

N° d'ordre : 4021

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

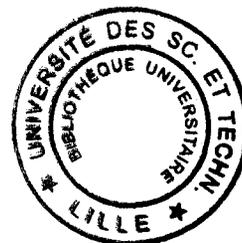
Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN ELECTRONIQUE DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Spécialité Microondes & Microtechnologies

Par

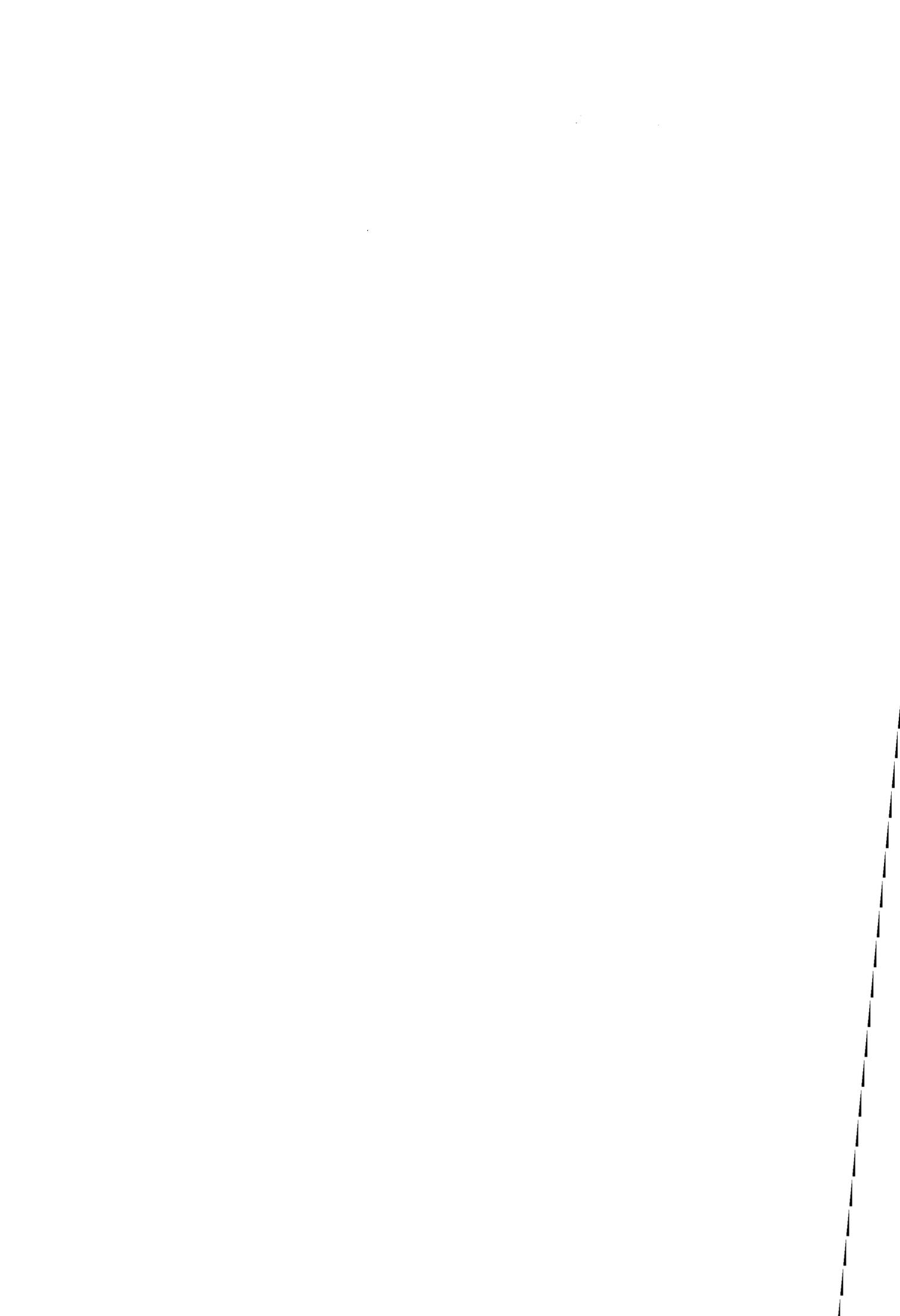
Nicolas VERPLANCK



**Développement de microsystèmes EWOD
sur surfaces hydrophobes et superhydrophobes
Application à la spectrométrie de masse**

Soutenue publiquement le 02 octobre 2007

<u>Directeur de thèse</u>	Jean-Christophe Camart,	Professeur, Université de Lille 1
<u>Encadrant</u>	Vincent Thomy,	Maître de Conférences, Université de Lille 1
<u>Rapporteurs</u>	Anne-Marie Gué,	Directrice de Recherche CNRS, LAAS
	Yong Chen,	Professeur, ENS Paris
<u>Examineurs</u>	Jean Berthier,	Ingénieur, CEA-LETI
	Bruno Berge,	Directeur scientifique, Varioptic
	Rabah Boukherroub,	Directeur de Recherche CNRS, Université de Lille 1
	Alain Cappy,	Professeur, Université de Lille 1
	David Quéré,	Directeur de Recherche CNRS, ESPCI



« Le visiteur est prié [...] de placer son doigt dans l'alvéole ci-contre. »

Baley [...] posa le bout de son index sur une surface laiteuse et particulièrement propre. Aussitôt, il sentit une vive piqûre à son doigt et, relevant en hâte celui-ci, il constata qu'une petite goutte de sang y perlait ; mais une seconde plus tard, elle disparut. Il secoua son doigt et le pressa, sans réussir à le faire saigner de nouveau.

Il était clair que l'on analysait son sang [...].

Il attendit un moment qui lui sembla long, puis l'écran se ralluma, et il y lut : « Le visiteur est prié d'avancer. »

« Les cavernes d'acier »

Isaac Asimov, 1953, Editions J'ai lu

Remerciements

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) dirigé par Monsieur le Professeur A. Cappy. Je lui adresse mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de me faire l'honneur de présider cette Commission d'Examen. Merci également pour les bons moments passés en Conseil de Laboratoire.

Je remercie Messieurs les Professeurs P. Tabourier et C. Druon pour leur accueil au sein de l'équipe « Micro/Nanofluidique » de l'IEMN.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur J.C. Camart qui a assuré la direction de ce travail de recherche.

J'adresse mes plus sincères remerciements et toute ma reconnaissance à Monsieur V. Thomy, Maître de Conférences, pour m'avoir guidé et soutenu tout au long de ce travail de recherche dont il est le co-directeur. Sa motivation sans faille et son optimisme ont permis de surmonter les moments difficiles. Son aide a également été précieuse lors de la fin de thèse alors que je démissionnais pour commencer un nouvel emploi à Lyon. Merci Vincent.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Madame A.M. Gué, Directrice de Recherche CNRS au Laboratoire d'Architecture et d'Analyse des Systèmes, et à Monsieur le Professeur Y. Chen, de l'Ecole Normale Supérieure, pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail et d'en être rapporteurs.

Je tiens à remercier Messieurs J. Berthier, Ingénieur au CEA-LETI, D. Quéré, Directeur de Recherche CNRS à l'ESPCI pour leur participation à cette Commission d'Examen.

Je remercie tout particulièrement Monsieur B. Berge, Directeur scientifique à Varioptic pour sa participation au jury de thèse ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant au sein de sa société.

Je remercie également Monsieur R. Boukherroub, Directeur de Recherche CNRS, de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire, pour sa collaboration, ses conseils et sa très grande disponibilité durant ces trois années ainsi que pour sa participation au jury de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur M. Salzet, Madame Isabelle Fournier et Monsieur M. Wisztorski, du Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, pour leur collaboration dans ce travail de thèse.

Je remercie également Monsieur R. Blossey, Directeur de Recherche CNRS, de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire, pour les discussions théoriques sur la superhydrophobicité.

Je ne saurais oublier Mademoiselle E. Galopin, doctorante au sein de l'équipe, qui a partagé avec moi ce travail de recherche ainsi que son bureau. Un grand merci pour ces trois années.

Je tiens également à remercier Alan, Anthony, Aurélien, Cédric, Clarisse, David, Florian, François, Gaëlle, Jean-Christophe, Julien, Kamel, Marie, Matthieu, Michèle, Nicolas, Olivier, Steeve, Timothée, Yannick et tous ceux que j'oublie pour tous les bons moments partagés, aussi bien en salle blanche qu'à la pause café. Je remercie également les différents représentants des doctorants que j'ai eu la chance de côtoyer.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'IEMN pour leur disponibilité, leur aide et leurs précieux conseils, en particulier le personnel de la centrale de technologie.

Je remercie enfin tout particulièrement mes parents, ma soeur et toute ma famille qui m'ont toujours soutenu dans ce que j'entreprenais, bien avant même le début de la thèse.

Une pensée, enfin, pour Claire, ma femme, qui m'a soutenu même lorsque j'étais dans ma caverne et qui a toujours cru en moi. Merci.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE 1 LABORATOIRES SUR PUCE POUR PROTEOMIQUE	21
1. INTRODUCTION	23
2. L'ANALYSE DE PROTEINES	23
2.1. <i>La spectrométrie de masse MALDI</i>	24
2.2. <i>Limites de l'analyse MALDI</i>	26
2.3. <i>La spectrométrie de masse DIOS</i>	26
2.4. <i>Les laboratoires sur puce pour la protéomique</i>	28
3. LES METHODES DE DEPLACEMENT DE GOUTTES.....	30
3.1. <i>La microfluidique discrète</i>	30
3.2. <i>Les gouttes dans l'huile</i>	30
3.3. <i>Les SAW</i>	32
3.4. <i>Les forces magnétiques</i>	33
3.5. <i>Les forces électrohydrodynamiques</i>	34
4. VERS UN MICROSYSTEME EWOD POUR ANALYSE DIOS.....	36
5. BIBLIOGRAPHIE.....	38
CHAPITRE 2 MICROSYSTEME EWOD POUR ANALYSE MALDI	43
1. INTRODUCTION	45
2. THEORIE DE L'ELECTROMOUILLAGE.....	45
2.1. <i>Mouillage de surface</i>	45
2.2. <i>L'électromouillage sur diélectrique</i>	48
2.3. <i>Saturation de l'angle de contact</i>	49
2.4. <i>L'EWOD pour le déplacement de microgouttes</i>	50
2.5. <i>Hystérésis</i>	53
3. REALISATION DU MICROSYSTEME CLASSIQUE	54
3.1. <i>Principe</i>	54
3.2. <i>Design utilisé</i>	55
3.3. <i>Choix des matériaux et étapes de fabrication de la base</i>	56
3.4. <i>Caractérisation électrique de la base</i>	58
3.5. <i>Réalisation du capot</i>	59
4. CARACTERISATION FLUIDIQUE	62
4.1. <i>Banc de caractérisation</i>	62
4.2. <i>Opérations microfluidiques de base</i>	65
5. DEPLACEMENT DE LIQUIDES BIOLOGIQUES	69
5.1. <i>Déplacement d'une goutte contenant des peptides</i>	69
5.2. <i>Déplacement d'une goutte de matrice</i>	69
6. ANALYSE MALDI.....	70
6.1. <i>Principe des ouvertures</i>	70
6.2. <i>Validation des ouvertures</i>	71

6.3. Analyse MALDI	72
7. CONCLUSION.....	73
8. BIBLIOGRAPHIE.....	74
CHAPITRE 3 MICROSYSTEME EWOD POUR ANALYSE DIOS.....	77
1. INTRODUCTION	79
2. LES SURFACES SUPERHYDROPHOBES.....	79
2.1. Principe de la superhydrophobicité	79
2.2. Théorie de la superhydrophobicité	81
2.3. Réalisation de surfaces superhydrophobes	89
3. REALISATION DU MICROSYSTEME SUPERHYDROPHOBE	90
3.1. Principe	90
3.2. Réalisation du capot superhydrophobe	91
3.3. Caractérisation des surfaces superhydrophobes	94
4. CARACTERISATION FLUIDIQUE	95
4.1. Déplacement de gouttes.....	95
4.2. Création de gouttes	97
5. DEPLACEMENT D'UNE GOUTTE CONTENANT DES PEPTIDES.....	98
6. ANALYSE DIOS	98
6.1. Principe des ouvertures.....	98
6.2. Validation des ouvertures	99
6.3. Analyse DIOS	100
7. COMPARAISON DES MICROSYSTEMES MALDI ET DIOS	102
8. CONCLUSION.....	103
9. BIBLIOGRAPHIE.....	104
CHAPITRE 4 ETUDE DE L'ELECTROMOILLAGE SUR SURFACES SUPERHYDROPHOBES .	109
1. INTRODUCTION	111
2. VARIATION DE MOUILLABILITE SUR SURFACES SUPERHYDROPHOBES	111
2.1. Variation de mouillabilité dans la littérature	111
2.2. Electromouillage et surfaces superhydrophobes.....	113
3. REALISATION DES SURFACES SUPERHYDROPHOBES	116
3.1. Synthèse	116
3.2. Présentation des surfaces étudiées	118
3.3. Traitement hydrophobe.....	122
4. CARACTERISATION DES SURFACES SUPERHYDROPHOBES.....	124
4.1. Angle de contact	124
4.2. Hystérésis	125
4.3. Fraction de surface des nanofils.....	125
5. CARACTERISATION DE L'ELECTROMOILLAGE	126
5.1. Nanofils sur silicium, dans l'air.....	126
5.2. Nanofils sur SiO ₂ , dans l'air	131
5.3. Nanofils sur SiO ₂ , dans l'huile	139

5.4. Conclusion	143
6. PREMIERE MODELISATION	143
7. DEPLACEMENT DE GOUTTES.....	146
7.1. Présentation du système	146
7.2. Caractérisation.....	151
8. CONCLUSION.....	151
9. BIBLIOGRAPHIE.....	153
CHAPITRE 5 AUTRES DEVELOPPEMENTS	157
1. INTRODUCTION	159
2. MICROSYSTEME POUR LA CULTURE DE CELLULES	159
2.1. Les cell-on-chip dans la littérature	159
2.2. Principe du microsysteme.....	163
2.3. Valves EWOD de 1 ^{ère} génération	164
2.4. Valves EWOD de seconde génération	172
2.5. Fonctionnalisation et culture	179
2.6. Conclusion	180
3. CACHES MALDI	181
3.1. Principe de l'imagerie MALDI	181
3.2. Principe du cache	182
3.3. Validation du cache en V-groove.....	185
3.4. Développement d'une grille pour imagerie	188
3.5. Support pour cache	189
3.6. Résultats MALDI.....	191
3.7. Conclusion	192
4. BIBLIOGRAPHIE.....	193
CONCLUSION GENERALE	197
ANNEXES	203
ANNEXE 1 - PROCEDES TECHNOLOGIQUES MIS EN ŒUVRE	205
1.1. Photolithographie.....	205
1.2. Métallisation	207
1.3. Gravure RIE.....	209
1.4. Bibliographie	210
ANNEXE 2 – CONTROLE DES ELECTRODES PAR LABVIEW	211
2.1. Interface utilisateur	211
2.2. Stockage des valeurs	212
2.3. Lancement de la boucle.....	213
2.4. Suivi en temps réel	213
PUBLICATIONS, BREVETS ET COMMUNICATIONS.....	217

Introduction générale

L'apparition, depuis une dizaine d'années, d'enjeux scientifiques et industriels importants en recherche biologique, diagnostic médical, analyse environnementale... a amené à l'émergence de la thématique *lab-on-chip*, ou laboratoires sur puce. Dédiée à la réalisation de dispositifs miniaturisés pour l'analyse chimique ou biologique¹, ils présentent, comme intérêt, outre les avantages inhérents à la réduction d'échelle des opérations réalisées classiquement, un gain en terme de coût pour des produits éventuellement jetables ainsi que la mise au point de fonctions originales non encore possibles pour le moment. La conception de ces *lab-on-chip* implique la nécessaire compatibilité d'un ensemble de fonctions existant isolément ou encore indisponibles justifiant ainsi les approches pluridisciplinaires : micro et nanotechnologie, chimie, biologie, instrumentation biomédicale, mécanique des fluides, physique...

La réalisation de microsystèmes microfluidiques à l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) a été initiée au début des années 2000 sous la responsabilité des Professeurs C. Druon et P. Tabourier. Parmi l'ensemble des travaux entrepris, nous pouvons citer les microsystèmes microfluidiques dédiés à l'analyse par spectrométrie de masse, outils de référence pour l'identification des protéines. Ils intègrent des composants élémentaires pour des opérations de prétraitement des échantillons biologiques ainsi qu'une interface micro/macro pour le couplage à l'instrumentation d'analyse. En particulier, les travaux de thèse de Mr François Caron ont amené, sous l'égide du consortium BioChipLab™, à la mise au point d'une filière technologique (verre, polymère SU-8, Téflon) pour la réalisation d'opérations d'électromouillage sur diélectrique (EWOD) ainsi qu'à la conception et la réalisation d'une architecture microfluidique discrète, brevetée, autorisant le déplacement sous forme de goutte, le prétraitement et l'analyse par spectrométrie de masse de type MALDI d'échantillons biologiques tests.

Cette thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux basés sur l'EWOD pour la spectrométrie de masse MALDI. Elle est centrée sur l'optimisation : (i) des opérations technologiques, (ii) des caractéristiques microfluidiques et (iii) des conditions d'analyse. L'originalité de ce travail porte en particulier sur l'intégration de surfaces superhydrophobes au sein de différents dispositifs microfluidiques EWOD, amenant à des résultats originaux tant applicatifs que fondamentaux. La perspective de systèmes intégrés, de la cellule biologique à l'analyse des protéines qu'elles expriment, nous a amené à concevoir et à réaliser un premier microsystème dédié à la culture de cellules en goutte ainsi qu'un cache en silicium pour imagerie MALDI.

¹ E. Verpoorte, "Microfluidic chips for clinical and forensic analysis", *Electrophoresis* **23** (2002) 677-712.

Ce projet s'est déroulé dans le cadre de collaborations avec des laboratoires multidisciplinaires, de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, issus de thématiques aussi variées que les micro et nano technologies (IEMN), la chimie de surface (Equipe 'Bio interfaces' de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire, IRI), la mécanique des fluides (Laboratoire de Mécanique de Lille, LML), la spectrométrie de masse (Equipe Imagerie MALDI du Laboratoire de Neuroimmunologie de Annélides, LNA) et la physique des surfaces superhydrophobes (Equipe 'Modélisation de Nanosystèmes Biologiques' de l'IRI). La proximité géographique de l'ensemble des acteurs, l'interactivité et la réactivité des personnels impliqués ont, sans contexte, été un facteur prépondérant dans l'obtention des résultats présentés.

Le présent manuscrit se décompose en cinq chapitres. Le premier chapitre débute par une présentation du contexte biologique de notre étude et en particulier des enjeux liés à l'analyse protéomique. La spectrométrie de masse de type MALDI, outils de référence en la matière, est alors détaillée. Présentant quelques limitations intrinsèques notamment dues à l'adjonction nécessaire de matrice, l'utilisation de la spectrométrie de masse DIOS (*Desorption/Ionization On Silicon*) offre une complémentarité que nous justifions. Suit alors un état de l'art des microsystèmes fluidiques pour l'analyse biologique tant au niveau des dispositifs commerciaux que des prototypes de recherche. Nous montrons alors que la microfluidique discrète (sous forme de goutte), et en particulier celle qui repose sur l'électromouillage, possède toutes les spécifications nécessaires à l'intégration dans un *lab-on-chip*. L'originalité de l'architecture proposée, compte tenu de l'état de l'art et des travaux précédents à l'IEMN, repose sur l'utilisation de surfaces rugueuses (nanotexturées) comme support pour analyse DIOS, surfaces qui se révèlent être superhydrophobes.

Le chapitre 2 présente une synthèse de la théorie de l'électromouillage en soulignant en particulier les grandeurs physiques limitantes pour le déplacement que sont la saturation de la variation de l'angle de contact en fonction de la tension ainsi que l'hystérésis des surfaces employées. La seconde partie du chapitre détaille l'ensemble du banc EWOD mis en place pour le déplacement de gouttes par EWOD. Sont notamment présentés l'électronique de commande, l'interface logicielle spécifiquement développée ainsi que le support physique du microsystème. La dernière partie de ce chapitre détaille les différentes étapes nécessaires à la réalisation d'un microsystème EWOD pour analyse MALDI. Ce dispositif servira d'élément de comparaison, dans la suite de la thèse, avec le microsystème DIOS réalisé, tant au niveau de la caractérisation microfluidique que de l'analyse par spectrométrie de masse. La technologie employée ici, bien que développée lors d'un précédent travail de thèse, a été optimisée et largement simplifiée. Nous caractérisons ensuite le microsystème avec de l'eau désionisée avant de déplacer des gouttes comprenant différents mélanges de peptides et

des gouttes de matrice. Une caractérisation des surfaces par fluorescence ainsi que par analyse MALDI valide finalement le microsysteme et clos ce chapitre.

Les 3 chapitres suivants présentent les points clés de la thèse.

Le chapitre 3 consiste en l'intégration de surfaces nanotexturées au sein du microsysteme EWOD original pour analyse DIOS. Ces surfaces, réalisées par attaque chimique du silicium, ont la particularité d'être superhydrophobes. Nous abordons dans un premier temps la théorie de la superhydrophobicité avant d'intégrer de telles surfaces au sein du microsysteme développé au chapitre précédent. Comme dans le chapitre précédent, le microsysteme est caractérisé avec de l'eau désionisée avant le déplacement de mélanges de peptides. Enfin, nous effectuons une détection par fluorescence ainsi qu'une analyse DIOS. Les résultats sont confrontés à ceux du chapitre précédent.

Suite à l'utilisation de surfaces nanotexturées comme support DIOS, nous nous intéressons plus particulièrement, dans le chapitre 4, à l'électromouillage sur surfaces superhydrophobes qui restait un verrou technologique jusque très récemment. En effet, les meilleurs résultats de la littérature font état d'une relaxation partielle de la goutte. La particularité des surfaces employées (nanofils de silicium obtenus par synthèse) nous a permis d'effectuer pour la première fois une opération totalement réversible d'EWOD dans un environnement d'air. Les mêmes caractérisations dans un environnement d'huile ont également été effectuées afin d'être comparées à la littérature. Nous présentons une interprétation du phénomène ainsi que les premiers éléments d'un modèle théorique. La dernière partie présente un premier microsysteme pour le déplacement de gouttes sur surfaces superhydrophobes.

Enfin, le chapitre 5 présente deux des applications développées en parallèle de la thèse. Il s'agit dans un premier temps d'un microsysteme composé de valves EWOD pour la création parallélisée de gouttes ayant vocation à être utilisées en culture de cellules. La seconde partie, hors du champ applicatif de l'électromouillage, s'intéresse à l'imagerie de coupes de tissus par spectrométrie de masse MALDI. Cette technique est principalement limitée, en terme de résolution, par le diamètre du faisceau laser. Nous tentons d'apporter une solution simple et adaptable à tout type de spectromètres grâce à la microfabrication de masques optiques sur silicium.

Chapitre 1

Laboratoires sur puce pour protéomique

1. Introduction

Depuis plusieurs années maintenant, les puces à ADN se sont parfaitement intégrées au sein des opérations de routine en biologie et ont permis de dresser une carte du génome humain. Les retombées en terme de recherche contre les maladies génétiques sont exceptionnelles. Toutefois la mise en place de cette cartographie amène plus de questions qu'elle n'en résout. Selon les biologistes, la compréhension du comportement cellulaire, de son interaction avec son environnement et en particulier avec ses congénères (processus de régulation) serait liée aux expressions protéiques.

Le nouveau défi des biologistes est de dresser la carte complète du protéome humain, c'est-à-dire l'ensemble de nos protéines. Pour cela, il est nécessaire de développer des systèmes similaires aux puces à ADN : les puces à protéines. Non seulement leur nombre est beaucoup plus conséquent que pour l'ADN (500 000 à 1 000 000 chez les mammifères), mais en plus leurs propriétés intrinsèques (taille, conformation, hydrophobicité) rendent extrêmement complexe leur manipulation. D'autre part, leur concentration au sein du milieu biologique peut s'étendre sur une vaste plage selon qu'il s'agisse de protéines 'de base' communes à toute cellule, ou de protéines synthétisées et sécrétées en faible quantité (protéines marqueurs à un stade précoce de la dégénérescence cellulaire par exemple).

Dans ce contexte, la spectrométrie de masse reste la technique de référence pour l'identification des protéines. Cependant, pour gagner en terme de sensibilité, de temps d'analyse, de coûts, de parallélisation, les volumes d'analytes nécessitent d'être de plus en plus faibles. Leur manipulation s'avère délicate et il est nécessaire d'automatiser les différentes opérations de préparation de l'échantillon.

Ce chapitre présente dans un premier temps les spectrométries de masse MALDI et DIOS ainsi que les différents microsystèmes commerciaux pour l'analyse de protéines. La seconde partie présente un état de l'art succinct sur les différentes possibilités de déplacement de liquide en microfluidique discrète. Nous détaillons ensuite les choix effectués dans le cadre de cette thèse concernant la technique de déplacement, les surfaces étudiées ainsi que l'architecture adoptée pour le *lab-on-chip*, ou laboratoire sur puce.

2. L'analyse de protéines

La spectrométrie de masse MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) est la technique de référence en analyse protéomique. La méthode d'analyse repose sur l'ionisation des analytes (protéines ou peptides) qui sont différenciés par l'appareil par l'action d'un champ électrique ou magnétique. Le spectromètre de masse fournit alors un spectre représentant l'abondance statistique de chaque type d'ions formé en fonction du

rapport m/z (masse/charge)¹. L'information obtenue est qualitative dans le sens où elle correspond aux abondances relatives.

2.1. La spectrométrie de masse MALDI

En désorption laser classique (LDI), des impulsions laser sont utilisées pour produire des ions à partir d'échantillons solides. Cette technique est limitée non seulement par les propriétés physiques du matériau (spectres de photoabsorption, volatilité, polarité...) mais aussi à l'analyse de composés de faible masse².

En effet, dans ce cas, l'ionisation des composés est réalisée en phase gazeuse, c'est-à-dire après volatilisation de l'échantillon (sous l'effet conjugué du vide et de la chaleur). Cette technique est donc peu adaptée aux molécules polaires, comme les peptides et les protéines car plus la molécule est grande, plus il est difficile de la transférer en phase gazeuse sans dégradation. La solution a été apportée en 1988 par des méthodes d'ionisation dites douces (ou indirectes), comme le MALDI³⁻⁴, permettant l'ionisation et l'évaporation simultanées au moyen d'un transfert d'énergie par absorption des photons laser tout en préservant l'analyte. Les ions ainsi produits en phase gazeuse ont des énergies internes faibles et restent stables sur toute la durée de l'analyse.

Le MALDI repose sur l'utilisation d'un composé organique, la matrice, dans laquelle est dispersé l'échantillon (10^4 molécules de matrice pour 1 molécule d'analyte) (Figure 1.1). Le mélange matrice/analyte est placé sur une cible MALDI conductrice en acier inoxydable (Figure 1.2).

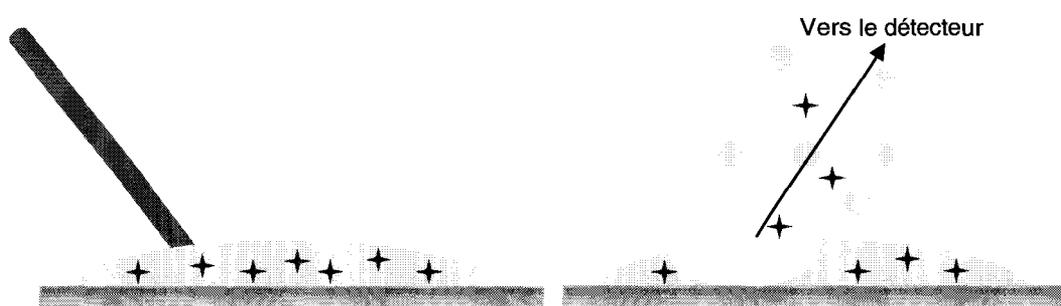


Figure 1.1 - Schéma de principe du MALDI : a) irradiation du dépôt par tir laser, absorption des photons UV par les molécules de matrice et excitation puis ionisation de la matrice, b) relaxation et dissociation de la matrice, passage en phase gazeuse, transfert de charges (protons et cations) vers les molécules d'échantillon.

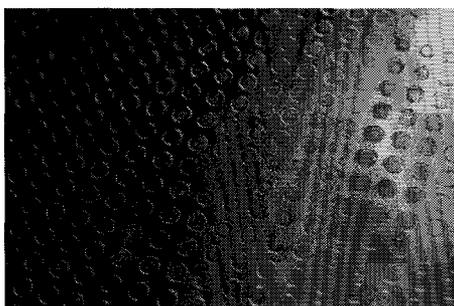


Figure 1.2 - Détail d'une plaque MALDI⁵.

L'évaporation du solvant entraîne une co-cristallisation de l'échantillon et de la matrice. La particularité de cette dernière est d'absorber l'énergie à la longueur d'onde du laser utilisé⁶ (la plupart des lasers employés en MALDI émettent dans l'UV⁷⁻⁸). L'irradiation du dépôt se traduit par deux phénomènes :

- une absorption par la matrice des photons émis par le laser,
- une excitation thermique et électronique de celle-ci conduisant à son ionisation par transfert de protons à l'échantillon.

Ce transfert entraîne, dans certains cas, l'éjection de matière sous forme d'un plasma qui va rapidement s'étendre en phase gazeuse sous vide. Une partie de cette matière sera ionisée.

Les spectromètres de masse MALDI sont généralement associés à un détecteur temps de vol (TOF, *Time Of Flight*). Les analyseurs TOF sont basés sur la séparation par un champ électrique des molécules ionisées puis sur la mesure du temps d'arrivée de celles-ci au détecteur (temps de vol). Il est alors possible de créer un spectre selon le rapport m/z des ions détectés (Figure 1.3). Ce rapport m/z permet d'identifier sans équivoque la molécule ionisée. On remonte à la composition de l'échantillon par l'intermédiaire de banques de données qui font le lien entre le rapport m/z et le nom de la molécule.

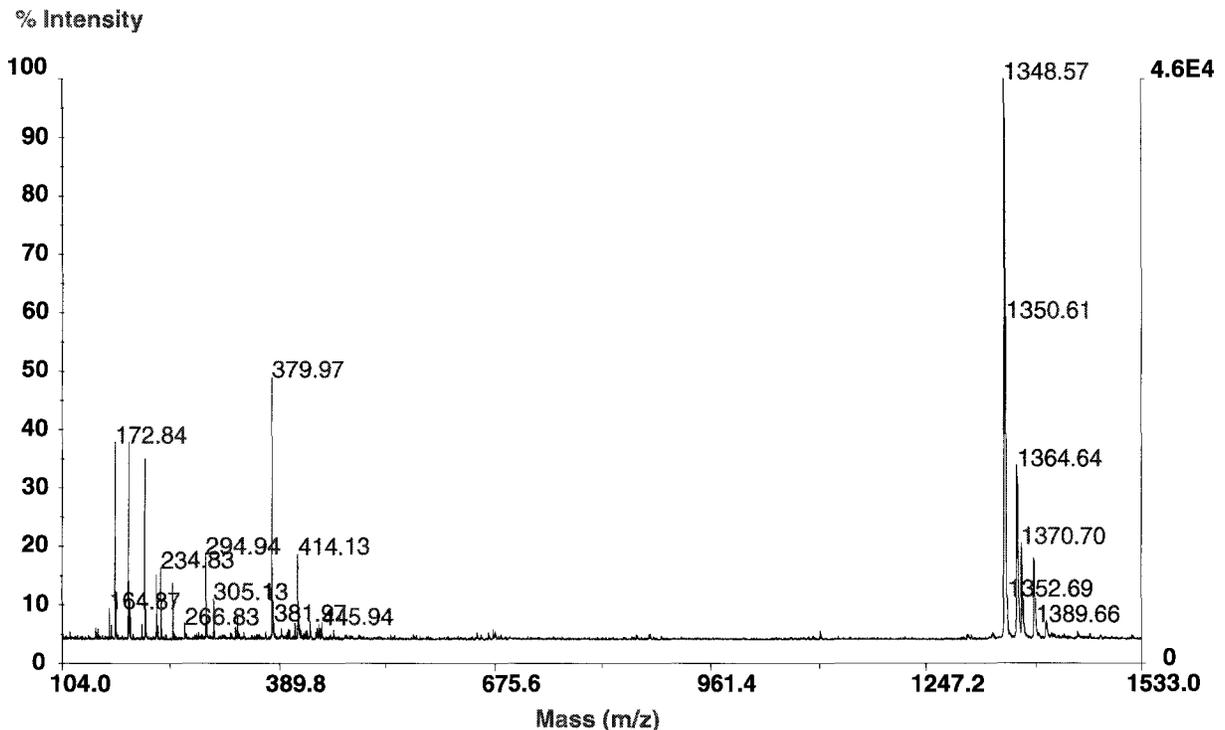


Figure 1.3 - Exemple de spectre de masse MALDI : analyse de la Substance P ($10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) mélangée avec de la matrice HCCA.

2.2. Limites de l'analyse MALDI

L'analyse simultanée de l'échantillon et de la matrice représente toutefois un inconvénient majeur. En effet, l'ionisation de la matrice conduit à la présence de pics parasites dans les basses masses empêchant la visualisation des peptides de masse équivalente. Ce phénomène est d'autant plus marqué que la concentration de matrice est nettement plus élevée que celle de l'échantillon (facteur 10^4 - Figure 1.4).

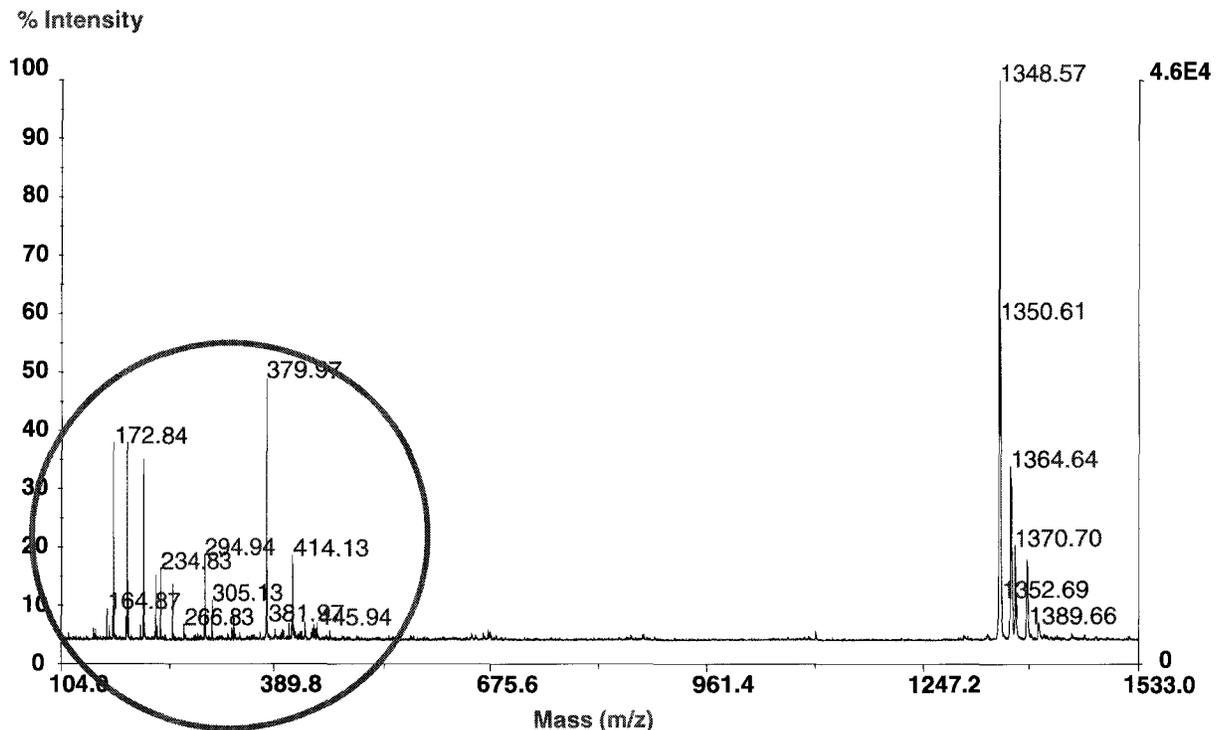


Figure 1.4 - Bruit de fond lié à la désorption de matrice en spectrométrie de masse MALDI. La matrice présente dans les basses masses empêche la détection de peptides de faible masse et présents en quantité bien plus faible que la matrice.

2.3. La spectrométrie de masse DIOS

De nouvelles surfaces ont été développées pour s'affranchir de cette matrice. Historiquement, Wei *et al.* ont été les premiers à mettre au point en 1999 une technique de désorption/ionisation douce en utilisant du silicium poreux (DIOS, *Desorption/Ionization On porous Silicon*)⁹. La capacité de cette surface à transmettre l'énergie du laser à l'analyte semble liée à ses propriétés de photoluminescence, fortement dépendantes de la géométrie du pore. Ainsi, contrairement au MALDI dans lequel la longueur d'onde du laser est étroitement liée à la structure moléculaire de la matrice, le silicium poreux utilisé en DIOS ne doit absorber qu'un photon pour être photoluminescent (capacité à exciter les électrons de la bande de valence du silicium cristallin)¹⁰.

Une autre explication du phénomène de désorption serait que la rugosité, plus que la porosité, permette d'obtenir un bon signal DIOS. A partir de là, différentes formes de

nanostructures ont été testées comme potentielles cibles DIOS¹¹ telles que des nanotubes¹², nanofils¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶, nanogrooves¹⁷, nanoparticules¹⁴⁻¹⁸⁻¹⁹, nanocavités²⁰ ou encore des microcolonnes¹⁴⁻²¹. Malgré le nombre important de surfaces, la compréhension définitive du phénomène de désorption/ionisation DIOS (comme MALDI) est toujours une question ouverte.

La Figure 1.5 présente le résultat d'un spectre DIOS réalisé sur nanofils de silicium. On peut noter l'absence de bruit au niveau des basses masses, ce qui permet la visualisation de peptides présents en faible quantité, contrairement à l'analyse MALDI (Figure 1.4). Cependant, on peut remarquer que l'intensité des pics est plus faible, le MALDI reste la référence pour les hautes masses.

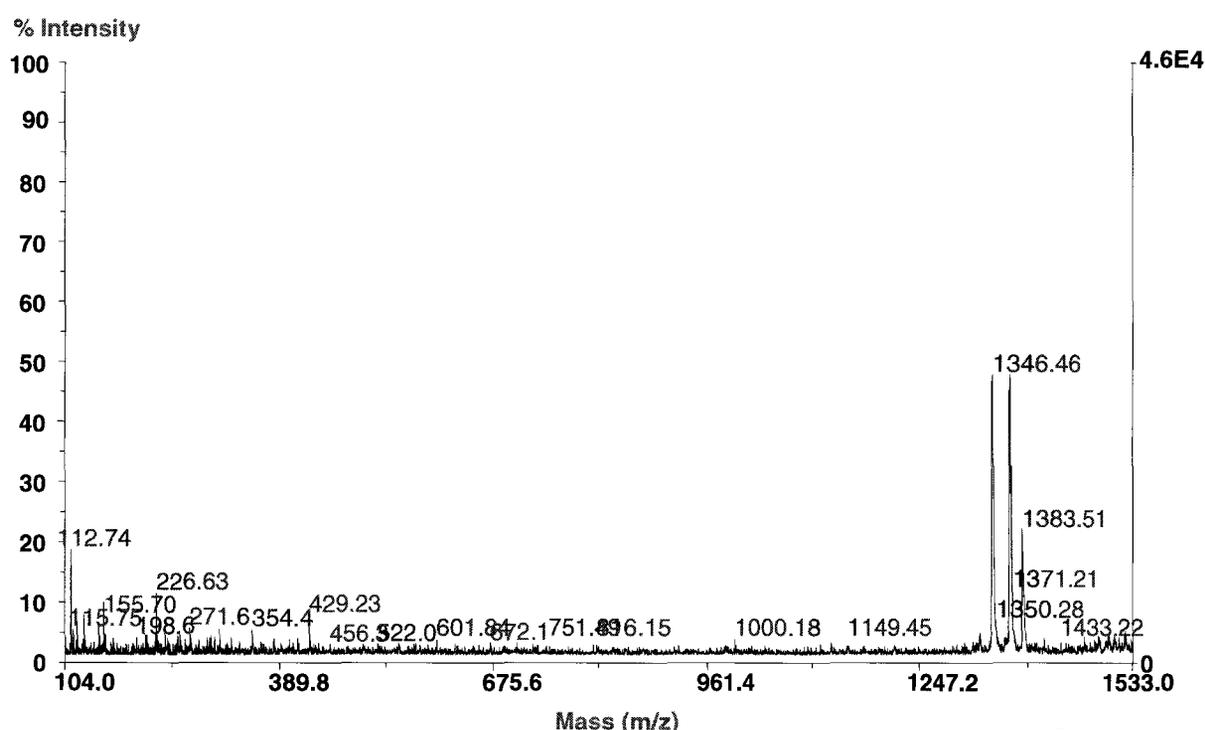


Figure 1.5 - Exemple de spectre de masse DIOS : analyse de la Substance P (10^{-5} mol.L⁻¹). On remarque l'absence de bruit lié à la matrice au niveau des basses masses. De nouveaux pics apparaissent.

L'intérêt pour ce type de surfaces est tel que la société Waters²² (USA) possède une licence d'exclusivité pour la commercialisation de cibles DIOS. La Micromass MassPREP DIOS-targetTM est constituée de 96 puits en silicium poreux réalisés par gravure spécifique sur silicium cristallin.



Figure 1.6 - Cible DIOS sur silicium poreux, commercialisée par la société Waters²².

2.4. Les laboratoires sur puce pour la protéomique

L'analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon brut, contenant des protéines, nécessite plusieurs opérations de prétraitement : digestion trypsique, dessalage, pré-concentration. Toutes ces opérations sont, à l'heure actuelle, manuelles. Dans le meilleur des cas, elles peuvent être gérées par des automates de biochimie, dont le coût est relativement élevé.

Depuis quelques années, un grand intérêt est porté à la miniaturisation de systèmes d'analyse pour les applications chimiques ou biologiques : les *lab-on-chip*²³⁻²⁴⁻²⁵. L'objectif est d'intégrer au sein de la même puce un ensemble de fonctions biologiques.

Les projets de laboratoires sur puce sont nécessairement interdisciplinaires. En effet, ils intègrent des compétences issues de la microtechnologie, de la chimie, de la biologie et de l'instrumentation scientifique (analyse par spectrométrie de masse dans notre cas). Ainsi, le microsystème en lui-même est réalisé à partir des techniques empruntées à la microélectronique (lithographie, métallisation, gravure...) et développe des techniques spécifiques (microcanaux en PDMS²⁶ ou en SU-8²⁷ par exemple). Mais il faut également faire appel à la chimie pour fonctionnaliser les surfaces de l'architecture microfluidique afin d'éviter l'adsorption non désirée et de favoriser les interactions spécifiques. Et enfin, l'ensemble du dispositif doit être conçu en respectant les conditions liées à la biologie (culture de cellules dans des conditions draconiennes) et à l'application finale (interface avec l'instrumentation, dans notre cas un spectromètre de masse MALDI).

A terme, l'objectif de ces laboratoires est d'intégrer les opérations de prétraitement faites en routine dans les laboratoires d'analyse biologique et de pouvoir être simplement couplés à l'outil d'analyse. Plusieurs microsystèmes réalisés dans ce sens sont d'ores et déjà commercialisés.

Agilent²⁸, par exemple, commercialise des laboratoires sur puce composés d'un réseau de microcanaux permettant de déplacer des liquides de l'ordre du picolitre par pression ou par force électrocinétique et d'effectuer de nombreuses opérations comme le mélange, la dilution, la séparation par électrophorèse et par chromatographie et la détection par fluorescence. Un exemple de laboratoire sur puce Agilent est présenté Figure 1.7.

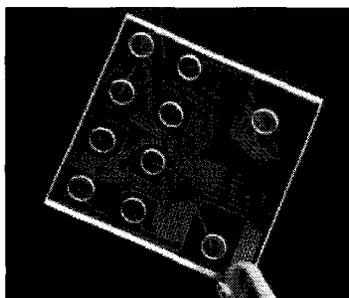


Figure 1.7 - *Lab-on-chip* commercialisé par la société Agilent²⁸.

On peut citer d'autres sociétés comme CIPHERGEN²⁹ ou Gyros AB³⁰. Ciphergen commercialise des ProteinChip[®] dédiées à une analyse SELDI-MS en exploitant l'affinité des protéines pour des surfaces fonctionnalisées ou 'surfaces chromatographiques' (Figure 1.8).

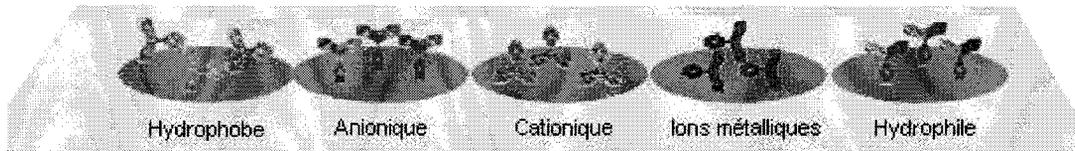


Figure 1.8 - Exemple de surfaces fonctionnalisées chimiquement pour analyse de protéines par SELDI-MS (Société Ciphergen²⁹).

La société Gyros développe des microsystèmes sur CD permettant le remplissage par centrifugation de chacun des puits et l'analyse par fluorescence induite par laser. Cela conduit à des analyses parallélisées d'une grande reproductibilité grâce à la symétrie du système.

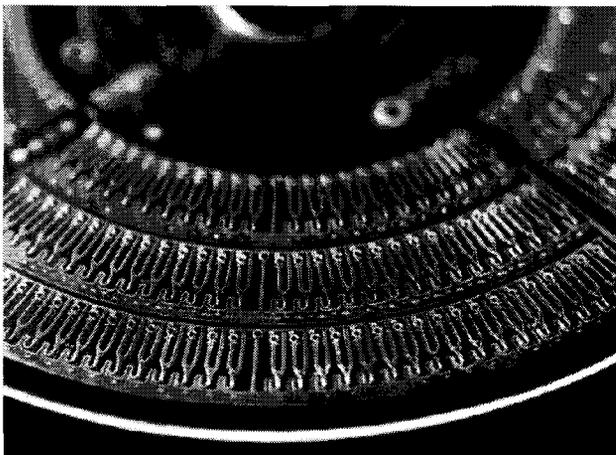


Figure 1.9 - Laboratoire sur puce réalisé sur CD permettant la centrifugation de volumes calibrés au sein des chambres et l'analyse par fluorescence à l'aide d'un laser : a) vue du micro-système et b) station de travail Gyros Workstation LIF³⁰.

En conclusion, les différents exemples présentés permettent de souligner que la clé de voûte des laboratoires sur puce est le déplacement de liquides. La microfluidique dicte ainsi les choix à effectuer en matière de matériaux employés, d'architectures conçues et conditionne les opérations biochimiques susceptibles d'être développées.

3. Les méthodes de déplacement de gouttes

3.1. La microfluidique discrète

La microfluidique est constituée de deux domaines bien distincts : la microfluidique continue et la microfluidique discrète.

La microfluidique continue met en œuvre une architecture fluide basée sur des microcanaux³¹. Historiquement liée au concept de *lab-on-chip* (μ TAS, *Miniaturized total chemical analysis system*)³², elle est sans doute la plus répandue à l'heure actuelle puisque la technologie et l'instrumentation nécessaires sont bien maîtrisées. Le déplacement de liquide nécessite des pressions élevées en hydrodynamique (plusieurs dizaines de bars dans des microcapillaires) et des tensions élevées en électro-osmose (plusieurs kV) par exemple. Selon le type d'application envisagée, la microfluidique continue peut s'avérer rédhibitoire. Ainsi pour de faibles dimensions (<1mm), les écoulements au sein de ces microcanaux sont laminaires. La seule diffusion ne permet pas le mélange de deux liquides si ce n'est au bout de temps de réaction longs. D'autre part, la réalisation d'opérations séquencées (par exemple succession de prétraitements par mise en contact avec des surfaces bio-actives) est difficilement envisageable dans ce cadre.

La microfluidique discrète, quant à elle, permet le déplacement de volumes calibrés, tout en permettant d'effectuer de nombreuses opérations en parallèle à partir d'un seul échantillon scindé en plusieurs gouttes. Ces dernières se comportent alors comme un bioréacteur indépendant. Des opérations microfluidiques élémentaires telles que l'apport d'analytes (excitation biochimique) ou la scission d'une partie du volume (pour analyse ou pour mise en contact avec un bioréacteur voisin) en font un véritable micro-laboratoire biologique. La microfluidique discrète a donc un très fort potentiel notamment au sein des *lab-on-chip* sans nécessiter une architecture microfluidique complexe.

3.2. Les gouttes dans l'huile

En travaillant à petite échelle (de l'ordre du microlitre voire du nanolitre), nous sommes confrontés à un problème naturel : l'évaporation. Ainsi, plus la goutte est petite, plus l'évaporation est rapide. D'autre part, l'interaction liquide/surface entraîne une perte parfois dramatique des analytes de l'échantillon tout au long du trajet par adsorption non spécifique (et surtout non souhaitée). L'une des solutions apportées à ces limitations est l'écoulement diphasique qui consiste à immerger la goutte dans un fluide non miscible. Généralement, un mélange huile/surfactant (tétradécane + span 80 par exemple) est utilisé.

La plupart des travaux portant sur l'utilisation de deux fluides non miscibles sont à l'interface entre la microfluidique continue et la microfluidique discrète. En effet, l'opération a souvent lieu dans des microcanaux remplis d'huile et dans lesquels sont insérées des

gouttes d'analytes. On se retrouve ainsi avec des trains de gouttes mis en mouvement par la pression apportée par le pousse-seringue. Un schéma de principe d'un tel microsysteme est présenté Figure 1.10.

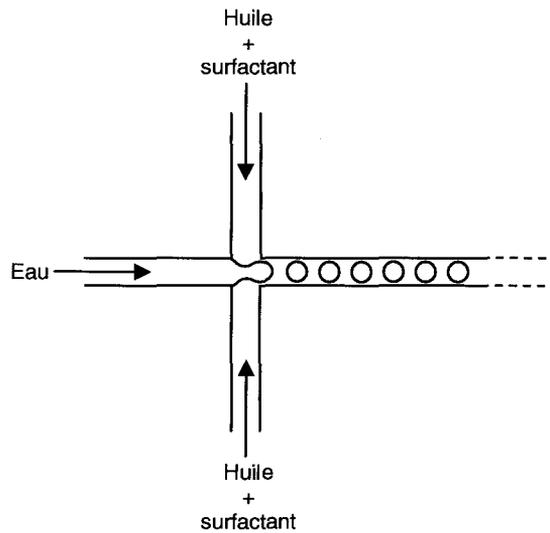


Figure 1.10 - Schéma de principe de création de gouttes dans un système diphasique.

De nombreux travaux font état de systèmes diphasiques. Les études portent sur les aspects purement fluidiques (influence de la pression sur la densité et la taille des gouttes par exemple³³) mais également sur le développement de nouvelles applications, notamment à vocation biologique comme le transport de cellules.

La société Rain Dance Technologies³⁴ commercialise de tels microsystemes pour le criblage à haut débit (*High Throughput Screening*) (Figure 1.11). Il leur est par exemple possible d'isoler quelques cellules par goutte et de détecter leur état (en vie ou non)³⁵.

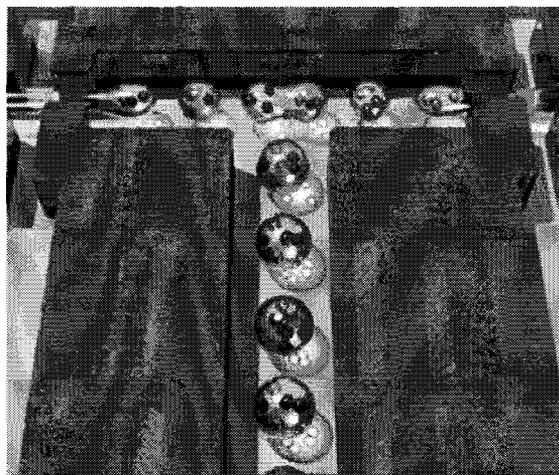


Figure 1.11 - Microsysteme permettant l'émulsion de milliers de gouttes par seconde pour des applications biomédicales³⁴.

Cette méthode de transport de gouttes rend toutefois très difficile la possibilité d'interagir réellement avec la goutte, en particulier dans le cas de surfaces fonctionnalisées.

3.3. Les SAW

La méthode basée sur les ondes acoustiques de surface permet de manipuler des gouttes dans l'air. Une onde acoustique (SAW pour *Surface Acoustic Waves*) est générée à la surface d'un matériau piézoélectrique spécifique par l'intermédiaire de transducteurs interdigités (IDT, *InterDigitated Transducers*) soumis à une excitation sinusoïdale.

Le contrôle de cette onde permet d'effectuer de nombreuses opérations microfluidiques (Figure 1.12). En fonction de la puissance, il est ainsi possible de réaliser des micromélanges (Figure 1.13.a), déplacer la goutte, voire l'éjecter (Figure 1.13.b). L'IEMN développe depuis plusieurs années de tels microsystèmes sur substrats de niobate de lithium (LiNbO_3) fonctionnalisés OTS (hydrophobes) sur lesquels sont réalisés des peignes interdigités Ti/Au³⁶.

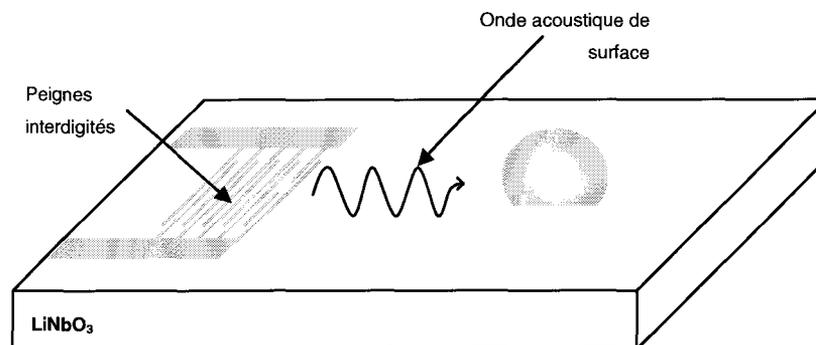


Figure 1.12 - Principe de fonctionnement d'un microsystème SAW pour le déplacement de microgouttes.

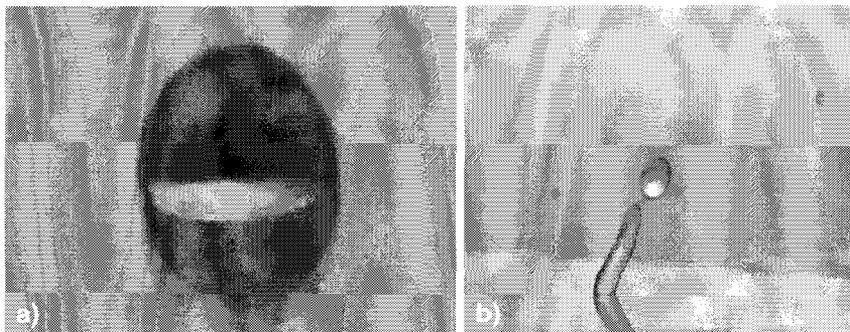


Figure 1.13 - Quelques opérations microfluidiques réalisables à partir d'une plateforme SAW en fonction de la puissance : a) micromélange, b) éjection de gouttes³⁷.

La société Advalytix³⁸ commercialise des produits utilisant la technologie SAW pour des applications biologiques tels que les micromélanges, l'hybridation d'ADN, la culture de cellules.

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir gérer simultanément le déplacement d'une ou de plusieurs gouttes suivant 2 directions perpendiculaires. Cependant, elle nécessite un système de localisation des gouttes pour rendre leur déplacement précis et

afin de pouvoir opérer en aveugle. Différentes méthodes ont été proposées pour effectuer une telle localisation. Elles nécessitent soit un grand nombre de transducteurs³⁹ soit de développer une électronique dédiée⁴⁰.

3.4. Les forces magnétiques

Des travaux encore peu nombreux concernent le déplacement de gouttes à l'aide de forces magnétiques. Une équipe de l'EPFL a ainsi développé un microsystème permettant le déplacement d'une goutte d'eau dans une huile silicone⁴¹. L'actionnement magnétique est assuré par la force imposée sur les microparticules superparamagnétiques placées dans la goutte. A partir de plusieurs niveaux de bobines, il est possible de changer la topologie du champ magnétique et d'effectuer les opérations standard en microfluidique, à savoir le déplacement, la fusion, le mélange ou encore la scission de gouttes. Un schéma du microsystème est présenté Figure 1.14.

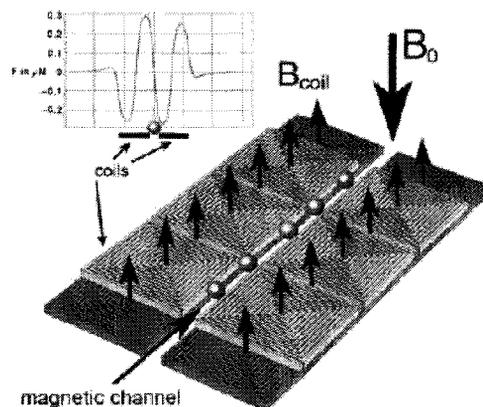


Figure 1.14 - Schéma d'un microcanal formé par deux niveaux de bobines. La simulation analytique montre le profil de la force magnétique dans la direction transverse au microcanal⁴¹.

Lyuksyutov *et al.* ont quant à eux démontré la possibilité de déplacer une goutte de $6\mu\text{m}$ de diamètre (mélange glycérine/eau) dans un microcanal de $100\mu\text{m}$ de diamètre délimité par des aimants entraînant la lévitation de la goutte (Figure 1.15)⁴². Des pulses de courant générés par des électrodes situées au fond du canal permettent le déplacement de la goutte.

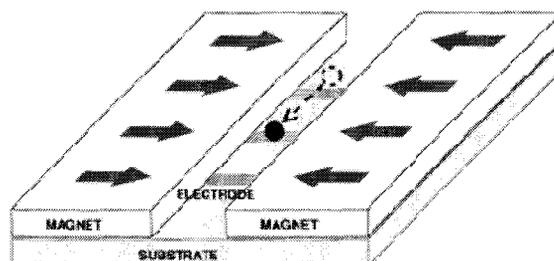


Figure 1.15 - Schéma d'un microcanal délimité par deux aimants pour la lévitation de la goutte, déplacée par génération d'un courant dans les électrodes enterrées⁴².

3.5. Les forces électrohydrodynamiques

Comme pour les exemples précédents, le déplacement de gouttes par les forces électrohydrodynamiques ne nécessite pas d'éléments mobiles. Dans le cas de liquides isolants, on parle de force diélectrophorétique. Cette force existe dans deux situations expérimentales : lorsqu'il y a un gradient de permittivité dans une zone de champ électrique ou lorsqu'il y a un moment induit dans un gradient de champ électrique. La structure utilisée comprend alors de simples électrodes métalliques, recouvertes d'un matériau hydrophobe. Concernant les liquides biologiques, la plupart du temps chargés en sels, les manipulations doivent s'opérer à haute fréquence pour retrouver leur caractère isolant.

Concernant les liquides conducteurs, le principe est basé sur l'effet d'électromouillage qui consiste à modifier la forme d'une goutte posée sur une surface lors de l'application d'une tension. Une couche diélectrique (pour éviter les phénomènes d'électrolyse) et une surface hydrophobe (en Téflon par exemple) sont nécessaires entre l'électrode et la goutte. On parle alors d'EWOD (*ElectroWetting On Dielectric*).

Cette partie présente les applications de l'EWOD au sein de laboratoires sur puce. Pour un état de l'art plus détaillé tant au point de vue théorique que pratique, nous vous renvoyons à l'article récent de Mugele et Baret⁴³ (qui contient par ailleurs une version anglaise de la thèse de Lippmann sur l'électrocapillarité) et de Fair⁴⁴.

Les laboratoires sur puce EWOD ont été initiés par Pollack *et al.*, de l'Université Duke (Figure 1.16)⁴⁵⁻⁴⁶. En réalisant une série d'électrodes, il est ainsi possible de déplacer par effet EWOD la goutte d'électrode en électrode par polarisation successive de celles-ci. Dans ce cas, les électrodes sont en chrome, le diélectrique est du parylène C (700nm) recouvert de 200nm de Téflon. La contre-électrode est une lame de verre recouverte d'ITO et de Téflon. Le gap entre les deux substrats est de 300µm pour des électrodes de 1,5mm. Le déplacement des gouttes de KCl (100mM) est effectué sous une tension de 120V_{DC}.

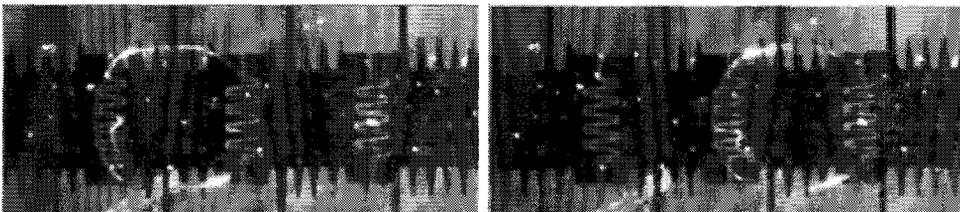


Figure 1.16 - Microsystème réalisé par Pollack *et al.* démontrant le premier déplacement de gouttes par EWOD le long d'électrodes interdigitées⁴⁵.

En 2004, cette équipe présente un *lab-on-chip* basé sur le principe EWOD permettant de mesurer la concentration de glucose dans une goutte de plasma, de sérum, d'urine et de salive⁴⁷. La détection s'effectue par détection du changement d'absorbance au cours du

temps du mélange échantillon/réactif. Une vue globale du microsysteme est présentée Figure 1.17.

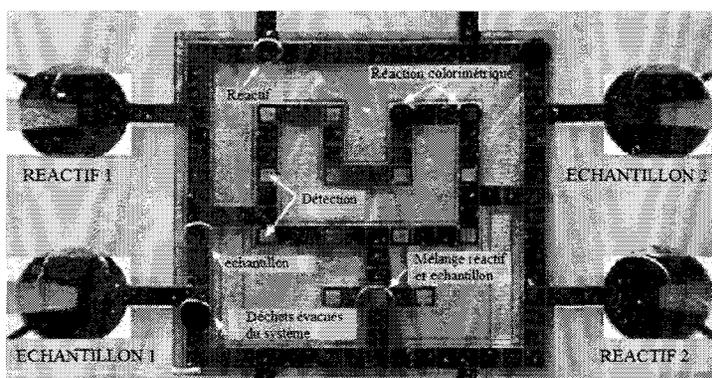


Figure 1.17 - Laboratoire sur puce EWOD pour la mesure de concentration de glucose dans un échantillon physiologique⁴⁷.

Rapidement, d'autres laboratoires sur puce voient le jour comme à Los Angeles ou à Grenoble. Kim et Garrell, de l'Université de Los Angeles (UCLA) s'intéressent aux applications en spectrométrie de masse MALDI. Ils ont ainsi présenté en 2005 un microsysteme permettant la purification de l'échantillon ainsi qu'une zone jouant le rôle de cible MALDI (Figure 1.18)⁴⁸. La méthode consiste à déplacer par électromouillage sur un plot hydrophobe (Téflon) une goutte de liquide biologique contenant des peptides et des impuretés (urée, sels). Les peptides sont adsorbés par la surface par interaction hydrophobe/hydrophobe. Une goutte d'eau, déplacée par électromouillage, dissout les impuretés mélangées aux peptides. Une goutte de matrice est ensuite amenée sur le plot et le microsysteme est introduit dans un spectromètre de masse MALDI. A la même période (2002 à 2005), au cours des travaux de thèse de F. Caron à l'IEMN, ont été développés des microsystemes similaires, basés sur une technologie verre/nickel/SU-8/Téflon et brevetés dans le cadre du contrat BioChipLab™⁴⁹.

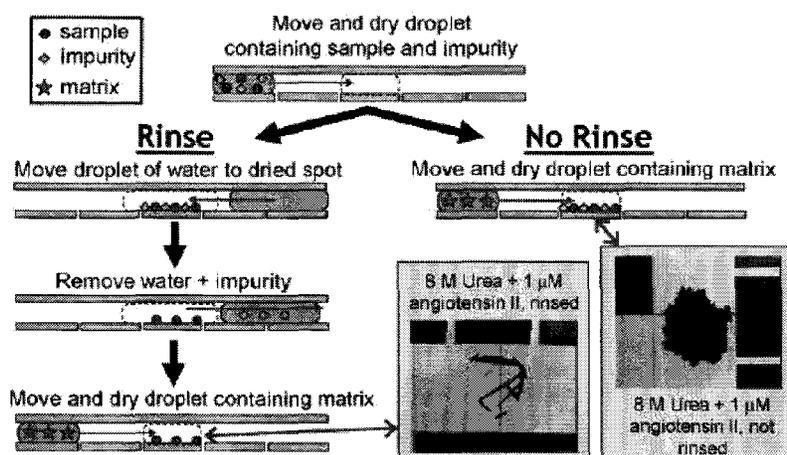


Figure 1.18 - Principe de fonctionnement du laboratoire sur puce pour analyse par spectrométrie de masse MALDI développé par le groupe de Kim et Garrell⁴⁸.

Yves Fouillet du CEA LETI propose, entre autres, un microsystème EWOD dédié à la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) au sein d'une goutte de 64nL⁵⁰. Il a également développé un microsystème ouvert, c'est-à-dire sans capot. La masse est assurée dans ce cas par une caténaire, enterré ou non⁵¹.

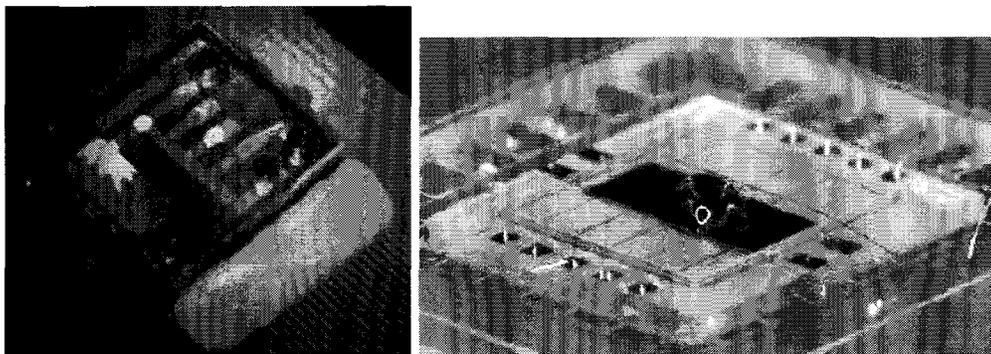


Figure 1.19 - Exemple de systèmes EWOD développés par le CEA: a) microsystème deux plans : la goutte de liquide fluorescent est immergée dans un environnement d'huile⁵⁰ et b) microsystème ouvert avec caténaire (fil d'or de 25µm de diamètre)⁵¹.

4. Vers un microsystème EWOD pour analyse DIOS

En résumé, l'état de l'art présenté permet de justifier les choix effectués concernant l'architecture microfluidique ainsi que le type d'analyse.

La spectrométrie de masse MALDI est la référence en analyse de protéines. Mais nous avons vu que l'un de ses inconvénients est la présence de matrice qui génère du bruit au niveau des basses masses, ce qui rend difficile la détection des peptides de masse équivalente. Un nouveau type de spectrométrie de masse, complémentaire au MALDI, a fait son apparition en 1999. Il s'agit de la spectrométrie de masse DIOS. De plus, l'utilisation de nanostructures de silicium dispense de l'ajout de matrice, simplifiant nettement l'architecture et les opérations microfluidiques nécessaires.

Les laboratoires sur puce actuellement développés sont encore dédiés à des applications MALDI et l'actionnement des gouttes est surtout effectué par EWOD⁴⁸. Nous proposons ici de réaliser et de caractériser, dans la continuité des travaux de thèse de François Caron⁵², un microsystème EWOD, dédié à l'analyse par spectrométrie de masse MALDI (chapitre 2). Ceci nous permettra ensuite de pouvoir le comparer avec un système similaire, original, dédié à la spectrométrie de masse DIOS (développé au chapitre 3).

Le microsystème est constitué de deux plans : une base et un capot. La base comprend l'architecture microfluidique, c'est-à-dire les électrodes. Le capot, non solidaire de la base, a vocation à servir de cible MALDI ou DIOS grâce à la présence d'ouvertures hydrophiles. En effet, contrairement aux travaux du groupe de Kim et Garrell⁴⁸, notre choix s'est tourné vers

la présence de ces plots hydrophiles afin de favoriser l'adsorption localisée des analytes. Un schéma de principe est présenté Figure 1.20.

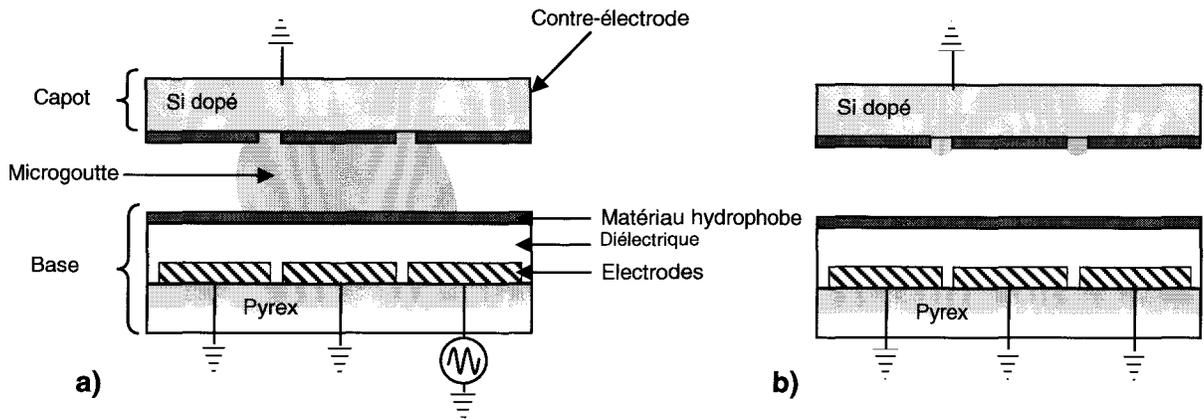


Figure 1.20 - Schéma de principe du microsystème EWOD développé au coeur de la thèse pour application à la spectrométrie de masse MALDI ou DIOS. La base contient l'architecture microfluidique, le capot est dédié à l'analyse en masse grâce à la présence d'ouvertures : a) la goutte se déplace au sein du microsystème et b) après passage de la goutte, un reliquat se trouve au sein des ouvertures.

