\text{m}$ at the tip. The micro-nibs were fabricated using the negative photoresist SU-8 on Si wafers. A stable electrospray has been achieved along with the observation of a Taylor cone protruding from the tip of the capillary slot. We have also demonstrated the capability of these sources for the analysis of peptide samples under pretty good conditions, samples in the μM range and HV value around 1.5–1.8 kV. We believe this idea to be compatible with both channel-based and digital microfluidic circuits. We intend to optimize the micromachining and further shrink these dimensions in order to reduce the working voltages, to enhance the analysis conditions and to work in conditions closer to nanospray ones. We are currently working on fabricating similar micro-nibs in SU-8 using novel fabrication methods in order to achieve smaller dimensions and thus generate nanosprays at lower working voltages.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Ministère de l'Industrie: Bio-Ingénierie 2001-Réseau Genhomme and by the Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies: Réseau Micro et Nanotechnologies with the integrated proteomic project. The mass spectrometry facilities used in this study was funded by the European Union (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS and the Université des Sciences et Technologies de Lille. The authors thank Christophe Boyaval (IEMN) for the SEM images.

References

- [1] Reyes D R, Iossifidis D, Auroux P-A and Manz A 2002 Micro-total analysis systems. 1: Introduction, theory and technology *Anal. Chem.* **74** 2623–36
- [2] Reyes D R, Iossifidis D, Auroux P-A and Manz A 2002 Micro-total analysis systems. 2: Analytical standard operations and applications *Anal. Chem.* **74** 2637–52
- [3] Krishnan M, Namasivayam V, Lin R, Pal R and Burns M A 2001 Microfabricated separation and reaction systems *Curr. Opin. Biotech.* **12** 92–8
- [4] Figeys D and Pinto D 2000 Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences *Anal. Chem.* **330A**–5A
- [5] Guetens G, van Cauwenberghe K, de Boeck G, Mes R, Tjaden U-R, van der Greef J, Highley M, van Oosterom A-T and de Bruijn E-A 2000 Nanotechnology in bio/clinical analysis *J. Chromatogr. A* **739** 139–50
- [6] Mouradian S 2001 Lab-on-a-chip: applications in proteomics *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6** 51–6
- [7] Khandurina J and Guttman A 2002 Bioanalysis in microfluidic devices *J. Chromatogr. A* **943** 159–83
- [8] Nelson R W, Nedelkov D and Tubbs K A 2000 Biosensor chip mass spectrometry: a chip-based proteomics approach *Electrophoresis* **21** 1155–63
- [9] Oleschuk R D and Harrison D J 1999 Analytical microdevices for mass spectrometry *Trans. Anal. Chem.* **19** 379–88
- [10] Dole M, March LL, Hines R L, Mobley R C, Ferguson L P and Alice M B 1968 Molecular beams of macroions *J. Chem. Phys.* **49** 2240–9
- [11] Fenn J B, Mann M, Meng C K, Wong S F and Whitehouse C M 1989 Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules *Science* **246** 64–71
- [12] Valasek G A, Kelleher N L, Little D P, Aaserud D J and McLafferty F W 1995 Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry *Anal. Chem.* **67** 3802–5
- [13] Wilm M S and Mann M 1996 Analytical properties of the nanoelectrospray ion source *Anal. Chem.* **68** 1–8
- [14] Lin L and Pisano P 1999 Silicon processed microneedles *IEEE J. Micromech. Syst.* **8** 78–84
- [15] Desai A, Tai Y-C, Davis M T and Lee T D 1997 A MEMS electrospray nozzle for mass spectrometry *Int. Conf. on Solid-State Sensors and Actuators, Transducers '97*
- [16] Licklider L, Wang X-Q, Desai A, Tai Y-C and Lee T D 2000 A micromachined chip-based electrospray source for mass spectrometry *Anal. Chem.* **72** 367–75
- [17] Tang K, Lin Y, Matson D W, Kim T and Smith R D 2001 Generation of multiple electrosprays using microfabricated emitter arrays for improved mass spectrometric sensitivity *Anal. Chem.* **73** 1658–63
- [18] Schultz G A, Corso T N, Prosser S J and Zang S 2000 A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry *Anal. Chem.* **72** 4058–63
- [19] Griss P, Melin J, Sjoedahl J, Roeraade J and Stemme G 2002 Development of micromachined hollow tips for protein analysis based on nanoelectrospray ionization mass spectrometry *J. Micromech. Microeng.* **12** 682–7
- [20] Sjoedahl J, Melin J, Griss P, Emmer A, Stemme G and Roeraade J 2003 Characterization of micromachined hollow tips for two-dimensional nanoelectrospray mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** 337–41
- [21] Ramsey R S and Ramsey J M 1998 Generating electrospray from microchip devices using an electroosmotic pumping *Anal. Chem.* **70** 3721–7
- [22] Xue Q, Foret F, Dunayevskiy Y M, Zavracky P M, McGruer N E and Karger B L 1997 Multichannel microchip electrospray mass spectrometry *Anal. Chem.* **69** 426–30
- [23] Zhang B, Liu H, Karger B L and Foret F 1999 Microfabricated devices for capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry *Anal. Chem.* **71** 3258–64
- [24] Kameoka J, Orth R, Ilic B, Czaplewski D, Wachs T and Craighead H G 2002 An electrospray ionization source for integration with microfluidics *Anal. Chem.* **74** 5897–901
- [25] Yuan C and Shiea J 2001 Sequential electrospray analysis using sharp-tip channels fabricated on a plastic chip *Anal. Chem.* **73** 1080–3
- [26] Kim J S and Knapp D R 2001 Microfabrication of polydimethylsiloxane electrospray ionization emitters *J. Chromatogr. A* **924** 137–45
- [27] Kim J-S and Knapp D R 2001 Microfabricated PDMS multichannel emitter for electrospray ionization mass spectrometry *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12** 463–9
- [28] Kim J S and Knapp D R 2001 Miniaturized multichannel electrospray ionization emitters on polydimethylsiloxane microfluidic devices *Electrophoresis* **22** 3993–9
- [29] Gobry V, Oostrum J, Martinelli M, Rohner T C, Reymond F, Rossier J S and Girault H H 2002 Microfabricated polymer injector for direct mass spectrometry coupling *Proteomics* **2** 405–12
- [30] Rossier J S, Youhnovski N, Lion N, Damoc E, Becker S, Reymond F, Girault H H and Przybylski M 2003 Thin-chip

- microspray system for high-performance Fourier-transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry of biopolymers *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42** 53–8
- [31] Lin C-H, Lee G-B, Chang B-W and Chang G-L 2002 A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photo resist *J. Micromech. Microeng.* **12** 590–7
- [32] Zhang J, Tan K L, Hong G D, Yang L J and Gong H Q 2001 Polymerization optimization of SU-8 photoresist and its applications in microfluidic systems and MEMS *J. Micromech. Microeng.* **11** 20–6
- [33] Arscott S, Duvillaret L, Mounaix P, Garet F, Coutaz J-L and Lippens D 1999 Terahertz time-domain spectroscopy of films fabricated from SU-8 *Electron. Lett.* **35** 243–4

A Novel Nib-Like Design for Microfabricated Nanospray Tips

Séverine Le Gac, Cécile Cren-Olivé, and Christian Rolando

Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, UMR CNRS 8009, Université des Sciences et Technologies de Lille Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq, France

Steve Arscott

Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie and Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, UMR CNRS 8009, Université des Sciences et Technologies de Lille Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq, France

We present here novel tips for nanoelectrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) applications. These ionization sources have a planar geometry in the shape of a nib. Their functioning is based on a principle much akin to that of a fountain pen in that fluids are actuated by capillarity. Once a voltage is applied, an electrospray is formed at the nib tip. The nib fabrication relies on micromachining techniques using the epoxy-based negative photoresist SU-8 and a double exposure photolithographic process. Two types of nib-like sources were fabricated; they were made either conductive by metallization with a nickel layer or non-conductive but hydrophilic by covering them with a SiO₂ layer. In the latter case, the HV was applied via a Pt wire inserted into the reservoir feature of the nib. The nib-like sources were tested on an ion trap mass spectrometer using Gramicidin S samples at concentrations as low as 1 μ M and ionization voltages as low as 1.2 kV. We have observed a good overall stability of the spray during the tests with no marked decrease in the signal intensity even under extreme conditions. (J Am Soc Mass Spectrom 2004, 15, 409–412)   2004 American Society for Mass Spectrometry

This paper deals with the use of microtechnology for the fabrication of electrospray ionization emitter tips. In this context, the smaller the dimensions, the better the performances. Nonetheless, the microfabricated emitter tips reported in the literature hardly meet nanospray criteria. Needle-like microfabricated emitter tips exhibit dimensions larger than conventional nanotips [1–5] while planar devices resulting from microtechnology techniques are not sharp enough and work under ESI rather than nanoESI conditions [6–10]. We aim at the design, fabrication and testing of an ESI emitter tip with small features which works under nanospray conditions, i.e., an ionization voltage of the order of 1 kV. We present a novel approach to the fabrication of a tip with a nib-like shape using the epoxy-based negative photoresist SU-8. The functioning of these micro-nibs is much akin to that of a simple fountain pen with a reservoir feature and a capillary slot guiding the fluid towards the nib tip via capillary action and thus towards the MS inlet.

Experimental

Preparation of the Samples

The peptides (Gramicidin S, Angiotensin I) and solvents used for the MS experiments were purchased from Sigma (L'Isle d'Abeau, France). Stock solutions of peptides were prepared in deionized water. Test solutions were prepared by diluting a 0.1 mM peptide stock solution using a MeOH:H₂O solution acidified with 0.1% formic acid.

Micro-Nib Fabrication

The micro-nibs are composed of two parts: A main SU-8 feature which supports the micro-nib and a membrane-like feature including a capillary slot leading the fluid to the nib tip by capillary action. The main SU-8 feature acted as a reservoir for loading the samples for the MS test.

The fabrication of the micro-nibs is described in Figure 1. A 400 μ m layer of SU-8 2075 was deposited on the Si wafer using standard spin-coating techniques (Step 1). A multilayered membrane-like structure was then formed using a so-called 2 1/2 D fabrication technique which relies on a double photolithography of the SU-8 using two photomasking and exposure steps. The

Published online January 15, 2004

Address reprint requests to Dr. C. Rolando, Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille 1), Bâtiment C4, 2 me  tage, UMR CNRS 8009, Chimie Organique et Macromoléculaire, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. E-mail: Christian.Rolando@univ.lille1.fr

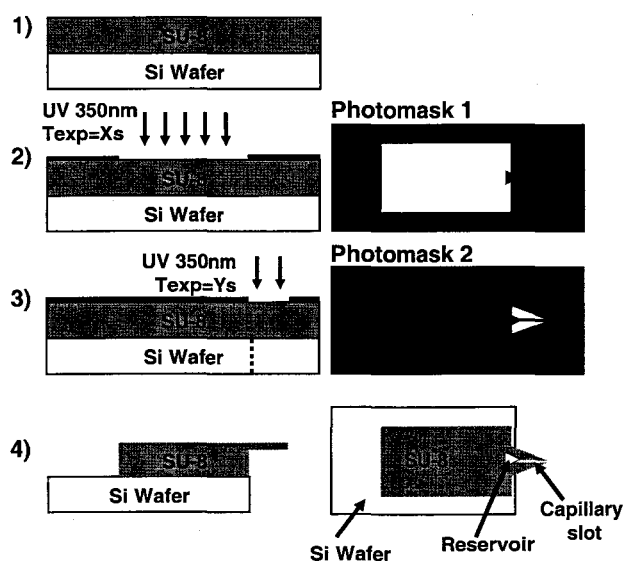


Figure 1. Fabrication steps 1–4 for the micro-nibs; side views (on the left) and top views (on the right). Starting from a Silicon wafer (100) covered with a 400 μm thick SU-8 layer (1), a double exposure technique is used to pattern the photoresist: the first exposure with an exposure time ($T_{\text{exp}} X_s$) allows for forming the main part of the nib structure (2) whilst the second exposure ($T_{\text{exp}} Y_s$) is shorter and allows for forming the membrane-like tip structure (3). The SU-8 is then developed so as to remove the non-exposed or non polymerized material; the Si wafer is also cleaved (dashed line in c) so as to free the micronib tip (4).

first step involved the formation of the main pillar of the system (Step 2) with an X_s exposure time (T_{exp}) chosen so that the whole SU-8 thickness was polymerized. The membrane-like feature with the capillary slot and the point-like structure (Step 3) was formed in the second step with a Y_s shorter exposure time so that only the upper resist layer was polymerized. A photoresist development step released the membrane-like feature from the Si wafer by removing the non-polymerized resist (underneath the nib tip and unexposed zones). Finally, the micro-nib was made to hang over the edge of the Si wafer (Step 4) by cleaving the silicon wafer along one of its crystallographic planes. The first batch of micro-nibs were made conductive via a nickel coating (500 \AA) using RF sputtering while the second batch was coated with a SiO_2 layer (1000 \AA) via plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD). The slot width was of 20 μm with a membrane depth at the tip of around 30 μm ; the length of the nib tip was approximately of 500 μm .

Instrumentation

The nib sources were tested on a LCQ Deca XP+ Ion Trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA). The nib-like structures were mounted on an xyz micro-positioning translational stage. For hydrophilic nibs, a rigid platinum wire (diameter = 125 μm) was manually placed into the reservoir; this wire was used as an electrical contact between the metallic zone of the

standard needle tip holder where HV is supplied and the liquid sample. A few micro-liters of the sample were dropped into the nib reservoir feature and capillary action was seen to result in the test liquid being present at the nib tip. The voltage was then applied on the liquid; we used voltage values in the 1.2–2.5 kV range for testing these prototypes. A camera mounted on the ion trap mass spectrometer allowed us to directly visualize the formation of the Taylor cone and the liquid flow in the capillary slot. Comparison tests were carried out using a medium borosilicate glass tip coated with a gold/palladium alloy from Protana (Odensee, Denmark) and having a 1 μm i.d. (ES 380). This tip was loaded with a 1 μM sample. The ionization was operated at 1 kV without any pressure assistance. The total ion current (TIC) signal was acquired for 2 min and the resulting mass spectrum was plotted as an average over this period using appropriate software (Excalibur, Thermo Finnigan, San Jose, CA).

Results and Discussion

Micro-Nib Microfabrication

The prototypes presented here were designed to assess the feasibility of such emitter tips and their compatibility and functioning in ESI experiments.

Electrospray Performance

SU-8 is neither strongly hydrophilic nor strongly hydrophobic; the contact angle is around 80° for pure water on SU-8. As expected, the capillary effect ensures the moving of the test solution (MeOH:H₂O, 50:50) towards the tip to fill in the slot, as seen after loading of the reservoir. A Taylor cone was observed under voltage application as shown on the pictures of a nib under (Figure 2) and without (insert in Figure 2) voltage. The MS tests were restricted by the volume of the reservoir. The test duration was dictated by the time required to consume the dropped volume, assuming a consumption rate of the order of 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, which needs improving.

The nickel coating on the first batch of nibs degraded under HV application after multiple-use, as is commonly observed for any emitter covered with a conductive layer. Conversely, the SiO_2 coated nibs had a much longer life and more tests could be carried out using a single micro-nib. Thus, we will mainly focus on the experiments and results obtained with the latter hydrophilic sources. No release of the SU-8 resist was observed as chemical noise on the spectra. This was to be expected as the resist was in both cases covered by either Ni or SiO_2 . In addition, we did not observe any adsorption of the peptides on the nib.

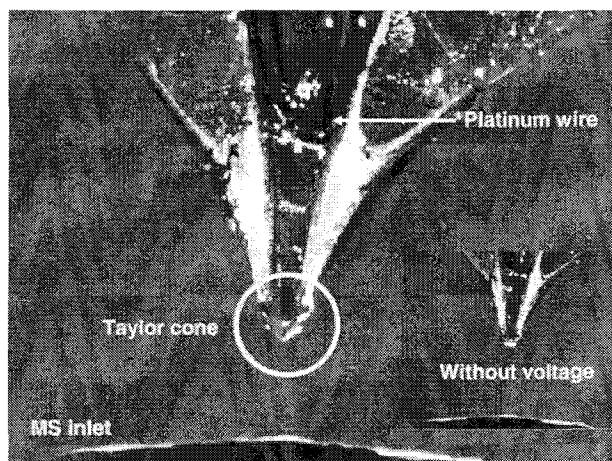


Figure 2. Photograph of the nib-like source in front of the ion trap mass spectrometer inlet; top view taken using the camera on the ion trap, with voltage and without voltage (in insert). Under HV supply, one can clearly see the Taylor cone. Note the capillary slot of the nib filled in with liquid and the platinum wire inserted in the reservoir for HV supply.

MS Tests: TIC Signal Stability and Resulting Mass Spectra

We tested Gramicidin S samples at 50 down to 5 μM and HV supply was in the 1.2–2.5 kV range. The total ion current (TIC) was recorded over a period of 2 min. We observed stable signals, even with the lowest concentration down to a 1.2 kV HV value. There was no particular decrease in the signal intensity when decreasing either the HV value or the peptide concentration; Table 1 presents the TIC intensity measured in a series of tests. Figure 3 shows the TIC signal observed for a 20 μM Gramicidin S solution with an HV of 2.2 kV. A RSD value of 7.5% was calculated from this plot.

All spectra showed the $(M + H)^+$ as well as the $(M + 2H)^{2+}$ species at respectively m/z 1141.8 and 571.9. Table 1 summarizes the intensity observed on the mass spec-

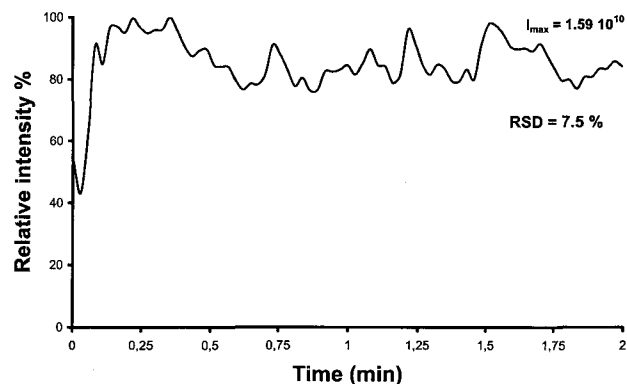


Figure 3. Total ion current signal recorded over a period of 2 min using a Gramicidin S sample at 20 μM under a HV value of 2.2 kV.

tra and the relative intensity ratio measured for these species under a variety of conditions. We saw two main trends when the concentration decreases: (1) The TIC signal intensity increases and (2) the intensity ratio observed for the $(M + H)^+$ and $(M + 2H)^{2+}$ species decreases. When the voltage value and the concentration were decreased, the micro-nib tip was moved closer to the MS inlet to observe a Taylor cone. In these conditions, the flow rate is increased and the spray is formed in a higher temperature region, as the ion trap inlet capillary is heated. The pattern of the resulting mass spectra is reminiscent of spectra recently obtained in APCI conditions without any corona discharge [11]. In addition, the concentration decrease from 20 to 1 mM results in a slight increase of the solution organic content from 40 to 50%; this may explain both that the signal intensity for the diluted solutions is slightly higher and that the intensity ratio observed for the $(M + H)^+$ and $(M + 2H)^{2+}$ species is lower as the $(M + 2H)^{2+}$ species reacts with water vapor to give the $(M + H)^+$ ion [12].

Table 1. Intensity of the TIC signal and relative intensity ratio observed for the $(M + H)^+$ and $(M + 2H)^{2+}$ species of Gramicidin S observed during testing of the nib sources. Mass spectra plotted as an average after 2 min acquisition of the signal

Entry	Gramicidin S concentration	HV value (kV)	TIC relative intensity ^{a,b}	Mass spectrum intensity ^{a,c}	$(M + H)^+ / (M + 2H)^{2+}$ intensity ratio ^a
1	50 μM	2.5	1	1	1.2
2	50 μM	2.2	1.1	1.1	1.2
3	50 μM	2	1.6	1.2	1.2
4	20 μM	2.5	3.9	1.9	0.92
5	20 μM	2.2	5.0	3.4	0.87
6	20 μM	2	5.0	3.4	0.87
8	5 μM	2.2	7.8	17.4	0.50
9	5 μM	2	8.8	11.8	0.45
10	5 μM	1.8	7.8	10.5	0.29
11	1 μM	1.8	13.2	23.0	0.37
12	1 μM	1.5	7.9	8.8	0.45

^aValues determined with a precision better than $\pm 10\%$ based on RSD value and on replicated experiments.

^bRelative values calculated using the TIC intensity observed with a 50 μM sample and a HV value of 2.5 kV (first entry) and taken to be 1 (3.17×10^9 measured value).

^cRelative values calculated using the MS intensity observed with a 50 μM sample and a HV value of 2.5 kV (first entry) and taken to be 1 (1.78×10^7 measured value).

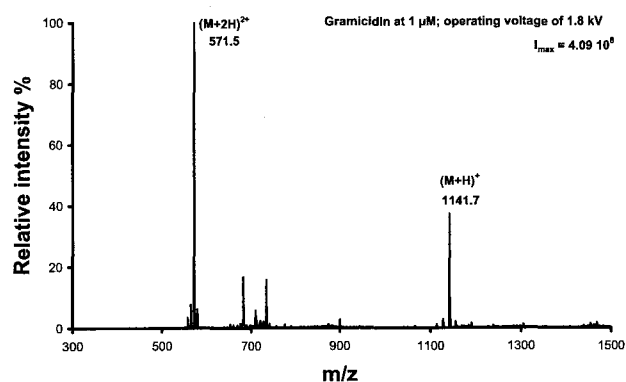


Figure 4. Mass spectrum using a Gramicidin S sample at 1 μM under a HV value of 1.8 kV.

Comparison with a Protana Nano-ESI Tip

The performances of the nib-like sources were compared with those of a commercial nanoESI tip (Protana) (Gramicidin S at 1 μM , HV of 1 kV). First, the distance between the tip and the MS inlet is large compared with the case of the nib tip and the standard tips are operated at a lower voltage. Nonetheless, the intensity of the spectra is much the same for both types of tips. Another difference is the intensity ratio for the $(M + H)^+$ and $(M + 2H)^{2+}$ species; the spectrum obtained with a Protana tip only presents the $(M + 2H)^{2+}$ species at m/z 571.6, as both $(M + H)^+$ and $(M + 2H)^{2+}$ species are detected using a micro-nib. This reflects the difference in the source dimensions and flow rate [13, 14].

Functioning Limits of the Nib-Like Sources

Using a sample at 10 μM , the voltage was thus decreased from 1.8 to 1.2 kV without any marked decrease either on the TIC signal intensity or on the mass spectrum intensity once the micronib optimal position had been found in the MS inlet. We finally tested a 1 μM Gramicidin S solution with a HV supply of 1.5 and 1.8 kV (see Table 1). Figure 4 presents the spectrum obtained at 1 μM under a 1.8 kV HV. There is a group of peaks around m/z 700 that can not be attributed to Gramicidin S. Nonetheless, these peaks were not detected when another solution (blank or other peptide) was run; this indicates that they are not attributable to any SU-8 release.

Conclusion

We have demonstrated that the fabrication of nib-like sources is a promising route for designing novel nanoESI tips. Such sources are easier to load than standard emitter tips because of their 2-D topology and are thus compatible with the use of robotics in view of analysis automation. We have fabricated and tested prototypes using the resist SU-8. They present a relatively wide opening slot (around 20 $\mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$) compared with standard nano-tips which have an i.d. of 1–5 μm at their tip. This difference in the aperture size

is reflected by the mass spectra pattern in terms of intensity ratio for the different charge states. The micronib optimal functioning is with a 1.8 kV HV supply and samples at 5–10 μM . The design and features of nib-like sources will now be improved so as to enhance their performances for MS applications.

Acknowledgments

The authors thank the French network for micro- and nanotechnologies for its financial support for this work (*Integrated Proteomics* project) as well as the *GenHomme* network (*BioChipLab* consortium). The Mass Spectrometry facility used for this study is funded by the European community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS and the Université des Sciences et Technologies de Lille. The authors also thank Christophe Boyaval from IEMN for the SEM photographs and Adeline Page from the Mass Spectrometry Facility for her help with the ion trap mass spectrometer.

References

- Lin, L.; Pisano, A.P. Silicon Processed Microneedles. *IEEE J. Microelectromech. Syst.* **1999**, *8*, 78–84.
- Licklider, L.; Wang, X-Q.; Desai, A.; Tai, Y-C.; Lee, T. D. A Micromachined Chip-Based Electro spray Source for Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 367–375.
- Schultz, G. A.; Corso, T. N.; Prosser, S. J.; Zhang, S. A Fully Integrated Monolithic Microchip Electro spray Device for Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4058–4063.
- Sjoedahl, J.; Melin, J.; Griss, P.; Emmer, A.; Stemme, G.; Roeraade, J. Characterization of Micromachined Hollow Tips for Two-Dimensional Nano electrospray Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 337–341.
- Tang, K.; Lin, Y.; Matson, D. W.; Kim, T.; Smith, R. D. Generation of Multiple Electro sprays Using Microfabricated Emitter Arrays for Improved Mass Spectrometric Sensitivity. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1658–1663.
- Kameoka, J.; Orth, R.; Ilic, B.; Czaplowski, D.; Wachs, T.; Craighead, H. G. An Electro spray Ionization Source for Integration with Microfluidics. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5897–5901.
- Yuan, C. H.; Shiea, J. Sequential Electro spray Analysis Using Sharp-Tip Channels Fabricated on a Plastic Chip. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1080–1083.
- Kim, J. S.; Knapp, D. R. Microfabricated PDMS Multichannel Emitter for Electro spray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 463–469.
- Kim, J. S.; Knapp, D. R. Miniaturized Multichannel Electro spray Ionization Emitters on Polydimethylsiloxane Microfluidic Devices. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3993–3999.
- Rossier, J. S.; Youhnovski, N.; Lion, N.; Damoc, E.; Becker, S.; Reymond, F.; Girault, H. H.; Przybylski, M. Thin-Chip Micro spray System for High-Performance Fourier-Transform Ion-Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Biopolymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 53–58.
- Cristoni, S.; Bernardi, L. R.; Biunno, I.; Guidugli, F. Analysis of Peptides Using Partial (No Discharge) Atmospheric Pressure Chemical Ionization Conditions with Ion Trap Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1686–1691.
- Zhan, D.; Fern, J. B. Gas Phase Hydration of Electro spray Ions from Small Peptides. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *219*, 1–10.
- Wilm, M. S.; Mann, M. Analytical Properties of the Nano electrospray Ion Source. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1–8.
- Schmidt, A.; Karas, M.; Dulcks, T. Effect of Different Solution Flow Rates on Analyte Ion Signals in Nano-ESI MS, or: When Does ESI Turn into Nano-ESI? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 492–500.

Micromachined 2D nanoelectrospray emitter

S. Arscott, S. Le Gac, C. Druon, P. Tabourier and C. Rolando

A novel 2D nanoelectrospray emitter for mass spectrometry has been micromachined using photoresist SU-8 on silicon substrates using one-step photomasking. The design contains a reservoir, a capillary slot and an emitter tip. The emitters were successfully tested on an ion trap mass spectrometer. A nanoelectrospray was observed at voltages as low as 0.8 kV.

Introduction: The use of micromachining for the fabrication of components in the fields of biology and chemistry [1] is attractive for various reasons: (i) increased reproducibility of the devices, (ii) improved device quality and (iii) batch production. These factors lead to more reliable analysis conditions and higher sample throughput, e.g. in the field of proteomics [2] where a large number of proteins still remain to be characterised using mass spectrometry (MS) techniques which rely on electrospray ionisation (ESI). ESI is currently performed using commercial sources based on capillary tubes. However, such emitters present a number of weaknesses: (i) poorly controlled fabrication, (ii) low analysis reproducibility and (iii) little scope for integration onto a chip. Thus, the application of micromachining techniques to the fabrication of ESI-MS emitters has been suggested [3, 4].

In this Letter, we present a novel 2D nanoelectrospray emitter. The design has much in common with that of a fountain pen in that it contains a reservoir for a test liquid and a capillary slot in order to guide the test liquid to a point where electrospray ionisation can be performed via the application of the ionisation voltage.

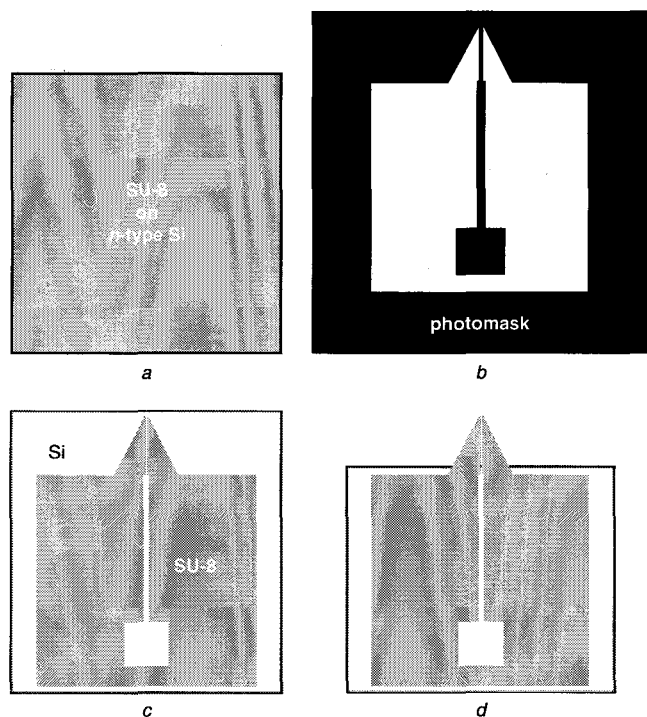


Fig. 1 Fabrication process for 2D ESI emitters

- a Spin-coating of SU-8
- b One-step UV photomasking stage
- c Development of emitters
- d Wafer dicing to ensure emitter tips overhang edge of silicon wafer

Source design and fabrication: The emitters are composed of three main elements: (i) a reservoir for the test liquid, (ii) a capillary slot having a length of 2 mm and (iii) an emitter tip which overhangs the edge of a silicon wafer thus ensuring a point-like effect for the required concentration of the electric field for ESI. The capillary slot leads the test liquid by capillary action from the reservoir to the overhanging emitter tip towards the MS. The emitter tips were approximately 1 mm long following wafer dicing and had a 40°

point angle. The exterior dimensions of each source were 1 × 1 cm to enable easy handling and emitter mounting in order to facilitate the MS tests. A schematic diagram for the fabrication of the emitters is shown in Fig. 1. The photomask was designed using the software *Wavemaker*® (BML, London, UK). A photomask was produced using an EBP G5000+ nanomasker (Leica, VA, USA) which contained a total of nine ESI emitters incorporated into the mask design in a 3 × 3 array. The emitters were fabricated in a planar fashion using the epoxy-based negative photoresist SU-8 (*Microchem*, MA, USA) on a 250 μm-thick 3 inch silicon *n*-type substrate orientated (100). SU-8 is becoming increasingly used for the construction of microfluidic networks [5]. A single 35 μm-thick layer of SU-8 2035 was spin-coated (3000 rpm/300 rpm⁻¹/30 s) onto the silicon wafer. The photoresist was then pre-baked using a hotplate for 5 min at 95°C. A single photomasking stage is then required to define the shape of the emitters using the photomask and exposure to UV radiation. Fig. 1b shows one element of the one-step photomask used to fabricate the 2D emitters. Following UV exposure, a post-bake of the SU-8 was performed for 2 min at 95°C using a hotplate. The SU-8 photoresist is then developed in XP SU-8 developer solution (see Fig. 1c). There were two widths of capillary slots on the mask: 8 and 16 μm, in the case of the smallest dimension, namely an 8 μm slot width, the capillary slot had an aspect ratio of >4. The individual emitters were diced along the (100) direction using a technique which ensures that the emitter tips overhang the edge of the silicon wafer (see Fig. 1d). Fig. 2 shows an SEM image of a typical emitter tip which has been fabricated.

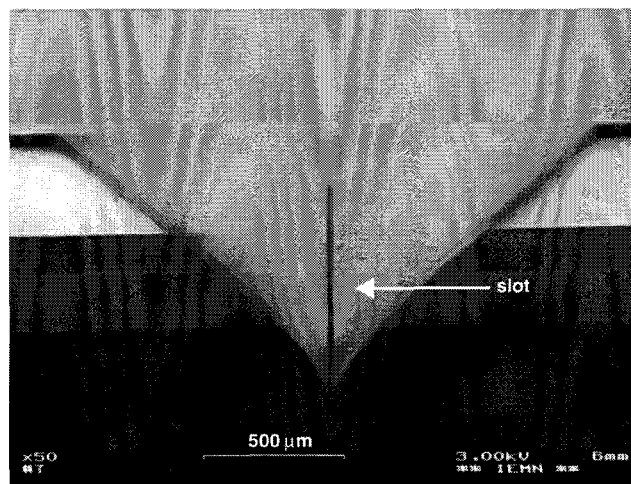


Fig. 2 SEM image of typical 2D ESI emitter fabricated using technique (slot width = 16 μm)

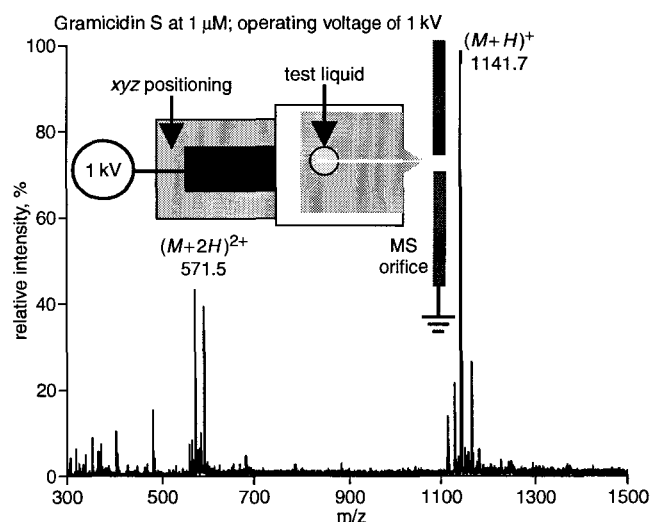


Fig. 3 Resultant test mass spectrum obtained using 2D ESI emitter (slot width = 8 μm) at 1 kV using Gramicidin S at 1 μM

Inset: Experimental setup used to test micromachined 2D ESI emitters

Mass spectrometry tests: A plan view of the setup used for the mass spectrometry tests is shown in the inset to Fig. 3. The emitters were tested on an LCQ Deca XP+ ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA). The silicon wafer which supported the SU-8 source was mounted on a moving component to be introduced into the ion trap inlet. This moving piece includes a metallic zone on which high voltage (HV) is applied for ESI-MS experiments. The ionisation voltage was applied to the liquid in the reservoir via the *n*-type silicon wafer. The conductivity of the wafer and liquid were sufficient to produce an electrospray upon application of the voltage. The peptide sample (5 μ L) was dropped into the reservoir of the 2D source using a micropipette. Following this, the moving component was introduced in the ion trap mass spectrometer inlet and its position was precisely adjusted using the *xyz* micro-positioning stage.

The sources were tested with standard peptide (Gramicidin S) solutions at 1, 5, 10 μ M prepared using a methanol:water (50:50) + 0.1% formic acid solvent. The HV supply was in the 0.8 to 1.5 kV range. Upon application of the ionisation voltage a Taylor cone was clearly visible at the end of the capillary slot; this demonstrates the existence of ESI. The total ion current (TIC) signals (not shown here) were stable in all conditions of spraying. The mass spectra were averaged over a 2 min acquisition period using the *Excalibur* software (Thermo Finnigan, San Jose, CA). A typical mass spectrum obtained with an 8 μ m micro-nib source, a HV supply of 1 kV and a sample of 1 μ M is shown in Fig. 3. A value of 0.8 kV was determined as a lower limit value for this current design of emitters. The signal-to-noise ratio (SNR) was observed to be very good for all experiments that were carried out with the emitters: the analysed species could be identified without doubt. The spraying conditions for these emitters are thus comparable to those used for standard emitter tips (results not shown here). Indeed, a major advantage of this topology is that liquid sample loading is much easier to achieve than for standard capillary tube emitters. Consequently, this source geometry is compatible with the use of robots for the automation of ESI-MS analysis for high-throughput applications.

Conclusions: We have designed and demonstrated a novel 2D nanoESI emitter which contains a reservoir and a capillary slot

which leads a test liquid from the reservoir to the emitter tip. The photoresist SU-8 has been used to produce the emitters on silicon wafers using a single photomasking step. The smallest critical emitter tip dimensions on the mask were 8 \times 35 μ m. Excellent performances were obtained in mass spectrometry experiments using the 2D ESI emitters, the peak intensity being comparable to that which is observed for standard capillary tube-based nanoESI emitters at a voltage of 1 kV.

© IEE 2003

Electronics Letters Online No: 20031099

DOI: 10.1049/el:20031099

1 September 2003

S. Arscott, C. Druon and P. Tabourier (*Institut d'Electronique, de Microelectronique et de Nanotechnologie, UMR, CNRS 8520, Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq Cedex, France*)

E-mail: steve.arscott@iemn.univ-lille1.fr

S. Le Gac and C. Rolando (*Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, UMR, CNRS 8009, Villeneuve d'Ascq Cedex, France*)

References

- 1 KOCH, M., EVANS, A., and BRUNNSCHWEILER, A.: In PETHIG, R (Ed.): 'Microfluidic technology and applications' (Research Studies Press, UK, 2000), Chap. 6, pp. 151–287
- 2 FIGEYS, D., and PINTO, D.: 'Proteomics on a chip: promising developments', *Electrophoresis*, 2001, **22**, pp. 208–216
- 3 GRISS, P., MELIN, J., SJODAHL, J., ROERADE, J., and STEMME, G.: 'Development of micromachined hollow tips for protein analysis based on nanoelectrospray ionisation mass spectrometry', *J. Micromech. Microeng.*, 2002, **12**, pp. 682–687
- 4 LIN, L., and PISANO, P.: 'Silicon processed micro-needles', *IEEE J. Micromech. Sys.*, 1999, **8**, pp. 78–84
- 5 LIN, C.-H., LEE, G.-B., CHANG, B.-W., and CHANG, G.-L.: 'A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photo resist', *J. Micromech. Microeng.*, 2002, **12**, pp. 590–597

Two-dimensional microfabricated sources for nanoelectrospray[†]

Séverine Le Gac,¹ Steve Arscott,^{1,2} Cécile Cren-Olivé¹ and Christian Rolando^{1*}

¹ Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

² Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN), Cité Scientifique, Avenue Poincaré, 59652 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 10 June 2003; Accepted 10 November 2003

The idea of a novel two-dimensional (2D) nanoelectrospray ionization emitter tip with the shape of a nib is explored here. This novel planar design is studied as an alternative to the needle-like standard emitter tips that suffer from a lack of reproducibility and robustness and from an inherent incompatibility with high-throughput analysis. The composition of the micro-nib sources is analogous to the working of a simple fountain pen, with a liquid reservoir linked to a micro-nib tip from which the sample is electrosprayed via a capillary slot. The micro-nib prototypes described here were fabricated using microtechnology techniques and using the epoxy-based negative photoresist SU-8. The resulting free-standing micro-nib structure was supported by a silicon wafer. We present here two series of such micro-nib sources, the latter series exhibiting improved characteristics such as a 8 µm source width of the nib tip. They were tested in mass spectrometry experiments on an ion trap mass spectrometer (LCQ Deca XP+, Thermo Finnigan) using standard peptide samples having concentrations down to 1 µM and with a high voltage (HV) supply around 1 kV for the second series of micro-nib sources. In addition to the stability of the spray, the obtained mass spectra showed the reliability of these sources for peptide analysis; the signal of the spectra was as intense and the signal-to-noise ratio (S/N) as high as that obtained with the use of standard emitter tips. Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: electrospray ionization; microfabricated emitter tip; 2D ionization sources; microfluidics

INTRODUCTION

Nanoelectrospray ionization is currently performed using fused-silica or glass emitter tips.^{1–3} These emitter tips have the shape of a needles with a typical inner diameter at the end of 1–5 µm.³ They are manufactured using pulling and heating techniques.^{3,4} However, this fabrication process is not very well controlled and consequently leads to the production of sources with critical dimensions which are not always reproducible. This drawback can be reduced by including a laser micromachining step during the fabrication of the emitter tips⁵ as this technique increases the source reproducibility and quality; however, this quality enhancement increases the cost of the sources. As a result, the laser-micromachined sources are rare and not used routinely in laboratories for infusion analysis. The second drawback of these needle-like ionization sources is the method of employment that requires

skilled users for the analysis preparation.⁵ The emitter tip is first loaded with the sample using a micro-pipette and a gel-loader. Following this, the air bubbles inside the tip must be removed by careful agitation, the source is then introduced in the inlet of the mass spectrometer and broken open to allow the infusion of the sample into the inlet for analysis.^{3,4} Again, the breaking step of the source is a random process suffering from a lack of reproducibility and results in a non-calibrated flow rate of the sample.⁶

Currently, the field of MS-based analysis is rapidly expanding, especially with the soft ionization modes such as electrospray ionization (ESI)^{1,3} and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI),^{7–9} as these processes are suitable for the analysis of biological samples.² The rapid evolution in MS reflects the increasing number of biological samples to be analyzed today. Indeed, MS techniques are currently the most powerful detection and analysis techniques for protein samples,^{10–15} as they allow the identification, characterization and sequencing of proteins and peptides. In addition, MS is a very sensitive analytical tool which is well adapted for the low quantities of biological material to be analyzed after the sample extraction and processing steps. MS is hence the last step in the usual process of protein samples, also called the proteomic approach.^{12,14,15} The result of this emerging field of protein and proteomic analysis is a current need for high-throughput analysis; this

*Correspondence to: Christian Rolando, Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille 1), Bâtiment C4, 2ème étage, UPRESA CNRS 8009, Chimie Organique et Macromoléculaire, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

E-mail: Christian.Rolando@univ-lille1.fr

[†]Paper presented at the 21st Informal Meeting on Mass Spectrometry, Antwerp, 11–15 May 2003.

Contract/grant sponsor: French Network for Micro- and Nanotechnologies.

[†]Paper presented at the 21st Informal Meeting on Mass Spectrometry, Antwerp, 11–15 May, 2003.

may be achieved with the automation of the analysis and the use of robotics.¹¹ Unfortunately, due to the limitations such as the low quality of the analysis conditions, a difficult manual preparation process and the random dimensions of the ionization emitter tips, standard ESI-MS techniques do not lend themselves well to automation and are not readily adapted to automation.

However, using microtechnology techniques to produce ionization emitter tips dedicated to electrospray applications will provide enhanced fabrication control and higher quality ionization sources together with their reproducibility and robustness. In addition, microtechnology is fully compatible with batch production and the fabrication of high-density arrays of ionization sources. Lastly, microtechnology appears to be a reliable route for coupling a microfluidic system to a final ESI-MS analysis step by integrating an on-chip nanoESI emitter tip. This integrated approach allows for optimization of the microsystem-MS connection as the capillary-based coupling creates dead volumes and requires glues that dissolve in organic solvents resulting in chemical noise on the mass spectra.^{16–18}

There have already been some reports in the literature describing such microfabricated ionization emitter tips following two main approaches, a nozzle-like approach and an in-plane approach.^{19–32} The nozzle-like approach consists of micromachining a source with the shape of a nozzle thus reproducing the standard emitter tips.^{19–23} This is achieved by etching Si/SiO₂ using appropriate etching techniques, as reported by Stemme *et al.*,^{19,20} Corso *et al.*,²¹ and others, or by micromachining polymer materials.^{22,23} The second approach, the in-plane approach, is to micromachine a point-like structure at the end of a microchannel so as to form an ionization tip.^{24,32} For example, Kim and Knapp described such PDMS (polydimethylsiloxane) features as ionization sources,^{24–26} Yuan and Shiea presented a PMMA (polymethylmethacrylate) star-like device where the branch tips are machined as ESI emitter tips,²⁷ and Rossier *et al.* tapered structures so as to form ESI sources.^{28,29} Kameoka *et al.* created a point-like structure by inserting a polymer triangle sheet between the bottom and the top wafer of a microsystem at the end of a microchannel.³⁰ Lastly, a microchannel outlet may be micromachined to the shape of a needle.^{31,32} However, it should be stated that all these references present sources with relatively large dimensions compared with standard emitter tips (i.d. 1–5 μm) and which work under higher ionization values voltage than in nanoESI conditions (<1 kV).

We present here the design, fabrication and testing of a novel type of ionization source having the shape of a nib, the composition of which has much in common with that of a fountain pen (Fig. 1). Initially, we validated this nib-like tip concept by testing commercial pen nibs on a mass spectrometer and we saw that providing a quite high voltage supply, i.e. of the order of 2–3 kV, a spray could be observed at the tip of the nib and that mass spectra could be obtained. The methodology took us through two generations of micro-nibs which were both fabricated using micromachining techniques and based on the SU-8 negative photoresist. The sources include a reservoir for the liquid test

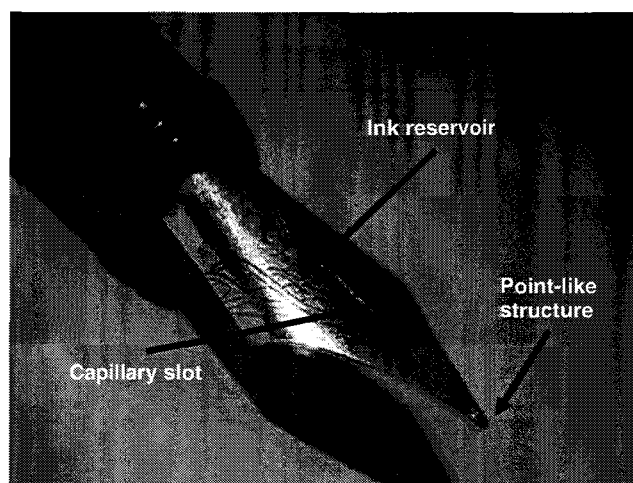


Figure 1. Photograph of a fountain pen. Arrows indicate the main components of the nib system, the ink reservoir, and the capillary slot for guiding the fluid to the point-like structure where the ink is ejected.

samples and a capillary slot guiding the test fluid towards the point-like tip of the nib.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Peptides and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Mass spectrometry experiments were carried out using standard peptide samples. Test solutions were prepared from the concentrated stock solutions by diluting them using a 50:50 MeOH/H₂O solution acidified with 0.1% formic acid. Thus, Gramicidin S samples at 50 μM down to 1 μM were prepared.

Source fabrication

The fabrication of the two generations of micro-nib emitter tips relied on similar microtechnology processes. The nib feature was made in the SU-8 negative photoresist³³ and was supported on a silicon wafer. The SU-8 nib structure included the main components of a nib system, a reservoir feature for fluids, a capillary slot and a point-like structure at the end. The SU-8 photoresist was used to micromachine the first prototypes that are presented here as this material allows fabrication of complicated structures using simple technological processes.

The microfabrication process of the nib tips has been described in detail elsewhere;³⁴ however, a brief summary will be given here. Starting from a silicon wafer which was covered with a thick layer (400 μm) of the SU-8 negative photoresist (step 1), a double exposure technique was used so as to form a membrane-like structure with the shape of a nib (steps 2 & 3). The main part of the nib feature is machined with an exposure time (~50 s) and the tip of the micro-nib feature with an exposure time (<10 s). It should be noted that the first exposure time is greater than the second one; thus, partial polymerization of the SU-8 for a given thickness is obtained in order to produce the overhanging membrane-like feature that is detached from the Si wafer.

This is called 2.5D lithography as the resulting nib structure is neither entirely planar nor 3D. Finally, the SU-8 feature was coated with 100 nm SiO₂ using PECVD techniques (plasma-enhanced chemical vapour deposition) and the Si wafer was carefully cleaved so as to free the micro-nib structure (step 4).

For the second series of micro-nibs, the fabrication process was changed slightly. A single UV exposure technique was used to machine the nib structure in the SU-8 photoresist to produce an entirely planar nib structure rather than a 2.5D one as previously. In addition, the last surface treatment step prior to the silicon wafer cleaving step was omitted and there was no SiO₂ hydrophilic coating on the resist and the nib surface was of pure SU-8.

Test in MS

The micro-nib sources were tested on an ion trap mass spectrometer (LCQ Deca XP+; Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) using standard peptide samples. For both series of micro-nib emitter tips the protocol for the tests was the same. The wafer supporting the nib source was placed on a moving positional part inserted in the inlet of the mass spectrometer. A Pt wire was inserted into the reservoir feature of the source for the application of the high voltage (HV) via the liquid; this Pt wire served as an electrical contact between the metallic zone on which the ionization voltage is usually applied and the liquid sample. The nib was loaded with the test sample by simply dropping the solution into the reservoir using a micropipette and it was introduced into the mass spectrometer. We were able to observe the spray formation at the nib tip using the camera of the ion trap. For all experiments, the scanning time was 1.5 s, the signal was acquired for 2 min and the TIC (total ion current) signal and the resulting mass spectra were plotted, the mass spectra being averaged over this acquisition period (80 spectra) using Excalibur software (Thermo Finnigan). Nonetheless, the conditions for the MS experiments in terms of peptide concentrations and HV values were different due to the different size features of the two series of micro-nib emitter tips.

RESULTS AND DISCUSSION

This planar or quasi-planar design is of great interest as it is fully compatible with the use of robotics to achieve high-throughput analysis through its automation. In fact, the loading of the micromachined source is much easier and, in addition, the breaking step of the source has been eliminated before the analysis. Finally, as already discussed, the use of microtechnology techniques guarantees the reproducibility of the sources.

First generation of micro-nib sources

Figure 2 shows a scanning electron microscope image of a first series source with the 2.5D SU-8 nib feature supported on a silicon wafer. The critical source dimension, i.e. the width of the slot at the tip of the nib, was determined by the photomask to be 20 μm in this design.

While testing the nib tips on the ion trap mass spectrometer, the fluid moving in the slot of the nib structure was clearly observed together with the electrospray, demonstrated by the

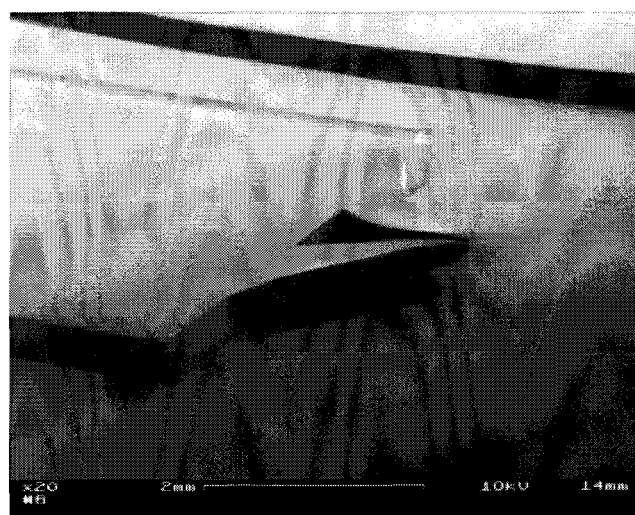


Figure 2. Photograph of a nib structure (first generation) fabricated in the epoxy-based negative photoresist SU-8 and supported on a silicon wafer (scanning electron microscopy).

formation of a Taylor cone, which is observed when the HV is applied. The HV supply was decreased from 2.5 to 1.2 kV for these first prototypes and the concentration of Gramicidin S was in the 1–50 μM range. Using our micro-nib source, the spray was seen to be stable as reflected by the TIC signals. Figure 3 (top) represents the TIC signal recorded for an experiment with Gramicidin S at 5 μM under a HV of 2.2 kV. It should be noted that the signal intensity (2.46×10^{10}) is high and comparable to that obtained under standard conditions. Figure 3 (bottom) shows the resulting mass spectrum averaged over a 2 min acquisition period resulting in two main peaks at m/z 571.5 and 1141.7 corresponding to the two ionic species of Gramicidin S, the singly and the doubly charged ions, respectively. It should be noted that the spectral intensity (3.10×10^8) is comparable to that observed with a standard emitter tip and that the signal-to-noise ratio (S/N) is very good for these first prototypes. We successfully decreased the peptide concentration to 1 μM without observing any marked decrease in the signal intensity (or the S/N ratio) either on the TIC graphs or the mass spectra. The optimal functioning conditions of these first nib emitter tips were determined to be a 10 μM sample concentration and a HV value of 1.8 kV.