5. Bibliographie

- ¹ F. Rouessac and A. Rouessac, "*Analyse chimique*", 5^{ème} édition, Editions Dunod (2000).
- ² M.A. Posthumus, P.G. Kistemaker, H.L.C. Meuzelaar and M.C. Ten Noever de Brauw, "*Laser desorption mass spectrometry of polar non-volatile bio-organic molecules*", *Anal. Chem.* **50** (1978) 985-991.
- ³ M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr and F. Hillenkamp, "*Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds*", *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes* **78** (1987) 53-68.
- ⁴ M. Karas and F. Hillenkamp, "*Laser Desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*", *Anal. Chem.* **60** (1988) 229-2301.
- ⁵ <http://www.univ-lille1.fr/master-proteomique/proteowiki/>
- ⁶ F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis and B.T. Chait, "*Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*", *Anal. Chem.* **63** (1991) 1193A-1203A.
- ⁷ F. Hillenkamp and M. Karas, "*Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization*", *Methods in Enzymol.* **193** (1990) 280-295.
- ⁸ M. Karas, U. Bahr, A.I. Ingendoh, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupt and F. Hillenkamp, "*Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization Mass Spectrometry*", *Anal. Chim. Acta* **241** (1990) 175-185.
- ⁹ J. Wei, J.M. Buriak and G. Siuzdak, "*Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon*", *Nature* **399** (1999) 243-246.
- ¹⁰ D.S. Peterson, "*Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry*", *Mass Spectrometry Reviews* **26** (2007) 19-34.
- ¹¹ A. Vertes, "*Soft laser desorption ionization – MALDI, DIOS and nanostructures*", *Laser Ablation and its applications*, Chap. 20, ed. Claude Phipps (2007).
- ¹² S. Xu, Y. Li, H. Zou, J. Qiu, Z. Guo and B. Guo, "*Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*", *Anal. Chem.* **75** (2003) 6191-6195.
- ¹³ E.P. Go, J.V. Apon, G. Luo, A. Saghatelian, R.H. Daniels, V. Sahi, R. Dubrow, B.F. Cravatt, A. Vertes and G. Siuzdak, "*Desorption/ionization on silicon nanowires*", *Anal. Chem.* **77** (2005) 1641-1646.
- ¹⁴ Y. Chen, G. Luo, J. Diao, O. Chornoguz, M. Reeves and A. Vertes, "*Laser desorption ionization from nanostructured surfaces: nanowires, nanoparticle films and silicon microcolumn arrays*", *J. Phys.: Conf. Ser.* (2005)
- ¹⁵ H.J. Choi, "*Nanowire-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry for quantitative analysis of small molecules*", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19** (2005) 3166-3170.
- ¹⁶ N. Verplanck, Y. Coffinier, M. Wisztorski, G. Piret, V. Thomy, I. Fournier, J.C. Camart, P. Tabourier and R. Boukherroub, "*Nanostructured surface as EWOD counter electrode for matrix-free mass spectrometry analysis*", The 10th International Conference on Miniaturized

- Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2006), Tokyo (Japan), November 5-9 (2006) 771-773.
- ¹⁷ S. Okuno, R. Arakawa, K. Okamoto, Y. Matsui, S. Seki, T. Kozawa, S. Tagawa and Y. Wada, "Requirements for laser-induced desorption ionization on submicrometer structures", *Anal. Chem.* **77** (2005) 5364-5369.
- ¹⁸ J.A. McLean, K.A. Stumpo and D.H. Russell, "Size-selected (2-10 nm) gold nanoparticles for matrix assisted laser desorption ionization of peptides", *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 5304-5305.
- ¹⁹ G. Luo, J. Diao, O. Chomoguz, M. Reeves and A. Vertes, "Laser desorption ionization mass spectrometry from nanoparticle films", Abstracts of Papers, 230th ACS National Meeting, Washington, DC, USA, August 28-September 1 (2005).
- ²⁰ N.H. Finkel, B.G. Prevo, O.D. Velez and L. He, "Ordered silicon nanocavity arrays in surface-assisted desorption ionization mass spectrometry", *Anal. Chem.* **77** 1088-1095.
- ²¹ Y. Chen and A. Vertes, "Black silicon as matrix-free laser desorption ionization substrate", Abstracts of Papers, 230th ACS National Meeting, Washington, DC, USA, August 28-September 1 (2005).
- ²² Waters, <http://www.waters.com>
- ²³ S. Colin, "La physique des microécoulements", *Pour la science* **306** (2003) 74-81.
- ²⁴ H. Andersson and A. van den Berg, "Microfluidic devices for cellomics: a review", *Sens. Act. B* **93** (2003) 315-325.
- ²⁵ E. Verpoorte, "Microfluidic chips for clinical and forensic analysis", *Electrophoresis* **23** (2002) 677-712.
- ²⁶ M. Le Berre, C. Crozatier, G. Velve Casquillas and Y. Chen, "Reversible assembling of microfluidic devices by aspiration", *Microel. Eng.* **83** (2006) 1284-1287.
- ²⁷ J. Carlier, S. Arscott, V. Thomy, J.C. Fourrier, F. Caron, J.C. Camart, C. Druon and P. Tabourier, "Integrated microfluidics based on multi-layered SU-8 for mass spectrometry analysis", *J. Micromech. Microeng.* **14** (2004) 619-624.
- ²⁸ Agilent, <http://www.chem.agilent.com>
- ²⁹ CIPHERGEN, <http://www.ciphergen.com>
- ³⁰ Gyros AB, <http://www.gyros.com>
- ³¹ P. Abgrall and A.M. Gué, "Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review", *J. Micromech. Microeng.* **17** (2007) R15-R49.
- ³² A. Manz, N. Graber and H.M. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing", *Sens. Act. B* **1** (1990) 244-248.
- ³³ J.P. Raven, "Microfluidics with foams", 3^{ème} Congrès Français de Microfluidique, Société Hydrotechnique de France, Toulouse (France), December 14-16 (2006).
- ³⁴ Rain Dance Technologies, <http://www.raindancetechnologies.com>

- ³⁵ E. Brouzes, J. Branciforte, M. Twardowski, D. Marran, Y. Suo, Y. Charles, L. Boitard, M.P. Weiner, J.M. Rothberg, N. Perrimon and D.R. Link, "*Droplet-based high-throughput live/dead cell assay*", The 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2006), Tokyo, Japan, November 5-9 (2006) 1043-1045.
- ³⁶ A. Renaudin, "*Réalisation d'une plate-forme à ondes acoustiques de surface pour une microfluidique digitale dédiée à la biologie*", Thèse de l'Université de Lille I (2006).
- ³⁷ A. Renaudin, E. Galopin, J.C. Camart, V. Thomy and F. Zoueshtiagh, "*Creeping, walking and jumping drop...*", 58th Annual Meeting of the American Physical Society, Division of Fluid Dynamics (2006).
- ³⁸ Advalytix, www.advalytix.de
- ³⁹ S. Alzuaga, J.F. Manceau and F. Bastien, "*Motion of droplets on solid surface using acoustic radiation pressure*", J. Sound and Vibration **282** (2005) 151-162.
- ⁴⁰ A. Renaudin, P. Tabourier, J.C. Camart, C. Druon, "*Surface acoustic wave two-dimensional transport and location of microdroplets using echo signal*", J. Appl. Phys. **100** (2006) 116101-116103.
- ⁴¹ U. Lehmann, S. Hadjidj, V.K. Parashar, A. Rida and M.A.M. Gijs, "*Two dimensional magnetic manipulation of microdroplets on a chip*", The 13th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Seoul, Korea, June 5-9 (2005).
- ⁴² I.F. Lyuksyutov, D.G. Naugle and K.D.D Rathnayaka, "*On-chip manipulation of levitated femtodroplets*", Appl. Phys. Lett. **85** (2004) 1817-1819.
- ⁴³ F. Mugele and J. C. Baret, "*Electrowetting: from basics to applications*", J. Phys.: Condens. Matter **17** (2005) R705-R774.
- ⁴⁴ R.D. Fair, "*Digital microfluidics: is a true lab-on-a-chip possible?*", Microfluid Nanofluid **3** (2007) 245-281.
- ⁴⁵ M.G. Pollack, R.B. Fair and A.D. Shenderov, "*Electrowetting-Based actuation of liquid droplets for microfluidic applications*", Appl. Phys. Lett. **77** (2000) 1725-1726.
- ⁴⁶ M.G. Pollack, A.D. Shenderov and R.B. Fair, "*Electrowetting-based actuation of droplets for integrated microfluidics*", Lab Chip **2** (2002) 96-101.
- ⁴⁷ V. Srinivasan, V.K. Pamula and R.B. Fair, "*An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids*", Lab Chip **4** (2004) 310-315.
- ⁴⁸ A.R. Wheeler, H. Moon, C.A. Bird, R.R. Ogorzalek Loo, C.J. Kim, J.A. Loo and R.L. Garrell, "*Digital microfluidics with in-line sample purification for proteomics analyses with MALDI-MS*", Anal. Chem. **77** (2005) 534-540;
- ⁴⁹ J.P. Lepasant, F. Caron, C. Druon, C. Rolando, D. Loyaux, J.C. Fourier and P. Tabourier, "*Laser radiation desorption device for manipulating a liquid sample in the form of individual drops, thereby making it possible to carry out the chemical and biological treatment thereof*", AU2005259080 (2006).
- ⁵⁰ Y. Fouillet, D. Jary, A.G. Brachet, J. Berthier, R. Blervaque, L. Davoux, J.M. Roux, J.L. Achard and C. Peponnet, "*EWOD digital microfluidics for lab-on-a-chip*", 4th International Conference on Nanochannels, Microchannels and Minichannels, Liemrick, Ireland, June 19-21 (2006).

⁵¹ Y. Fouillet, H. Jeanson, D. Jary and C. Vauchier, *“Moving droplets with microcatenaries”*, The 7th International Conference on Micro Total Analysis Systems (μ TAS2003), Squaw Valley (USA), October 5-9 (2003).

⁵² F. Caron, *“Développement de microsystèmes fluidiques à électromouillage pour l'analyse de protéines par spectrométrie de masse MALDI”*, Thèse de l'Université de Lille 1 (2007).

Chapitre 2

Microsystème EWOD pour analyse MALDI

1. Introduction

Dans ce chapitre, nous présentons le principe de l'effet d'électromouillage sur diélectrique suivi d'une synthèse sur les aspects théoriques qui le gouverne. Cette étude permet de définir les conditions nécessaires à la réalisation des opérations élémentaires en microfluidique (déplacement et création de gouttes) et de souligner les grandeurs limitatives.

Des choix technologiques sont alors effectués pour la réalisation d'un microsystème EWOD deux plans destiné à l'analyse MALDI. Les filières étudiées sont optimisées dans un souci de simplicité et de rapidité de réalisation, c'est pourquoi la base est réalisée à partir d'une technologie basse température.

Parallèlement, un banc destiné à la mise en œuvre de ces microsystèmes est développé : support du microsystème, électronique de commande ainsi qu'interface logicielle dédiée au pilotage du dispositif.

Enfin, les systèmes réalisés sont caractérisés en terme de tension d'actionnement, de vitesse de déplacement, de type de liquide utilisé puis validés en spectrométrie de masse MALDI à partir d'échantillons de référence.

2. Théorie de l'électromouillage

2.1. Mouillage de surface

Les deux états de surface prédominants en microfluidique sont l'état mouillable et l'état non mouillable. On définit une surface comme mouillable ou non mouillable en fonction de l'angle θ que forme la goutte avec la surface au niveau de la ligne triple (interface des trois milieux - Figure 2.1.a). Une surface est considérée comme mouillable lorsque l'angle de contact que forme une goutte avec celle-ci est inférieur à 90° (Figure 2.1.a). Dans le cas contraire (un angle supérieur à 90°), la surface est définie comme non mouillable (Figure 2.1.b). Pour une surface en contact avec de l'eau, on parle respectivement de surfaces hydrophile et hydrophobe. D'un point de vue du liquide, on parle de liquides mouillants ou non mouillants.

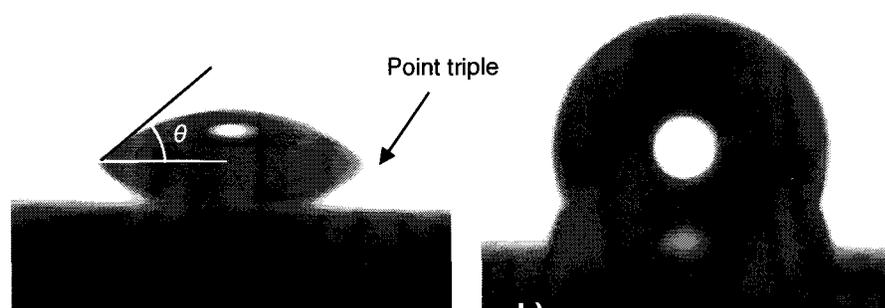


Figure 2.1 - Goutte d'eau déposée sur deux surfaces d'énergies différentes : a) surface mouillable ($\theta < 90^\circ$), b) surface non mouillable ($\theta > 90^\circ$).

L'angle de contact d'un liquide sur une surface en fonction des tensions superficielles est donné par la relation de Young (2.1). La tension superficielle (encore appelée énergie d'interface ou énergie de surface), notée γ , est la tension qui existe à l'interface de deux milieux (solide/liquide, liquide/liquide, solide/gaz)¹. Elle s'exprime en énergie par unité de surface (mJ.m^{-2}) mais peut être également considérée comme une force par unité de longueur (mN.m^{-1}). A partir de cette définition, il est possible d'identifier trois forces agissant sur la ligne triple : γ_{LG} (tension de surface liquide/gaz), encore écrit γ , γ_{LS} (tension de surface liquide/solide) et γ_{SG} (tension de surface solide/gaz). Ces trois forces sont représentées Figure 2.2.

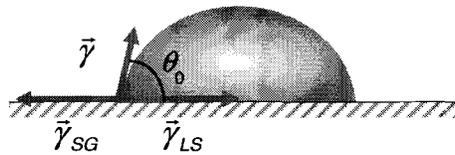


Figure 2.2 - Tensions superficielles agissant sur la ligne triple d'une goutte de liquide déposée sur un substrat.

A l'équilibre :

$$\vec{\gamma}_{LS} + \vec{\gamma} + \vec{\gamma}_{SG} = 0$$

Par projection sur le solide, on obtient la relation de Young² :

$$\gamma_{LS} = \gamma_{SG} - \gamma \cos \theta_0 \quad (2.1)$$

Il est également possible de remonter à l'équation (2.1) par calcul de la variation d'énergie de surface dE liée à un déplacement dx de la ligne triple :

$$dE = (\gamma_{LS} - \gamma_{SG})dx + \gamma dx \cos \theta$$

A l'équilibre, l'énergie est minimum ($dE=0$) et on retrouve bien la relation de Young (2.1).

Concrètement, en suivant la règle de Zisman³⁻⁴, les surfaces mouillables sont des surfaces de haute énergie (~ 500 à 5000mN.m^{-1}). Il s'agit des matériaux où les énergies de liaison chimique sont de l'ordre de l'eV (liaisons ioniques, covalentes, métalliques). Les matériaux mouillables sont les oxydes, les métaux...

A l'inverse, les surfaces non mouillables sont des surfaces de basse énergie (~ 10 à 50mN.m^{-1}). Pour ces matériaux, les énergies de liaisons sont de l'ordre de kT . Il s'agit essentiellement des cristaux (silicium) et des polymères¹.

Les angles de contact sont mesurés au laboratoire sur un goniomètre (Digidrop, GBX, France) présenté Figure 2.3.

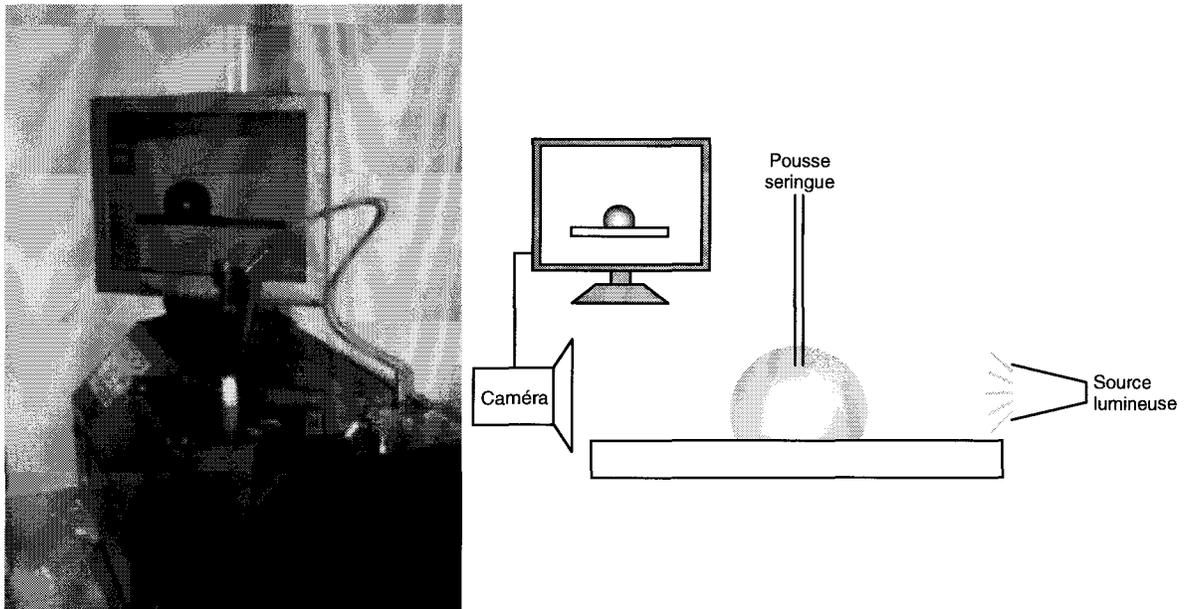


Figure 2.3 – a) Goniomètre permettant la mesure des angles de contact et de l'hystérésis à l'IEMN, b) synoptique de l'appareil.

La mesure s'effectue en définissant la base de l'image, le logiciel trace ensuite la courbe polynomiale équivalant à la forme de la goutte. Le tracé de la tangente à cette courbe au point d'intersection avec la base de la goutte donne l'angle de contact. Cela est schématisé Figure 2.4 :

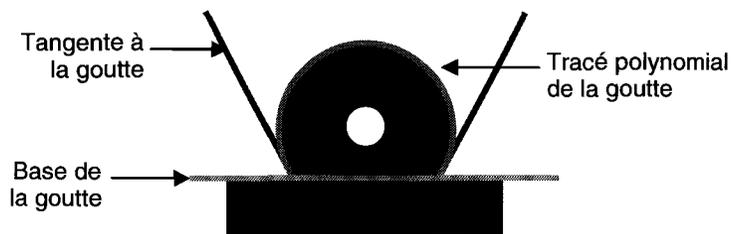


Figure 2.4 - Principe de mesure sur le Digidrop de l'IEMN.

Le Tableau 2.1 présente les valeurs des angles de contact à l'équilibre d'une goutte d'eau désionisée posée à la surface des différents matériaux hydrophobes utilisés lors de ce travail de thèse.

Surface	Angle de contact à l'équilibre θ_0 (°)
Téflon	118°
Cytop	112°
OTS	110°
C ₄ F ₈	105°

Tableau 2.1 - Angle de contact à l'équilibre des différents matériaux hydrophobes utilisés dans la thèse.

Ces valeurs d'angles sont définies pour chaque matériau. Cependant, il est possible de changer l'angle de contact d'une goutte posée sur une surface par application d'une tension. Il s'agit de l'électromouillage.

2.2. L'électromouillage sur diélectrique

Lippmann a montré, lors de sa thèse sur l'électrocapillarité en 1875⁵, que l'application d'une tension entre un électrolyte et une goutte de mercure immergée dans celui-ci entraînait la création d'une double couche électrique (EDL, *Electric Double Layer*) à l'interface.

Le principe de l'électromouillage consiste, à partir du phénomène d'électrocapillarité, à modifier la forme d'une goutte posée sur une surface lors de l'application d'une tension (Figure 2.5). Etant donné que la plupart des liquides utilisés dans les laboratoires sur puce sont conducteurs, la goutte est isolée du substrat par un diélectrique afin d'éviter tout phénomène d'électrolyse⁶. On parle dans ce cas d'électromouillage sur diélectrique (EWOD, *ElectroWetting On Dielectric*).

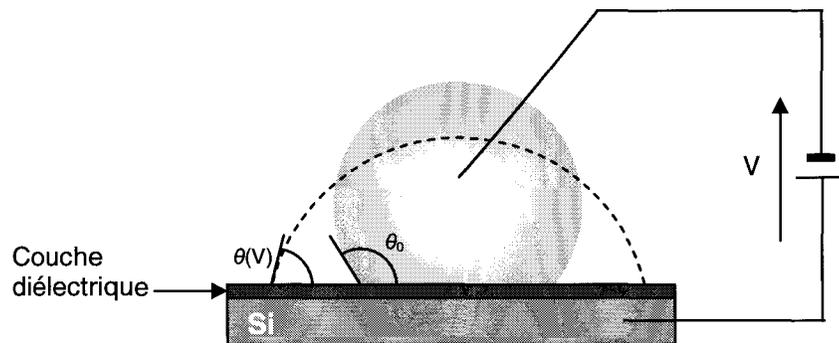


Figure 2.5 - Principe de l'EWOD. Sous l'effet de la tension, la goutte s'étale.

Le système peut être vu comme une capacité variable⁵⁰. L'énergie emmagasinée dans cette capacité suivant une direction perpendiculaire au plan, notée $W(x)$, s'écrit alors :

$$W(x) = \frac{1}{2} C(x) V^2 = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2e} x V^2$$

où ϵ_r est la permittivité du diélectrique, ϵ_0 , la permittivité électrique du vide, x , la longueur de la capacité et e , son épaisseur. En appliquant le principe des travaux virtuels, on déduit la force par unité de longueur transversale :

$$F_m = \frac{\partial W(x)}{\partial x} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2e} V^2 \quad (2.2)$$

Cette force, agissant sur la ligne triple, peut être insérée dans l'équation de Young (2.1) :

$$\gamma_{LS} = \gamma_{SG} - \gamma \cos \theta(V) + \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2e} V^2$$

On aboutit alors à l'équation de Young-Lippmann établie par Bruno Berge en 1993⁶ :

$$\cos \theta(V) = \cos \theta_0 + \frac{\epsilon_0 \epsilon_r V^2}{2\gamma e} \quad (2.3)$$

L'évolution de l'angle est donc proportionnelle à la tension au carré appliquée sur la surface et à la capacité du diélectrique.

2.3. Saturation de l'angle de contact

Selon l'équation (2.3), il est théoriquement possible d'obtenir un mouillage total de la goutte par augmentation de la tension. Cependant, on observe expérimentalement une saturation de l'angle de contact à partir d'une certaine tension. Dans ce cas, l'évolution de l'angle en fonction de la tension est mieux approximée en utilisant une fonction de Langevin⁷. On obtient alors la fonction de Young-Lippmann modifiée et représentée Figure 2.6 :

$$\cos \theta(V) - \cos \theta_0 = (\cos \theta_s - \cos \theta_0) L \left[\frac{3\epsilon_0 \epsilon_r V^2}{2\gamma e (\cos \theta_s - \cos \theta_0)} \right] \quad (2.4)$$

avec $L(x) = \coth x - \frac{1}{x}$, la fonction de Langevin et θ_s , l'angle de saturation.

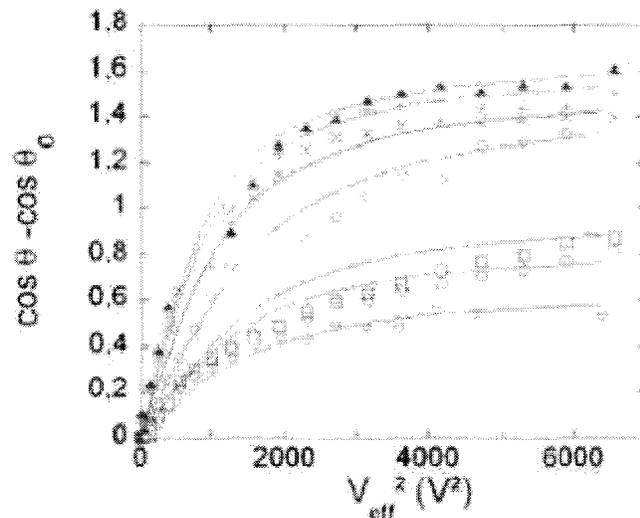


Figure 2.6 - Résultats expérimentaux de l'électromouillage de différents liquides et corrélation avec l'équation de Young-Lippmann modifiée⁷.

La littérature apporte de nombreuses hypothèses pour la compréhension de ce phénomène de saturation : augmentation du champ électrique au niveau de la ligne triple due à un effet de pointe⁸, piégeage de charges dans ou sur la couche diélectrique⁹, ionisation de l'air au niveau de la ligne triple¹⁰, fuites au niveau du diélectrique¹¹ ou encore annulation de l'énergie superficielle $\gamma_{SL}(V)$ ¹²⁻¹³.

Berthier *et al.* se servent de cette dernière hypothèse pour calculer la tension maximale à appliquer avant saturation. Si $\gamma_{SL}(V)=0$, on a :

$$\cos \theta(V) = \frac{\gamma_{SG}}{\gamma}$$

En insérant cette équation dans l'équation de Young-Lippmann (2.3), on trouve que la tension à partir de laquelle apparaît la saturation est :

$$V_{\max} = \sqrt{\frac{2e(\gamma_{SG} - \gamma \cos \theta_0)}{\epsilon_0 \epsilon_r}} \quad (2.5)$$

Cette équation définit donc la tension maximale V_{\max} à appliquer en électromouillage avant d'obtenir un phénomène de saturation.

2.4. L'EWOD pour le déplacement de microgouttes

Compte tenu de l'application envisagée, le microsystème EWOD étudié comprend deux plans. En plus d'une base sur laquelle est réalisé un réseau d'électrodes, un substrat, que nous appellerons capot, joue le rôle de contre-électrode. En effet, le système un plan (avec caténaire) ne permet pas de réaliser toutes les opérations microfluidiques telle que la scission de goutte par exemple¹⁴. Un schéma de principe du microsystème deux plans est présenté Figure 2.7.

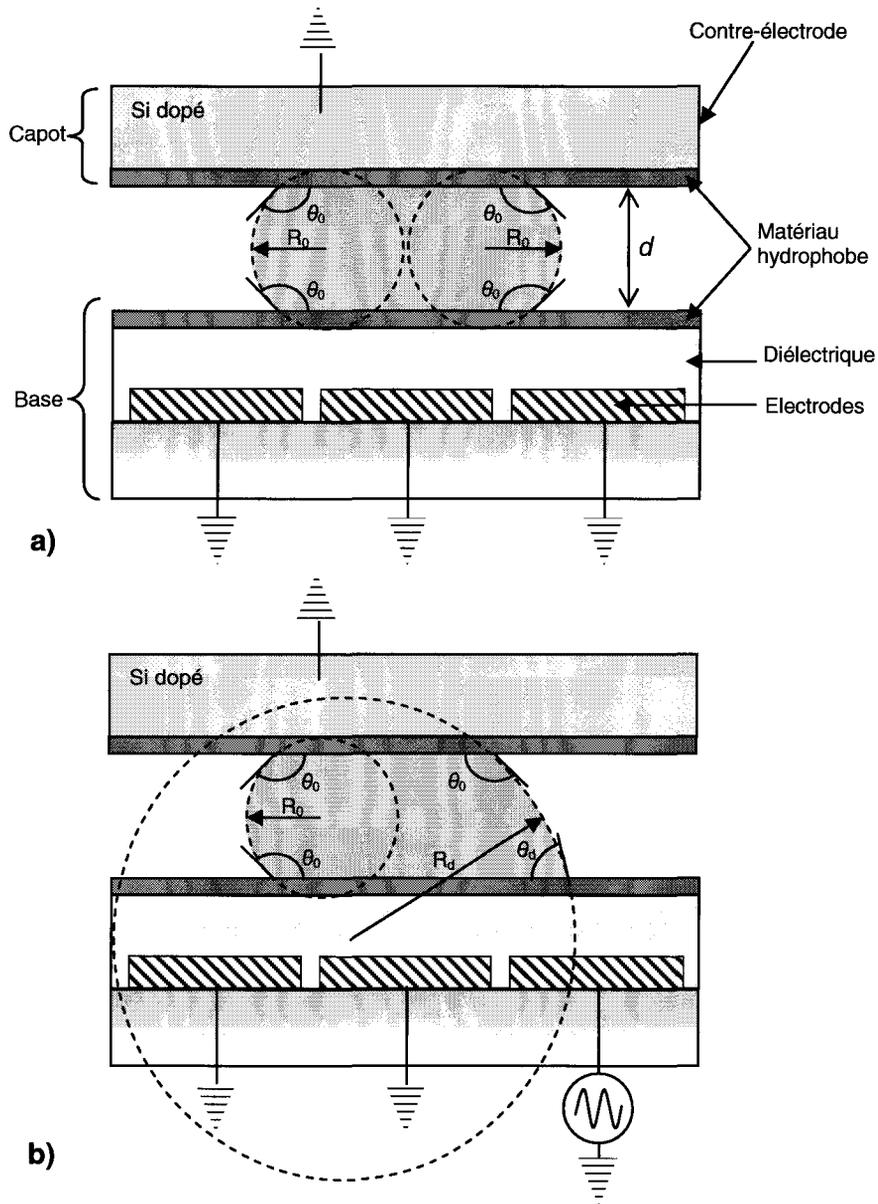


Figure 2.7 - Schéma de principe d'un microsystème EWOD pour le déplacement de microgouttes : a) aucune tension n'est appliquée sur les électrodes, b) une tension est appliquée sur l'électrode de droite.

Initialement, aucune tension n'est appliquée entre les électrodes et la contre-électrode. Quel que soit l'endroit où est placée la goutte, l'angle de contact est l'angle de contact d'équilibre de la goutte θ_0 . Lorsqu'une électrode située sous la goutte est mise sous tension, l'angle de contact de la ligne triple en contact avec cette électrode diminue pour atteindre une valeur θ_d . Le rayon de courbure R_d du ménisque augmente. L'angle de contact sur le reste du substrat est toujours l'angle de contact à l'équilibre θ_0 et le rayon de courbure associé R_0 est inférieur au rayon de courbure R_d .

D'après la loi de Laplace, ce changement de rayon de courbure du ménisque entraîne une différence de pression au sein de la goutte¹⁵. Cette différence de pression est notée :

$$\Delta P = P_g - P_d \quad (2.6)$$

où P_g est la pression du côté gauche dans la goutte alors que P_d est la pression du côté droit. Ces deux valeurs sont déterminées par les expressions suivantes :

$$P_g - P_a = \gamma \left(\frac{1}{R_0} + \frac{1}{R} \right) \quad (2.7)$$

$$P_d - P_a = \gamma \left(\frac{1}{R_d} + \frac{1}{R} \right) \quad (2.8)$$

avec P_a la pression atmosphérique, R le rayon de la goutte dans la direction transversale, R_0 , le rayon de courbure du ménisque gauche et R_d , le rayon de courbure du ménisque droit. Ainsi,

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_0} - \frac{1}{R_d} \right) > 0 \quad (2.9)$$

La pression au sein de la goutte est donc plus forte à gauche qu'à droite, la goutte se déplace sur l'électrode de droite.

En posant :

$$R_0 = -\frac{d}{2 \cos \theta_0}$$

$$R_d = -\frac{d}{\cos \theta_0 + \cos \theta_d}$$

on trouve :

$$\Delta P = \gamma \frac{\cos \theta_d - \cos \theta_0}{d} \quad (2.10)$$

On peut déduire à partir de (2.10) la force motrice F_m par unité de longueur qui permet le déplacement :

$$F_m = \gamma (\cos \theta_d - \cos \theta_0) \quad (2.11)$$

Or, en insérant la relation de Young-Lippmann (2.3), on obtient :

$$F_m = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2e} V^2 \quad (2.12)$$

La force motrice F_m obtenue est identique à celle calculée en (2.2). Elle agit sur la goutte en la déplaçant sur l'électrode sous tension. Cependant, tous nos calculs présentés jusqu'ici sont appliqués à des surfaces idéales parfaites. En réalité, certaines forces s'opposent au déplacement de la goutte, il s'agit de l'hystérésis et des forces visqueuses. Or, il a été montré par simulation numérique que le mouvement de la goutte est limité par les forces interfaciales plus que par les forces visqueuses¹⁶. Concrètement, pour qu'il y ait déplacement de la goutte, la force motrice doit être supérieure à la force d'hystérésis.

2.5. Hystérésis

L'hystérésis est liée aux imperfections d'une surface. En effet, la formule de Young considère qu'il n'existe qu'un angle de contact, l'angle de contact statique, noté θ_0 . Cependant, cette configuration n'existe que pour des surfaces physiquement et chimiquement parfaites. En pratique, les surfaces présentent le plus souvent des imperfections, liées à des défauts physiques, comme la rugosité, ou à des défauts chimiques, comme la présence de molécules organiques à la surface. L'angle statique est donc compris entre deux valeurs que l'on appelle angle d'avancée, noté θ_A , et angle de reculée, noté θ_R , angles obtenus lorsqu'une goutte est déposée sur une surface inclinée (Figure 2.8). La différence de ces deux angles ($\theta_A - \theta_R$) est appelée hystérésis et représente la force qui s'oppose au déplacement¹. En pratique, la force nécessaire pour déplacer une goutte sera d'autant moins importante que l'hystérésis développée par la surface sera faible.

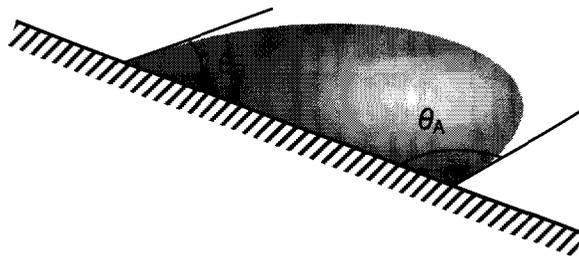


Figure 2.8 - Angles d'avancée et de reculée d'une goutte sur un plan incliné.

Une autre méthode pour quantifier l'hystérésis est la technique de "gonflement de goutte". En gonflant une goutte, le volume de celle-ci augmente tandis que le diamètre de la base reste fixe : la ligne triple est "accrochée" à la surface. A partir d'un certain angle, θ_A , la ligne "décroche". En aspirant la goutte, il est possible de déterminer θ_R de la même manière¹. Le schéma présenté Figure 2.9 décrit la méthode de mesure de l'hystérésis par "gonflement de goutte".

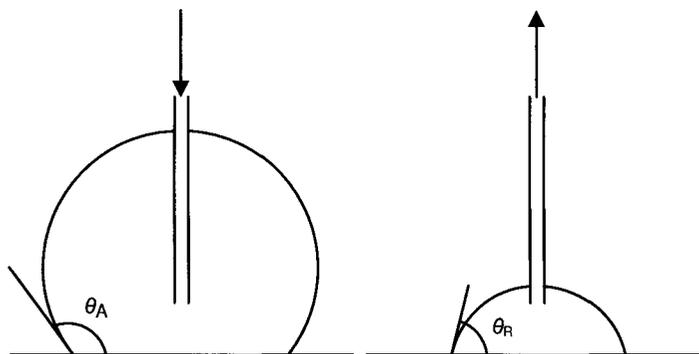


Figure 2.9 - Mesure des angles d'avancée et de reculée par la méthode du "gonflement de goutte".

Le tableau ci-dessous présente les valeurs d'hystérésis des matériaux hydrophobes utilisés dans le cadre de cette thèse. Les mesures ont été réalisées à l'IEMN sur le Digidrop.

Surface	Angle d'avancée θ_A (°)	Angle de reculée θ_R (°)	Hystérésis (°)
Téflon	125	112	13
Cytop	116	105	11
OTS	115	101	14
C ₄ F ₈	114	92	22

Tableau 2.2 - Hystérésis des différents matériaux hydrophobes utilisés dans la thèse.

L'hystérésis peut également être exprimée en terme de force. Dans le cas d'un microsystème EWOD deux plans, l'hystérésis intervient sur les deux substrats et s'écrit¹⁷ :

$$F_H = 2\gamma(\cos\theta_R - \cos\theta_A) \quad (2.13)$$

Dans le cadre de surfaces réelles, il faut donc que la force motrice soit supérieure à la force d'hystérésis :

$$\frac{\varepsilon_0\varepsilon_r}{2e}V^2 > 2\gamma(\cos\theta_R - \cos\theta_A)$$

Il existe donc une tension seuil V_{\min} permettant le déplacement de la goutte :

$$V_{\min} = \sqrt{\frac{4\gamma e}{\varepsilon_0\varepsilon_r}(\cos\theta_R - \cos\theta_A)} \quad (2.14)$$

L'effet d'hystérésis et le phénomène de saturation bornent l'intervalle de tension à utiliser en électromouillage. Concrètement, la tension permettant le déplacement doit être comprise entre V_{\min} (liée à l'hystérésis) et V_{\max} (liée à la saturation).

3. Réalisation du microsystème classique

3.1. Principe

Le microsystème est composé d'une base et d'un capot, il s'agit d'un système deux plans. Pour des facilités d'observation, la base, contenant les électrodes, est transparente alors que le capot, qui joue également le rôle de contre-électrode, est un substrat de silicium dopé relié à la masse. Le système complet est présenté Figure 2.10.

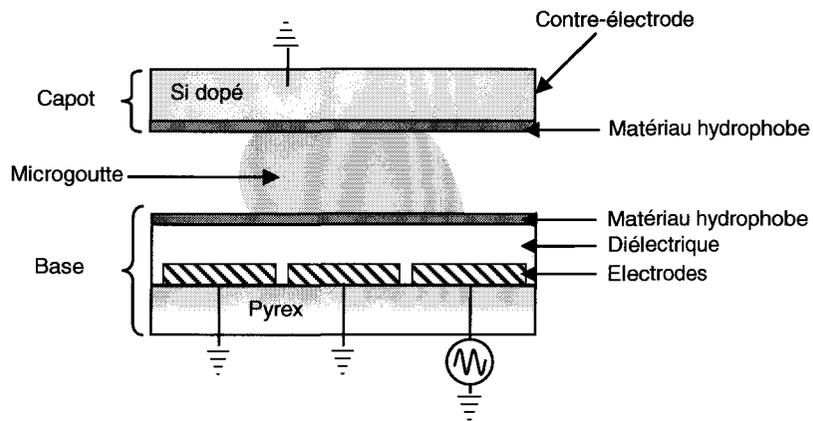


Figure 2.10 - Schéma de principe du microsystème EWOD classique.

3.2. Design utilisé

Le masque utilisé, réalisé pendant la thèse de François Caron¹⁸, contient deux séries de 3 électrodes jouant le rôle de réservoirs et 33 électrodes dédiées au déplacement. Les réservoirs font 4mm de largeur et les électrodes, 1,7mm. 24 contacts électriques permettent le contrôle des électrodes. Le design est présenté Figure 2.11.

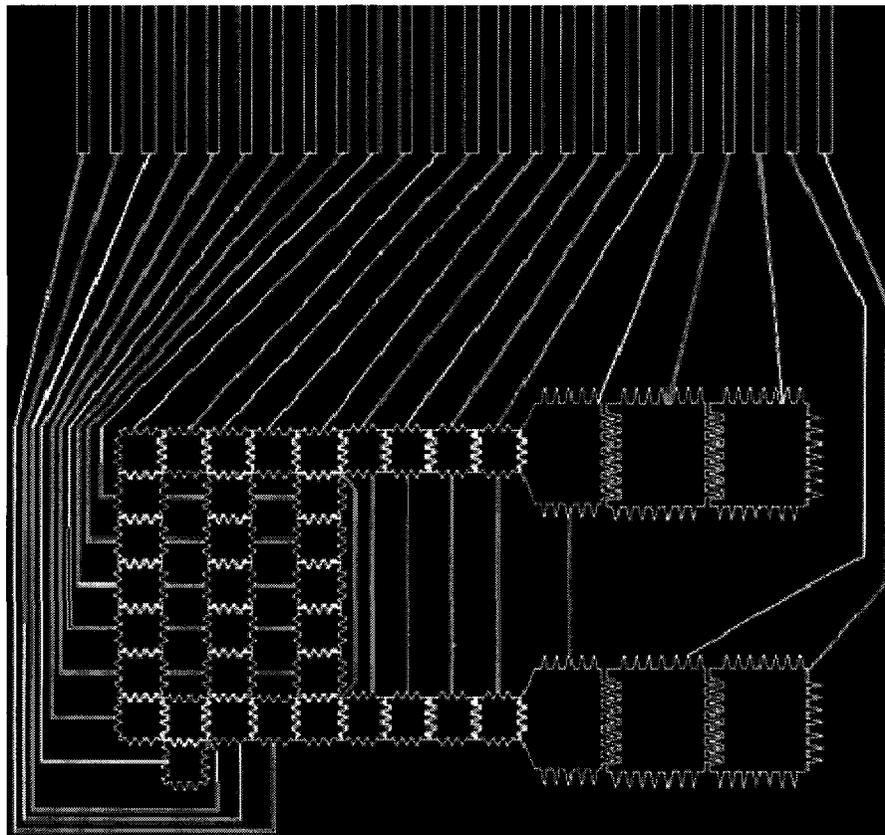


Figure 2.11 - Design du masque EWOD utilisé pour les applications en spectrométrie de masse MALDI et DIOS.

3.3. Choix des matériaux et étapes de fabrication de la base

Le procédé utilisé est un procédé basse température car il utilise un polymère comme diélectrique. Le substrat peut être aussi bien du silicium que du verre. Les électrodes sont en nickel et le diélectrique utilisé est une résine photosensible négative, la SU-8 2002 (Microchem, USA). Cette technologie a été en partie mise au point lors de la thèse de François Caron, le matériau hydrophobe utilisé alors était du Téflon AF 1600 (Dupont, USA) pour la base comme pour le capot. Or, le principal inconvénient de l'utilisation de ce matériau est sa température de recuit élevée (330°C). A cette température, la SU-8 atteint sa limite de stabilité thermique (jusqu'à 315°C d'après Microchem¹⁹). Nous avons donc choisi d'utiliser le Cytop (AGC, Japon) comme matériau hydrophobe dont le principal avantage est de présenter une température de recuit comprise entre 90°C et 180°C selon l'épaisseur. Ceci n'entraîne donc aucune altération de la résine. Les étapes de réalisation de cette base sont présentées ci-dessous :

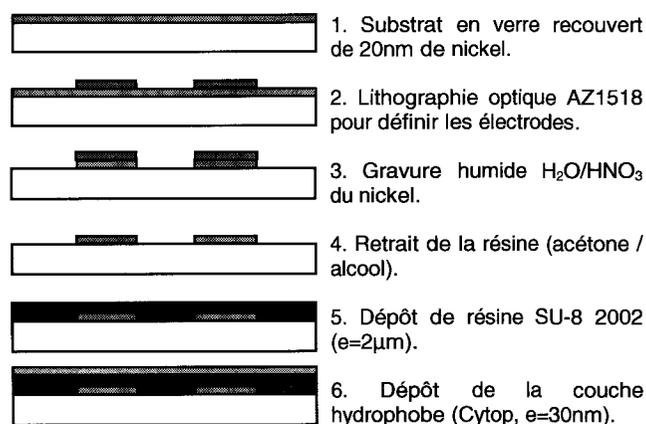


Figure 2.12 – Procédé de fabrication de la base en verre.

Le choix de ces matériaux pour la réalisation permet d'obtenir une base transparente, relativement rapide à réaliser et à bas coût.

3.3.1. Les électrodes

Les électrodes sont réalisées à partir d'une couche de nickel de 20nm d'épaisseur. Cette épaisseur permet de disposer d'un réseau d'électrodes transparentes. Le nickel est déposé par pulvérisation cathodique (Annexe 2). Les paramètres de dépôt sont présentés Tableau 2.3 :

Matériau	Gaz	Puissance	Pression	Temps
Nickel	Ar / 10sccm	300W	25mT	5'40"

Tableau 2.3 - Paramètres de dépôt d'une couche de 20nm de nickel transparente par pulvérisation cathodique.

Le motif des électrodes est réalisé par lithographie optique (Tableau 2.4 – Annexe 2). Dans la suite du manuscrit, les paramètres d'enduction présentés comportent trois valeurs qui sont respectivement la vitesse (rpm, *rotation per minute*), l'accélération (rpm.s⁻¹, *rotation per minute per second*) et le temps (s). La couche de nickel est ensuite gravée par voie chimique à l'acide nitrique (HNO₃/H₂O 1:3 v/v) pendant 1 minute au travers du masque en résine AZ1518 (Figure 2.12.2 et Figure 2.12.3).

Résine	Enduction	Recuit 1	Insolation	Recuit 2	Révélation
AZ1518	3500/2000/12	90sec@110°C	74mJ.cm ⁻²	3min@130°C	20sec@MF319

Tableau 2.4 - Paramètres de dépôt d'une couche AZ1518 d'épaisseur 1,5µm.

La gravure terminée, la résine est dissoute à l'acétone et le substrat rincé à l'alcool isopropylique puis séché sous flux d'azote.

3.3.2. Le diélectrique

La SU-8 est une résine photosensible négative de type époxy destinée à la microfabrication de structures chimiquement et thermiquement stables. Ce matériau a l'avantage d'être transparent. De plus, sa constante diélectrique relative ($\epsilon_r=3,2$ à 10MHz¹⁹) fait d'elle un bon diélectrique pour l'EWOD. Les paramètres de dépôt d'une couche de 2µm sont présentés ci-dessous :

Résine	Enduction	Recuit 1	Insolation	Recuit 2	Révélation
SU-8 2002	500/100/10 3000/300/30	1min@95°C	80mJ.cm ⁻²	2min@95°C	1min@SU-8 Developer

Tableau 2.5 - Paramètre de dépôt d'une couche de SU-8 2002 d'épaisseur 2µm.

Le choix d'un matériau photosensible tel que la SU-8 permet d'obtenir, après exposition et révélation, une couche mince isolante sur les électrodes conductrices tout en conservant un accès aux connexions électriques des électrodes (zones non exposées aux UV).

3.3.3. La couche hydrophobe

Les matériaux hydrophobes utilisés en EWOD sont généralement des fluoropolymères de type Téflon¹⁵ ou Cytop²⁰ qui ne sont pas altérés par les tensions appliquées. Le Téflon est généralement déposé sur des diélectriques, de type oxyde ou nitrure, qui supportent les fortes températures nécessaires au recuit du Téflon (330°C pendant 45min sous N₂). Dans notre cas, l'utilisation de SU-8 ne nous permet pas d'utiliser du Téflon dans les meilleures conditions. Nous utilisons donc pour la base un autre fluoropolymère aux propriétés équivalentes : le Cytop CTL-809M, et son solvant associé, le CT-Solv 180. Le CTL-809M est dilué à 1:10 (v/v) dans le solvant puis déposé par *spin-coating* (1500/300/30) suivi d'un recuit

à une température de 180°C pendant 30 minutes. Les épaisseurs obtenues sont de l'ordre de 25-30nm.

L'angle de contact statique du Cytop, légèrement inférieur à celui du Téflon, est de 112° (Figure 2.13) et présente une hystérésis moyenne de $11^\circ \pm 1^\circ$ avec un angle d'avancée de $116^\circ \pm 1^\circ$ et un angle de reculée de $105^\circ \pm 1^\circ$ (Figure 2.14).

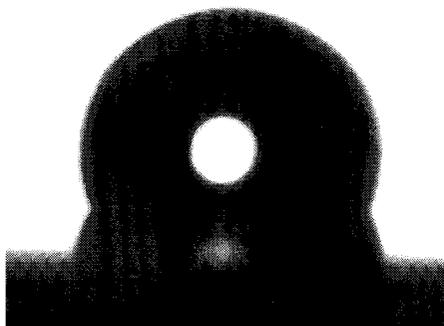


Figure 2.13 - Goutte d'EDI (5µL) déposée sur un substrat de silicium recouvert de Cytop (30nm).

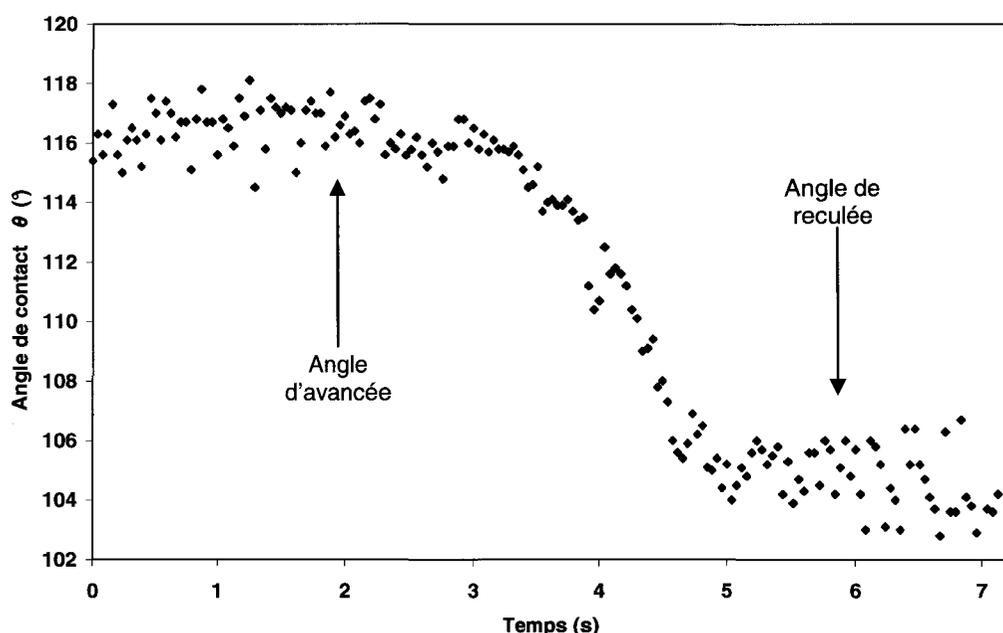


Figure 2.14 - Hystérésis du Cytop : la première partie de la courbe montre l'angle d'avancée, la seconde partie représente l'angle de reculée.

3.4. Caractérisation électrique de la base

Le critère prépondérant dans les microsystèmes EWOD est la réversibilité du phénomène, c'est-à-dire la relaxation de la goutte une fois la tension coupée. Cet effet réversible a été observé de manière optique à l'aide du goniomètre pour chacun des points de mesure de la Figure 2.15.

L'évolution de l'angle en fonction de la tension appliquée est caractérisée (Figure 2.15) pour une fréquence d'utilisation de 1kHz (signal créneau) en utilisant la méthode de l'aiguille

et le goniomètre. Nous avons comparé ces résultats à l'équation théorique de Young-Lippmann (2.3) ainsi qu'à l'équation de Langevin (2.4) avec $e=2\mu\text{m}$, $\varepsilon_0=8,85418782.10^{-12}\text{F.m}^{-1}$, $\varepsilon_r=3,2$, $\gamma=72\text{mN.m}^{-1}$ et $\theta_s=73,8^\circ$.

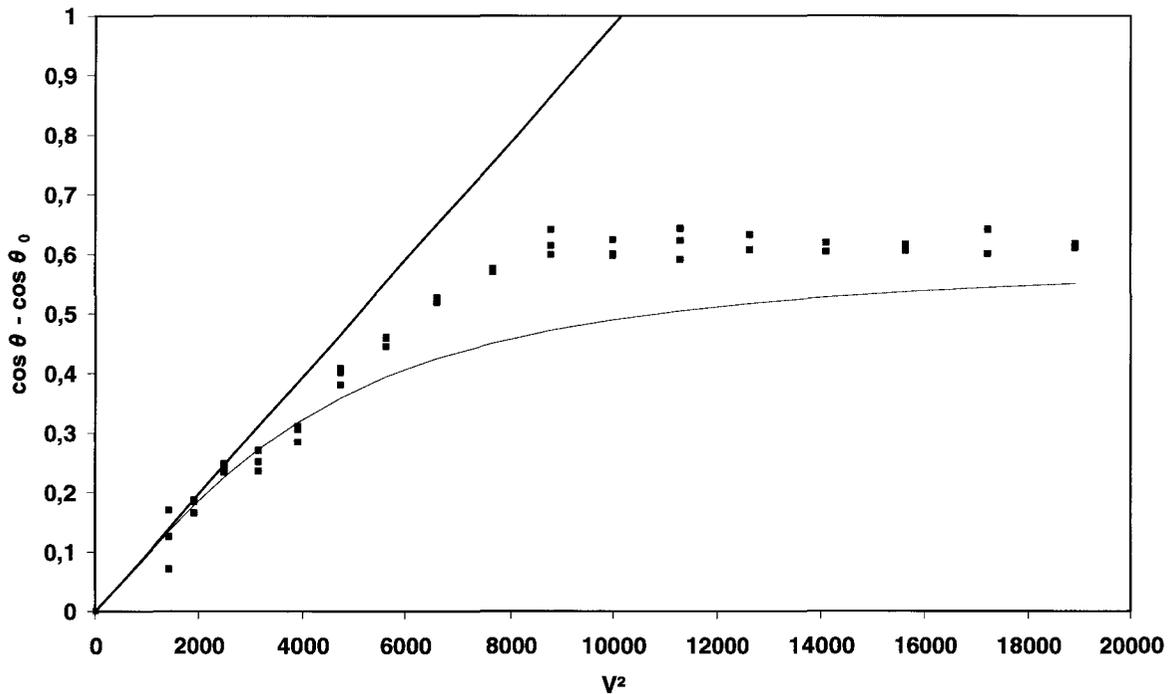


Figure 2.15 – Evolution de la différence $\cos \theta - \cos \theta_0$ en fonction de la tension appliquée au carré V^2 . Les points représentent les données expérimentales, la droite suit l'équation de Young-Lippmann théorique alors que la courbe décrit l'équation de Langevin (2.4).

Nous observons, comme attendu, un effet de saturation à un angle moyen de $73,8^\circ$. La saturation apparaît pour une tension d'environ $85-90V_{\text{max}}$, ce qui est relativement en bon accord avec la valeur théorique attendue : d'après l'équation (2.5), la tension pour laquelle apparaît la saturation est de $78,3V_{\text{max}}$.

3.5. Réalisation du capot

3.5.1. Choix des matériaux

Le capot, relié à la masse, doit être conducteur. Nous utilisons donc un substrat de silicium de type p, d'orientation $\langle 100 \rangle$ et de résistivité $0,009-0,01\Omega.\text{cm}^{-1}$.

Concernant le matériau hydrophobe, nous avons opté pour une monocouche d'OTS (OctadécylTrichloroSilane). En effet, étant donné l'application en spectrométrie de masse, des opérations d'affinité avec l'échantillon à analyser sont envisagées. Il s'agit donc, au niveau du capot, de créer dans la couche hydrophobe, des ouvertures hydrophiles susceptibles d'être fonctionnalisées. Les solutions précédemment développées au sein de l'équipe étaient basées sur une technique de *lift-off* du Téflon²¹. Bien que validée, elle est de

mise en œuvre complexe et présente quelques limitations. L'emploi de monocouches auto-assemblées permet d'effectuer aisément des ouvertures localisées sans gravure ni *lift-off*.

Il est à noter qu'il n'est pas possible d'obtenir un effet d'électromouillage réversible sur une monocouche d'OTS²². En effet, l'effet d'électromouillage sur une monocouche apparaît pour une tension importante. Ceci entraîne une désorption de la couche d'OTS et rend irréversible l'électromouillage: Dans notre configuration, l'électromouillage ne s'effectue que sur la base SU-8/Cytop.

3.5.2. Réalisation de la monocouche

L'OTS est une monocouche moléculaire auto-assemblée, ou SAMs (*Self-Assembled Monolayers*). Celles-ci sont réalisées par la simple mise en solution de l'échantillon. Les molécules en solution s'assemblent à la surface en fonction de leur affinité. Ainsi, les thiols (-SH) s'associent préférentiellement à l'or alors que les silanes sont mieux adaptés aux oxydes. Les liaisons sont de types van der Waals pour les thiols et covalentes pour les silanes. L'uniformité de la couche dépend fortement du temps d'immersion de l'échantillon dans la solution. Une fois la monocouche assemblée, il suffit de rincer l'excédent de molécules à la surface.

Dans notre cas, nous travaillons sur silicium (avec un oxyde natif de quelques angströms d'épaisseur). Cet oxyde natif est suffisant à l'accroche de la monocouche. Nous utilisons donc une molécule contenant un groupement silane : l'OTS. Cette molécule est couramment utilisée en microélectronique, principalement en électronique moléculaire²³⁻²⁴. Sa structure moléculaire à 18 carbones ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SiCl}_3$) lui confère des propriétés hydrophobes.

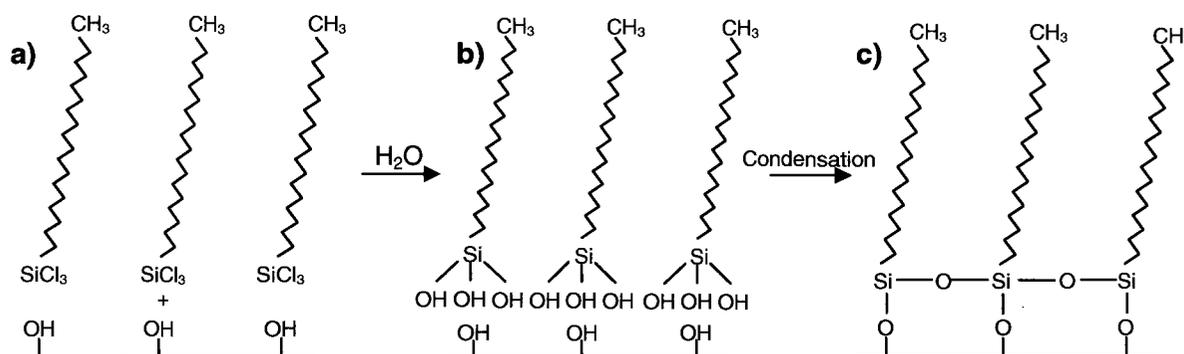


Figure 2.16 - Schéma de principe de synthèse d'une monocouche d'OTS sur l'oxyde natif du silicium.

Dans un premier temps, il est nécessaire d'activer les groupements hydroxyles -OH à la surface de l'échantillon. Cette étape peut être réalisée de plusieurs façons (plasma O_2 , ozonolyse...). Nous avons opté pour la technique la plus simple : l'ozonolyse. Basée sur la capacité des UV à transformer de l'oxygène en ozone, cette technique permet non seulement d'activer les surfaces mais également de détruire toute trace organique à la

surface de l'échantillon. Ainsi, après 15 minutes d'ozonolyse sous une lampe de longueur d'onde 183nm, l'échantillon est immergé dans un mélange OTS/hexane (100 μ L/50mL) sous atmosphère inerte (N₂) pendant 16h (Figure 2.16)²⁵. L'oxyde natif, hydrophile, est responsable de la présence d'eau à la surface de l'échantillon, les molécules d'OTS s'orientent de telle façon à immerger dans l'eau le groupement Cl₃, hydrophile. Le reste de la molécule, hydrophobe, se positionne en dehors de cette couche (Figure 2.16.a), dans l'hexane. Le groupement -Cl₃ est alors hydrolysé et remplacé par des groupements -OH (Figure 2.16.b). Enfin, la condensation permet la formation de liaisons siloxanes Si-O-Si (Figure 2.16.c). Le substrat est ensuite rincé successivement au chloroforme, à l'éthanol et à l'EDI avant d'être séché à l'azote.

3.5.3. Caractérisation du capot

La surface d'OTS présente des angles de contact de l'ordre de 110° (Figure 2.17). L'hystérésis est relativement faible et comparable aux fluoropolymères, de l'ordre de 14° \pm 1° en moyenne, avec un angle d'avancée de 115° \pm 1° et un angle de reculée de 101° \pm 1° (Figure 2.18).

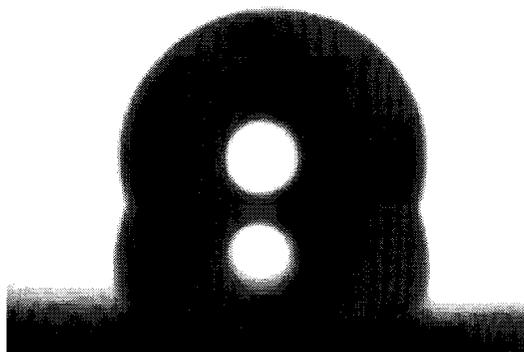


Figure 2.17 - Goutte d'EDI (5 μ L) déposée sur un substrat de silicium recouvert d'OTS.

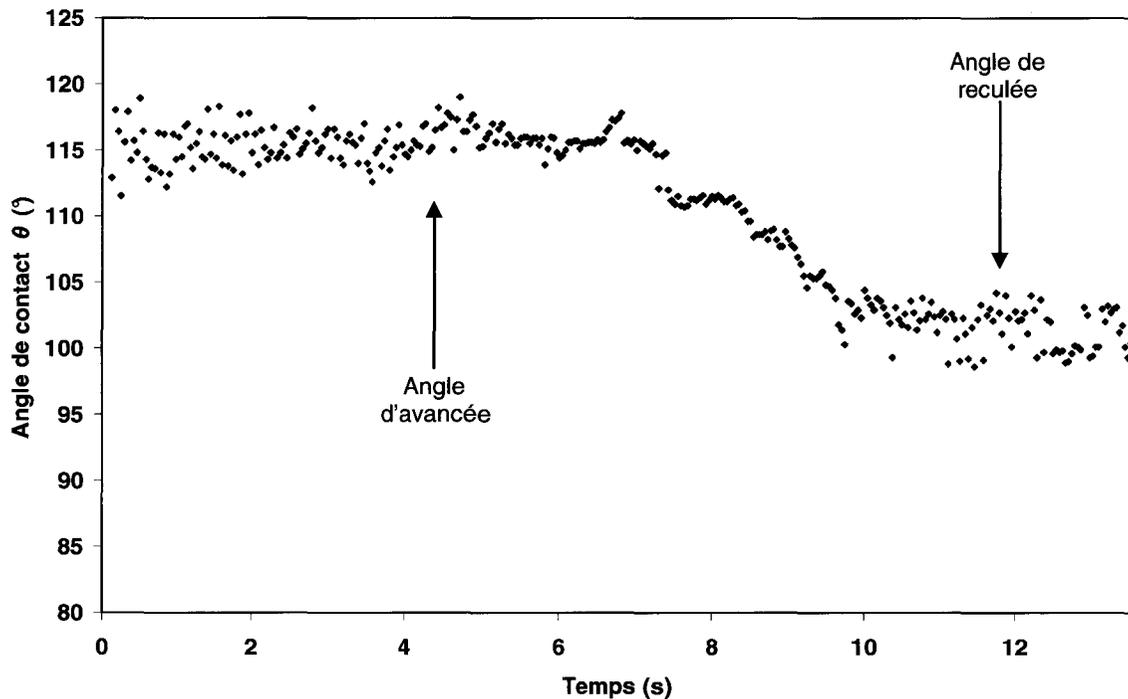


Figure 2.18 - Hystérésis de l'OTS : la première partie de la courbe montre l'angle d'avancée, la seconde partie représente l'angle de reculée.

4. Caractérisation fluïdique

4.1. Banc de caractérisation

4.1.1. Présentation du banc

Afin de caractériser les déplacements de microgouttes au sein du microsystème EWOD présenté, il a été nécessaire de développer un banc de contrôle des électrodes.

La partie matérielle comprend quatre éléments principaux. Un générateur de fonctions basses fréquences CENTRAD GF 265 (ELC, France) délivrant des signaux de 180mHz à 5MHz. Les niveaux de sortie étant trop faibles ($20V_{cc}$ en circuit ouvert, $10V_{cc}$ sur 50Ω) pour le déplacement EWOD, il est nécessaire d'ajouter un amplificateur haute tension (TEGAM, USA) de gain 50 (37dB). Ces éléments alimentent une carte 24 relais (hautes tensions et faibles courants) développée au sein de l'équipe, avec l'appui de Bernard Verbeke, technicien RF à l'IEMN. Le dernier élément est l'interface PC permettant de contrôler cette carte relais via une carte E/S (μ DAQ 120A, Eagle Technology, Afrique du Sud) pilotée sous LabVIEW 8.2 (National Instruments, USA).

Les substrats (base et capot) sont maintenus ensemble par des pinces. Le gap entre les deux substrats est assuré par la superposition d'adhésifs d'épaisseur $75\mu\text{m}$. Le substrat contenant les électrodes est alimenté par une limande. La masse, quant à elle, est assurée par un câble BNC relié au capot.

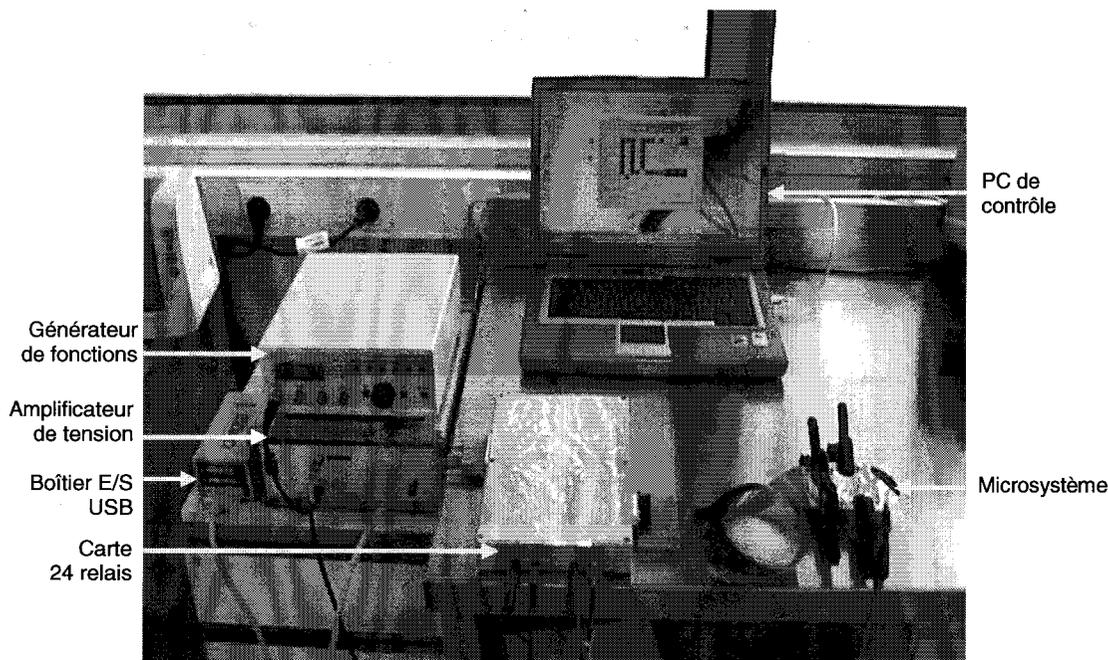


Figure 2.19 - Présentation du banc EWOD complet.

4.1.2. Interface LabVIEW 8.2

Nous avons développé, pour une meilleure ergonomie, une interface LabVIEW 8.2 permettant de programmer rapidement une séquence complexe. De plus, à l'aide de cette interface, il est aisé de déterminer le délai de passage d'une séquence à une autre (correspondant au passage de la goutte d'une électrode à une autre) ainsi que le nombre de boucles désirées. Le VI (*Virtual Instrument*) ainsi développé est présenté Figure 2.20.

Dans un premier temps, le délai d'attente entre deux séquences (en secondes) ainsi que le nombre de boucles souhaitées sont déterminés. L'architecture microfluidique est représentée dans le logiciel à l'aide d'un cluster. Chaque élément du cluster représente une électrode et contrôle l'une des 24 broches de la carte E/S (la carte E/S est constituée de 3 ports de 8 bits et une broche de masse). Pour chaque séquence, il suffit de choisir les électrodes à activer par simple clic. Une fois toutes les séquences programmées, le programme est activé. Cette disposition est adaptable à toute nouvelle architecture. Le synoptique du programme LabVIEW est détaillé en Annexe 2.

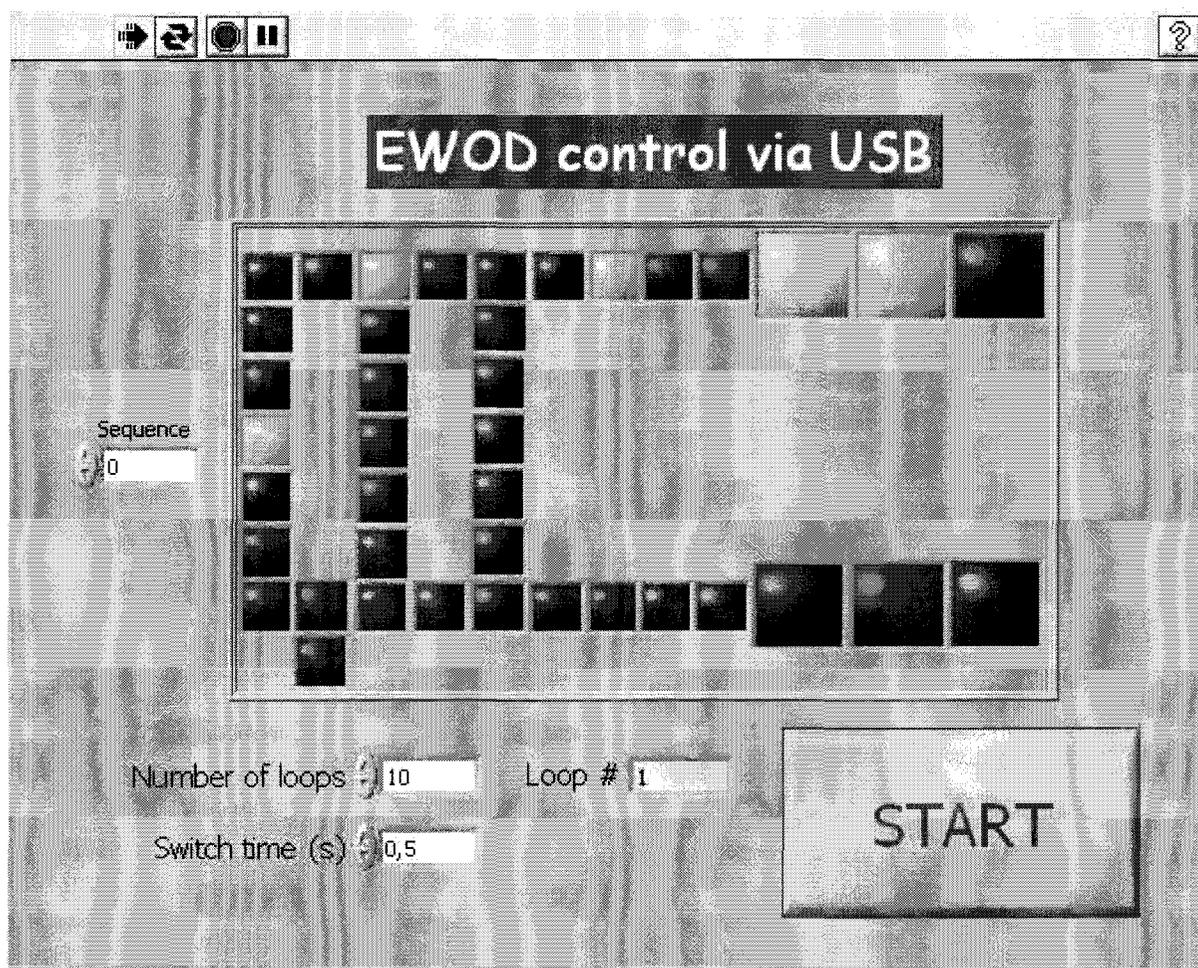


Figure 2.20 - Présentation du VI pour le contrôle des électrodes sous LabVIEW : cinq électrodes sont activées à la séquence 0, 10 boucles sont réalisées et la vitesse est de 2 électrodes.s⁻¹.