A fragmentation experiment was thus carried out using a sample at 10 μM and a HV supply of 1.8 kV; the $[M + 2H]^{2+}$ species at m/z 571 was isolated in the trap (selection window width of 2 Th) and fragmented (normalized collision energy parameter of 30%, activation RF frequency factor set at 0.25). As before, TIC plots and MS/MS spectra were traced after 2 min acquisition and the mass spectra averaged. The intensity of the TIC signal and the fragmentation mass spectrum was high, with values of 3×10^8 arbitrary units and 3×10^6 arbitrary units, respectively. Figure 4 presents the mass spectrum obtained for the fragmentation of Gramicidin S under the aforementioned conditions and annotated with the sequence of the observed fragments. It should be noted that the fragmentation pattern obtained with a nib source was comparable to that observed with a standard emitter tip

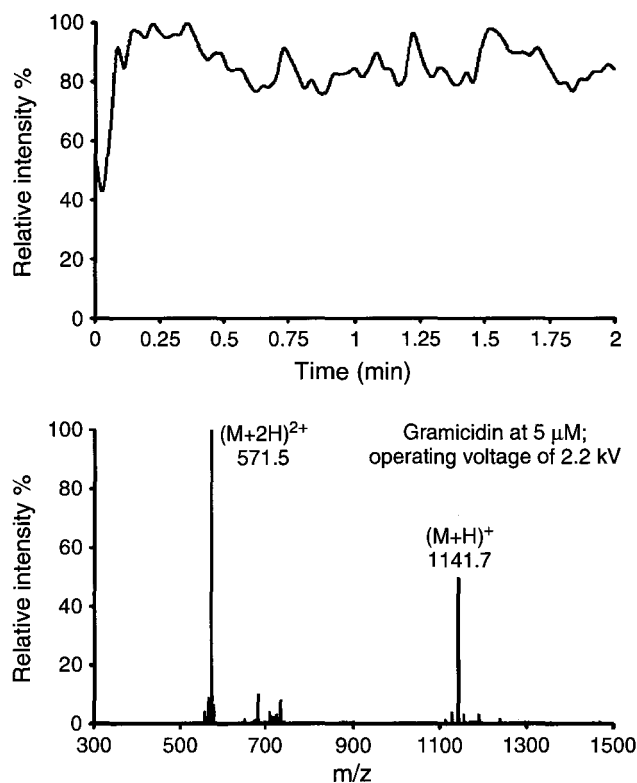


Figure 3. Mass spectrometry experiment using a micro-nib source; Gramicidin S sample at 5 μM and HV of 2.2 kV. Top: TIC signal recorded over a period of 2 min ($I_{\max} = 2.46 \times 10^{10}$); bottom: resulting mass spectrum averaged over this acquisition period ($I_{\max} = 3.10 \times 10^8$).

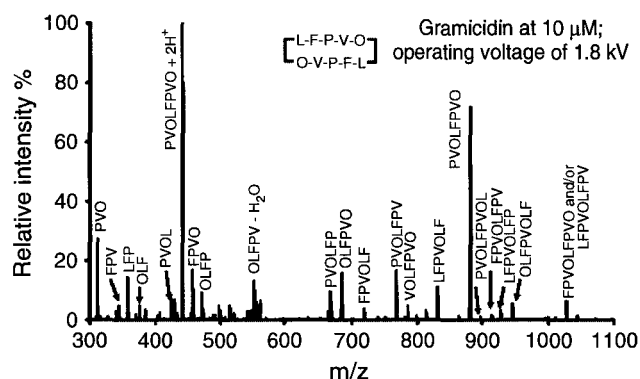


Figure 4. Fragmentation spectrum obtained using a first-generation micro-nib source; Gramicidin S sample at 10 μM and HV of 1.8 kV ($I_{\max} = 2.94 \times 10^6$).

(data not shown) and the mass spectra presented the same peaks with similar relative intensities.

The analytical performances of the micro-nib source were finally compared with those of standard emitter tips (Au/Pd-coated borosilicate emitter tips, ref. ES 380) from Protana (Odensee, Sweden). These sources were operated at 1 kV without any pressure assistance and with samples in the low-μM range. In addition to the better analysis conditions, the mass spectrum pattern observed exhibited a single unique peak corresponding to the doubly charged species at m/z 571.6.

We thus validated the idea of 2D microfabricated ionization sources with the shape of a nib; this appeared to be a reliable route for micromachining ionization sources. Unfortunately, the MS experiments showed that the optimal conditions for these micro-nib sources were still far from usual nanoESI conditions. Consequently, the micro-nib dimensions and design needed improving so as to be usable under better analysis conditions with a HV of the order of 1 kV. Therefore, a second series of micro-nib prototypes was designed and fabricated.

Second generation of micro-nib sources

For the second generation of micro-nib sources, there were two slot width values, 8 and 16 μm, smaller values than for the first series of micro-nib sources so as to enhance the analysis conditions. The capillary slot of the nib was also made narrower than the microchannel upstream to it, as shown in the photograph in Fig. 5. In addition, the micro-nib design was slightly changed; the nib feature was an entirely planar structure and it included a small microfluidic network upstream to the nib.

The mass spectrometry experiments were carried out following the same procedure as before. Due to the smaller slot dimensions, the test conditions could be improved: the Gramicidin S sample concentration was in the 1–10 μM range and the HV supply was lower than 1.5 kV. The performances of these sources were much improved compared with those of the first-generation micro-nib sources. Firstly, as mentioned above, the conditions were closer to nanoESI conditions with an average voltage around 1 kV and less concentrated samples; spray was still observed to be stable at an ionization voltage of 0.8 kV. Secondly, the overall performance was comparable to that of standard emitter tips. The signal was very intense and the S/N ratio was seen to be higher than with the first-generation micro-nibs and also better with the smaller nib slot width. Figure 6 shows typical mass spectra obtained with micro-nib sources with slot dimensions of 16 μm (top) and 8 μm (bottom). Thirdly, the spectra obtained with a 16 μm source, whose dimensions are close to those of the first-generation nib emitter tips, exhibited

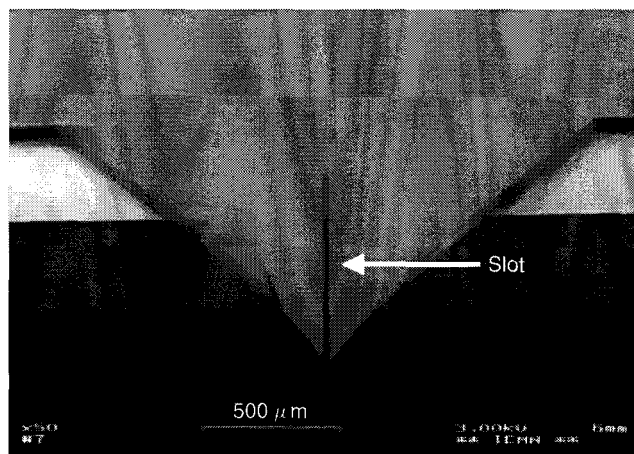


Figure 5. Photograph of a micro-nib source from the second generation (scanning electron microscopy). The capillary slot of the nib is clearly seen as a continuation of the outlet microchannel and is narrower than the latter.

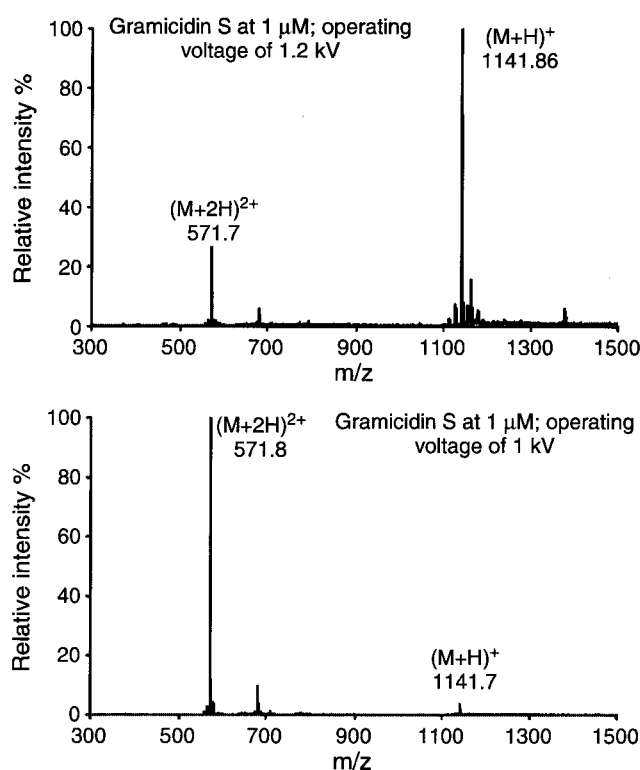


Figure 6. Mass spectra obtained using second-generation nib emitter tips. Top: Nib with a 16 μm slot width, HV of 1.2 kV and Gramicidin S sample at 1 μM ($I_{\text{max}} = 9.91 \times 10^6$); bottom: nib with a 8 μm slot width, HV of 1 kV and Gramicidin S sample at 5 μM ($I_{\text{max}} = 3.72 \times 10^8$).

a similar pattern with two peaks of comparable intensities at m/z 571.7 and 1141.9, whereas the spectra obtained with the smaller micro-nib sources (8 μm slot width) mainly presented a single peak at m/z 571.8 (Fig. 6, bottom) as obtained using a standard emitter tip. To investigate the influence of the slot dimension, we then carried out double tests under similar HV and peptide concentration conditions using micro-nib sources with slot widths of 8 and 16 μm , respectively. It was clearly shown that the pattern of the mass spectra was different depending on the nib slot width of the micro-nib where the spectra obtained with the 16 μm source always exhibited two peaks for the singly and the doubly charged ions of the Gramicidin S (Fig. 6, top), whereas the spectra observed with the 8 μm source had mainly one peak corresponding to the doubly charged species (Fig. 6, bottom), i.e. what could be referred to as a 'standard pattern'. We believe that this spectrum pattern is directly linked to the ionization pattern that is imposed by the source configuration and its dimensions. The source dimensions govern the size of the first-generation droplets that are created at the source tip during the electrospray phenomenon and the sample flow rate, the droplet size and the flow rate value, as already well known, have a significant influence on the ionization process.^{35–37} The standard emitter tips from Protana, once they are broken, have a 1–5 μm i.d., i.e. a dimension close to our 8 μm micro-nib source. The ionization pattern observed with both these sources should be similar. However, our 16 μm micro-nib source has a dimension source three times

larger; the Taylor cone and the resulting droplets created during the electrospray phenomenon are thus much larger, the flow rate is higher and, as a consequence, the ionization process is different.

CONCLUSIONS

In this work, we have designed, fabricated and tested novel emitter tips for electrospray ionization applications. They have a topology reminiscent of a fountain pen. The prototypes were fabricated using the SU-8 negative photoresist and the SU-8 nib feature was supported on a silicon wafer. The first series allowed us to validate the concept and the feasibility of such micro-nib sources. For the second series, the dimensions and design of the sources were reduced and improved according to our first experience with micro-nib sources. The micro-nib performances were, as expected, directly linked to their slot width value; the smaller the nib slot width, the better the performances and the closer to standard emitter tips. Mass spectrometry experiments demonstrated the reliability and the robustness of these nib emitter tips as well as their good performances relative to the standard needle sources. It should be noted that these spraying performances are state-of-the-art for microfabricated sources compared with former reports in literature. As for other aspects, such 2D sources should lend themselves well to analysis automation, as their use is much easier in terms of analysis preparation than standard needle-like emitter tips.

Acknowledgements

The authors would like to thank the French Network for Micro- and Nanotechnologies for their financial support (project named as 'Integrated Proteomics') as well as the GenHomme network (BioChipLab consortium). The Mass Spectrometry Facility used for this study is funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS and the Université des Sciences et Technologies de Lille. We would also like to thank Christophe Boyaval at IEMN for the SEM pictures and Adeline Page from the Mass Spectrometry Facility for her help with the ion trap mass spectrometer.

REFERENCES

- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; **246**: 64.
- Valaskovic GA, Kelleher NL, Little DP, Aaserud DJ, McLafferty FW. Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1995; **67**: 3802.
- Wilm MS, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* 1996; **68**: 1.
- Valaskovic GA, McLafferty FW. Long-lived metallized tips for nanoliter electrospray mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1996; **7**: 1270.
- McLafferty FW, Valaskovic GA. Electrospray ionization source and method of using the same. *US Patent* 5788 166, 1998.
- Feng B, Smith RD. A simple nanoelectrospray arrangement with controllable flow-rate for mass analysis of submicroliter protein samples. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000; **11**: 94.
- Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 1987; **78**: 53.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Anal. Chem.* 1988; **60**: 2299.

9. Cotter RJ. *Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research*. American Chemical Society: Washington, DC, 1997.
10. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003; **422**: 193.
11. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; **422**: 198.
12. Figeys D. Proteomics in 2002: a year of technical development and wide-ranging applications. *Anal. Chem.* 2003; **75**: 2891.
13. Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.* 2001; **101**: 269.
14. Berger SJ, Lee SW, Anderson GA, Pasa-Tolic L, Tolic N, Shen Y, Zhao R, Smith RD. High-throughput global peptide proteomic analysis by combining stable isotope amino acid labeling and data-dependent multiplexed-MS/MS. *Anal. Chem.* 2002; **74**: 4994.
15. Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J. Mass Spectrom.* 2001; **36**: 1083.
16. Ramsey RS, Ramsey JM. Generating electrospray from microchip devices using an electroosmotic pump. *Anal. Chem.* 1998; **70**: 3721.
17. Xue Q, Foret F, Dunayevskiy YM, Zavracky PM, McGruer NE, Karger BL. Multichannel microchip electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1997; **69**: 426.
18. Zhang B, Liu H, Karger BL, Foret F. Microfabricated devices for capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1999; **71**: 3258.
19. Griss P, Melin J, Sjoedahl J, Roeraade J, Stemme G. Development of micromachined hollow tips for protein analysis based on nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *J. Micromech. Microeng.* 2002; **12**: 682.
20. Sjoedahl J, Melin J, Griss P, Emmer A, Stemme G, Roeraade J. Characterization of micromachined hollow tips for two-dimensional nanoelectrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 337.
21. Schultz GA, Corso TN, Prosser SJ, Zang S. A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2000; **72**: 4058.
22. Licklider L, Wang XQ, Desai A, Tai YC, Lee TD. A micromachined chip-based electrospray source for mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2000; **72**: 367.
23. Tang K, Lin Y, Matson DW, Kim T, Smith RD. Generation of multiple electrosprays using microfabricated emitter arrays for improved mass spectrometric sensitivity. *Anal. Chem.* 2001; **73**: 1658.
24. Kim JS, Knapp DR. Microfabrication of polydimethylsiloxane electrospray ionization emitters. *J. Chromatogr. A* 2001; **924**: 137.
25. Kim JS, Knapp DR. Microfabricated PDMS multichannel emitter for electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001; **12**: 463.
26. Kim JS, Knapp DR. Miniaturized multichannel electrospray ionization emitters on polydimethylsiloxane microfluidic devices. *Electrophoresis* 2001; **22**: 3993.
27. Yuan C, Shiea J. Sequential electrospray analysis using sharp-tip channels fabricated on a plastic chip. *Anal. Chem.* 2001; **73**: 1080.
28. Gobry V, Oostrum J, Martinelli M, Rohner TC, Reymond F, Rossier JS, Girault HH. Microfabricated polymer injector for direct mass spectrometry coupling. *Proteomics* 2002; **2**: 405.
29. Rossier JS, Youhnovski N, Lion N, Damoc E, Becker S, Reymond F, Girault HH, Przybylski M. Thin-chip microspray system for high-performance Fourier-transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry of biopolymers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2003; **42**: 53.
30. Kameoka J, Orth R, Ilic B, Czaplewski D, Wachs T, Craighead HG. An electrospray ionization source for integration with microfluidics. *Anal. Chem.* 2002; **74**: 5897.
31. Lin L, Pisano P. Silicon processed microneedles. *IEEE J. Micromech. Sys.* 1999; **8**: 78.
32. Desai A, Tai Y-C, Davis MT, Lee TD. A MEMS electrospray nozzle for mass spectrometry. *Int. Conf. on Solid-State Sensors and Actuators, Transducers '97*, 1997.
33. Lin CH, Lee GB, Chang BW, Chang GL. A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photo resist. *J. Micromech. Microeng.* 2002; **12**: 590.
34. Arscott S, Le Gac S, Rolando C, Druon C, Tabourier P. A planar on-chip micro-nib interface for nanoESI-MS microfluidic applications. *J. Micromech. Microeng.* 2004; **14**: 310.
35. Cole RB. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Fundamentals, Instrumentation and Applications*. John Wiley: New York, 1997.
36. Wilm M, Mann M. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 1994; **136**: 167.
37. Juraschek R, Dülcks T, Karas M. Nanoelectrospray—more than just a minimized-flow electrospray ionization source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999; **10**: 300.



A micro-nib nanoelectrospray source for mass spectrometry

S. Arscott^{a,b,*}, S. Le Gac^b, C. Druon^a, P. Tabourier^a, C. Rolando^b

^a Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN), UMR CNRS 8520, Université des Sciences et Technologies de Lille, Cité Scientifique, Avenue Poincaré, 59652 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^b Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (LCOM), UMR CNRS 8009, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

Received 2 September 2003; received in revised form 2 September 2003; accepted 1 October 2003

Abstract

The design, fabrication and testing of a novel interface resembling a micro-nib for nano-electrospray ionisation–mass spectrometry (ESI–MS) applications is reported in this paper. The micro-nibs are fabricated in a planar topology using the negative photoresist SU-8 deposited onto silicon substrates. In order to direct the liquids to the nib tip, capillary slots with dimensions of $8\ \mu\text{m} \times 35\ \mu\text{m}$ and $16\ \mu\text{m} \times 35\ \mu\text{m}$ are included in the micro-nib design. The micro-nibs are fabricated so that they overhang from the edge of a silicon substrate in order to provide a reliable free-standing planar interface from a micro-fluidic circuit to a mass spectrometer. The micro-nib sources are tested on an ion trap mass spectrometer using standard peptide samples at concentrations down to $1\ \mu\text{M}$ and with a typical ionisation voltage of around 1 kV. In addition, the nibs function well when the voltage supply was decreased to a value of 0.8 kV. The resulting mass spectra are seen to have a good signal-to-noise ratio (S/N) comparable to those observed using classical emitter tips. The micro-nibs demonstrate state-of-the-art performances with respect to current micro-machined electrospray interfaces and are comparable to those obtained for stand-alone fused-silica-based emitter tips.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Nano-electrospray ionisation; Micro-fabrication; Micro-fluidic device; Lab-on-chip; μTAS ; SU-8; Mass spectrometry; Proteomics

1. Introduction

There is currently a rapid development in the area of micro-fluidic integrated circuits, often referred to in the literature as either 'Lab-on-a-chip' systems or 'micro total analysis systems (μTAS)' [1–3]. This is due to the fact that device miniaturisation is seen as a route for high-throughput analysis through increased automation thus leading to enhanced analysis conditions. Such systems require fully-integrated on-chip interfaces to and from the real world [4]. For example, when the micro-system is dedicated to biological applications and especially for the analysis of protein samples, the final detection step is performed using mass spectrometry (MS) techniques. Indeed, MS based on a soft ionisation mode is currently the most powerful technique for protein identification and characterisation. In addition to this, the analysis of the sample can be done on-line when the ionisation is performed in the electrospray ionisation (ESI) mode. However, coupling a micro-fluidic system to a mass spec-

trometer requires reliable and robust interfaces. The current standard interface to a mass spectrometer is based on thin, free-standing silica-based capillary tubes which consists of an ionisation emitter tip. Heat treatment and pulling techniques can provide a typical orifice end diameter for such a configuration of the order of 1–5 μm , but with a poor reproducibility from tip-to-tip. In addition to this, such techniques are not compatible with the current trends in on-chip fabrication of the micro-systems mentioned above [1–3]. One hybrid approach simply consists of mounting a capillary into a pre-defined output micro-channel in order to form the nano ESI–MS interface [5,6]. However, such hybrid methods can be cumbersome in terms of fabrication and pose problems if high yield processes are required. Firstly, such methods are not compatible with the preparation of high-density arrays of nano ESI sources. Secondly, these hybrid methods present two main disadvantages: dead volumes are created at the micro-system–MS interface which lead to a loss in the quality of the separation performed on the chip and, in addition to this, adhesives which are used to maintain the ionisation source in the micro-channel can induce chemical noise on the resulting mass spectra. Therefore the design, fabrication and optimisation of a reliable interface for

* Corresponding author. Tel.: + 33-3-20-19-79-79;

fax: + 33-3-19-78-98.

E-mail address: steve.arscott@iemn.univ-lille1.fr (S. Arscott).

micro-fluidic systems coupled to MS is a current technological challenge.

By using a micro-machining-type approach, improvements can be obtained without reverting to a capillary tube by integrating the ionisation source directly onto the micro-system. The reproducibility and robustness of nano ESI emitters are thus increased, along with a reduction of the production costs. Finally, using micro-technology techniques for the fabrication of ionisation emitter tips is fully compatible with batch production and thus the fabrication of high-density arrays for high-throughput analysis. Recently, several groups have described an on-chip ionisation source either directly from on-chip outlet channels [7–11] or by using a micro-fabricated source in the shape of a nozzle [12–17]. For the former method, direct spraying at the flat edge of a chip from either an open or closed outlet micro-channel can be obtained. However, the test liquid can spread around the channel opening and results have been somewhat inconclusive. For the latter method, on-chip ionisation sources are micro-machined directly onto the chip in order to mimic standard ionisation emitter tips. Such features can either be out-of-plane [12,13] or in-plane [14–17] with respect to the wafer surface. Out-of-plane free-standing nozzles have been fabricated using silicon micro-machining by deep reactive ion etching (DRIE) techniques [12,13]. In-plane or horizontal nozzles fabricated using SiO_2 and Si_3N_4 have been described [14,15]. Polymer-based planar nozzles have also been investigated [16,17].

In this paper we present a novel approach to this problem by the fabrication of a novel planar interface composed of a free-standing nib-like structure using the epoxy-based negative photoresist SU-8. The functioning of the nibs is much akin to that of a simple fountain pen in that they include a reservoir, a capillary slot and a nib-tip. The micro-nibs are fabricated in a planar (2D) fashion which is applicable to high batch production thus enabling excellent reproducibility of critical dimensions from device-to-device. We believe that such an interface, which has been tested in stand-alone conditions, is compatible with both micro-fluidic integrated circuits composed of channels and digital micro-fluidic circuits. In addition to this, the interfaces presented here are compatible with high throughput testing via robot sample loading.

2. Micro-nib design and fabrication

2.1. Micro-nib layout

Fig. 1 shows a schematic diagram of the design layout of the micro-nibs. The micro-nibs had four active parts: reservoirs measuring $2500\ \mu\text{m} \times 2500\ \mu\text{m} \times 35\ \mu\text{m}$, an open micro-fluidic channel, a capillary slot having a total length of $2000\ \mu\text{m}$, a width (w) and a height (h), and a micro-nib tip which overhangs the edge of a silicon wafer by varying lengths between 500 and $1000\ \mu\text{m}$. The reservoir contained

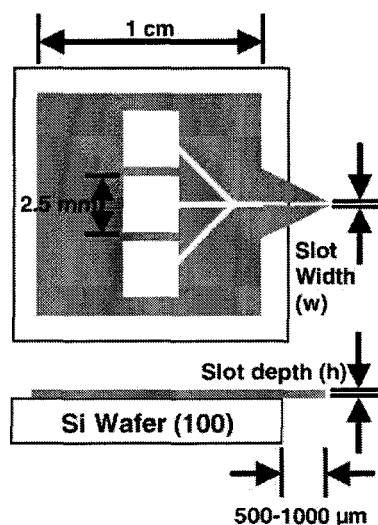


Fig. 1. Schematic diagram of micro-nib design fabricated using the negative photoresist SU-8 on a silicon substrate. (above) The slot width (w) on the mask was 8 and $16\ \mu\text{m}$. (below) Side-view of ESI-MS interface clearly showing the micro-nib overhanging the silicon wafer following wafer cleaving techniques.

the sample test liquid whilst the micro-fluidic channel and capillary slot lead the test liquid by capillary action from the reservoir to the overhanging nib tip. The nib tip is then placed at the inlet of the MS. The micro-nibs were micro-machined using the negative photoresist SU-8 (Microchem, MA USA). This photoresist is being increasingly used by the micro-fluidic community for the formation of micro-fluidic channels [18,19]. We have previously presented micro-nibs for Nano ESI fabricated in SU-8 using a 2.5D photolithographic method [20].

2.2. Nanospray emitter fabrication: SU-8 technology

The micro-nibs were fabricated in a planar technology using the epoxy-based negative photoresist SU-8 2035 on standard 3 in. silicon n-type substrates orientated (100). Fig. 2 shows the fabrication steps used to form the micro-nibs. Firstly, a $200\ \text{nm}$ thick nickel etch release layer was deposited onto the Si wafer surface via Ar plasma sputtering techniques (Plassys MP 450S). This nickel layer was then patterned photolithographically (Karl Suss MA750) to form a localised etch-release layer underneath the micro-nibs via standard UV photolithographic techniques (positive photoresist AZ1518 [$1.2\ \mu\text{m}$]) and an $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (1:3) wet etch. Following photoresist removal, the wafers were then fully dehydrated at $170\ ^\circ\text{C}$ for 30 min in order to ensure good adhesion of the SU-8 to the silicon surface. Micro-nibs were then fabricated having an SU-8 thickness of $35\ \mu\text{m}$. Care was taken during photoresist dispensing and spin-coating to achieve good surface planarity for the subsequent photolithographic step. Again, standard UV photolithographic techniques were employed in order to form the nibs in SU-8 which were composed of a capillary slot having an aspect

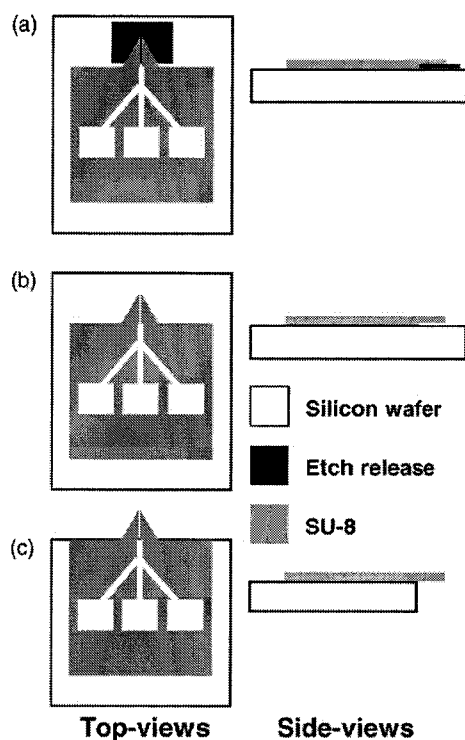


Fig. 2. Three-step process for the fabrication of the micro-nib structures: (a) nickel etch-release layer deposition followed by SU-8 2035 deposition, (b) etch-release of micro-nib using a nitric acid wet-etch, (c) wafer cleaving to ensure that micro-nib overhangs the edge of the silicon wafer.

ratio of >4 leading to the nib tip and micro-fluidic channels linking a main test liquid reservoir to the input of the capillary slot. A single photomasking step was used to form the micro-nibs. A 5 in. photomask was fabricated using an EBP G5000 + nanomasker (Leica, Chantilly, VA, USA) which contained a total of nine micro-nibs incorporated into the mask design in a 3×3 array (not shown here).

Table 1 shows the processing parameters used to form the planar micro-nibs using SU-8 technology. It can be noted that an exposure time of 20 s equates to 140 mJ/cm^2 , even though this figure is rather low compared to that quoted in the standard documentation (Microchem, Newton, MA, USA), we found this to give excellent feature definition. Indeed, the processing parameters, i.e. the pre-bake, post-bake and exposure times had been previously optimised in order to produce excellent feature definition.

The design contained two widths of capillary slots on the mask: 8 and $16 \mu\text{m}$. The photoresist SU-8 was used for these

Table 1
SU-8 2035 processing parameters used for the fabrication of the micro-nibs

	Values
Spread cycle of speed/acceleration/time (rpm/rpm s^{-1} /s)	500/100/30
Spin cycle of speed/acceleration/time (rpm/rpm s^{-1} /s)	3000/300/30
Pre-bake in hot plate ($^{\circ}\text{C/s}$)	95/300
Exposure time in UV lamp of 7 mW cm^2 (s)	20
Post-bake in a hot plate ($^{\circ}\text{C/s}$)	95/120
Hard bake	None

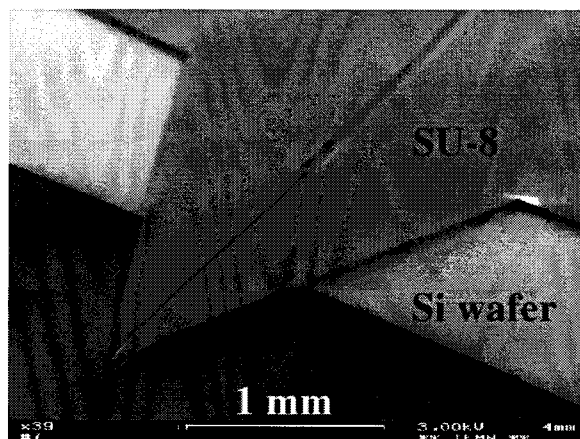


Fig. 3. SEM image of the nib-like structure fabricated using the negative photoresist SU-8. Wafer cleaving techniques leave the micro-nibs overhanging the edge of the silicon wafer providing an excellent planar nano ESI-MS interface.

tests as the ease of formation of durable objects with high aspect ratio features that helps the photoresist for the formation of such free-standing features with capillary slots for micro-fluidic applications. After development of the photoresist using the XP SU-8 developer (1-methoxy-2-propyl acetate), the nickel etch-release layer was etched using the nitric acid-based wet-etch ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$) described above. It should be noted that at this concentration, the process took a couple of hours in order to fully remove the nickel etch-release layer underneath the micro-nib tips, however a subsequent surface inspection showed that the resulting SU-8 structures were not affected by this etch. After careful drying, the individual systems were diced using a technique which ensures that the nib tips remained unaffected by the wafer cleaving and thus gave a high yield. This seemingly trivial step is however, an important parameter as the aim here was the development of a robust interface applicable to many micro-fluidic circuits, both micro-channel-based systems or digital micro-fluidic-based systems, which could be formed on a single wafer. Fig. 3 shows an SEM image (Hitachi S4700) of a typical micro-nib which has been fabricated for this study.

In order to further sharpen the nib-tip, we have investigated a 2.5D lithographic technique for the fabrication of the micro-nibs. This technique consists of varying the exposure angle during the photolithographic stage. Fig. 4 clearly shows that we were able to sharpen the nib-tip using this process whilst keeping the thickness of the SU-8 constant in order to assure a rigid free-standing structure.

3. Tests and discussion

3.1. Mass spectrometry tests: methods

The performances of the nib-like structures for electro-spray applications were studied on a LCQ Deca XP+ ion

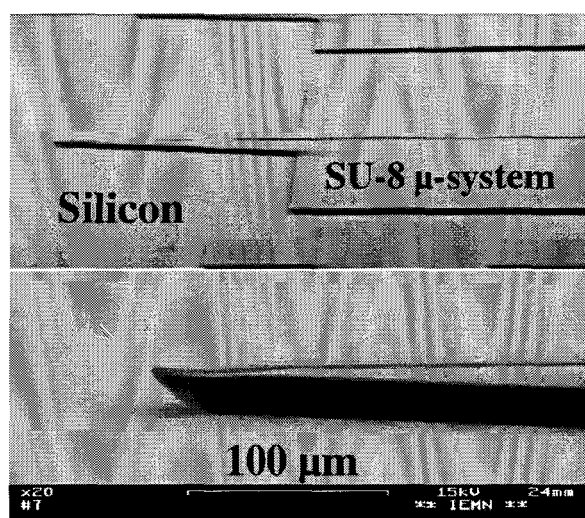


Fig. 4. Sharpening the micro-nib point via a 2.5D lithography technique (exposure angle 60°). Above: SEM shows side view of micro-system plus nib. Below: SEM shows zoom of the nib tip. Compensation of the exposure time has to be taken into account if exposure angles other than 0° are used.

trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). The silicon wafer which supported the nib-structure, was placed on a moving xyz part to be introduced in the ion-trap inlet (see Fig. 5). This moving part (not shown in Fig. 5) includes a metallic zone via which the ionisation voltage supply is usually applied on the emitter tip. The liquid test sample was dropped in the reservoir of the nib structure using a micro-pipette. Due to the relatively hydrophobic nature of the polymerised SU-8, we were able to contain a liquid sample volume of a few micro-litre in the reservoir, assuming a semi-hemispherical drop. A platinum wire then completed the contact from the metallic zone of the xyz moving part to the liquid reservoir of the nib structure for HV supply and thus allowing spray formation at the nib tip using the conductivity of the liquid sample along the

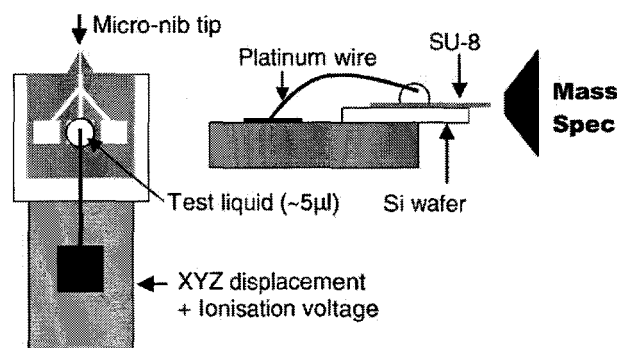


Fig. 5. Plan and side views of the set-up for the ESI-MS tests. One of the micro-nib reservoirs was loaded with the test liquid (volume $\sim 5 \mu\text{l}$) before being brought into proximity to the inlet of the mass spectrometer (MS). The high voltage (HV) was applied via the test liquid using a Pt wire in order to produce the ESI.

micro-fluidic channel and the capillary slot. However, it can be noted in passing that we have also performed successful MS tests by applying the voltage to the liquid via the semiconductor substrate, provided that this substrate is suitably doped either n-type or p-type. For the results shown here, we used a Pt wire that linked this metallic zone to the reservoir of the nib structure in order to test the micro-nibs; hence HV supply was applied directly to the liquid sample in the reservoir. The moving piece was then introduced in the ion trap mass spectrometer inlet and its position could be precisely adjusted with the xyz positioning stage. A camera mounted on the MS allowed us to check the nib positioning in front of the inlet and to visualise the formation of the Taylor Cone.

The test samples were solutions of a standard peptide, Gramicidin S; these samples were prepared from aqueous stock solutions of Gramicidin S at $100 \mu\text{M}$ diluted using a $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50), 0.1% formic acid-based solvent. Thus, samples at 1, 5 and $10 \mu\text{M}$ were used for the tests. HV supply was decreased from 1.5 to 0.8 kV for the tests presented here. For all experiments, the signal was recorded over a period of 2 min; then, the total ion current (TIC) signal and the mass spectra were plotted in the 300–1500 m/z range for this acquisition period using Excalibur software (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA).

3.2. Capillary action in the slot and wetting behaviour at the nib tip

Fig. 6(a) shows a photograph of the nib tip of a micro-nib taken using an optical microscope following introduction of

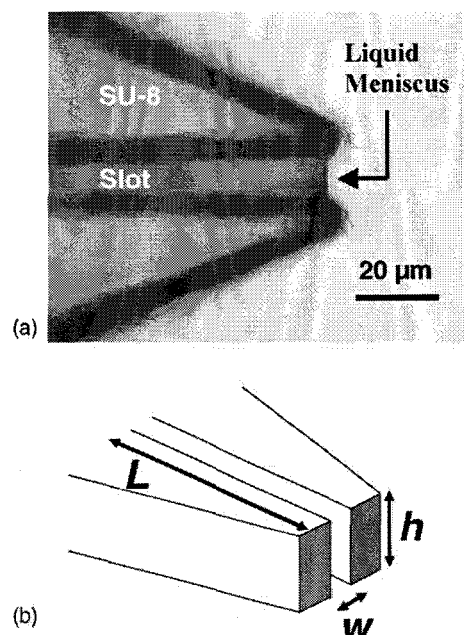


Fig. 6. (a) Optical microscope photograph showing that the test liquid is confined uniquely in the slot at the nib tip of the micro-nib for a $16 \mu\text{m}$ slot width; (b) schematic diagram of the capillary slot of the micro-nib showing the relevant dimensions: slot width (w), slot depth (h) and the slot length (L).

Table 2

Contact angle of test liquids on SU-8 2035 (as processed in this article, see Table 1)

Test liquid	Contact angle (α) on SU-8 ($^{\circ}$)
De-ionised H ₂ O	79
H ₂ O/CH ₃ OH/CH ₂ O ₂ (50%:50%:1%)	61

a test liquid, de-ionised (DI) water, into one of the on-chip reservoirs. In this case the slot width (w) was 16 μm and the slot thickness (h) was 35 μm . The capillary slot of the micro-nib has critical dimensions as shown in Fig. 6(b). As the micro-nib is presented to the MS horizontally, the effect of gravity on the capillary height is negligible. Indeed, the factors which determine whether or not the capillary slot is filled are the following: (i) the contact angle, α , of the test liquid on SU-8; (ii) the surface tension of the test liquid, γ and (iii) the dimensions of the capillary slot (w and h). The classic ‘capillary rise’ equation shown in Eq. (1) [21] for a capillary tube describing the height of rise of a liquid (h_r) where ρ is the density of the liquid, g the acceleration due to gravity and r the inner radius of the capillary tube, implies that the cosine of α should be positive to ensure that the liquid enters the capillary slot, this is true even in the absence of gravity [22].

$$h_r = \frac{2\gamma\cos(\alpha)}{\rho gr} \quad (1)$$

$$\gamma\cos(\alpha) = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (2)$$

Firstly, if $\alpha < 90^{\circ}$, then following Young’s equation, given in Eq. (2) [21], this implies that $\gamma_{SV} > \gamma_{SL}$ and thus the solid–liquid interaction is more favourable than the solid–vapour interaction. Whereas for a capillary tube Eq. (1) involves the term r , in the case of a capillary slot

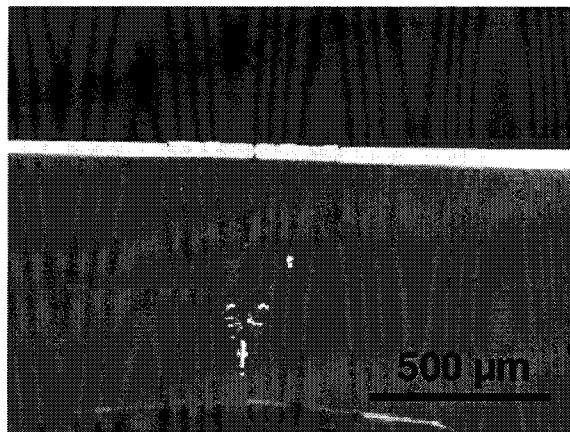


Fig. 7. Photograph taken from the top of the micro-nib during interfacing to a mass spectrometer. The micro-nib source has a slot width (w) of 16 μm , a slot depth (h) of 35 μm and a slot length (L) of 2000 μm . The Taylor Cone is clearly seen, thus demonstrating the formation of an electrospray whose dimensions are determined by the slot dimensions w and h .

the dimensions of the slot will determine if the slot is to be filled. If the liquid does indeed fill the slot, a liquid-bridge will be formed between the two walls of the micro-nib slot [23]. We can define an aspect ratio (R) from the system of the slot depth (h) divided by the slot width (w). Clearly R must exceed some critical value before the micro-nib slot is filled, i.e. the formation of the liquid bridge must be energetically favourable. For both micro-nibs, i.e. slot dimensions of 8 $\mu\text{m} \times 35 \mu\text{m}$ ($R = 4.4$) and 16 $\mu\text{m} \times 35 \mu\text{m}$ ($R = 2.2$), the test liquid was seen to reach the free-standing nib tip instantaneously under optical microscope observations. However, we have tested a micro-nib having slot dimensions of 24 $\mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$ ($R = 0.6$), i.e. by using a thinner coating of SU-8 during the fabrication process, in

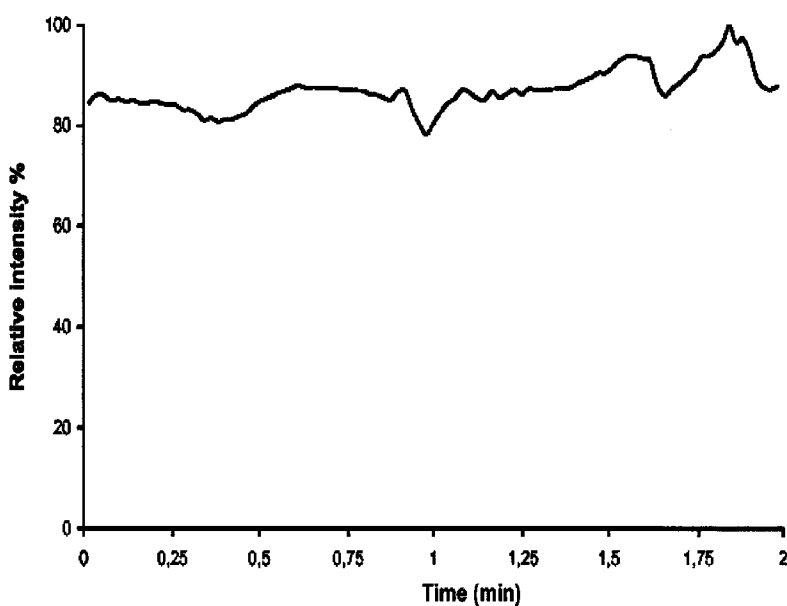


Fig. 8. Total ion current (TIC) signal observed with a nib-like source. Slot width (w) of 8 μm , Gramicidin S sample of 5 μM and HV supply of 1 kV.

this case the test liquid did not fill the slot. We thus conclude that for future fabrication, the aspect ratio should exceed that of 1.

In addition to this factor, it can be clearly seen that due to the fact that the SU-8 is neither particularly hydrophobic nor hydrophilic for pure de-ionised water or the test solvent solution used for the MS tests ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50) + 0.1% formic acid (HCOOH), see Table 2, the test liquid does not spread around the nib tip when the liquid is present in the slot of the micro-nib. Indeed, the meniscus is clearly visible in Fig. 6 demonstrating a contact angle of the order of 79° for DI H_2O . This is in contrast to standard ESI-MS sources based on SiO_2 , which are natu-

rally hydrophilic, and can lead to the test liquid spreading around the edge of the source, leading to degraded performances.

3.3. MS tests: results

Once the nib-like source was loaded with a few microlitres of the Gramicidin S sample (Sigma, l'Isle Abeau, France) and introduced into the MS inlet, the fluid was seen to be moving along the capillary slot and arrive at the tip of the nib. Following this, the HV supply was applied to the Pt wire and the camera on the ion trap allowed to observe the formation of the Taylor Cone, a clear indication of the

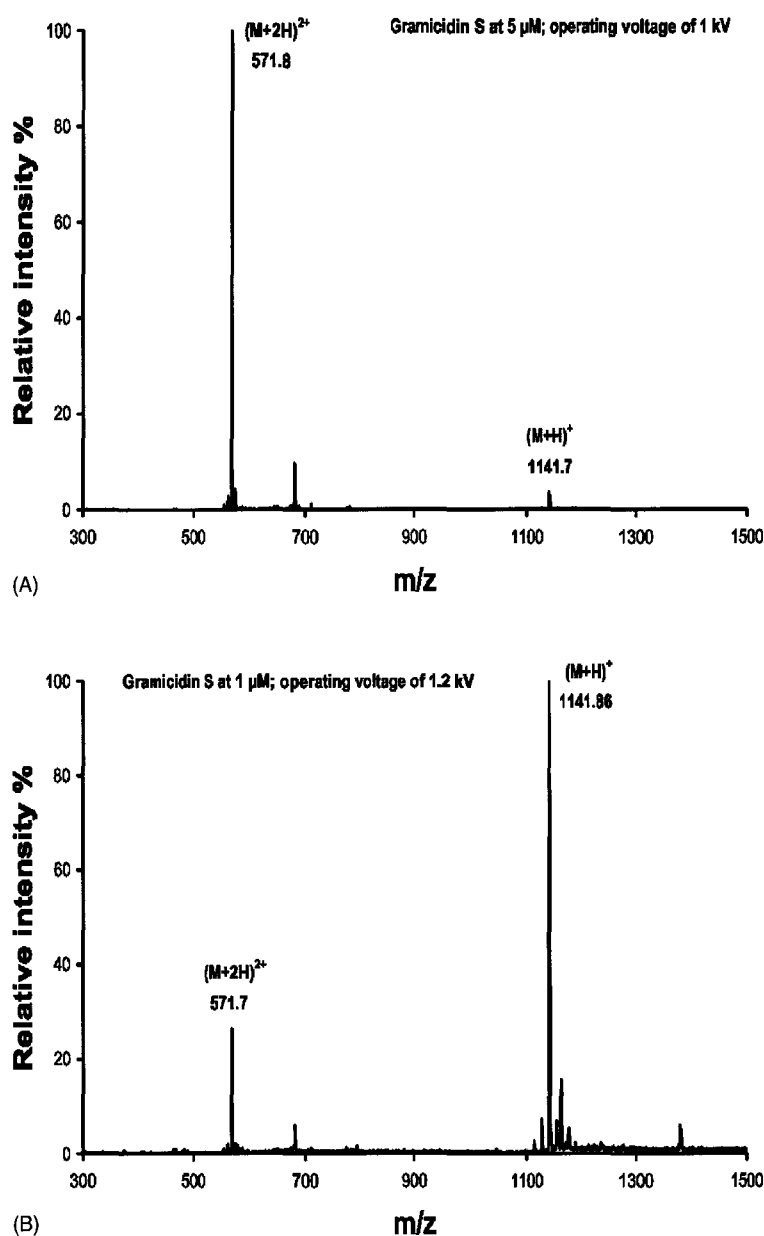


Fig. 9. Mass spectra obtained with micro-nib sources of two dimensions, (A) source with $8\ \mu\text{m} \times 35\ \mu\text{m}$ slot dimensions (HV supply of 1 kV, Gramicidin S at 5 μM), (B) source with $16\ \mu\text{m} \times 35\ \mu\text{m}$ slot dimensions (HV supply of 1.2 kV and Gramicidin S sample of 1 μM).

electrospray phenomenon. The Taylor Cone size was seen to be determined by the slot width (w) at the nib tip; hence, it was observed to be smaller for the nib emitter with a $8\ \mu\text{m}$ capillary slot width. Fig. 7 shows a photograph of the electro-spraying observed using nib-like sources with a $16\ \mu\text{m}$ slot width.

Good stability of the spray was observed, this is reflected by the stability of the TIC signal which was recorded for the experiments during interfacing to the MS. This demonstrates the capability of the source for electro-spraying and the quality of the spray. The stability was observed under a variety of conditions used for the tests, it was even achieved using an ionisation voltage of $0.8\ \text{kV}$. Fig. 8 represents the TIC signal observed with the nib source with a $8\ \mu\text{m}$ slot width; the HV supply was of $1\ \text{kV}$ and the peptide sample here was of $5\ \mu\text{M}$.

The resulting mass spectra were then plotted as shown in Fig. 9. All the spectra exhibited two main peaks corresponding to the singly - and doubly-charged species of the Gramicidin S, respectively, at $m/z\ 1141.7$ and $m/z\ 571.8$. In addition, the signal-to-noise ratio (S/N) was comparable to that which is observed for results obtained with a standard emitter tip. Nevertheless, it should be noted that the intensity ratio for the two peaks depended on the analysis conditions, the ionisation voltage, the Gramicidin S concentration, the source position but mostly on the source dimension, as will be discussed in detail elsewhere [21]. This is demonstrated in Fig. 9, which presents the spectra obtained with a sample of Gramicidin S at 5 and $1\ \mu\text{M}$, and a $1\ \text{kV}$ HV ionisation voltage using the two types of micro-nib sources, (A) the source with a $8\ \mu\text{m}$ slot and (B) this with a $16\ \mu\text{m}$ slot.

The intensities obtained both on the TIC signals and the mass spectra and the overall performances of the micro-nib sources were in good concordance with the intensities observed on spectra obtained under normal conditions i.e. using a standard emitter tip. This was proved by a comparison test which we have performed with one micro-nib source and one of the Protana needle-like sources we use routinely in the lab. In addition, the conditions of the tests were similar to the usual conditions of nano ESI analysis in terms of HV supply values (around $1\ \text{kV}$) and peptide concentrations (a few micro-litre). Even in the extreme conditions, the Gramicidin S peptide could be unambiguously identified as there was no marked decrease of the S/N and as there was no emerging parasite peaks on the resultant mass spectrum which could have made the interpretation difficult, i.e. the identification of the specific peptide uncertain. We have validated here the functioning of micro-nib sources in stand-alone conditions to replace standard emitter tips. We saw that this nib-like design was fully compatible with high-throughput analysis and its automation by the use of robotics. This is accounted for the easier loading of the micro-nib sources by simply dropping the solution to be analysed into the reservoir and also as these sources do not need breaking in order to be used.

4. Conclusions

We have designed, fabricated and tested a novel planar nano ESI-MS world-to-chip interface. The design is based on the idea of a micro-nib containing a reservoir and a capillary slot which leads a test liquid from the reservoir to the free-standing micro-nib tip, the working of which is analogous to that of a fountain pen. Micro-machining techniques employing the negative photoresist SU-8 have been used to fabricate the micro-nibs on silicon substrates. A novel etch release technique involving a sacrificial layer is described which enables the fabrication of free-standing membrane like nib tips which overhang the edge of the silicon wafer. Micro-nibs having capillary slot dimensions of $8\ \mu\text{m} \times 35\ \mu\text{m}$ and $16\ \mu\text{m} \times 35\ \mu\text{m}$ have been fabricated in order to perform direct MS tests. The resulting mass spectra experiments showed the reliability of the micro-machined ESI emitter tips, the S/N and the peak intensity being comparable to those observed for standard fused-silica nano ESI sources. In addition, the performances of the nib sources were seen to be linked to the slot dimensions; the smaller the slot dimension, the better the performances. Such micro-nibs can be readily used in stand-alone mode, sample loading achieved via robotics in order to increase analysis through-put. We are currently working to integrate such micro-nibs into on-chip micro-fluidic systems and also to reduce micro-nib dimensions in order to produce fully integrated interfaces which function at lower working voltages.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support of the 'Ministère de l'Industrie: Bio-Ingénierie 2001-Réseau Genhomme' and also that of the 'Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies: Réseau Micro et Nanotechnologies'. The Authors would like to thank M. Gaudet for technical assistance and C. Boyaval (IEMN) for his skill in obtaining clear SEM images.

References

- [1] S. Shoji, S.N. Akagaawa, M. Esashi, Micropumps and sample injector for integrated chemical analysis systems, *Sens. Actuat. A* 21 (1990) 189–192.
- [2] B.H. Vander Schoot, S. Jeanneret, A. Vanden Berg, N.F. de Rooij, Modular set-up for a miniaturized chemical analysis system, *Sens. Actuat. B* 15 (1993) 211–213.
- [3] M. Richter, A. Prak, J. Naundorferberl, H. Leeuwis, P. Woias, A. Steckenborn, A chemical micro-analysis system as a micro-fluid system demonstrator, in: *Proceedings of the Transducers, Chicago, IL, USA, 1997*, pp. 303–306.
- [4] M. Koch, A. Evans, A. Brunnschweiler, in: R. Pethig (Ed.), *Micro-fluidic Technology and Applications*, Research Studies Press, UK, 2000, pp. 151–287 (Chapter 6).
- [5] D. Figeys, D.Y. Ning, R. Aebersold, A micro-fabricated device for rapid protein identification by micro-electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3153–3160.