4.1.3. Carte E/S

Pour plus de souplesse d'emploi et pour des expérimentations hors salle blanche, nous avons opté pour un contrôle du banc par ordinateur portable. La carte E/S choisie possède donc une connectique USB. Il s'agit d'un boîtier de 120 E/S présenté Figure 2.21. Les 120 entrées/sorties permettront à l'avenir de faire évoluer le système vers des architectures microfluidiques beaucoup plus complexes.

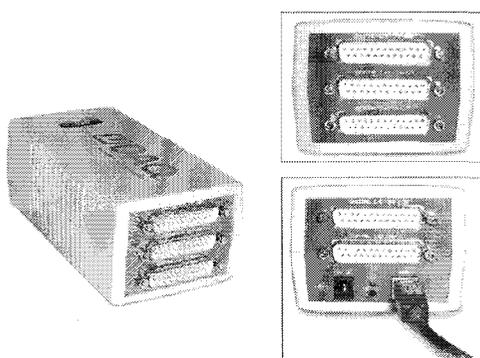


Figure 2.21 - Boîtier E/S numérique USB 120A utilisé pour le banc EWOD (Image www.hitechtools.com).

4.1.4. Porte-substrat

La dernière phase critique avant déplacement de gouttes par EWOD est le positionnement des substrats (capot et base) en vis-à-vis. L'utilisation d'un dispositif élémentaire (adhésif et pince) rend délicate la manipulation des échantillons. Nous avons donc récemment mis au point un support en Téflon intégrant à la fois la connectique permettant de contrôler jusqu'à 96 électrodes (4 x 24) mais également un jeu de cales métalliques afin d'obtenir un gap précis entre les deux substrats (Figure 2.22). De plus, la masse est dorénavant intégrée sous les cales métalliques. Les différentes caractérisations de cette thèse n'ont pu être effectuées avec ce porte-substrat, conçu et réalisé en fin de thèse.

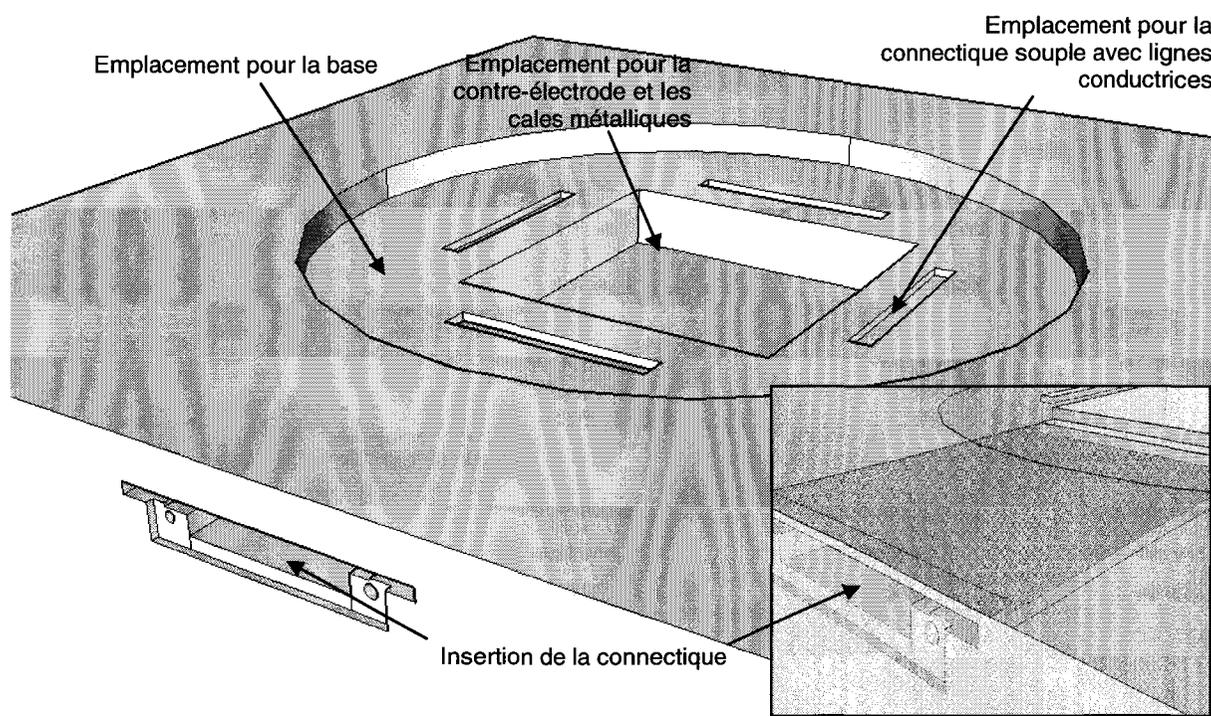


Figure 2.22 - Vue 3D du porte-substrat en Téflon nouvelle génération.

4.2. Opérations microfluidiques de base

Le microsystème final nécessite deux opérations microfluidiques, c'est-à-dire la création de gouttes à partir d'un réservoir et le déplacement de cette même goutte jusqu'à une zone d'analyse bien définie. Toutes les mesures de cette partie ont été réalisées à partir d'EDI.

4.2.1. Déplacement

Le principe du déplacement de goutte a déjà été présenté en début de chapitre. Pour la caractérisation du déplacement, les deux substrats ont été espacés de $300\mu\text{m}$. La tension

minimale $V_{\min_{\text{exp}}}$ permettant le déplacement efficace et reproductible d'une goutte de $0,8\mu\text{L}$ sur des électrodes de $1,7\text{mm}$ de côté est de $70V_{\max}$ (1kHz, créneau).

L'équation (2.14) adaptée à notre situation donne :

$$V_{\min} = \sqrt{\frac{2\gamma e}{\epsilon_0 \epsilon_r} [(\cos \theta_{R_{\text{Cytop}}} - \cos \theta_{A_{\text{Cytop}}}) + (\cos \theta_{R_{\text{OTS}}} - \cos \theta_{A_{\text{OTS}}})]} \quad (2.15)$$

En posant $e=2\mu\text{m}$, $\epsilon_0=8,85418782 \cdot 10^{-12}\text{F.m}^{-1}$, $\epsilon_r=3,2$, $\gamma=72\text{mN.m}^{-1}$, on trouve une tension théorique $V_{\min_{\text{th}}}$ égale à $64,6\text{V}$, proche de la valeur expérimentale.

Le résultat d'un déplacement à une vitesse standard d'utilisation de $10 \text{ électrodes.s}^{-1}$ soit 17mm.s^{-1} dans le cas de ce microsystème est présenté Figure 2.23.

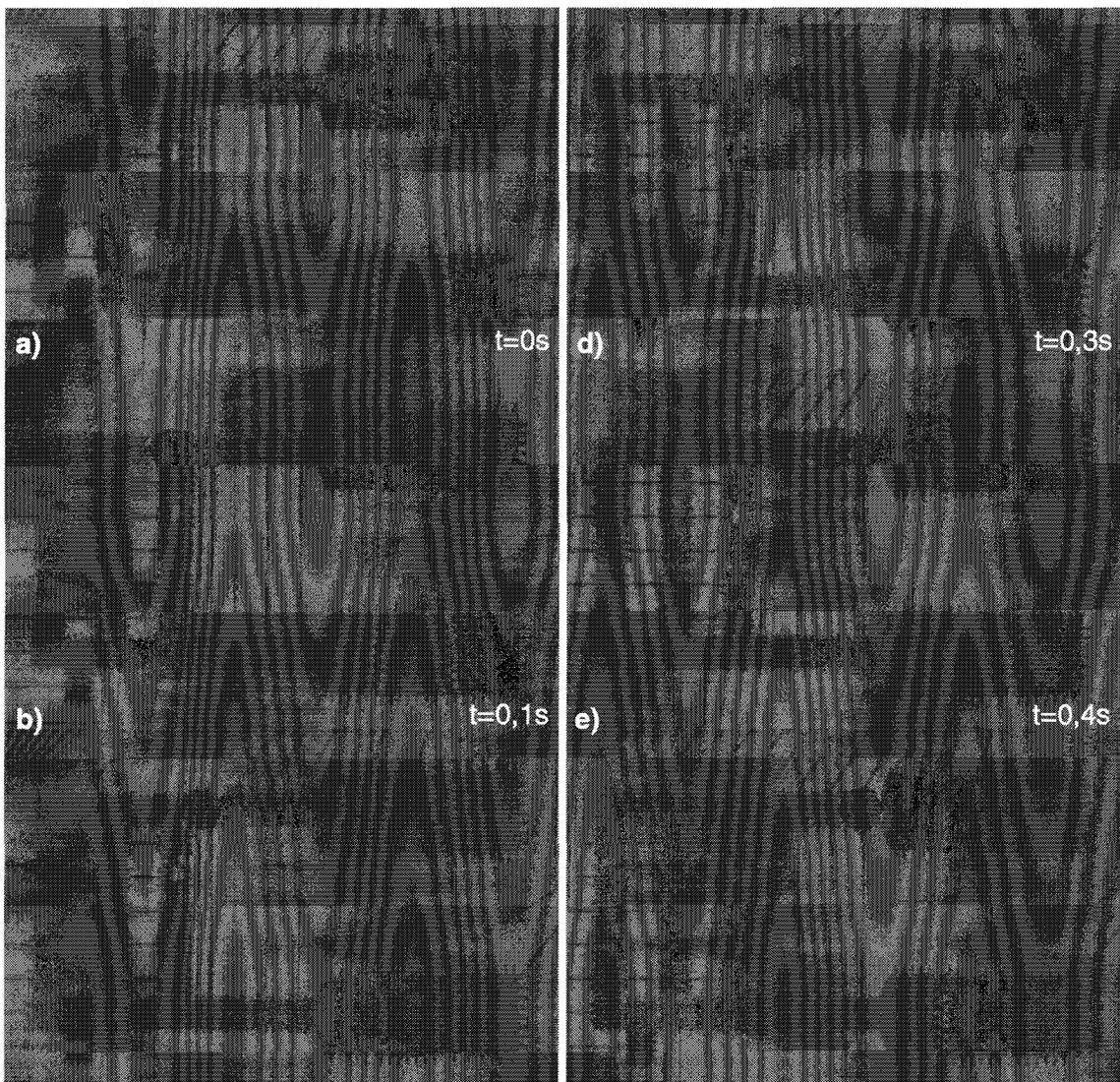


Figure 2.23 - Déplacement d'une goutte de $0,8\mu\text{L}$ avec un capot hydrophobe (OTS) sous une tension de $70V_{\max}$ (1kHz) à une vitesse de 17mm.s^{-1} .

La vitesse maximale de déplacement observée est cependant bien supérieure à la vitesse standard : il est possible d'atteindre une vitesse de 71 électrodes. s^{-1} soit 121mm. s^{-1} pour une tension de 100V_{max}. La limite de déplacement est, en réalité, fixée par la dimension des électrodes. En effet, la goutte met un certain temps pour parcourir la distance d'une électrode. Si la tension appliquée bascule de l'électrode 1 à l'électrode 2 avant que la goutte n'entre en contact avec l'électrode 2, le déplacement s'arrête.

Des essais de tenue dans le temps ont été effectués afin de s'assurer de la bonne tenue de la monocouche d'OTS sous l'effet de la tension. Nous avons ainsi effectué plusieurs milliers d'allers/retours sur 9 électrodes à une tension de 70V_{max} (1kHz) pour une vitesse de 71 électrodes. s^{-1} soit 12cm. s^{-1} . Nous pouvons donc valider l'OTS comme couche hydrophobe pour la contre-électrode.

4.2.2. Création de gouttes

Les laboratoires sur puce doivent permettre la création de gouttes à partir d'un réservoir afin d'alimenter le microsystème. Par exemple, il peut être intéressant de fractionner un très faible volume initial d'échantillon de liquide biologique en plusieurs gouttes de même volume pour multiplier le nombre d'analyses sur cet échantillon.

La création de gouttes est une application spécifique de la scission de goutte, décrite par C.J. Kim¹⁵, dont le principe est présenté Figure 2.24. Si une tension est appliquée sur les électrodes adjacentes à l'électrode sur laquelle est positionnée la goutte, celle-ci s'étire et mouille les deux électrodes sous tension. Afin de conserver un volume constant, il y a pincement de la goutte sur l'électrode centrale. Si le pincement est favorable, il y a scission et création de deux gouttes filles de même volume.

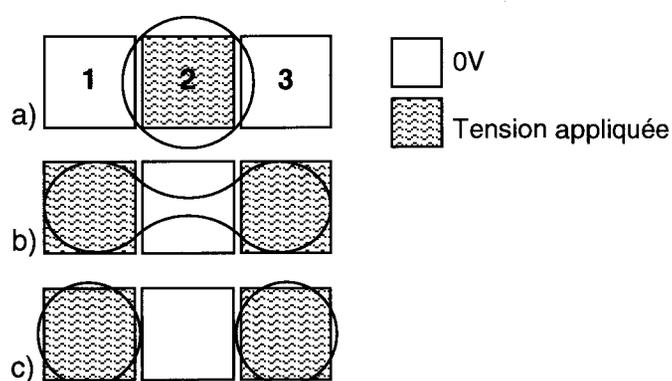


Figure 2.24 - Principe de scission d'une goutte par EWOD : a) la goutte est confinée sur l'électrode centrale sous tension, b) la tension est coupée et appliquée sur les électrodes adjacentes, la goutte est étirée et forme un pincement, c) si le pincement est favorable, il y a scission, les gouttes filles sont créées.

Dans le cas spécifique de la création de gouttes, au lieu de scinder une goutte mère en deux gouttes filles identiques, une goutte fille est extraite d'une goutte mère comme expliqué sur la Figure 2.25.

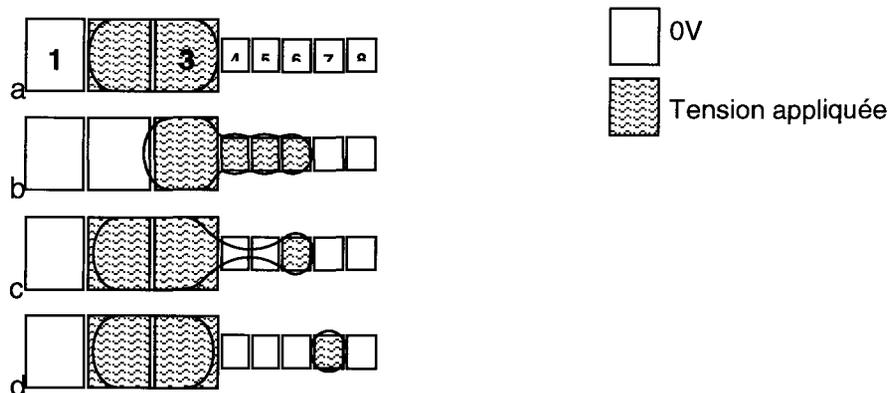


Figure 2.25 - Schéma de principe de la création de gouttes à partir d'un réservoir : a) la goutte se confine sur les électrodes 2 et 3 du réservoir, b) la tension est appliquée sur trois électrodes de déplacement et coupée sur l'électrode 2 du réservoir, c) la tension est coupée sur les électrodes 4 et 5 et de nouveau appliquée sur l'électrode 2, il y a pincement. Si les conditions sont favorables, il y a scission et d) il est possible de déplacer la goutte sur le microsystème.

La création de gouttes est possible pour une tension de $87,5V_{\max}$. En dessous de cette tension, il n'a pas été possible de créer de gouttes pour un gap de $300\mu\text{m}$. La Figure 2.26 détaille quatre étapes dans la création d'une goutte de $0,8\mu\text{L}$ à partir d'un réservoir d'environ $9,6\mu\text{L}$. La goutte est confinée au niveau des électrodes 2 et 3 du réservoir (Figure 2.26.a). La tension est appliquée sur les électrodes 3, 4, 5, 6 et 7, un doigt de liquide est alors formé le long des quatre électrodes de $1,7\text{mm}$ (Figure 2.26.b). La tension sur les électrodes 4, 5 et 6 est coupée et de nouveau appliquée sur l'électrode 2, la goutte est pincée (Figure 2.26.c) avant la scission (Figure 2.26.d).

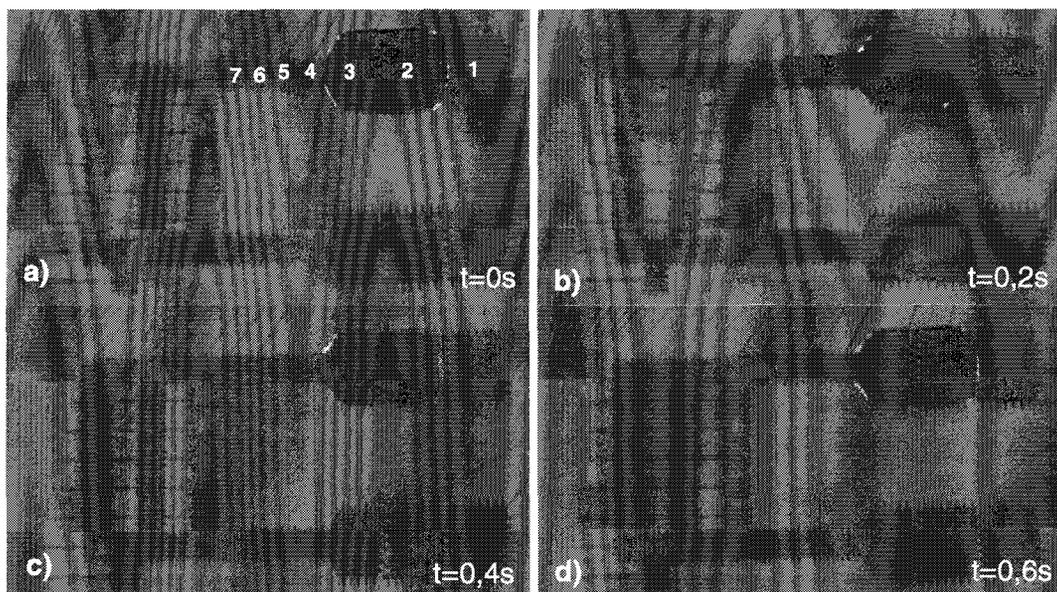


Figure 2.26 - Etapes permettant la création de gouttes suivant le protocole défini précédemment avec un gap de 300 μ m : a) la tension n'est appliquée que sur les électrodes 2 et 3 du réservoir, b) la tension est appliquée sur les électrodes 3, 4, 5, 6 et 7, c) la tension est appliquée de nouveau sur les électrodes 2, 3 et 7 et coupée sur les électrodes 4, 5 et 6 et d) la goutte est créée.

5. Déplacement de liquides biologiques

5.1. Déplacement d'une goutte contenant des peptides

L'élément de base en analyse par spectrométrie de masse MALDI est le peptide. Nous avons donc caractérisé le déplacement d'un mélange de peptides connus.

Dans les travaux précédents de l'équipe¹⁸, le mélange de peptides déplacé était une préparation PEPMIX classiquement utilisée pour calibrer le spectromètre de masse. Cependant, les données du fournisseur ne permettent pas de connaître la concentration précise du mélange (les peptides présents sont, eux, connus). Nous avons donc décidé de préparer un mélange de peptides spécifique.

Les peptides utilisés sont l'angiotensine II ($C=10^{-6}\text{mol.L}^{-1}$, $m=1046,54\text{Da}$), la bradykinine ($C=10^{-6}\text{mol.L}^{-1}$, $m=1060,56\text{Da}$), la substance P ($C=10^{-6}\text{mol.L}^{-1}$, $m=1347,73\text{Da}$), la ACTH 18-39 ($C=10^{-6}\text{mol.L}^{-1}$, $m=2465,19\text{Da}$). Le mélange est effectué dans de l'eau contenant 0,1% de TFA (acide trifluoroacétique).

Nous avons pu réaliser un déplacement du mélange de peptides. Environ vingt allers/retours sur cinq électrodes sont réalisables avant que la goutte ne cesse d'avancer. Ceci est sans doute dû à des problèmes d'adsorption non spécifique liée aux interactions hydrophobes/hydrophobes (protéine/fluoropolymère). Dans le cadre d'une analyse, il n'est pas nécessaire de déplacer la goutte autant de fois. Cela n'est donc pas un facteur limitant.

5.2. Déplacement d'une goutte de matrice

Il existe plusieurs types de matrice. Les essais entrepris ont concerné les plus communes : la HCCA (acide α cyano-4-hydroxycinnamique) et la DHB (acide 2,5 dihydroxybenzoïque).

Concernant la HCCA, lors des travaux de thèse de François Caron, il n'avait pas été possible de la déplacer quelle que soit la concentration dans un mélange acétonitrile/eau (5:5 v/v) contenant 0,3% de TFA. Etant donné qu'il arrivait à déplacer de la matrice DHB dans un même mélange contenant 0,1% de TFA, nous avons supposé que le problème pouvait provenir de la concentration en TFA.

Nous avons donc essayé de déplacer de la matrice HCCA à une concentration de 1mg.mL^{-1} dans un mélange acétonitrile/eau (5:5 v/v) contenant 0,1% de TFA. Nous tirons la

même conclusion : il est impossible de la déplacer. Nous n'observons aucun effet d'électromouillage.

L'autre hypothèse avancée est liée à la constitution moléculaire de la matrice. En effet, la matrice HCCA est constituée de nombreuses liaisons hydrogènes. La réaction de cristallisation est donc extrêmement rapide entraînant une précipitation et ainsi une adsorption non spécifique abondante sur la surface.

Concernant la DHB, la concentration de 10mg.mL^{-1} dans un mélange acétonitrile/eau (2:3 v/v) contenant 0,1% de TFA a pu être déplacée. Le déplacement est cependant relativement lent (1électrode.s^{-1}) et limité dans le temps. Après quelques allers/retours sur cinq électrodes, la goutte n'avance plus, la surface est polluée.

Dans notre cas, la goutte de matrice n'est pas déplacée directement. Nous amenons en effet la goutte de peptide, plus facile à déplacer, au contact de la goutte de matrice. Les deux liquides sont alors mélangés par une série d'allers/retours sur deux électrodes puis positionnés sur le plot d'analyse. Ce mélange permet d'effectuer une meilleure co-cristallisation par rapport à un mélange par diffusion et donc d'obtenir une meilleure analyse.

6. Analyse MALDI

6.1. Principe des ouvertures

Jusqu'à présent, la contre-électrode utilisée était entièrement hydrophobe. Afin de fixer la goutte, ainsi qu'une partie des analytes qu'elle contient, sur le capot, il est nécessaire de réaliser des plots hydrophiles sur le substrat. Pour cela, il s'agit d'ouvrir localement la monocouche d'OTS. Un schéma de principe est présenté Figure 2.27. Le principe des ouvertures a également été développé et breveté dans le cadre de la thèse de François Caron²¹. La technique d'ouverture du Téflon par *lift-off* présentait de nombreux inconvénients car le Téflon, se déposant par *spin-coating*, passait sous la casquette. De plus, la résine positive ne peut être recuite à plus de 140°C alors que le Téflon nécessite un recuit à 330°C . Le *lift-off* doit donc être réalisé après un premier recuit à 110°C et avant le recuit à 330°C .

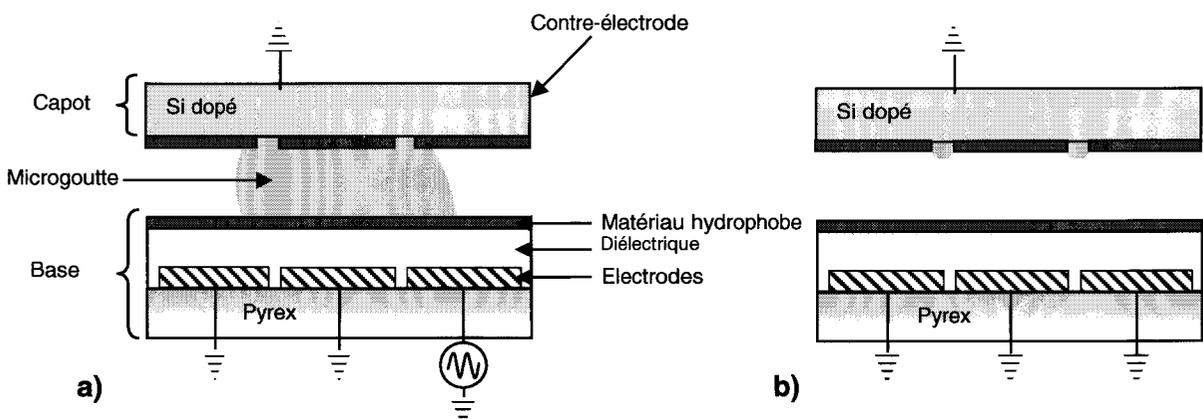


Figure 2.27 - Principe des ouvertures dans la couche hydrophobe pour analyse par spectrométrie de masse MALDI : a) passage de la goutte sur les ouvertures, b) après passage de la goutte, les zones hydrophiles contiennent une goutte d'analytes.

La réalisation d'ouvertures dans l'OTS nécessite de détruire localement la monocouche. Etant donnée la faible dimension des ouvertures (100µm), l'ozonolyse au travers d'un masque physique ne permet pas de réaliser des ouvertures bien définies. Celles-ci sont donc réalisées par plasma O₂ (Q=20sccm, P=100mT, P=100W, t=30s) au travers d'un masque en résine optique.

Le masque utilisé pour les ouvertures est présenté Figure 2.28. Il contient des ouvertures de 100µm, 250µm, 500µm et 1000µm, espacées de 3500µm.

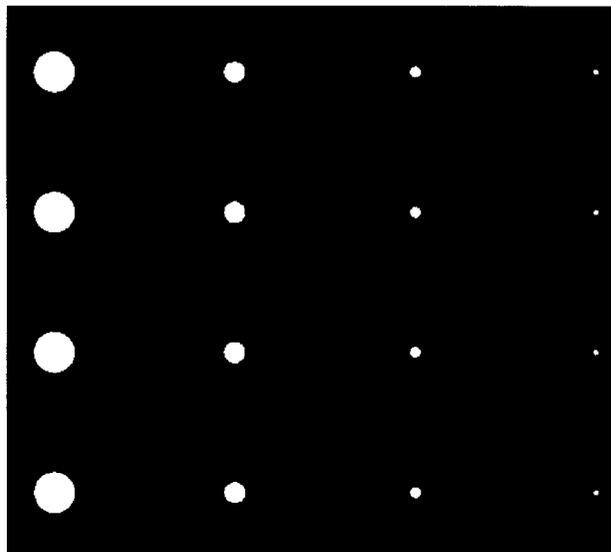


Figure 2.28 - Masque utilisé pour les ouvertures. Les dimensions sont de 100µm, 250µm, 500µm et 1000µm et espacées de 3500µm (de centre à centre).

6.2. Validation des ouvertures

Afin de valider le principe des ouvertures, nous avons déplacé une goutte de liquide contenant un peptide fluorescent. Le peptide utilisé est la lysine-arginine-rhodamine (10^{-6} mol.L⁻¹) dont le marqueur fluorescent est la rhodamine.

Il n'a été possible de déplacer la goutte que sur les ouvertures de 100µm. Pour des dimensions supérieures, la goutte reste accrochée au sein du plot hydrophile.

La surface est ensuite scannée à l'IBL (Institut de Biologie de Lille) sous microscope à fluorescence. Le résultat est présenté Figure 2.29.

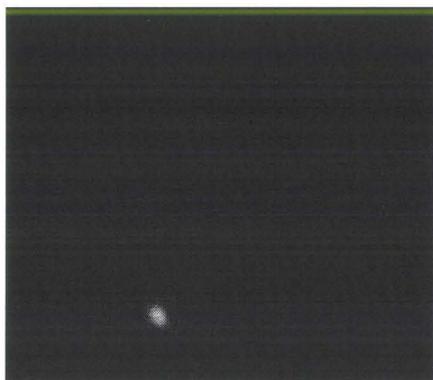


Figure 2.29 - Image obtenue par fluorescence sur des ouvertures de 100µm après passage d'une goutte déplacée par électromouillage.

On constate donc que l'ouverture contient le peptide fluorescent alors que le reste du substrat, hydrophobe, semble ne pas avoir subi d'adsorption non spécifique. Ce type d'ouverture fonctionne donc pour piéger des gouttes de peptides. Nous utilisons de telles ouvertures pour l'analyse MALDI du mélange présenté au paragraphe précédent.

6.3. Analyse MALDI

Dans un premier temps, nous avons validé le microsystème par l'analyse d'un seul peptide, la substance P (10^{-5} mol.L⁻¹), mélangée à de la HCCA, sans déplacement. Le résultat est présenté Figure 2.30. Les pics de haute masse sont liés à la Substance P, les pics de basse masse sont dus à la matrice. Les différentes analyses sont réalisées en collaboration avec l'IRI (Institut de Recherche Interdisciplinaire) et le LNA (Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides), de l'USTL sur un spectromètre de masse Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, USA).

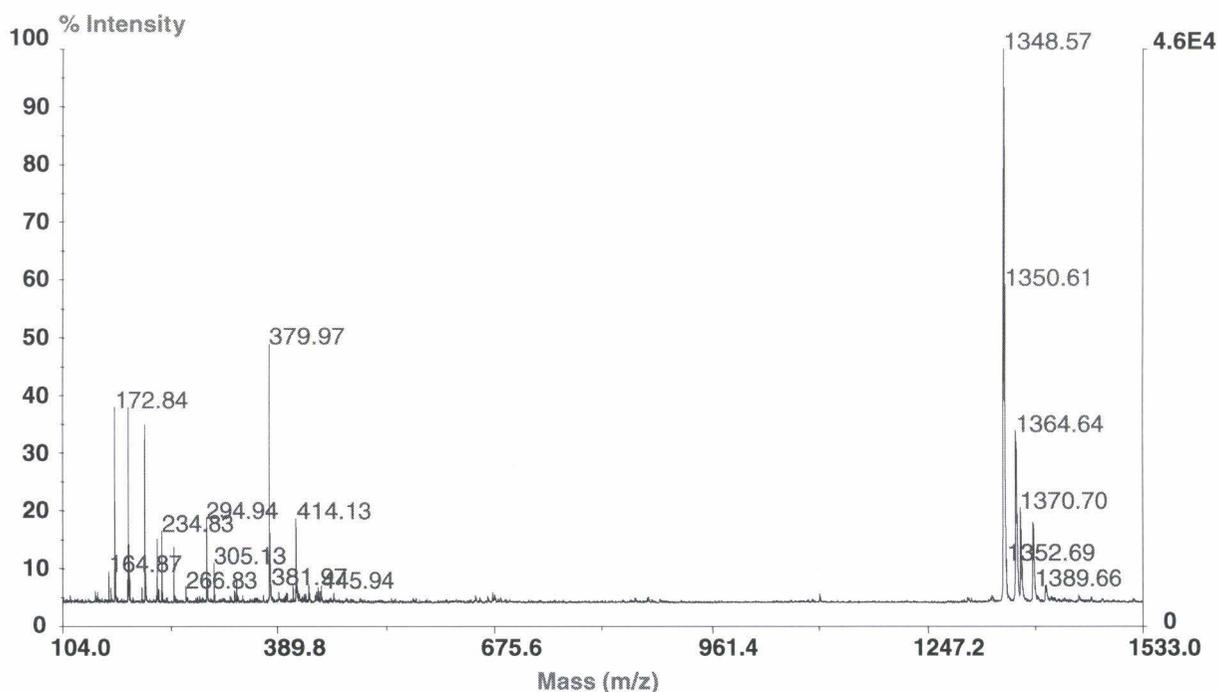


Figure 2.30 - Exemple de spectre de masse MALDI : analyse de la Substance P (10^{-5}mol.L^{-1}) mélangée avec de la matrice HCCA.

Nous avons par la suite analysé le mélange de peptides déplacé précédemment (paragraphe 5.1) sur des ouvertures de $100\mu\text{m}$. Le résultat d'une telle analyse est présenté sur la Figure 2.31. On retrouve bien les quatre peptides présents dans le mélange. Le microsystème est donc bien validé pour une analyse de type MALDI sur des ouvertures de $100\mu\text{m}$. Cependant, en raison de la faible dimension des ouvertures, le signal est relativement faible.

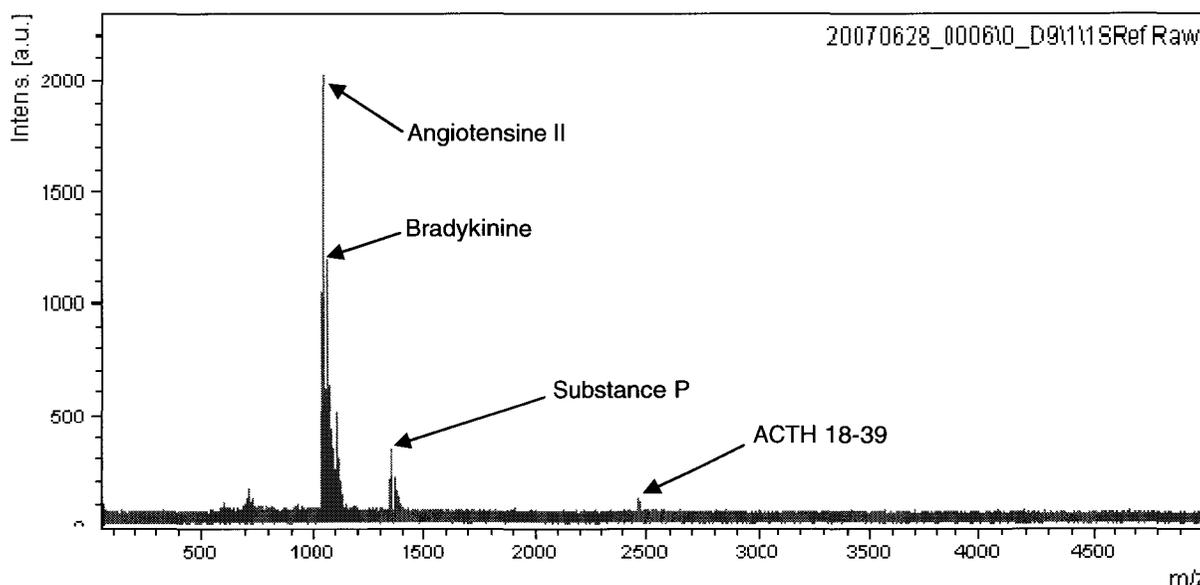


Figure 2.31 - Analyse MALDI du mélange de peptides du paragraphe 5.1 mélangé avec de la matrice DHB au sein d'ouvertures de $100\mu\text{m}$.

7. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté un microsystème, ainsi que le banc expérimental, fonctionnant par électromouillage et destiné à l'analyse par spectrométrie de masse MALDI. Celui-ci comporte une base, intégrant l'architecture microfluidique (verre/nickel/SU-8/Cytop) dédiée au déplacement de gouttes par électromouillage, et un capot amovible hydrophobe (OTS). Nous avons validé les différentes opérations microfluidiques nécessaires (création et déplacement de gouttes) ainsi que le déplacement de liquides biologiques (mélange de peptides et matrice). Le passage d'une goutte sur des ouvertures hydrophiles ($100\mu\text{m}$ de diamètre) a permis de valider le dispositif en fluorescence et en MALDI. Ce dispositif est une version optimisée par rapport à ceux réalisés précédemment à l'IEMN. D'un point de vue pilotage informatique, le développement d'une interface Labview permet une plus grande convivialité de manipulation. Nous présentons également un support de microsystèmes plus fonctionnel ainsi qu'une simplification des opérations technologiques.

8. Bibliographie

- ¹ P.G. de Gennes, F. Brochard-Wyart and D. Quéré, *"Gouttes, bulles, perles et ondes"*, Ed. Belin (2002).
- ² T. Young, *"An essay on the cohesion of fluids"*, Philos. Trans. R. Soc. London **95** (1805) 65.
- ³ J. Fox and W. Zisman, *"The spreading of liquid on low energy surfaces. I. Polytetrafluoroéthylène"*, J. of Colloid Interface Sci. **5** (1950) 514.
- ⁴ W. Zisman, *"Contact angle wettability and adhesion"*, Chemical series **43** (1964).
- ⁵ G. Lippmann, *"Relations entre les phénomènes électriques et capillaires"*, Ann. Chim. Phys. **5** (1875) 494-549.
- ⁶ B. Berge, *"Electrocapillarité et mouillage de films minces par l'eau"*, C. R. Acad. Sci. Paris série II **317** (1993) 157-163.
- ⁷ J. Berthier, P. Clementz, O. Raccurt, D. Jary, P. Claustre, C. Peponnet and Y. Fouillet, *"Computer aided design of an EWOD microdevice"*, Sens. Actuators A **127** (2006) 283-294.
- ⁸ S. Kuiper, *"Voltage reduction in electrowetting-on-dielectric"*, 5th International Meeting on Electrowetting, Rochester (NY, USA), May 31 – June 2 (2006).
- ⁹ H.J.J Verheijen and M.W.J. Prins, *"Reversible electrowetting and trapping of charge: model and experiments"*, Langmuir **15** (1999) 6616-6620.
- ¹⁰ M. Vallet, M. Vallade and B. Berge, *"Limiting phenomena for the spreading of water on polymer films by electrowetting"*, Eur. Phys. J. B. **11** (1999) 583-591.
- ¹¹ B. Shapiro, H. Moon, R.L. Garrell and C.J. Kim, *"Equilibrium behavior of sessile drops under surface tension, applied external fields, and material variations"*, J. Appl. Phys. **93** (2003) 5794-5811.
- ¹² V. Peykov, A. Quinn and J. Ralston, *"Electrowetting: a model for contact angle saturation"*, Colloid Polym. Sci. **278** (2000) 789-793.
- ¹³ A. Quinn, R. Sedev and J. Ralston, *"Contact angle saturation in electrowetting"*, J. Phys. Chem. B. **109** (2005) 6268-6275.
- ¹⁴ Y. Fouillet, D. Jary, A.G. Brachet, J. Berthier, R. Blervaque, L. Davoux, J.M. Roux, J.L. Achard and C. Peponnet, *"EWOD digital microfluidics for lab-on-a-chip"*, 4th International Conference on Nanochannels, Microchannels and Minichannels, Liemrick, Ireland, June 19-21 (2006).
- ¹⁵ S.K. Cho, H. Moon and C.J. Kim, *"Creating, transporting, cutting and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits"*, J. Microelec. Sys. **12** (2003) 70-80.
- ¹⁶ J. Berthier, P. Silberzan, *"Microfluidics for biotechnology"*, Artech House Publishers (2005).
- ¹⁷ J.B. Brzoska, F. Brochard-Wyart and F. Rondelez, *"Motions of droplets on hydrophobic model surfaces induced by thermal gradients"*, Langmuir **9** (1993) 2220-2224.

- ¹⁸ F. Caron, “*Développement de microsystèmes fluidiques à électromouillage pour l’analyse de protéines par spectrométrie de masse MALDI*”, Thèse de l’Université de Lille 1, 29 juin (2007).
- ¹⁹ Microchem, <http://www.microchem.com>
- ²⁰ U.C. Yi and C.J. Kim, “*Soft printing of droplets digitized by electrowetting*”, The 12th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems, Boston, June 8-12 (2003) 1804-1807.
- ²¹ J.C. Fourier, F. Caron, C. Druon, P. Tabourier, J.P. Le Pesant, D. Loyaux and C. Rolando, “*Dispositif pour désorption par rayonnement laser incorporant une manipulation de l’échantillon liquide sous forme de gouttes individuelles permettant leur traitement chimique et biochimique*”, USTL, CNRS, Sanofi-Aventis, Osmooze, N°FR200400060 81, 04/05/04.
- ²² F. Saeki, J. Baum, H. Moon, J.Y. Yoon, C.J. Kim, and R.L. Garrell, “*Electrowetting on Dielectrics (EWOD): Reducing Voltage Requirement for Microfluidics*”, American Chemical Society National Meeting, Chicago, IL, August (2001).
- ²³ D. Goldhaber-Gordon, M.S. Montemerlo, J.C. Love, G.J. Opitck and J.C. Ellenbogen, “*Overview of nanoelectronic devices*”, Proc. IEEE **85** (1997) 521-540.
- ²⁴ S. Lenfant, “*Monocouches organiques auto-assemblées pour la réalisation de diodes moléculaires*”, Thèse de l’Université de Lille 1 (2001).
- ²⁵ R. Maoz and J. Sagiv, “*On the formation and structure of self-assembling monolayers. I. A comparative atr-wettability study of Langmuir-Blodgett and adsorbed films on flat substrates and glass microbeads*”, J. Colloid Interface Sci. **100** (1984) 465-496.

Chapitre 3
Microsystème EWOD
pour analyse DIOS

1. Introduction

La spectrométrie de masse MALDI reste l'outil de référence en analyse de protéines. Cependant, l'inconvénient majeur est l'ionisation simultanée de l'échantillon et de la matrice. Cela conduit à la présence de pics parasites dans les basses masses empêchant la visualisation des peptides de masse équivalente car la concentration de matrice est nettement plus élevée que celle de l'échantillon (facteur 10^4).

De nouvelles surfaces ont été développées pour s'affranchir de cette matrice. Il s'agit des surfaces DIOS permettant une désorption/ionisation de l'analyte malgré l'absence de matrice. Ces surfaces sont généralement nanostructurées par des nanopores ou encore des nanofils. Naturellement hydrophiles, les surfaces de nanofils doivent subir un traitement hydrophobe afin de les intégrer au sein du laboratoire sur puce. La surface présente alors un comportement macroscopique de type superhydrophobe.

Ce chapitre présente donc dans un premier temps une synthèse sur la théorie de la superhydrophobicité en distinguant deux comportements : une goutte de liquide peut soit s'ancrer dans la nanostructure (configuration de Wenzel) soit rouler sur la surface (configuration de Cassie-Baxter). La seconde partie détaille la technique de réalisation utilisée pour de telles surfaces ainsi que leur intégration comme capot (et contre-électrode) au sein du laboratoire sur puce. Enfin, dans une troisième partie, nous caractérisons le microsystème tant d'un point de vue microfluidique que biochimique (caractérisation par fluorescence et analyse DIOS). Nous concluons par une confrontation de ces résultats avec ceux du chapitre précédent autant d'un point de vue fluide (tensions appliquées, vitesse de déplacement) que biologique (comparaison MALDI/DIOS).

2. Les surfaces superhydrophobes

2.1. Principe de la superhydrophobicité

La nature fait bien les choses ! La feuille de lotus, synonyme de pureté dans la religion hindou, est admirée par sa capacité à repousser la moindre goutte d'eau venant perturber sa surface, entraînant par la même occasion toute poussière parasite qui oserait frôler son limbe. Ce phénomène (aussi appelé effet *rolling ball*) est présent dans la nature non seulement chez la feuille de lotus mais également chez près de 200 autres espèces, végétales et animales. Par exemple, les ailes du papillon sont couvertes d'écailles dont la taille et la forme confèrent à la surface un caractère superhydrophobe et qui sont à l'origine de leur coloration (Figure 3.1).

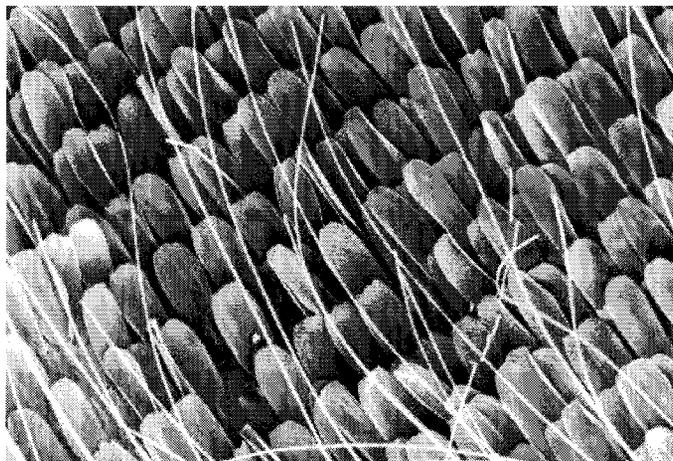


Figure 3.1 – Cliché MEB d'une aile de papillon¹.

Le point commun entre toutes ces surfaces superhydrophobes est leur rugosité. Elles sont composées de structures nanométriques limitant l'imprégnation du liquide et repoussant la goutte. Dans la plupart des cas, les surfaces sont en plus composées d'une seconde échelle de rugosité, de dimension micrométrique. La goutte, afin de minimiser son énergie, forme une perle liquide à la surface de la structuration. Le terme superhydrophobicité s'emploie donc lorsque l'angle de contact apparent d'une goutte d'eau sur une surface approche 180°.

Le nombre de publications sur ce sujet ne cesse d'augmenter depuis quelques années. Un diagramme non exhaustif du nombre de publications sur ce sujet est présenté Figure 3.2. Les résultats sont tirés du site bibliographique Scopus (www.scopus.com - 16/04/2007) et recensent les publications et brevets dont le titre, le résumé ou les mots-clés contiennent soit *superhydrophobic* soit *superhydrophobicity* depuis la première parution en 1973.

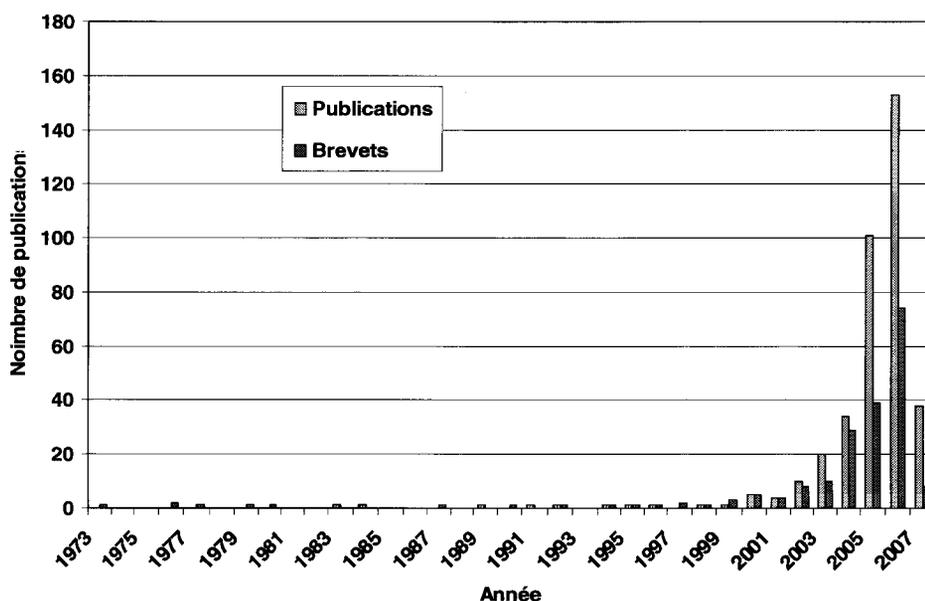


Figure 3.2 - Evolution du nombre de publications et de brevets sur surfaces superhydrophobes dont le titre, le résumé ou les mots-clés contiennent soit *superhydrophobic* soit *superhydrophobicity* (Source www.scopus.com - 16/04/2007).

2.2. Théorie de la superhydrophobicité

Dans le chapitre précédent, les surfaces étudiées étaient considérées comme planes. La rugosité du substrat était alors suffisamment faible pour ne pas intervenir au niveau des propriétés de mouillage. Dans ce cas, la relation de Young (2.1) nous donne la valeur de l'angle de contact θ sur la surface (que nous appellerons dorénavant angle de Young).

Cependant, la surface peut présenter une hétérogénéité physique (rugosité) ou chimique (divers matériaux donc diverses énergies de surface). On observe alors un nouvel angle de contact, que l'on appelle angle de contact apparent, généralement noté θ^* . Localement, l'angle de contact entre la goutte et la surface correspond toujours à l'angle de Young, comme représenté sur la Figure 3.3.

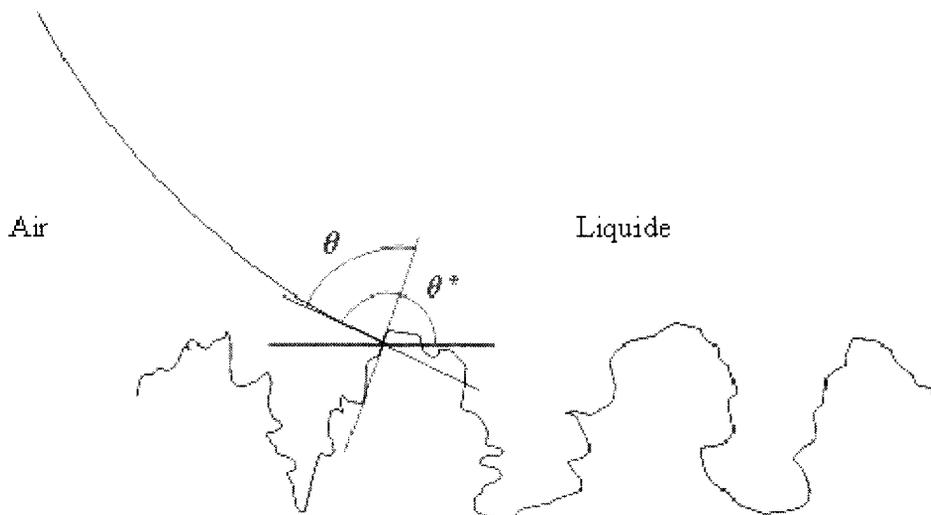


Figure 3.3 - Angle de Young local θ et angle macroscopique apparent θ^* que forme une goutte de liquide posée sur une nanostructure.

De plus, une goutte posée sur une surface rugueuse et hydrophobe peut adopter deux configurations : une configuration de type Wenzel²⁻³ (faible rugosité) et une configuration de type Cassie-Baxter⁴ (forte rugosité), comme présenté Figure 3.4. Dans les deux cas, même si localement, l'angle de contact n'est pas modifié (angle de Young), on observe une augmentation de l'angle de contact apparent θ^* de la goutte.

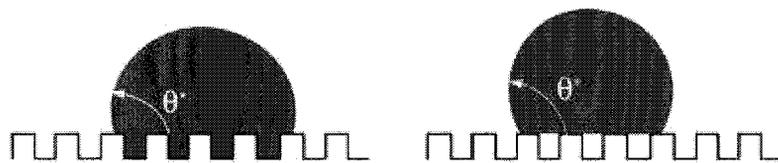


Figure 3.4 - Surfaces superhydrophobes : a) modèle de Wenzel, b) modèle de Cassie-Baxter⁵.

Bien que la surface soit superhydrophobe, il existe une différence fondamentale entre les deux modèles : la valeur de l'hystérésis. La première expérience à ce sujet est attribuée à

Johnson et Dettre (1964) qui ont mesuré les angles d'avancée et de reculée en fonction de la rugosité⁶. Pour cela, ils caractérisent une cire dont la rugosité diminue avec le nombre de recuits. Le résultat de cette expérience est présenté Figure 3.5. On observe ainsi à faible rugosité une forte hystérésis pouvant atteindre 100° (Wenzel) liée à l'augmentation de la surface du substrat en contact avec la goutte. A partir d'une certaine rugosité (non quantifiée dans leur expérience), on observe un saut des deux valeurs de l'hystérésis résultant de la formation de poches d'air sous la goutte. L'angle de reculée se rapproche de l'angle d'avancée (Cassie-Baxter), l'hystérésis diminue fortement pour atteindre une valeur inférieure à une dizaine de degrés.

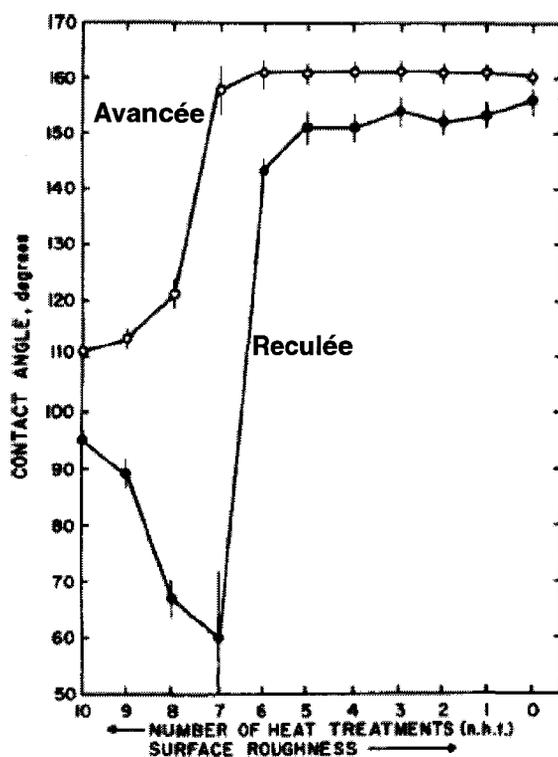


Figure 3.5 - Expérience de Johnson et Dettre présentant l'évolution des angles d'avancée et de reculée en fonction de la rugosité⁶.

Cette expérience montre également qu'une goutte en configuration de Cassie-Baxter permet d'obtenir un angle de contact bien supérieur à celui d'une goutte en configuration de Wenzel. Cela est illustré Figure 3.6.a⁵. La goutte de gauche est dans un état de Cassie-Baxter alors que la goutte de droite est dans un état de Wenzel. Après évaporation d'une partie de la goutte (Figure 3.6.b), l'angle observé (qui est l'angle de reculée) est similaire à l'angle d'avancée pour la goutte de gauche alors que la goutte de droite semble être posée sur une surface hydrophile, la goutte est piégée.

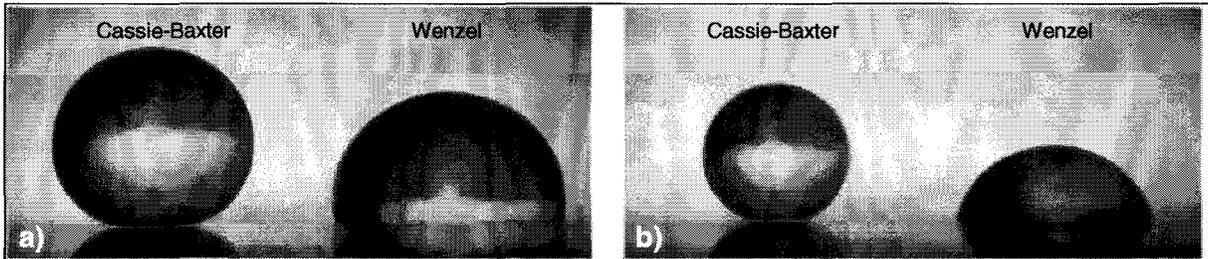


Figure 3.6 - Illustration de la différence entre l'état de Cassie-Baxter et l'état de Wenzel : a) après dépôt des gouttes sur la surface, b) après évaporation⁵.

Les deux paragraphes suivants présentent plus en détail ces deux modèles.

2.2.1. Modèle de Wenzel (1936)

Lorsque la surface présente une faible rugosité, la goutte suit l'état de surface, elle est empalée sur la rugosité (Figure 3.4.a). Dans ce cas, on considère que les énergies de surface solide/liquide et solide/gaz sont respectivement $r\gamma_{SL}$ et $r\gamma_{SG}$ où la rugosité r est définie comme le rapport entre la surface réelle et la surface apparente ($r > 1$ pour une surface rugueuse, et $r = 1$ pour une surface parfaitement plane)⁷. Un déplacement dx de la ligne triple entraîne donc une variation dE de l'énergie qui peut être notée :

$$dE = r(\gamma_{SL} - \gamma_{SV})dx + \gamma dx \cos \theta^* \quad (3.1)$$

A l'équilibre ($dE=0$), pour une rugosité nulle, c'est-à-dire pour $r = 1$, nous retrouvons la relation de Young. Pour une rugosité non nulle, on obtient la relation de Wenzel² :

$$\cos \theta^* = r \cos \theta \quad (3.2)$$

La question est de savoir quelles sont les conditions pour se situer dans cette configuration. Dans cette relation, l'angle de Young θ ne peut être modulé puisque sur surface plane, la valeur optimale se situe aux alentours de 120° dans le cas de l'eau. De plus, elle sous-entend qu'il est possible d'atteindre un angle apparent de 180° (comme le montre la Figure 3.7) dès que le produit $r \cos \theta$ atteint -1 . Or un angle apparent θ^* de 180° ne peut être observé pour la simple raison que la goutte doit conserver une surface de contact avec le substrat. Le seul paramètre sur lequel il est possible d'intervenir est donc la rugosité. Cependant, une forte rugosité entraîne une configuration de Cassie-Baxter. En effet, la goutte minimise son énergie en restant en surface d'une forte rugosité plutôt que de pénétrer dans les aspérités. Ainsi, la loi de Wenzel ne se vérifie que pour une certaine échelle de rugosité et donc pour des angles apparents inférieurs à 180° .

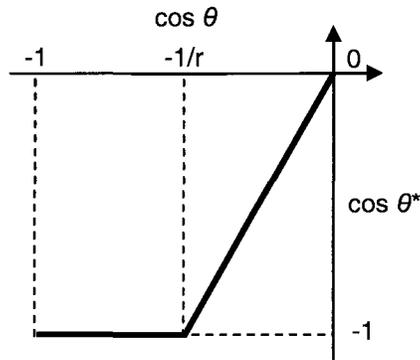


Figure 3.7 - Angle de contact apparent en fonction de l'angle de Young selon la relation de Wenzel.

Dans ce type de comportement, l'interface liquide/solide étant fortement augmentée, on observe une augmentation considérable de l'hystérésis, comme présenté Figure 3.5. La goutte est collée à la surface. L'état de Wenzel contraste avec l'idée même que l'on se fait de la superhydrophobicité, c'est-à-dire l'effet *rolling ball*.

2.2.2. Modèle de Cassie-Baxter (1944)

Cassie et Baxter n'ont pas étudié directement le cas des surfaces superhydrophobes. Ils se sont plus particulièrement intéressés à une surface plane mais chimiquement hétérogène (Figure 3.8).

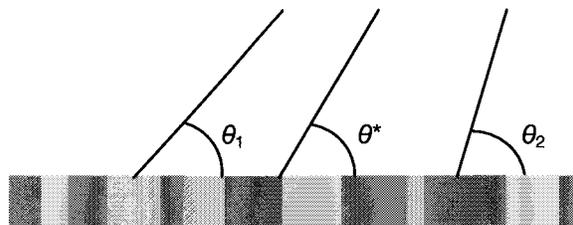


Figure 3.8 - Surface plane mais chimiquement hétérogène constituée de deux matériaux.

Si la surface est constituée de deux matériaux, chacun possède une énergie de surface propre, un angle de contact caractéristique et occupe une fraction définie de la surface. A présent, si nous considérons le matériau 1 comme hydrophobe et que nous remplaçons le matériau 2 par de l'air, une goutte en contact avec chacune des deux phases (le solide et l'air) forme des angles respectifs θ_E et 180° alors que les fractions de surfaces respectives sont Φ_S et $(1-\Phi_S)$.

Considérons un déplacement dx de la ligne de contact. Dans ce cas, le changement d'énergie dE correspondant peut s'écrire :

$$dE = \phi_s (\gamma_{SL} - \gamma_{SV}) dx + (1 - \phi_s) \gamma dx + \gamma dx \cos \theta^* \quad (3.3)$$

Le minimum de E mène, en utilisant la relation de Young, à la relation de Cassie-Baxter :

$$\cos \theta^* = -1 + \phi_s (\cos \theta_E + 1) \quad (3.4)$$

L'angle apparent θ^* est compris dans l'intervalle $[\theta_1, \theta_2]$. La Figure 3.9 décrit le comportement de l'angle apparent en fonction de l'angle de Young selon la relation de Cassie-Baxter (3.4).

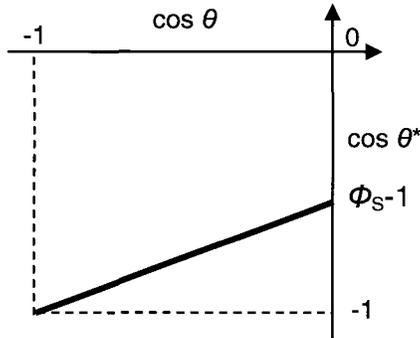


Figure 3.9 - Angle de contact apparent en fonction de l'angle de Young selon la relation de Cassie-Baxter.

2.2.3. Discussion sur ces modèles

Pour résumer les deux parties précédentes, une faible rugosité entraîne une configuration de Wenzel tandis qu'une forte rugosité, une configuration de Cassie-Baxter. De plus, l'angle de contact apparent est nettement plus faible en configuration de Wenzel qu'en configuration de Cassie-Baxter. De Gennes a montré que pour une surface sinusoïdale et un angle de Young de 120° , la rugosité à partir de laquelle apparaissent des poches d'air est de $1,75^8$. Malheureusement, tout n'est pas aussi simple. En effet, Bico *et al.* ont montré que le régime de Cassie-Baxter était thermodynamiquement stable sous une valeur seuil notée $\cos \theta_c^9$. Pour que la goutte se positionne préférentiellement en régime de Cassie-Baxter, il est nécessaire qu'elle 'dépense' moins d'énergie qu'en régime de Wenzel. La variation d'énergie calculée à partir de l'équation (3.3) doit donc être plus faible que celle calculée à partir de l'équation (3.1), d'où :

$$\cos \theta_C = \frac{\phi_s - 1}{r - \phi_s} \quad (3.5)$$

Ceci mène à la cohabitation des deux régimes, comme décrit sur la Figure 3.10 :

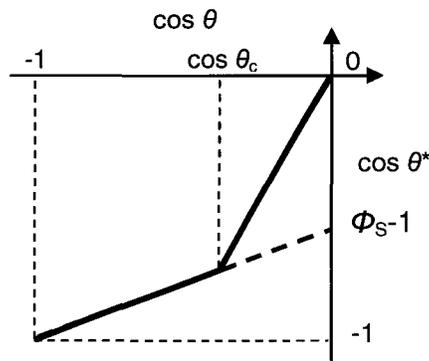


Figure 3.10 - Cohabitation des deux régimes superhydrophobes. A faible hydrophobicité ($\cos \theta_c < \cos \theta < 0$), l'angle de contact apparent est théoriquement donné par la relation de Wenzel tandis qu'à forte hydrophobicité ($\cos \theta < \cos \theta_c$), l'angle apparent suit la relation de Cassie-Baxter. Cependant, en pratique, une hydrophobicité moyenne entraîne le plus souvent une configuration de Cassie-Baxter métastable (pointillés gras)¹⁰.

Cependant, lorsqu'on dépose une goutte sur une surface rugueuse, on se retrouve le plus souvent en configuration de Cassie-Baxter, même lorsque $\theta < \theta_c$ (pour l'eau, $\theta < 120^\circ$)²⁵⁻¹¹⁻¹²⁻¹³⁻¹⁴. Cet état est métastable, c'est-à-dire qu'en appliquant une pression sur la goutte par exemple, il est possible de passer en configuration de Wenzel : stable et avec une hystérésis importante¹⁰. Cette configuration est paradoxale et extrêmement défavorable, en particulier en microfluidique. En effet, bien que disposant d'une surface superhydrophobe, l'hystérésis développée est de l'ordre de 100° contre une dizaine de degrés pour une surface plane classique, la configuration idéale étant l'effet *rolling ball* ou *fakir*, c'est-à-dire en régime de Cassie-Baxter.

2.2.4. Vers le biomimétisme...

Neinhuis et Barthlott ont étudié en détail les propriétés superhydrophobes de près de 200 plantes, le fameux *effet lotus*¹⁵⁻¹⁶ (Figure 3.11). Dans la majeure partie des cas, la surface comporte deux échelles de rugosité (l'une micrométrique, l'autre nanométrique).

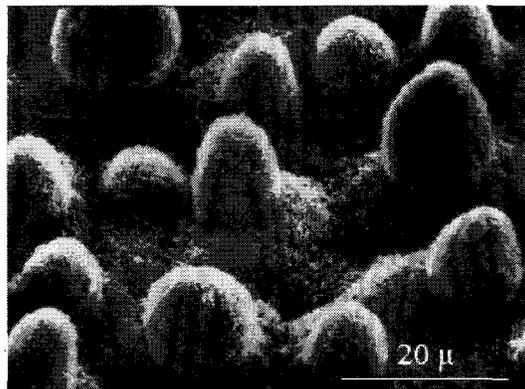


Figure 3.11 - Cliché MEB d'une feuille de lotus présentant une double échelle de rugosité¹⁶.

Cette idée de double rugosité intéresse de plus en plus les chercheurs travaillant sur les surfaces superhydrophobes. Les premières hypothèses ont été apportées par Bico¹⁷ et Herminghaus¹⁸ mais d'autres équipes s'intéressent également au sujet¹⁹⁻²⁰⁻²¹. Selon Bico, cette double rugosité éviterait de placer la goutte en configuration de Wenzel 'ventouse', les petites aspérités joueraient le rôle de réservoirs d'air, la goutte serait alors dans une configuration intermédiaire entre Wenzel et Cassie-Baxter. D'un point de vue mécanique, le double niveau de rugosité développé par la nature présenterait davantage de résistance aux endommagements localisés de la surface (rayures par exemple) qu'une surface à une seule échelle de rugosité²².

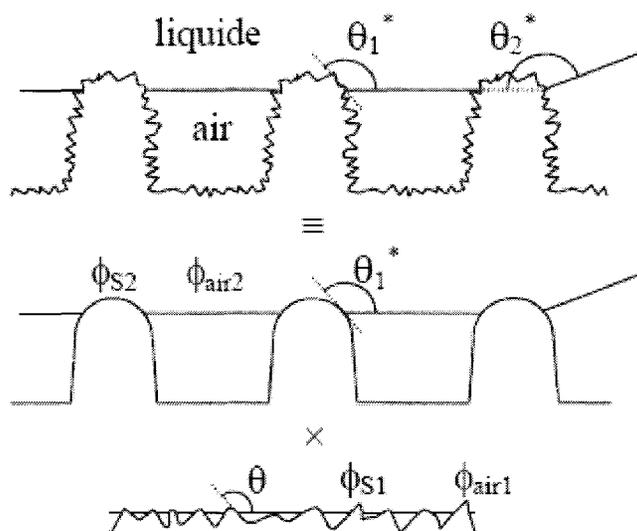


Figure 3.12 - Angle de contact apparent sur une surface présentant une double rugosité¹⁷.

Dans le cas d'une double rugosité, l'équation de Cassie- Baxter devient :

$$\cos \theta_2^* = \phi_{S1} \phi_{S2} \cos \theta - \phi_{S2} \phi_{A1} - \phi_{A2} \quad (3.6)$$

avec

$$\cos \theta_2^* = \phi_{S2} \cos \theta_1^* - \phi_{A2} \quad (3.7)$$

et

$$\cos \theta_1^* = \phi_{S1} \cos \theta - \phi_{A1} \quad (3.8)$$

où θ est l'angle de Young, θ_1^* , Φ_{S1} et Φ_{A1} respectivement l'angle, la fraction de surface solide et la fraction de surface de l'air de la rugosité nanométrique et θ_2^* , Φ_{S2} et Φ_{A2} respectivement l'angle, la fraction de surface solide et la fraction de surface de l'air de la rugosité micrométrique (Figure 3.12).

On peut également constater à partir de l'expression (3.9) que la double rugosité amplifie le caractère superhydrophobe de la surface¹⁷. Si, par exemple, les deux rugosités sont homothétiques, elles possèdent la même fraction de surface Φ_S et l'équation de Cassie-Baxter devient :

$$\cos \theta^* = -1 + \phi_s^2(1 + \cos \theta) \quad (3.9)$$

Comme $\Phi_s < 1$, $\cos \theta^*$ est plus petit que dans le cas d'une simple rugosité, l'angle augmente.

Mais la double rugosité n'est pas le seul type de surface naturelle superhydrophobe. Il existe également des cas, comme pour la *Drosera*, où la surface consiste en l'enchevêtrement de fibrilles (Figure 3.13).

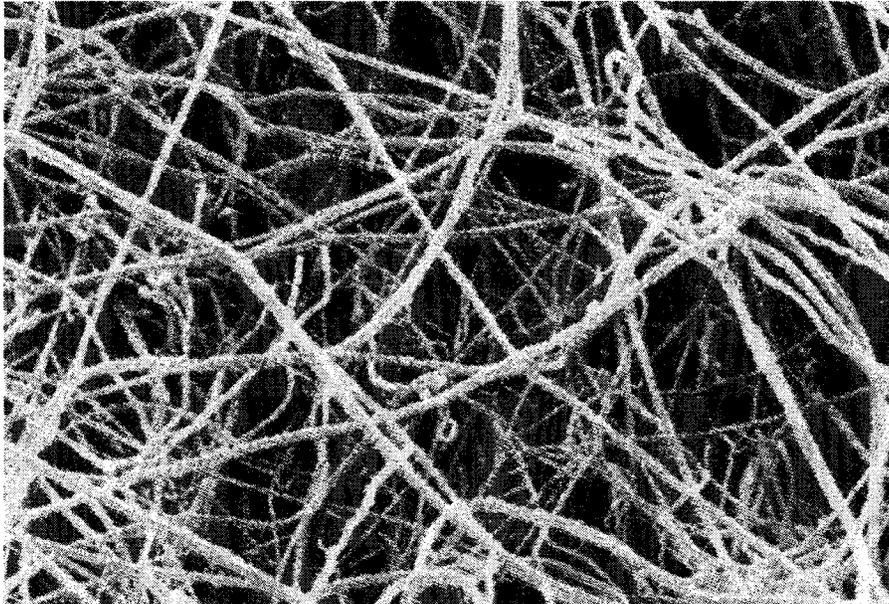


Figure 3.13 - Cliché MEB des fibrilles d'une feuille de *Drosera* superhydrophobe (Cliché Barthlott)⁸.

Nous verrons plus loin que la structure de la feuille de *Drosera* n'est pas sans rappeler les surfaces étudiées dans le chapitre 4.

2.2.5. Cas des surfaces hydrophiles

En général, une surface hydrophile et rugueuse peut être considérée comme poreuse ; le liquide remplit la nanostructure. C'est le cas de nos surfaces de nanofils. Si la surface est complètement hydrophile, la goutte imprégnera complètement la structure.

Récemment, Cheng et Rodak ont démontré que la feuille de lotus, symbole de la superhydrophobicité, était recouverte d'un matériau plutôt hydrophile ($\sim 74^\circ$)²³. Cette découverte a inspiré une équipe américaine qui a développé une architecture sur silicium hydrogéné présentant un angle de Young de 74° . Ils ont ainsi défini un nouvel état métastable de Cassie-Baxter, présent pour des angles de Young inférieurs à 90° (Figure 3.14)²⁴.

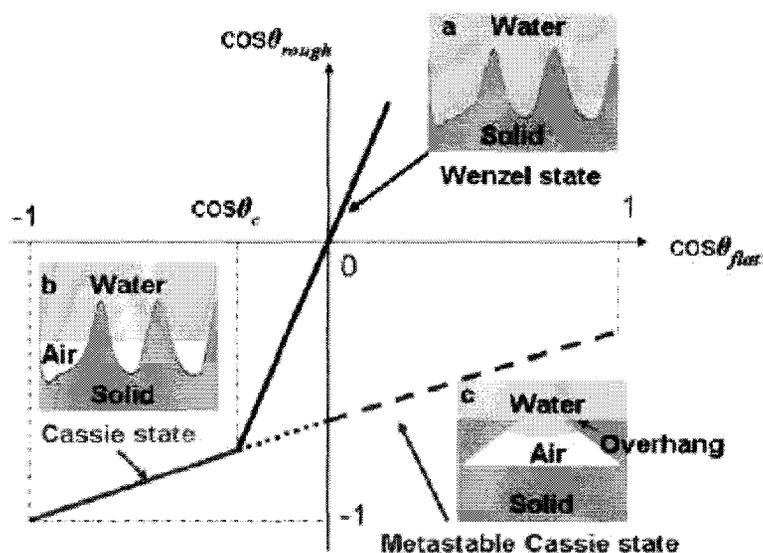


Figure 3.14 - Description d'un état de Cassie-Baxter métastable pour des surfaces hydrophiles²⁴.

Bico avait déjà montré dans sa thèse¹⁷, à partir des travaux de Herminghaus¹⁸, la possibilité de donner une configuration superhydrophobe à une surface hydrophile comme le montre la Figure 3.15. Mais comme dans le cas précédent, il s'agissait d'un état instable.

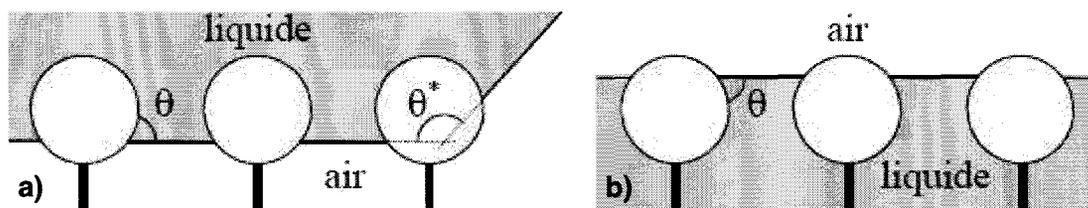


Figure 3.15 - Représentation schématique d'une surface hydrophile avec : a) un comportement superhydrophobe instable et b) le remplissage de la microstructure¹⁷.

2.3. Réalisation de surfaces superhydrophobes

D'un point de vue technologique, il existe actuellement plusieurs possibilités pour mimer les propriétés de mouillage de ces surfaces naturelles. Les principales techniques ou surfaces employées sont la lithographie électronique, les polymères rugueux ou encore la croissance de nanofils²⁵⁻²⁶. En terme de microfabrication, il est possible de réaliser des micro ou nanotexturations en résines optiques²⁷, électroniques, par gravure du silicium ou à base de PDMS²⁸⁻²⁹. Il s'agit la plupart du temps de piliers réalisés avec des caractéristiques géométriques bien définies.

Onda *et al.* ont réalisé des structures fractales par dépôt de AKD (*AlkylKetene Dimer*) qui leur ont permis d'obtenir des angles de contact de l'ordre de 174° (Figure 3.16)³⁰⁻³¹. Mais il est également possible d'utiliser toutes sortes de surfaces rugueuses comme du Téflon³², des nanofils de silicium³³, du silicium noir³⁴, des nanofibres de carbone³⁵...

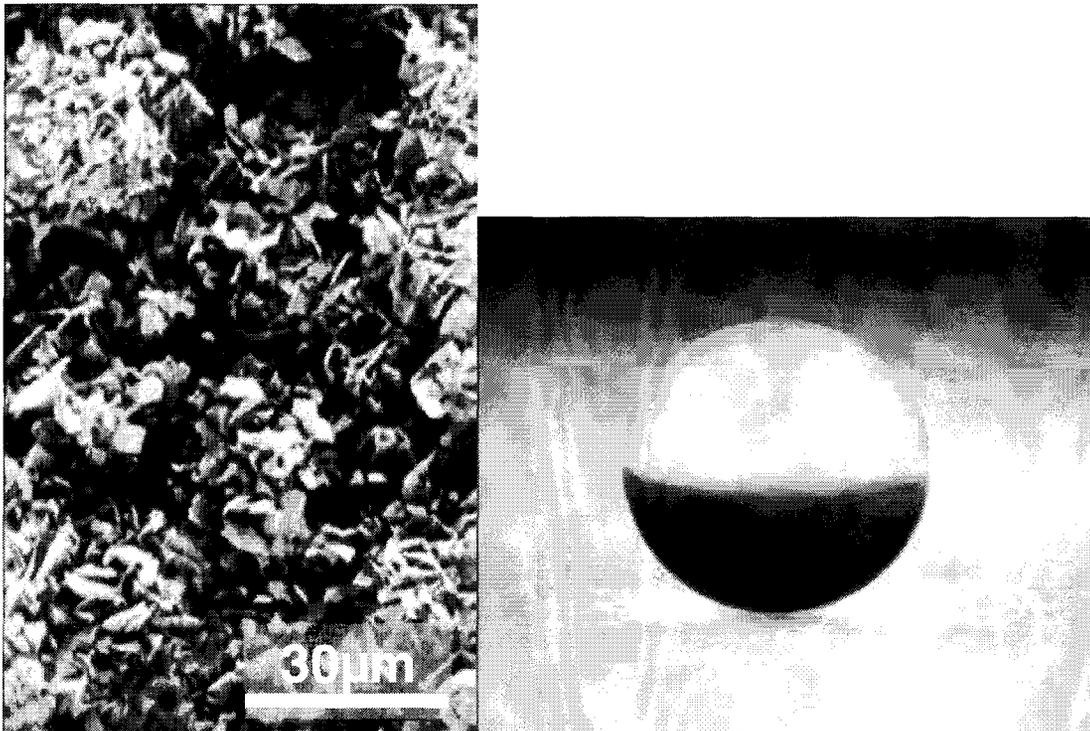


Figure 3.16 - Surfaces fractales superhydrophobes réalisées par Shibuichi *et al.* :
 a) cliché MEB de la surface, b) goutte d'eau formant un angle de 174° ³¹.

Pour l'intégration au sein du microsystème EWOD, nous avons travaillé sur deux surfaces superhydrophobes à base de nanofils de silicium obtenus par gravure chimique ou par croissance.

3. Réalisation du microsystème superhydrophobe

3.1. Principe

La base utilisée dans ce microsystème EWOD est identique à celle développée au chapitre 2 : substrat de verre, électrode de nickel, couche de SU-8 comme diélectrique et Cytop. La contre-électrode est un substrat de silicium recouvert de nanofils de silicium réalisés soit par attaque chimique HF/AgNO₃ soit par croissance VLS³⁶. Bien que ces deux types de surfaces soient validées en terme d'intégration dans un microsystème EWOD, et pour des raisons de clarté du manuscrit, ne sera présentée dans ce chapitre que la réalisation de surfaces superhydrophobes obtenues par attaque chimique. Les surfaces obtenues par croissance VLS sont, quant à elles, présentées au chapitre 4 mais dans un contexte différent. Une fois la surface nanotexturée, celle-ci est rendue superhydrophobe par fonctionnalisation des nanofils à l'aide d'une monocouche d'OTS et intégrée au sein du microsystème EWOD (Figure 3.17).

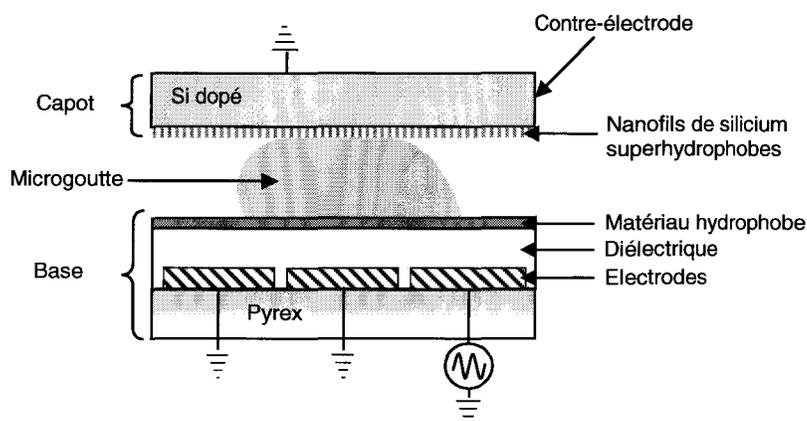


Figure 3.17 - Schéma de principe de l'EWOD avec contre-électrode superhydrophobe.

3.2. Réalisation du capot superhydrophobe

La gravure chimique du silicium (HF/AgNO_3 , HF/FeNO_3) est apparue récemment dans la littérature³⁷. Cette méthode permet d'obtenir rapidement des nanofils bien orientés, cristallins et dont le dopage est identique à celui du substrat de départ.

3.2.1. Principe de la gravure HF/AgNO_3

Une première explication du phénomène de gravure par HF/AgNO_3 est apportée par Peng *et al.*³⁸. Le principe est basé sur la technique de dépôt d'argent sans électrode (*Electroless Silver Deposition* ou plus généralement appelée EMD pour *Electroless Metal Deposition*). Deux phénomènes se déroulent simultanément : une réduction des ions argent Ag^+ (réaction cathodique) et une oxydation du silicium (réaction anodique). Un schéma de principe est présenté Figure 3.18.

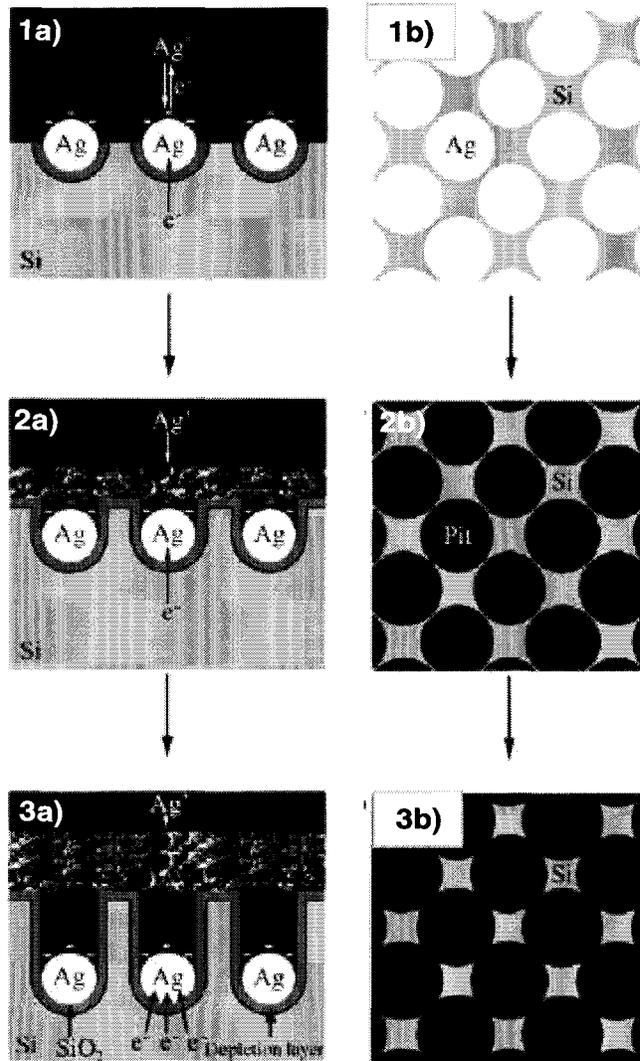


Figure 3.18 - Schéma de principe de la réalisation de nanofils de silicium par gravure chimique HF/AgNO₃ (schéma de Peng *et al.*³⁷).

Concrètement, le cation argent présent en solution capte un électron de la bande de valence du silicium. Cette réduction entraîne un dépôt de nanoparticules d'argent en surface (Figure 3.18.1). Celles-ci étant plus électronégatives que le silicium, les ions Ag⁺ vont préférentiellement être attirés par les particules d'argent déposées à la surface plutôt que par le silicium. Les électrons de la bande de valence du silicium vont donc être transférés par l'intermédiaire de la particule d'argent (transfert rendu possible grâce à la faible barrière d'énergie à l'interface Ag/Si). Il y a donc dépôt de métal sur métal, ce qui conduit à l'apparition de particules de taille plus importante.

De plus, cette électronégativité plus forte joue le rôle de catalyseur pour la réaction cathodique (réduction des ions argent). Ceci entraîne un excès de transfert d'électrons sous la particule d'argent et conduit à une oxydation excessive du silicium. Le SiO₂ est immédiatement gravé par le HF présent en solution et la particule d'argent descend dans l'ouverture ainsi formée. Cette technique amène à la création d'ouvertures dans le silicium (Figure 3.18.2). Cependant, après un certain temps, l'oxydation latérale gravée par le HF

amène les ouvertures à s'élargir davantage conduisant à la formation de nanofils (Figure 3.18.3). Les plus grosses particules d'argent ne pourront pas rentrer dans les trous et resteront en surface pour former des dendrites.

L'inconvénient d'une telle technique est le manque de contrôle au niveau de la densité de nanofils obtenus.

3.2.2. Réalisation des nanofils

Les nanofils de l'EMN sont réalisés dans le cadre de la thèse de Gaëlle Piret, au sein de l'équipe de R. Boukherroub, sur des substrats de silicium de type *p* et de très faible résistivité ($0,009-0,01\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). L'échantillon est préalablement nettoyé par attaque piranha ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ 1:1 v/v) pendant 10 minutes puis rincé abondamment à l'EDI avant séchage à l'azote. Le substrat est désoxydé juste avant la gravure pendant 1 minute par attaque HF 10%. Après la désoxydation, il est directement introduit dans un mélange HF5%/AgNO₃10% (1:1 v/v) pendant 30 minutes à 50°C, suivi d'un rinçage EDI et d'un séchage à l'azote.

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les nanofils sont recouverts de dendrites d'argent visibles sur la Figure 3.19.a. Pour retirer l'argent déposé en surface, l'échantillon est immergé pendant 8h dans un mélange H₂O:HCl:HNO₃ (1:1:1 v/v/v), suivi à nouveau d'un rinçage EDI et d'un séchage à l'azote. Les nanofils obtenus ont une longueur comprise entre 500nm et 3µm (Figure 3.19.b) pour un diamètre compris entre 10nm et 100nm. Cette longueur diffère selon les substrats mais est homogène sur un même substrat.

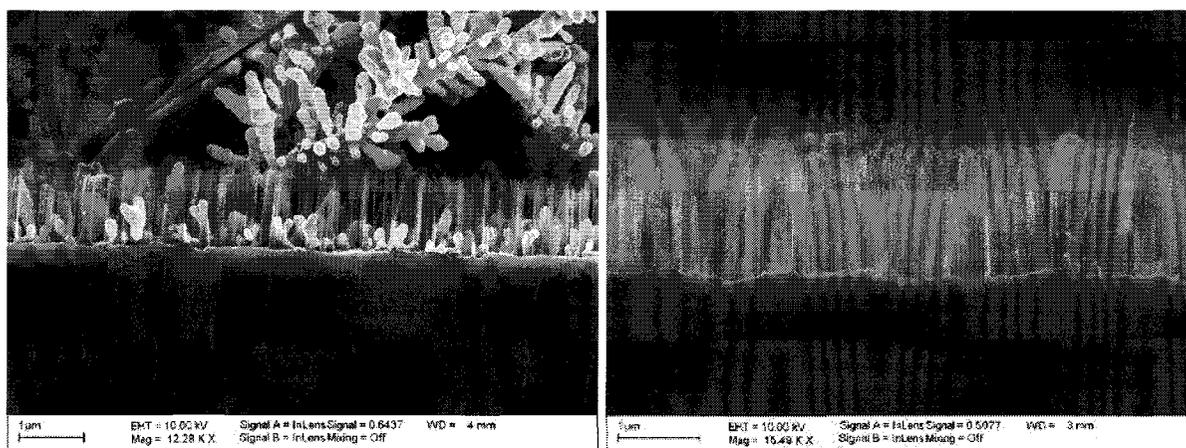


Figure 3.19 - Clichés MEB de nanofils de silicium réalisés par gravure chimique HF/AgNO₃ pendant 30min : a) avant dissolution de l'argent, b) après dissolution de l'argent.

3.2.3. Superhydrophobicité

De la même manière que sur la contre-électrode plane (chapitre 2), le matériau hydrophobe utilisé est la monocouche d'OTS. La forte rugosité induite par les nanofils rend la surface superhydrophobe. En plus de l'intérêt en spectrométrie de masse, la monocouche, de dimension moléculaire, épouse parfaitement la conformation des nanofils et permet de

conserver la rugosité de surface. Cela n'est pas possible lors d'un dépôt par enduction d'un fluoropolymère de type Téflon ou Cytop car tous les nanofils ne sont pas recouverts et restent donc hydrophiles, augmentant considérablement l'hystérésis.

3.3. Caractérisation des surfaces superhydrophobes

3.3.1. Angle de contact

L'angle de contact statique des surfaces réalisées au paragraphe 3.2 est de $164^\circ \pm 3^\circ$. L'aiguille présente sur les figures est nécessaire pour retenir la goutte (Figure 3.20.a). En effet, la goutte est en configuration de Cassie-Baxter. La moindre inclinaison ou la moindre vibration fait rouler la goutte.

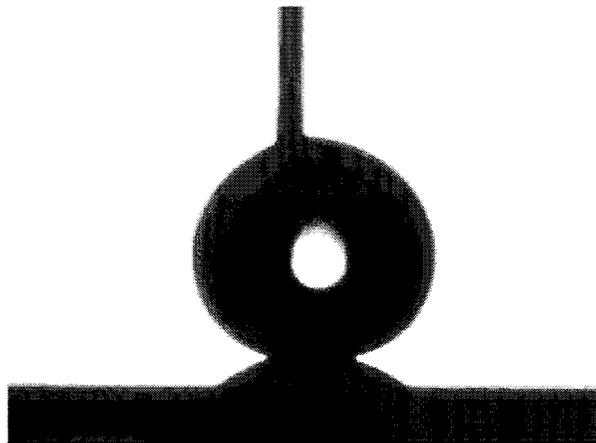


Figure 3.20 - Goutte d'EDI (5 μ L) déposée sur un substrat superhydrophobe de nanofils de silicium fonctionnalisés OTS.

3.3.2. Hystérésis

La Figure 3.21 présente les angles d'avancée et de reculée sur la surface superhydrophobe. On constate bien qu'il n'y a aucune modification de l'angle au cours du temps et que l'angle d'avancée est équivalent à l'angle de reculée ($167^\circ \pm 1^\circ$). Il n'y a donc pas d'hystérésis (mesurable), nous sommes en configuration de Cassie-Baxter avec un effet *rolling ball*.

A titre d'information, la chute de l'angle apparent en fin de mesure n'est pas liée à l'hystérésis mais à la mesure en elle-même qui manque de précision car la base de la goutte est trop petite.

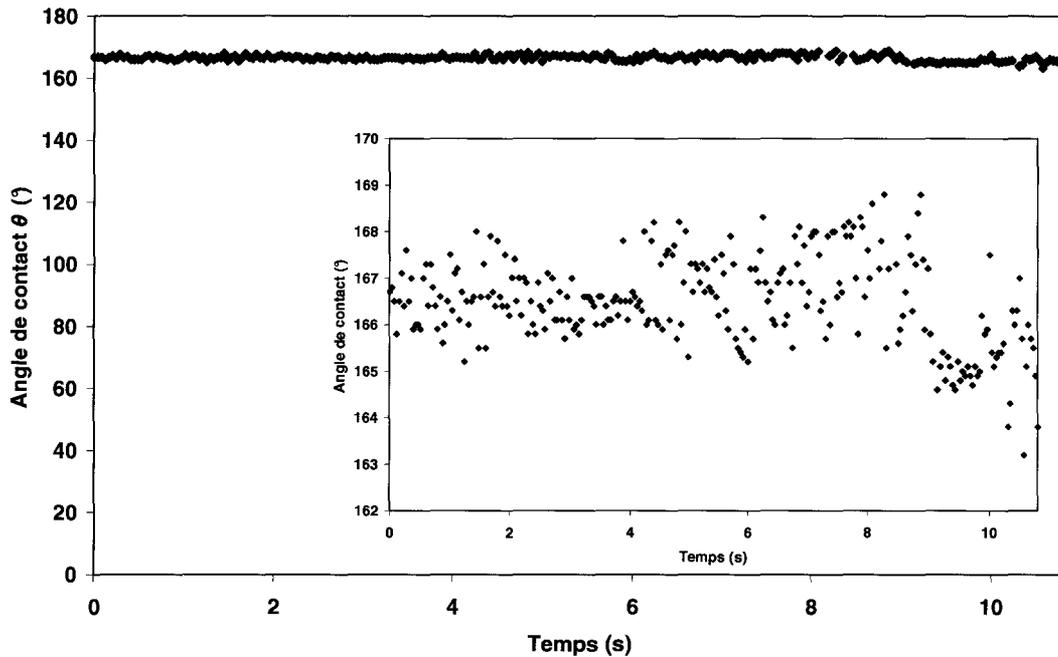


Figure 3.21 - Mesure de l'hystérésis sur des nanofils de silicium réalisés par voie chimique et rendus hydrophobes par traitement OTS (encart : vue zoomée entre 162° et 170°).

3.3.3. Fraction de surface des nanofils

Etant donné que nous sommes en configuration de Cassie-Baxter, il nous est possible d'utiliser la relation (3.4) pour déterminer la fraction de surfaces des nanofils.

Pour rappel, l'équation de Cassie-Baxter s'écrit :

$$\cos \theta^* = -1 + \phi_s (\cos \theta_E + 1) \quad (3.10)$$

ainsi, on peut déterminer la fraction de surface ϕ_s :

$$\phi_s = \frac{\cos \theta^* + 1}{\cos \theta_E + 1} \quad (3.11)$$

En prenant $\theta_E = 110^\circ$ (angle de Young de l'OTS) et $\theta^* = 164^\circ$, nous trouvons une fraction de surface de 6%.

4. Caractérisation fluidique

4.1. Déplacement de gouttes

Pour la caractérisation du déplacement, les deux substrats ont été espacés de $300\mu\text{m}$ (Figure 3.17). Il a été possible de déplacer une goutte de $0,8\mu\text{L}$ à une tension minimale de $62,5V_{\text{max}}$ (1kHz).

L'équation (2.14) adaptée à notre situation donne :

$$V_{\min} = \sqrt{\frac{2\gamma e}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} (\cos \theta_{R_{Cytop}} - \cos \theta_{A_{Cytop}})} \quad (3.12)$$

En posant $e=2\mu\text{m}$, $\varepsilon_0=8,85418782 \cdot 10^{-12}\text{F}\cdot\text{m}^{-1}$, $\varepsilon_r=3,2$, $\gamma=72\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, on trouve une tension $V_{\min_{th}}$ égale à 42,7V. La différence avec la valeur expérimentale peut être expliquée par une hétérogénéité de la surface. En effet, une goutte coincée entre deux plans voit sa surface en contact avec le solide augmenter considérablement (d'un facteur 10) par rapport à une configuration un plan rencontrée lors des caractérisations au goniomètre. Ainsi, même si les mesures précédentes (technique de l'aiguille) montre une hystérésis nulle, la force de frottement rencontrée par une goutte placée entre deux plans n'est pas nulle. Il est donc nécessaire d'appliquer une force supplémentaire pour déplacer la goutte. L'IRI travaille actuellement sur l'homogénéisation de ces surfaces au sein de la thèse de Gaëlle Piret.

La vitesse de déplacement standard est de 10 électrodes. s^{-1} soit 17mm. s^{-1} dans le cas de ce microsystème. Le résultat de ce déplacement est présenté Figure 3.22. Le contraste des photos est de qualité moyenne car les nanofils sont très peu réfléchissants. Comme pour le microsystème MALDI, la vitesse de déplacement maximale observée est de 71 électrodes. s^{-1} soit 121mm. s^{-1} .

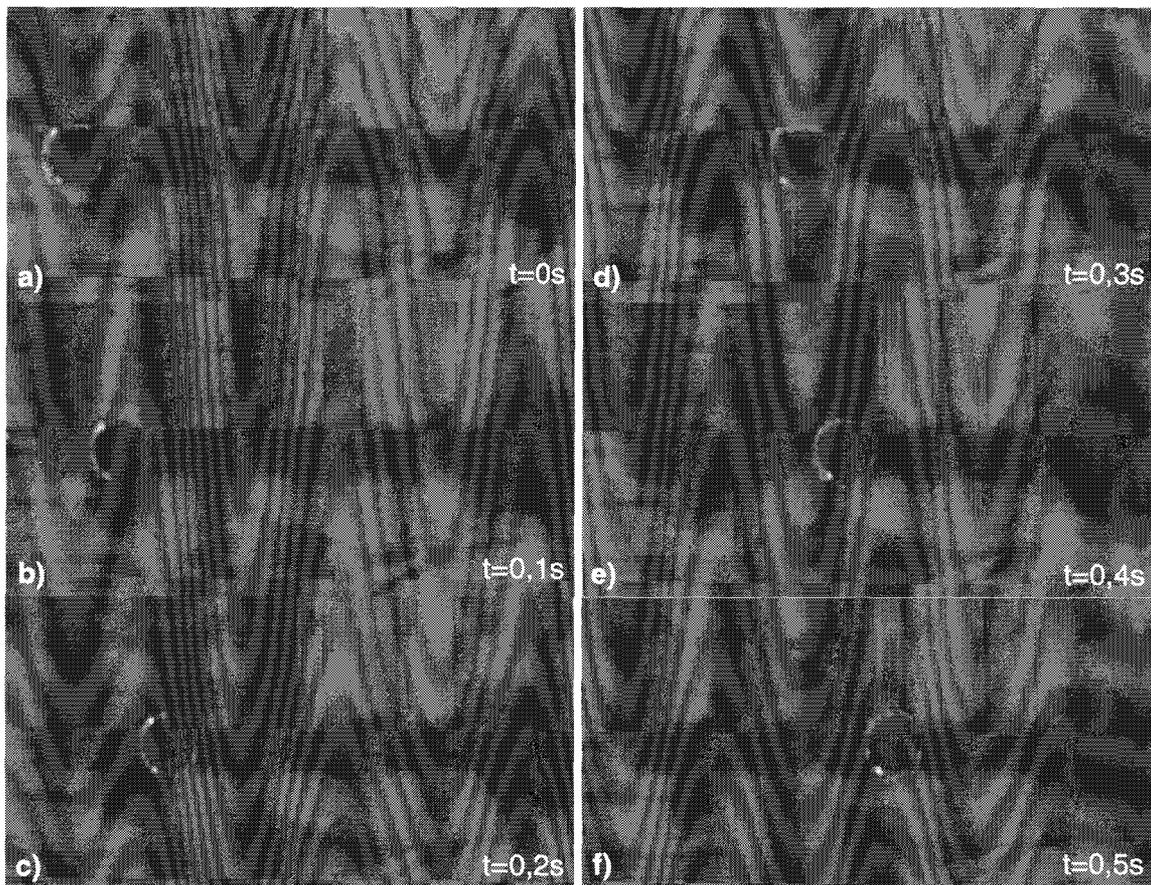


Figure 3.22 - Déplacement d'une goutte de 0,8 μL avec un capot superhydrophobe (OTS) à une tension de 62,5V $_{\max}$ (1kHz) à une vitesse de 17mm. s^{-1} .

4.2. Création de gouttes

La création de goutte avec un gap de $300\mu\text{m}$ n'a été possible qu'à partir d'une tension de $87,5V_{\text{max}}$. La Figure 3.23 détaille quatre étapes dans la création d'une goutte de $0,8\mu\text{L}$ à partir d'un réservoir d'environ $9,6\mu\text{L}$. La goutte est confinée au niveau des électrodes 2 et 3 du réservoir (Figure 3.23.a). La tension est appliquée sur les électrodes 3, 4, 5 et 6, il y a alors formation d'un doigt de liquide le long des trois électrodes de $1,7\text{mm}$ (Figure 3.23.b). La tension sur les électrodes 4 et 5 est coupée et de nouveau appliquée sur l'électrode 2, pour provoquer le pincement de la goutte (Figure 3.23.c) avant la scission (Figure 3.23.d).

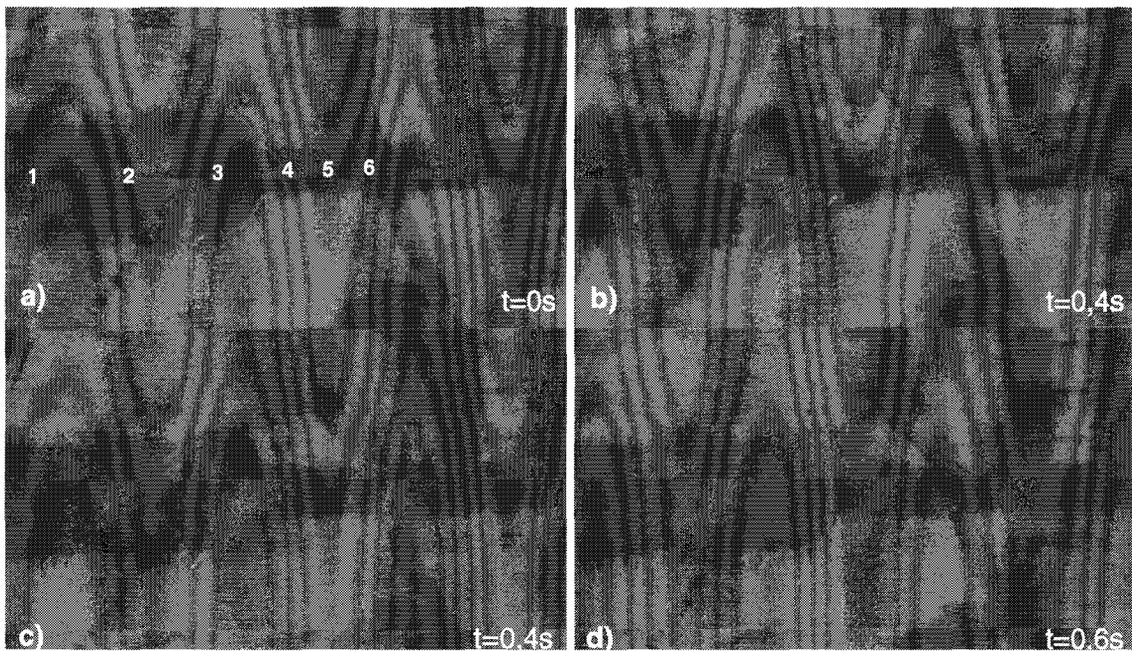


Figure 3.23 - Etapes permettant la création de gouttes suivant le protocole défini précédemment avec un gap de $300\mu\text{m}$: a) la tension n'est appliquée que sur les électrodes 2 et 3 du réservoir, b) la tension est appliquée sur les électrodes 3, 4, 5 et 6, c) la tension est appliquée de nouveau sur les électrodes 2, 3 et 6 et coupée sur les électrodes 4 et 5 et d) la goutte est créée (pour des raisons de qualité d'image, les gouttes ont été colorisées par ordinateur).

Nous avons constaté que, lors de la création de gouttes, la calibration du volume dépendait de la vitesse. En effet, pour une vitesse supérieure à $8,5\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ($5 \text{ électrodes}\cdot\text{s}^{-1}$), il n'est pas possible de créer des gouttes. Le doigt n'a pas le temps d'atteindre l'électrode 6. Lors de la coupure de tension sur les électrodes 4 et 5, le liquide revient à sa position initiale. Par contre, pour des vitesses inférieures à $5 \text{ électrodes}\cdot\text{s}^{-1}$, la goutte n'est pas calibrée. La goutte tente de se mettre en position d'équilibre, un surplus de liquide mouille les électrodes 4, 5 et 6. Le volume contenu sur l'électrode 2 est plus important que celui contenu sur les électrodes 4, 5 et 6. Ainsi, lors de la scission, le volume créé est plus grand que l'électrode. Deux photos permettent de se rendre compte de cette différence de volume à des vitesses de $8,5\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ($5 \text{ électrodes}\cdot\text{s}^{-1}$) et de $3,4\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ($2 \text{ électrodes}\cdot\text{s}^{-1}$).

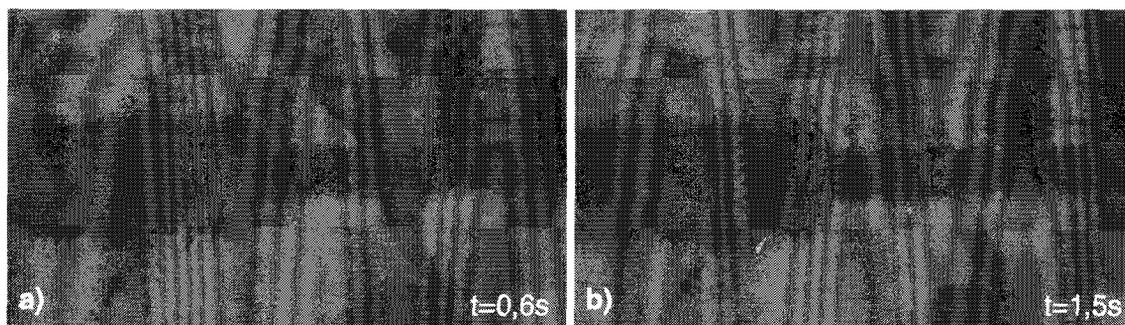


Figure 3.24 - Création de gouttes de volumes différents à des vitesses différentes : a) goutte de $0,8\mu\text{L}$ à une vitesse de $8,5\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, b) goutte de $1,3\mu\text{L}$ à une vitesse de $3,4\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$.

5. Déplacement d'une goutte contenant des peptides

En analyse DIOS, il n'est pas nécessaire d'utiliser une matrice, il suffit donc de déplacer la goutte de peptides jusqu'à la zone d'analyse.

Nous avons utilisé le même mélange peptidique que pour l'analyse MALDI (chapitre 2). Pour rappel, les peptides utilisés sont l'angiotensine II ($C=10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $m=1046,54\text{Da}$), la bradykinine ($C=10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $m=1060,56\text{Da}$), la substance P ($C=10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $m=1347,73\text{Da}$), la ACTH 18-39 ($C=10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $m=2465,19\text{Da}$). Le mélange est effectué dans de l'eau contenant 0,1% de TFA (acide trifluoroacétique).

Nous avons pu réaliser un déplacement du mélange de peptides. Environ vingt allers/retours sur cinq électrodes sont réalisables avant que la goutte ne cesse d'avancer. Les résultats en terme de déplacement de liquides biologiques sur surfaces superhydrophobes sont donc équivalents aux résultats sur surfaces hydrophobes et permettent d'envisager des analyses par spectrométrie de masse DIOS.

6. Analyse DIOS

6.1. Principe des ouvertures

Le principe des ouvertures (rappelé Figure 3.25) est identique à celui présenté au chapitre 2 sur un capot classique. Les ouvertures dans l'OTS sont réalisées par plasma O_2 .

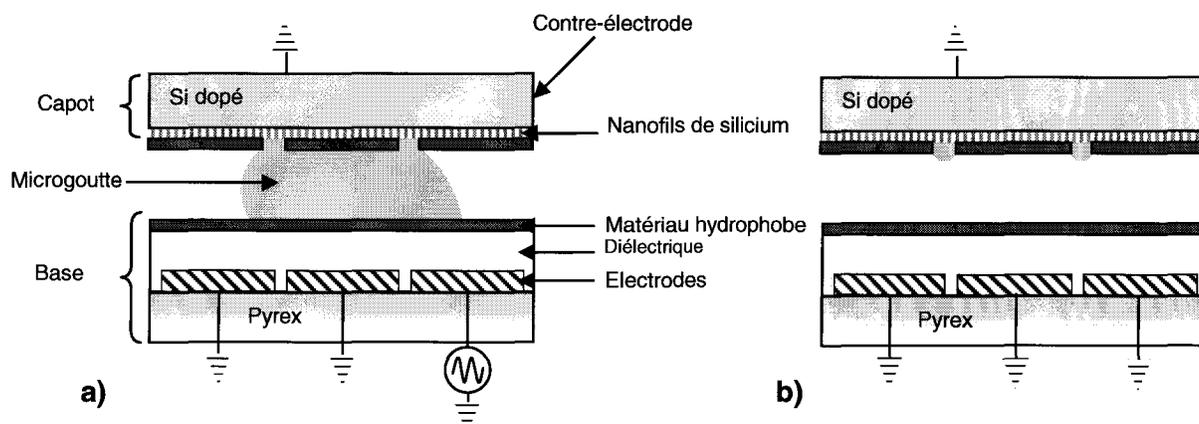


Figure 3.25 - Principe des ouvertures dans la couche hydrophobe pour analyse par spectrométrie de masse DIOS : a) passage de la goutte sur les ouvertures, b) après passage de la goutte, les zones hydrophiles contiennent une goutte d'analyte.

6.2. Validation des ouvertures



Nous déplaçons une goutte de liquide contenant un peptide fluorescent la lysine-arginine-rhodamine (10^{-6}mol.L^{-1}) dont le marqueur fluorescent est la rhodamine.

Comme au chapitre 2, il n'a été possible de déplacer la goutte que sur les ouvertures de $100\mu\text{m}$. Pour des dimensions supérieures, la goutte reste accrochée au sein du plot hydrophile.

La surface est ensuite scannée (à l'IBL, Institut de Biologie de Lille) sous microscope à fluorescence. Le résultat est présenté Figure 3.26.

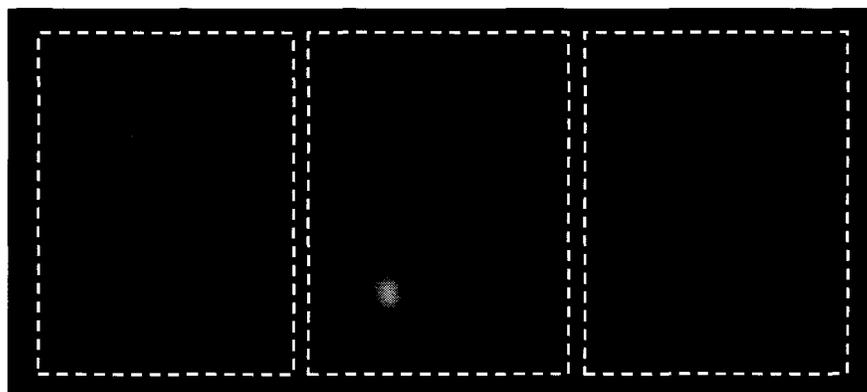


Figure 3.26 - Image obtenue par fluorescence sur des ouvertures de $100\mu\text{m}$ après passage d'une goutte déplacée par électromouillage.

Comme pour la cible MALDI, ce type d'ouvertures permet de piéger des gouttes de peptides. Nous utilisons de telles ouvertures pour l'analyse DIOS du mélange présenté au paragraphe précédent.

Contrairement à l'analyse par fluorescence sur surface MALDI, on constate ici une adsorption non spécifique sur l'OTS. On distingue par ailleurs clairement trois des électrodes. L'électrode centrale est plus lumineuse car la goutte, en faisant des allers/retours sur trois électrodes, est passée plus souvent sur celle-ci. A la vue de ce résultat, on peut se

demander pourquoi la surface plane, présentant une plus grande surface de contact avec la goutte, ne présente pas d'adsorption non spécifique sur l'OTS. Cela s'explique par un phénomène d'interférence de la fluorescence très connu sur silicium³⁹. En effet, le problème est purement optique et lié à la différence de marche entre le rayon directement transmis et celui transmis puis réfléchi (Figure 3.27). Cela amène à des interférences constructives ou destructives. En jouant sur l'épaisseur de SiO_2 , il est possible d'annuler ces interférences. Dans notre cas, le SiO_2 n'est pas souhaité pour éviter l'ajout d'un diélectrique supplémentaire.

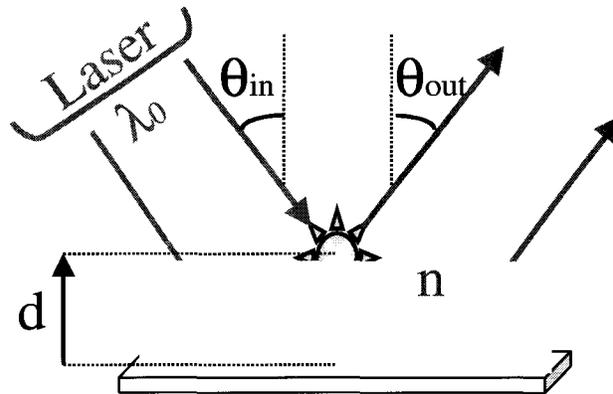


Figure 3.27 - Effet de la distance entre la molécule fluorescente et la surface réfléchissante intervenant dans les phénomènes d'interférences sur silicium.

6.3. Analyse DIOS

Comme dans le précédent chapitre (analyse MALDI), nous avons validé le microsystème par l'analyse d'un seul peptide, la substance P ($10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), mélangée à de la HCCA, sans déplacement. Le résultat est présenté Figure 3.28. Contrairement à l'analyse MALDI, on constate l'absence de pics parasites au niveau des basses masses. L'inconvénient est une perte d'intensité du signal.

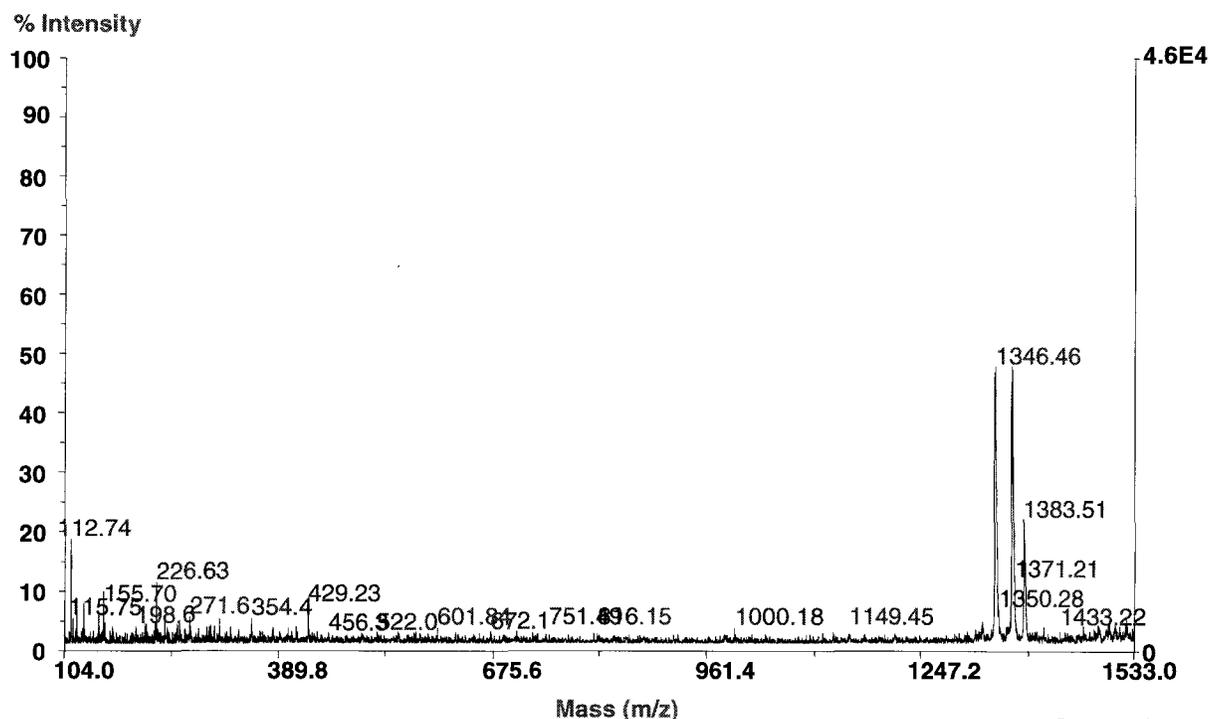


Figure 3.28 - Exemple de spectre de masse DIOS : analyse de la Substance P (10^{-5} mol.L $^{-1}$). On remarque l'absence de bruit lié à la matrice au niveau des basses masses. De nouveaux pics apparaissent.

Nous avons par la suite analysé le mélange de peptides déplacé précédemment. Le résultat d'une telle analyse est présenté sur la Figure 3.29.

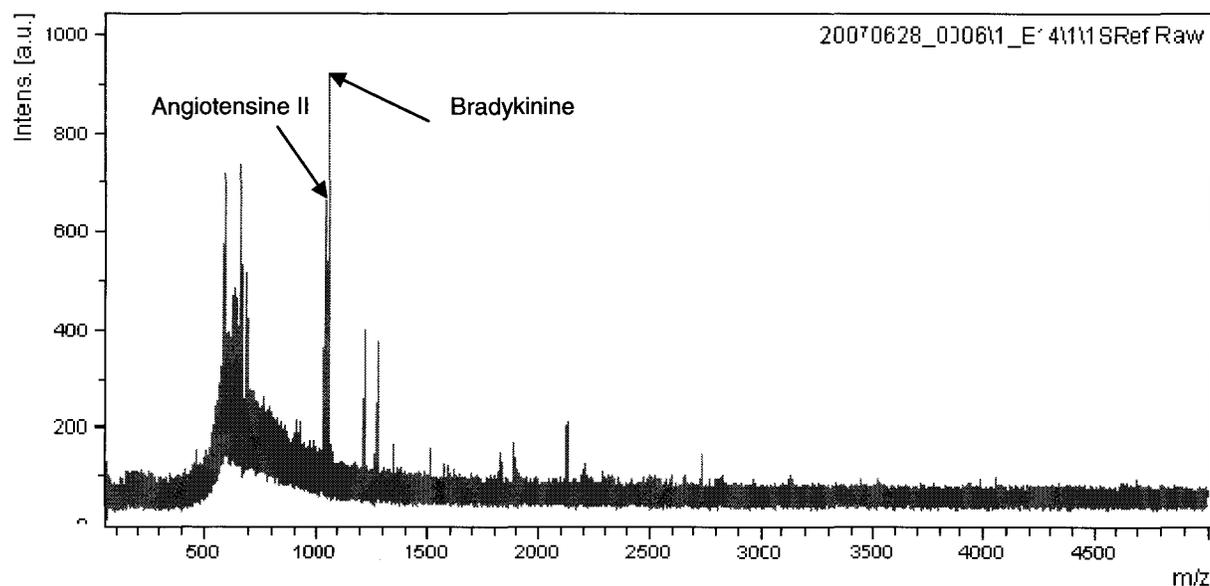


Figure 3.29 - Analyse DIOS du mélange de peptides du paragraphe 5 mélangé au sein d'ouvertures de $100\mu\text{m}$.

Le résultat n'est pas conforme à celui attendu. Deux points sont à mettre en valeur :

- la sensibilité de l'analyse est très faible, ce qui explique qu'il n'est possible de détecter que deux des peptides présents en solution (Angiotensine II et Bradykinine). Ces deux peptides présentaient déjà les pics les plus intenses lors de l'analyse MALDI (Figure 2.31).

- l'analyse présente un bruit de fond non négligeable, notamment en raison de la forte intensité du laser nécessaire à la détection des peptides.

Les analyses DIOS réalisées pour le moment ont toujours montré une intensité de signal plus faible que lors d'une analyse MALDI. De plus, ce résultat est le premier effectué sur des ouvertures de 100 μ m, ce qui limite le nombre d'espèces à détecter et donc l'intensité du signal. Ceci explique à la fois la perte de signal pour les deux peptides de plus fortes masses ainsi que la nécessité d'augmenter l'intensité du laser (généralisant un bruit de fond).

Le contrôle de la densité et de la taille des nanofils permettra d'optimiser les surfaces DIOS afin de gagner en sensibilité et faciliter le transfert d'énergie. Ce travail se poursuit dans le cadre de la thèse de Gaëlle Piret.

7. Comparaison des microsystèmes MALDI et DIOS

Les deux microsystèmes dédiés à des applications MALDI et DIOS ont permis d'effectuer les opérations microfluidiques standard ainsi que des déplacements de liquides biologiques. Le tableau ci-dessous reprend les différents résultats obtenus au cours du chapitre 2 et de ce chapitre pour un gap de 300 μ m.

	Microsystème classique	Microsystème superhydrophobe
V_{\min} @1kHz	70V _{max}	62,5V _{max}
Accord avec la théorie	Oui	Non
Vitesse maximale	71 électrodes.s ⁻¹	71 électrodes.s ⁻¹
Longueur du doigt en électrodes pour la création de gouttes	4	3
Déplacement de peptides	Oui	Oui
Déplacement de matrice HCCA	Non	Non nécessaire
Déplacement de matrice DHB	Oui	Non nécessaire

Tableau 3.1 - Comparaison des microsystèmes MALDI et DIOS présentés aux chapitres 2 et 3.

Bien qu'une légère diminution de tension soit observable pour des déplacements EWOD entre un système classique et superhydrophobe (10% de tension en moins) et que la création de gouttes puisse se faire sur un plus petit nombre d'électrodes (aspects microfluidiques), l'avantage notable et original est dans l'application elle-même qui consiste en l'insertion de surfaces DIOS permettant une analyse par spectrométrie de masse sans matrice au sein du microsystème.

8. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré la possibilité d'utiliser des surfaces superhydrophobes comme contre-électrode au sein d'un microsystème EWOD. Celles-ci permettent d'effectuer les opérations microfluidiques classiques en microfluidique discrète comme la scission ou la création de gouttes. L'avantage est la diminution de tension nécessaire au déplacement, liée directement à l'absence d'hystérésis (non mesurable) au niveau de la contre-électrode. A notre connaissance, d'un point de vue microfluidique, ce dispositif est original.

Ces surfaces permettent, de plus, d'effectuer des analyses par spectrométrie de masse DIOS qui, contrairement à l'analyse MALDI présentée au chapitre 2, ne nécessite pas l'utilisation de matrice organique et permet d'étudier les peptides présents dans les basses masses. Bien que ce système nous permette de nous situer à l'état de l'art, les surfaces sont encore à optimiser dans le cas d'utilisation de mélanges de peptides en particulier afin de limiter le bruit de fond et d'augmenter l'intensité du signal.

9. Bibliographie

- ¹ <http://www.bath.ac.uk/ceos/insects3.html>
- ² R.N. Wenzel, "*Resistance of solid surfaces to wetting by water*", *Ind. Eng. Chem.* **28** (1936) 988-994.
- ³ R.N. Wenzel, "*Surface roughness and contact angle*", *J. Phys. Colloid Chem.* **53** (1949) 1466-1467.
- ⁴ A.B.D. Cassie and S. Baxter, "*Wettability of porous surfaces*", *Trans. Faraday Soc.* **40** (1944) 546-551.
- ⁵ M. Callies and D. Quéré, "*On water repellency*", *Soft Matter* **1** (2005) 55-61.
- ⁶ R.E. Johnson and R.H. Dettre, "*Contact angle, Wettability and Adhesion*", *Advances in Chemistry Series* **43** (1964) 112-135.
- ⁷ D. Quéré, "*Les surfaces super-hydrophobes*", *Physique statistique, Images de la Physique, CNRS* (2005) 239-244.
- ⁸ P.G. de Gennes, F. Brochard-Wyart and D. Quéré, "*Gouttes, bulles, perles et ondes*", Ed. Belin (2002).
- ⁹ J. Bico, U. Thiele and D. Quéré, "*Wetting of textured surfaces*", *Colloids Surf. A* **206** (2002) 41-46.
- ¹⁰ A. Lafuma and D. Quéré, "*Superhydrophobic states*", *Nature Materials* **2** (2003) 457-460.
- ¹¹ S. Shibuichi, T. Onda, N. Satoh and K. Tsujii, "*Super water-repellent surfaces resulting from fractal structure*", *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 19512-19517.
- ¹² J. Bico, C. Marzolin and D. Quéré, "*Pearl drops*", *Europhys. Lett.* **47** (1999) 220-226.
- ¹³ D. Öner and T.J. McCarthy, "*Ultrahydrophobic surfaces. Effect of topography length scales on wettability*", *Langmuir* **16** (2000) 7777-7782.
- ¹⁴ Z. Yoshimitsu, A. Nakajima, T. Watanabe and K. Hashimoto, "*Effects of surface structure on the hydrophobicity and sliding behavior of water droplets*", *Langmuir* **18** (2002) 5818-5822.
- ¹⁵ C. Neinhuis and W. Barthlott, "*Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces*", *Ann. Bot.* **79** (1997) 667-677.
- ¹⁶ W. Barthlott and C. Neinhuis, "*Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological cells*", *Planta* **202** (1997) 1-8.
- ¹⁷ J. Bico, "*Mécanismes d'imprégnation : Surfaces texturées, Bigouttes, Poreux*", Thèse, Université Paris VI (2000).
- ¹⁸ S. Herminghaus, "*Roughness-induced non-wetting*", *Europhys. Lett.* **52** (2000) 165-170.
- ¹⁹ M. Nosonovsky, "*Multiscale roughness and stability of superhydrophobic biomimetic interfaces*", *Langmuir* **23** (2007) 3157-3161.

- ²⁰ N.A. Patankar, "Mimicking the Lotus Effect: Influence of Double Roughness Structures and Slender Pillars", *Langmuir* **20** (2004) 8209-8213.
- ²¹ L. Gao and T.J. McCarthy, "The "Lotus Effect" Explained: Two Reasons Why Two Length Scales of Topography Are Important", *Langmuir* **22** (2006) 2966-2967.
- ²² R. Blossey, "Self-cleaning surfaces: virtual realities", *Nature Mat.* **2** (2003) 301-306.
- ²³ Y.T. Cheng and D.E. Rodak, "Is the lotus leaf superhydrophobic?", *Appl. Phys. Lett.* **86** (2005) 144101.
- ²⁴ L. Cao, H.H. Hu and D. Gao, "Design and fabrication of micro-textures for inducing a superhydrophobic behaviour on hydrophilic materials", *Langmuir* **23** (2007) 4310-4314.
- ²⁵ D. Quéré, "Non-sticking drops", *Rep. Prog. Phys.* **68** (2005) 2495-2532.
- ²⁶ X.M. Li, D. Reinhoudt and M. Crego-Calama, "What do we need for a superhydrophobic surface? A review on the recent progress in the preparation of superhydrophobic surfaces", *Chem. Soc. Rev.* (2007) Published on web 31st January.
- ²⁷ D.L. Herbertson, C.R. Evans, N.J. Shirtcliffe, G. McHale and M. I. Newton, "Electrowetting on superhydrophobic SU-8 patterned surfaces", *Sensors and Actuators A* **130-131** (2006) 189-193.
- ²⁸ B. He, J. Lee and N.A. Patankar, "Contact angle hysteresis on rough hydrophobic surfaces", *Coll. Surf. A* **248** (2004) 101-104.
- ²⁹ M.H. Chen, Y.J. Chuang and F.G. Tseng, "Fabrication of superhydrophobic surface by nanomolding", The 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2006), Tokyo, Japan, November 5-9 (2006) 161-163.
- ³⁰ T. Onda, S. Shibuichi, N. Satoh and K. Tsujii, "Super water-repellent fractal surfaces", *Langmuir* **12** (1996) 2125-2127.
- ³¹ S. Shibuichi, T. Yamamoto, T. Onda and K. Tsujii, "Super water- and oil-repellent surfaces resulting from fractal structure", *J. Colloid Interface Sci.* **208** (1998) 287-294.
- ³² P. van der Wal and U. Steiner, "Super-hydrophobic surfaces made from Teflon", *Soft Matter* **3** (2007) 426-429.
- ³³ R. Rosario, D. Gust, A.A. Garcia, M. Hayes, J.L. Taraci, T. Clement, J.W. Dailey and S.T. Picraux, "Lotus effect amplifies light-induced contact angle switching", *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 12640-12642.
- ³⁴ J. Kim and C.J. Kim, "Nanostructured Surfaces for Dramatic Reduction of Flow Resistance in Droplet-based Microfluidics", *IEEE Conf. MEMS*, Las Vegas, NV, January (2002) 479-482.
- ³⁵ M.S. Dhindsa, N.R. Smith, J. Heikenfeld, P.D. Rack, J.D. Fowlkes, M.J. Doktycz, A.V. Melechko, and M.L. Simpson, "Reversible electrowetting of vertically aligned superhydrophobic carbon nanofibers", *Langmuir* **22** (2006) 9030-9034.
- ³⁶ N. Verplanck, Y. Coffinier, M. Wisztorski, G. Piret, V. Thomy, I. Fournier, J.C. Camart, P. Tabourier and R. Boukherroub, "Nanostructured surface as EWOD counter electrode for matrix-free mass spectrometry analysis", The 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2006), Tokyo (Japan), November 5-9 (2006) 771-773.

- ³⁷ K. Peng, H. Fang, J. Hu, Y. Wu, J. Zhu, Y. Yan and S. Lee, "*Uniform, axial-orientation alignment of one-dimensional single-crystal silicon nanostructure array*", *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (2005) 2737-2742.
- ³⁸ K. Peng, Y. Wu, H. Fang, X. Zhong, Y. Xu and J. Zhu, "*Metal-particle-induced, highly localized site-specific etching of Si and formation of single-crystalline Si nanowires in aqueous fluoride solution*", *Chem. Eur. J.* **12** (2006) 7942-7947.
- ³⁹ A. Lambacher and P. Fromherz, "*Luminescence of dye molecules on oxidized silicon and fluorescence interference contrast microscopy of biomembranes*", *J. Opt. Soc. Am. B* **19** (2002) 1435-1453.



Chapitre 4

Etude de l'électromouillage sur surfaces superhydrophobes

1. Introduction

Les résultats du chapitre précédent ont montré qu'il était possible d'utiliser des surfaces superhydrophobes comme contre-électrode au sein de microsystèmes EWOD.

Cependant, comme nous le montrons dans la première partie de ce chapitre, il apparaît dans la littérature que la variation de mouillabilité sur des surfaces superhydrophobes reste un enjeu. Plus particulièrement, un effet EWOD réversible sur de telles surfaces n'a jamais pu être obtenu dans un environnement d'air : une goutte, initialement dans un état de Cassie-Baxter et soumise à l'électromouillage, se retrouve dans une configuration de Wenzel. La forte hystérésis induite par cet état rend la relaxation totale impossible.

Contrairement aux différentes surfaces superhydrophobes utilisées dans la littérature pour l'EWOD, nous nous intéressons aux nanofils de silicium. Dans la seconde partie du chapitre, nous présentons la méthode de croissance de ces nanofils par VLS (*Vapour-Liquid-Solid Method*). Différente de celle présentée au chapitre 2 (basée sur la gravure), elle permet d'obtenir par croissance des surfaces extrêmement hétérogènes, rappelant la texture de la feuille de *Drosera* (Figure 3.13), tout en conservant une grande variabilité dans sa structure due au nombre important de paramètres de croissance.

La troisième partie de ce chapitre présente la caractérisation du phénomène d'électromouillage sur ces surfaces ainsi qu'une explication possible du comportement de la goutte. Un modèle théorique simple est ensuite développé afin de définir les paramètres physiques prépondérants nécessaires à une opération d'électromouillage réversible.

Enfin, nous exposons une dernière évolution technologique (Si/polySi/SiO₂) du microsystème EWOD. Cette évolution a pour objectif de pouvoir intégrer dans le système EWOD des étapes de croissance de nanofils à haute température (500°C). Les premiers essais pour le déplacement de goutte sur de telles surfaces sont ensuite présentés.

2. Variation de mouillabilité sur surfaces superhydrophobes

2.1. Variation de mouillabilité dans la littérature

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, de nombreux travaux concernent l'étude des surfaces superhydrophobes. Compte tenu des importantes applications induites par la faible hystérésis (réduction considérable des tensions nécessaires pour l'actionnement, *self-cleaning...*), de plus en plus d'équipes s'intéressent à la modification réversible de l'angle de contact, condition nécessaire au déplacement sur de telles surfaces¹. Parmi les travaux publiés, on distingue essentiellement deux techniques de modulation de l'angle de contact : l'une chimique et l'autre mécanique.

La voie chimique consiste à modifier les propriétés de mouillage de la surface. Rosario *et al.* utilisent des nanofils de silicium silanisés contenant un photochrome. Sous lumière blanche (450-550nm), cette couche est non polaire et hydrophobe, l'angle de contact apparent est d'environ 160°. Sous UV (366nm), la molécule devient polaire et donc hydrophile, l'angle chute à 133°. L'effet est réversible sous lumière blanche. En réalisant un gradient de lumière UV, il est alors possible de déplacer la goutte : l'angle sur surface irradiée aux UV est inférieur à l'angle de reculée en lumière blanche (140°)². Des travaux similaires ont été réalisés avec du NIPAM (N-isopropylacrylamide)³⁻⁴ ou encore par transition UV/obscurité⁵. Mais il est également possible de modifier la mouillabilité du NIPAM par gradient de température et/ou de pH⁶⁻⁷.

La voie mécanique, quant à elle, consiste plus à augmenter la surface liquide/solide, qui modifie de surcroît l'angle de contact apparent, qu'à modifier directement les propriétés de mouillage de la surface en elle-même. Plusieurs idées originales sont présentées dans la littérature. Zhang *et al.* jouent sur les propriétés de compression et de dilatation d'un film polyamide élastique formant des motifs triangulaires et réalisent ainsi des transitions réversibles de 152° à 0°⁸. Une telle surface est présentée Figure 4.1.

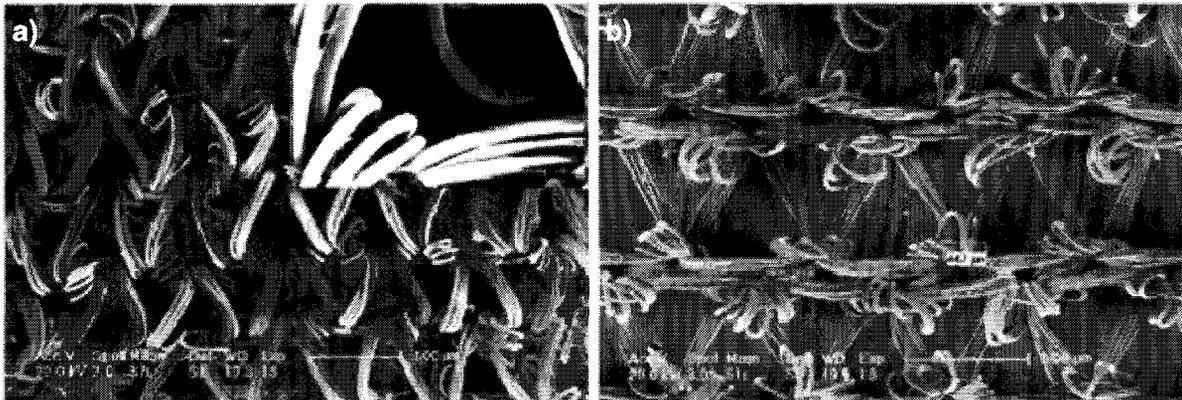


Figure 4.1 - Film de polyamide élastique : a) compressé, les triangles ont une dimension d'environ 200μm, l'angle de contact est d'environ 152°, b) le film est dilaté, la dimension des triangles est d'environ 450μm, l'angle de contact apparent est nul⁸.

Il est aussi possible de créer des parties mobiles sur membranes souples déplacées par actionnement pneumatique. Lee *et al.* utilisent ainsi une surface structurée en PDMS recouverte d'une membrane également en PDMS⁹. En aspirant l'air sous la membrane, celle-ci épouse la microstructure, l'angle est de 144,7°. Lorsque l'actionnement de la membrane est interrompu, la surface devient plane, l'angle diminue à 114,6°. Ce phénomène n'est malheureusement pas réversible : le passage de la surface plane à celle structurée n'entraîne aucune modification de l'angle de contact : la goutte se retrouve dans une configuration de Wenzel.

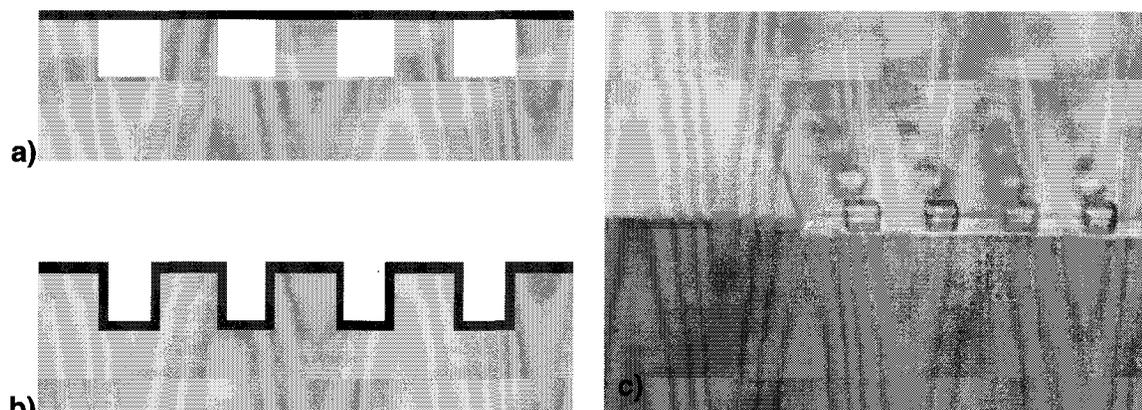


Figure 4.2 - Principe de la membrane amovible pour passer d'une surface hydrophobe à superhydrophobe: a) et b) schéma de principe, c) photo MEB du dispositif⁹.

Une architecture plus récente et plus complexe consiste à placer la nanostructure, composée de deux niveaux, sur la membrane métallique. Sans tension, la goutte n'est posée que sur la nanostructure la plus haute, la surface liquide/solide est la plus faible. Par application d'une tension entre la membrane et le substrat, la nanostructure descend et se retrouve au niveau de la seconde nanostructure, l'interaction liquide/surface augmente, l'angle chute (Figure 4.3)¹⁰. En pratique, la goutte passe de 152° à 131°. Cependant, la réversibilité du phénomène et l'hystérésis ne sont pas clairement définies.

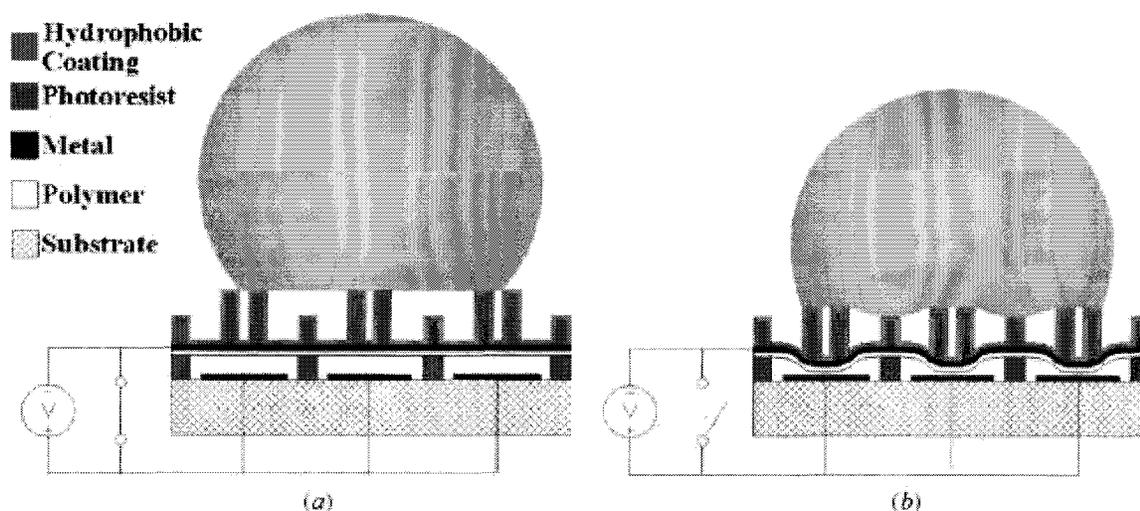


Figure 4.3 - Principe de changement de mouillabilité par modification de la morphologie de la surface¹⁰.

2.2. Electromouillage et surfaces superhydrophobes

Les équipes travaillant sur l'électromouillage n'ont pas résisté à l'attrait de telles surfaces. Jusqu'à présent, toutes ont rencontré le même problème : une goutte, initialement en configuration de Cassie-Baxter et soumise à l'électromouillage se retrouve aspirée dans la nanostructure et ne peut revenir à son état initial. L'effet EWOD est alors irréversible.

A défaut de réussite, certains groupes de recherche tentent de l'expliquer. L'un des précurseurs dans ce domaine est Tom Krupenkin¹¹, des laboratoires Bell (USA), qui en 2004 présente ses premiers résultats en la matière. Les surfaces se composent de piliers en silicium, gravés au travers d'un masque réalisé par lithographie électronique (une géométrie en 'tapis de fakir'). L'isolation électrique est assurée par une oxydation de la surface et l'hydrophobicité par un polymère de type Téflon. En appliquant une tension, il arrive à obtenir un mouillage total de la goutte sur la surface comme montré Figure 4.4. Cependant, ce phénomène s'avère irréversible.

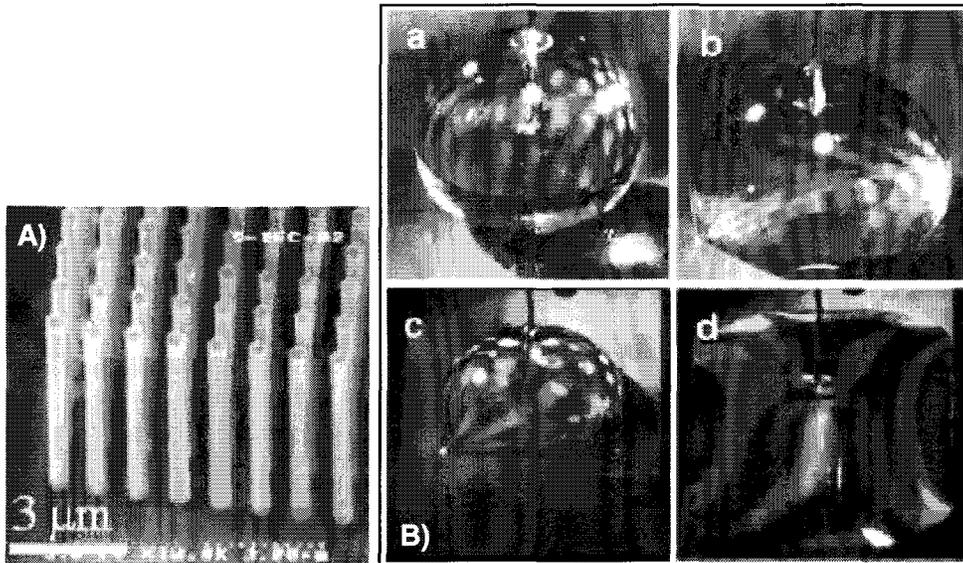


Figure 4.4 – A) Nanostructure en silicium utilisée pour l'électromouillage, B) mouillage total par électromouillage d'une goutte de cyclopentanol sur surface nanostructurée par lithographie électronique¹¹ : a) Aucune tension n'est appliquée, d) le mouillage est total sous l'application d'une tension (ici, 50V).

Le même groupe apporte en 2005 une première solution pour le démouillage de surfaces superhydrophobes¹². Une impulsion très courte de courant électrique appliquée dans le substrat amène à un échauffement de la surface. La température peut monter jusque 240°C, il y a alors ébullition et la goutte se trouve expulsée de la surface avec création de gouttes satellites. Même si cette technique est de mise en œuvre aisée, on imagine mal un tel système intégré au sein d'un *lab-on-chip*. L'échauffement entraînerait des dommages au matériel biologique au sein de la goutte.

D'autres équipes ont travaillé sur l'électromouillage sur surfaces texturées, en utilisant divers matériaux, comme une bicouche SU-8/Téflon par exemple¹³ ou des nanofibres de carbone recouvertes de Parylène C/Téflon¹⁴. Dans le premier cas, la réversibilité n'est pas totale. L'angle passe de 152° à 90° sous 130V et se limite à 114° une fois la tension coupée. Dans le second cas (nanofibres de carbone), aucune réversibilité n'est observée.