- [6] N.H. Bings, C. Wang, C.D. Skinner, C.L. Colyer, P. Thibeault, D.J. Harrison, Micro-fluidic devices connected to fused-silica capillaries with minimal dead volume, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3292–3296.
- [7] Q. Xue, F. Foret, Y.M. Dunayevskiy, P.M. Zavracky, N.E. McGruer, B.L. Karger, Multichannel microchip electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 69 (1997) 426–430.
- [8] R.S. Ramsey, J.M. Ramsey, Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1174–1178.
- [9] B. Zhang, H. Liu, B.L. Karger, F. Foret, Micro-fabricated devices for capillary electrophoresis–electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3258–3264.
- [10] C. Yuan, J. Shiea, Sequential electrospray analysis using sharp tip channels fabricated on a plastic chip, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1080–1083.
- [11] J. Kameoka, R. Orth, B. Ilic, D. Czaplowski, T. Wachs, H.G. Craighead, An electrospray ionisation source for integration with micro-fluidics, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5897–5901.
- [12] G.A. Schultz, T.N. Corso, S.J. Prosser, S. Zhang, A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4058–4063.
- [13] P. Griss, J. Melin, J. Sjobahl, J. Roeraade, G. Stemme, Development of micro-machined hollow tips for protein analysis based on nano-electrospray ionisation mass spectrometry, *J. Micromech. Microeng.* 12 (2002) 682–687.
- [14] A. Desai, Y-C Tai, M.T. Davis, T.D. Lee, Electrospray nozzle for mass spectrometry, in: *International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Transducers'97*, Chicago, IL, USA, 1997.
- [15] L. Lin, P. Pisano, Silicon processed micro-needles, *IEEE J. Micromech. Sys.* 8 (1999) 78–84.
- [16] J.S. Kim, D.R. Knapp, Micro-fabricated PDMS multichannel emitter for electrospray ionisation mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 463–469.
- [17] V. Gobry, J. Oostrum, M. Martinelli, T.C. Rohner, F. Reymond, J.S. Rossier, H.H. Girault, Micro-fabricated polymer injector for direct mass spectrometry, *Proteomics* 2 (2002) 405–412.
- [18] J. Zhang, K.L. Tan, G.D. Hong, L.J. Yang, H.Q. Gong, Polymerization optimisation of SU-8 photoresist and its applications in micro-fluidic systems and MEMS, *J. Micromech. Microeng.* 11 (2000) 20–26.
- [19] C.-H. Lin, G.-B. Lee, B.-W. Chang, G.-L. Chang, A new fabrication process for ultra-thick micro-fluidic micro-structures utilizing SU-8 photo resist, *J. Micromech. Microeng.* 12 (2002) 590–597.
- [20] Séverine Le Gac, Cécile Cren-Olivé, Christian Rolando and Steve Arscott A novel nib-like design for microfabricated nanospray tips, *J. Amer Soc. Mass Spectrom.*, in press.
- [21] T. Young, An essay on the cohesion of fluids, *Philos. Trans. Soc. Lond.* 95 (1805) 65–87.
- [22] A.E. Lord Jr., Capillary flow in the geotechnical centrifuge, *Geotech. Test. J.* 22 (4) (1999) 292–300.
- [23] A. Valencia, M. Brinkmann, R. Lipowski, Liquid bridges in chemically structured slit pores, *Langmuir* 17 (11) (2001) 3390–3399.

Biographies

Steve Arscott was born in Plymouth (UK). He received a B.Eng.(hons) in Electrical and Electronic Engineering from the University of Ply-

mouth in 1989. He then obtained an M.Sc. and Ph.D. in Electrical and Electronic Engineering from the University of Manchester Institute of Science and Technology (UMIST), Manchester (UK) in 1990 and 1994, respectively. After working as a Research Fellow at the Institute of Microwaves and Photonics, University of Leeds (UK) he joined the Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN), Université de Sciences et Technologies de Lille (USTL, France) in 1998 as a Research Scientist. His current research interests are the design, fabrication and development of micro-fluidic devices, circuits and world-to-chip interfaces for applications in the sphere of 'lab-on-chip'.

Séverine Le Gac received a MS degree in biology and chemistry from the Doctoral School at the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (France) in 2000. During this time, she also worked on the synthesis and the test of inhibitors of a zinc metalloprotease, TACE, in a CEA laboratory, Saclay (France). She then received an Engineering degree with a specialisation in chemistry from the Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles, Paris (France). She is currently preparing a PhD on micro-fluidic devices to be connected to ESI-MS at the University of Lille (France).

Christian Druon received the degree in engineering from the conservatoire National des Arts et Métiers, Lille, France in 1970 and the Ph.D. degree in Physics from the University of Lille, in 1984. In 1991 he was appointed Professor at the University of Valenciennes. Since 1996 he has been a research scientist at the University of Lille. He is also with the Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN), Villeneuve d'Ascq, France. His current research interests are the design, fabrication and development of MEMS and microfluidic elements, devices and circuits for applications in the area of 'lab-on-a-chip'.

Pierre Tabourier obtained a Ph.D. in Physics from the University of Lille in 1984. Since 1991 he is an appointed Professor at the Université du Littoral Côte d'Opale, France. He also is working as a research scientist at the Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN). His current research interests are micro-fluidics and design of lab-on-chip systems devoted to protein study by Mass Spectrometry.

Christian Rolando was born in Marseille (France). He studied Physics and Chemistry at the Ecole Normale Supérieure and obtained a Ph.D in Chemistry at the University Pierre et Marie Curie (Paris 6) under the supervision of Professor Marc Julia. He has been involved in research joining analytical chemistry and organic chemistry for 30 years. He has worked in the field of mass spectrometry in which he developed the widely used methods such as the so-called thioacidolysis for lignin structural analysis, new instrumentation concepts, for example, the ion trapping in linear quadrupole and demonstrated several properties of ESI like the pulsed character of current. He has published more than 150 research papers which have been cited over one thousand times. He is currently the Director of the joint Mass Spectrometry and Proteomics facility at the Lille Genopole and the Université des Sciences et Technologiques de Lille. His current research interest are focused in the use of proteomics and the development of new tools for increasing sensitivity and throughput.

Séverine Le Gac¹
Steve Arscott^{1,2}
Christian Rolando¹

A planar microfabricated nanoelectrospray emitter tip based on a capillary slot

¹Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, Université des Sciences et Technologies de Lille

²Institut d' lectronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN), Villeneuve d'Ascq, France

We report on the fabrication and testing of planar nib-like structures for nanoelectrospray ionization-mass spectrometry (nanoESI-MS) applications. The micro-nib structures were fabricated on silicon substrates using the negative photoresist SU-8; they include capillary slots with widths of 8 and 16 μm . A suitable wafer cleaving step made the nib-like structures overhang the edge of a silicon substrate to provide a robust interface for nanoESI-MS applications; this freeing of the nib tip from the wafer surface created a point-like structure that is essential to establish an electrospray. The micro-nib sources were successfully tested on an LCQ Deca XP+ ion trap mass spectrometer using peptide samples at concentrations down to 1 μM . The high voltage was applied using a platinum wire inserted in the sample reservoir upstream to the capillary slot. A Taylor cone was clearly seen at the nib tip. The micro-nibs performed well at voltages as low as 0.8 kV; such performances are state-of-the-art with respect to current micromachined ESI-MS interfaces and are conditions comparable to those used for standard emitter tips. In addition, we clearly observed the influence of the micro-nib slot width on the ionization performances: the narrower the slot, the better the performances.

Keywords: Microfabricated emitter tip / Microfluidics / Miniaturization / Nanoelectrospray ionization
DOI 10.1002/elps.200305664

1 Introduction

Microtechnology is becoming increasingly used in the fields of biology and chemistry [1–8] for miniaturizing analytical tools. This revolution, much akin to that in the microelectronics industry some decades ago, is explained by the inherent advantages of microtechnology, e.g., the reproducibility of the microfabricated devices, the possibility of batch production and fabrication of high-density devices on a single wafer [9, 10]. In addition, a number of materials, designs, and processes are conceivable [11–15]. As well as this gain in the device quality, the decrease in dimensions achieved using microtechnology techniques goes hand in hand with enhanced analysis conditions and performances [7, 8] and a further gain in sensitivity. Lastly, the current need for high-throughput analysis and automation is fulfilled as microfabricated devices lend themselves well to a robotic interface [8,

16]. High-throughput analysis is much needed in the field of proteomics due to the massive amount of proteins to be analyzed and characterized [17, 18]. The conventional methodology for studying proteins, the so-called proteomics approach [19, 20], relies on a final analysis step using mass spectrometry (MS) techniques [21] as MS is currently the most powerful analytical tool for the study of proteins [21–24]. As a result, new tools which are compatible with the use of robotics are essential for MS analysis and especially MS analysis based on electrospray ionization (ESI). ESI is usually performed using needle-like emitter tips fabricated in glass or fused-silica [25, 26]; nonetheless, such sources present a number of inherent disadvantages. Firstly, their fabrication techniques are not well controlled, resulting in a lack of reproducibility and robustness of the tips which reflects itself in the analysis quality. In addition, their design is not compatible with the use of robotics, but dictates an entirely manual process.

A recent idea consists in fabricating emitter tips using microtechnology techniques for the aforementioned reasons, the expected tip reproducibility, batch production and the gain in analysis sensitivity and quality. The gain in sensitivity, that goes together with decreasing dimensions, is particularly true for ESI-MS analysis: the less sample, the better the analysis performances [25–29]. A

Correspondence: Dr. Christian Rolando, Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille 1), Bâtiment C4, 2 me  tage, UPRESA CNRS 8009, Chimie Organique et Macromoléculaire, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France
E-mail: christian.rolando@univ-lille1.fr
Fax: +33-3-2033 6136

Abbreviations: HV, high voltage; SEM, scanning electron microscopy; TIC, total ion current

number of microfabricated nanoESI emitter tips have already been described in the literature; they are based on different materials and result from various microtechnological processes. However, they obey two main types of designs, one being similar to the needle-like shape of standard emitter tips whereas the other is rather a point-like structure machined at the end of a microchannel. Needle-like micromachined emitter tips have been fabricated in silicon [30–32], silicon nitride [33, 34], parylene [35], and polycarbonate [36]. Point-like structures in parylene [37], polyimide [38, 39], polyethylene terephthalate (PET) [40], polydimethyl siloxane (PDMS) [41–43] as well as polymethylmethacrylate (PMMA) [44] were reported. Nonetheless, among these microfabricated nano-ESI tips, none is reported to work under true nano-ESI conditions (low 1 kV high voltage (HV)); in general, the ionization voltage is much higher than 1 kV. In addition, these are generally complicated structures fabricated with time-consuming processes.

We recently described a novel approach to address the microfabrication of nano-ESI emitter tips (Arscott *et al.*, submitted; Le Gac *et al.*, submitted) by fabricating a nib-like structure. The microfluidics of the device we propose work along the lines of the basic nib of a fountain pen [45]. These micro-nib sources were fabricated using the epoxy-based negative photoresist SU-8; however, the first prototypes presented large dimensions at the tip compared to standard emitter tips and thus needed improving so as to exhibit better analytical performances. In this paper, we present another series of 2-D micro-nib sources having an improved design and smaller source features which suit nanospray ionization conditions, *i.e.*, an HV supply of around 1 kV. Their fabrication relies once more on the use of the photoresist SU-8 as this material is appropriate for the rapid production of prototypes [46]. The test liquid is guided *via* capillary action through a microchannel to the nib tip, where electro spraying occurs.

2 Materials and methods

2.1 Photomask design

The photomask used to fabricate the micro-nibs for this study was designed using the software Wavemaker® (BML, London, UK). In brief, nine micro-nibs were incorporated into the mask design in a 3 × 3 array. An in-house 5" photomask has been produced using an EBP G5000+ nano-masker (Leica, VA, USA). The design of the micro-nibs incorporated three active parts: (i) a reservoir for the test liquid measuring 500 μm × 500 μm × 35 μm, (ii) a capillary slot having a length of 2 mm, and (iii) a nib-tip which

overhangs the edge of a silicon wafer ensuring a point-like effect. The reservoir contains the sample test liquid whilst the capillary slot leads the test liquid by capillary action from the reservoir to the overhanging nib tip towards the MS. The nib tips were 2.7 mm long with a 40° point angle. The micro-nib outside dimensions were 1 cm × 1 cm to enable easy handling and mounting and thus to facilitate the MS tests.

2.2 Fabrication technology

A schematic diagram for the fabrication of the micro-nibs is shown in Fig. 1. The nibs were fabricated in a planar fashion using the epoxy-based negative photoresist SU-8 (Microchem, Newton, MA, USA) (49, 50) on 250 μm thick 3-inch silicon n-type substrates orientated (100). Firstly, the wafers were dehydrated at 170°C for 30 min in order to ensure good adhesion of the SU-8 to the silicon surface. A single 35 μm thick layer of SU-8 2035 was then spin-coated (3000 rpm/300 rpm⁻¹/30 s) onto the silicon wafer following an initial spread cycle (500 rpm/100 rpm⁻¹/30 s) using a volume of approximately 5 mL of SU-8 dispensed using a pipette onto the center of the wafer using an AC3 spin-coater (Karl Suss MicroTec, Munich, Germany). The photoresist was then prebaked using a prelevelled hot-plate for 5 min at 95°C (Fig. 1A). It can be noted that such a relatively thin coating of SU-8

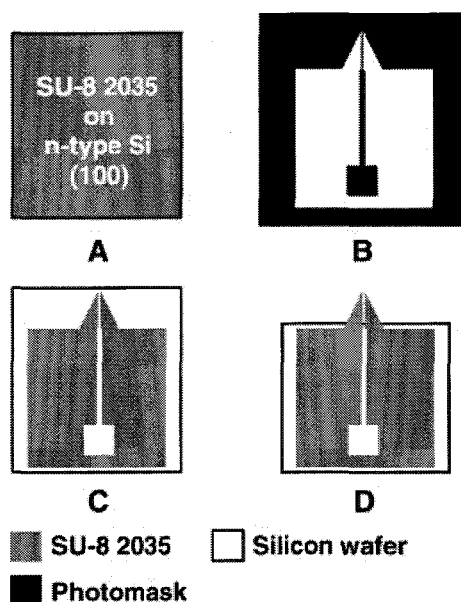


Figure 1. Fabrication procedure for the production of the micro-nib electro spray sources. (A) SU-8 spin-coating on a silicon wafer, (B) single-step standard UV photomasking stage, (C) definition of micro-nibs *via* photoresist development, and (D) wafer dicing to ensure that micro-nibs overhang the edge of the silicon wafer.

produces no observable wafer bowing. A single photomasking stage was then required in order to define the shape of the micro-nibs using the photomask and exposure to UV radiation using an MA6/BA6 UV masker (Karl Suss MicroTec). It should be noted at this point that no complicated alignment was needed to form the micro-nibs since a single-step photomasking procedure was used. In addition to this, the fabrication time, which is a critical manufacturing parameter, was very short due to the relative ease of SU-8 processing, *i.e.*, the fabrication required no molding or intricate assembly stage which may necessitate alignment of complex parts and thus could jeopardize the critical dimensions of the source. Figure 1B shows one element of the one-step photomask used to fabricate the micro-nibs. Following UV exposure ($20 \text{ s} / 7 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$), a post-bake of the SU-8 was performed for 2 min at 95°C using a hot-plate. The non-exposed SU-8 was then developed in the standard off-the-shelf XP SU-8 developer (1-methoxy-2-propyl acetate) solution (Fig. 1C). Excellent feature definition was obtained due to the optimization of the processing parameters mentioned above, *i.e.*, the prebake time, the UV exposure dose, the postbake time, and the development time. There were two widths of capillary slots on the mask: $8 \mu\text{m}$ and $16 \mu\text{m}$; in the case of the smallest dimension, the capillary slot had an aspect ratio of > 4 . The photoresist SU-8 was chosen for the fabrication of these structures due to the ease of formation of high aspect ratio features which facilitate the production of such capillary slots for microfluidic applications. After careful drying using dry nitrogen, the individual systems were diced so that the nibs overhung the edge of the silicon wafer

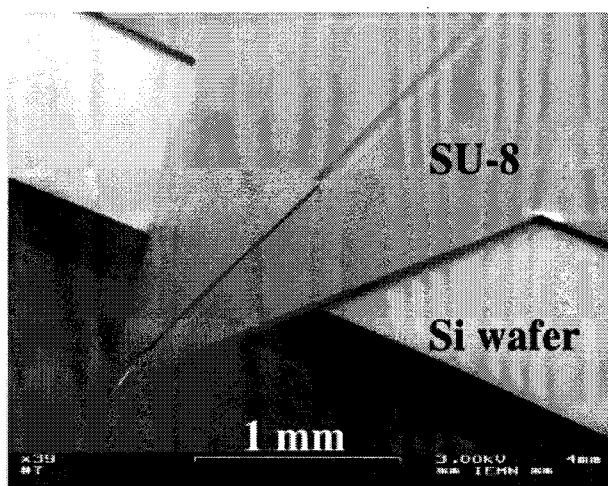


Figure 2. SEM image of the nib-like structures fabricated using the negative photoresist SU-8. Wafer cleaving techniques leave the micro-nibs overhanging the edge of the Si wafer providing an excellent planar nano-ESI-MS interface.

(Fig. 1D) and that they were unaffected by the wafer cleaving. In this way, the SU-8 nib tips were seen to overhang the edge of the silicon wafer, thus producing free-standing membrane-like features. Figure 2 shows a scanning electron microscopy (SEM) image of a typical micro-nib which can be fabricated using the technique described in Fig. 1.

2.3 Mass spectrometry

For nanoelectrospray applications, the nib-like structures were tested on a LCQ Deca XP+ ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). The silicon wafer which supported the nib-structure was mounted on a moving component to be introduced into the ion trap inlet (Fig. 3). This moving piece includes a metallic zone on which HV is applied for ESI-MS experiments. The silicon wafer was carefully isolated from this metallic zone so as to prevent from any possible effects during nanoelectrospray due to the semiconducting properties of the Si. A platinum wire was connected to this metallic zone and inserted into the liquid reservoir of the micro-nib structure for HV supply (Fig. 3). The test sample was dropped into the reservoir of the micro-nib structure using a micropipette, typically $2\text{--}5 \mu\text{L}$ being dropped in the reservoir per test. Following this, the moving component was introduced in the ion trap mass spectrometer inlet and its position was precisely adjusted using the *xyz* micropositioning translational stage. In addition, the camera mounted on the mass spectrometer allowed us to check the nib positioning in front of the inlet and to visualize the electrospray phenomena and the Taylor cone formation after applying the HV. The nib sources were tested with standard peptide solutions prepared from an aqueous stock solution using a MeOH:H₂O 50/50, 0.1% formic acid solvent. Thus, Gramicidin S (Sigma, L'Isle d'Abeau,

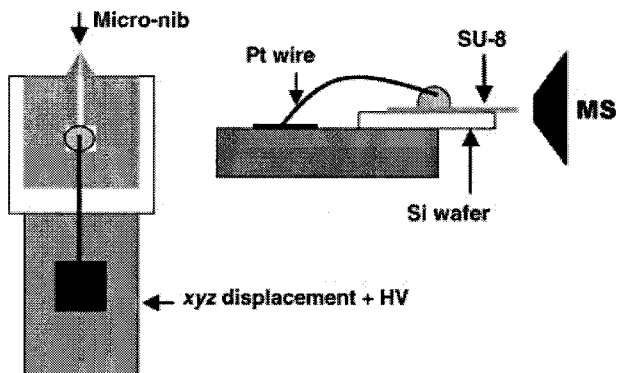


Figure 3. Schematic representation of the setup used for interfacing the micro-nib source to the mass spectrometer.

France) solutions at 1, 5, 10 μm were prepared. The HV supply was in the 0.8–1.5 kV range for the 8 and 16 μm nib sources. The total ion current (TIC) signal was recorded over a period of 2 min in all cases and the mass spectra were averaged over this acquisition period using the Excalibur software (Thermo Finnigan) on the ion trap mass spectrometer in a 300–1500 m/z range. Comparison tests were carried out using a commercial standard tip from Protana (Odense, Denmark); a medium borosilicate emitter tip coated with Au/Pt and having a said 1 μm tip inner diameter (ES 380) was used. With this standard emitter tip, HV supply was 1 kV and the sample had a concentration of 1 μM . Electrospraying was obtained without any pressure assistance.

3 Results and discussion

3.1 Micro-nib design

We present here a novel type of electrospray emitter tips which are planar, with an open structure and a nib-like geometry. The micro-nib sources were fabricated using the negative photoresist SU-8, this SU-8 structure being supported on a silicon wafer; SU-8 was retained for these tests of the nib structure as this material allows relatively rapid fabrication of prototypes [46]. For this design, the slot widths at the nib tip were 8 and 16 μm . Each source was connected to a reservoir through a microchannel (Fig. 1D). In the previous design, the micro-nibs were made hydrophilic by covering the SU-8 structure with a thin layer of SiO_2 . It should be noted here that this last high temperature surface treatment step was suppressed so as to facilitate the fabrication process of the nib sources. In this way, we were able to test the compatibility of SU-8 with the MS techniques. As explained previously, the micro-nib structures were freed from the Si wafer at the tip of the nib feature so as to overhang the edge of the Si wafer. Using a nonfreed nib-like structure having a nib tip placed in close proximity to the edge of the Si wafer, the liquid was prone to spread around the edge of the wafer which supports the SU-8 feature as is the case for direct spraying from a channel [9, 49, 50].

As mentioned in previous publications (Arscott *et al.*, submitted; Le Gac *et al.*, submitted), this geometry of ESI emitter tips is fully compatible for microfabricating isolated sources to replace standard emitter tips. Indeed, one advantage of a micro-nib source is that liquid sample loading is easier to achieve than for a standard source having the shape of a needle; here, the liquid sample is simply dropped into the reservoir of the planar structure upstream to the capillary slot. The liquid then moves instantaneously to fill in the capillary network towards the micro-nib tip. Consequently, this nib-like geometry should

be more compatible with the use of robots and thus with the automation of ESI-MS analysis for high-throughput applications.

3.2 Tests with MS

3.2.1 MS performances

The micro-nibs were tested on an ion trap mass spectrometer; they were introduced into the mass spectrometer on an xyz moving component (Fig. 3). The electrical contact was achieved using a platinum wire. Once the micro-nib was introduced into the mass spectrometer, the reservoir feature was loaded with the liquid sample using a micropipette; this liquid was seen moving readily towards the tip of the nib. For this second design of nib sources with smaller slot dimensions, lower ionization voltage values were required for electrospraying. The Taylor cone formation was observed using the camera mounted on the ion trap mass spectrometer; due to the smaller dimensions, the Taylor cone was not as easy to distinguish as with the first generation micro-nibs as the slot dimension determines the size of the spray as shown on the photograph (Fig. 4). The tests were carried out with peptide samples of Gramicidin S at 10 μM down to 1 μM , and the HV supply for this new design of micro-nibs was in the 0.8–1.5 kV range. This value of 0.8 kV was determined as a lower limit value for this current design of micro-nibs. Thus, the spraying conditions for these micro-nibs are comparable to those used for standard emitter tips, e.g., the commercial Protana tips (1 kV HV, 1 μM peptide samples).

As described in the experimental section, the electrospray signal was recorded for 2 min and both the TIC signals and the mass spectra were plotted using the Soft-

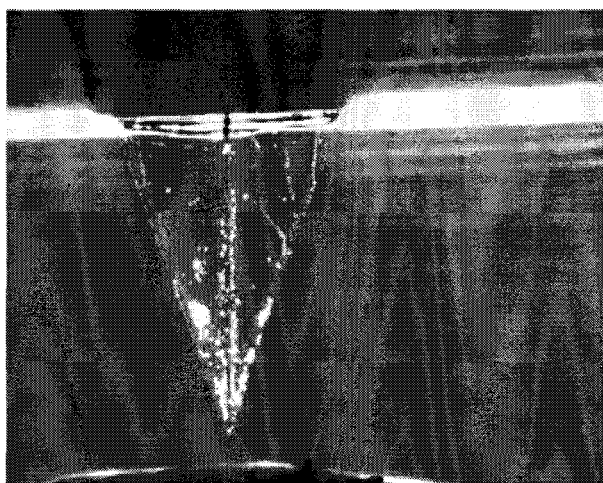


Figure 4. Micro-nib source during spraying at the MS inlet. Capillary slot, 16 μm ; ionization voltage, 1 kV.

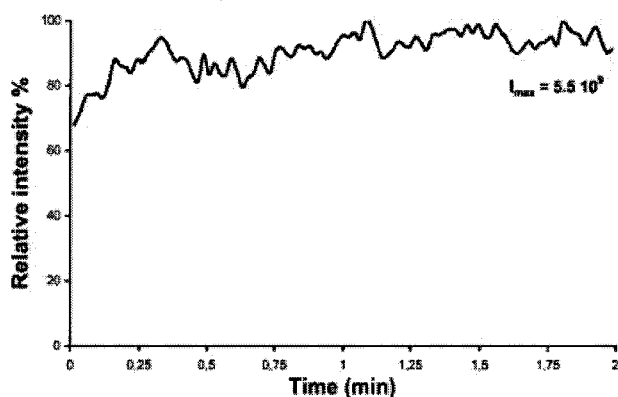


Figure 5. TIC signal recorded over a period of 2 min on an ion trap mass spectrometer and using a micro-nib source ($8\ \mu\text{m}$ slot width). Gramicidin S, $5\ \mu\text{M}$; HV, 0.8 kV.

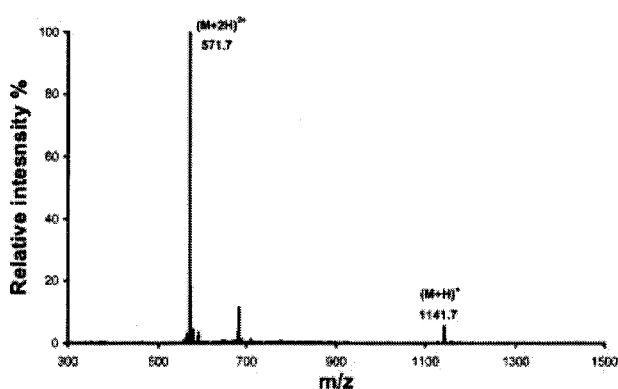


Figure 6. Mass spectrum averaged on a 2 min acquisition of the signal; analysis of $5\ \mu\text{M}$ Gramicidin S under a 1.2 kV ionization voltage using the micro-nib source with an $8\ \mu\text{m}$ slot.

ware Excalibur, the mass spectra being averaged over this 2 min period. For both types of sources, *i.e.*, with a slot dimension of 8 and of $16\ \mu\text{m}$, the TIC signals were stable in all conditions of spraying. The RSD for the TIC signal plot on Fig. 5 was calculated to be 6.9%. In addition, a decrease in the TIC signal intensity was not observed when decreasing either the peptide concentration or the ionization voltage. Figure 5 shows the TIC signal that was recorded for a sample at $5\ \mu\text{M}$ under a 0.8 kV ionization voltage using the source with an $8\ \mu\text{m}$ slot width.