Une solution permettant la réversibilité est de modifier le milieu ambiant. En effet, l'irréversibilité est observée lorsque le milieu ambiant est de l'air. En remplaçant celui-ci par un milieu hydrophobe, comme de l'huile (dodécane), il est possible d'obtenir une réversibilité¹⁴ (Figure 4.5). L'angle passe ainsi de 160° à 120° (100° dans l'air) lorsque la tension est appliquée et revient à 160° après coupure de la tension.

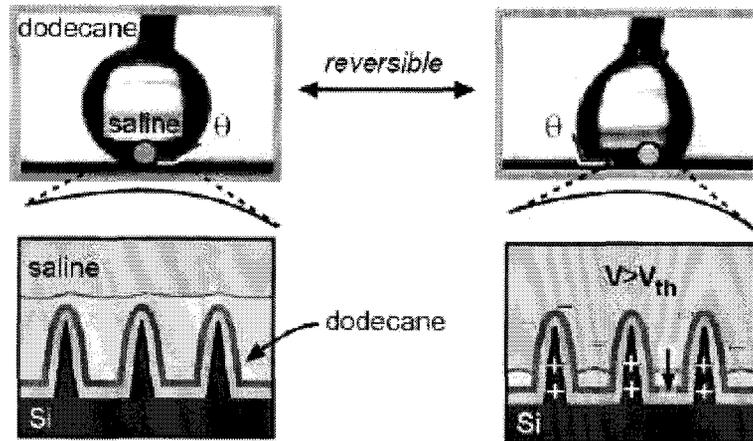


Figure 4.5 - Réversibilité du phénomène EWOD sur surface superhydrophobe par immersion de la goutte d'eau dans du dodécane¹⁴.

Il est intéressant de remarquer qu'un environnement d'huile empêche l'effet Wenzel. Cependant, on peut se poser la question de l'intérêt d'une telle surface puisqu'une goutte d'eau dans un environnement d'huile possède déjà un angle de contact très élevé¹⁵, même sur une surface plane (Figure 4.6).

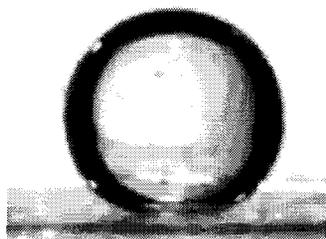


Figure 4.6 - Goutte d'eau dans l'huile sur une surface plane hydrophobe. La goutte est posée sur un film d'huile¹⁵.

Un calcul rapide permet de déterminer l'angle d'une goutte d'eau sur du Téflon dans un environnement d'huile à l'équilibre à partir de l'équation de Young :

$$\gamma_{ES} = \gamma_{SH} - \gamma_{EH} \cos \theta_0 \quad (4.1)$$

avec

$$\gamma_{ES} = 47 \text{ mN.m}^{-1}$$

$$\gamma_{SH} = 2 \text{ mN.m}^{-1}$$

$$\gamma_{EH} = 50 \text{ mN.m}^{-1}$$

On trouve :

$$\theta_E = 154^\circ$$

Une surface plane permet à la fois un mouillage total mais également une réversibilité complète.

A l'heure actuelle, il n'existe donc pas dans la littérature, à notre connaissance, de surfaces ou de méthodes présentant la relaxation naturelle de la goutte soumis à l'électromouillage. Bien que d'autres techniques permettent un effet réversible, elles sont relativement complexes (voie mécanique), lente (voie chimique) ou inappropriées à des applications biologiques (voie thermique).

3. Réalisation des surfaces superhydrophobes

Concernant la réalisation de surfaces superhydrophobes pour EWOD, nous avons opté pour la synthèse de nanofils par la technique VLS. Elle consiste en un dépôt chimique en phase vapeur (CVD, *Chemical Vapour Deposition*) en présence d'un catalyseur métallique. Contrairement à l'attaque chimique présentée précédemment qui a pour avantage d'être simple de mise en œuvre, cette synthèse est plus complexe (utilisation d'un four dédié, paramètres de température, pression, débit à maîtriser) mais permet d'obtenir un vaste panel de surfaces de manière contrôlée. Un autre intérêt est de pouvoir effectuer la croissance sur tout type de surface supportant un recuit à 500°C. Il est donc possible de réaliser sur le substrat des étapes préalables comme la réalisation d'électrodes en polysilicium par exemple.

3.1. Synthèse

Les surfaces présentées dans cette partie ont été réalisées dans le cadre du travail post-doctoral de Yannick Coffinier dans l'équipe Bio Interfaces de Rabah Boukherroub (IRI).

3.1.1. Dépôt du catalyseur

Dans un premier temps, le dépôt sur la surface d'un catalyseur sous forme de nanoparticules (de l'or dans notre cas) est nécessaire. Pour cela, deux solutions existent : le dépôt de nanoparticules ou le démouillage de film mince. Les surfaces réalisées dans cette

thèse l'ont été par démouillage de film mince, notamment pour obtenir une densité de nanoparticules importantes.

La surface est préalablement nettoyée par un nettoyage piranha (H_2SO_4 / H_2O_2 3:1 v/v) pendant 15 minutes à 80°C et rincée abondamment à l'eau désionisée puis séchée sous un flux d'azote afin de retirer toute trace organique. Dans le cas où la présence d'oxyde n'est pas souhaitée (ou nécessaire), une étape intermédiaire consiste en une désoxydation au HF50% pendant 1 minute afin de retirer l'oxyde natif, suivie d'un rinçage EDI et d'un séchage à l'azote. Une couche de 4nm d'or est ensuite déposée par évaporation sur la surface (Annexe 2). Cette faible épaisseur entraîne une discontinuité du film.

3.1.2. Croissance des nanofils

La surface est introduite dans un four à 500°C sous flux de silane (SiH_4). Sous l'effet de la température, l'or forme une goutte par démouillage (Figure 4.7). Les dimensions des nanoparticules ainsi obtenues sont assez hétérogènes et peuvent varier de 10 à 100nm de diamètre¹⁶.

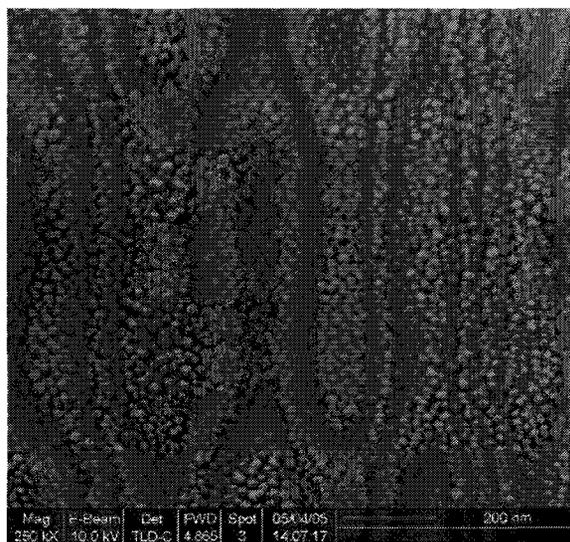


Figure 4.7 - Nanoparticules d'or obtenues après démouillage d'un film mince de 4nm à 500°C. La taille des particules est comprise entre 10nm et 50nm¹⁶.

L'or, sous forme liquide, dissocie le SiH_4 en Si et H_2 . Le silicium, en phase vapeur, diffuse ainsi dans la goutte de métal (phase liquide) et précipite (phase solide) jusqu'à faire croître un fil sous la goutte. On obtient donc un nanofil de silicium terminé par une nanoparticule d'or comme le montre la Figure 4.8.

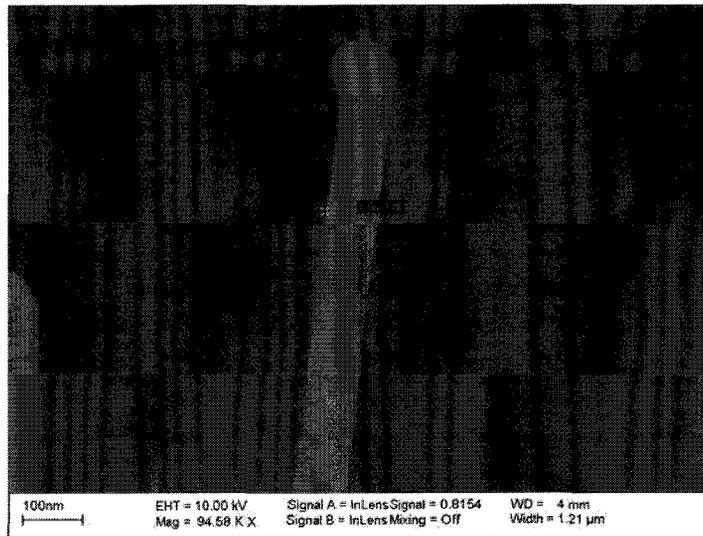


Figure 4.8 - Nanofil de silicium de 90nm de diamètre terminé par une particule d'or ayant servi de catalyseur.

Les caractéristiques de la surface sont liées aux paramètres de croissance. Ainsi le diamètre du fil est directement lié au diamètre du catalyseur, la longueur et la densité sont fonctions de la pression et du temps alors que l'orientation est déterminée par la pression. A titre d'exemple, la Figure 4.9 présente deux surfaces de nanofils obtenues à des pressions différentes ($P=0,1T$ et $P=0,4T$) pour un temps de croissance de 60 minutes dans les deux cas. On constate que la longueur mais également la densité des nanofils dépendent fortement de la pression.

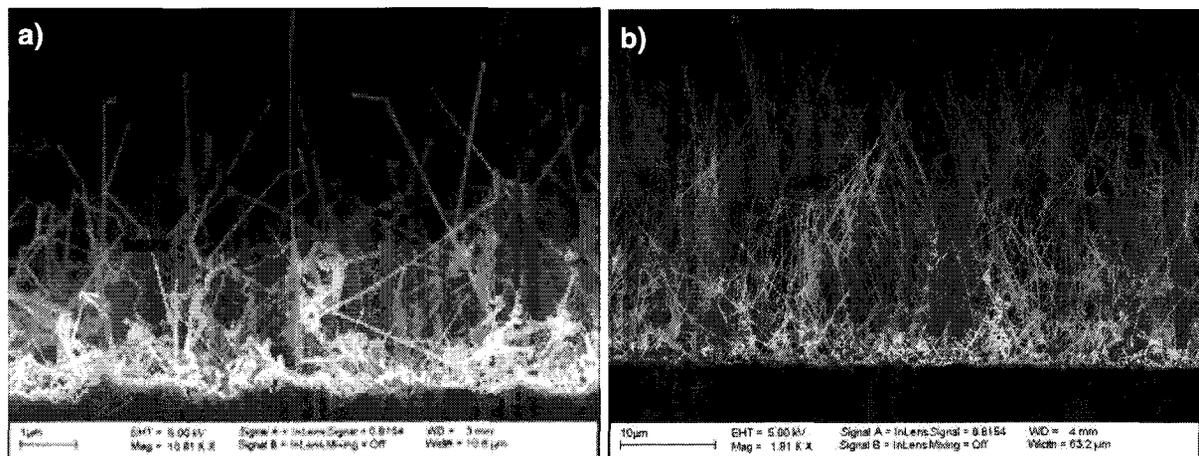


Figure 4.9 - Nanofils VLS réalisés à partir d'une couche mince d'or (4nm) sur un substrat de silicium <100> type n. a) $P = 0,1T$, b) $P = 0,4T$. Le débit en silane est de 40sccm, le temps de croissance de 60min.

3.2. Présentation des surfaces étudiées

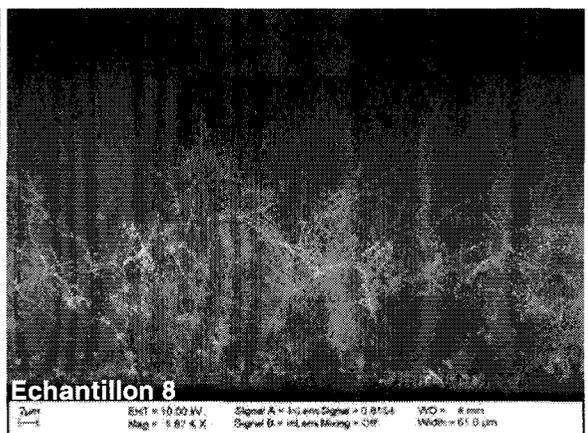
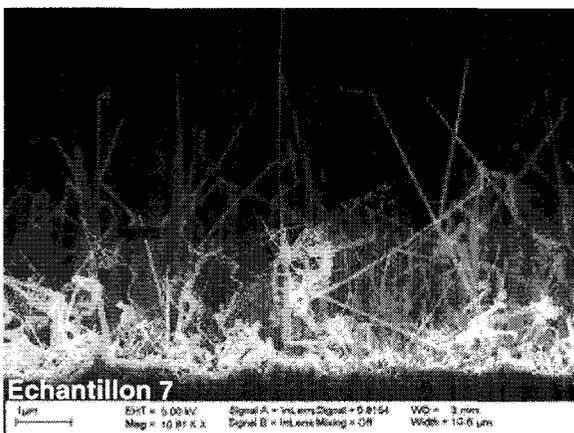
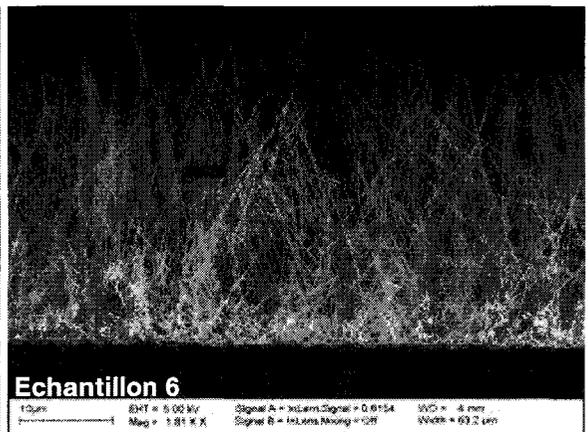
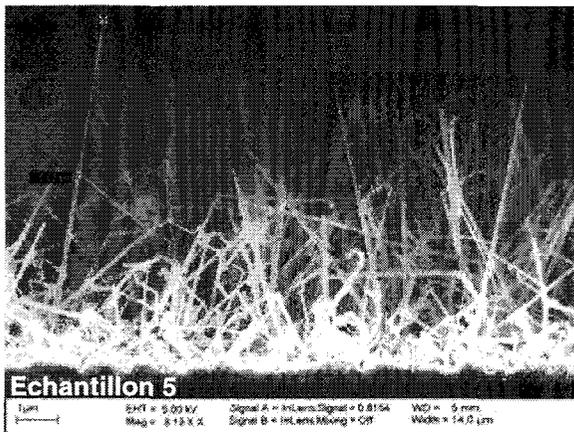
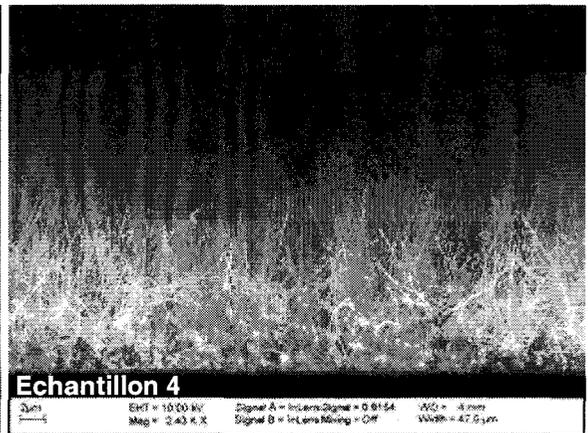
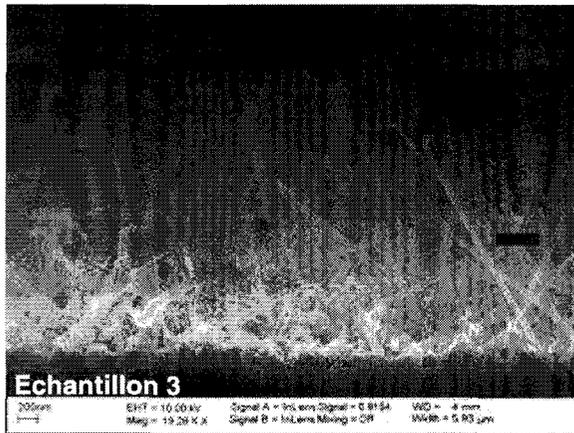
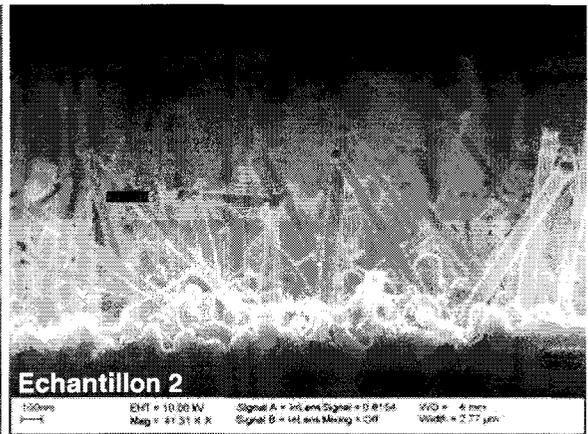
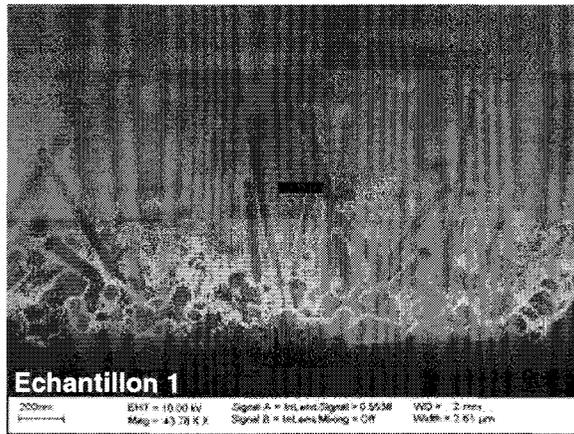
Afin d'étudier le phénomène d'électromouillage sur ce type de surfaces superhydrophobes, dix surfaces différentes ont été réalisées par la technique VLS. Les paramètres retenus pour la croissance de chaque échantillon sont présentés Tableau 4.1.

Tous les échantillons ont été réalisés sous 40sccm de SiH₄, à une température de 500°C sous deux pressions différentes pour un même temps de croissance, excepté pour les croissances de 80min et 100min réalisées uniquement sous une pression de 0,4T (échantillons 9 et 10). Le choix de ces conditions a pour objectif d'obtenir une importante variabilité de la densité et des longueurs de nanofils.

#	Temps (min)	Pression (T)	Longueur (µm)
1	10	0,1	1
2	10	0,4	1
3	20	0,1	2,5
4	20	0,4	15
5	40	0,1	8
6	40	0,4	35
7	60	0,1	7
8	60	0,4	30
9	80	0,4	52,6
10	100	0,4	66

Tableau 4.1 - Paramètres de croissance de nanofils VLS sur silicium.

Ces différents essais nous ont permis d'obtenir deux types de surfaces bien distinctes : celles réalisées à faible pression (surfaces 1, 3, 5 et 7) et celles réalisées à forte pression (surfaces 2, 4, 6, 8, 9 et 10). Les surfaces obtenues en fonction de ces différents paramètres sont présentées Figure 4.10.



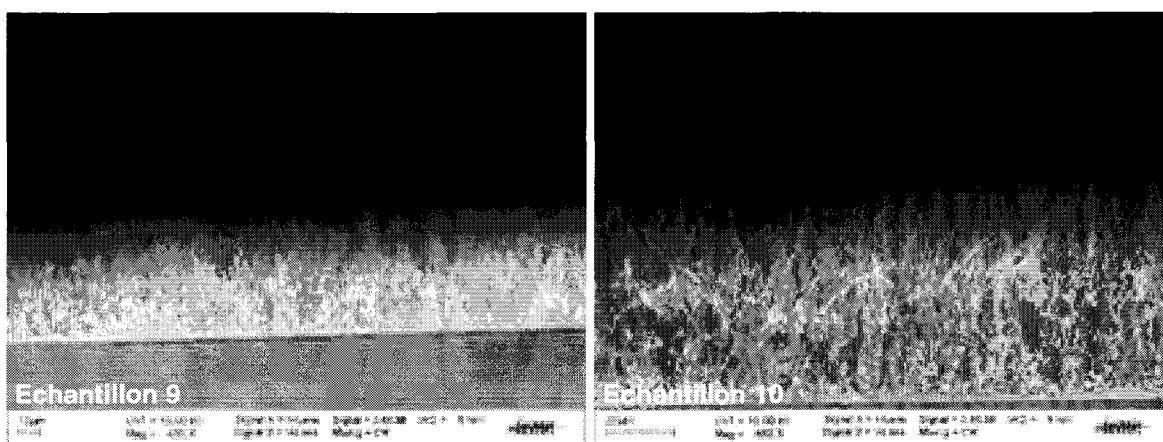


Figure 4.10 - Photo MEB des 10 surfaces de nanofils réalisées par VLS. Les échantillons 1, 3, 5 et 7 sont réalisés à faible pression ($P = 0,1T$), les échantillons 2, 4, 6, 8, 9 et 10 sont réalisés à forte pression ($P = 0,4T$).

3.2.1. Influence de la pression

La pression est sans doute le paramètre le plus important pour l'obtention de surfaces 'homogènes', aussi bien en densité qu'en longueur. En effet, à faible pression ($0,1T$), les nanofils ont tous des tailles différentes, certains montrent des 'cassures' dans la croissance et leur densité n'est pas homogène sur le substrat. A plus forte pression ($0,4T$), la densité des nanofils est relativement homogène sur la surface et leur longueur est constante, l'épaisseur de la couche est également constante sur toute la surface.

3.2.2. Influence du temps de croissance

Le temps agit faiblement sur la densité des nanofils. Plus la croissance est longue, plus la couche de nanofils est dense. Cependant, le temps intervient essentiellement sur la longueur. Ainsi, à une pression de $0,4T$, une croissance de 20min donne des nanofils de $15\mu m$ de long alors que pour une croissance de 100min, l'épaisseur de la couche atteint $66\mu m$. La Figure 4.11 montre la relation entre le temps de croissance et la longueur des nanofils pour une pression de $0,4T$.

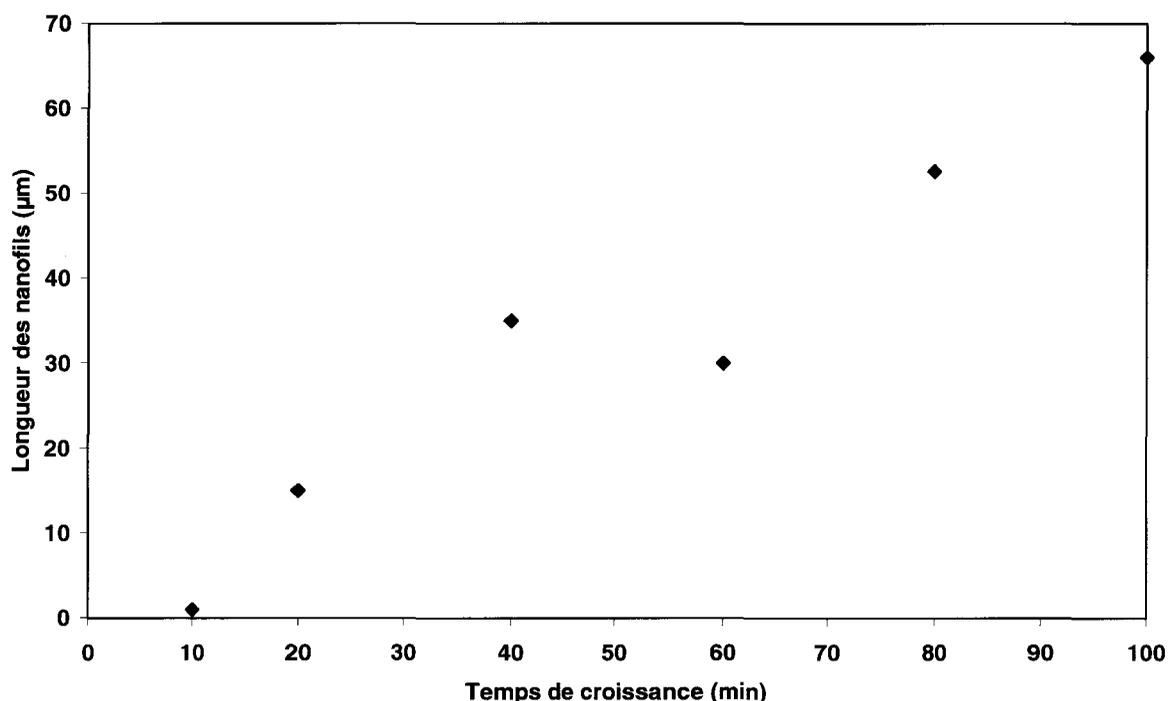


Figure 4.11 - Longueur des nanofils en fonction du temps de croissance (à une pression de 0,4T).

3.3. Traitement hydrophobe

Comme pour les nanofils du chapitre 2, le dépôt de polymère sur les nanofils s'avère délicat, notamment lorsqu'il s'agit d'un dépôt à la tournette (Téflon, Cytop), d'autant que l'épaisseur est nettement plus importante pour les nanofils VLS que pour les nanofils gravés par voie chimique. De plus, l'étude du comportement de ces surfaces soumises à électromouillage (et donc à des tensions supérieures à quelques volts) ne permet pas d'utiliser de monocouches organiques comme l'OTS¹⁷.

Cependant, il est également possible de déposer un fluoropolymère, le C_4F_8 (Octafluorobutène). Ce dépôt s'effectuant par plasma, il épouse parfaitement la structure. Bien que ce polymère possède de moins bonnes qualités que le Téflon ou le Cytop (angle de Young autour de 105° et une hystérésis de l'ordre de $22^\circ \pm 1^\circ$ - Figure 4.12), celui-ci nous permet d'obtenir des surfaces superhydrophobes. En effet, d'après la loi de Cassie-Baxter, l'angle de Young a peu d'influence sur l'angle de contact apparent. Celui-ci est principalement dépendant de la fraction de surface comme le montre la Figure 4.13.

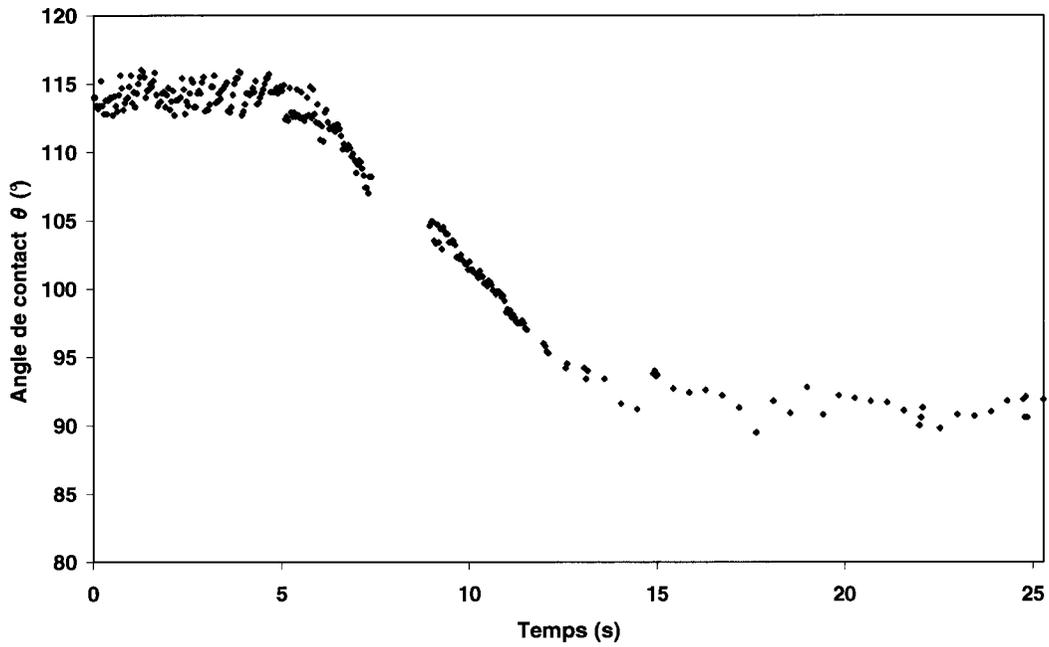


Figure 4.12 - Hystérésis du C_4F_8 : la première partie de la courbe montre l'angle d'avancée, la seconde partie représente l'angle de reculée.

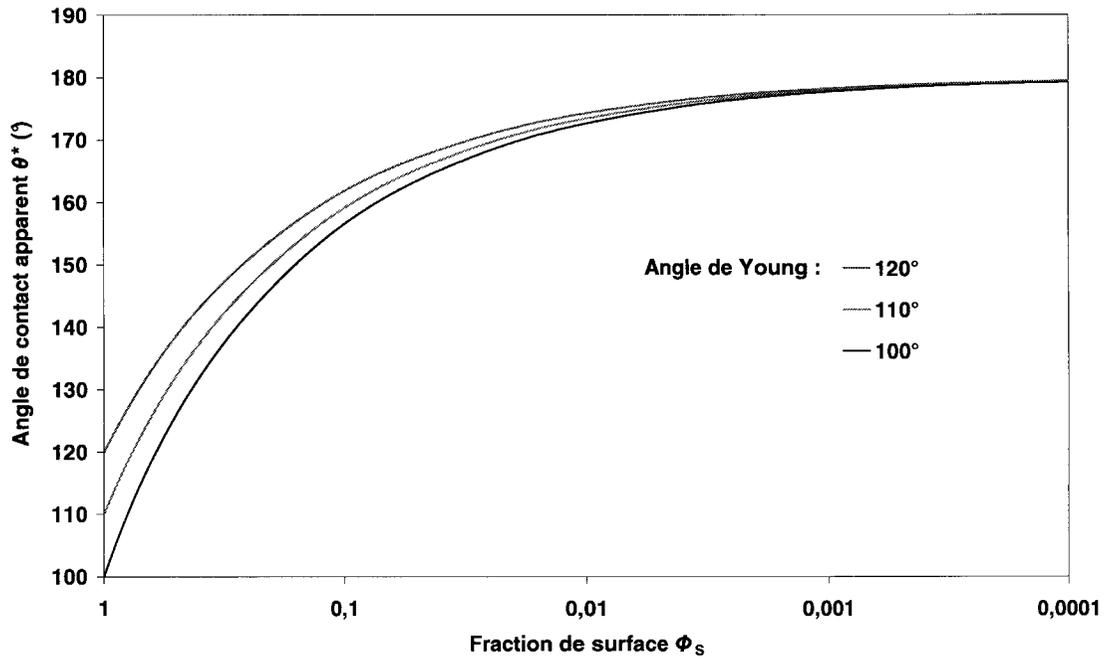


Figure 4.13 - Evolution de l'angle de contact apparent θ^* en fonction de la fraction de surface ϕ_s pour trois angles de Young différents.

Le C_4F_8 a donc été déposé en une seule étape de passivation de 10 secondes ($P_{bobine}=1000W$, $Q_{C_4F_8}=220sccm$). L'épaisseur obtenue est d'environ 30nm (après mesure par ellipsométrie sur surface plane). Les nanofils ainsi recouverts ont été observés au MEB afin de s'assurer du recouvrement des nanofils (Figure 4.14).

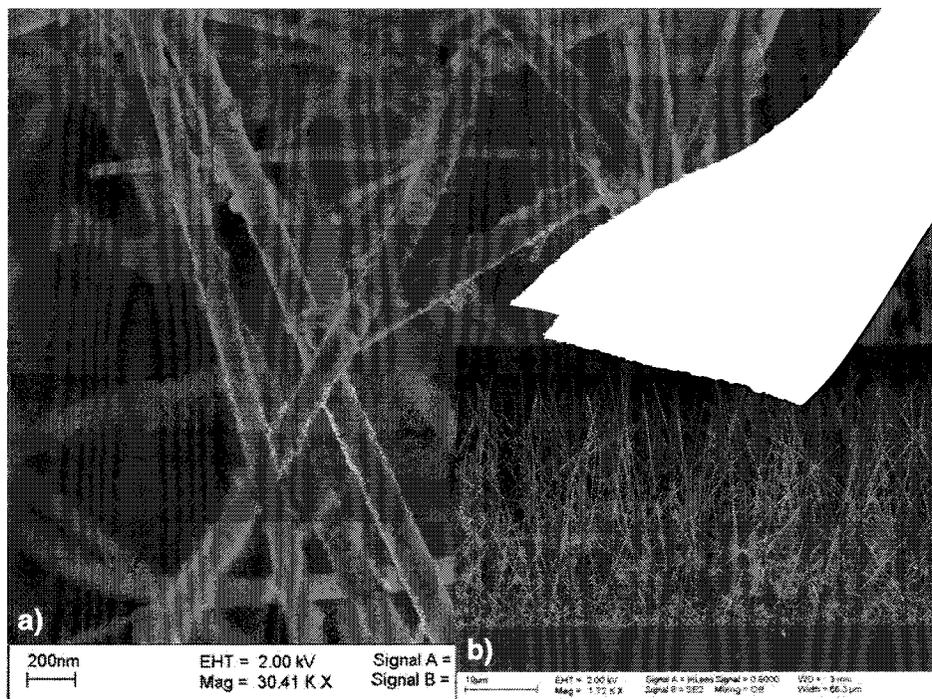


Figure 4.14 - Nanofils VLS recouverts de C_4F_8 . a) Aspect des nanofils, b) Etat de surface général.

Le résultat convient parfaitement à l'effet souhaité puisque le polymère n'entraîne pas de modification de la configuration de la surface malgré la longueur et la densité des nanofils. L'état de surface est similaire à celui avant dépôt du polymère (Figure 4.9.b).

4. Caractérisation des surfaces superhydrophobes

4.1. Angle de contact

Les premiers essais de caractérisation de ces surfaces ont consisté en la mesure de l'angle de contact statique. Quel que soit le type de surface et la position de la goutte, l'angle de contact mesuré est de l'ordre de $160^\circ \pm 1^\circ$ (Figure 4.15).

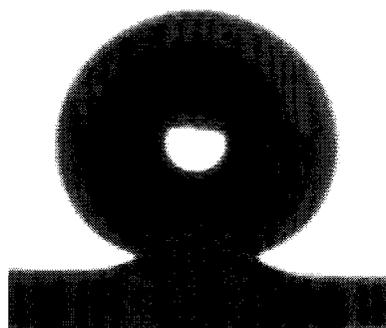


Figure 4.15 - Goutte d'EDI ($5\mu\text{L}$) déposée sur un substrat superhydrophobe de nanofils de silicium VLS recouverts de C_4F_8 .

4.2. Hystérésis

Nous avons déterminé les valeurs d'hystérésis. La Figure 4.16 présente un exemple de mesure d'hystérésis pour l'une des surfaces étudiées.

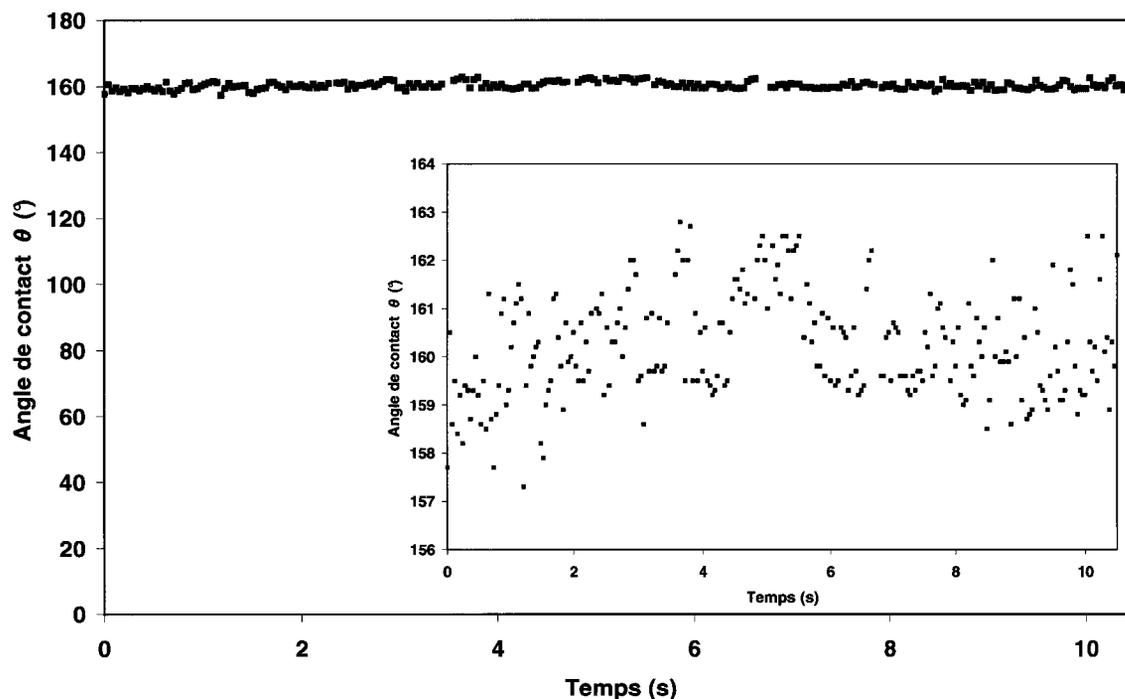


Figure 4.16 - Mesure de l'hystérésis sur des nanofils de silicium réalisés par voie chimique et rendus hydrophobes par dépôt de C_4F_8 (encart : vue zoomée entre 156° et 164°).

On constate bien sur ce graphe qu'il n'y a aucune modification de l'angle au cours du temps. En effet, l'angle d'avancée est équivalent à l'angle de reculée. L'hystérésis n'est pas quantifiable, nous avons un effet *rolling ball*. Les valeurs obtenues pour les angles d'avancée et de reculée sont de $160^\circ \pm 1^\circ$. Comme pour l'angle de contact statique, l'hystérésis est équivalent quelle que soit la surface.

4.3. Fraction de surface des nanofils

A partir de l'angle apparent et de la relation de Cassie-Baxter (3.4), il nous est possible d'estimer la fraction de surface de nanofils de manière empirique. Sur C_4F_8 , l'angle de Young est de 105° et l'angle apparent de 160° , ce qui implique que la fraction de surface Φ_s est de l'ordre de 8%. Cette valeur ne peut être comparée à d'autres techniques expérimentales comme la mesure de rugosité par AFM en raison de la forte hétérogénéité de la surface. Quoiqu'il en soit, cette fraction de surface mesurée, très faible, représente le pourcentage de surface sur lequel repose la goutte (état de Cassie-Baxter). Physiquement, cette surface

correspond aux nanofils les plus grands. Ceci nous donne une indication de la position initiale de la goutte.

5. Caractérisation de l'électromouillage

5.1. Nanofils sur silicium, dans l'air

5.1.1. Présentation du montage

L'électromouillage, de la même manière que dans les chapitres précédents, a été caractérisé par la méthode de l'aiguille. Une tension alternative de fréquence 1kHz (signal créneau) est appliquée sur la pointe, le substrat étant à la masse. Le liquide utilisé est de l'eau désionisée, le milieu ambiant, de l'air. Le volume utilisé est de l'ordre de 5 à 6 μ L. Nous sommes en dessous de la longueur capillaire, la gravité n'influe donc pas sur la forme de la goutte. La pointe utilisée pour la caractérisation électrique est métallique donc hydrophile. Nous avons également effectué des essais avec une aiguille hydrophobe (celle du goniomètre permettant le dépôt de gouttes), pour des résultats similaires. L'aiguille ne perturbe donc pas la mesure. Le principe de la mesure est rappelé Figure 4.17 :

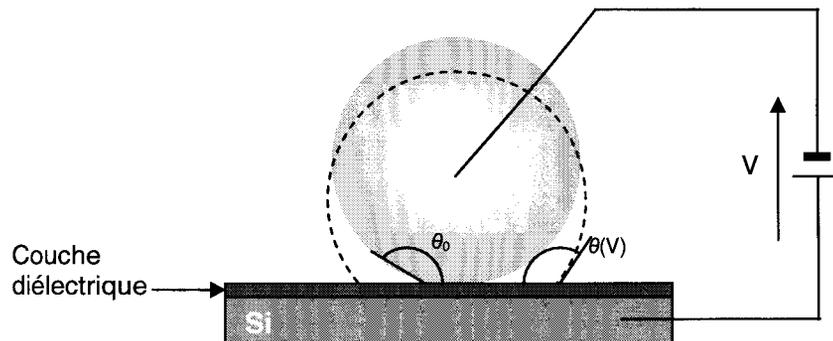


Figure 4.17 – Principe de la méthode de l'aiguille.

5.1.2. Résultats

Les dix échantillons présentés au paragraphe 3.2 ont été caractérisés. L'effet EWOD est irréversible sur les échantillons 1, 3, 5 et 7 ainsi que sur l'échantillon 2 (présentés Figure 4.10). La moindre tension fait passer la goutte d'une configuration de Cassie-Baxter à une configuration de Wenzel.

Les échantillons 4, 6, 9 et 10 ont été soumis aux mêmes conditions expérimentales. Il y a une chute considérable de l'angle de contact lorsque la goutte est soumise à l'électromouillage. Mais la réversibilité observée n'est pas totale. En effet, contrairement aux surfaces précédentes, lorsque la tension est coupée, la goutte remonte mais ne reprend pas sa configuration initiale.

L'échantillon 8, quant à lui, permet la relaxation complète de la goutte et donc une réversibilité totale de l'effet EWOD (Figure 4.18). Sous une tension maximale de 87,5V_{max},

l'angle, initialement à $161,5^\circ$, chute de $14,2^\circ$ pour atteindre une valeur de $147,3^\circ$. Dès que la tension est coupée, la goutte reprend sa configuration initiale, l'effet est réversible. Au-dessus de cette tension apparaît un phénomène d'électrolyse.

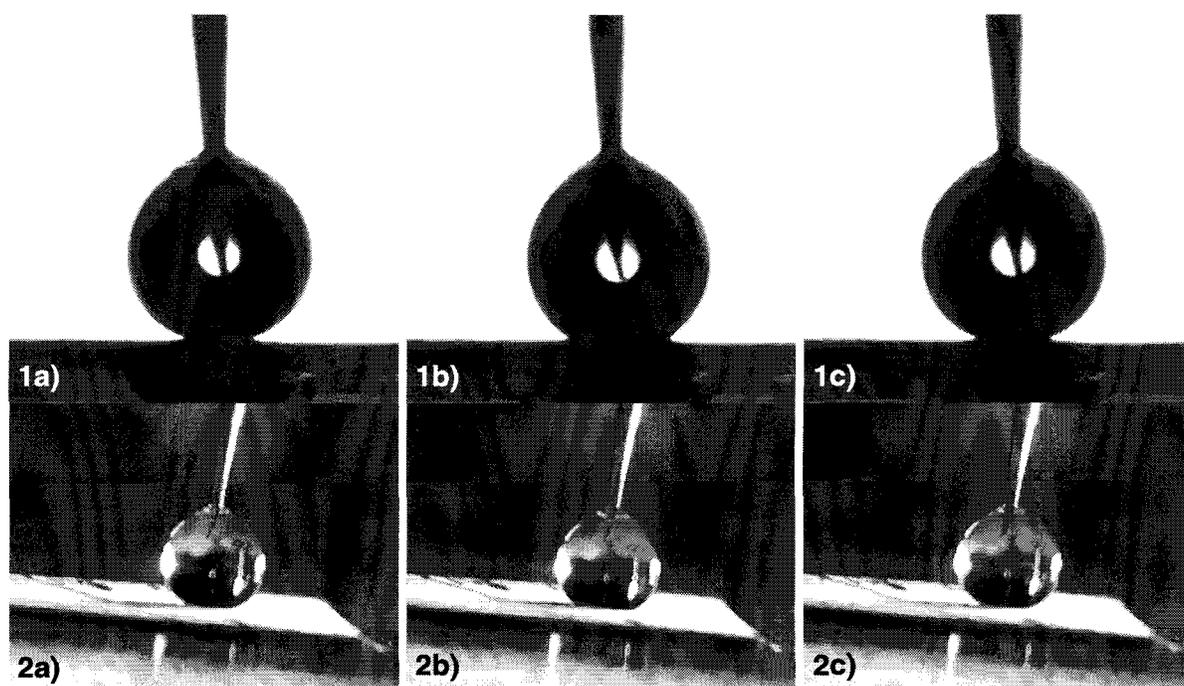


Figure 4.18 - Effet EWOD observé sur une goutte déposée sur une surface de nanofils de silicium superhydrophobes (échantillon 8). 1a) et 2a) Aucune tension n'est appliquée, 1b) et 2b) une tension de $87,5V_{\max}$ est appliquée ($f=1\text{kHz}$), 1c) et 2c) la tension est coupée, la goutte retrouve son état initial.

5.1.3. Influence de la tension sur l'angle de contact

Concernant cette dernière surface, nous observons sur la Figure 4.20 une évolution quasi linéaire de l'angle de contact en fonction de la tension, suivie d'une saturation (Figure 4.19). La réponse est donc semblable à l'EWOD classique. Cependant, la saturation est aussi liée à une irréversibilité du phénomène due à une électrolyse et une détérioration de la couche hydrophobe à partir de $87,5V_{\max}$. Ce phénomène est lié à l'absence de diélectrique efficace.

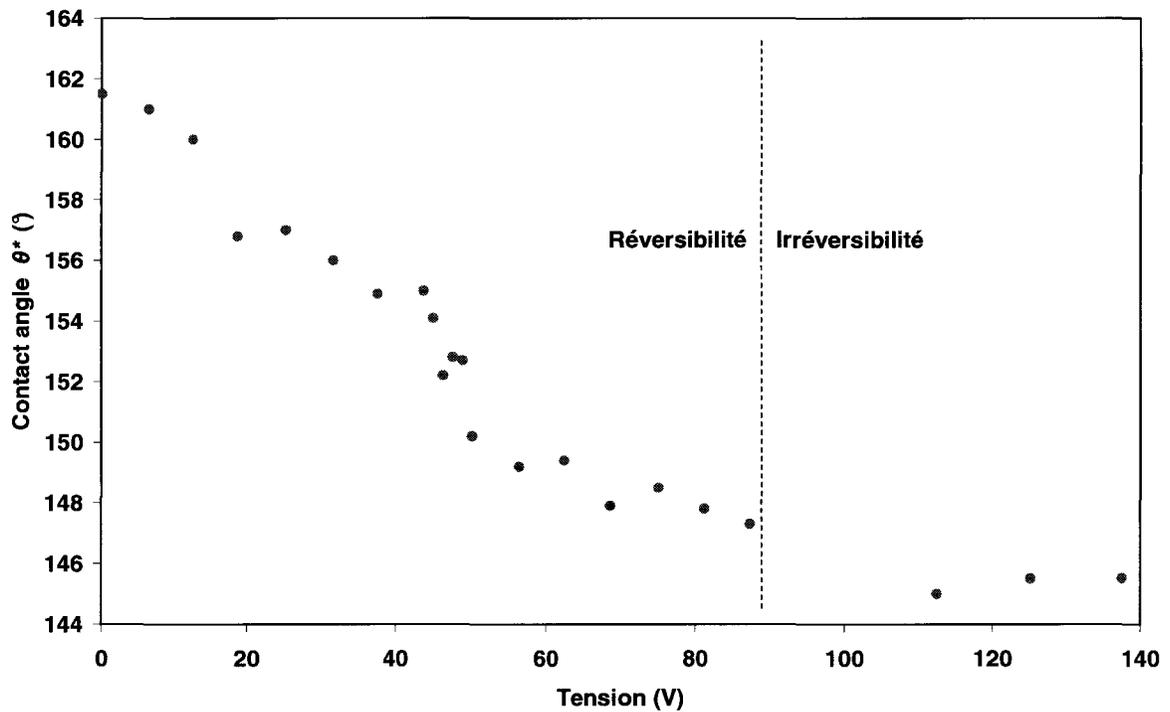


Figure 4.19 - Evolution de l'angle de contact apparent θ^* en fonction de la tension appliquée selon la conductivité de la goutte dans un environnement d'air.

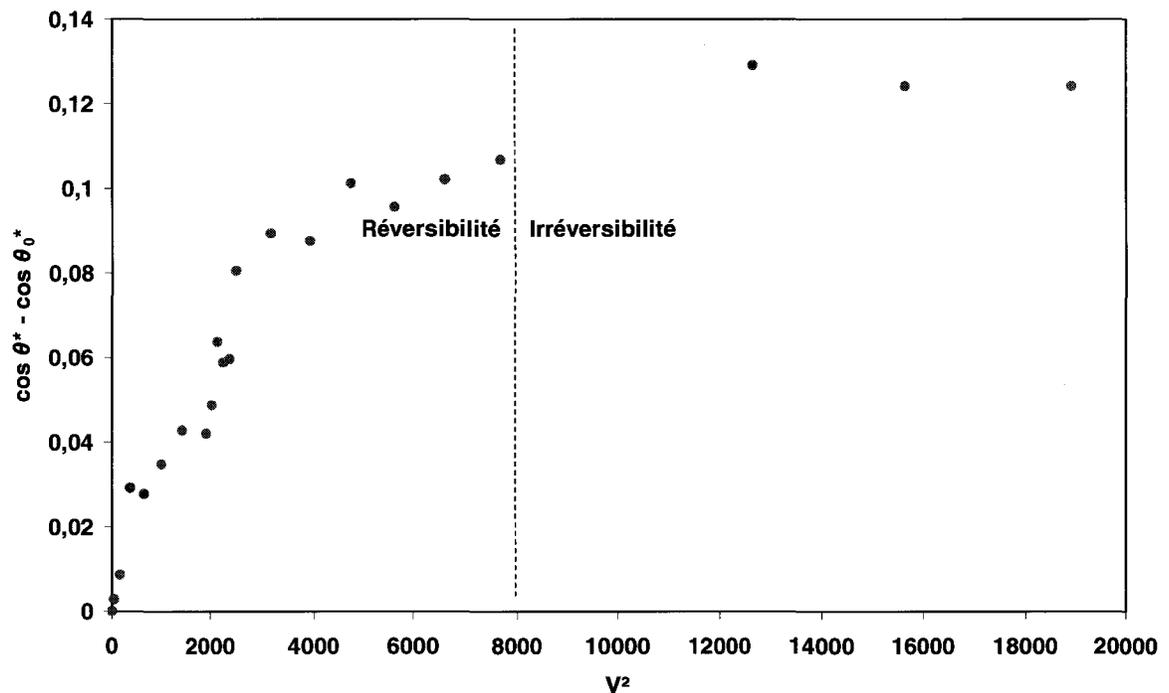


Figure 4.20 - Evolution de la différence de $\cos \theta^*(V) - \cos \theta_0^*$ en fonction de la tension au carré (relation de proportionnalité selon l'équation de Lippmann) selon la conductivité de la goutte dans un environnement d'air.

5.1.4. Reproductibilité

Dans le cas de l'échantillon 8, il a fallu déterminer la reproductibilité de ce phénomène dans le temps, notamment pour s'assurer de la qualité de la couche hydrophobe mais

également de la bonne tenue mécanique des nanofils dans le temps. Une centaine de cycles ont été effectués et le phénomène est reproductible dans le temps, comme le montre la Figure 4.21.

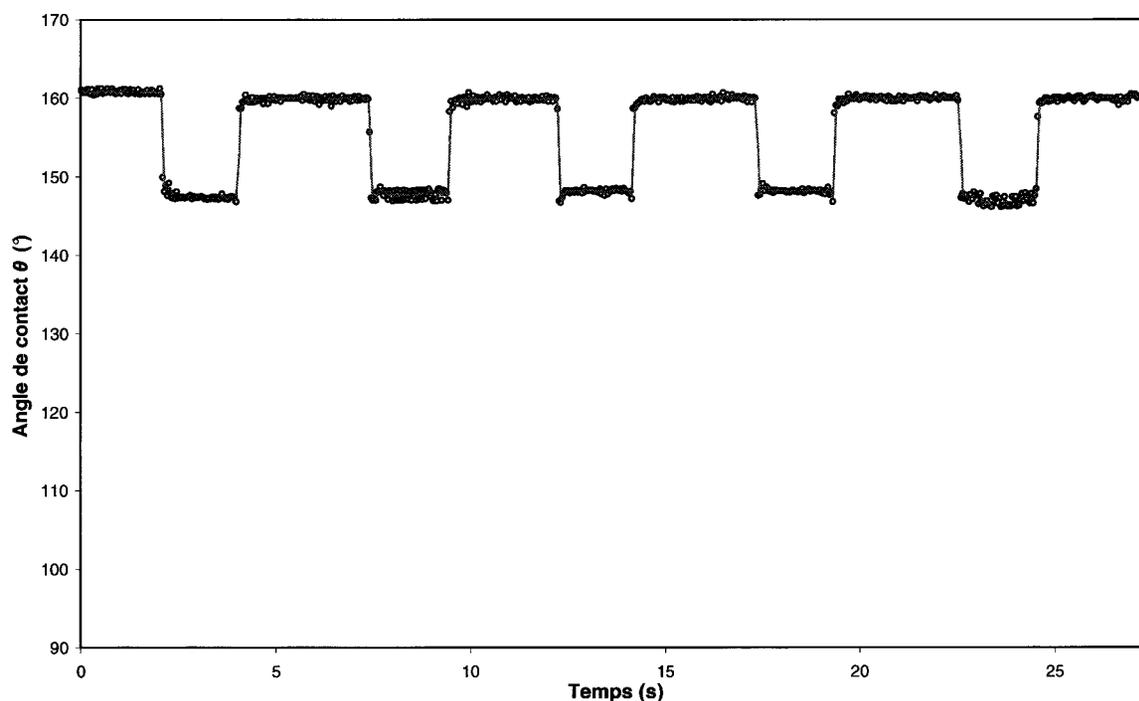


Figure 4.21 - Effet EWOD réversible sur nanofils superhydrophobes recouverts de C_4F_8 . Sans tension, l'angle de contact est de $161,5^\circ$. Lors de l'application d'un signal crête ($V=87,5V_{\max}$ @ 1kHz), l'angle chute de $14,2^\circ$. La nouvelle valeur est $147,3^\circ$. Dès que la tension est coupée, la goutte retrouve sa configuration initiale (160°).

Il est possible de mesurer, grâce aux résultats précédents, les temps de transition entre les deux états. On observe sur les graphes suivants (Figure 4.22 et Figure 4.23) que le temps de relaxation est similaire à celui d'étalement. Le temps d'étalement τ_e est de l'ordre de 45ms alors que le temps de relaxation τ_r observé est de 40ms. Ces résultats sont à mettre en perspective par rapport à la vitesse de prise de vue de la caméra du goniomètre, limitée à 25 images par seconde, ce qui correspond à un intervalle de 40ms entre deux mesures. Le temps de relaxation est donc inférieur ou égal à 40ms mais aucune valeur précise ne peut être déterminée à partir de ces mesures.

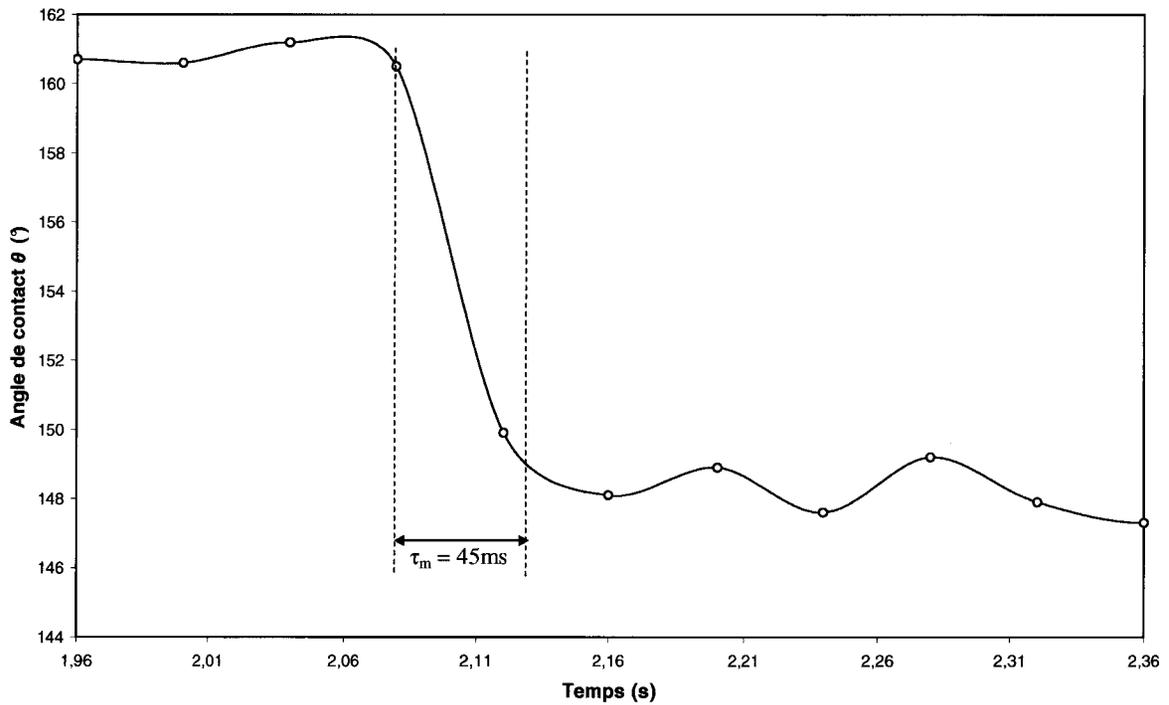


Figure 4.22 - Temps de mouillage de la goutte lors de l'application d'une tension ($87,5V_{\max}$ @ 1kHz). Le temps de mouillage est de 45ms au maximum.

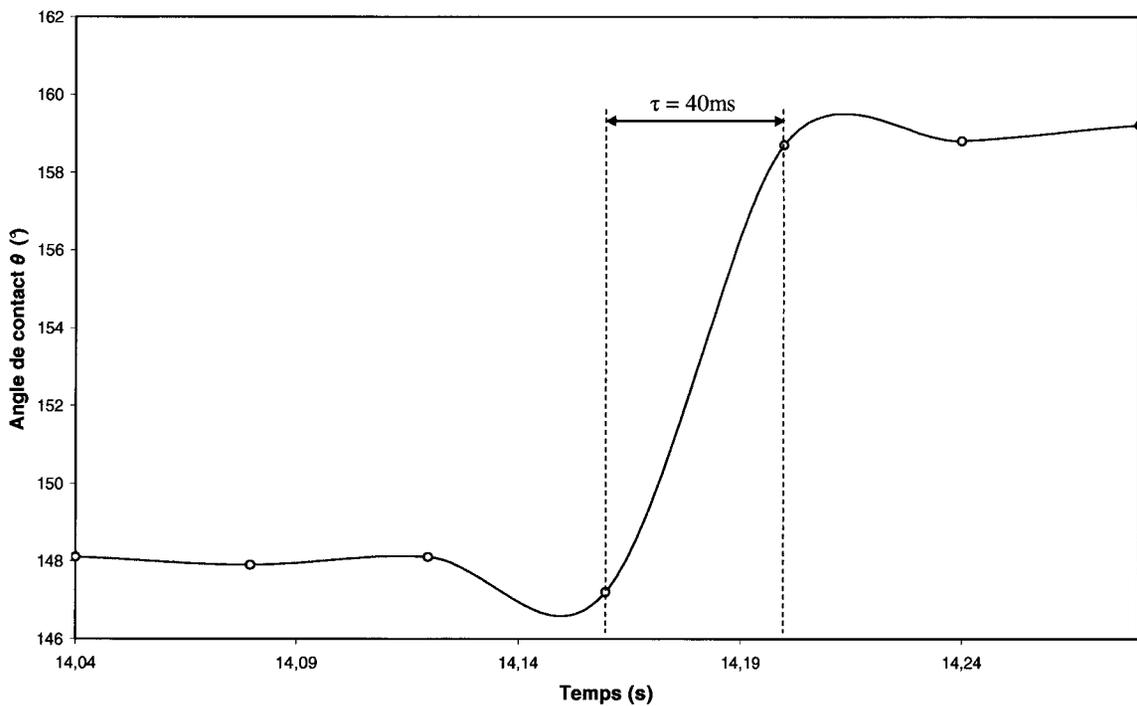


Figure 4.23 - Temps de relaxation de la goutte une fois la tension coupée. La relaxation dure 40ms au maximum (temps entre deux mesures).

Les transitions sont extrêmement rapides et sans doute dues à la très faible hystérésis de la surface. La goutte doit être expulsée des nanofils dès coupure de la tension.

5.1.5. Discussion

Une analyse détaillée de la Figure 4.21 montre que l'angle de départ de $161,5^\circ$ se stabilise à 160° dès la première relaxation. Lors des relaxations suivantes, l'angle conserve cette dernière valeur.

Deux explications de ce phénomène peuvent être avancées. La première serait un démouillage partiel, identique à celui présenté dans la littérature¹³. Ainsi, dans les travaux de McHale, l'angle passe de 152° à 90° sous 130V et se limite à 114° une fois la tension coupée. Dans notre cas, nous ne perdons que $1,5^\circ$.

La seconde serait liée à la technique de dépôt de la goutte. En effet, compte tenu de la superhydrophobicité de la surface, la goutte peut ne pas être posée complètement mais plutôt suspendue par la pointe de l'aiguille. Dans ce cas, la première application de tension 'attire' la goutte sur la surface. Elle se retrouve alors posée sur les nanofils. L'angle de goutte ne serait donc pas de $161,5^\circ$ mais plutôt de 160° .

Tout cela ne reste bien entendu que supposition. Il est en effet très délicat de travailler sur des surfaces superhydrophobes. Non seulement, le dépôt de goutte est techniquement complexe (passage d'une aiguille hydrophobe à une surface superhydrophobe), mais également son maintien sur la surface est délicat, la moindre inclinaison la faisant rouler hors du substrat.

Toutefois, les résultats obtenus montrent pour la première fois la possibilité d'obtenir un effet EWOD totalement réversible sur surface superhydrophobe. Parmi les surfaces testées, seule une, qui présente une grande hauteur de nanofils ($30\mu\text{m}$) et une densité importante, répond à nos attentes. Nous tenterons dans la partie suivante de faire le lien entre la topologie de la structure et le comportement de la goutte lors de l'électromouillage. D'autre part, bien que réversible, la variation d'angle obtenue est de 13° . Il peut être délicat de réaliser des opérations standard en microfluidique (création et scission de goutte).

Cette variation est en fait limitée par le phénomène d'électrolyse observé à partir de $87,5V_{\text{max}}$. La manipulation de liquides plus conducteurs (solution saline de KCl 100mM) entraîne également une électrolyse dès l'application de quelques volts. Ceci s'explique par l'absence de diélectrique. Afin d'élargir la plage de tension accessible sans détérioration des surfaces et d'amplifier la variation d'angle de contact, nous avons, comme dans le cas d'un système EWOD classique, inséré un diélectrique. Nous nous sommes tournés vers le SiO_2 qui supporte la température nécessaire à la croissance des nanofils.

5.2. Nanofils sur SiO_2 , dans l'air

Contrairement aux structures testées habituellement dans lesquelles le diélectrique est situé entre la nanostructure et le matériau hydrophobe, nous avons choisi de placer le SiO_2 sous la couche de nanofils et non directement sous la couche de C_4F_8 .

Plusieurs raisons à cela :

- Etant donné que les nanofils sont terminés par une nanoparticule d'or, il n'est pas possible de faire croître du SiO_2 à 1100°C : l'or passerait par une étape d'évaporation polluant le four de croissance.
- De plus, retirer l'or au préalable est une opération délicate : sans modification de surface, les nanofils de silicium sont hydrophiles, une attaque humide entraîne donc une agglomération des nanofils entre eux, annulant toutes les propriétés liées à la texturation.

Après étude des différentes topologies de nanofils réalisées auparavant, l'échantillon 8 a été sélectionné afin d'étudier l'électromouillage sur surface superhydrophobe avec présence de diélectrique. De plus, l'étude de l'influence de la conductivité de la goutte s'est révélée possible par l'utilisation, en plus de l'EDI, de deux solutions salines (KCl) de concentration 14mM et 100mM.

5.2.1. Présentation du système

Un substrat de silicium de type p, d'orientation $\langle 100 \rangle$ et de résistivité $0,009-0,01\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ est recouvert de 300nm d'oxyde par croissance thermique sèche (Figure 4.24). Les nanofils ont ensuite été réalisés avec les paramètres de l'échantillon 8 présentés précédemment :

- dépôt de 4nm d'or par évaporation,
- croissance des nanofils ($T=500^\circ\text{C}$, $Q=40\text{sccm}$, $P=0$, 4T , $t=60\text{min}$).

L'état de surface est comparable à la surface précédente, c'est-à-dire sans diélectrique.

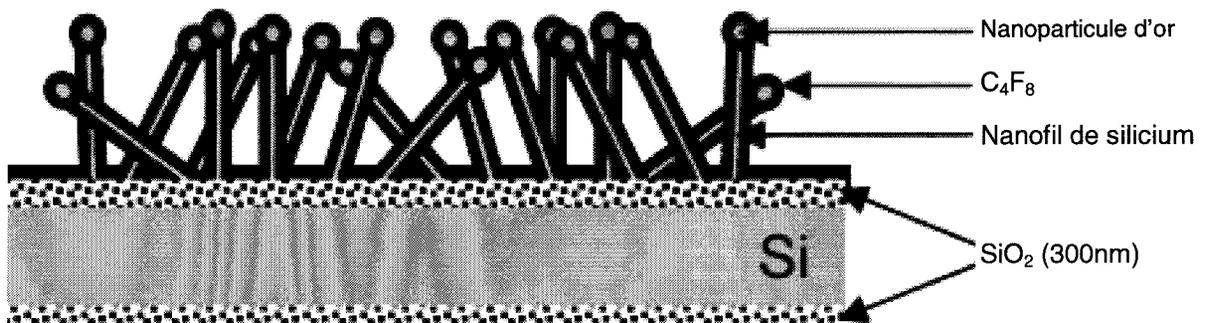


Figure 4.24 - Présentation du micro-système pour l'étude de l'EWOD réversible sur nanofils superhydrophobes.

Notons que, dans cette configuration, la présence de SiO_2 sur la face arrière du substrat introduit une couche diélectrique supplémentaire.

5.2.2. Résultats

De même que lors des essais précédents (échantillon 8 sans diélectrique), le phénomène d'électromouillage réversible a été observé (Figure 4.25). La variation d'angle est équivalente au système précédent ($\sim 14^\circ$ à $87,5V_{\text{max}}$). Toutefois, il a été possible d'appliquer des tensions beaucoup plus importantes sans détériorer la couche hydrophobe.

Ainsi, la variation d'angle maximale obtenue est nettement supérieure aux résultats précédents (Figure 4.18). Sous une tension de $150V_{max}$, l'angle chute de 23° (contre $14,2^\circ$ sans diélectrique) pour atteindre une valeur de 137° . Une fois la tension coupée, la goutte reprend sa configuration initiale, l'effet est totalement réversible.

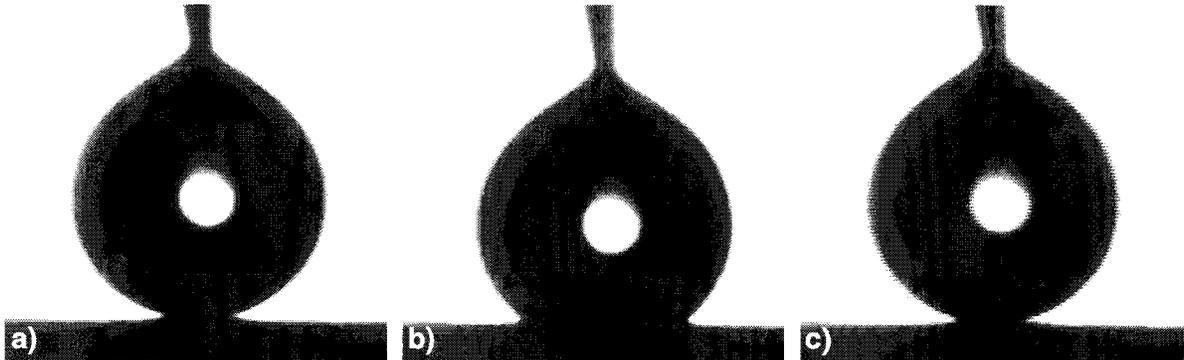


Figure 4.25 - Effet EWOD observé sur une goutte déposée sur une surface de nanofils de silicium superhydrophobes (échantillon 8) avec présence de SiO_2 sous la couche de nanofils. a) Aucune tension n'est appliquée, b) une tension de $150V_{max}$ est appliquée ($f=1kHz$), c) la tension est coupée, la goutte retrouve son état initial.

5.2.3. Influence de la tension sur l'angle de contact

La réversibilité est possible avec les trois liquides utilisés (EDI, KCl 14mM, KCl 100mM). Il n'a pas été observé de différence notable entre ces liquides (Figure 4.26). Ici aussi, comme le montre la Figure 4.27, l'évolution est quasi linéaire, suivie d'une saturation à partir de $150V_{max}$ (mesurée pour la solution de KCl (100mM)). Le résultat est donc conforme à celui attendu.

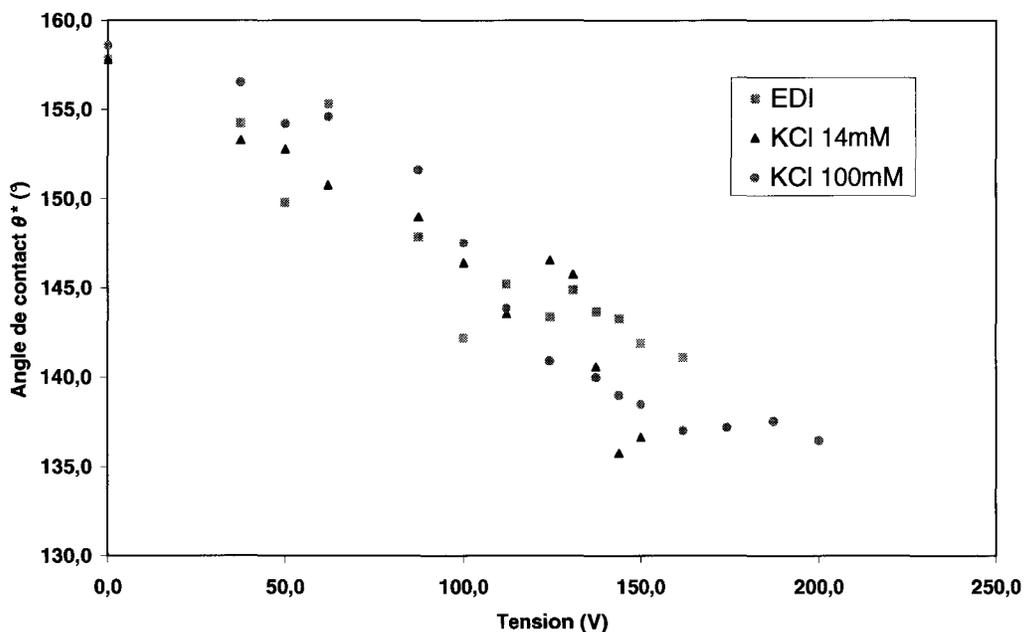


Figure 4.26 - Evolution de l'angle de contact apparent θ^* en fonction de la tension appliquée selon la conductivité de la goutte dans un environnement d'air.

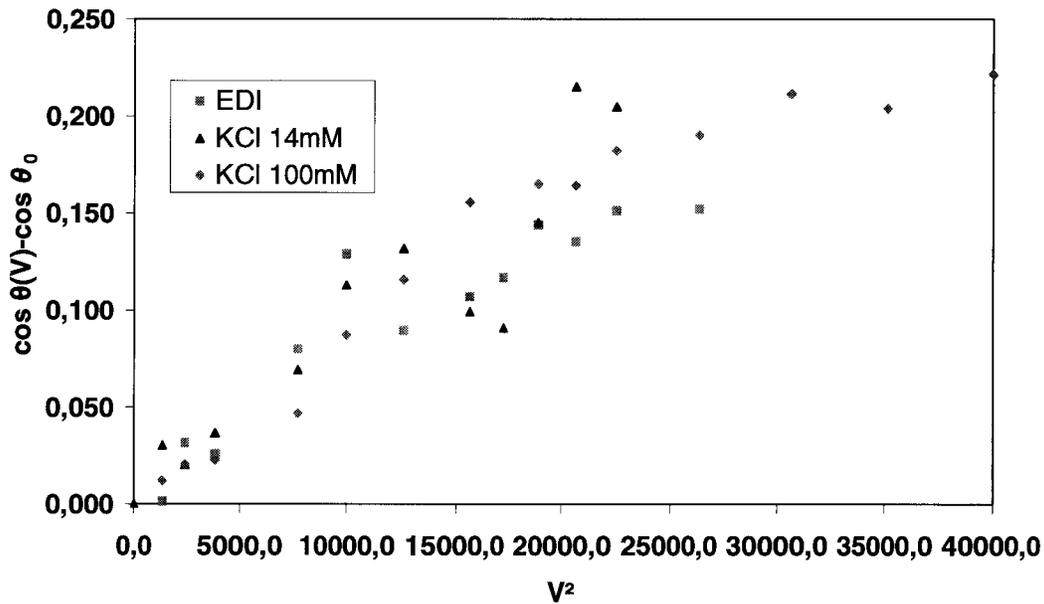


Figure 4.27 - Evolution de la différence de $\cos \theta^*(V) - \cos \theta_0^*$ en fonction de la tension au carré (relation de proportionnalité selon l'équation de Lippmann) selon la conductivité de la goutte dans un environnement d'air.

Notons que la variation d'angle de contact sur surfaces superhydrophobes est nettement inférieure à celle obtenue sur surfaces planes : nous passons d'une surface superhydrophobe (160°) à une surface très hydrophobe (137°). Torkke li a exprimé cela au travers d'une équation de Young-Lippmann faisant intervenir les angles apparents ainsi que la fraction de surface définie par Cassie et Baxter¹⁸. Cette équation de Young-Lippmann pour surface superhydrophobe est notée :

$$\cos \theta^*(V) = \cos \theta_0^* + \phi_s \frac{\epsilon_0 \epsilon_r V^2}{2\gamma e} \quad (4.2)$$

En prenant pour valeur $\phi_s=8\%$, $\epsilon_0=8,854 \cdot 10^{-12}$, $\epsilon_r=3,9$, $V=150V$, $\gamma=72mN \cdot m^{-1}$ et $e=600nm$, l'angle théorique résultant est de 102° sous $150V_{max}$. Cette valeur s'applique sans trop d'erreur à des surfaces bien définies géométriquement¹³⁻¹⁴. Par contre, comme nous le détaillerons par la suite, nos surfaces ont une topologie extrêmement hétérogène. La fraction de surface et l'épaisseur sont donc peu précises. Ceci explique l'écart important entre cet angle théorique et nos valeurs expérimentales.

Herbertson *et al.* affinent quant à eux cette formule en faisant intervenir deux épaisseurs : l'épaisseur du diélectrique avec et sans nanostructure, notées respectivement e_1 et e_2 ¹³ :

$$\cos \theta^*(V) = \cos \theta_0^* + \left(\frac{\phi_s}{e_1} + \frac{1-\phi_s}{e_2} \right) \frac{\epsilon_0 \epsilon_r V^2}{2\gamma} \quad (4.3)$$

Dans notre cas, le pilier est conducteur puisqu'il s'agit d'un nanofil de silicium. Cette formule n'est donc pas utilisable.

5.2.4. Reproductibilité

La reproductibilité du phénomène lors d'une succession de cycles a été démontrée et une partie de ces cycles est présentée Figure 4.28.

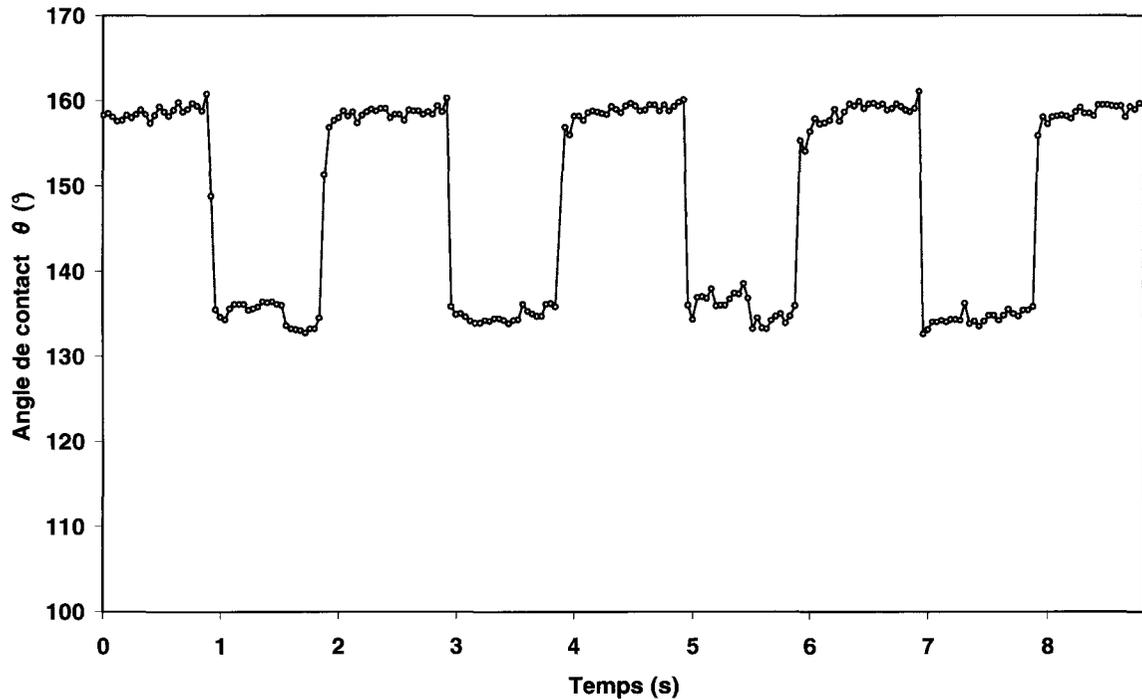


Figure 4.28 - Effet EWOD réversible sur nanofils superhydrophobes recouverts de C_4F_8 avec diélectrique. Sans tension, l'angle de contact est de $160 \pm 2^\circ$. Lors de l'application d'un signal crête à crête ($V=150V_{max}$ @ 1kHz), l'angle chute de 23° . La nouvelle valeur est 137° . Dès que la tension est coupée, la goutte retrouve sa configuration initiale (160°).

Les temps de transition sont sensiblement comparables aux résultats précédents et sont présentés ci-dessous.

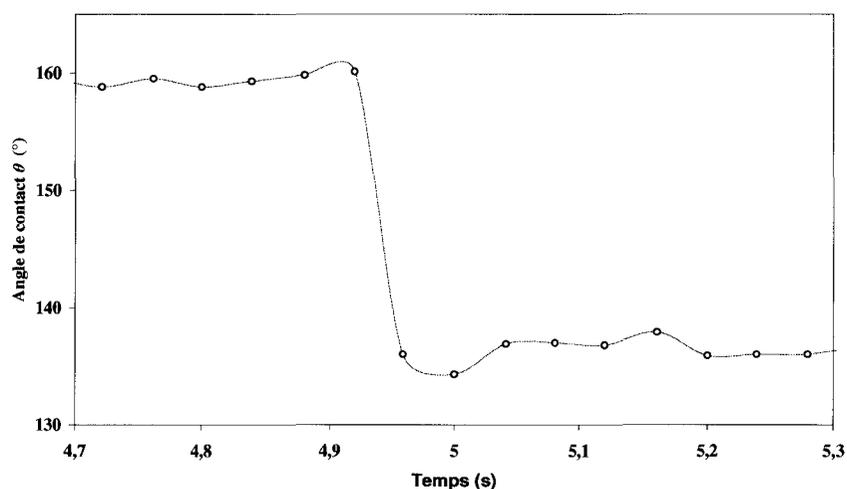


Figure 4.29 - Temps de mouillage de la goutte lors de l'application d'une tension ($150V_{\max}$ @ 1kHz). Le temps de mouillage est de 45ms au maximum.

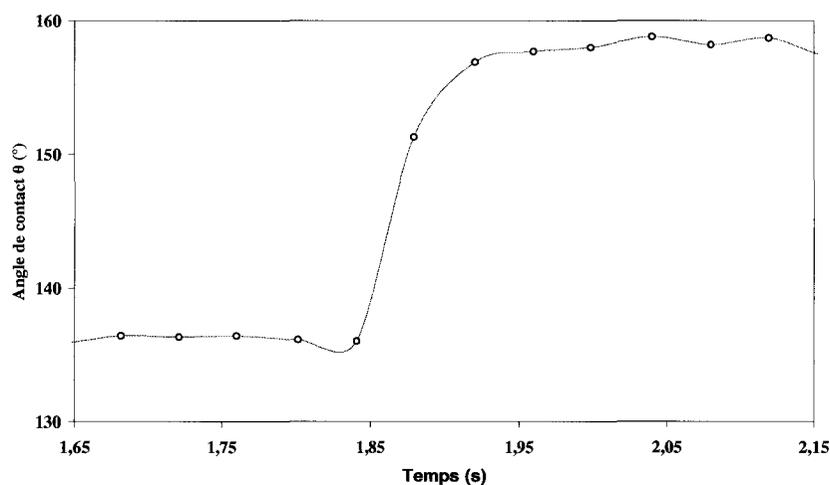


Figure 4.30 - Temps de relaxation de la goutte une fois la tension coupée. La relaxation dure 40ms au maximum (temps entre deux mesures).

5.2.5. Discussion

Du fait de la très faible hystérésis et de la plus grande variation d'angle, la relaxation est souvent associée à un saut de la goutte lors d'une transition abrupte entre une tension de $150V_{\max}$ et une tension nulle (Figure 4.31).

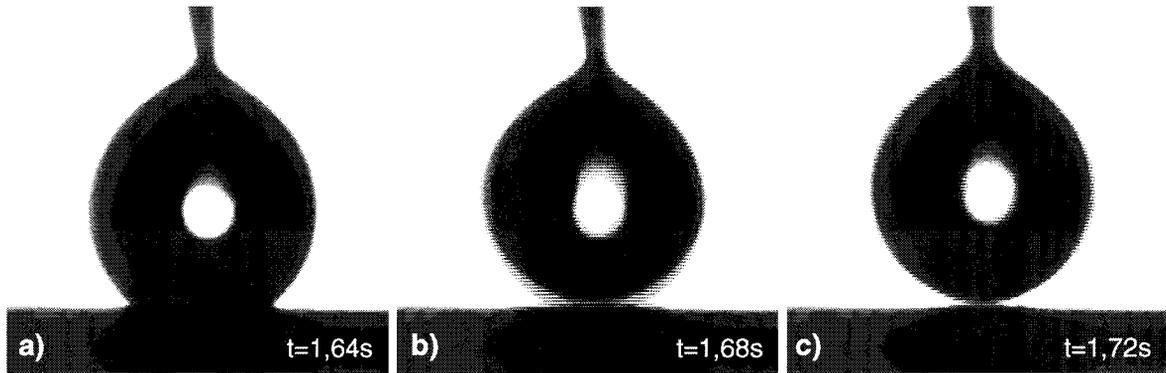


Figure 4.31 - Saut de la goutte lors de la relaxation entraînée par la coupure de tension.

Ce saut de goutte montre la capacité de la surface à repousser la goutte même après mouillage. Il s'agit littéralement du phénomène appelé *water-repellency*¹⁹.

Une question peut se poser quant à l'évolution de l'hystérésis sous tension. En effet, on imagine le liquide entrer dans la nanostructure. Ainsi, l'interface liquide/solide augmente, et *a priori*, l'hystérésis également.

Cependant, nous avons constaté que la goutte pouvait glisser lors de l'effet d'électromouillage et ceci sans modification apparente de l'angle de reculée. Cet effet est visible sur la Figure 4.32. Les deux photos représentent la goutte à des instants relativement proches lors de l'application de la tension. Il n'y a donc pas d'hystérésis (mesurable), de l'air doit se retrouver sous la goutte et nous restons dans une configuration équivalente à Cassie-Baxter. C'est sans doute cette propriété qui permet la réversibilité. Malgré l'hystérésis non mesurable, celle-ci a tout de même dû augmenter légèrement en raison d'une augmentation de l'interface liquide/solide liée à l'effet d'électromouillage.

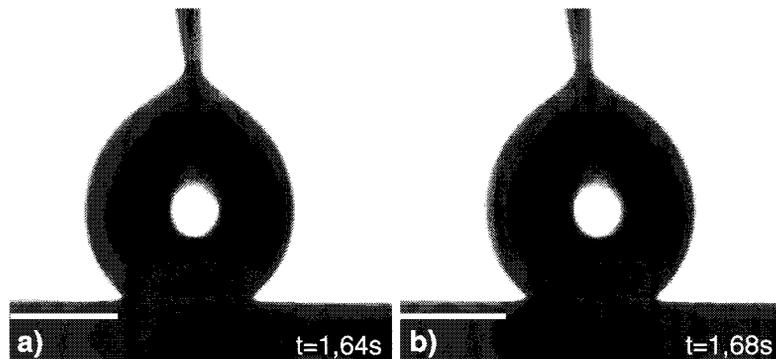


Figure 4.32 - Glissement de la goutte d'eau lors de l'application de la tension, qui dénote l'absence d'hystérésis. La goutte n'est retenue que par l'aiguille.

L'étude approfondie de la surface peut expliquer le piégeage de l'air. En regardant les surfaces réalisées à forte pression, on constate qu'il y a, dans chaque cas, deux niveaux bien distincts de nanofils (Figure 4.33.a).

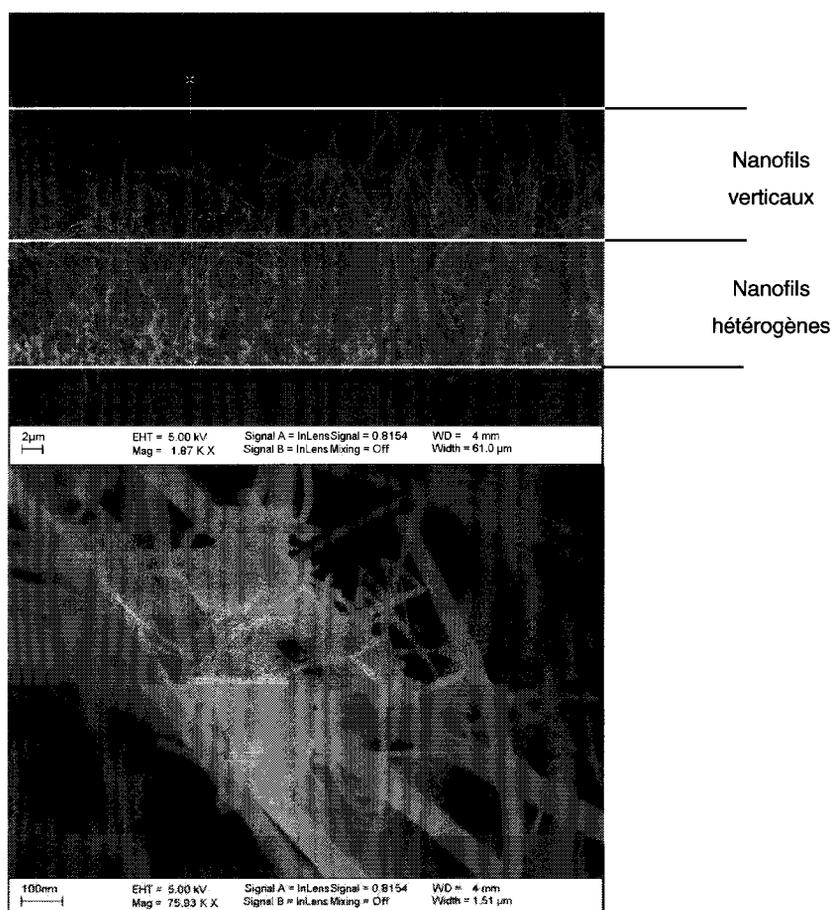


Figure 4.33 - Conformation des nanofils : a) niveau inférieur : importante densité de nanofils présentant des orientations très hétérogènes, niveau supérieur : nanofils quasi verticaux présentant une densité moindre, b) la sous-couche est constituée de nombreux noeuds de nanofils.

Un premier niveau (appelé niveau inférieur) contient des nanofils extrêmement denses et leur orientation est très hétérogène. Il y a même présence de nœuds de nanofils (Figure 4.33.b). Alors que pour le second niveau (niveau supérieur), ils sont présents avec une densité moindre et leur croissance s'est effectuée verticalement. On peut aisément faire le lien entre cette structure et les surfaces à double texturation déployées par la nature²⁰.

Nous pouvons, à partir de là, avancer un premier scénario possible expliquant le phénomène réversible de la goutte sur ce type de surface. Au repos (tension nulle), la goutte est posée sur un très faible pourcentage de la surface : les nanofils verticaux du niveau supérieur. Une fois la tension appliquée, la goutte descend jusqu'au niveau inférieur mais ne peut s'infiltrer plus profondément dans celui-ci. Il reste donc toujours de l'air sous la goutte, évitant l'effet ventouse.

Ce scénario doit pouvoir s'appliquer à toutes les surfaces étudiées, réalisées avec ou sans SiO_2 . Or, toutes les surfaces présentant cette double texturation (en particulier les échantillons sans SiO_2 : 2, 4, 6, 9 et 10) ne présentent pas la même réversibilité totale. Une étude en cours est menée en collaboration avec Ralf Blossey de l'IRI pour valider cette hypothèse et comprendre quels paramètres permettent la relaxation totale. Les premiers éléments de cette étude théorique seront présentés paragraphe 6.

5.3. Nanofils sur SiO₂, dans l'huile

5.3.1. Présentation du montage

Afin de comparer nos résultats à ceux de la littérature¹⁴, nous avons entrepris, en parallèle, la caractérisation de nos surfaces dans un environnement d'huile. Notons que cette configuration n'entre pas dans les applications envisagées dans le cadre de cette thèse.

Pour cette étude, nous utilisons les mêmes surfaces que dans l'air (échantillon 8). Cependant, il est nécessaire d'immerger le système complet, avec la goutte, dans un environnement d'huile. Un schéma du montage est présenté Figure 4.34.

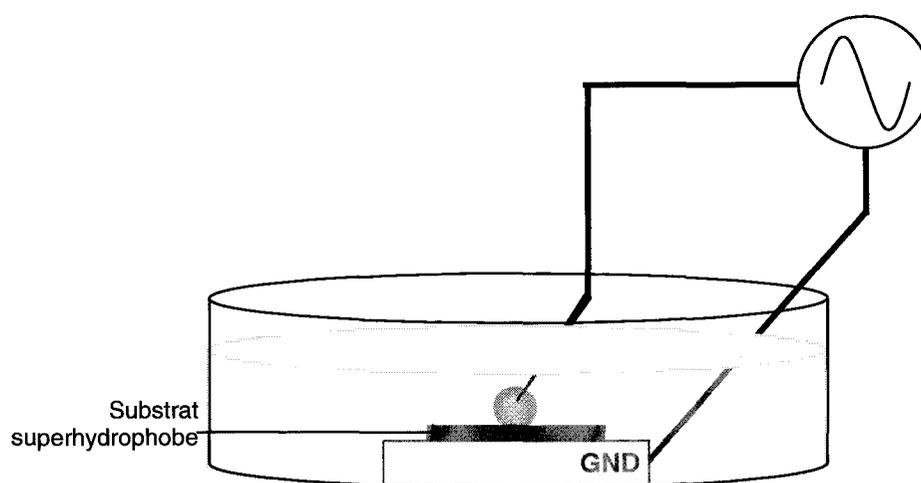


Figure 4.34 - Schéma de principe du montage pour la caractérisation de l'effet EWOD sur surfaces superhydrophobes dans un environnement d'huile.

La goutte utilisée a un volume supérieur à celle utilisée dans l'air car, lorsqu'elle est trop légère, celle-ci remonte à la surface. Le volume est donc d'environ 12 μ L. La gravité intervient et écrase légèrement la goutte. De plus, les photographies présentées sont légèrement déformées par la forme circulaire du cristalliseur (Figure 4.35).

5.3.2. Résultats

L'électromouillage sur l'échantillon 8 est également réversible dans un environnement d'huile (Figure 4.35). Comme expliqué en début de chapitre, l'angle de contact apparent dans l'huile est supérieur à celui dans l'air. Il passe de 160° à 164°. Pour une tension équivalente, la variation d'angle est nettement plus importante dans l'huile que dans l'air. A 150V_{max}, pour une goutte de solution saline de concentration 100mM en KCl, l'angle de contact apparent chute à 106°. Après coupure de la tension, l'effet est totalement réversible, la goutte revient à sa position initiale.

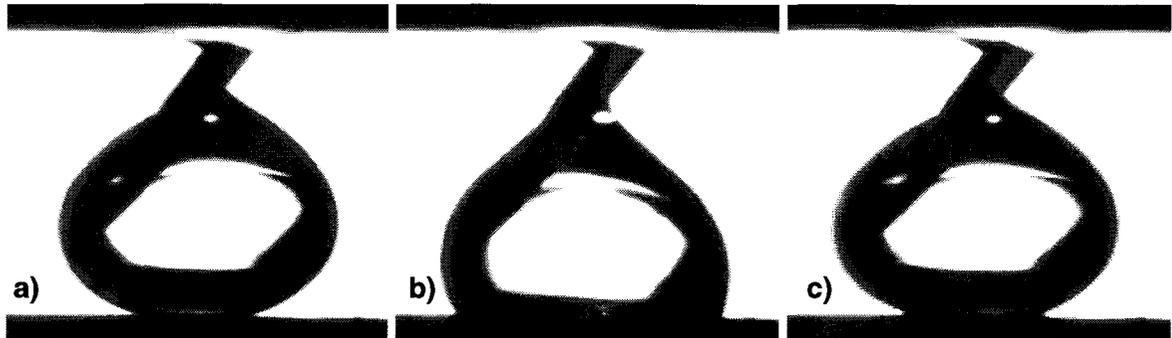


Figure 4.35 - Effet EWOD observé sur une goutte déposée sur une surface de nanofils de silicium superhydrophobes (échantillon 8) avec présence de SiO_2 sous la couche de nanofils dans un environnement d'huile (undecane). a) Aucune tension n'est appliquée, b) une tension de $150V_{\text{max}}$ est appliquée ($f=1\text{kHz}$), c) la tension est coupée, la goutte retrouve son état initial.

5.3.3. Influence de la tension sur l'angle de contact

Il est intéressant de noter l'influence de la conductivité du liquide sur la variation d'angle comme le montrent les Figure 4.36 et Figure 4.37. Dans l'air, la conductivité du liquide influence peu la variation de l'angle. Dans l'huile, la variation d'angle passe de 155° à $150V_{\text{max}}$ pour une goutte d'EDI pure à 106° pour une goutte de solution saline (100mM KCl)

Cette variation est par ailleurs plus importante que celle observée dans la littérature par Dhindsa *et al.* qui obtiennent une variation d'angle maximale de 40° (de 160° à 120°) pour une goutte de solution saline dans un bain de dodécane.

Dans notre cas, et comme l'expliquent Dhindsa *et al.*¹⁴, la présence d'un film d'huile entre la goutte et la surface (Figure 4.5), doit réduire les forces de friction pour le déplacement latéral de la goutte. La ligne triple avance donc davantage et l'angle chute.

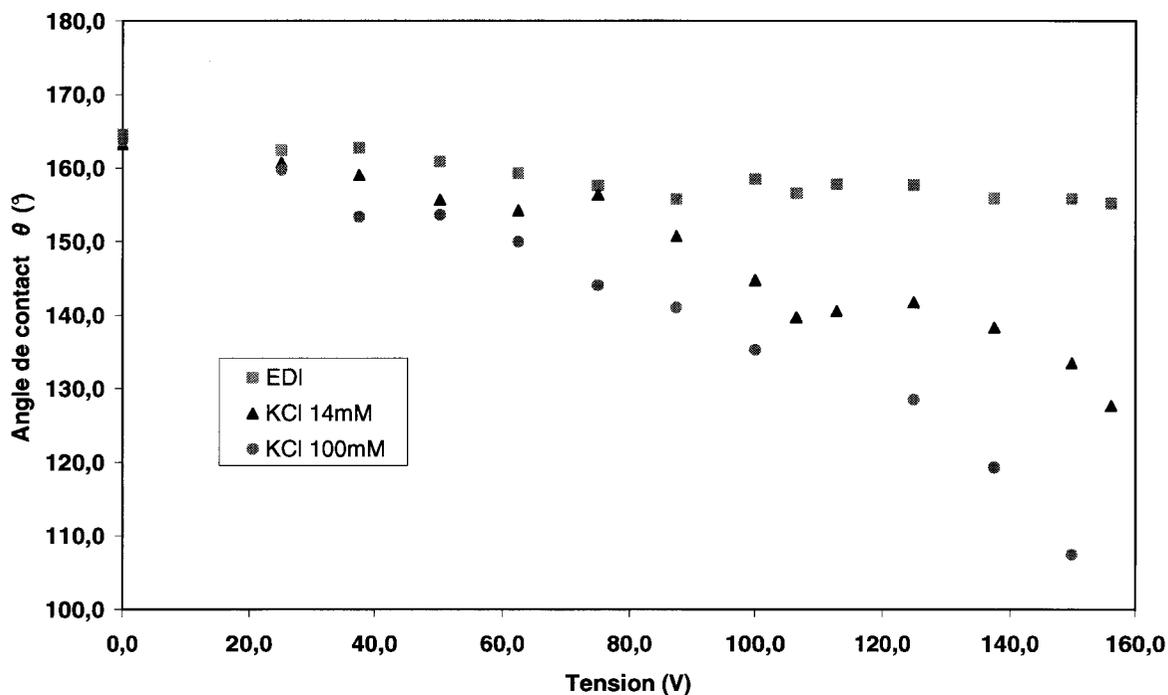


Figure 4.36 - Evolution de l'angle de contact apparent θ^* en fonction de la tension appliquée selon la conductivité de la goutte dans un environnement d'huile.

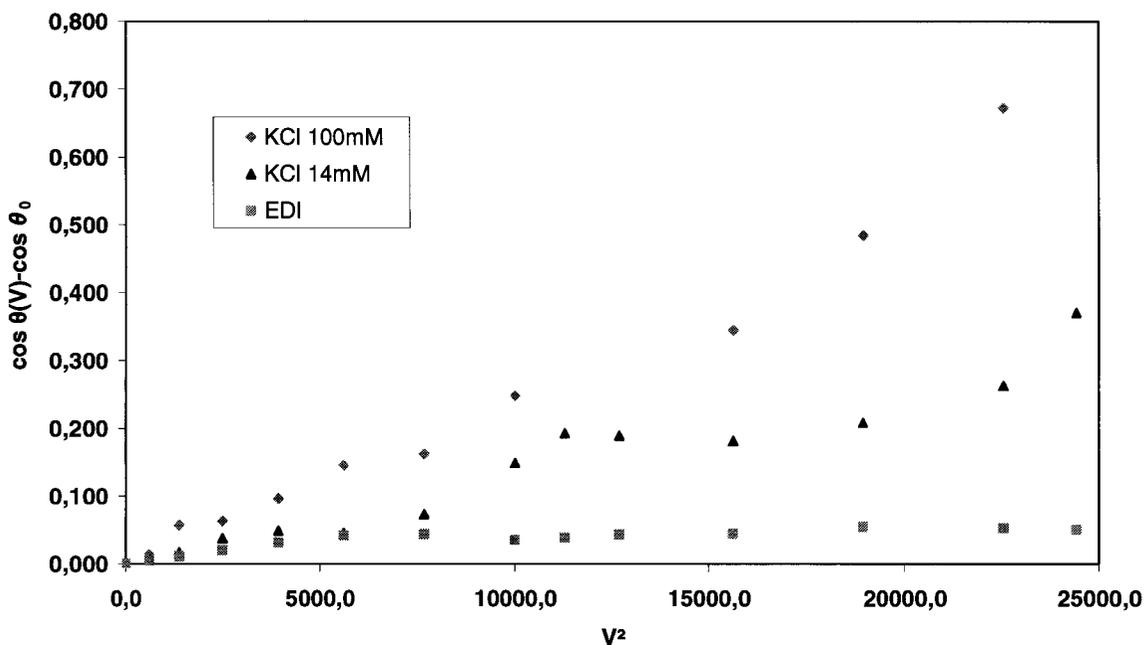


Figure 4.37 - Evolution de la différence de $\cos \theta^*(V) - \cos \theta_0^*$ en fonction de la tension au carré (relation de proportionnalité selon l'équation de Lippmann) selon la conductivité de la goutte dans un environnement d'huile.

5.3.4. Reproductibilité

Comme dans l'air, la reproductibilité du phénomène a été étudiée et validée. Cependant, aucun graphe n'est réellement interprétable. En effet, le glissement de goutte décrit plus haut fausse la mesure de nombreux points. La validation a donc été optique.

Dans ces conditions expérimentales spécifiques, nous observons le même phénomène que celui observé dans la littérature (effet réversible dans l'huile). Nous pouvons dans ce cas comparer les temps de transition relevés. Toujours de l'ordre de 40ms dans notre cas, ils sont très largement inférieurs à ceux présentés dans la littérature (de 1 à 3s)¹⁴.

5.3.5. Discussion

La question de la valeur de l'hystérésis reste posée lors de l'application de la tension. Comme dans l'air, la goutte glisse sur la surface et ceci sans modification apparente de l'angle de reculée. Il n'y a donc pas d'hystérésis (mesurable), nous restons dans une configuration de Cassie-Baxter. Cet effet est visible sur la Figure 4.38. Les trois photos représentent la goutte à des instants relativement proches lors de l'application de la tension. La goutte est maintenue en place uniquement par l'aiguille hydrophile.

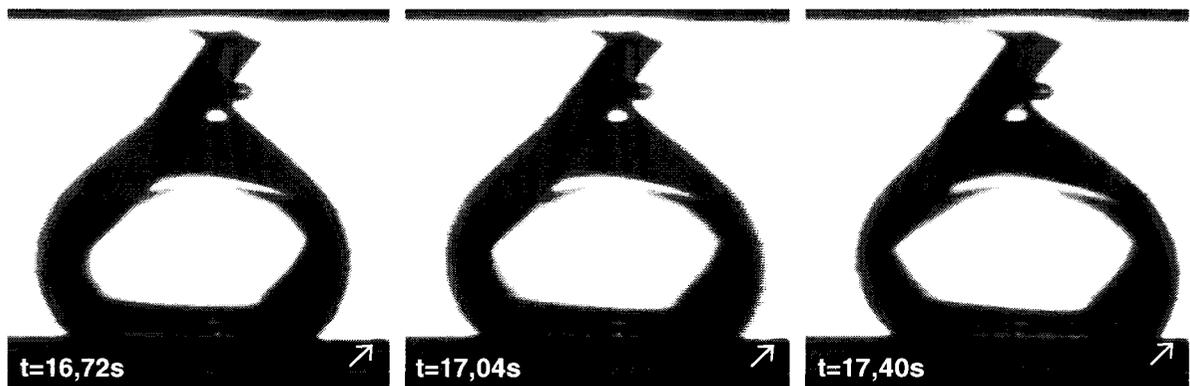


Figure 4.38 - Glissement de la goutte d'eau lors de l'application de la tension, qui dénote l'absence d'hystérésis. La goutte n'est retenue que par l'aiguille. La flèche est un repère pour montrer le déplacement.

5.3.6. Conclusion

Les surfaces de nanofils de silicium permettent donc d'obtenir un effet réversible dans l'huile avec une variation d'angle nettement supérieure aux variations dans l'air. L'angle chute ainsi de 164° à 106° pour une tension de $150V_{max}$ (à 1kHz).

Il ne nous a pas été possible d'élargir notre étude aux autres surfaces étudiées dans l'air (celles-ci ne comportant pas d'oxyde) pour des raisons matérielles. L'effet dans un environnement d'huile doit être réversible pour toutes les surfaces et il serait intéressant d'étudier plus précisément la relation entre la variation d'angle et la topologie des surfaces (longueur des nanofils, densité...).

5.4. Conclusion

Un seul type de surface recouverte de nanofils (échantillon 8), obtenu pour un temps de croissance de 60min sous une pression de 0,4T pour un débit de SiH_4 de 40sccm, nous a permis d'obtenir pour la première fois un effet EWOD réversible dans l'air avec une variation d'angle de contact de 23° à $150V_{\text{max}}$ (de superhydrophobe à très hydrophobe)²¹. De plus, la variation obtenue dans l'huile (58°) est nettement supérieure aux résultats présents dans la littérature¹⁴.

Les nanofils de silicium, après avoir montré leur intérêt comme contre-électrode EWOD pour des applications biologiques (chapitre 3), pourraient permettre le déplacement de goutte sur des bases superhydrophobes. En effet, étant donnée la très faible hystérésis relevée lors de l'électromouillage, le moindre changement d'angle devrait entraîner le déplacement de la goutte.

6. Première modélisation

Cette partie a pour objectif de modéliser le comportement d'une goutte soumise à l'électromouillage sur surfaces de nanofils de silicium superhydrophobes.

Afin d'obtenir un effet d'électromouillage réversible, nous prenons comme hypothèse qu'une goutte déposée sur une surface superhydrophobe doit se retrouver dans un état de Cassie-Baxter stable avec et sans tension. Cela implique que, quelle que soit la situation, de l'air se retrouve piégé sous la goutte. Ainsi, la valeur de $\cos \theta_c$ doit être la plus faible possible afin d'offrir un maximum d'excursion possible au niveau de la variation d'angle, tout en se confinant dans une plage d'états stables (chapitre 3, Figure 3.10).

Pour déterminer cette valeur critique, nous nous appuyons sur les travaux de He *et al.* qui permettent de définir θ_c selon les paramètres géométriques d'une nanostructure bien définie²².

Considérons la structure suivante :

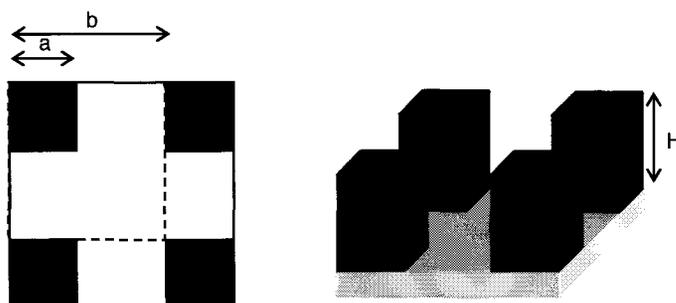


Figure 4.39 - Vue de haut et en perspective d'une structure composée de piliers carrés de côté a et de hauteur H .

Au point critique θ_c , par définition, les énergies en configuration de Wenzel et les énergies en configuration de Cassie-Baxter sont identiques. Il est donc possible de décrire :

$$\gamma_{SL}[(a+b)^2 + 4aH] = \gamma_{SL}a^2 + \gamma_{LV}(b^2 + 2ab) + \gamma_{SV}(b^2 + 2ab + 4aH) \quad (4.4)$$

Le terme de gauche représente les énergies dans la zone pointillée (contenant un seul pilier) en configuration de Wenzel. Le mouillage est total, seul γ_{SL} intervient. Le terme de droite représente la surface composite, c'est-à-dire en configuration de Cassie-Baxter.

En insérant l'équation de Young au sein de l'équation (4.4), on trouve :

$$\cos \theta_c = - \left(1 + \frac{4aH}{(a+b)^2 - a^2} \right)^{-1} \quad (4.5)$$

Il est donc possible, à partir de la structure initiale, de définir des critères géométriques bien précis pour réduire considérablement la valeur critique θ_c et donc d'obtenir un effet EWOD optimum sur surface superhydrophobe.

Compte tenu de l'extrême hétérogénéité de nos surfaces, notre situation est plus délicate et ne peut être directement appliquée à l'expression précédente. En étroite collaboration avec Ralf Blossey (IRI), nous avons, en première approche, adapté le modèle développé par le groupe de Patankar à nos surfaces.

Comme décrit précédemment, si nous observons précisément nos surfaces, nous pouvons distinguer deux niveaux de nanofils. Le niveau supérieur est constitué de nanofils verticaux et peu denses, définissant la hauteur totale de la structure. Le niveau inférieur est constitué de nanofils dont la hauteur est moindre, formant un tapis dense, rugueux et désordonné. Ces deux niveaux sont nettement visibles sur la Figure 4.33.a. Bien que de nombreuses surfaces présentent cette double texturation (échantillons 4, 6, 8, 9 et 10), seul l'échantillon 8 amène à un effet totalement réversible. Au-delà des deux niveaux de structuration, il existe donc des paramètres géométriques précis induisant la réversibilité (hauteur, diamètre, densité, rugosité). En admettant que la goutte au repos soit disposée en surface des nanofils, notre interprétation est la suivante : lorsqu'une tension est appliquée, le liquide pénètre dans la nanostructure jusqu'à l'interface entre les deux niveaux (inférieur et supérieur) où la grande densité de nanofils bloque la progression de la goutte. Ainsi, de l'air est piégé sous la goutte, l'effet est réversible.

Bien que la géométrie réelle de nos surfaces soit beaucoup plus complexe, il nous est possible d'effectuer une approche similaire à celle de He *et al.*

Afin de faciliter les calculs, nous prenons comme modèle une surface simplifiée présentée Figure 4.40. Le niveau supérieur est défini par des éléments cylindriques parfaitement verticaux (symbolisant les nanofils du premier niveau) et caractérisés par leur

hauteur et leur diamètre. Le niveau inférieur est représenté par une surface rugueuse classique, caractérisée par sa rugosité moyenne (représentant le second niveau).

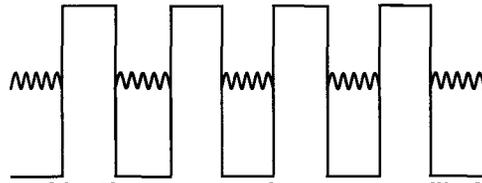


Figure 4.40 - Modélisation de la surface de nanofils à deux niveaux.

Suivant la démonstration de He *et al.*, nous nous intéressons à une zone rugueuse contenant un seul nanofil considéré comme circulaire :

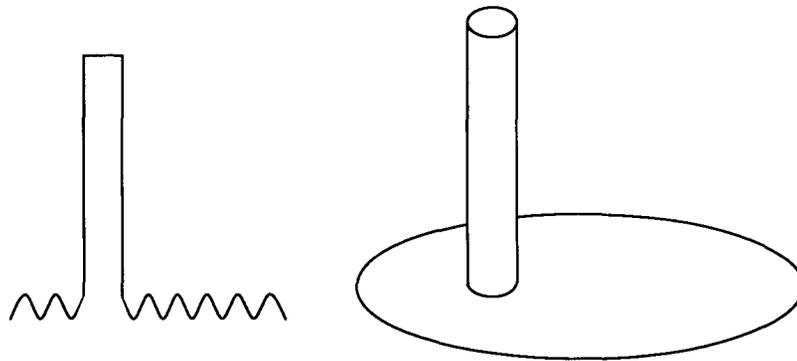


Figure 4.41 - Modèle pour la description du phénomène : un seul nanofil sur une surface définie.

Soit A_R , A_{NW} et C_{NW} respectivement l'aire de la surface rugueuse, l'aire du 'chapeau' du nanofil et l'aire du cylindre du nanofil (sans le 'chapeau'). Au point critique θ_c , il y a égalité entre les énergies en configuration de Wenzel et les énergies en configuration de Cassie-Baxter, d'où :

$$\gamma_{SL}(A_R + A_{NW} + C_{NW}) = \gamma_{SL}A_{NW} + \gamma_{LV}A_R + \gamma_{SV}(A_R + C_{NW}) \quad (4.6)$$

La factorisation de cette équation conduit à :

$$(\gamma_{SL} - \gamma_{LV} - \gamma_{SV})A_R = (\gamma_{SV} - \gamma_{LV})C_{NW}$$

En insérant l'équation de Young, on obtient :

$$\cos \theta_c = -\frac{A_R}{A_R + C_{NW}} \quad (4.7)$$

On définit la rugosité r de la surface rugueuse, avec A_F , l'aire de la surface plane, comme :

$$r = \frac{A_R}{A_F}$$

De plus,

$$C_{NW} = \pi d_{NW}H_{NW}$$

$$A_{NW} = \frac{\pi d_{NW}^2}{4}$$

On arrive alors à une expression de θ_c liée à la géométrie, c'est-à-dire la longueur et le diamètre du nanofil, la fraction de surface et la rugosité de la surface rugueuse :

$$\cos \theta_c = - \left(1 + \frac{4\phi_S H_{NW}}{d_{NW} r} \right)^{-1} \quad (4.8)$$

En posant :

$$A_{NW} = a^2$$

$$A_R = (a + b)^2 - a^2$$

$$C_{NW} = 4aH$$

on retrouve bien l'équation (4.5) du modèle de He *et al.*.

Concrètement, plus le nanofil est long et fin, plus θ_c est faible. Cependant, ces quatre paramètres sont encore très délicats à contrôler lors de la croissance des nanofils, notamment à cause de la grande dispersion dans le diamètre et la longueur des nanofils.

Ce premier modèle n'explique pas entièrement le phénomène de réversibilité de l'électromouillage sur nanofils mais apporte des premiers éléments de réponse. Un meilleur contrôle de la croissance et *a fortiori* des dimensions des nanofils permettront non seulement de comparer valeurs expérimentales et théoriques mais aussi d'affiner le modèle.

En posant une série de simplifications et d'approximations, l'objectif de ce qui précède est d'apporter des premiers éléments pour de futurs travaux : construire un modèle original susceptible de définir des critères pour un électromouillage réversible optimum, c'est-à-dire occasionnant une décroissance maximum d'angle tout en se situant dans un état de Cassie-Baxter stable.

7. Déplacement de gouttes

7.1. Présentation du système

Dans notre étude sur le déplacement, nous utilisons les échantillons de nanofils de silicium issus du procédé 8 (seuls permettant un électromouillage réversible dans l'air). Comme la croissance de tels nanofils s'effectue à 500°C, nous utilisons une base réalisée à partir de procédés haute température mis au point au cours de cette thèse. Les électrodes sont en silicium cristallin ou polysilicium et recouvertes de SiO₂ comme diélectrique. Il n'est pas utile de travailler sur substrat transparent car la couche de nanofils, étant donné son épaisseur, est opaque. Nous utilisons donc un substrat de silicium. La croissance de nanofils s'effectue sur le diélectrique comme dans la partie précédente. Le matériau hydrophobe est

du C_4F_8 déposé par plasma. La Figure 4.42 présente les différentes étapes de réalisation de la base superhydrophobe.

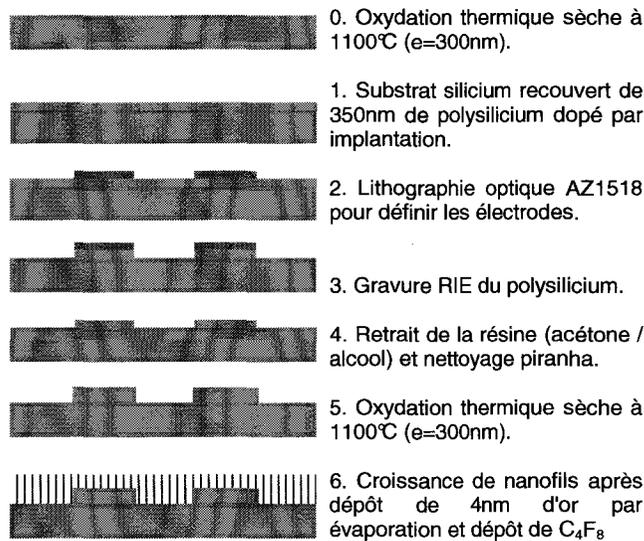


Figure 4.42 - Etapes de réalisation d'une base EWOD superhydrophobe en silicium.

Il est nécessaire de faire croître les nanofils sur la totalité du substrat. En effet, dans l'hypothèse où seules les électrodes ont un caractère superhydrophobe, la goutte, afin de minimiser son énergie, se place préférentiellement, sur la surface simplement hydrophobe. Dans ce cas, l'angle de contact apparent lors de l'application d'une tension (137°) étant supérieur à cet angle ($110-115^\circ$), il n'est pas possible d'attirer la goutte vers l'électrode.

7.1.1. Design du masque

Le masque utilisé permet les caractérisations avec un déplacement linéaire de la goutte le long de 24 électrodes. La partie du masque utilisée dans le cadre de la thèse est présentée Figure 4.43.

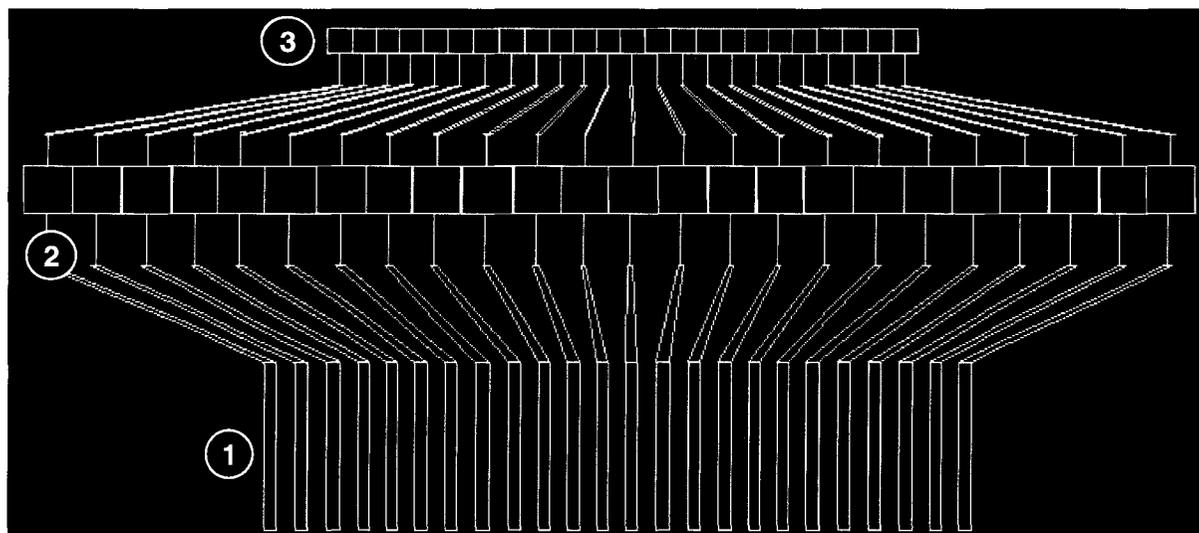


Figure 4.43 - Design utilisé pour la caractérisation du déplacement EWOD sur surfaces superhydrophobes.

Les 24 électrodes sont contrôlées via des contacts électriques (Figure 4.43.1). Il est possible de réaliser sur le même masque plusieurs lignes en parallèle. Ainsi, un seul microsystème permet de caractériser différentes tailles d'électrodes, de 2mm à 50 μ m de côté. L'espacement entre chaque électrode dépend de la taille de l'électrode. Celui-ci varie de 30 μ m pour les électrodes de 2mm à 5 μ m pour les électrodes de 50 μ m. Le tableau ci-dessous reprend l'ensemble des dimensions du design utilisé. Les électrodes utilisées sont celles de 2mm (Figure 4.43.2) et de 1mm de côté (Figure 4.43.3).

#	Largeur de l'électrode (μ m)	Espacement entre les électrodes (μ m)
1	2000	30
2	1000	20
3	800	15
4	400	15
5	200	5
6	100	5
7	50	5

Tableau 4.2 - Dimensions des électrodes pour le design utilisé.

7.1.2. Les électrodes

Les électrodes sont en polysilicium afin de pouvoir faire croître la couche de SiO₂ par oxydation thermique sèche. Une croissance de SiO₂ (300nm) a été réalisée pour isoler les électrodes du substrat. L'épaisseur de polysilicium déposée est de 350nm. Afin d'obtenir la meilleure conductivité possible, celui-ci a été dopé après le dépôt. Le dopage a été réalisé par implantation ionique d'atomes de phosphore (dose : 6,7.10¹⁴ at.cm⁻² soit 5.10¹⁹ at.cm⁻³, E=115keV) suivi d'un recuit thermique rapide (30s@1100°C).

Les électrodes sont définies par lithographie optique (Tableau 4.3) et gravés par RIE (Tableau 4.4 - Annexe 2).

Résine	Dépôt	Recuit 1	Insolation	Recuit 2	Révélation
AZ1518	3500/2000/12	90sec@110°C	74mJ.cm ⁻²	3min@130°C	20sec@MF319

Tableau 4.3 - Paramètres de dépôt d'une couche AZ1518 d'épaisseur 1,5µm.

Matériau	Gaz 1 / Débit	Gaz 2 / Débit	Gaz 3 / Débit	Puissance	Pression	Temps
Polysilicium	SF ₆ / 12sccm	O ₂ / 10sccm	N ₂ / 10sccm	55W	25mT	5'40"

Tableau 4.4 - Paramètres de gravure RIE de 350nm de polysilicium dopé (masque en résine AZ1518).

Après gravure, la résine est dissoute à l'acétone. La plaque est ensuite rincée à l'alcool isopropylique. Un nettoyage au mélange piranha permet de retirer les dernières traces organiques présentes sur le substrat avant son introduction dans le four.

7.1.3. Le diélectrique

Le diélectrique utilisé est le dioxyde de silicium. Afin d'isoler efficacement les électrodes du liquide, les substrats contenant les électrodes sont introduits dans un four à 1100°C, ce qui conduit à une croissance d'oxyde (oxydation thermique sèche) d'épaisseur 300nm.

Lors de cette étape, l'oxyde recouvre l'intégralité du polysilicium, y compris les contacts électriques. Il faut donc graver le SiO₂ à cet endroit afin de ne pas avoir un diélectrique supplémentaire inutile, qui impliquerait une plus forte tension pour obtenir un effet d'électromouillage. La gravure se fait par RIE avec les paramètres présentés Tableau 4.5. Un masque en résine AZ1518 de 1,5µm d'épaisseur protège le reste du substrat (paramètres du Tableau 4.3).

Matériau	Gaz 1 / Débit	Gaz 2 / Débit	Puissance	Pression	Temps
SiO ₂	CHF ₃ / 40sccm	CF ₄ / 40sccm	125W	50mT	12 min

Tableau 4.5 - Paramètres de gravure RIE de 300nm de SiO₂ (masque en résine AZ1518).

7.1.4. Validation de la nouvelle filière technologique

Avant de tenter un déplacement sur nanofils, il convient de valider les nouveaux matériaux par un déplacement EWOD classique. Nous pouvons à présent utiliser du Téflon comme couche hydrophobe. En effet, la température de recuit est compatible avec la technologie employée. Il est déposé par *spin-coating* (2000/1000/60) et recuit 10min à 160°C sur plaque chauffante puis 45min à 330°C dans un four sous flux d'azote.

Le capot utilisé pour la caractérisation est un substrat de pyrex recouvert de 20nm de nickel puis de Téflon.

La Figure 4.44 montre le déplacement d'une goutte d'EDI à une tension de 75Vmax (à 1kHz) sur des électrodes de 1,7mm de côté pour un gap de 300µm.

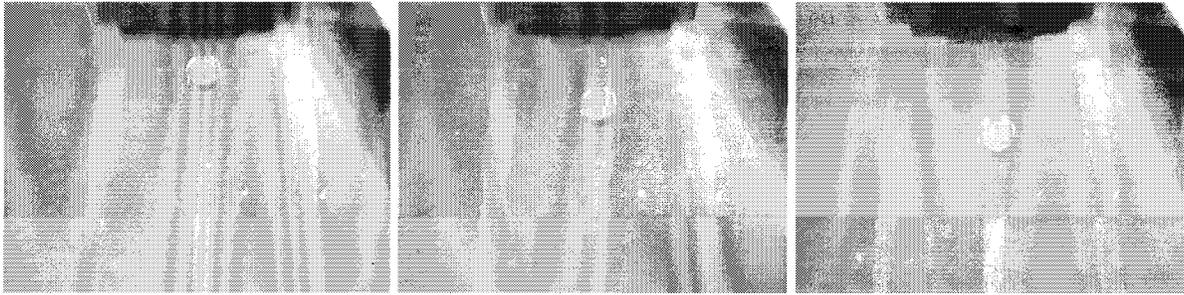


Figure 4.44 - Microsystème EWOD montrant le déplacement d'une goutte d'EDI. Les électrodes sont en polysilicium, le diélectrique est du SiO_2 et la couche hydrophobe, du Téflon. La contre-électrode est un substrat de pyrex recouvert de nickel et de Téflon. Le déplacement s'effectue sous $75V_{\text{max}}$ à une fréquence de 1kHz (signal créneau).

La nouvelle filière technologique est donc validée. Nous pouvons réaliser un microsystème sans couche hydrophobe sur lequel nous allons faire croître les nanofils.

7.1.5. Croissance des nanofils

L'accès aux contacts électriques nécessite de réaliser un *lift-off* d'or (Figure 4.45). Le masque en résine 1518 forme une casquette permettant le retrait de la résine (Tableau 4.6).

Résine	Dépôt	Recuit 1	Casquette	Insolation	Recuit 2	Révélation
AZ1518	5000/400/10	60sec@110°C	30@MIF326	78mJ.cm ²	1min@110°C	40sec@MIF726

Tableau 4.6 - Paramètre de réalisation d'un profil casquette en AZ1518 d'épaisseur 1,2µm.

L'or est ensuite déposé par évaporation (4nm). Pour le *lift-off*, la résine est retirée à l'acétone, le substrat est rincé à l'alcool isopropylique puis séché à l'azote.

Les paramètres de croissance des nanofils restent inchangés ($P=0,4T$, $Q=40\text{sccm}$, $T=500^\circ\text{C}$, $t=60\text{min}$).

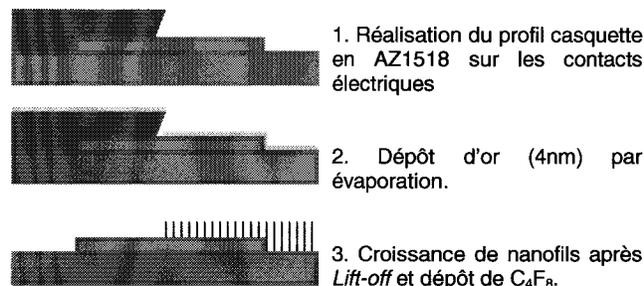


Figure 4.45 - Etapes de réalisation des nanofils de silicium avec *lift-off* pour libérer les contacts électriques.

La surface est enfin rendue superhydrophobe par dépôt d'une couche de C_4F_8 par plasma pendant 10s. La Figure 4.46 présente la base du microsystème terminée.

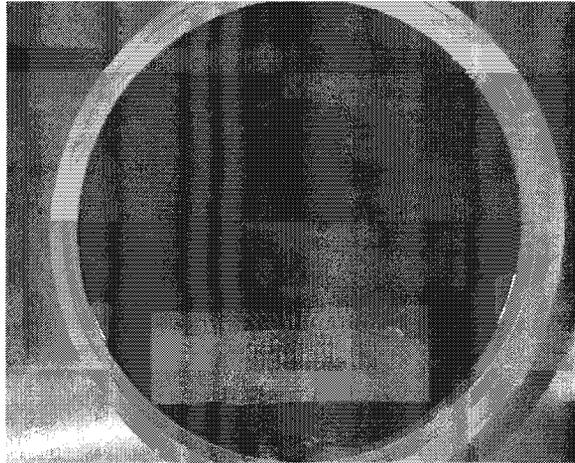


Figure 4.46 – Base du microsystème superhydrophobe sur substrat de silicium avec accès aux contacts électriques suite au *lift-off* d'or.

7.2. Caractérisation

Afin de limiter au maximum l'hystérésis, nous avons dans un premier temps essayé le déplacer la goutte à l'aide d'une caténaire, fil de cuivre de $75\mu\text{m}$, en guise de contre-électrode. Dans cette configuration, la goutte n'étant pas comprimée entre deux substrats, la surface d'interaction est très faible et ne permet pas de mouiller plusieurs électrodes simultanément. Il n'est donc pas possible de déplacer la goutte.

Il est ainsi nécessaire de travailler dans une configuration deux plans, les deux substrats étant superhydrophobes. Cependant, le banc de caractérisation utilisé actuellement ne permet pas de placer de façon parfaitement parallèle les deux substrats. Cela entraîne un glissement de la goutte en raison de l'absence d'hystérésis. Le prochain banc, dont nous avons montré le principe au chapitre 2, actuellement en cours de réalisation, devrait nous permettre la mise en place d'une telle manipulation. Une approche intéressante pourrait être de réaliser des accès capillaires (de type *via holes*) du même type que ceux réalisés dans la thèse de Torkelli¹⁸.

8. Conclusion

L'électromouillage sur des surfaces superhydrophobes, a été étudié. Les meilleurs résultats de la littérature font état d'une relaxation partielle de la goutte dans un environnement d'air une fois la tension coupée. Nous avons pu nous placer à l'état de l'art en réalisant le premier effet EWOD totalement réversible (angle de contact variant de 161° à 134° à $150\text{ V}_{\text{TRMS}}$) sur surfaces superhydrophobes (nanofils de silicium obtenus par croissance). Les mêmes caractérisations dans un environnement d'huile ont également été effectuées et ont montré de meilleurs résultats que ceux de la littérature (plus grande variation d'angle de contact). Une interprétation du phénomène ainsi que les premiers

éléments d'un modèle théorique sont présentés. Ils doivent permettre à terme d'optimiser l'effet d'électromouillage réversible. De plus, nous avons pu mettre au point la technologie nécessaire à la réalisation d'une base EWOD entièrement superhydrophobe. Malgré des difficultés de manipulation (tentatives infructueuses de déplacement de gouttes d'EDI au moyen d'une caténaire ainsi qu'avec un capot), des pistes sont envisagées pour obtenir un déplacement EWOD sur surfaces superhydrophobes : mise au point d'un banc de caractérisation optimisé, en particulier au niveau du parallélisme des substrats et des accès capillaires. Toutefois, ce travail laisse un vaste champ d'étude tant fondamental qu'applicatif.

9. Bibliographie

- ¹ N. Verplanck, Y. Coffinier, V. Thomy and R. Boukherroub, "*Wettability Switching on Nanostructured Surfaces*", *Nano. Res. Lett.* (2007) à paraître.
- ² R. Rosario, D. Gust, A.A. Garcia, M. Hayes, J.L. Taraci, T. Clement, J.W. Dailey and S.T. Picraux, "*Lotus effect amplifies light-induced contact angle switching*", *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 12640-12642.
- ³ H. Akiyama and N. Tamaoki, "*Polymers derived from N-Isopropylacrylamide and azobenzene-containing acrylamides: photoresponsive affinity to water*", *J. Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **42** (2004) 5200-5214.
- ⁴ W. Jiang, G. Wang, Y. He, X. Wang, Y. An, Y. Song and L. Jiang, "*Photo-switched wettability on an electrostatic self-assembly azobenzene monolayer*", *Chem. Commun.* **28** (2005) 3550-3352.
- ⁵ H.S. Lim, D. Kwak, D.Y. Lee, S.G. Lee and K. Cho, "*UV-driven reversible switching of a rose-like vanadium oxide film between superhydrophilicity and superhydrophobicity*", *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 4128-4129.
- ⁶ F. Xia, L. Feng, S. Wang, T. Sun, W. Song, W. Jiang and L. Jiang, "*Dual-responsive surfaces that switch between superhydrophilicity and superhydrophobicity*", *Adv. Mater.* **18** (2006) 432-436.
- ⁷ T. Sun, G. Wang, L. Feng, B. Liu, Y. Ma, L. Jaing and D. Zhu, "*Reversible switching between superhydrophilicity and superhydrophobicity*", *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004) 357-360.
- ⁸ J. Zhang, X. Lu, W. Huang and Y. Han, "*Reversible superhydrophobicity to superhydrophilicity transition by extending and unloading an elastic polyamide film*", *Macromol. Rapid Commun.* **26** (2005) 477-480.
- ⁹ J. Lee, B. He and N.A. Patankar, "*A roughness-based wettability switching membrane device for hydrophobic surfaces*", *J. Micromech. Microeng.* **15** (2005) 591-600.
- ¹⁰ T.H. Chen, Y.J. Chuang, C.C. Chieng and F.G. Tseng, "*A wettability switchable surface by microscale surface morphology change*", *J. Micromech. Microeng.* **17** (2007) 489-495.
- ¹¹ T.N. Krupenkin, J.A. Taylor, T.M. Schneider and S. Yang, "*From rolling ball to complete wetting: the dynamic tuning of liquid on nanostructured surfaces*", *Langmuir* **20** (2004) 3824-3827.
- ¹² T. Krupenkin, J.A. Taylor, P. Kolodner and M. Hodes, "*Electrically tunable superhydrophobic nanostructured surfaces*", *Bell Labs Technical Journal* **10** (2005) 161-170.
- ¹³ D.L. Herbertson, C.R. Evans, N.J. Shirtcliffe, G. McHale and M.I. Newton, "*Electrowetting on superhydrophobic SU-8 patterned surfaces*", *Sensors and Actuators A* **130-131** (2006) 189-193.
- ¹⁴ M.S. Dhindsa, N.R. Smith, J. Heikenfeld, P.D. Rack, J.D. Fowlkes, M.J. Doktycz, A.V. Melechko, and M.L. Simpson, "*Reversible electrowetting of vertically aligned superhydrophobic carbon nanofibers*", *Langmuir* **22** (2006) 9030-9034.
- ¹⁵ A. Klingner and F. Mugele, "*Electrowetting-induced morphological transitions of fluid microstructures*", *J. Appl. Phys.* **95** (2004) 2918-2920.

- ¹⁶ B. Salhi, *"Synthèse et caractérisation de nanofils et de nanostructures 3D à base de Silicium"*, Thèse de l'Université de Lille 1 (2007).
- ¹⁷ F. Saeki, J. Baum, H. Moon, J.Y. Yoon, C.J. Kim, and R.L. Garrell, *"Electrowetting on Dielectrics (EWOD): Reducing Voltage Requirement for Microfluidics"*, American Chemical Society National Meeting, Chicago, IL, August (2001).
- ¹⁸ A. Torkkeli, *"Droplet Microfluidics on a Planar Surface"*, Ph.D. Thesis, VTT Information Technology, Finland (2003).
- ¹⁹ M. Callies and D. Quéré, *"On water repellency"*, *Soft Matter* **1** (2005) 55-61.
- ²⁰ R. Blossey, *"Self-cleaning surfaces – virtual realities"*, *Nature Mat.* **2** (2003) 301-306.
- ²¹ N. Verplanck, Y. Coffinier, E. Galopin, J. C. Camart, R. Boukherroub and V. Thomy, *"Reversible electrowetting on superhydrophobic silicon nanowires"*, *Nano Lett.* **7** (2007) 813-817.
- ²² B. He, N.A. Patankar and J. Lee, *"Multiple equilibrium droplet shapes and design criterion for rough hydrophobic surfaces"*, *Langmuir* **19** (2003) 4999-5003.

Chapitre 5

Autres développements

10. Introduction

Nos compétences en microfabrication et en électromouillage ont permis d'aborder d'autres projets au cours de la thèse. La thématique reste toujours l'analyse de protéines mais s'élargit également à l'étude des cellules (cellomique).

Ce chapitre présente deux des réalisations mises au point au cours de la thèse. La première, encore en caractérisation, concerne la culture parallélisée de cellules en goutte. Pour cela, il a été nécessaire de développer un système original de valves fonctionnant par électromouillage. La seconde partie n'est plus liée à l'électromouillage mais trouve son application en imagerie MALDI et concerne le développement de caches en silicium afin d'atteindre des résolutions compatibles avec l'étude de cellules uniques.

11. Microsystème pour la culture de cellules

11.1. Les *cell-on-chip* dans la littérature

Le cœur de ce travail de thèse est centré sur l'analyse de peptides pour, à terme, permettre l'analyse d'un échantillon biologique brut contenant des protéines. La perspective du travail présenté dans la suite est de faire le lien entre les cellules biologiques et les protéines qu'elles sécrètent. L'idée est donc de concevoir, à moyen terme, un *lab-on-chip* intégrant culture de cellules et analyse protéomique. Depuis quelques années, apparaissent de nouveaux laboratoires sur puce dédiés à l'étude de cellules (ou cellomique), il s'agit des *cell-on-chip*. Ces laboratoires permettent l'étude de cellules et sont, pour la plupart, dédiés à l'analyse de la cellule unique. Nous nous intéressons ici aux laboratoires sur puce permettant une immobilisation de la cellule. Nous distinguons deux concepts différents dans le terme 'culture de cellule unique' :

- la cellule unique est immobilisée sur un plot mais reste dans le même environnement que ses congénères, elle n'est pas isolée. Il y a donc possibilité de communication intercellulaire et donc perte de certaines protéines sécrétées par les cellules.
- la cellule unique est isolée sur un plot au sein d'une goutte, avec une population réduite de cellules voire seule.

La première situation est sans aucun doute la plus répandue car elle est basée sur la microfluidique continue. Dans ce cas, une méthode appropriée d'immobilisation permet l'étude de cellules au sein du microcanal.

11.1.1. Immobilisation mécanique

Différents BioMEMS (*Micro Electro Mechanical System for Biology*) permettent la manipulation d'une cellule : les micropinces¹, les microfiltres² ou encore les micromembranes actionnées³. Dans ces cas, une étude de plusieurs cellules en parallèle semble complexe.

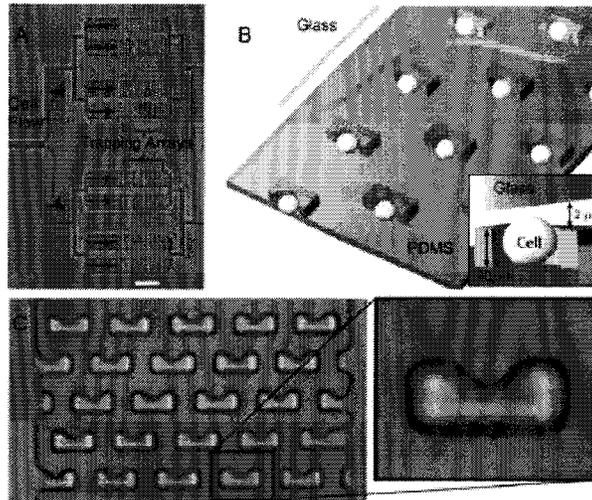


Figure 0.1 - Filtres en PDMS permettant l'immobilisation mécanique d'une cellule².

Cependant, récemment, l'équipe de Lee a amélioré la technique de microfiltre (Figure 0.1) en permettant la création de gouttes de l'ordre du nanolitre et contenant une trentaine de cellules (Figure 0.2)⁴. Ce dispositif microfluidique permet, entre autre, de maintenir les cellules dans des conditions stables avec un control optique de leur viabilité.

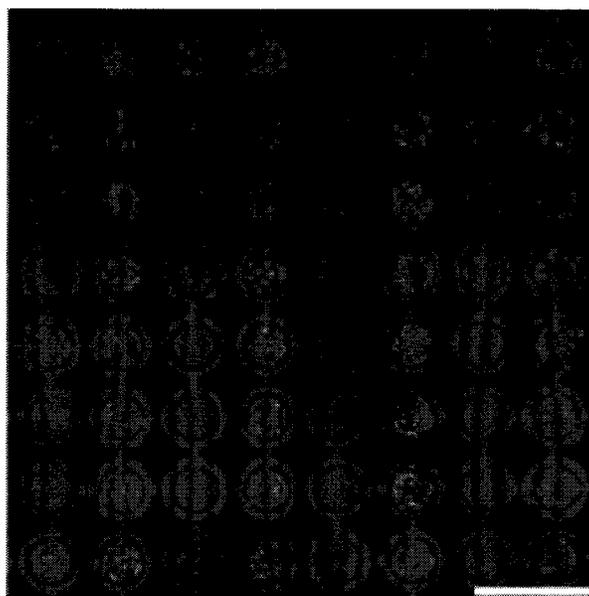


Figure 0.2 - Microbioréacteur permettant l'isolation d'une trentaine de cellules par chambre ainsi que leur excitation via des canaux latéraux⁴.

11.1.2. Immobilisation électrique

La voie électrique permet d'immobiliser des cellules grâce à la diélectrophorèse. Ainsi, en créant un réseau d'électrodes fonctionnalisées au sein d'un microcanal, il est possible d'étudier plusieurs milliers de cellules⁵. Un schéma de principe est présenté Figure 0.3. Sur une électrode ($3\mu\text{m}$ de large), en moyenne une seule cellule est placée pendant la durée de l'excitation électrique. Les conditions de viabilité sont assurées en maintenant, pendant 30 minutes, des niveaux de tensions appliquées inférieures à 10V (à 2MHz).

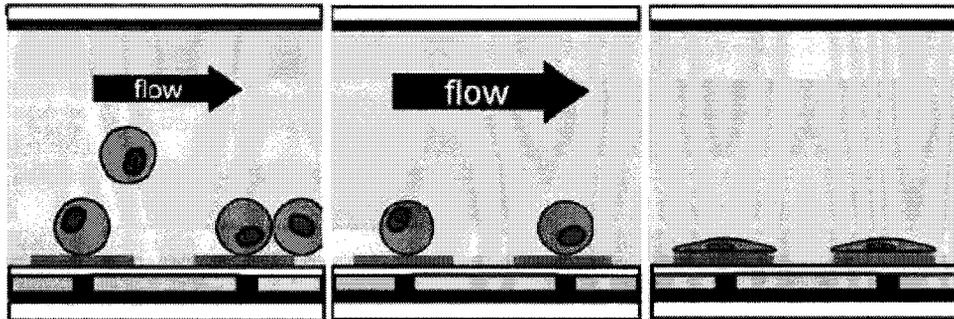


Figure 0.3 - Principe de l'immobilisation de cellules par diélectrophorèse :
 a) activation des électrodes et mise en solution des cellules, b) rinçage des cellules non accrochées et c) étalement et culture des cellules.

11.1.3. Immobilisation chimique

Les deux méthodes d'immobilisation présentées précédemment des forces externes (mécaniques, électriques) sont nécessaires afin d'immobiliser la cellule. Or, au sein de l'organisme, celle-ci adhère aux autres cellules et à la matrice extracellulaire grâce à des protéines d'adhérence telles que la fibronectine ou le collagène. A partir d'une chimie de surface appropriée, il est possible de mettre la cellule dans des conditions similaires aux conditions *in vivo*. Pour cela, il suffit de réaliser des plots fonctionnalisés par des protéines d'adhérence.