The mass spectra were averaged over this 2 min period. Figure 6 shows the mass spectrum obtained for a Gramicidin S sample at $5\ \mu\text{M}$ using the micro-nib with an $8\ \mu\text{m}$ slot width; the HV supply was 1.2 kV. Here, as for most tests, two main peaks were observed at m/z 571.5 and 1141.7, respectively, for the $(M+2H)^{2+}$ and $(M+H)^+$ species of Gramicidin S. For comparison, one test was carried out with an emitter tip coated with metal (Protana).

Gramicidin S had a concentration of $1\ \mu\text{M}$ and an ionization voltage of 1 kV was applied. Figure 6 presents the resulting spectrum which exhibits a strong peak at m/z 571.5.

The signal-to-noise ratio (S/N) was observed to be excellent and better than 40 for all experiments that were carried out using the micro-nib sources and even under the limit conditions, *i.e.*, an HV supply of 0.8–1 kV with a $1\ \mu\text{M}$ peptide concentration, the analyzed species could be identified without problems. The overall performances of this design of micro-nib sources were thus seen to be similar to those of standard emitter tips in terms of S/N and signal intensity.

We observed that the sample consumption of our nib sources was rather high, *e.g.*, a low $1\ \mu\text{L}/\text{min}$. We believe that the open structure favored the evaporation of the liquid sample in the mass spectrometer inlet as it is in direct contact with the air. Appropriate surface treatment could avoid the liquid dispersion around the reservoir and thus could limit the contact surface area with air.

3.2.2 MS pattern

It is worth mentioning that the spectrum pattern greatly depends on the conditions of spraying, *i.e.*, the HV value, the peptide concentration, and especially the dimensions of the source (8 vs. $16\ \mu\text{m}$). Table 1 summarizes the intensity ratios observed for the two $(M+H)^+$ and $(M+2H)^{2+}$ Gramicidin S ions. Two different mass spectrum patterns can be distinguished, a Protana-like pattern, that is almost uniquely the $(M+2H)^{2+}$ and little or no $(M+H)^+$ species as shown in Fig. 7 and pattern where both ions have comparable intensities. The Protana-like pattern was observed for the micro-nib source having a $8\ \mu\text{m}$ slot width, except for the experiments carried out under the limit conditions ($1\ \mu\text{M}/1\ \text{kV}$, $1\ \mu\text{M}/1.2\ \text{kV}$, $5\ \mu\text{M}/0.8\ \text{kV}$) where the nib-like structure has to be moved closer to the mass spectrometer inlet to enable electrospraying; in these cases, the intensity of the $(M+H)^+$ peak increased. Using the source with a $16\ \mu\text{m}$ slot dimension, the mass spectrum pattern was not the same with a more intense $(M+H)^+$ peak and even a $(M+H)^+$ peak being more intense than the $(M+2H)^{2+}$ peak. Figure 8 presents the mass spectra obtained with sources of 8 (Fig. 8, top) and $16\ \mu\text{m}$ (Fig. 8, bottom) under similar test conditions, that is a Gramicidin S sample at $5\ \mu\text{M}$ and an ionization voltage of 1.2 kV.

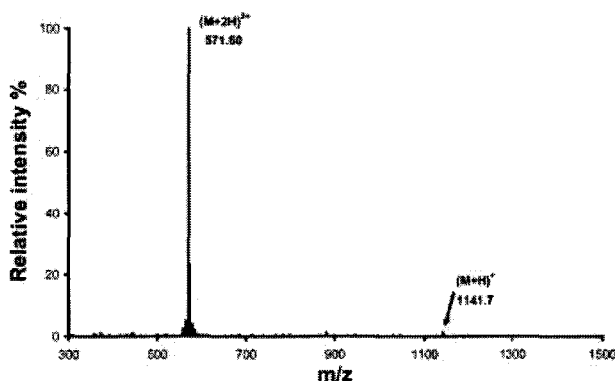
These results show that the slot dimension of the micro-nib source is a critical parameter for the ionization rule, leading to a preferential formation of the $(M+2H)^{2+}$ species rather than the $(M+H)^+$ when the outlet slot width

Table 1. Intensity ratio for the peaks of the mono- and bi-charged species of Gramicidin S measured under different conditions

[GS]	HV (kV)	8 μm	16 μm
1 μm	0.8		
	1	2.27	0.412
	1.2	0.61	3.77
5 μm	1.5	0.077 ^{a)}	
	0.8	0.39	
	1	0.12 ^{a)}	2.27
10 μm	1.2	0.053 ^{a)}	0.51
	1.5	0.014 ^{a)}	0.28
	0.8		7.63
	1		2.54
	1.2	0.039 ^{a)}	
	1.5	0.027 ^{a)}	

a) Protane-like pattern

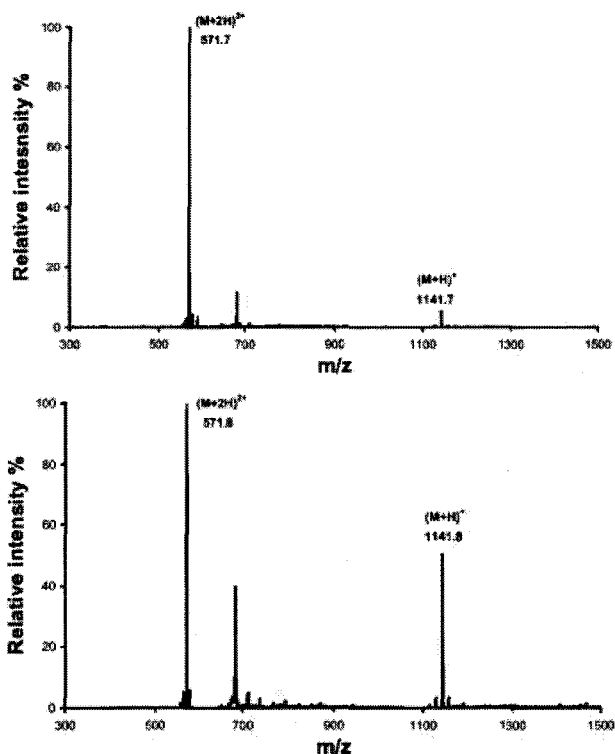
decreases (Table 1). Using standard tips broken to the classical final diameter of 1 μm or to a larger diameter of 10 μm , very different spectra were also observed as, at low flow rates, sodium adducts completely disappeared [51]. The size of the aperture dictates the fluid flow-rate; the smaller the aperture size, the smaller the droplets as a consequence of a lower flow-rate. Moreover, the formation of smaller droplets goes hand in hand with better ionization yields as previously reported [24, 29, 52, 53]. Nonetheless, it should be noted that under limit conditions (lowest ionization value and lowest concentrations), the pattern of the mass spectra is also different; under these conditions, the micro-nib source had to be moved closer to the MS inlet to observe a spray. As the inlet capillary of the ion trap is heated, ionization took place in a zone at higher temperature. Under such conditions atmospheric

**Figure 7.** Mass spectrum obtained with a commercially available Protana emitter tip and averaged over a 2 min acquisition of the signal; Gramicidin S, 1 μm ionization voltage, 1 kV.

pressure chemical ionization (APCI)-like spectra are observed under ESI conditions without a corona discharge at high flow-rates [54].

3.2.3 MS/MS experiments

Finally, we carried out fragmentation experiments under a variety of conditions in terms of HV, concentration and for micro-nib sources of 8 and 16 μm slot width. The $(M+2H)^{2+}$ species of the Gramicidin S was specifically isolated in the trap (selection window width of 2 Th) and submitted to a fragmentation experiment (normalized collision energy parameter of 30% and activation RF frequency factor set at 0.25). Figure 9 shows the MS/MS spectrum resulting from the fragmentation of the Gramicidin S at 5 μm under a 1.2 kV HV supply and using a micro-nib source (slot width of 8 μm).

**Figure 8.** Mass spectra obtained with a nib source (averaged on a 2 min recording period); HV, 1.2 kV; Gramicidin S, 5 μM ; slot dimension of (top) 8 μm and (bottom) 16 μm .**4 Concluding remarks**

We have designed and demonstrated a novel 2-D nanoESI-MS interface. The design is based on the idea of a micro-nib containing a reservoir and a capillary slot which leads a test liquid from the reservoir to the micro-nib tip, the working of which is analogous to that of a

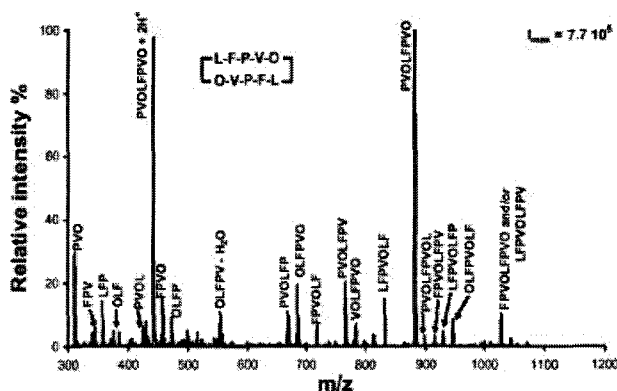


Figure 9. Fragmentation experiment with a nib source (slot width, 8 μm). Gramicidin S, 5 μM ; HV, 1.2 kV. Mass spectrum averaged over a 2 min period.

simple fountainpen. The negative photoresist SU-8 was used to fabricate the micro-nibs on silicon substrates. Capillary slot dimensions of 8 and 16 μm were fabricated in order to perform direct MS tests. The mass spectra experiments showed the reliability of the nib ESI emitter tips; the S/N and the peak intensity were similar to those observed for standard fused-silica nano-ESI sources and working voltages as low as 0.8 kV could be used. The performances of the nib-like sources were seen to be dependent on to the slot dimension; the smaller the slot dimension, the better the performance, as demonstrated by MS tests.

This work has been financially supported by the 'Ministère de l'Industrie, Bio-Ingénierie 2001-Réseau Genhomme' and by the 'Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies, Réseau des Micro- et Nanotechnologies' (RMNT). The authors would also like to thank Mr. Christophe Boyaval (IEMN) for his help in obtaining the SEM image and Matthieu Gaudet, MSc student, who took part in the fabrication of the presented micro-nib sources.

Received August 6, 2003

5 References

- [1] Figeys, D., Pinto, D., *Anal. Chem.* 2000, 72, 330A–335A.
- [2] Verpoorte, S., *Trends Anal. Chem.* 2000, 19, 350–351.
- [3] Voldman, J., Gray, M. L., Schmidt, M. A., *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 1999, 1, 401–425.
- [4] Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P.-A., Manz, A., *Anal. Chem.* 2002, 74, 2623–2636.
- [5] Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P.-A., Manz, A., *Anal. Chem.* 2002, 74, 2637–2652.
- [6] Guetens, G., van Cauwenberghe, K., de Boeck, G., Mes, Ardiet, R. C., van Oosterom, A. T., Highley, M., de Bruijn, E. A., Tjaden, U. R., *J. Chromatogr. B* 2000, 739, 139–150.
- [7] Khandurina, J., Guttman, A., *J. Chromatogr. A* 2002, 943, 159–183.
- [8] Laurell, T., Nilsson, J., Marko-Varga, G., *Trends Anal. Chem.* 2001, 20, 225–231.
- [9] Xue, Q., Foret, F., Dunayevskiy, Y. M., Zavracky, P. M., McGruer, N. E., Karger, B. L., *Anal. Chem.* 1997, 69, 426–430.
- [10] Liu, H., Felten, C., Xue, Q., Zhang, B., Jedrzejewski, P., Karger, B. L., Foret, F., *Anal. Chem.* 2000, 72, 3303–3310.
- [11] McCreeley, T., *Trends Anal. Chem.* 2000, 19, 396–401.
- [12] Harrison, D. J., Glavina, P. G., Manz, A., *Sens. Actuators B* 1993, 10, 107–116.
- [13] Jacobson, S. C., Moore, A. W., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1995, 67, 2059–2063.
- [14] Boone, T. D., Hugh Fan, Z., Hooper, H. H., Ricco, A. J., Tan, H., Williams, S., *Anal. Chem.* 2002, 74, 78A–86A.
- [15] Rossier, J., Reymond, F., Michel, P. E., *Electrophoresis* 2002, 23, 858–867.
- [16] Felton, M. J., *Anal. Chem.* 2003, 75, 303A–306A.
- [17] Tyers, M., Mann, M., *Nature* 2003, 422, 193–197.
- [18] Aebersold, R., Mann, M., *Nature* 2003, 422, 198–207.
- [19] Haynes, P. A., Gygi, S. P., Figeys, D., Aebersold, R., *Electrophoresis* 1998, 19, 1862–1871.
- [20] Ericson, C., Phung, Q. T., Horn, D. M., Peters, E. C., Fitchett, J. R., Ficarro, S. B., Salomon, A. R., Brill, L. M., Brock, A., *Anal. Chem.* 2003, 75, 2309–2315.
- [21] Figeys, D., *Anal. Chem.* 2003, 75, 2891–2905.
- [22] Andersen, J. S., Mann, M., *FEBS Lett.* 2000, 480, 25–31.
- [23] Aebersold, R., Goodlett, D. R., *Chem. Rev.* 2001, 101, 269–296.
- [24] Aebersold, R., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003, 14, 685–695.
- [25] Mann, M., Wilm, M., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1–8.
- [26] Valaskovic, G. A., Kelleher, N. L., Little, D. P., Aaserud, D. J., McLafferty, F. W., *Anal. Chem.* 1995, 67, 3802–3805.
- [27] Emmett, M. E., Caprioli, R. M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994, 5, 605–613.
- [28] Gale, D. C., Smith, R. D., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993, 7, 1017–1021.
- [29] Wilm, M., Mann, M., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 1994, 136, 167–180.
- [30] Schultz, G. A., Corso, T. N., Prosser, S. J., Zhang, S., *Anal. Chem.* 2000, 72, 4058–4063.
- [31] Griss, P., Melin, J., Sjoedahl, J., Roeraade, J., Stemme, G., *J. Micromech. Microeng.* 2002, 12, 682–687.
- [32] Sjoedahl, J., Melin, J., Griss, P., Emmer, A., Stemme, G., Roeraade, J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17, 337–341.
- [33] Desai, A., Tai, Y.-C., Davis, M. T., Lee, T. D., *Int. Conf. on Solid-State Sensors and Actuators, Transducers '97*, 1997.
- [34] Licklider, L., Wang, X.-Q., Desai, A., Tai, Y.-C., Lee, T. D., *Anal. Chem.* 2000, 72, 367–375.
- [35] Lin, L., Pisano, A. P., *IEEE J. Microelectromech. Sys.* 1999, 8, 78–84.
- [36] Tang, K., Lin, Y., Matson, D. W., Kim, T., Smith, R. D., *Anal. Chem.* 2001, 73, 1658–1663.
- [37] Kameoka, J., Orth, R., Ilic, B., Czaplowski, D., Wachs, T., Craighead, H. G., *Anal. Chem.* 2002, 74, 5897–5901.

- [38] Gobry, V., van Oostrum, J., Martinelli, M., Rohner, T. C., Reymond, F., Rossier, J. S., Girault, H. H., *Proteomics* 2002, 2, 405–412.
- [39] Rossier, J. S., Youhnovski, N., Lion, N., Damoc, E., Becker, S., Reymond, F., Girault, H. H., Przybylski, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 53–58.
- [40] Rohner, T. C., Rossier, J. S., Girault, H. H., *Anal. Chem.* 2001, 73, 5353–5357.
- [41] Kim, J. S., Knapp, D. R., *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 137–145.
- [42] Kim, J. S., Knapp, D. R., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001, 12, 463–469.
- [43] Kim, J. S., Knapp, D. R., *Electrophoresis* 2001, 22, 3993–3999.
- [44] Yuan, C. H., Shiea, J., *Anal. Chem.* 2001, 73, 1080–1083.
- [45] Waterman, L. E., US Patent, 1884.
- [46] Lorenz, H., Despont, M., Fahrni, N., LaBianca, N., Renaud, P., Vettiger, P., *J. Micromech. Microeng.* 1997, 7, 121–124.
- [47] Lin, C.-H., Lee, G.-B., Chang, B.-W., Chang, G.-L., *J. Micromech. Microeng.* 2002, 12, 590–597.
- [48] Zhang, J., Tan, K. L., Hong, G. D., Yang, L. J., Gong, H. Q., *J. Micromech. Microeng.* 2001, 11, 20–26.
- [49] Ramsey, R. S., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1998, 70, 3721–3727.
- [50] Zhang, B., Liu, H., Karger, B. L., Foret, F., *Anal. Chem.* 1999, 71, 3258–3264.
- [51] Schmidt, A., Karas, M., Dülcks, T., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003, 14, 492–500.
- [52] Fernandez de la Mora, J., Loscertales, I. G., *J. Fluid Mech.* 1994, 260, 155–184.
- [53] Pfeifer, R. J., Hendricks, Jr., C. D., *AIAA J.* 1968, 6, 496–502.
- [54] Cristoni, S., Bernardi, L. R., Biunno, I., Guidugli, F., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 1686–1691.



Monoliths for microfluidic devices in proteomics

Séverine Le Gac^a, Julien Carlier^b, Jean-Christophe Camart^b,
Cécile Cren-Oliv e^a, Christian Rolando^{a,*}

^a *Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille 1),
UMR CNRS 8009, Chimie Organique et Macromoléculaire, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

^b *Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie, Université des Sciences et Technologies de Lille,
UMR CNRS 8520, Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

Available online 7 June 2004

Abstract

We report here on the preparation of monolithic capillary columns in view to their integration in a microsystem for on-chip sample preparation before their on-line analysis by electrospray and mass spectrometry (ESI–MS). These monolithic columns are based on polymer materials and consist of reverse phases for peptide separation and/or desalting. They were prepared using lauryl methacrylate (LMA), ethylene dimethacrylate (EDMA) as well as a suitable porogenic mixture composed of cyclohexanol and ethylene glycol. The resulting stationary phases present thus a C12-functionality. The LMA-based columns were first prepared in a capillary format using capillary tubing of 75 μm i.d. and tested in nanoLC–MS experiments for the separation of a commercial Cytochrome C digest composed of 12 peptidic fragments whose isoelectric point values and hydrophobic character cover a wide range. The LMA-based columns were capable of separating the peptidic fragments and their performances were seen to be similar as those of standard commercial columns dedicated to proteomic purposes with calculated separation efficiencies up to 145×10^3 plates/m. Monolithic LMA-based phases were then successfully polymerized in microchannels fabricated using the negative photoresist SU-8. After the polymerization, the systems were seen to withstand the pressures applied during the nanoLC–MS separation tests that were carried out in the same conditions as for the monolithic capillary columns. The pressure drop during these tests of the in-microchannel monoliths was as high as 50 bar; however, the separation was not as good as for a capillary format which could be accounted for by the monolith dimensions.

  2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Polymer monoliths; Microfluidic devices; Miniaturization; Proteomics

1. Introduction

These last years novel miniaturized analytical tools [1,2] are emerging which are referred to as μTAS (Micro-Total Analysis Systems) or Lab-on-a-chip devices. These miniaturized and integrated devices are of great interest in the fields of analytical biology and chemistry [3,4] as they can be used with little handling. Furthermore, sample loss and contamination are decreased. In addition to this, fast, automated

and high-throughput analysis is possible. Last, these small devices are appropriate for the analysis of reduced-sized samples like biological ones.

Here we report the development of a microfluidic device dedicated to the preparation of protein samples prior to their on-line analysis by electrospray and mass spectrometry (ESI–MS). The system includes different modules, including a chromatographic device and an integrated ionization emitter tip with the shape of a nib [5] for the introduction of the sample into the mass spectrometer, as illustrated on Fig. 1.

On-chip separations are mostly performed under an electrical field [6]; electro-based pumping systems are easier to implement on a microchip format since no valve is required. Nonetheless, these latter imply the addition of salts in the solution, which are detrimental for the analysis in ESI–MS [7]. Only a few compositions of the mobile phase are acceptable for both the electrochromatography and the

Abbreviations: AcCN, acetonitrile; AIBN, 2,2'-azobisisobutyronitrile; CyOH, cyclohexanol; Cyt C, Cytochrome C; EG, ethylene glycol; EDMA, ethylene dimethacrylate; HCOOH, formic acid; HV, high voltage; IDA, information dependant acquisition; LMA, lauryl methacrylate; MeOH, methanol; SEM, scanning electron microscopy; SPE, solid phase extraction; SU-8, name of a photoresist used for microtechnology processes.

* Corresponding author. Tel.: +33-3-20-43-49-77;
fax: +33-3-20-33-61-36; mobile: +33-6-60-67-37-78.

E-mail address: christian.rolando@univ-lille1.fr (C. Rolando).

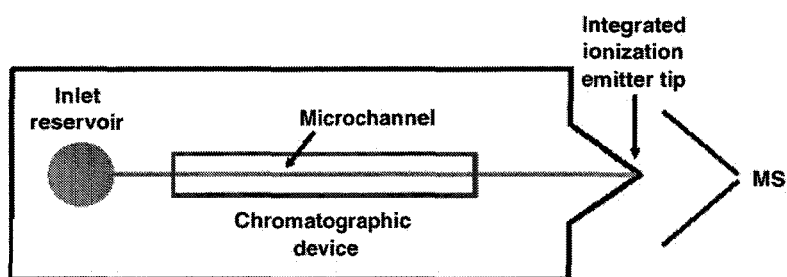


Fig. 1. Schematic representation of the microfluidic system which includes a chromatographic device and an integrated ionization emitter tip with the shape of a nib.

nano-electrospray ionization, leading to a non-satisfying compromise for real analytical work [8–10]. Here, the flow relies on a hydraulic pumping system, which excludes any electro-driven separation. This implies the use and introduction of a stationary phase in the microchannels, this phase suiting such a microfluidic context. Creating a stationary phase means structuring the microchannel so as to generate a high surface area for the analytes to interact with the solid support. A first idea to achieve that is to pack particles in a section of a microchannel [11]; they are maintained using frits. However, it is difficult to control the packing density of the particles and to introduce frits in a microchannel [12,13]. In addition, frits are prone to clogging and are the site of bubble generation [14]. Bead trapping was also demonstrated using either bars [15] or a kind of restriction in the microchannel [16]. A second idea is to structure the microchannel using microtechnology techniques by etching pillar-shaped structures in it [17]. Nonetheless, this microtechnology-based route does not allow the generation of a surface area which is high enough for chromatographic purposes and, in addition, the fabrication cost is very high for routine production [18]. A third idea that we have chosen for our microfluidic development is to use a monolithic phase, that can be prepared in situ in a microchannel and that is based either on silica or on polymer. Monoliths can be described as interconnected networks of cross-linked and porous globules [19,20] which present a bimodal porosity; large through-pores (>50–100 nm) which consist of the preferential pathway for fluids to flow through the column and small pores (<2 nm) where molecular interactions take place between analytes and stationary phase. As the material is monolithic here, there is no restraint in the porosity properties dictated by the packing of spherical particles which usually gives a 26% calculated interstitial void volume in packed columns [19]. These mass transfer limitations linked to diffusion phenomena affect the separation performances in HPLC [21]. In particle-based devices, the liquid flows *around* the particles whereas it flows *through* the material in case of monolithic materials. The resistance to mass transfer is thus lower using this material and can be further promoted by the presence of through-pores greater than 600 nm whereby convection phenomena appear in addition to the usual diffusion ones [22,23]. This results in a faster and enhanced mass transfer. On the contrary, using particle-based columns, mass transfer

is only governed by diffusion phenomena. It is hence very slow, especially for high molecular weight analytes and the operating pressure is high as the consequence of the lower porosity.

Polymer macroporous monoliths are prepared using a radical polymerization process initiated either by UV-irradiation or by the temperature. The reaction mixture is composed of (i) monomers, mono-vinyl ones which bear the functionality and poly-vinyl ones which are cross-linking agents, (ii) a porogenic solvent which governs the formation of the porous structure and (iii) an initiator. The monolith structure and porosity are influenced by the porogen content in the reaction mixture, the quantity and quality of the initiator, the ratio mono-/poly-vinyl monomers and the temperature in case of a thermally induced polymerization [24]. Monomers mostly belong to the families of either acrylate [25] compounds or styrene/divinylbenzene [26]. Monolithic phases have found a number of applications mainly as chromatographic stationary phases for any separation mode (normal separation [27], reverse phase separation [28], ion exchange separation [29], affinity separation [30], capillary electrochromatography [31], pressure assisted capillary electrochromatography ...) and as solid supports for reactors [32]. Compared to their silica-based counterparts [33], polymer-based monoliths withstand a wide range of pH values [34]. In addition, a great variety of chemistry [23] and consequently of separation modes is possible as a result of the large range of functional monomers that can be introduced in the reaction mixture.

So, monoliths present a series of advantages for microfluidic applications [35]; they are prepared in one step in a local way providing the polymerization is initiated by UV-irradiation. Their physical and chemical properties can be adjusted providing some changes in the polymerization mixture composition to fit microfluidic applications. Firstly, their porosity can thus be promoted so as to decrease the pressure drop along the column. Indeed, a too high pressure drop may damage the bonding between the top and the bottom wafers and cannot be provided by an on-chip pumping system. As a consequence, porosity is a critical parameter for materials dedicated to microfluidic applications. Secondly, depending on the application field, the monolith functionality can be tailored. Hence, their use in a microsystem format has already been described as SPE

phases [36], mixing-inducing structures [37], micro-reactor solid supports [38], and reverse phases [39] for electrochromatography (Fig. 1).

We report here on the preparation of monolithic phases for microfluidic applications and especially on the preparation of stationary phases for chromatographic purposes in a reverse-phase separation mode. The monolith polymerization was initiated by UV-irradiation and monoliths were first prepared in a capillary tubing as this consists of a good model for microchannels and then in microchannels that were fabricated in the negative photoresist SU-8. The resulting monolithic columns were first studied for their morphology and porosity properties and then tested for the separation of a Cyt C digest in nanoLC–MS experiments.

2. Experimental

2.1. Materials and chemicals

UVs transparent fused-silica capillary tubing (75 μm i.d.; 360 μm o.d.) was purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ). The UV lamp (2 \times 20 W, 365 nm, $I = 2100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) was purchased from Elvetec (France). Lauryl methacrylate (LMA), ethylene dimethacrylate (EDMA), 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN), trimethoxysilylpropylsilane, methanol (MeOH), ethylene glycol (EG), cyclohexanol (CyOH), acetone, sodium hydroxide (NaOH) and hydrochloric acid (HCl) were purchased from Sigma–Aldrich (L'isle d'Abeau, France). The commercial Cytochrome C digest was purchased from Dionex (Amsterdam, The Netherlands). Deionized water (18.2 M Ω) was prepared using a Milli-Q system from Millipore (Billerica, MA, USA).

2.2. Monolith preparation in capillary tubing

Capillary tubing was connected to a syringe-pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) using appropriate connections (UpChurch Scientific, Oak Harbour, WA, USA) for the preparation steps. Capillary tubing was treated using a previously described procedure [35]. It was first rinsed with acetone (15 min) and deionized water (15 min), activated by a 0.2 M NaOH solution (30 min), washed again with deionized water (15 min), treated with a 0.2 M HCl solution (30 min) and washed again consecutively with deionized water (15 min) and acetone (15 min) before drying for 90 min (80 °C). Once back to room temperature, the capillary tubing was filled with a 15% vol. 3-trimethoxysilylpropylsilane solution in acetone, closed using appropriate caps (UpChurch Scientific, Oak Harbour, WA, USA) and let for treatment reaction for 24 h at room temperature. After a 2 h acetone washing, the tubing was finally placed overnight in oven (80 °C) for drying. The monomer mixtures and the porogens were first prepared separately and then mixed in the

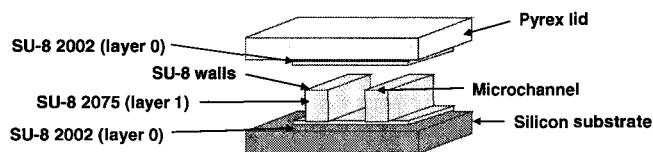


Fig. 2. Schematic representation of the microtechnology route used for the fabrication of the SU-8-based microsystem with a multi-layered structure.

indicated volume ratio; 1% wt. AIBN was then added. The N_2 -degassed polymerisation mixture was injected in the capillary tubing, which was then closed at its extremities and placed under UV-irradiation for 2 h. Once the reaction was completed, the resulting monolithic phase was abundantly washed with MeOH to remove the un-reacted chemicals and placed overnight in oven (80 °C) for drying.

2.3. Microsystem preparation

The microsystems were fabricated using a SU-8-based technology that has been described elsewhere and that mainly relies on a series of standard photolithography steps that allow for forming and patterning the successive layers of SU-8 [40]. The microsystems consist of microchannels made in the negative photoresist SU-8 using photolithography techniques. Fig. 2 illustrates the SU-8 multi-layered structure used to build the microsystem. A first thin layer of SU-8 2002 (2 μm) was deposited on a supporting silicon wafer. On that layer, a second and thick layer of SU-8 2075 (height of $\sim 200 \mu\text{m}$) was deposited as walls having a 200 μm thickness, i.e. to form the microchannel and the accesses for the introduction of the transfer capillary tubing. This layer also includes pillars that support the Pyrex lid and allow for optimizing its bonding on the main SU-8 layer. The microsystem was closed using a Pyrex wafer also coated with a SU-8 2002 layer (2 μm); it was thus bonded on the bottom wafer using a SU-8/SU-8 bonding technique. It should be noted that the two thin layers of SU-8 2002 that were deposited on the supporting Si wafer and the Pyrex lid were introduced in the structure so as to enhance the adhesion of the SU-8 resist walls; this is critical when dealing with high-aspect ratio structures such as microchannels. This wall-based structure allowed to diminish the stresses between the bottom and the top wafer and thus to enhance the wafer bonding together with to prevent from any wafer warping. Fig. 3 is a photograph of one of the resulting microsystems with the wall and pillar structures below the Pyrex lid. The microchannels were of 200 μm depth, of 100–500 μm width and of 3 cm total length. The microsystem was connected to the lab-world using standard fused-silica capillaries coated with polyimide (20 μm i.d.; 150 μm o.d.) so as to facilitate the injection of the chemicals and the coupling for the nanoLC–MS separation tests. These capillaries were introduced in the microchannels at their inlets and outlets and glued in place using a 2-component epoxy glue.

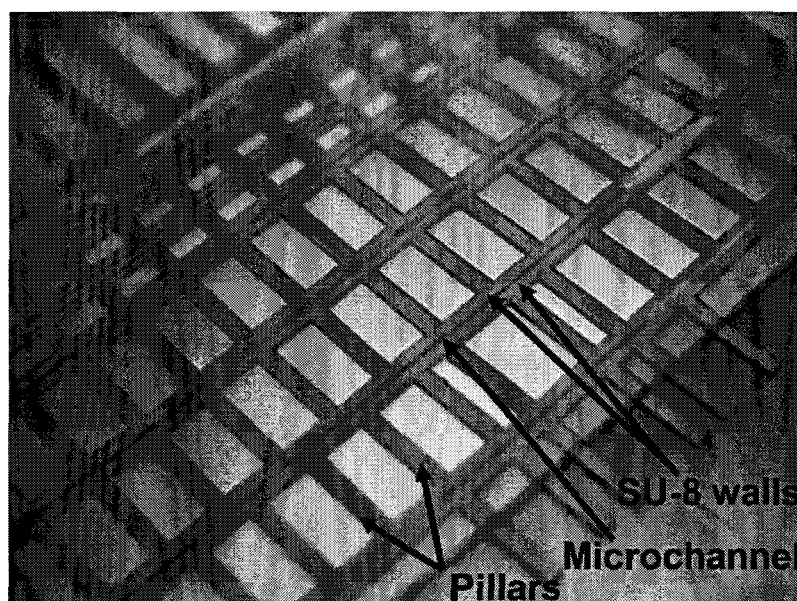


Fig. 3. Photograph of a microsystem made according to the multi-layered structure fabrication route.

2.4. Monolith preparation in microchannels

The monoliths were prepared in microchannels according to the procedure described above for the polymerizations in capillary tubing except from the preliminary inner wall treatment step which was suppressed here. Indeed, the microchannel inner walls did not present any silanol groups as is the case for the fused-silica capillary tubing and there was no chance for the monolith to escape from their support due to the presence of the transfer capillaries at both ends of the microchannels. UV-initiated polymerization was carried out after a mask was placed on both ends of the microchannels. Thus, the 2.8 cm-long microchannel contained a 2.2 cm-long monolithic column.

2.5. Test in nanoLC-MS

The monolithic columns were tested for separation experiments on a nanoLC set-up from LC Packings-Dionex (Amsterdam, The Netherlands) including an Ultimate Micro Pump to pump solvents through the columns, an Accurate stream splitter and a Famos injection system. The separation tests were carried out using a commercial Cytochrome C digest (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) which was directly injected onto the column without any pre-concentration step. The elution was performed using a gradient of solvent A (95% H₂O, 5% AcCN, 0.1% HCOOH) and solvent B (95% AcCN, 5% H₂O, 0.1% HCOOH), this gradient having been optimized for the separation of the Cytochrome C digest on a commercial PepMap column (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands): solvent B content was increased from 5 to 50% in 30 min, from 50 to 95% in 1 min, was kept for 5 min at 95% and finally was decreased back to 5% in 1 min. The column was allowed to re-equilibrate for approximately 40 min before

another separation test was run. The pressure drop during the nanoLC runs was measured using the Ultimate Micro Pump system and recorded by *Chromeleon* software (LC Packings-Dionex, Amsterdam, The Netherlands). Detection was achieved using mass spectrometry techniques on an API QStar Pulsar Q-q-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, MA, USA). The monolithic column was connected at its outlet to a 50 cm long fused-silica capillary tubing (20 μm i.d.; 280 μm o.d.) using a Teflon butt-to-butt connection (LC Packings-Dionex, Amsterdam, The Netherlands). This transfer capillary tubing was connected at its other end to a fused-silica PicoTip source (20 μm i.d.; 360 μm o.d.; 15 μm i.d. at its tip; New Objective, Cambridge, MA, USA) using the same butt-to-butt Teflon connection as previously. The tip position was adjusted to 1–2 mm in front of the MS inlet. Detection was carried out in positive mode with a 2.2–2.5 kV HV and the spectra were acquired on a m/z 300–2000 range, the nanoLC set-up being coupled to the mass spectrometer. The data acquisition was controlled by software *Bioanalyst* (Applied Biosystems, MA, USA) in IDA mode with a detection cycle time of 10 s. Fragmentation was triggered for any doubly charged species reaching an intensity threshold of 30 counts with a relative collision energy that had been calculated taking account of the charge state of the selected species and with Ar as collision gas. Once selected and fragmented, eluted species were excluded from the MS/MS selection (± 0.5 Da mass window exclusion around the ion m/z value) for 1 min.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of the monolithic capillary columns

Monolithic columns were first prepared in capillary tubing of 75 μm i.d. which was cut in pieces of 15–20 cm

length. This capillary tubing was seen as a good model of microchannels due to its size close to that of microfabricated channels. It is also an appropriate support for the study of the monolithic phases as it is easily connected to any pumping system using dedicated connectors. We used here capillary tubing which was transparent to UV-irradiation to enable an UV-initiated polymerization for the preparation of the monoliths. Indeed, this polymerisation initiation mode enables a spatial control of the reaction in the microchannels and thus the preparation of columns having a given length using appropriate photomasks. It should be noted that the inner diameter of the capillaries was dictated by the most currently commercially available capillary tubing having an i.d. of 75 μm .

The column preparation and the polymerization process were done in standard conditions as already widely described in the literature with a first preliminary treatment of the inner walls using a heterobifunctional coupling agent which ensures the covalent anchoring of the monolith in its capillary support. Then, the polymerisation mixture was injected into the capillary which was placed under UV-irradiation for around 2 h. The resulting monolithic was abundantly washed using MeOH and dried overnight in an oven. The polymerisation mixture was composed here of LMA and EGDMA (see Fig. 4) as monomers in a 65/35 molar ratio and 60% vol. of porogen composed of cyclohexanol and ethylene glycol in a 80/20 volume ratio. AIBN was last added as 1% wt. of the monomers. The polymerization process was not initiated through a thermal activation. Firstly, wrapping capillary tubing in an aluminium foil prevents the polymeriza-

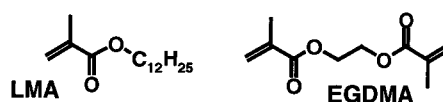


Fig. 4. Monomers used for the polymerization, LMA or lauryl methacrylate as functional monomer and EDMA or ethylene dimethacrylate as cross-linking agent.

tion from proceeding and secondly, when using photomasks for the irradiation of the polymerization mixture, the monolithic column was seen to be polymerized in the irradiated zones and not under the mask, which shows that the polymerization process was induced by UV-irradiation and not in a thermal way (Fig. 4).

3.2. Study of the porosity and morphology properties of the monolith

The monolithic columns prepared in capillary tubing were observed under scanning electron microscopy (SEM). The obtained photograph (Fig. 5) first shows the typical structure of monolithic materials. They are composed of small and interconnected globules which form a monolithic porous structure. The monolithic material presented here has an homogeneous appearance with regularly-shaped and sphere-like small nodules. The size of the globules was roughly determined to be in a 0.6–1.25 μm range, according to an enlarged SEM photograph; it should be noted that this size is more than five-fold less than those of conventional porous particles packed in chromatographic devices,

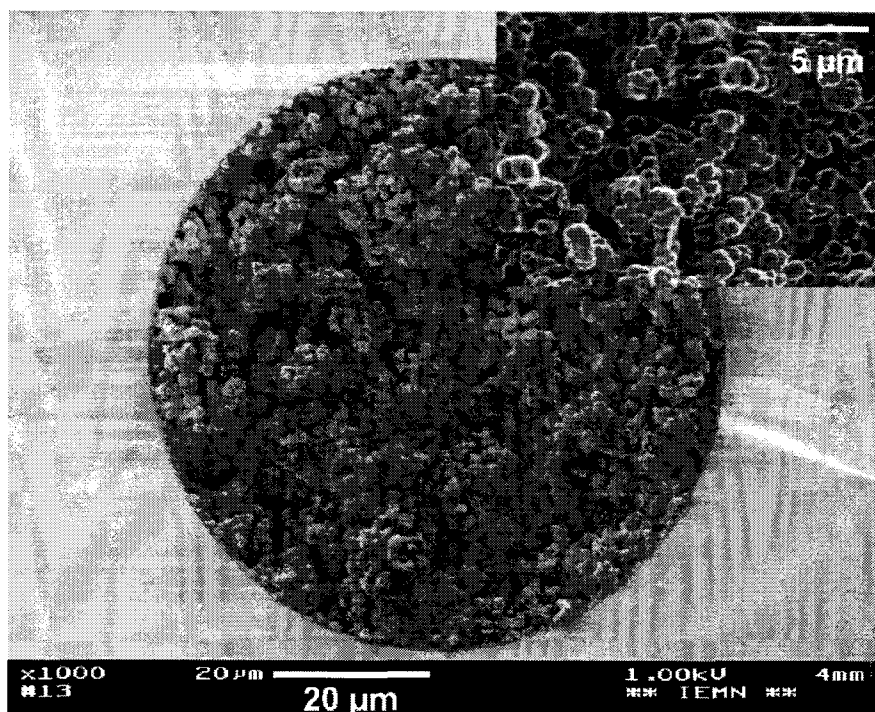


Fig. 5. Scanning electron microscopy (SEM) photograph of a section of capillary tubing which contains a monolithic phase; enlarged view of the monolith morphology in inset.

which authorizes the preparation of narrower columns than when using porous particles. In addition, the column presents a low inter-particle void content and a structure that suits for chromatographic applications as flow-through is not favoured in a too great extent. This monolithic column was prepared using an appropriate porogenic mixture (CyOH/EG 80/20) and presents an appropriate structure for separation purposes with no “large” pores but rather a continuous structure.

The study of the monolith morphology and porosity properties also included the measurement of the pressure drop observed along a column during a separation test (see Fig. 6 for its profile). The typical pattern of the pressure plot $P = f(t)$ presents a plateau with a maximal value, ΔP_{\max} when the acetonitrile content is low, i.e. at the beginning and the end of the gradient and a drop when the acetonitrile content was abruptly increased up to 76% ($t = 31$ – 36 min, $B = 95\%$). The pattern of this plot is illustrated in Fig. 6 for in-microsystem tests. For the monolithic column tested here the ΔP_{\max} value was of 80 bar. This value can be compared to the pressure drop observed when operating a commercial column based on packed silica-particles; this column is of 15 cm and exhibits a pressure drop of 125 bar. As a matter of fact, this P_{\max} value is linked to what is called the macroporosity of the column, i.e. the large through-pores of the monolithic phase or the inter-particle voids in a column based on packed particles. It reflects thus the resistance to mass transfer of the column material; this accounts for that P_{\max} is higher for a particle-based column as the flow occurs around the particles in the 26% inter-particle void and not through the material. We then calculated the permeability B_0 of our column to compare it to a commercial column based on packed particles, using Darcy's law:

$$B_0 = \frac{\eta L Q}{A \Delta P}$$

where L is the column length, Q the fluid flow-rate through the column, A the section area of the column and ΔP the pressure drop along the column expressed in Pascal. B_0 was calculated for the described monolithic column ($L = 17$ cm,

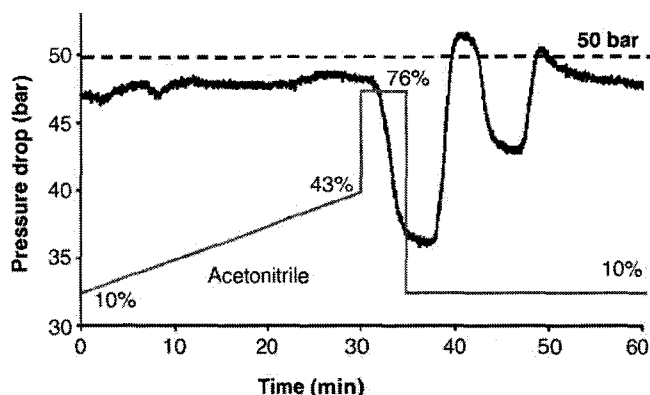


Fig. 6. Pressure drop measured along the in-channels monolithic columns during a separation test using a nanoLC set-up connected to ESI-MS.

i.d. 75 μm) as well as for a commercial PepMap column (Dionex, The Netherlands) ($L = 15$ cm, i.d. 75 μm). The fluid viscosity was taken as 0.94 mPa s, calculated as the viscosity of a solvent mixture composed of 9.5% AcCN and 90.5% H₂O (95% solvent A and 5% solvent B). These respective values (see Table 1) confirm that monolithic columns are more permeable and that the mass transfer is much higher than with columns based on packed particles. In addition, they are in agreement with those indicated in the literature [41]. We then calculated the corresponding mean pore diameter d_p for the column material applying the Kozeny–Carman equation as proposed by Gusev et al. [42]:

$$d_p = 2 \times \sqrt{\frac{5 \times B_0}{\varepsilon_T}}$$

where d_p is the mean pore diameter, B_0 the permeability of the column and ε_T the total porosity of the column. This latter was approximated to be 0.6 for the monolithic column assuming the total porosity was equal to the volume introduced of porogen as a first approximation, and 0.3 for the PepMap column. The coefficient 2 is linked to the shape of the pores which are assumed to be cylindrical and the coefficient 5 is an empirical Kozeny coefficient for such a structure composed of packed sphere particles. The mean pore diameter values calculated using this model gives a 0.7 and 0.5 μm values, respectively, for our monolithic column and a PepMap one. These values agree with the respective pressure drop values measured on both columns: the higher the porosity, the lower the pressure drop. Nonetheless, according to Vervoort et al., the coefficient values must be changed depending on the phase porosity [43] and this formula cannot be used for high-porosity materials ($\varepsilon_T > 0.8$). However, the estimated values for d_p allow us to compare our monolithic column to a PepMap one in terms of mean pore diameter. The calculated value could not be confirmed using the SEM picture of the monolithic phase (Fig. 5); this latter is obtained for a monolith in a dry state whereas the d_p value is calculated for a swollen polymer using the phase permeability and thus a measured pressure drop value and the liquid viscosity (Table 1).

3.3. Separation tests using a Cyt C digest sample

Separation tests were carried out against a Cytochrome C digest sample which is commercially available. This sample consists of 12 peptidic fragments of bovine Cytochrome C, which cover a wide range of physical and chemical properties, such as their molecular weight, iso-electric point (pI) and hydrophobicity (log P). Due to these various properties, this digest sample is used to adjust the separation gradient on conventional columns and is a good reference sample to assess the separation capabilities of a chromatographic column. Table 2 summarizes the properties of the 12 fragments contained in the Cytochrome C digest.

Table 1

Comparison of the monolithic column discussed here with a commercial PepMap column based on porous silica particles; dimensions of the column (length L and A section area), test parameters (flow-rate Q and maximum of pressure drop ΔP) as well as physical properties (permeability B_0 and mean pore diameter d_p)

	L (cm)	A (μm^2)	Q (nl/min)	ΔP (bar)	B_0 (μm^2)	d_p (μm)
Monolithic column	17	0.44×10^4	200	80	1.51×10^{-2}	0.7
PepMap column	15	0.44×10^4	100	125	0.4×10^{-2}	0.5

Table 2

List of the Cytochrome C fragments contained in the commercial digest sample with their sequence, mono-molecular weight, isoelectric point (pI) and hydrophobic character (Kyte–Doolittle scale) calculated using *ExPASy* software

Sequence	Fragment sequence	Mass ($M + H$) ⁺	pI	Hydrophobic character
56–73	GITWGEETLMEYLENPKK	2138.05	4.5	−0.96
56–72	GITWGEETLMEYLENPK	2009.95	4.1	−0.79
9–22	IFVQKCAQCHTVEK	1633.82	8.1	0.02
39–53	KTGQAPGFSYTDANK	1584.77	8.5	−1.19
40–53	TGQAPGFSYTDANK	1456.67	5.5	−0.99
26–38	HKTGPNLHGLFGR	1433.78	11.0	−0.88
89–99	GEREDLIAYLK	1306.7	4.7	−0.61
28–38	TGPNLHGLFGR	1168.62	9.4	−0.39
92–99	EDLIAYLK	964.53	4.1	0.21
80–86	MIFAGIK	779.45	8.5	1.6
74–79	YIPGTK	678.36	8.6	−0.57
9–13	IFVQK	634.39	8.8	0.82

Separation tests were performed on a nanoLC set-up. 1 μl of the Cyt C digest sample (800 or 80 fmol) was directly injected into the column without a first pre-concentration step. Peptides were detected using MS techniques with an on-line coupling of the column to an API QStar Pulsar Q-q-TOF mass spectrometer instead of the UV diode arrays detector. MS is first more sensitive than UV detection and second allows for identifying the eluted species using their molecular weight (deduced from the m/z value read on the

mass spectra) or their sequence determined using the MS/MS spectra. Fig. 7 shows the MS trace obtained for the separation of 800 fmol of the Cyt C digest on the LMA-based column that was tested here; the peptidic fragments are well separated as seen on this graph. The reconstructed chromatograms were plotted for all the peptidic fragments, as shown on Fig. 8 as well as the corresponding mass spectra. They were first used to determine the retention time of each peptidic species. We chose not to use the apparent retention

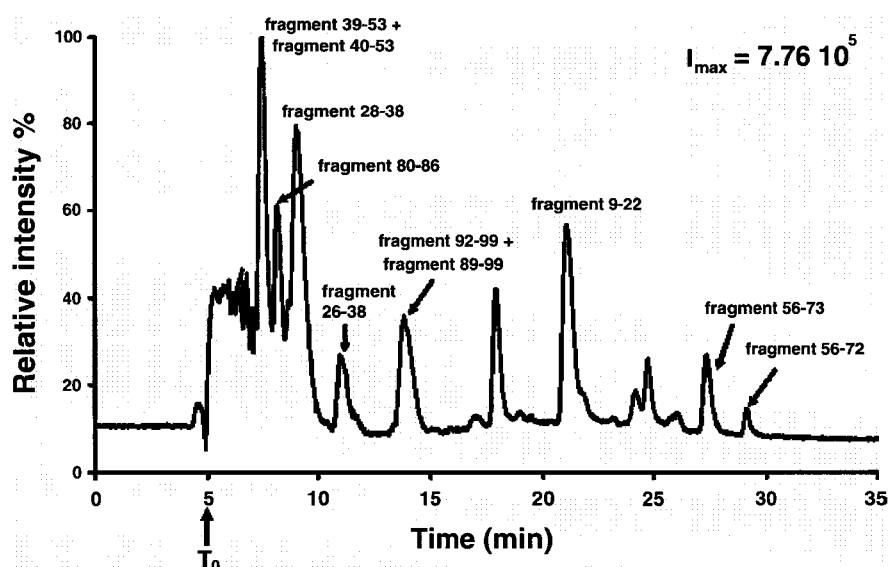


Fig. 7. MS trace of a separation on a LMA-based monolithic column; separation experiment using a Cyt C digest sample at 800 fmol and a 200 nl/min flow-rate. T_0 is indicated as an arrow at the elution start.