L'équipe de Whitesides a été l'une des premières à étudier la viabilité de cellules sur plots fonctionnalisés par de la fibronectine⁶ alors que Théry *et al.* ont étudié en détail l'influence de la forme du plot sur le développement de la cellule⁷.

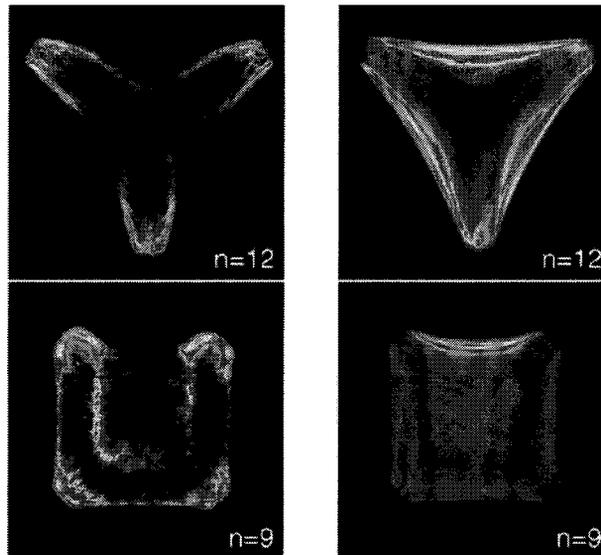


Figure 0.4 - Etude de l'orientation du cytosquelette de la cellule selon la forme du plot⁷.

Veisheh *et al.*, sur le même principe, utilisent des plots en or sur SiO₂ pour effectuer une chimie sélective. Les plots en or sont fonctionnalisés avec des thiols terminés par de la fibronectine⁸. Le SiO₂ est fonctionnalisé avec des PEG (PolyEthylèneGlycol) qui ont la particularité de limiter l'adsorption des protéines, et par conséquent, des cellules.

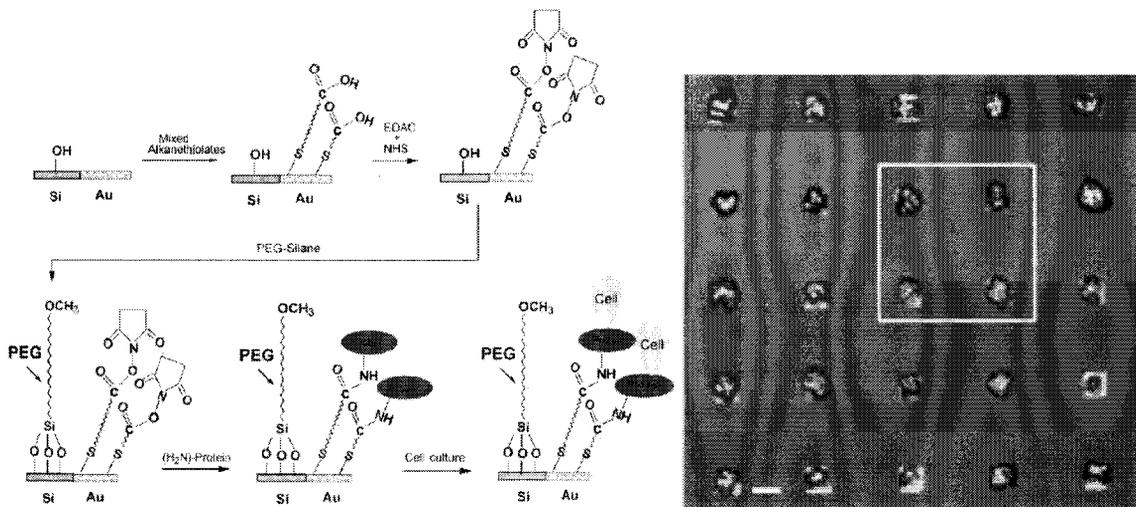


Figure 0.5 - a) Etapes de fonctionnalisation des plots en or par de la fibronectine sur SiO₂ pour l'accueil des cellules et b) culture de cellules sur plots de 20µm x 20µm.

11.1.4. L'électromouillage pour la culture de cellules

L'EWOD et la culture de cellules ne sont pas, à priori, compatibles. En effet, le milieu de culture est chargé en protéines et en sels qui polluent la surface et limitent ainsi le déplacement de la goutte.

Il existe tout de même certains microsystemes EWOD pour l'étude des cellules. Ainsi, Huang *et al.* ont développé un concentrateur de cellules en combinant astucieusement EWOD et DEP⁹. Ainsi, la goutte est déplacée par EWOD jusqu'à la zone de concentration. A partir de là, le réseau d'électrodes DEP est activé de gauche à droite, ce qui a la particularité de concentrer les cellules. Enfin, une scission de goutte permet d'obtenir une goutte sans

cellules et une goutte avec cellules ; la concentration au sein de cette goutte a donc été multipliée par deux. Un schéma de principe est présenté Figure 0.6:

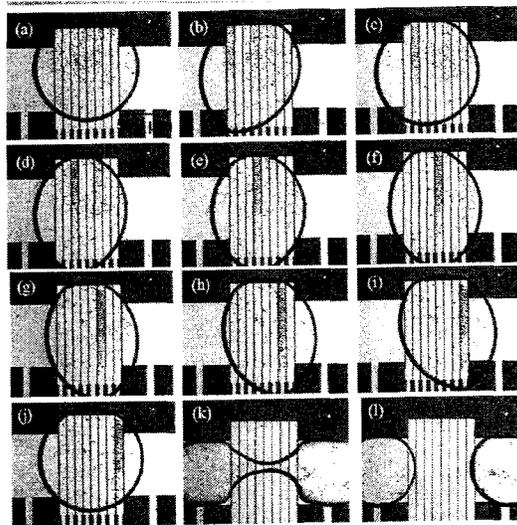


Figure 0.6 - Principe du concentrateur EWOD/DEP. La goutte se déplace par EWOD jusqu'à la zone de concentration. Les électrodes DEP permettent ensuite la concentration des cellules de gauche à droite. La scission de goutte permet de concentrer les cellules dans la goutte de droite qui est donc deux fois plus concentrée que la goutte initiale.

11.1.5. Orientations technologiques

Au vu de l'état de l'art présenté, on s'aperçoit que la majorité des microsystèmes développés pour la culture de cellule unique concernent l'immobilisation sur un plot mais tout en restant dans le même environnement que ses congénères. Nos compétences en électromouillage nous permettent d'envisager une culture de cellules en goutte, notamment par le développement de valves. Concernant l'immobilisation, le choix se porte sur la chimie de surface qui place la cellule dans des conditions optimum. Ainsi l'objectif est d'associer les capacités de la microfluidique discrète pour interagir individuellement sur un nombre restreint de cellules, tout en les plaçant dans des conditions optimum de développement par une chimie de surface adéquate.

11.2. Principe du microsystème

Le principe du microsystème est de réaliser un réseau de microgouttes destiné à la culture de cellules parallélisée. Ce microsystème a été développé au cœur de cette thèse. Cependant, il n'a pas été possible pour le moment d'intégrer la culture de cellules au sein des chambres (celle-ci a été réalisée en parallèle). Les caractérisations fluidiques sont donc réalisées avec de l'EDI.

Pour réaliser ce microsystème et permettre la création parallélisée de gouttes, un système de valves basées sur le principe de la scission de goutte EWOD a été mis au point.

11.3. Valves EWOD de 1^{ère} génération

11.3.1. Principe des valves

Les valves sont inspirées de la scission de goutte par EWOD. Le principe consiste à remplir un microcanal ouvert (murs discontinus) constitué de zones successivement hydrophiles et hydrophobes. Les zones hydrophiles sont destinées à accueillir les gouttes pour la culture de cellules. La zone hydrophobe est contrôlable par EWOD et permet d'isoler les gouttes entre elles. Un schéma de valve est présenté Figure 0.7.

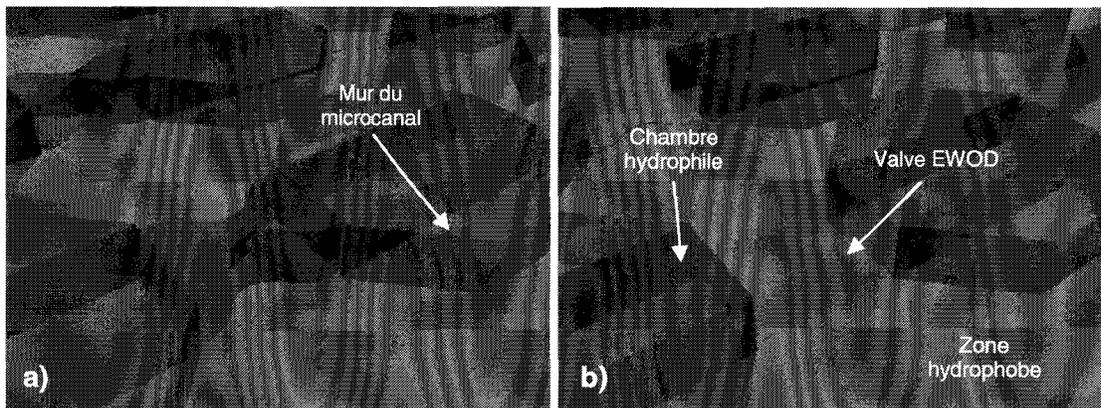


Figure 0.7 - Schéma d'une valve EWOD de première génération : a) pendant le remplissage du microcanal, la valve est ouverte et b) après coupure de la tension, la valve est fermée.

Le principe de création des gouttes est présenté Figure 0.8. La première étape consiste à activer l'ensemble des valves par application d'une tension. Le canal est alors rempli au moyen d'un pousse-seringue qui est arrêté une fois les zones hydrophiles et hydrophobes remplies. La tension appliquée sur les valves est coupée séquentiellement (de la première à la dernière électrode) afin d'évacuer le surplus de liquide. Le liquide quitte les valves, les gouttes sont créées. La présence d'évents latéraux (ouvertures dans les murs du microcanal) favorise la scission du flux (présence d'air).

L'intérêt d'un tel microsystème est d'appliquer la tension pendant un très court laps de temps, uniquement pendant le remplissage du microcanal. De plus, le déplacement de milieux de culture par électromouillage est très délicat, en raison de la forte concentration en éléments biologiques (biologiques notamment). Ici, le liquide est déplacé par surpression et les valves ne servent qu'à la scission. Il n'y a donc aucun déplacement directement par électromouillage.

L'objectif du projet est de pouvoir, à terme, fournir aux biologistes un réseau de micro boîtes de Pétri indépendantes les unes des autres. L'intégration de la technique EWOD permet d'envisager, par la suite, de pouvoir intervenir individuellement sur chaque micro

bioréacteur tant pour la collecte d'une partie du liquide en vue d'une analyse que pour son excitation biochimique par l'adjonction d'analytes spécifiques.

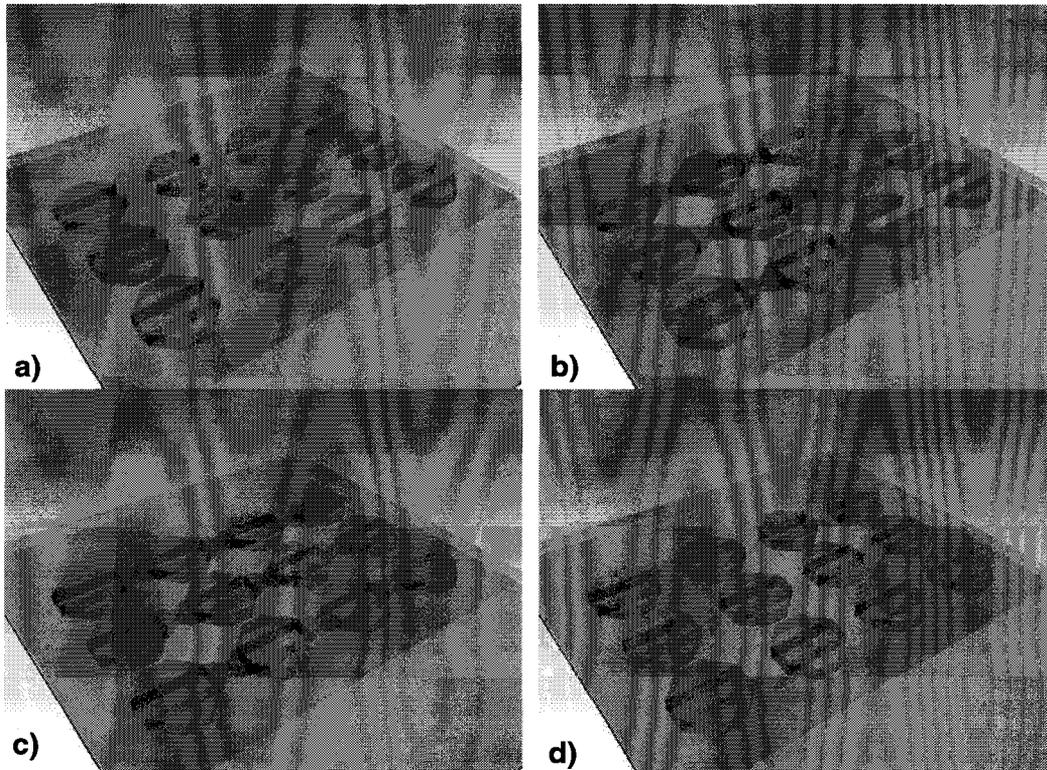


Figure 0.8 - Schéma de principe de création des gouttes par valves EWOD : a) sans tension, le liquide est bloqué aux abords de la première valve, b) on applique une tension sur les valves, le liquide remplit le microcanal, c) le canal est rempli et d) la tension est coupée, le liquide quitte les valves, les gouttes sont créées.

Afin de favoriser la scission, nous nous sommes intéressés à la géométrie des électrodes. La scission de goutte EWOD est possible lorsque le pincement est favorable. Les électrodes suivent donc la forme que prend une goutte juste avant la scission (Figure 0.9)¹⁰. Ceci a également l'avantage de limiter le volume total de liquide à évacuer au niveau des valves EWOD.

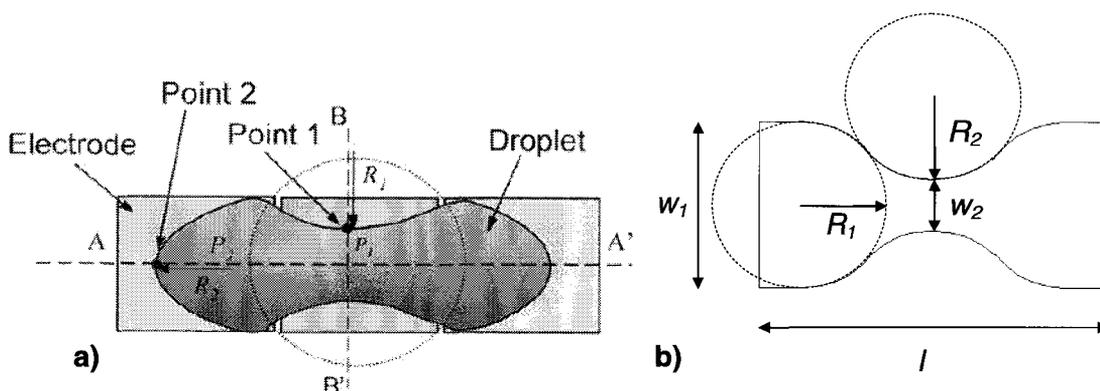


Figure 0.9 - Relation entre la scission de goutte¹⁰ (a) et la forme des électrodes pour les valves EWOD (b).

Le masque utilisé pour le microsystème comporte 11 microcanaux comprenant chacun 12 valves et 10 chambres hydrophiles. Trois largeurs de canaux sont étudiées (1000 μm , 800 μm et 500 μm). Les électrodes présentent différents pincements afin d'en étudier l'influence.

Les différentes configurations sont présentées en détail dans le Tableau 0.1 et le design complet est présenté Figure 0.10.

#	l	w ₁	w ₂	R ₁	R ₂
1	2000	1000	1000	500	0
2	-	-	487,5	-	750
3	-	-	309,7	-	500
4	-	-	175,1	-	400
5	1300	800	489,6	400	500
6	-	-	410,5	-	350
7	-	-	262,5	-	200
8	-	-	151,4	-	150
9	900	500	500	250	0
10	-	-	213	-	250
11	-	-	158,9	-	200

Tableau 0.1 - Récapitulatif des différentes dimensions utilisées pour les valves EWOD.

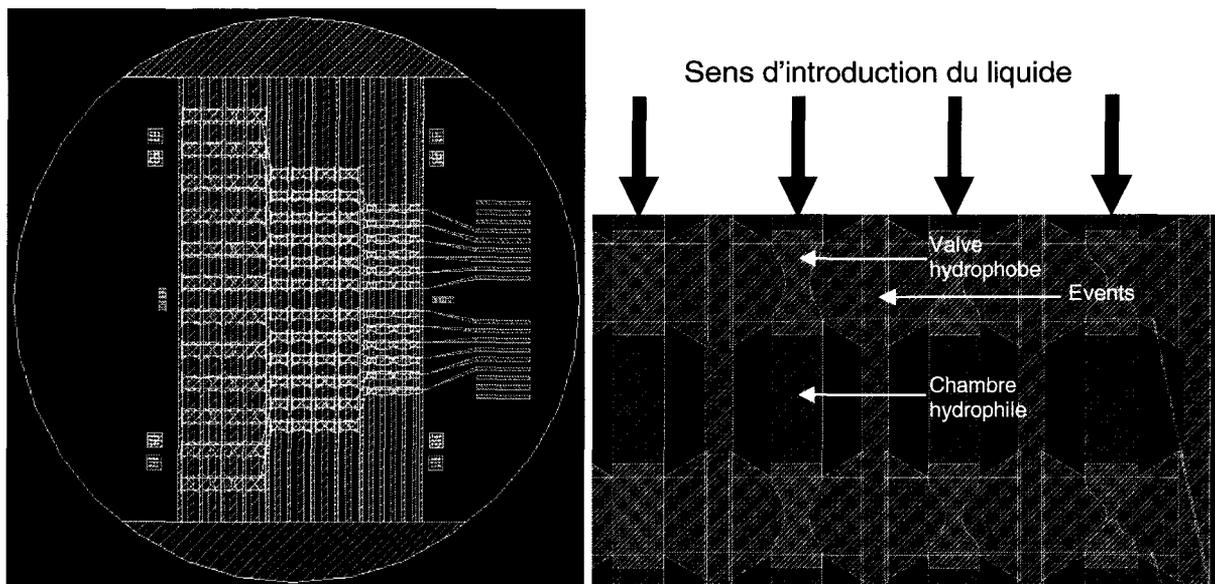


Figure 0.10 - Design des valves de première génération.

La première génération, développée en début de thèse, est basée sur la technologie polymère (SU-8). Ceci nous a permis de développer rapidement un système afin de valider le principe des valves. Les différentes étapes de réalisation de ces valves sont détaillées ci-dessous.

11.3.2. Etapes de fabrication

La base est réalisée sur un substrat de verre à partir de la technologie basse température décrite au chapitre 2, avec des électrodes de nickel et une couche de SU-8 en tant que diélectrique. Le Cytop joue le rôle de couche hydrophobe mais cette étape nécessite un *lift-off* afin de créer les chambres hydrophiles.

Le capot, servant de contre-électrode, est un substrat de silicium <100>, de type *n* et de résistivité $5-10\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$. Il contient également l'architecture microfluidique. Afin de créer les murs d'une hauteur de $100\mu\text{m}$ en SU-8, il est nécessaire de déposer au préalable une couche de SU-8 de $2\mu\text{m}$ (pleine plaque). Cette épaisseur permet d'avoir un gap en bonne relation avec les dimensions des électrodes. De plus, cela permet l'introduction de capillaires au sein du microcanal. La dernière étape consiste à rendre hydrophobe le capot par dépôt de C_4F_8 .

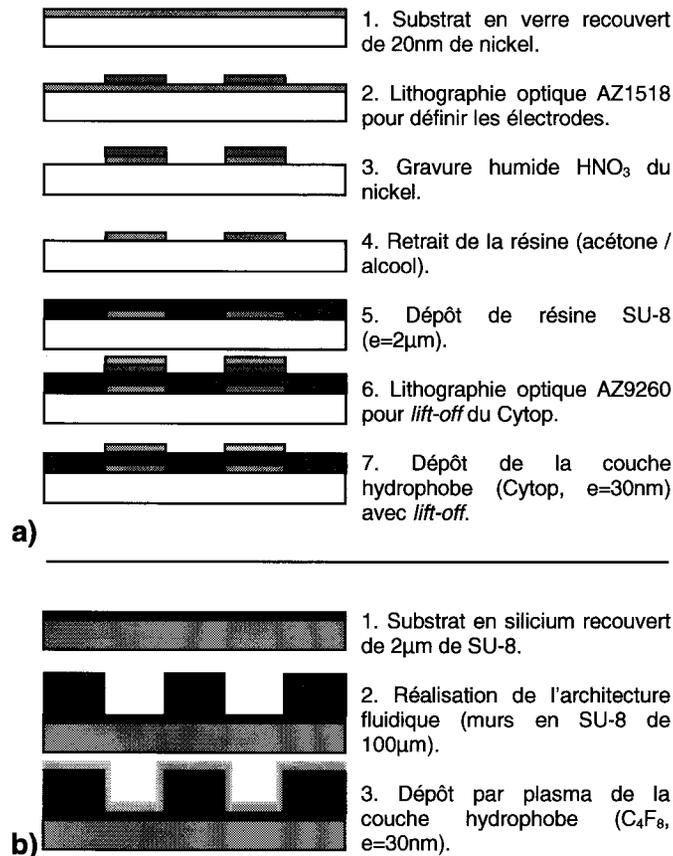


Figure 0.11 - Présentation des étapes de fabrication du laboratoire sur puce pour la culture de cellules en gouttes : a) la base contenant les électrodes, b) le capot contenant l'architecture fluidique.

11.3.3. Réalisation de la base

Réalisation des électrodes et de la couche diélectrique

Les paramètres sont les mêmes que ceux présentés au chapitre 2. Il s'agit d'une base en verre avec électrodes de nickel et une couche de SU-8 comme diélectrique.

Pour rappel, les électrodes sont réalisées à partir d'une couche de nickel de 20nm d'épaisseur déposée par pulvérisation cathodique. Le motif des électrodes est réalisé par lithographie optique et la couche de nickel gravée par voie chimique à l'acide nitrique. L'étape suivante consiste au dépôt de 2µm de SU-8 2002 comme diélectrique.

Réalisation de la couche hydrophobe

Comme présenté en début de partie, le principe du *cell-on-chip* consiste à alterner des valves hydrophobes et des chambres hydrophiles. Il est donc nécessaire de réaliser une étape d'ouverture de la couche hydrophobe. Pour cela, nous avons deux possibilités, à savoir la gravure ou le *lift-off*. Or, la couche sous le matériau hydrophobe est un polymère. Les gravures se faisant par plasma O₂, il n'est pas possible de graver le matériau hydrophobe sans détériorer la SU-8. Il a donc fallu réaliser un *lift-off*.

Pour cette opération, seul le Cytop a été retenu, les autres matériaux étant rapidement écartés.

En effet, le C₄F₈, déposé par plasma, recouvre l'intégralité de la surface, y compris les flancs de la résine. Un *lift-off* de C₄F₈ s'avère donc impossible.

Le Téflon, compte tenu des caractéristiques de température (recuit à 330°C), s'avère extrêmement délicat d'emploi dans ce cas : la résine optique positive supporte difficilement des températures de recuit supérieures à 130°C¹¹.

Le Cytop, quant à lui, se dépose par *spin-coating* et ne nécessite qu'un seul recuit à une température permettant l'utilisation d'une telle résine.

Cette technique de *lift-off* est déjà présentée dans la littérature¹², notamment pour du *patterning* de protéines¹³⁻¹⁴.

Contrairement au *lift-off* de métal, il n'y a aucun intérêt à réaliser un profil casquette puisque le Cytop est déposé par *spin-coating* et passerait sous la casquette. Nous avons donc réalisé un masque classique en résine positive (AZ9260) d'une épaisseur de 5µm avec les paramètres présentés Tableau 0.2.

Résine	Enduction	Recuit	Insolation	Révélation
AZ9260	5000/1000/40	3min@110°C	315mJ.cm ⁻²	20sec@ AZ351B/H ₂ O 1:2 v/v

Tableau 0.2 - Paramètres de dépôt de 5µm de résine AZ9260 pour le *lift-off* du Cytop.

Le Cytop est ensuite déposé avec les paramètres habituels (1500/300/30) puis recuit 30 minutes à 120°C (et non 180°C pour éviter de brûler la résine positive).

Le *lift-off* a l'avantage d'être simple de réalisation, contrairement à la gravure. Cependant, le dépôt s'effectuant à la tournette, les bords du Cytop présentent des défauts (plusieurs microns) induits par la centrifugation sur les flancs de la résine sacrificielle, comme le montre le cliché MEB de la Figure 0.12 lors de la mise au point du procédé sur silicium.

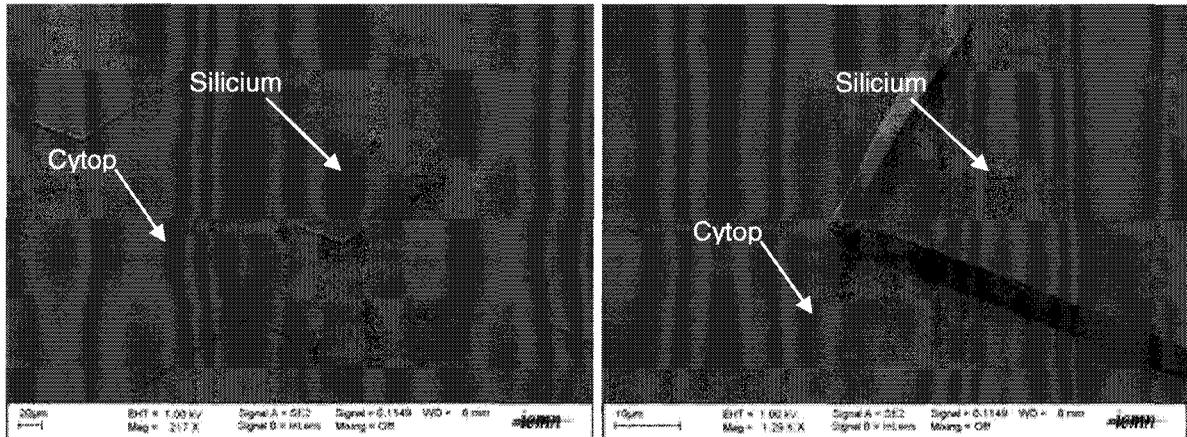


Figure 0.12 - Cliché MEB montrant le profil du Cytop après le *lift-off* : a) vue d'ensemble, b) zoom sur un défaut.

Une astuce pour résoudre ce problème consiste à réaliser l'enduction sous flux d'azote de manière verticale à une pression de 0,7bar en modifiant légèrement les paramètres d'enduction (500/250/90). Cette surpression empêche le Cytop de remonter le long des murs de résine. Le résultat d'un tel *lift-off* est visible Figure 0.13. Un test avec les mêmes paramètres d'enduction (500/250/90) mais sans flux d'azote donne à nouveau des défauts. Cette étape de *lift-off* met fin à la réalisation de la base.

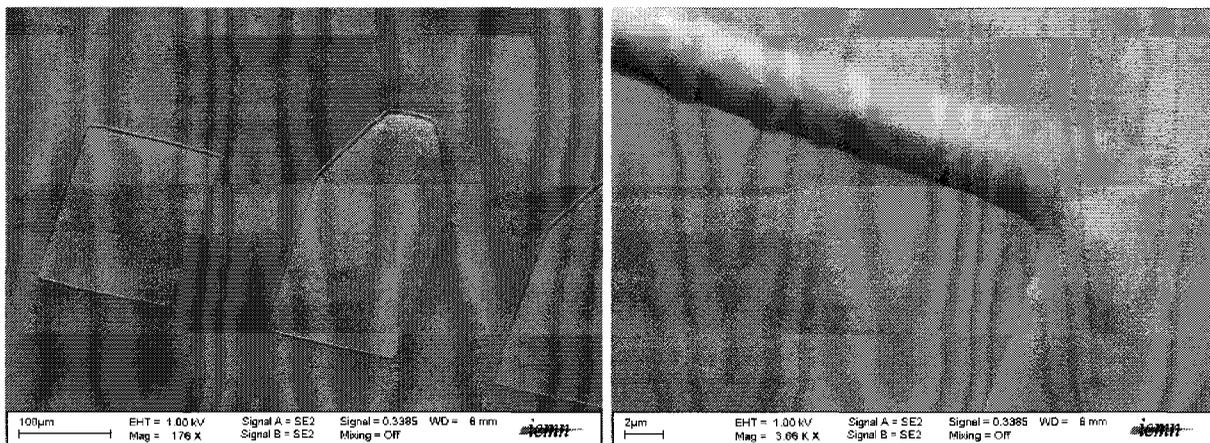


Figure 0.13 - Résultat d'un *lift-off* en soufflant à l'azote pendant l'enduction. Les défauts sont presque inexistants.

11.3.4. Réalisation du capot

Le substrat de silicium est de type n , d'orientation $\langle 100 \rangle$ et de conductivité $5-10\Omega.cm^{-1}$. Pour réaliser des petits motifs d'épaisseur importante ($\sim 100\mu m$) en SU-8 (murs des microcanaux), il est nécessaire de déposer au préalable une fine couche de SU-8 2002 ($2\mu m$) afin d'optimiser leur adhérence. L'utilisation de la résine SU-8 2075 permet ensuite de réaliser des motifs d'une telle épaisseur. Les paramètres de dépôt d'une telle couche sont présentés Tableau 0.3:

Résine	Enduction	Recuit 1	Insolation	Recuit 2	Révélation
SU-8 2075	500/100/10	5min@65°C	240mJ.cm ²	5min@65°C	10min@SU-8 Developer
	2000/300/30	20min@95°C		10min@95°C	

Tableau 0.3 - Paramètre de dépôt d'une couche de SU-8 2075 d'épaisseur $100\mu m$.

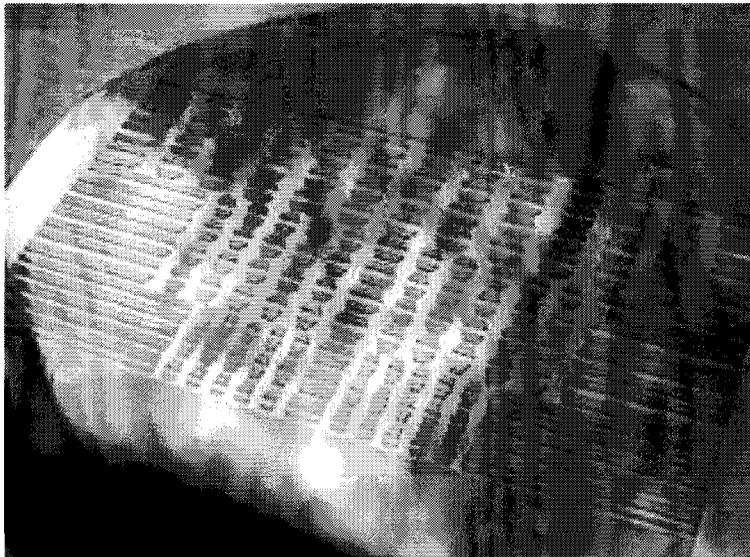


Figure 0.14 - Présentation du capot réalisé en résine SU-8 avec des murs d'épaisseur $150\mu m$.

11.3.5. Caractérisation fluïdique

La caractérisation fluïdique du microsystème nécessite la connexion à l'entrée du microcanal d'un capillaire (diamètre interne de $20\mu m$ et externe de $90\mu m$). Celui-ci est introduit de manière horizontale comme présenté sur la Figure 0.15.

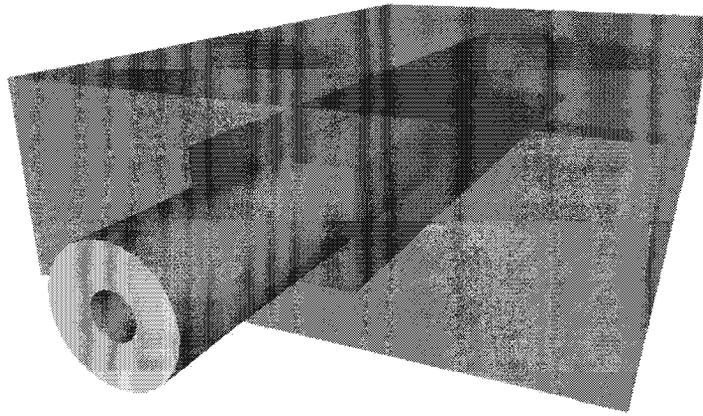


Figure 0.15 - Accès capillaire.

Les premiers résultats permettent de valider le principe des valves. Seule une dimension d'électrodes permet la création de gouttes. Il s'agit du microcanal 5 dont les dimensions de l'électrode sont de $800\mu\text{m} \times 1300\mu\text{m}$ (l x L). Cela conduit à la création de gouttes de 80nL. Les étapes de remplissage du microcanal et de la création de la goutte sont présentés Figure 0.16. Le débit de remplissage est de $10\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. La tension à appliquer pour permettre le remplissage est de 135V_{rms} à 1kHz (créneau).

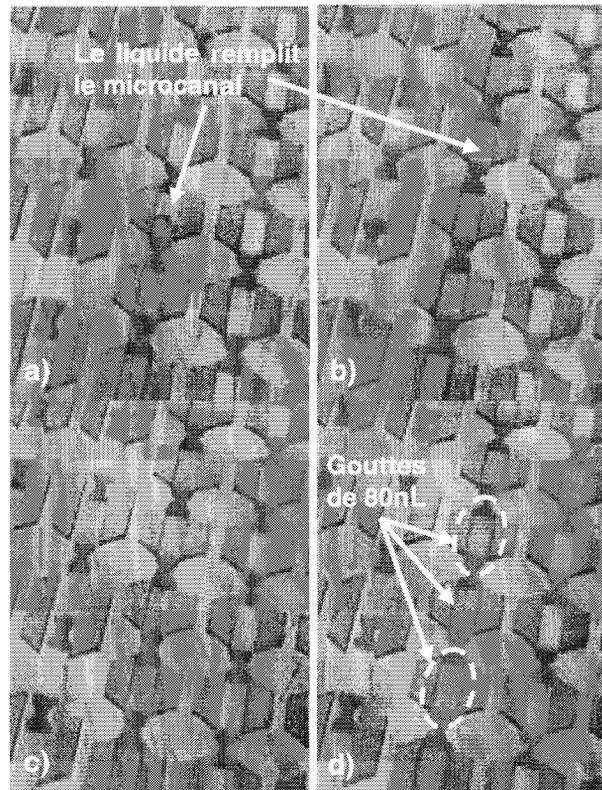


Figure 0.16 - Création de gouttes au sein des chambres hydrophiles : a) et b) la tension est appliquée, le liquide remplit le canal, c) le canal n'est plus alimenté en liquide qui se confine sur les électrodes (pincement), d) la tension est coupée électrode par électrode, le liquide se confine dans les chambres, les gouttes sont créées.

11.3.6. Discussion

Bien que le principe des valves soit validé, la technologie mise en œuvre présente de nombreuses limites. En effet, seule une dimension de valves amène à la scission du flux continu en gouttes. Le remplissage est relativement rapide vu les débits utilisés. Cependant, une fois le canal rempli, le liquide met beaucoup de temps à suivre la forme de l'électrode et donc à adopter une position favorable à la scission. De plus, la présence d'évents le long du microcanal est une source de fuites.

Bien que les matériaux utilisés aient permis de valider rapidement le principe, l'épaisseur de la couche de SU-8 constituant les murs (100 μm) engendre un défaut de planarité. Ceci contribue également aux fuites le long du microcanal. La SU-8 est également difficile à coupler avec la culture de cellules prévue ultérieurement. En effet, la chimie de surface sur polymère est relativement complexe¹⁵.

11.4. Valves EWOD de seconde génération

11.4.1. Présentation

Nous avons donc repensé l'architecture des valves ainsi que les matériaux utilisés. Les événements ont été soit supprimés soit réduits et placés sur le capot afin de limiter les fuites. De plus, l'électrode conserve toujours son pincement mais le microcanal, dans l'une des deux configurations, suit l'électrode. Ceci permet au liquide de suivre directement la forme de l'électrode.

Pour limiter les fuites, nous avons choisi de travailler avec un capot en silicium gravé par gravure profonde afin de conserver la planarité de la surface polie pour l'interface entre les deux substrats.

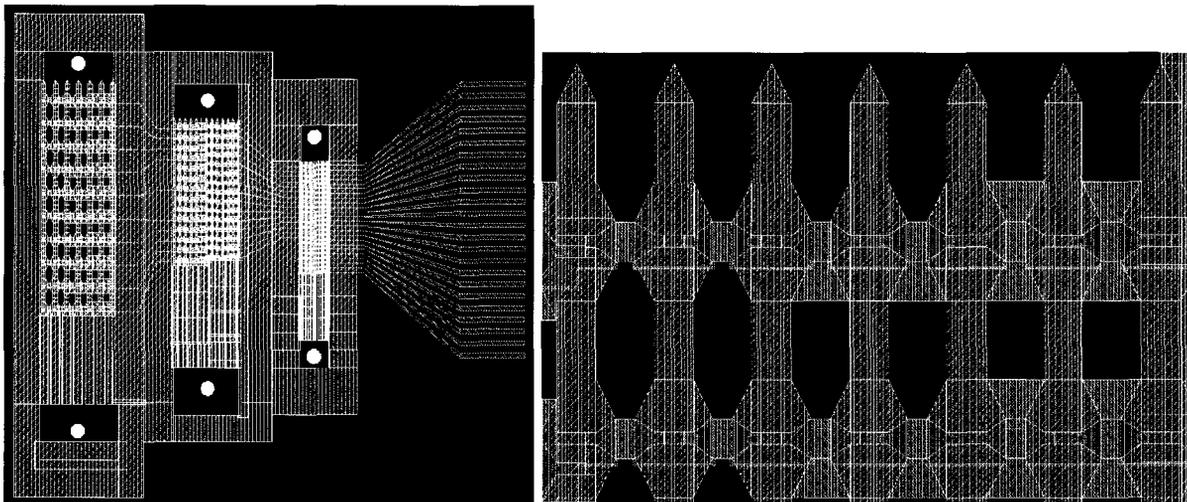


Figure 0.17 - Schéma de principe des valves EWOD de seconde génération.

De plus, la culture de cellules requiert une chimie de surface appropriée permettant l'adhésion et le développement de la cellule. Nous avons donc fait le choix du dioxyde de silicium comme diélectrique. La base est donc réalisée selon le procédé haute température présenté chapitre 4. Quant au substrat à utiliser, le choix s'est porté sur du quartz pour des raisons de tenue en température et de transparence.

Le capot est intégralement en silicium et gravé par attaque ICP. Il est ensuite rendu hydrophobe par dépôt d'une couche de C_4F_8 .

La Figure 0.18 présente les étapes de fabrication pour la réalisation des valves EWOD de seconde génération.

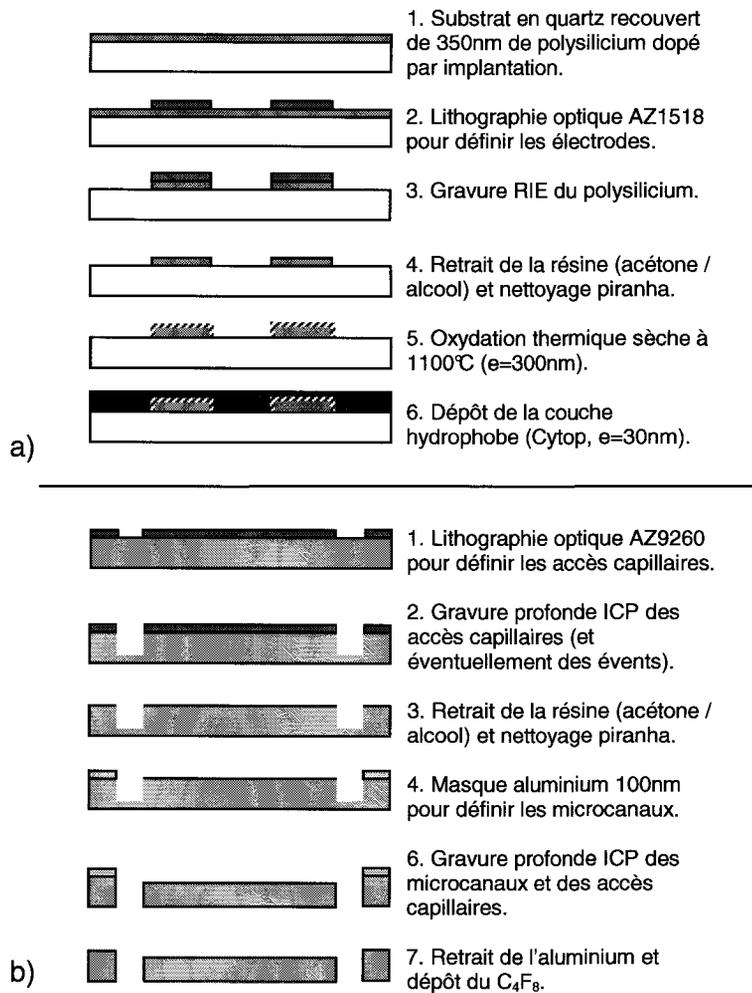


Figure 0.18 - Etapes de réalisation : a) d'une base en quartz, b) d'un capot en silicium.

11.4.2. La couche hydrophobe

Etant donné que les valves sont réalisées à partir du procédé haute température, il est possible d'utiliser aussi bien du Téflon que du Cytop contrairement à la première génération sur polymère. Comme il n'est pas possible de réaliser de *lift-off* pour le Téflon, nous avons

gravé les matériaux par plasma O_2 . De plus, la gravure possède l'avantage de donner des profils bien plus droits (sans défaut).

Pour l'étude, nous utilisons un substrat de silicium recouvert soit de Téflon soit de Cytop déposés par *spin-coating*. Le Téflon est déposé par *spin-coating* (2000/1000/60) suivi d'un recuit à une température de 160°C pendant 10 minutes puis d'un recuit à 330°C pendant 45 minutes sous flux d'azote. Le Cytop est déposé avec les mêmes paramètres que précédemment.

L'étape de gravure d'un matériau classique consisterait à réaliser un masque en résine positive. Ceci s'avère plus délicat dans le cas de matériaux hydrophobes. En effet, un film de liquide sur une surface hydrophobe démouille. Il en est de même lors d'un dépôt de résine. Il n'est donc pas possible de déposer directement un film homogène de résine pour la réalisation d'un masque sur un matériau hydrophobe. Une solution présentée dans la littérature consiste à utiliser un masque en aluminium¹⁶. L'aluminium a la particularité d'être gravé pendant le développement de la résine. Il évite ainsi une étape de gravure.

Nous déposons dans un premier temps 20nm d'aluminium par évaporation. Il est à noter que le dépôt d'aluminium par pulvérisation cathodique sur un matériau hydrophobe ne fonctionne pas (démouillage de l'aluminium). Un masque en résine AZ1518 d'épaisseur 1,5 μ m est alors réalisé sur celui-ci avec les paramètres habituels. L'étape de développement dure 5min afin de permettre la gravure de l'aluminium. Le fluoropolymère est ensuite gravé par plasma O_2 avec les paramètres suivants :

Matériau	Gaz 1 / Débit	Puissance	Pression	Temps
Téflon / Cytop	O_2 / 30sccm	50W	50mT	10 min

Tableau 0.4 - Paramètres de gravure RIE d'une couche de Téflon ou Cytop (masque en aluminium).

Une fois la gravure terminée, l'aluminium est retiré par une nouvelle immersion dans le révélateur.

Après retrait de l'aluminium, le fluoropolymère a la particularité d'être hydrophile (chute de 118° à 85° pour le Téflon et de 112° à 54° pour le Cytop) et l'hystérésis atteint une valeur d'environ 45°, sans doute en raison de la présence de solvants suite au bain dans le révélateur. Il est donc nécessaire de le recuire à sa température de recuit soit 180°C pour le Cytop et 330°C pour le Téflon afin de retrouver l'angle de contact initial¹⁶.

Une étude a été réalisée sur les deux fluoropolymères pour plusieurs paramètres de température. L'évolution des angles de contact au cours du temps est reportée sur les graphiques de la Figure 0.19¹⁷.

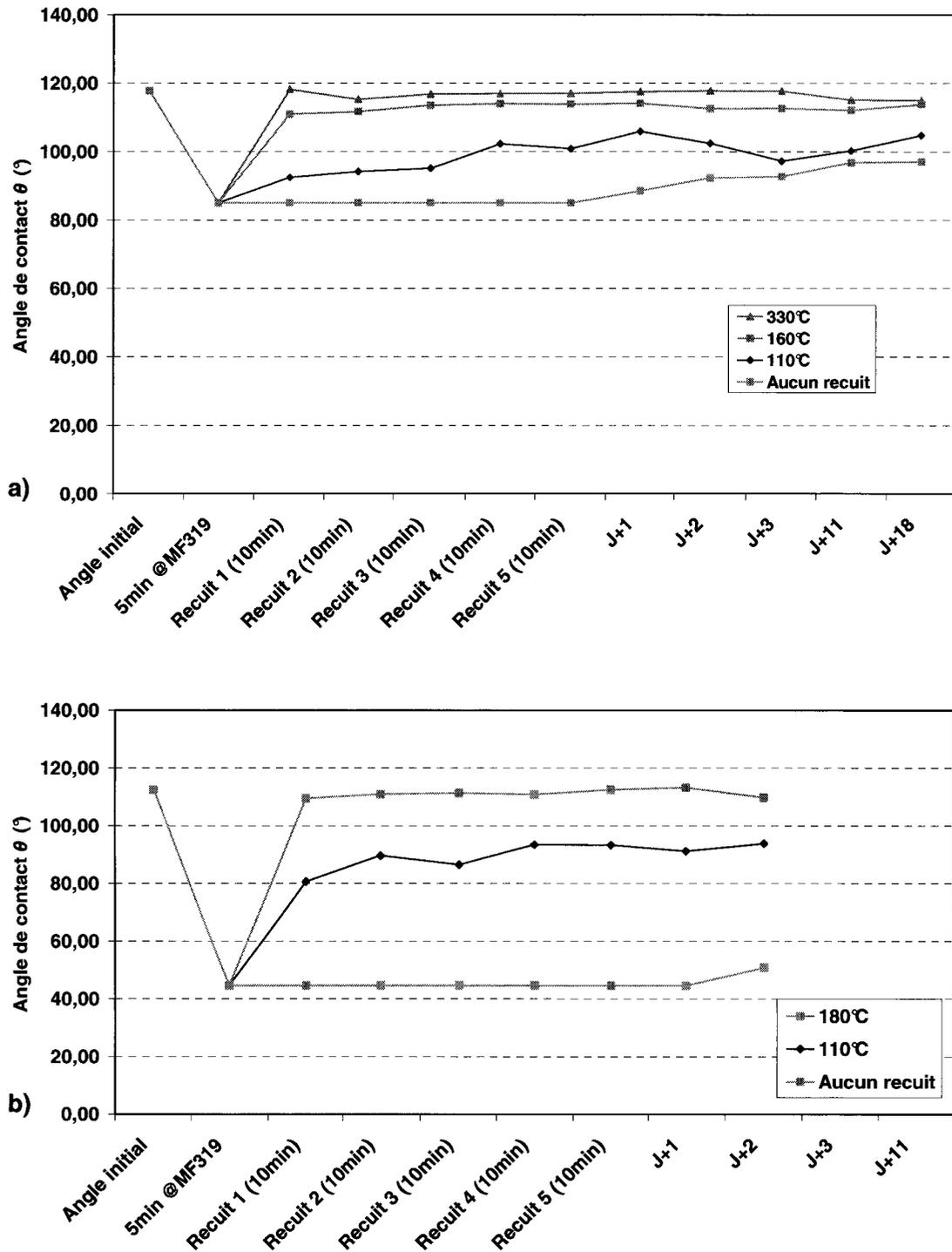


Figure 0.19 - Evolution des angles de contacts du Téflon (a) et du Cytrop (b) en fonction des recuits et du temps.

On constate que la surface redevient hydrophobe uniquement lors d'un recuit à la température préconisée par le fournisseur. De plus, cette valeur reste stable au cours du temps. Les résultats d'une telle gravure sont présentés Figure 0.20. La Figure 0.20.b présente une analyse EDX permettant la visualisation des espèces présentes. On remarque l'absence de fluor au sein de la chambre hydrophile. La gravure est donc réussie.

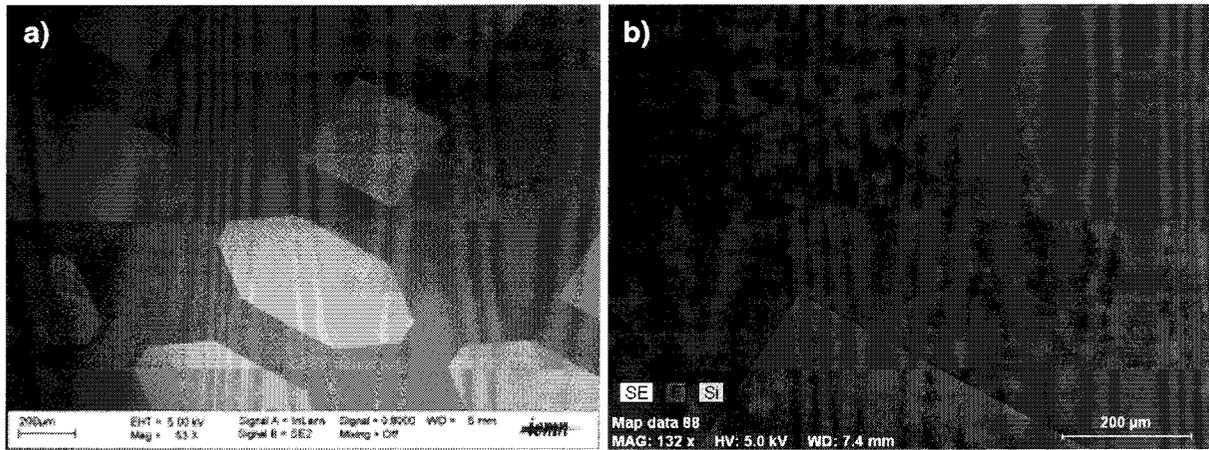


Figure 0.20 - Résultat de la gravure de Cytop sur silicium : a) image MEB, b) analyse EDX montrant l'absence de fluor au sein de la chambre, la gravure a fonctionné.

11.4.3. Réalisation du capot

Deux configurations de microcanaux existent : les microcanaux qui épousent la forme de l'électrode (configuration 1) et ceux qui conservent des événements latéraux (configuration 2). Pour la configuration 1, il a été nécessaire de placer l'événement au dessus de l'électrode. Dans le second cas, les événements pouvaient être placés de chaque côté de la valve (Figure 0.21). Ces deux configurations permettent d'étudier l'influence d'événements en contact direct ou non avec la colonne de liquide.

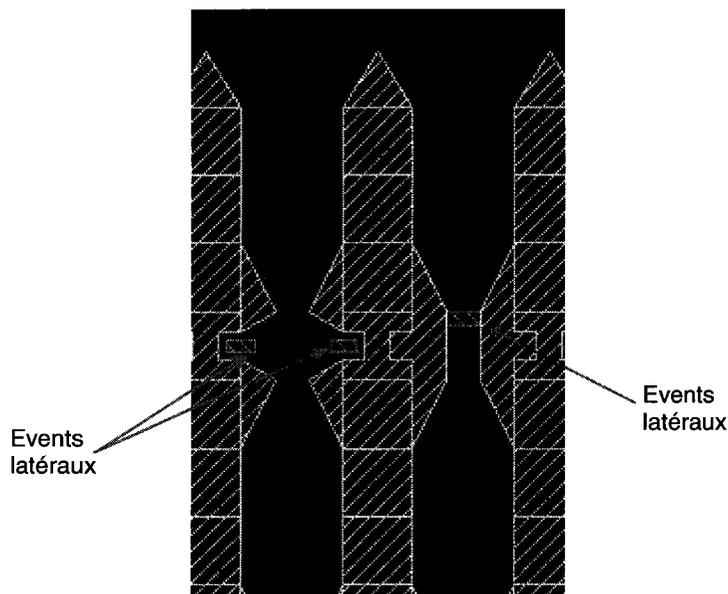


Figure 0.21 - Présentation des deux configurations d'événements possibles.

Le capot est réalisé à partir d'un substrat de silicium dopé p, d'orientation $\langle 100 \rangle$ et de résistivité $0,009-0,01\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$. Les différentes étapes sont rappelées Figure 0.22:

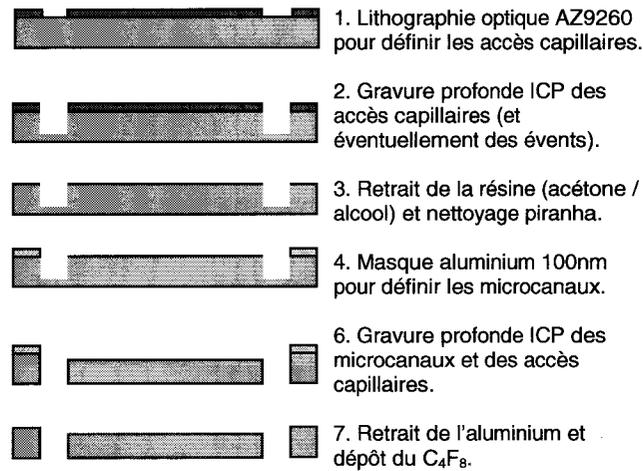


Figure 0.22 - Etapes de réalisation d'un capot en silicium.

La première étape consiste à réaliser un masque en résine optique AZ9260 de 5µm d'épaisseur pour définir les événements et les accès capillaires. Les paramètres de dépôt sont présentés Tableau 0.5 :

Résine	Enduction	Recuit 1	Insolation	Recuit 2	Révélotion
AZ9260	5000/1000/40	90sec@110°C	315mJ.cm ⁻²	3min@110°C	1min@ AZ351B/H ₂ O 1:2 v/v

Tableau 0.5 - Paramètres de dépôt de 12µm de résine AZ9260 pour le lift-off du Cytos.

L'étape suivante consiste à graver les événements à l'aide du bâti STS, suivant le procédé BOSCH (~6µm.min⁻¹) avec les paramètres définis ci-dessous. La gravure est arrêtée avant l'ouverture en face arrière des accès capillaires (ceux-ci seront ouverts pendant la gravure des microcanaux).

Gravure	Puissance bobine gravure	Débit SF ₆	Passivation	Puissance bobine passivation	Débit C ₄ F ₈
8,5s	2000W	450sccm	3s	1500W	200sccm

Tableau 0.6 - Paramètres de gravure profonde sur le bâti STS.

Une fois la gravure terminée, la résine est retirée par un nettoyage acétone/alcool suivi d'un nettoyage piranha. Un masque en aluminium d'une épaisseur de 200nm est alors déposé par pulvérisation cathodique. Une lithographie de résine AZ1518 d'épaisseur 1,5µm (paramètres habituels) permet de graver l'aluminium pendant la révélation. Ce dernier servira de masque pendant la gravure STS. Les paramètres de gravure sont identiques à ceux présentés Tableau 0.6. Après la gravure des microcanaux, l'aluminium est retiré par un nettoyage au révélateur MF319. On récupère ainsi un capot silicium. La dernière étape consiste à le rendre hydrophobe. Pour cela, nous réalisons un dépôt de C₄F₈ avec les mêmes paramètres qu'au chapitre 4 (T=10s, P_{bobine}=1000W, Q_{C₄F₈}=220sccm). Les trois capots obtenus sont présentés sur la Figure 0.23.

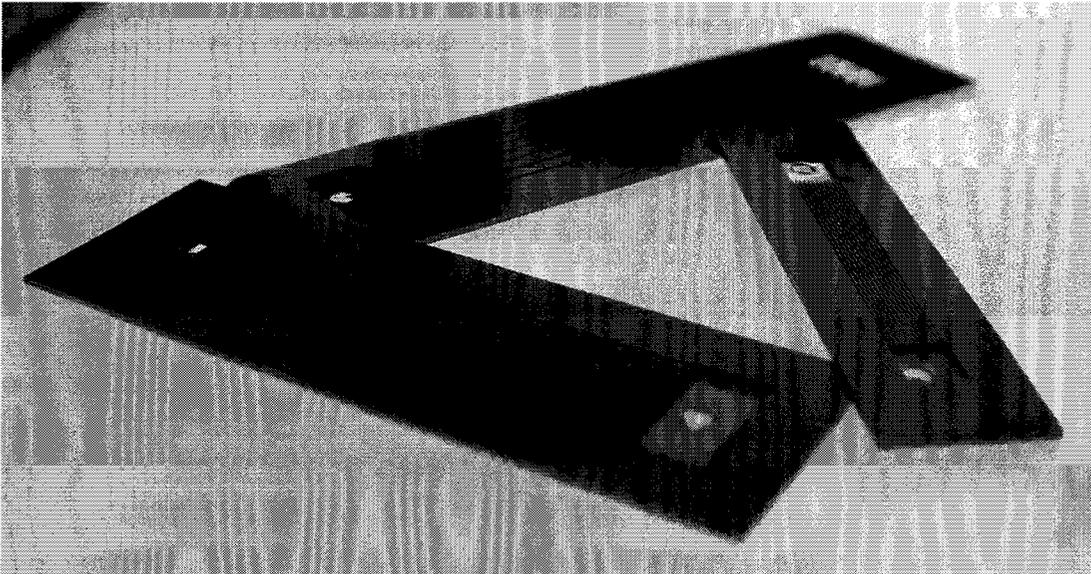


Figure 0.23 - Capots du microsysteme de seconde génération, réalisés par gravure profonde du silicium (configuration 1, modèle sans événements).

11.4.4. Caractérisation fluïdique

Pour caractériser le microsysteme, l'accès capillaire est réalisé lors de la gravure des événements. Il suffit par la suite d'adapter une connectique Nanoport (UpChurch Scientific, USA - Figure 0.24)¹⁸ sur laquelle nous pouvons adapter le tube capillaire (Figure 0.15).

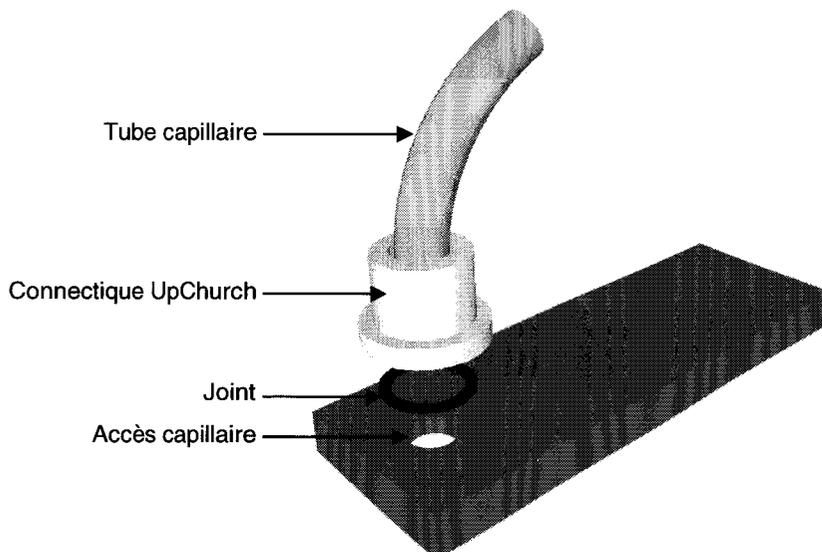


Figure 0.24 - Accès capillaire de type UpChurch.

Génération sans événement

Concernant la génération sans événement, il a été possible de remplir efficacement les microcanaux sans observer la moindre fuite. Il est de plus possible d'augmenter considérablement le débit (jusque $30\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$).

Cependant, l'absence d'événement est préjudiciable. En effet, l'absence d'air ne permet pas de réaliser une scission. Il n'y a pas d'air pour prendre la place du liquide sur l'électrode.

Ce microsysteme a tout de même permis de valider la nouvelle technologie et les nouveaux matériaux. L'inconvénient majeur est l'impossibilité de créer les gouttes à partir du flux continu. Les événements semblent donc indispensables.

Génération avec événements

Au moment où ce travail de thèse se termine, les dernières étapes technologiques concernant la réalisation de la configuration 2, avec événements, n'ont pu être effectuées. Compte tenu des résultats présentés ci-dessus, aucune difficulté majeure ne devrait empêcher cette ultime réalisation. La caractérisation fluide devrait alors suivre. En parallèle à ces travaux, nous avons étudié la fonctionnalisation de surface favorisant la culture de cellules.

11.5. Fonctionnalisation et culture

Nous avons réalisé des chambres en SiO_2 , cela nous permet donc de fonctionnaliser la chambre par des silanes. Thomas Heim a développé pendant son post-doctorat à l'IRI une chimie simple permettant la localisation de cellules. Pour cela, une monocouche d'OTS sur substrat de silicium est ouverte localement (par ozonolyse). Les ouvertures sont alors fonctionnalisées par une monocouche d'APTES (3-AminoPropyl TriEthoxy Silane). Cette monocouche est déposée en phase vapeur.

La Figure 0.25 montre le résultat d'une de ses cultures de cellules cancéreuses du sein, MDA231, pleine plaque. Les motifs d'APTES sont des lignes de $100\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$. On constate que les cellules s'étalent le long des motifs, elles sont donc dans un environnement favorable. Dans le cas contraire, la cellule finirait par mourir et resterait sphérique.

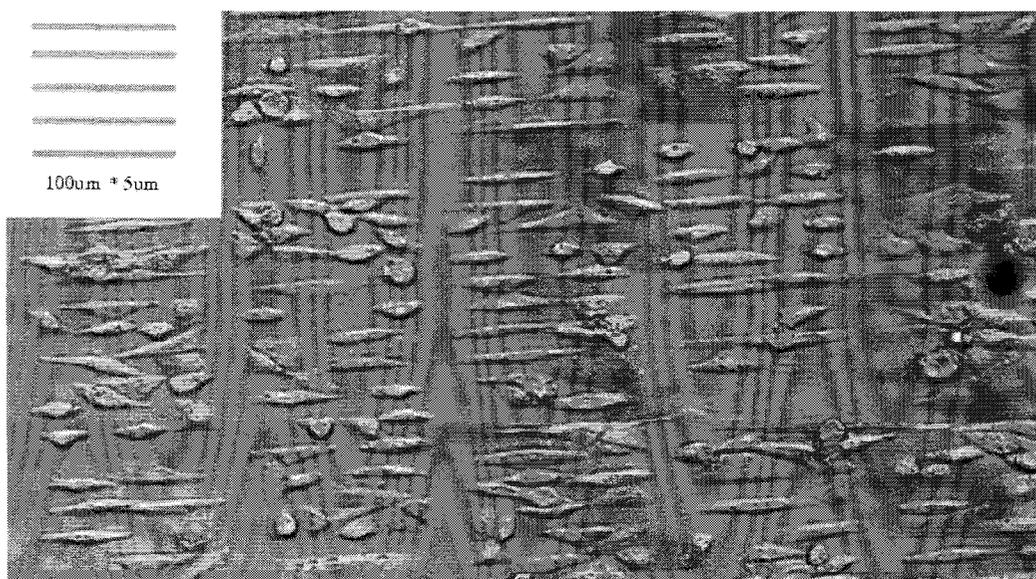


Figure 0.25 - Culture de cellules sur des lignes fonctionnalisées APTES, le reste du substrat est fonctionnalisé OTS (Culture de cellules et cliché : T. Heim, IRI).

Cette chimie de surface est donc parfaitement appropriée à notre application. L'objectif suivant est, dans un premier temps, de fonctionnaliser intégralement la chambre par APTES. Par la suite, une fonctionnalisation APTES/OTS permettra de contrôler précisément le nombre de cellules par chambre.

11.6. Conclusion

Une première génération de valves à partir d'une technologie polymère a permis de valider le principe des valves EWOD mais a très vite montré ses limites. En effet, en raison d'une mauvaise planarité de la couche épaisse constituant les murs, des fuites apparaissent et la géométrie des événements semble également peu appropriée.

Une seconde génération utilisant à la fois une nouvelle architecture ainsi que de nouveaux matériaux a permis de résoudre ces problèmes. Cependant, ce dispositif n'a pu être totalement validé, puisque pour une version intermédiaire de la 2^{ème} génération du dispositif (configuration 1, sans événements) la scission n'a pas été observée. Concernant l'ultime version de cette seconde génération (configuration 2, avec événements), à l'heure à laquelle ce manuscrit est finalisé, il n'a pas été possible de réaliser les dernières étapes technologiques. La caractérisation fluidique n'a donc pu être effectuée, La chimie de surface nécessaire à la culture de cellules a été définie sur lame de verre. A terme, une fois l'architecture fluidique définitivement validée, ce microsysteme devrait permettre l'étude parallélisée de cellules au sein de volumes de liquides calibrés.

12. Caches MALDI

12.1. Principe de l'imagerie MALDI

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés à la spectrométrie de masse MALDI 'discrète'. Dans ce cas, le laser vient irradier une zone précise du substrat où la matrice a co-cristallisé avec l'échantillon. Cependant, depuis la fin des années 1990, est apparue l'imagerie MALDI permettant de cartographier les molécules présentes dans une coupe de tissu¹⁹. Cette imagerie utilise le pouvoir analytique de la spectrométrie de masse pour créer des images moléculaires représentant la distribution des biomolécules contenues dans un échantillon²⁰. Bien que destructrice, cette technique diffère des autres techniques d'imagerie (comme l'IRM par exemple) par sa capacité à apporter des informations moléculaires sur l'échantillon. Plusieurs modes d'imagerie MALDI existent, mais nous ne nous intéresserons qu'à l'imagerie point par point.

12.1.1. Principe de l'imagerie point par point

En imagerie point par point, la surface de l'échantillon est scannée par le faisceau (de quelques centaines à quelques microns de diamètre) en déplaçant d'une distance définie par avance l'échantillon sous le faisceau ou le faisceau par lui-même. Pour chaque point d'analyse, un spectre de masse est alors enregistré. Suite au balayage de la surface de l'échantillon par le laser, l'ensemble des points d'analyse obtenus est stocké dans un tableau à deux dimensions. Il est ensuite possible, à l'aide de logiciels spécifiques, de reconstituer une cartographie 2D pour une molécule donnée qui est l'image de la répartition d'un analyte déterminé au sein du tissu analysé. Le principe de l'imagerie MALDI est présenté Figure 0.26 :

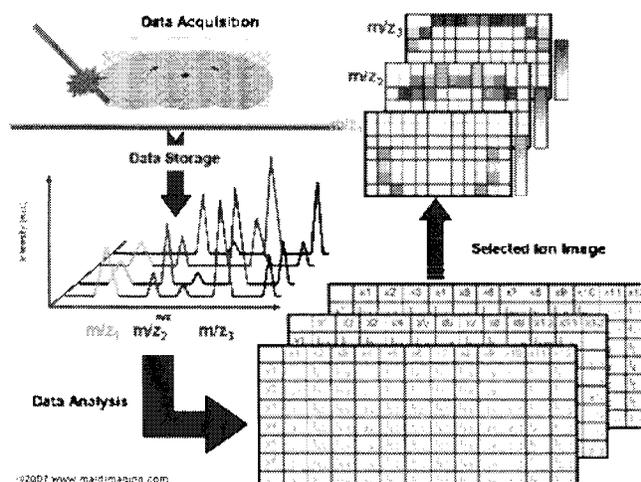


Figure 0.26 - Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI en mode point par point.

Le paramètre prépondérant pour une résolution optimale de l'image est le nombre de points d'analyse MALDI qui sera réalisé sur l'échantillon, le nombre de pixels en quelque sorte. Cependant, afin que les résultats soient significatifs, il faut éviter le recouvrement des surfaces analysées. Etant donné que le laser a un angle d'incidence non nul par rapport à la normale (de l'ordre de 30° à 50° selon le fabricant), le pas minimum entre deux points ne peut être inférieur au diamètre de la zone irradiée. En pratique, la distance entre deux points sera au minimum égale au diamètre d'intersection du faisceau laser avec la surface. Ainsi, une amélioration de la résolution d'une image passe par la réduction du diamètre du laser.

Les lasers utilisés en MALDI sont le plus souvent des lasers N₂ émettant à 337nm avec un système de focalisation classique. Leur diamètre est généralement compris entre 75µm et 200µm. Dans le meilleur des cas, le pas et la définition de l'image sont limités à 75µm. Compte tenu du diamètre d'une cellule (de l'ordre de la dizaine de microns), l'irradiation s'effectue sur un groupe de cellules au sein du tissu. L'étude de la cellule unique au sein du tissu se trouve donc compromise.

Plusieurs équipes de recherche ou constructeurs apportent leur propre solution mais dans la plupart des cas, celle-ci nécessite une modification matérielle ou logicielle du spectromètre de masse et dans le meilleur des cas la focalisation laser est supérieure à 25-30µm²¹. De plus, cette réduction du faisceau laser entraîne une diminution du nombre d'ions détectés²².

Une alternative originale, développée conjointement avec le Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides (LNA-FRE 8017) de Lille dans le cadre de la thèse de Maxence Wisztorski²⁰, est l'utilisation de caches en silicium jouant le rôle d'obturateur physique du faisceau laser, limitant ainsi la zone d'irradiation du tissu en fonction de la surface de l'ouverture. Ne seront détaillés dans ce manuscrit que les réalisations technologiques effectuées au cours de mes travaux de thèse ainsi que les principaux essais de validation par spectrométrie de masse. Pour plus de détails concernant l'analyse des résultats ainsi que la modélisation du comportement en spectrométrie de masse, nous invitons le lecteur à consulter la thèse de Maxence Wisztorski²⁰.

12.2. Principe du cache

Le cache est appliqué directement sur la coupe de tissu afin de limiter la perte des ions formés comme le montre la Figure 0.27. L'épaisseur doit être minimale pour ne pas perturber le laser et être insérée aisément dans le spectromètre. Il doit être opaque aux UV afin de ne pas irradier les parties cachées. Même si le diamètre d'irradiation laser est fortement réduit par ces caches, la quantité d'ions produits ne devrait pas diminuer puisque le profil en énergie du faisceau laser n'est pas modifié. Comme pour une cible MALDI, le masque doit être conducteur afin de ne pas perturber le champ électrique d'accélération et entraîner des décalages des temps de vol mesurés²³.

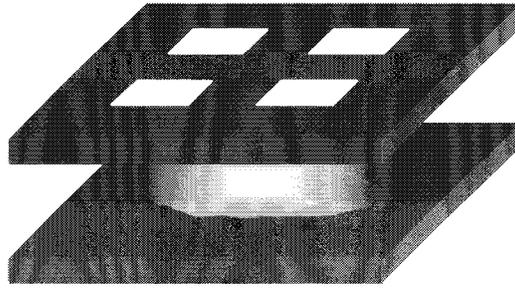


Figure 0.27 - Principe du cache en silicium plaqué sur une coupe de tissu.