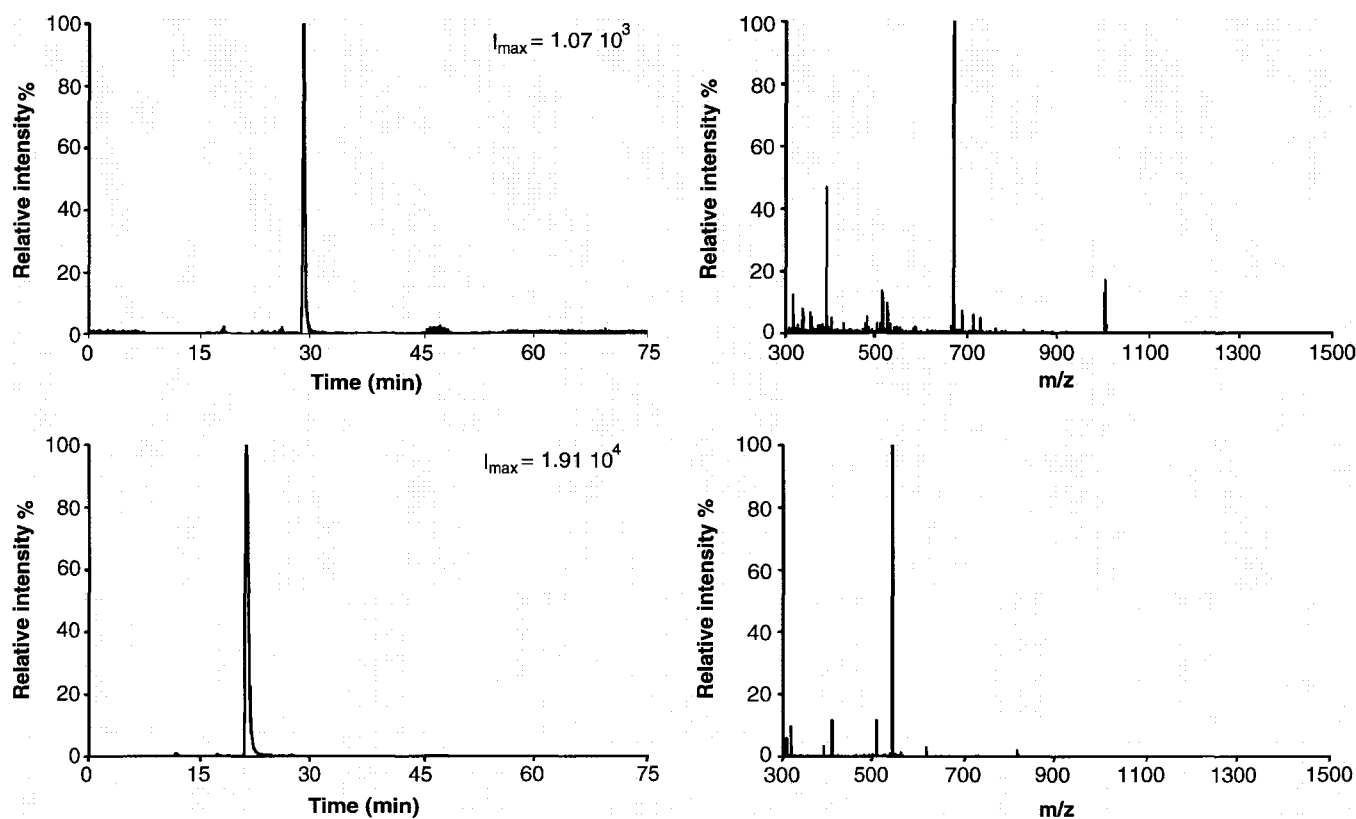


Fig. 8. Reconstructed chromatograms (left) and corresponding mass spectra (right) for two fragments of the Cyt C for the separation based on 800 fmol of digest sample; fragments 56–72 ($T_r - T_0 = 22.06$ min; $N_{rel} = 145 \times 10^3$ plates/m) (top) and 9–22 ($T_r - T_0 = 16.08$ min; $N_{rel} = 66 \times 10^3$ plates/m) (bottom).

time value but a relative retention time T_r defined as $T_r = T_{rapp} - T_0$ where T_0 is the time where elution starts and T_{rapp} the absolute value read on the chromatogram. This allows us to suppress the dead time linked to the coupling of the monolithic capillary column to the mass spectrometer using capillary tubing which increases the retention time values on the MS trace. The reconstructed chromatograms were also used to determine the relative separation efficiency N_{rel} ; this latter was calculated using the following formula, assuming a Gaussian peak shape:

$$N_{rel} = 5.54 \times \left(\frac{T_r - T_0}{w} \right)^2$$

where $T_r - T_0$ and w are the relative retention time and calculated peak width at its half-height respectively, and N_{rel} is given as a total number of plates. It should be noted that the relative separation efficiency was calculated here using a relative retention time $T_r - T_0$ which is lower than the absolute retention time T_r . Consequently, the relative efficiency values appear to be lower as they are under-estimated. The inter-test reproducibility was investigated with a series of consecutive separation runs, which allow for assessing the result dispersion. The column performed well and the separation was reproducible from one test to another one. Table 3 summarizes these data for the separated Cytochrome C fragments. Separation efficiency should be calculated for

an isocratic separation experiment and not a gradient one as we did here as the increased AcCN amount results in narrowing peaks. Nonetheless, the separation results obtained in gradient conditions can be correlated to those obtained in isocratic conditions using the LSS model [44] so as to correct the separation efficiency values. The results presented in Table 3 for the separation of 800 fmol of a Cytochrome C sample were seen to correlate well with this model and the curve $N_{rel} = f(T_r - T_0)$ fit an exponential curve with a correlation factor of 0.9224.

The corresponding mass spectra allowed us to determine whether peptides were co-eluted or not and whether peaks overlapped. From these data, it comes out that the LMA-based column discussed here gave a very nice separation of the 12 fragments of the Cyt C digest with separation efficiency values which were comparable to those obtained on a commercial column based on packed silica-particles (PepMap, Dionex, The Netherlands). Nonetheless, it should be noted that the shortest fragments were eluted in the injection peak (fragments 74–79 and 9–13) and are not indicated in Table 3 and that two fragments (fragments 39–53 and 40–53) were co-eluted as shown on the corresponding mass spectra.

Using the same column, a separation test with a 80 fmol Cyt C sample, i.e. 10-fold less material than previously, was carried out. The MS trace was not as nice as this obtained with a more concentrated sample, but the peptic frag-

Table 3
Separation results on a LMA-based monolithic column for either a 800 fmol sample or a 80 fmol one

Fragment	Test with 800 fmol Cyt C			Test with 80 fmol Cyt C		
	Averaged relative retention time ($T_r - T_0$) (min) ^{a,d}	Relative efficiency N_{rel} (plate) ^{b,d}	Relative efficiency N_{rel} (10^3 plate/m) ^{c,d}	Averaged relative retention time ($T_r - T_0$) (min) ^{a,d}	Relative efficiency N_{rel} (plate) ^{b,d}	Relative efficiency N_{rel} (10^3 plate/m) ^{c,d}
56–72	23.72 ± 0.32	49615 ± 7980	292 ± 47	23.06 ± 0.04	43459 ± 5229	256 ± 31
56–73	22.03 ± 0.26	22599 ± 2761	133 ± 16	21.65 ± 0.05	– ^c	– ^c
9–22	16.04 ± 0.04	9087 ± 2064	53 ± 12	15.91 ± 0.11	16824 ± 3215	99 ± 19
89–99	9.16 ± 0.06	2452 ± 699	14 ± 4	9.17 ± 0.16	4485 ± 44	26.4 ± 0.3
92–99	8.79 ± 0.02	945 ± 33	5.6 ± 0.2	9.11 ± 0.10	– ^c	– ^c
26–38	6.12 ± 0.12	881 ± 79	5.2 ± 0.5	6.35 ± 0.12	2461 ± 44	14 ± 0.3
28–38	4.18 ± 0.04	809 ± 332	4.8 ± 1.9	4.56 ± 0.05	1530 ± 189	9 ± 1.1
80–86	3.27 ± 0.09	1513 ± 854	8.9 ± 5	3.44 ± 0.07	504 ± 3	3.0 ± 0.02
40–53	2.64 ± 0.09	532 ± 75	3.1 ± 0.4	2.68 ± 0.08	1002 ± 15	5.9 ± 0.09
39–53	2.49 ± 0.08	1038 ± 81	6.1 ± 0.5	2.54 ± 0.09	990 ± 30	5.8 ± 0.2

^a Relative retention time calculated using the reconstructed chromatograms and taken as ($T_r - T_0$) with T_0 being the elution start time.

^b Relative separation efficiency in number of plates calculated using the peak width at its half-height w and the relative retention time ($T_r - T_0$); $N_{rel} = 5.54 \times ((T_r - T_0)/w)^2$.

^c Separation efficiency in number of plates/m calculated using the column length ($L = 17$ cm).

^d Result dispersion assessed using a series of three consecutive tests carried out in the same conditions.

^e Not determined.

ments were retained on the column and separated. Thus, our monolithic home-made columns are able to separate small amounts of sample like this 80 fmol Cyt C digest sample. As before, we plotted the reconstructed chromatograms for

the 12 peptidic fragments contained in the Cyt C digest. Fig. 9 shows the reconstructed chromatograms for some of the Cyt C fragments. As previously, the precise relative retention time $T_r - T_0$ and the relative separation efficiency

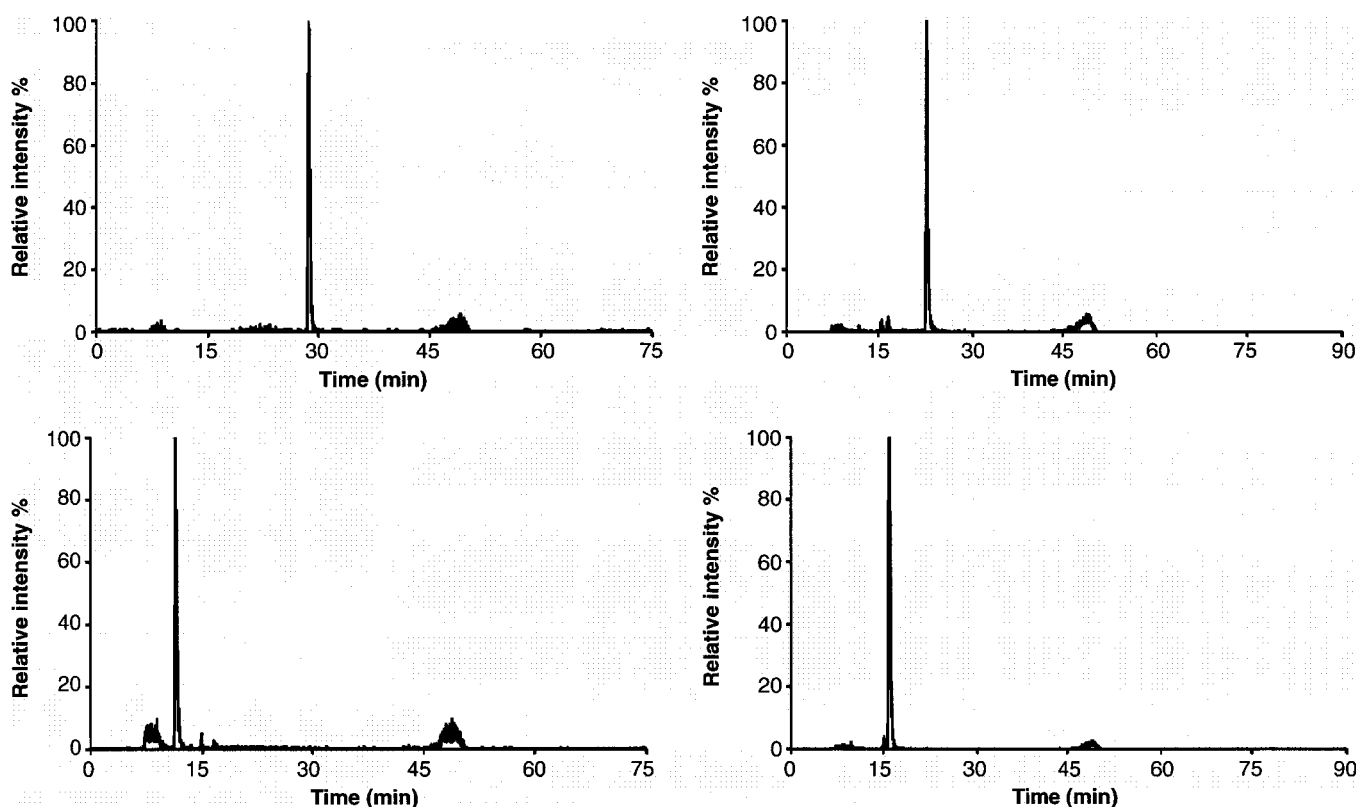


Fig. 9. Examples of reconstructed chromatograms for a series of Cyt C fragments for the separation using 80 fmol of the digest sample (test 1), from left to right and from top to down, fragments 56–73 ($T_r - T_0 = 21.68$ min; $N_{rel} = 325 \times 10^3$ plates/m), fragments 9–22 ($T_r - T_0 = 16.05$ min; $N_{rel} = 97.1 \times 10^3$ plates/m), fragments 28–38 ($T_r - T_0 = 4.58$ min; $N_{rel} = 9.5 \times 10^3$ plates/m), fragments 92–99 ($T_r - T_0 = 9.39$ min; $N_{rel} = 30.4 \times 10^3$ plates/m).

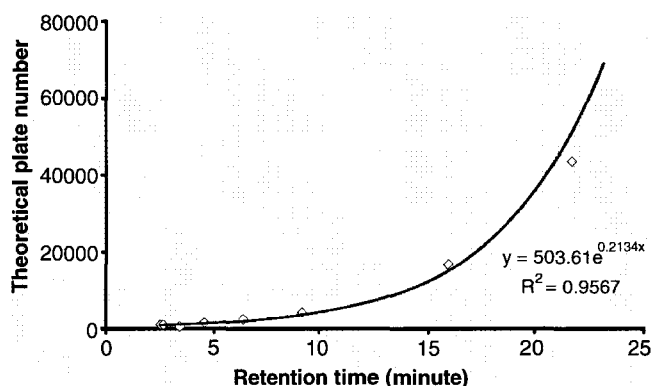


Fig. 10. Correlation between the calculated relative separation efficiency in number of plates and the relative retention time, assuming a logarithmic variation of the retention time for the linear gradient used. Correlation plot obtained for a separation test using 80 fmol of a Cyt C digest sample.

values N_{rel} were calculated for the different separation tests that were carried out and the result dispersion was assessed as well; these values are summarized in Table 3. Again the shortest fragments which are eluted in the injection peak are not mentioned in this Table. It should be observed that the efficiency values are much greater than previously when a 800 fmol sample was run, which demonstrates that the column was saturated for the earlier experiment using a more concentrated sample at 800 fmol/ μ l. However, the minority peptides are more difficult to detect like fragments 56–72 and 89–99 for example which are hardly detected. As before, we plotted $N_{rel} = f(T_r - T_0)$ which corresponds to an exponential curve. Thus, as for the separation of 800 fmol of Cyt C digest, the separation results fit the model that correlates the efficiency values obtained with a gradient experiment to this of an isocratic separation. Fig. 10 presents the

plot $N_{rel} = f(T_r - T_0)$ obtained using the averaged N_{rel} and $(T_r - T_0)$ values which has a correlation factor of 0.9567. The number of plates for an isocratic elution can be assessed to be around a value of 500. This plot also highlights that the gradient composition could be improved with a less steep increase in acetonitrile so as to give a better peptide separation with higher separation efficiency value.

3.4. Separation test in the microsystem

For the tests in microsystems, the same reaction mixture composition was used to prepare the monolithic phase, i.e. a porogen composed of ethylene glycol and cyclohexanol and LMA and EDMA as monomers introduced in a 65/35 molar ratio. Nonetheless, the phase was made more porous by introducing a larger volume of porogen in the reaction mixture, 70% against 60% before. This aimed at preventing from any problems caused by a too high pressure drop along the monolithic column which could result in the rupture of the cover lid bonding. The rupture may be detected as iridescence that appears between the SU-8 walls underneath the Pyrex cover lid caused by the leaking of the liquid outside the microchannels. The in-microsystem polymerisation succeeded as demonstrated by the resulting white trace in the selected channel (see Fig. 11). It should be noted here that no weakness neither of the microsystem nor of the cover lid bonding was observed after some hours pumping and the use of several chemical solutions. This is, to our knowledge, state-of-the-art performances for microfabricated systems, as the system including a polymerized monolith was able to withstand an up to 50 bar pressure drop (Fig. 6) for a whole night nanoLC runs.

The in-microchannel monolithic column was tested in the same conditions as before in nano-LC–MS coupling using

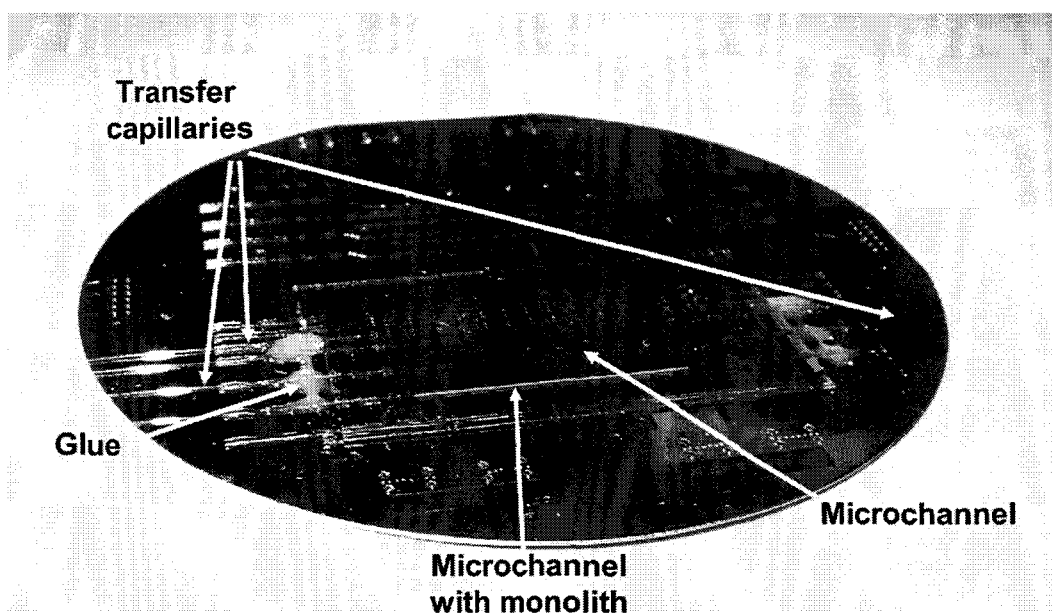


Fig. 11. Photograph of a SU-8-based microsystem including a monolithic column seen as a white trace in the first microchannel.

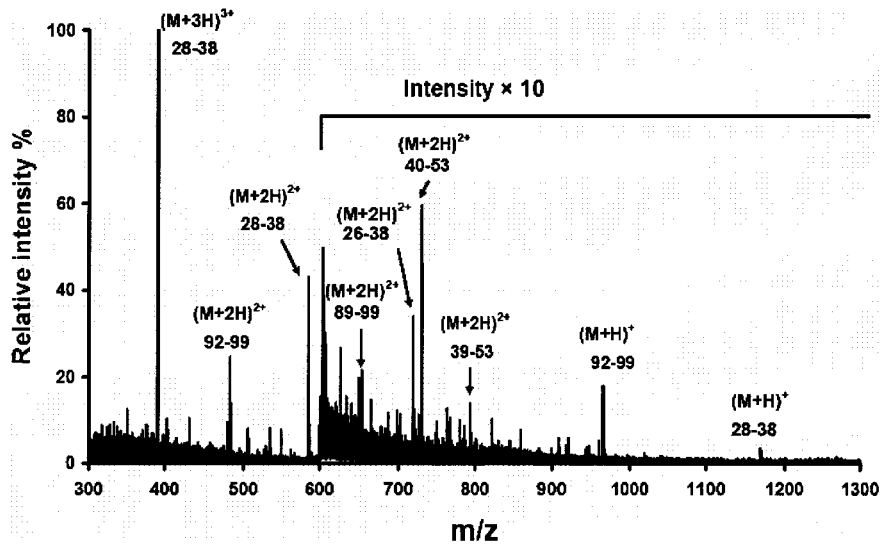


Fig. 12. Mass spectrum corresponding to the injection peak on the MS trace obtained for separation test carried out using the on-microsystem monolithic column. Arrows indicate the identified peptides from the Cyt C digest. The intensity is multiplied by 10 above m/z 600.

a Cytochrome *C* digest sample at 800–0.08 fmol/ μ l, 1 μ l being injected into the column. A poorer separation of the Cyt *C* fragments was achieved on the monolithic column prepared in the microchannel in spite of the relative high pressure drop that was measured during the separation tests. Fig. 12 represents the mass spectrum averaged over the elution peak. It is noteworthy that the peptides were efficiently desalted on the monolithic column but that most of the peptides were eluted in the injection peak. However, there were major changes here compared to the capillary format that could account for these results. Not only the total porosity of the monolithic phase was higher in the microchannel as in the capillary format, 70% against 60% volume in the capillary format, but the inner wall preliminary treatment was suppressed here and the column dimensions were dramatically changed. Hence, the observed low performances of the monolithic column could be accounted for by the following points. Firstly, as the porogenic content was increased, the resulting monolithic phase was more porous and consequently, its separation ability was lower. Secondly, the microchannel inner walls were not treated so as to secure the covalent anchoring of the monolith in its support; thus, there may be some fissuring at the inner wall proximity through which samples could flow without interacting with the monolithic stationary phase and its hydrophobic groups. Lastly, and surely, mainly, the column dimensions were dramatically changed compared to the case in the capillary format; in the microsystem, the column dimensions were a section area of $A_{\text{channel}} = l \times d$ with l and d being respectively of 100 and 200 μ m ($2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) and a length of 2.2 cm against a circular section area of $A_{\text{capillary}} = \pi r^2$ with an inner diameter being of 75 μ m ($0.44 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) and a column length of 17 cm in the capillary format. As well known, the chromatographic separation techniques are sensitive to the A_{section}/L ratio for the column; the lower this ratio, the better the separation. The 35-fold increase of this

ratio from the capillary to the microchannel format was apparently the main reason why a poor separation was achieved on the monolithic phase. A microsystem with optimized dimensions is currently under development and fabrication so as to improve these results.

4. Conclusion

In this paper we described the successful preparation of a monolithic phase, which was based on LMA as functional monomer and a cyclohexanol/ethylene glycol mixture as porogen in a capillary format for chromatographic purposes. This monolithic column was first tested in nanoLC/MS for the separation of a Cytochrome *C* digest sample at 800 and 80 fmol in a capillary format. The column was seen to exhibit separation capabilities and quality close to these obtained with a commercial column using the 800 fmol sample. However, using 80 fmol of Cyt *C* digest, the separation was outstanding, as the column was not saturated anymore as demonstrated by the higher efficiency values N . Nonetheless, the low-level peptides were more difficult to be detected and identified in MS. Lastly a polymer monolithic column was successfully prepared in a SU-8-based microfabricated channel and also tested for the separation of the Cyt *C* digest sample. The column dimensions afford a poor separation of the Cyt *C* fragments, but the system including the monolithic column was robust and was able to withstand high pressure values for 24 h at a time.

Acknowledgements

The authors would like to thank the French network for micro- and nanotechnologies for their financial support for this work (*Integrated Proteomics* project) as well as the

GenHomme network (*BioChipLab* consortium). The Mass Spectrometry facilities used for this study is funded by the European community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS and the Université des Sciences et Technologies de Lille. We also would like to thank Christophe Boyaval from the IEMN for the SEM images and Dr Steve Arscott from the IEMN for his kind help to design and fabricate the SU-8-based microsystem.

References

- [1] D.R. Reyes, D. Iossifidis, P.A. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2623.
- [2] P.A. Auroux, D. Iossifidis, D.R. Reyes, A. Manz, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2637.
- [3] G. Marko-Varga, J. Nilsson, T. Laurell, *Electrophoresis* 24 (2003) 3521.
- [4] N. Lion, T.C. Rohner, L. Dayon, I.L. Arnaud, E. Damoc, N. Youhnovski, Z.-y. Wu, C. Roussel, J. Jossierand, H. Jensen, J.S. Rossier, M. Przybylski, H.H. Girault, *Electrophoresis* 24 (2003) 3533.
- [5] S. Le Gac, S. Arscott, C. Rolando, *Electrophoresis* 24 (2003) 3640.
- [6] J.P. Kutter, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 352.
- [7] M. Wilm, M. Mann, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1.
- [8] E.X. Vrouwe, J. Gysler, U.R. Tjaden, J. Van der Greef, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 1682.
- [9] E. Varesio, S. Rudaz, K.-H. Krause, J.-L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 135.
- [10] A.R. Ivanov, C. Horvath, B.L. Karger, *Electrophoresis* 24 (2003) 3663.
- [11] G. Ocvirik, E. Verpoorte, A. Manz, M. Grasserbauer, H.M. Widmer, *Anal. Methods Instrum.* 2 (1995) 74.
- [12] H. Andersson, C. Jonsson, C. Moberg, G. Stemme, *Electrophoresis* 22 (2001) 3876.
- [13] B. He, L. Tan, F. Regnier, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1464.
- [14] J.-L. Liao, N. Chen, C. Ericson, S. Hjerten, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3468.
- [15] H. Andersson, W. Van der Wijngaart, G. Stemme, *Electrophoresis* 22 (2001) 249.
- [16] L. Ceriotti, N.F. de Rooij, E. Verpoorte, *Anal. Chem.* 74 (2002) 639.
- [17] B. He, F. Regnier, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 925.
- [18] B. He, N. Tait, F. Regnier, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3790.
- [19] E.C. Peters, F. Svec, J.M.J. Frechet, *Adv. Mater.* 11 (1999) 1169.
- [20] F. Svec, J.M.J. Frechet, *Chem. Mater.* 7 (1995) 707.
- [21] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271.
- [22] C. Viklund, F. Svec, J.M.J. Frechet, K. Irgum, *Chem. Mater.* 8 (1996) 744.
- [23] F. Svec, J.M.J. Frechet, *Ind. Eng. Chem. Res.* 38 (1999) 34.
- [24] F. Svec, J.M.J. Frechet, *Macromolecules* 28 (1995) 7580.
- [25] S. Xie, F. Svec, J.M.J. Frechet, *J. Chromatogr. A* 775 (1997) 65.
- [26] A. Premstaller, H. Oberacher, W. Walcher, A.M. Timperio, L. Zolla, J.-P. Chervet, N. Cavusoglu, A. van Dorsselaer, C.G. Huber, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2390.
- [27] M. Xu, D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Frechet, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1011.
- [28] A.R. Ivanov, L. Zang, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5306.
- [29] F. Svec, J.M.J. Frechet, *J. Chromatogr. A* 702 (1995) 89.
- [30] Z. Pan, H. Zou, W. Mo, X. Huang, R. Wu, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002) 141.
- [31] M. Zhang, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 22 (2001) 2593.
- [32] D. Josic, A. Buchacher, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 153.
- [33] B. Barroso, D. Lubda, R. Bischoff, *J. Proteome Res.* 2 (2003) 633.
- [34] T.J. Shepodd, US Patent 6 472 443 (2002);
T.J. Shepodd, *Chem. Abstr.* 137 (2002) 326337.
- [35] C. Yu, F. Svec, J.M.J. Frechet, *Electrophoresis* 21 (2000) 120.
- [36] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Frechet, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5088.
- [37] T. Rohr, C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Frechet, *Electrophoresis* 22 (2001) 3959.
- [38] G. Jas, A. Kirschning, *Chem. Eur. J.* 9 (2003) 5708.
- [39] D.J. Throckmorton, T.J. Shepodd, A.K. Singh, *Anal. Chem.* 74 (2002) 784.
- [40] J. Carlier, S. Arscott, V. Thomy, J.-C. Fourier, F. Caron, J.-C. Camart, C. Druon, P. Tabourier, *J. Micromech. Microeng.* 14 (2004) 619.
- [41] A.E. Rodrigues, V.G. Mata, M. Zabka, L. Pais, *J. Chromatogr. Lib.* 67 (2003) 325.
- [42] I. Gusev, X. Huang, C. Horvath, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 273.
- [43] N. Vervoort, P. Gzil, G.V. Baron, G. Desmet, *Anal. Chem.* 75 (2003) 843.
- [44] A. Wang, W. Carr, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 3.