De plus, étant donné l'incidence du laser, il est préférable d'avoir des ouvertures en V. En raison des moyens technologiques de l'IEMN, nous nous sommes orientés vers des caches en silicium $\langle 100 \rangle$ réalisés par gravure humide KOH. Pour rappel, la gravure KOH de substrats de silicium est plus rapide suivant les plans $\langle 100 \rangle$ que suivant les plans $\langle 111 \rangle$. Ainsi, on obtient des angles d'ouverture de $54,7^\circ$. Même si les angles du silicium et du laser ne concordent pas parfaitement, la zone d'ombre créée est réduite par rapport à des ouvertures à flancs droits (obtenues par gravure sèche). La Figure 0.28 illustre la différence entre les zones d'ombre créées selon le type de flancs pour deux masques ayant la même épaisseur.

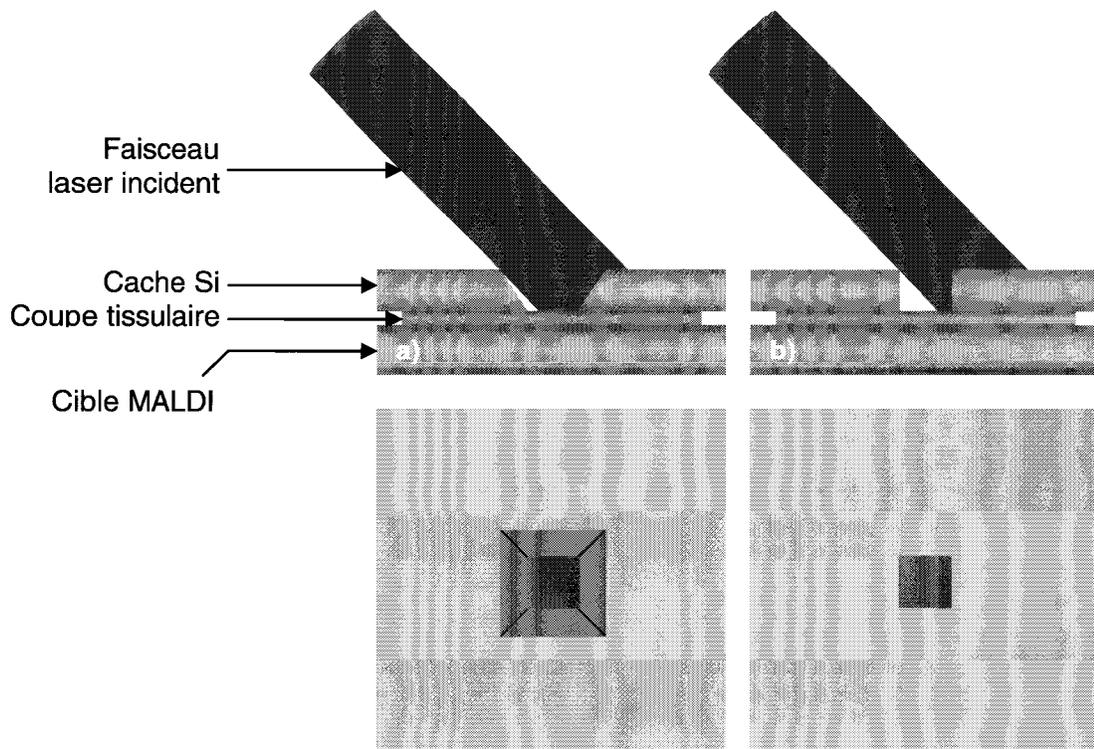


Figure 0.28 - Influence des flancs du cache sur la zone irradiée par le laser.

La zone irradiée dépend à la fois de l'épaisseur du cache et de la taille de l'ouverture. Nous différencions la largeur de l'ouverture interne, de plus faible dimension et en contact avec le tissu, de l'ouverture externe, de plus grande dimension et en regard du laser. Le

calcul de l'aire A_{irr} de la zone irradiée est fonction des différents paramètres comme le montre la Figure 0.29 dans le cas d'un cache avec ouverture en V.

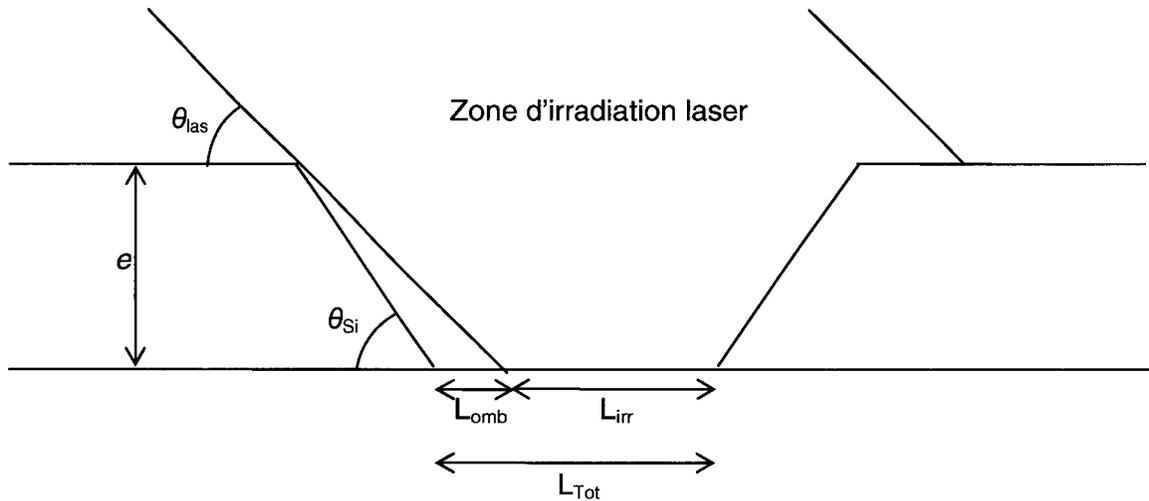


Figure 0.29 - Vue schématique d'une ouverture en V pour le calcul de la zone irradiée par le laser.

En considérant des ouvertures carrées, l'équation (0.1) permet d'obtenir l'aire irradiée au travers d'une ouverture en V avec e , l'épaisseur du cache, L_{TOT} , la largeur de l'ouverture interne du cache, L_{irr} , la largeur de la zone irradiée, L_{omb} , la largeur de la zone d'ombre, θ_{las} , l'angle du laser par rapport au cache et θ_{Si} , l'angle cristallin du silicium :

$$A_{irr} = L_{Tot}^2 - eL_{Tot} \left(\frac{1}{\tan \theta_{las}} - \frac{1}{\tan \theta_{Si}} \right) \quad (0.1)$$

L'équation (0.2) donne l'aire irradiée pour une ouverture droite :

$$A_{irr2} = L_{Tot}^2 - \frac{eL_{Tot}}{\tan \theta_{las}} \quad (0.2)$$

La différence des deux aires permet d'obtenir le gain en surface pour le cache en V par rapport à une ouverture à flancs droits :

$$A_{irr1} - A_{irr2} = \frac{eL_{Tot}}{\tan \theta_{Si}} \quad (0.3)$$

Le Tableau 0.7 présente l'aire irradiée théorique en fonction de l'épaisseur du substrat et de la dimension de l'ouverture. L'inclinaison du laser utilisé pour les manipulations est de 53° par rapport au plan (valeur très proche de celle du silicium), c'est pourquoi la zone irradiée est très proche de la surface totale, en comparaison à des ouvertures droites.

#	Epaiss. subst. (μm)	Larg. ouvert. (μm)	Aire ouvert. (μm^2)	Flancs droits		Flancs obliques	
				A_{irr} (μm^2)	%	A_{irr} (μm^2)	%
1	119	103	10609	1372,7	12,9	10051,1	94,7
2	60	155	24025	17016,9	70,8	23601,7	98,2
3	42	36	1296	156,6	12,1	1227,2	94,7

Tableau 0.7 - Zone irradiée en fonction de l'épaisseur du substrat, de l'épaisseur du substrat et de la dimension des ouvertures.

12.3. Validation du cache en V-groove

12.3.1. Réalisation technologique

Un dépôt de nitrure de silicium peu contraint Si_xN_y (200nm) a été réalisé par LPCVD sur un substrat de silicium de type n faiblement dopé d'orientation $\langle 100 \rangle$. Le nitrure de silicium offre une grande sélectivité de gravure au KOH face au silicium. Il est donc utilisé comme masque pour la gravure.

Dans un premier temps, un masque en résine AZ1518 permet de graver le Si_xN_y sur la face avant afin de définir la grille. Les paramètres de gravure sont les mêmes que pour la gravure du SiO_2 et sont présentés Tableau 0.8. L'étape suivante consiste à retirer le nitrure en face arrière toujours par gravure RIE. Après la gravure, la résine est retirée par nettoyage acétone / alcool isopropylique afin de ne pas polluer le bain de KOH.

Matériau	Gaz 1 / Débit	Gaz 2 / Débit	Puissance	Pression	Temps
Si_xN_y	CHF_3 / 40sccm	CF_4 / 40sccm	125W	50mT	9min

Tableau 0.8 - Paramètres de gravure RIE de 300nm de Si_xN_y .

L'échantillon doit avoir une épaisseur finale de l'ordre de $50\mu\text{m}$. Le substrat d'épaisseur $380\mu\text{m}$ ($\pm 25\mu\text{m}$) doit donc être aminci. Il est introduit dans un porte-substrat permettant de protéger la face avant du substrat pendant la phase d'amincissement. La vitesse de gravure du silicium est de l'ordre de $0,5\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ à $1\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ suivant l'âge du bain. Le substrat est aminci pendant environ 5h30 jusqu'à une épaisseur de $100\mu\text{m}$. Il est ensuite rincé à l'EDI, retiré du porte-substrat et plongé intégralement dans le bain de KOH. Cette étape délicate dure environ 1h et permet l'amincissement des $50\mu\text{m}$ restant en face arrière et la gravure des motifs sur une profondeur de $50\mu\text{m}$ en face avant.

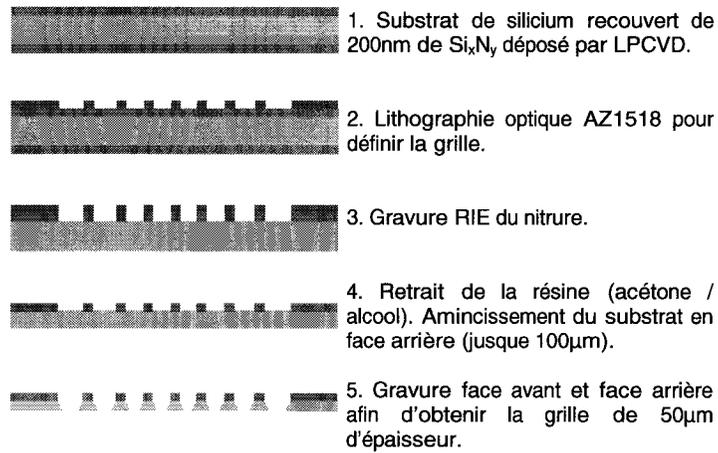


Figure 0.30 - Etape de réalisation des ouvertures en V-groove.

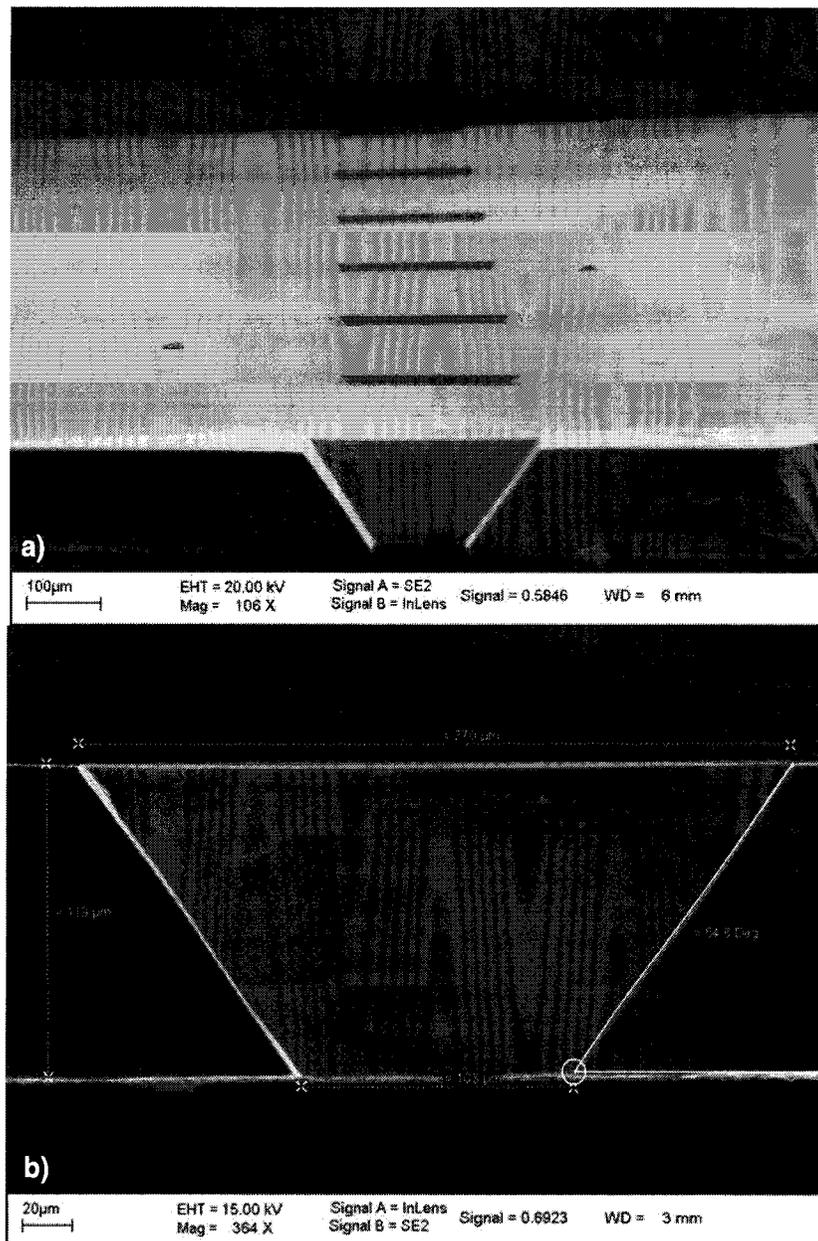


Figure 0.31 - Cache en silicium de type V-groove d'ouverture $103\mu\text{m}$ et d'épaisseur $119\mu\text{m}$: a) vue d'une partie du cache, b) dimensions d'une ouverture.

12.3.2. Résultats en spectrométrie de masse MALDI

Les tests ont été effectués sur des coupes de cerveau de rat. La matrice utilisée est de la HCCA saturée (acétonitrile (0,1%)/TFA 6:4 v/v). Une fois la matrice cristallisée, l'échantillon et le cache sont introduits dans le spectromètre. Deux spectromètres de masse MALDI-TOF-MS ont été utilisés pour la validation des caches : Voyager-DE STR (Applied Biosystems, USA) et Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, USA).

Les premiers caches ont des ouvertures assez proches du diamètre du masque. Il n'y avait donc pas d'intérêt en terme de résolution. Cependant, il s'est avéré que les masques jouaient un rôle pour la sensibilité d'analyse : l'intensité des pics détectés augmente en présence du masque comme le montre la Figure 0.32. Ce phénomène n'est pas encore expliqué.

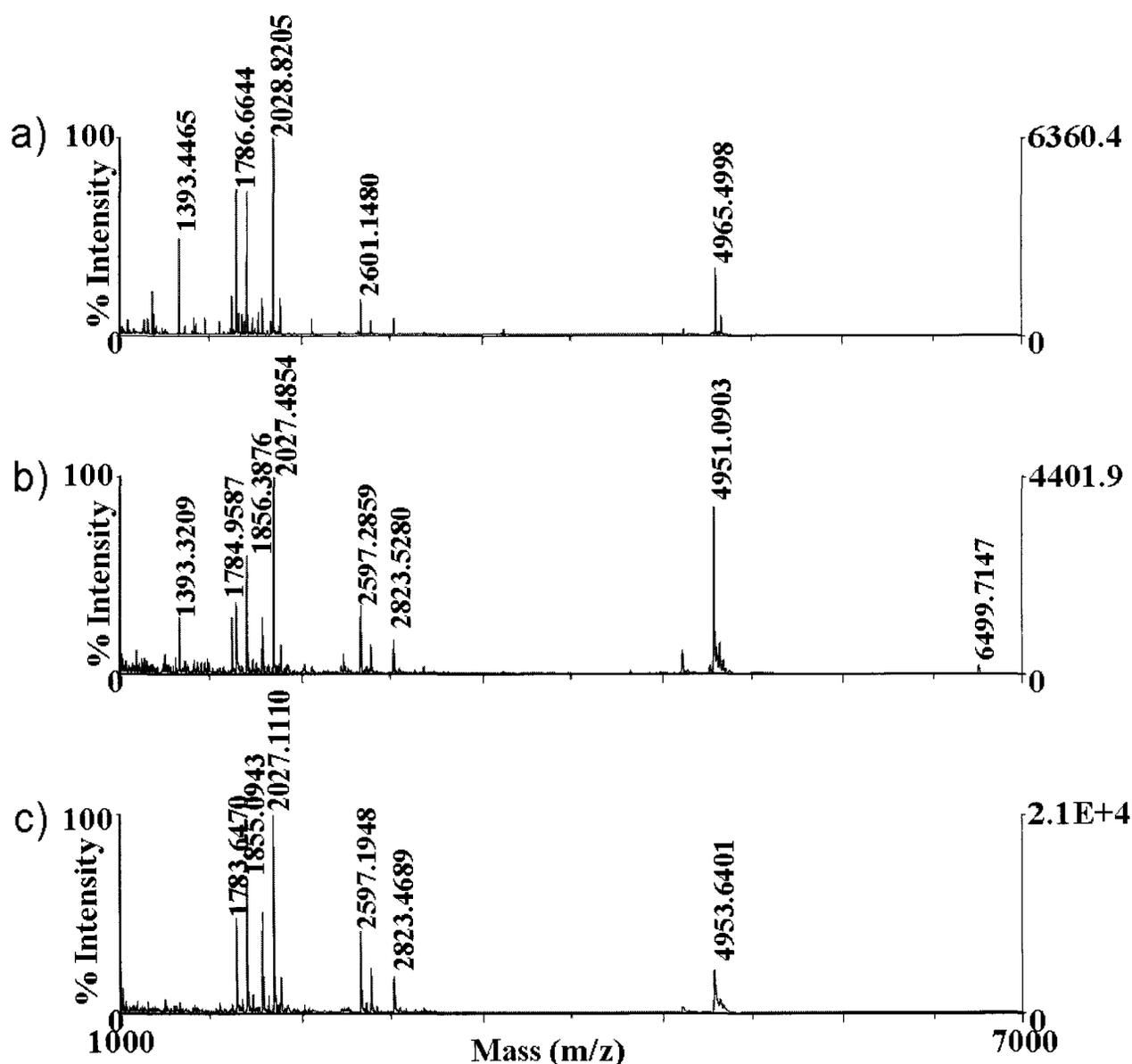


Figure 0.32 - Spectre de masse MALDI obtenu sur une coupe de cerveau de rat : a) sans masque, b) avec un masque d'ouverture 103µm et c) avec un masque d'ouverture 185µm.

12.4. Développement d'une grille pour imagerie

12.4.1. Présentation de la grille

L'idée initiale est de réaliser de l'imagerie point par point. Nous avons donc réalisé une grille de 1cm² (plus grande qu'une coupe de cerveau) constituée d'une matrice de 100x100 ouvertures de 95µm de côté (ouverture externe) et espacées de 5µm (Figure 0.33). L'ouverture interne est de 36µm pour une épaisseur de 42µm.

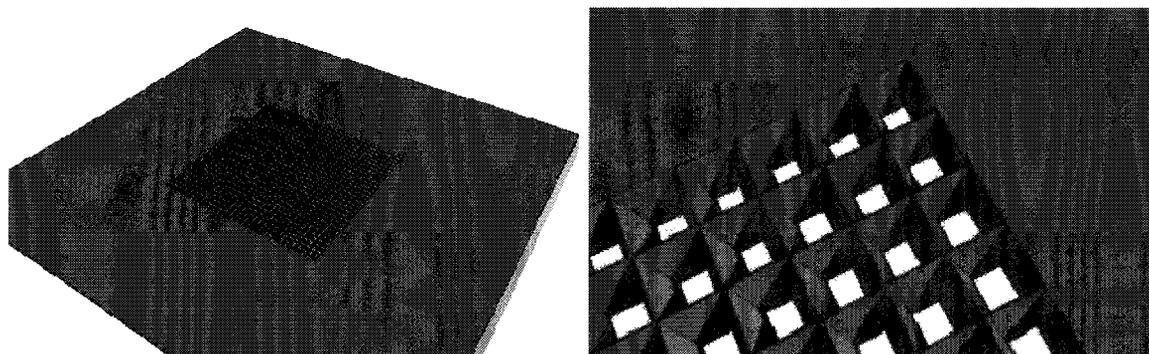


Figure 0.33 - Vue 3D de la grille réalisée pour l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI dans un substrat de silicium : a) vue d'ensemble, b) quelques ouvertures dans un coin.

12.4.2. Réalisation technologique de la grille

Les étapes de fabrication sont identiques à celles réalisées pour les ouvertures uniques (Figure 0.30). Une attention particulière doit être portée à la gravure KOH car, même si elle est très lente suivant les plans $\langle 111 \rangle$, elle n'est pas nulle. Il y a donc une sous-gravure. Ainsi, l'espacement entre les motifs n'étant que de 5µm, si la sous-gravure est trop importante ($>2,5\mu\text{m}$), les motifs se rejoignent et le masque en nitrure est désolidarisé du substrat.

Lors de la gravure des motifs, afin d'éviter trop de manipulations délicates (épaisseur du cache de l'ordre de 50µm), les grilles sont autoclivées grâce aux motifs placés sur le masque. Il ne reste qu'à les récupérer à la surface du KOH. La Figure 0.34 présente le résultat obtenu.

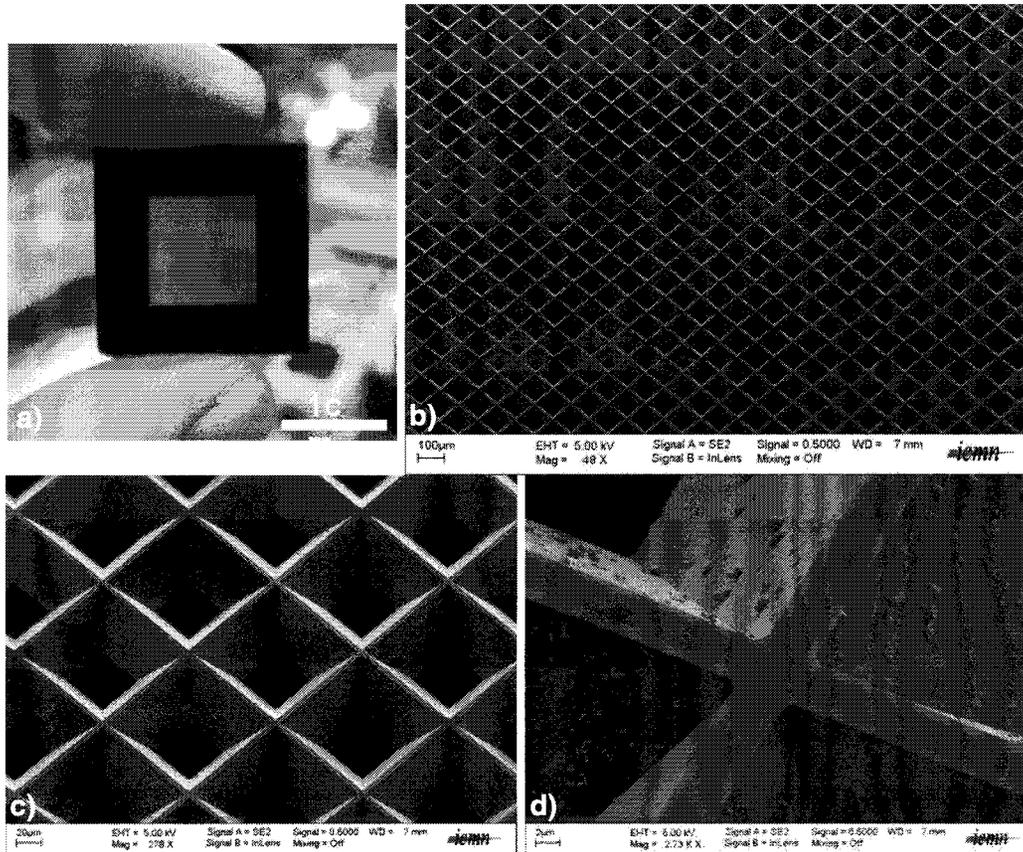


Figure 0.34 – a) Grille en silicium réalisée en gravure KOH (10000 trous), b) et c) vue d'une partie de la grille (homogénéité de la gravure) et d) masque en Si₃N₄ avec sous-gravure du silicium et cristaux de KOH.

12.5. Support pour cache

Le support standard utilisé dans le spectromètre de masse Bruker (MTP Slide Adapter II) est présenté Figure 0.35. Il est possible d'y disposer deux lames de verres de 75x25mm et d'une épaisseur de 900µm. Quatre rondelles dépassent légèrement afin de bloquer la lame face supérieure alors que deux ergots amovibles bloquent la lame face inférieure. Ceci permet à la lame d'être située précisément dans le plan de focalisation du laser. On ne pouvait donc envisager de fixer un cache entre les rondelles et la lame de verre, car dans ce cas, le cache se serait retrouvé au point de focalisation à la place de la lame.

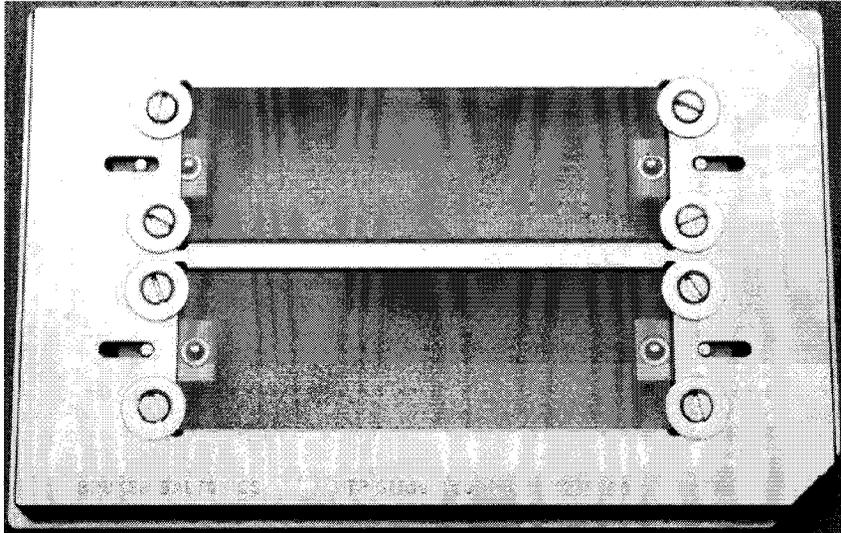


Figure 0.35 - Support pour cible MALDI de chez Bruker (MTP Slide Adapter II).

Nous avons donc conçu et fait réaliser à l'atelier de mécanique de l'IEEA (USTL) un support pour notre cache, parfaitement adapté à notre cahier des charges. Pour des questions d'évacuation des charges, il est préférable qu'il soit métallique. Le principe du support est d'être situé dans le même plan que les rondelles et fixé à leur place. Ce support dispose d'une ouverture carrée de 12mm de côté ainsi que d'une encoche de 2cm de côté et 50 μ m de profondeur pour intercaler le cache en silicium. Une vue tridimensionnelle du support est présentée Figure 0.36.

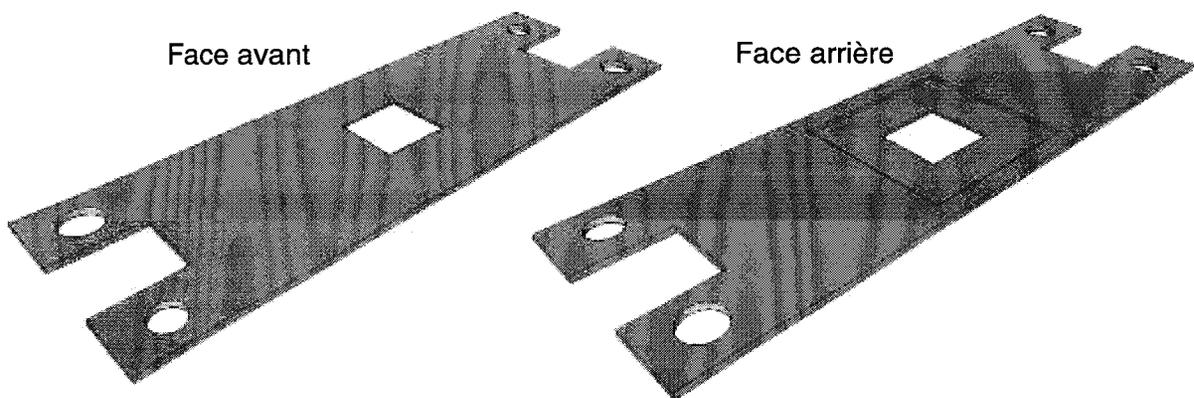


Figure 0.36 - Vue tridimensionnelle du support pour les caches en silicium.

Une fois l'adaptateur mis en place sur le support MALDI, la lame contenant la coupe de tissu et la matrice sont placées sur la face arrière de l'adaptateur. Une vue d'ensemble est présentée Figure 0.37.

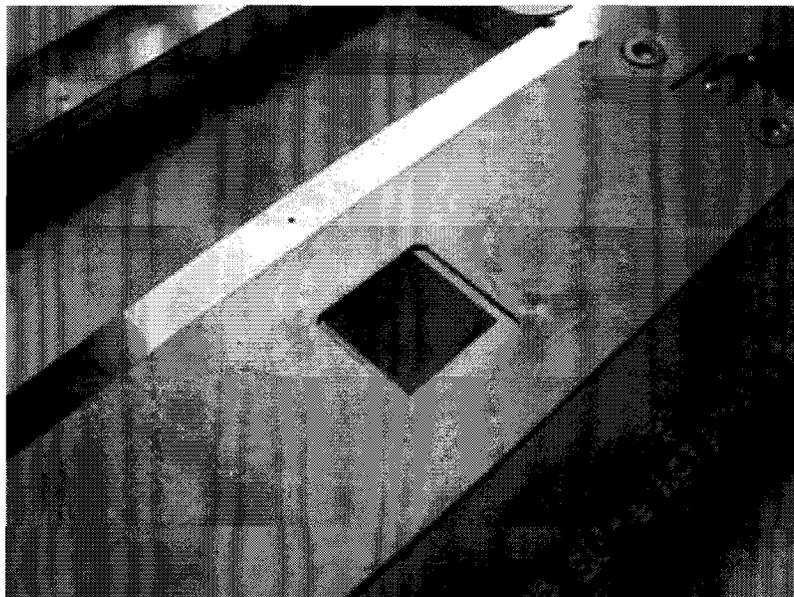


Figure 0.37 - Vue d'ensemble du support MALDI avec adaptateur, cache en silicium et coupe de tissu.

12.6. Résultats MALDI

Comme précédemment, l'analyse est effectuée sur une coupe de cerveau de rat. La matrice utilisée est de la HCCA saturée (acétonitrile (0,1%)/TFA 6:4 v/v). Nous n'avons pas réalisé de reconstruction d'image lors de la validation de la grille. La caractérisation a permis de valider que, contrairement aux autres techniques de haute résolution, nos caches n'entraînent pas de diminution de l'intensité. On observe, comme pour les plus grands caches, une amplification du signal. Il est donc possible de diminuer radicalement la zone irradiée tout en augmentant l'intensité des spectres.

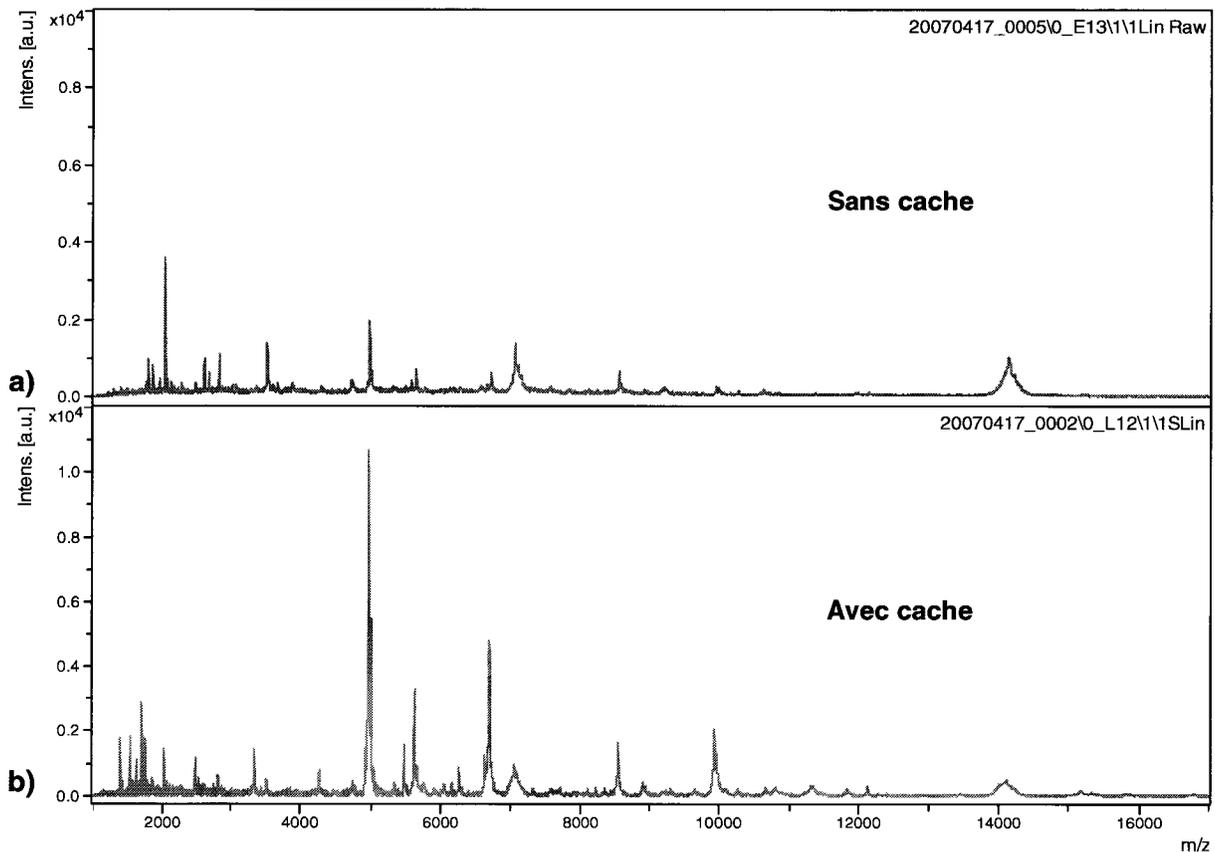


Figure 0.38 - Spectres obtenus sur une coupe de cerveau de rat : a) sans cache, b) avec un cache d'ouverture interne 36 μ m et d'épaisseur 42 μ m.

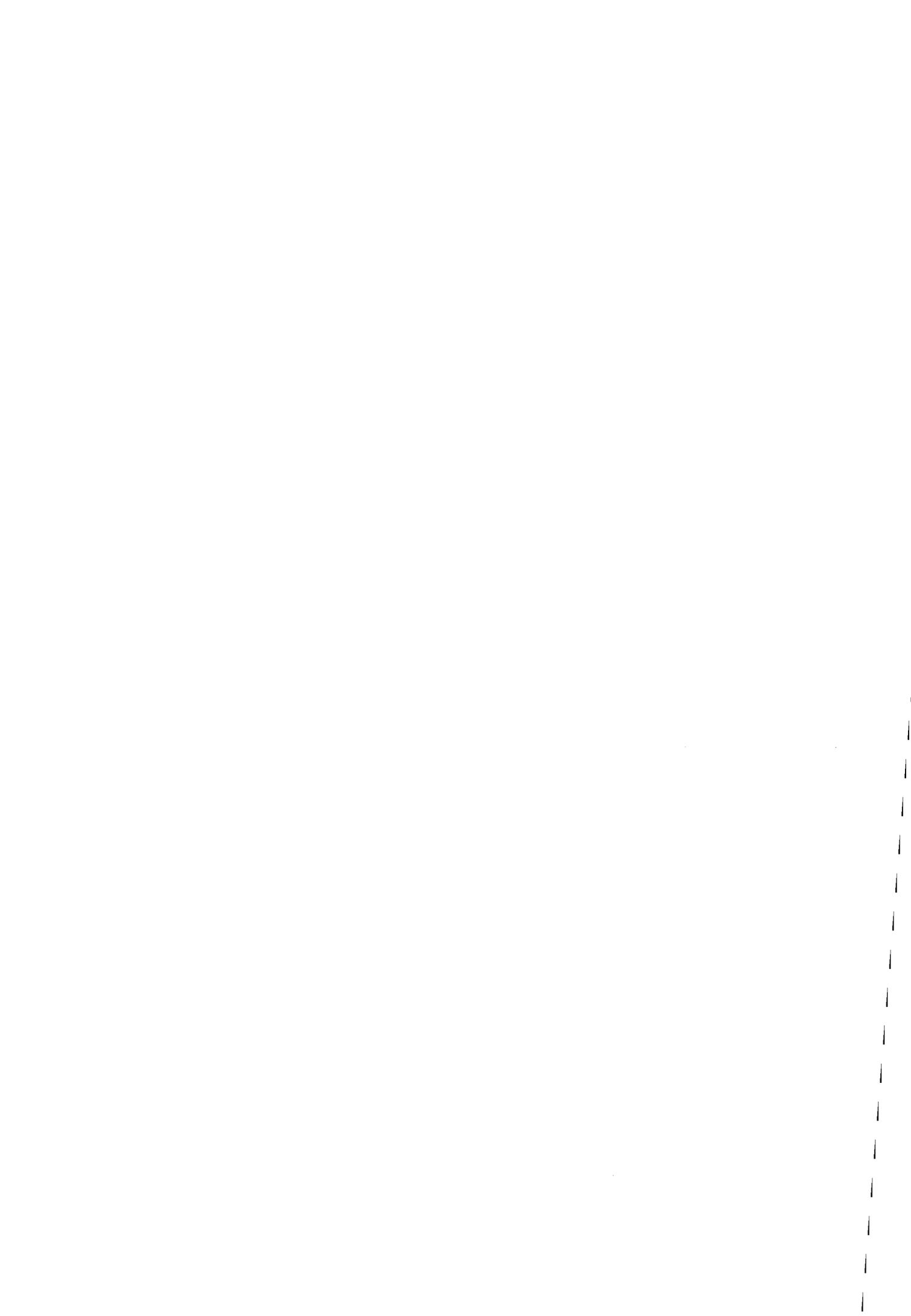
12.7. Conclusion

Les caches réalisés en silicium ont donc permis de réaliser de l'imagerie MALDI en diminuant considérablement la taille du faisceau donc la résolution de l'image²⁴. Les prochaines études permettront de déterminer l'importance de la taille de l'ouverture mais également d'éclaircir le phénomène d'amplification du signal. Le support réalisé permet d'insérer ce cache au sein de spectromètre MALDI de toute marque. Le brevet déposé fait de cet objet un véritable démonstrateur.

13. Bibliographie

- ¹ N. Chronis and L.P. Lee, “*Electrothermally activated SU-8 microgripper for single cell manipulation in solution*”, J. Microelec. Syst. **14** (2005) 857-863.
- ² D. Di Carlo, L.Y. Wu and L.P. Lee, “*Dynamic single cell culture array*”, Lab Chip **6** (2006) 1445-1449.
- ³ D. Irimia and M. Toner, “*Cell handling using microstructured membranes*”, Lab Chip **6** (2006) 345-352.
- ⁴ P.J. Lee, P.J. Hung, V.M. Rao and L.P. Lee, “*Nanoliter scale microbioreactor array for quantitative cell biology*”, Biotechnology and Bioengineering **94** (2006) 5-14.
- ⁵ D.S. Gray, J.L. Tan, J. Voldman and C.S. Chen, “*Dielectrophoretic registration and living cells to a microelectrode array*”, Biosensors and Bioelectronics **19** (2004) 1765-1774.
- ⁶ E. Ostuni, R. Kane, C.S. Chen, D.E. Ingber and G.M. Whitesides, “*Patterning mammalian cells using elastomeric membranes*”, Langmuir **16** (2000) 7811-7819.
- ⁷ M. Thery, A. Pépin, E. Dressaire, Y. Chen, M. Bornens “*Cell Distribution of Stress Fibres in Response to the Geometry of the Adhesive Environment*”, Cell Motility and the Cytoskeleton, **63** (2006) 341-355.
- ⁸ M. Veiseh, B.T. Wyckes, D.G. Castner and M. Zhang, “*Guided cell patterning on gold-silicon dioxide substrates by surface molecular engineering*”, Biomaterials **25** (2004) 3315-3324.
- ⁹ P.W. Huang, T.T. Wang, S.W. Lin, Y.C. Chang, S.K. Fan, “*Dielectrophoretic cell concentrator on EWOD-based chips*”, Proceedings of the 1st IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, January 18-21, Zhuhai, China (2006).
- ¹⁰ S.K. Cho, H. Moon and C.J. Kim, “*Creating, transporting, cutting, and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits*”, Journal of Microelectromechanical Systems **12** (2003) 70-80.
- ¹¹ J.C. Fourrier, F. Caron, C. Druon, P. Tabourier, J.P. Le Pesant, D. Loyaux and C. Rolando, “*Dispositif pour désorption par rayonnement laser incorporant une manipulation de l'échantillon liquide sous forme de gouttes individuelles permettant leur traitement chimique et biochimique*”, USTL, CNRS, Sanofi-Aventis, Osmooze, N°FR200400060 81, 04/05/04.
- ¹² T. Yasuda, K. Suzuki and I. Shimoyama, “*Automatic transportation of a droplet on a wettability gradient surface*”, 7th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (μ TAS), Squaw Valley, CA, USA, October 5-9(2003) 1129-1132.
- ¹³ C.S. Lee, S.H. Lee, S.S. Park, Y.K. Kim and B.G. Kim, “*Protein patterning on silicon-based surface using background hydrophobic thin film*”, Biosensors and Bioelectronics **18** (2003) 437-444.
- ¹⁴ S.H. Lee, C.S. Lee, D.S. Shin, B.G. Kim, Y.S. Lee and Y.K. Kim, “*Micro protein patterning using a lift-off process with fluorocarbon thin film*”, Sensors and Actuators B **99** (2004) 623-632.
- ¹⁵ P. Abgrall, “*Microtechnologies polymères pour les laboratoires sur puces*”, Thèse de l'Université Paul Sabatier - Toulouse III (2006).

- ¹⁶ P. Degenaar, B. Le Pioufle, L. Griscom, A. Tixier, Y. Akagi, Y. Morita, Y. Murakami, K. Yokoyama, H. Fujita and E. Tamiya, "A method for micrometer resolution patterning of primary culture neurons for SPM analysis", *J. Biochem.* **130** (2001) 367-376.
- ¹⁷ K. Madjour, "Microsystème EWOD pour la culture de cellules en gouttes", Rapport de Mastère 2 MNT, Université de Lille 1 (2007).
- ¹⁸ UpChurch Scientific, www.upchurch.com
- ¹⁹ R.M. Caprioli, T.B. Farmer and J. Gile, "Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS", *Anal. Chem.* **69** (1997) 4751-4760.
- ²⁰ M. Wisztorski, "Développements en imagerie par spectrométrie de masse et applications aux modèles invertébrés", Thèse, Université des Sciences et Technologies de Lille (2006).
- ²¹ J.C. Jurchen, S.S. Rubakhin and J.V. Sweedler, "MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16** (2005) 1654-1659.
- ²² K. Dreisewerd, M. Schurenberg, M. Karas and F. Hillenkamp, "Influence of the laser intensity and spot size on the Desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser Desorption/ionization with a uniform beam profile", *Int. J. Mass. Spectrom. and Ion Processes* **141** (1995) 127-148.
- ²³ P. Chaurand, S.A. Schwartz, D. Billheimer, B.J. Xu, A. Crecelius and R.M. Caprioli, "Integrating histology and imaging mass spectrometry", *Anal. Chem.* **76** (2004) 1145-1155.
- ²⁴ M. Wisztorski, N. Verplanck, V. Thomy, I. Fournier and M. Salzet, "Masks useful for MALDI imaging of tissue sections, processes of manufacture and uses thereof", Déclaration d'invention CNRS n°DI 00047-03 (2005), demande PCT n°EP/2007/054253 déposé le 2 mai 2007 sous priorité de la demande US PROVISoire N°60 /796, 535 du 2 mai 2006.



Conclusion générale



Dans le premier chapitre, l'état de l'art a montré l'intérêt des *lab-on-chip* pour les applications biomédicales et en particulier pour l'analyse protéomique par spectrométrie de masse.

Le premier prototype réalisé au cours de cette thèse comporte une base, intégrant l'architecture microfluidique (verre/nickel/SU-8/Cytop) dédiée au déplacement de gouttes par électromouillage, et un capot amovible. Consistant en un substrat de silicium recouvert d'une monocouche d'OTS, ce dernier a un comportement globalement hydrophobe mais contient des microplots hydrophiles (100 μ m de diamètre). De plus, le banc de pilotage du microsystème, existant antérieurement, a été modernisé pour une plus grande ergonomie. Des déplacements de gouttes d'EDI (à une vitesse maximale de 121mm.s⁻¹) et de différents liquides biologiques ont permis de valider le dispositif en fluorescence et en MALDI.

Dans un second temps, nous avons réalisé un second prototype original, la base étant identique à celle décrite précédemment. Le capot, quant à lui, est réalisé en silicium nanostructuré (par attaque chimique), permettant de réaliser une analyse par désorption/ionisation sur nanostructures (DIOS). Cette technique présente comme intérêts, contrairement à l'analyse MALDI, de s'affranchir de la matrice et d'annuler le bruit pour les basses masses. De plus, traitées hydrophobes, ces surfaces nanostructurées présentent un caractère macroscopique superhydrophobe. Après validation de l'ensemble des opérations microfluidiques élémentaires ainsi que l'analyse biologique, une confrontation des deux microsystèmes EWOD est alors présentée. Les tensions d'actionnement sont plus faibles sur le microsystème DIOS en raison de la très faible hystérésis sur le capot (force s'opposant au déplacement), les vitesses de déplacement étant, quant à elles, équivalentes. De plus, l'analyse pour une goutte contenant un seul peptide permet de noter l'absence de bruit dans les basses masses. Cependant, pour les mélanges plus complexes, on note d'importants problèmes de résolution en raison notamment d'un effet de suppression de pics. L'optimisation en cours de ces surfaces (densité et longueur des nanofils) amènera donc ce dispositif à être totalement opérationnel.

Enfin, l'électromouillage sur des surfaces superhydrophobes, a été étudié. Les meilleurs résultats de la littérature font état d'une relaxation partielle de la goutte dans un environnement d'air une fois la tension coupée. Nous avons pu nous placer à l'état de l'art en réalisant le premier effet EWOD totalement réversible (angle de contact variant de 161° à 134° à 150 V_{TRMS}) sur surfaces superhydrophobes (nanofils de silicium obtenus par croissance). Les mêmes caractérisations dans un environnement d'huile ont également été effectuées et ont montré de meilleurs résultats que ceux de la littérature (plus grande variation d'angle de contact). Une interprétation du phénomène ainsi que les premiers éléments d'un modèle théorique permettent d'envisager une optimisation de

l'électromouillage. Une technologie haute température a été mise au point pour la réalisation de bases EWOD superhydrophobes. Les essais de déplacement de gouttes d'EDI sur cette base n'ont pas été concluants. Toutefois, des pistes sont envisagées pour dépasser les problèmes de manipulation rencontrés.

En parallèle à ces travaux, la conception et la réalisation d'un microsystème EWOD dédié à la culture de cellules en goutte sont présentées. Validé par une première génération (verre/SU-8), il a toutefois comme principal défaut de présenter des fuites. La seconde version (Si/SiO₂) a permis de contrecarrer cette limitation mais n'a pas pu être totalement caractérisée. De plus, nous avons développé un objet original et breveté répondant au besoin de l'imagerie MALDI de diminuer le faisceau laser pour augmenter la résolution d'analyse de tissus biologiques. De réalisation simple et adaptable à tout type de spectromètre de masse MALDI, la conception d'un support spécifique en fait désormais un démonstrateur pré-industrialisable.

Notons également que nous n'avons pu présenter dans ce manuscrit, pour des raisons de confidentialité (brevet en cours de rédaction), les résultats de manipulations effectuées en collaboration avec Tim Foat, du *Defence Science and Technology Laboratory* (DSTL, Angleterre) et Farzam Zoueshtiagh, du Laboratoire de Mécanique de Lille (LML). La thématique générale de ces travaux repose sur l'utilisation de la technique EWOD pour la collecte de bioparticules déposées sur une surface, avec comme principale application le contrôle environnemental.

En conclusion, ces travaux laissent le champ à de nombreuses études futures. Nous pouvons ainsi dégager de cette thèse trois points clés qui semblent présenter d'importantes perspectives :

- l'utilisation de surfaces superhydrophobes DIOS au sein de systèmes EWOD doit être optimisée, notamment concernant l'aspect fonctionnalisation biochimique. Ceci doit permettre de réaliser des opérations de prétraitement (digestion trypsique, dessalage, séparation ...) intégrées afin d'analyser un échantillon brut et d'atteindre des seuils de sensibilité ultime,
- la faisabilité d'une opération d'électromouillage totalement réversible ayant été montrée sur nanofils de silicium superhydrophobes, une modélisation des propriétés de mouillage couplée à une caractérisation systématique de ces surfaces devrait amener à l'optimisation de la structure du matériau pour atteindre une variation maximum de l'angle de contact en fonction de la tension appliquée. Des systèmes de déplacement EWOD entièrement superhydrophobes sont, dans ce cadre, tout à fait envisageables, aussi bien pour des *lab-on-chip* pour la protéomique, que pour le *self-cleaning* ou des systèmes optiques,

- enfin, dans la continuité des travaux entrepris sur un microsystème EWOD pour la culture de cellules, la réalisation d'un *lab-on-chip* mixte cellomique/protéomique est possible tout en permettant l'intégration d'outils de détection *in situ* développés (spectroscopie d'impédance basses fréquences et TéraHertz, nano biocapteurs acoustiques à ondes de surface) dans le cadre du groupe Microfluidique de l'IEMN.

Annexes

Annexe 1 - Procédés technologiques mis en œuvre

1.1. Photolithographie

La lithographie optique, ou photolithographie, est une technique permettant de créer des motifs d'épaisseur uniforme dans une résine photosensible sur un substrat. La largeur minimale des motifs est de l'ordre du micron. Une lithographie est composée de trois étapes : une étape d'enduction, une étape d'insolation et une étape de développement.

1.1.1. Enduction

Le dépôt de la résine s'effectue par centrifugation au moyen d'une tournette (Figure A.1). Ce dépôt, plus connu sous le nom de *spin-coating*, prend en compte trois paramètres : la vitesse, exprimée en tours par minute (rpm, *rotation per minute*), l'accélération, exprimée en tours par minute par seconde ($\text{rpm}\cdot\text{s}^{-1}$, *rotation per minute per second*) et le temps, exprimé en secondes. L'épaisseur finale est déterminée par ces trois paramètres mais également par la quantité (en général, 1 ml de résine pour 1 pouce de diamètre) et la viscosité de la résine déposée. Une fois la résine étalée, on effectue un recuit afin d'évaporer les solvants.

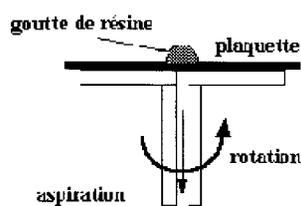


Figure A.1 - Principe de fonctionnement d'une tournette¹.

Insolation

La résine, sensible aux UV, est ensuite placée dans un aligneur (Figure A.2) et insolée au travers d'un masque afin d'y transférer les motifs. Le masque est une plaque de quartz ou de verre recouverte d'une couche de chrome, dans laquelle sont gravés les motifs.



Figure A.2 - Aligneur MA6/BA6 (Süss Microtec) de l'IEMN.

Les résines utilisées sont des composés organiques. Il en existe deux types, les résines positives et les résines négatives :

- une résine positive est constituée d'un composé photosensible, d'une base (résine) et d'un solvant organique. Avant l'exposition, le composé photosensible est insoluble dans le révélateur. Les radiations changent la structure chimique de la résine, les régions insolées deviennent plus solubles et sont éliminées à la révélation.

- une résine négative est constituée de polymères combinés avec un composé photosensible. Ce dernier absorbe les radiations lors de l'insolation et les convertit en énergie chimique afin de polymériser la résine. La résine ainsi polymérisée a un poids moléculaire plus important et devient insoluble lors de la révélation.

Développement

L'échantillon est ensuite immergé dans un révélateur afin de dissoudre la résine insolée (dans le cas d'une résine positive) ou la résine non insolée (dans le cas d'une résine négative). Les courbes présentées Figure A.3 montrent bien le pourcentage de résines restant après insolation et développement en fonction de l'énergie lumineuse lors de l'insolation.

La Figure A.4 reprend les différentes étapes de lithographie optique pour les résines positives et négatives.

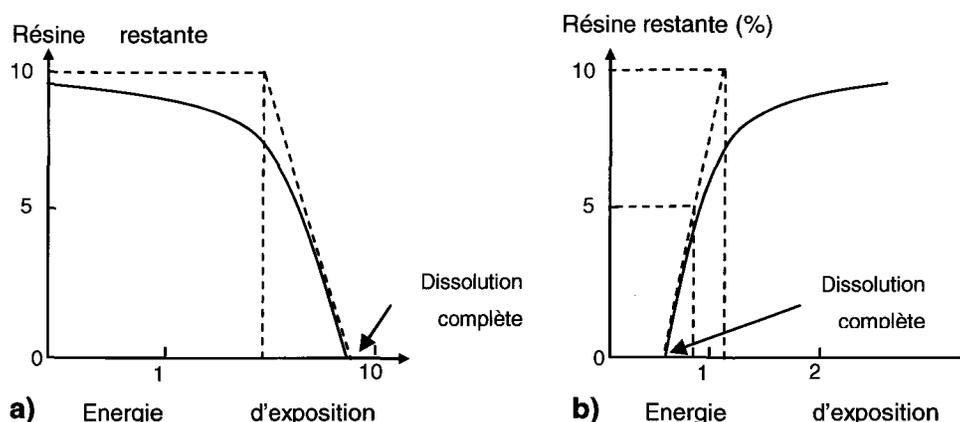


Figure A.3 - Courbe de réponse d'une résine au révélateur en fonction de l'énergie d'exposition : a) cas d'une résine positive, b) cas d'une résine négative.

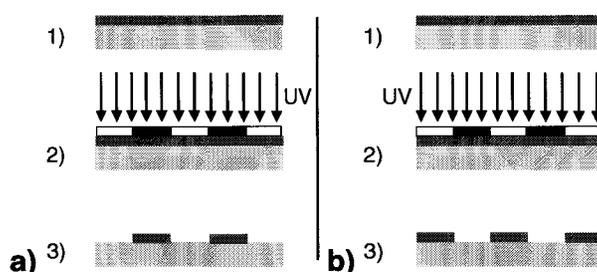


Figure A.4 - Schéma de principe de la photolithographie (a) dans le cas d'une résine positive, (b) dans le cas d'une résine négative : 1) enduction, 2) insolation, 3) développement.

1.2. Métallisation

Pulvérisation cathodique

Le procédé de pulvérisation cathodique permet de déposer des couches plus denses et d'obtenir une meilleure adhérence du dépôt sur le substrat. Elle est, de plus, préférée pour des métallisations de grandes surfaces (grâce à la grande taille de la cible, contrairement à l'évaporation où la cible peut être considérée comme ponctuelle). La pulvérisation cathodique se déroule sous un vide poussé (de l'ordre de 10^{-8} mBar) dans une enceinte comprenant deux plaques parallèles (une anode et une cathode). La cible du matériau à déposer est située à la cathode tandis que l'anode sert de porte-substrat. Le principe consiste à créer un plasma (ionisation d'un gaz neutre, en général l'argon) au voisinage de la cathode grâce à une excitation haute fréquence au voisinage de celle-ci (Figure A.5). La cible est alors bombardée par les électrons et les ions plasma. Etant donné que la mobilité des électrons est supérieure à celle des ions, un plus grand nombre d'électrons arrivent sur la cible qui se polarise négativement pour repousser les électrons excédentaires. Les ions argon sont accélérés par le champ électrique ainsi créé et transfèrent leur quantité de mouvement aux atomes de la cible qui s'arrachent à celle-ci. Les atomes arrachés vont alors être projetés vers le porte-substrat refroidi et s'y déposer. Cette technique permet de déposer un grand nombre de matériaux tels que le chrome, le nickel, l'or, le tungstène, l'argent ou encore le cuivre.

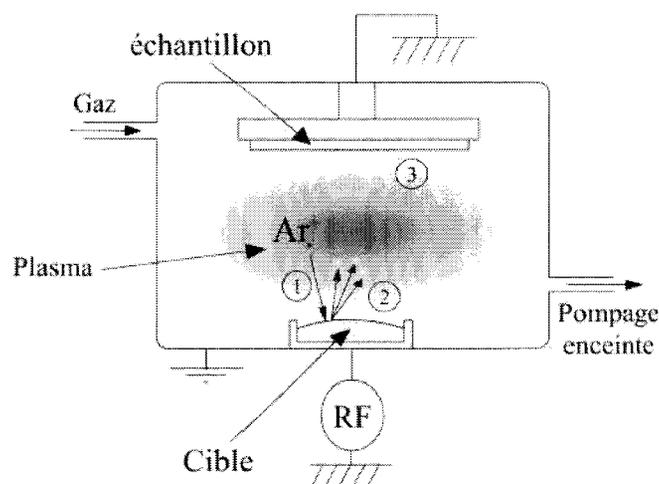


Figure A.5 - Schéma de principe de la métallisation par pulvérisation cathodique².

La pulvérisation cathodique RadioFréquence (RF) est utilisée pour déposer des couches conductrices, semi-conductrices et isolantes. Une tension négative est appliquée alternativement à la cathode et à l'anode. A la fréquence utilisée (16,56MHz), les ions, au regard de leur masse, ne peuvent pas suivre les variations temporelles du potentiel

comparativement aux électrons. Le couplage étant capacitif, une auto-polarisation négative de la cible se produit pour équilibrer les courants ioniques et électroniques de façon à obtenir un courant moyen total nul. Les caractéristiques de tels dépôts sont une vitesse de déposition lente (dans le cadre de notre utilisation, la vitesse de déposition du nickel est de $50\text{\AA}\cdot\text{min}^{-1}$) et une température peu élevée pendant le dépôt.

L'IEMN possède un bâti de pulvérisation cathodique MP450S (**PLASSYS**, France) (Figure A.6).

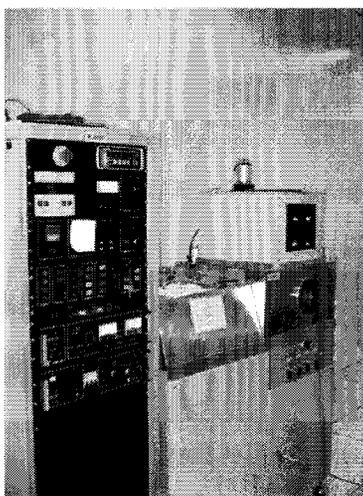


Figure A.6 - Bâti de métallisation par pulvérisation cathodique PLASSYS MP450S de l'IEMN.

Evaporation

Le principe de l'évaporation consiste à chauffer le métal à déposer jusqu'à dépasser la température de liquéfaction. La pression de vapeur est alors sensiblement supérieure à celle résiduelle dans l'enceinte. Les atomes métalliques se propagent alors jusqu'à rencontrer un obstacle où il y aura alors échange d'énergie. Lorsque l'atome rencontre le substrat, plus froid, il y a condensation définitive. L'évaporation se déroule dans le vide afin de limiter le nombre d'atomes résiduels et ainsi limiter considérablement les collisions entre atomes. La pression dans l'enceinte est généralement de l'ordre de 10^{-6} Torr. Le libre parcours moyen de l'atome est alors statistiquement supérieur aux dimensions de l'enceinte. Plusieurs méthodes permettent le chauffage du métal à évaporer :

- le creuset : ce récipient contenant le métal est chauffé par effet joule grâce à une résistance électrique. Le substrat à traiter est placé au-dessus de ce creuset. Cette procédure est limitée aux matériaux s'évaporant à relativement basse température (à cause du point de fusion du creuset),
- le canon à électrons à déflexion électromagnétique (Figure A.7) : le faisceau d'électrons est émis par un filament de tungstène et sa trajectoire est définie via un aimant. Le matériau repose sur une nacelle de cuivre refroidi pour éviter son évaporation. Cette technique, contrairement à la précédente, permet l'évaporation de tout matériau,

- par faisceau laser.

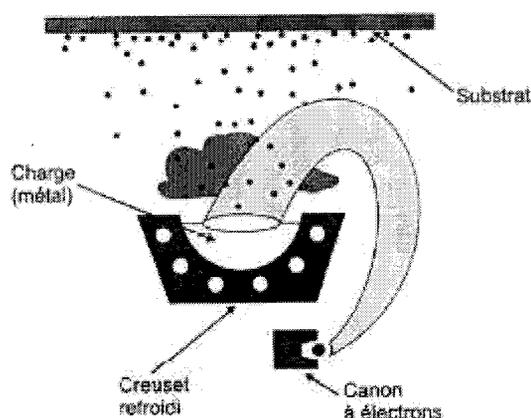


Figure A.7 - Schéma de principe de la métallisation par évaporation (procédé du canon à électrons)².

L'IEMN dispose d'un bâti d'évaporation fonctionnant sur le principe du canon à électrons 6 creusets (pour le refroidissement). Ces bâtis sont équipés de canons qui permettent, sous pression partielle d'argon et à très faible énergie, un prénettoyage des substrats avant dépôt.

Le dépôt par pulvérisation est utilisé préférentiellement dans le cas de couches minces et de bonne qualité (de l'ordre de la dizaine d'ångströms) ou dans le cas d'un *lift-off*. En effet, dans ce cas, le dépôt, anisotrope, n'est pas continu autour des motifs, ce qui facilite l'infiltration de l'acétone sous les films métalliques à décoller.

1.3. Gravure RIE

La gravure sèche RIE (*Reactive Ion Etching*) est une gravure sélective réalisée par plasma. Le substrat est placé dans un réacteur sous vide dans lequel sont introduits les gaz. Le plasma est ensuite déclenché à l'aide d'une source de puissance RF qui transforme les molécules en ions. Ceux-ci sont accélérés entre les deux électrodes et réagissent avec la surface. La gravure est soit à dominante physique (l'énergie des ions arrache les molécules à la surface, la gravure est anisotrope) soit à dominante chimique (les ions réagissent avec certains matériaux, la gravure est isotrope). Afin de réaliser une gravure sélective, il faut jouer sur ces deux propriétés. En général, les paramètres à ajuster sont la puissance, la pression, le débit et le temps. La fin de gravure est repérée par interférométrie (changement de matériau donc changement d'indice).

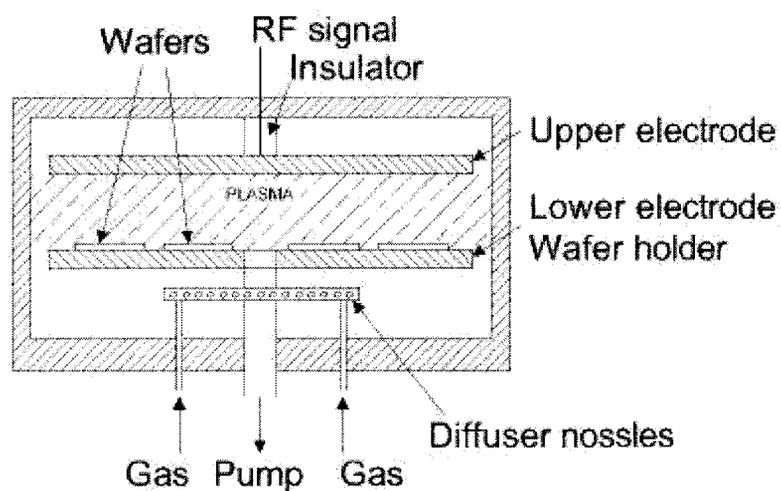


Figure A.8 - Schéma de principe de la gravure RIE³.

1.4. Bibliographie

¹ http://www.microelectronique.univ-rennes1.fr/fr/index_chap10.htm

² http://perso.wanadoo.fr/michel.hubin/physique/couche/chap_pc1.htm

³ <http://www.memsnets.org/mems/processes/etch.html>

Annexe 2 – Contrôle des électrodes par LabVIEW

2.1. Interface utilisateur

Le programme développé sous LabVIEW permet de contrôler les électrodes de façon indépendante et automatisée. Le principe consiste à contrôler chacune des broches de la carte E/S, chacune étant reliée à un circuit relais, lui-même connecté au substrat. La connectique de la carte E/S est de type DB25, divisé en 3 ports de 8 bits (A, B et C) et d'une broche de masse.

Dans un premier temps, le délai d'attente entre deux séquences (en secondes) ainsi que le nombre de boucles souhaitées sont déterminés. L'architecture microfluidique est représentée dans le logiciel à l'aide d'un cluster de n éléments (n étant le nombre d'électrodes). Chaque élément du cluster représente une électrode et contrôle l'une des 24 broches de la carte E/S. Pour chaque séquence, il faut choisir les électrodes à activer par simple clic (Figure A.9). Chaque élément, dont la forme rappelle les électrodes, est relié à l'un des éléments de l'un des trois clusters de 8 éléments représentant les 3 ports A, B et C (Figure A.10). Il en sort un nombre binaire pour chaque port convertit en nombre entier de 32 bits compris entre 0 et 255.

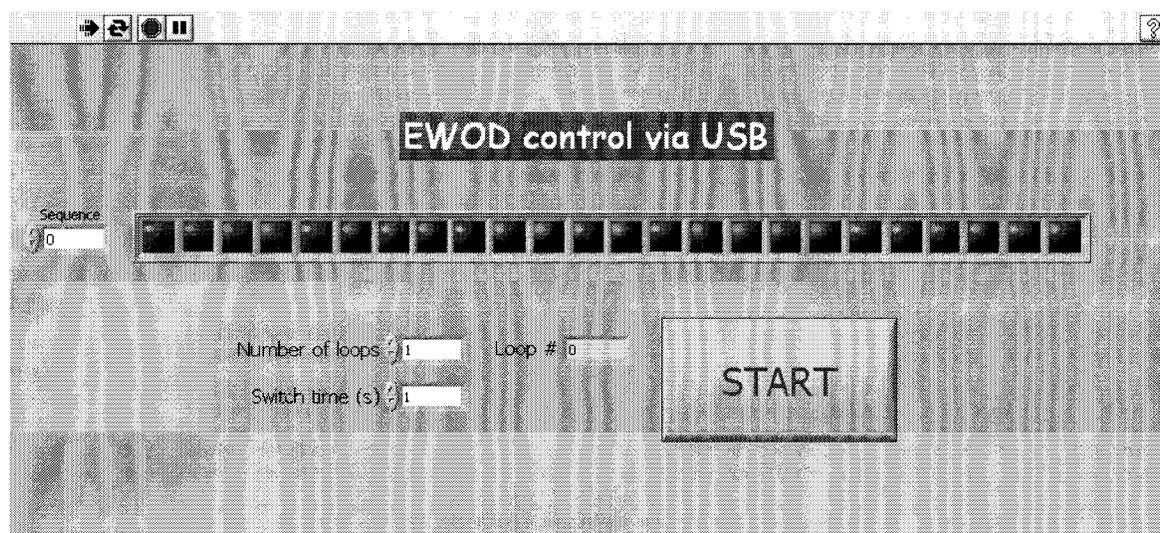


Figure A.9 - Face avant du VI LabVIEW pour le contrôle du banc EWOD.

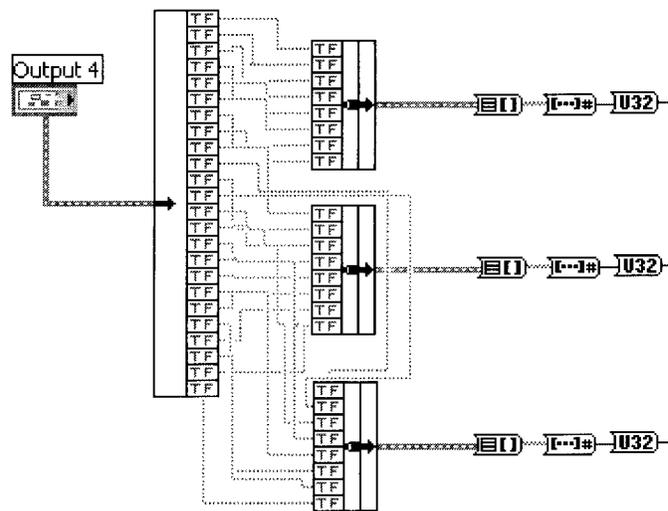


Figure A.10 – Détail du cluster qui envoie les données vers les 3 ports.

2.2. Stockage des valeurs

Les trois valeurs sont alors stockées dans trois tableaux dont la ligne active est déterminée par la valeur de séquence rentrée manuellement. Par exemple, si on souhaite tout d'abord activer l'électrode 1 (séquence 0), qui est reliée au bit 0 du port A, il suffit d'envoyer vers les tableaux A, B et C respectivement les valeurs 1, 0 et 0. Si on souhaite activer pour la séquence suivante (séquence 1) toutes les électrodes du port B et éteindre l'électrode 1, il faut envoyer respectivement 0, 255 et 0. Et cela ainsi de suite jusqu'à ce que la séquence complète souhaitée soit enregistrée dans le tableau.

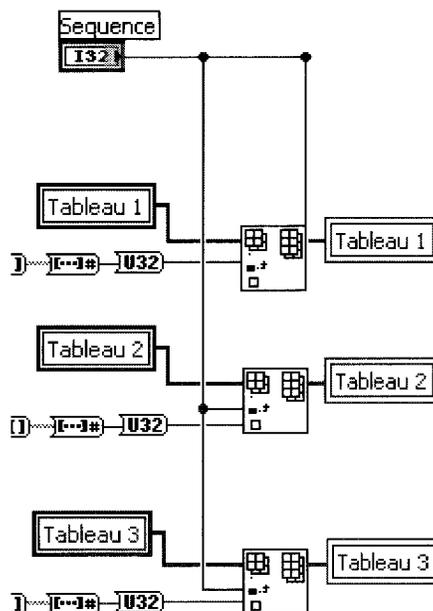


Figure A.11 - Zone de stockage des données.

2.3. Lancement de la boucle

Une fois la séquence complète programmée, il suffit de cliquer sur START afin d'activer une structure condition. Cette boucle va rechercher ligne par ligne les 3 valeurs présentent dans les tableaux et les écrit sur les ports. Un temps d'attente dont la valeur est choisie par l'utilisateur permet de contrôler la vitesse de transition entre deux états. Ainsi, il est possible de contrôler précisément la vitesse de déplacement des gouttes. Enfin, le programme ne s'arrêtera qu'une fois le nombre d'itérations souhaitées atteintes (*Number of loops*).

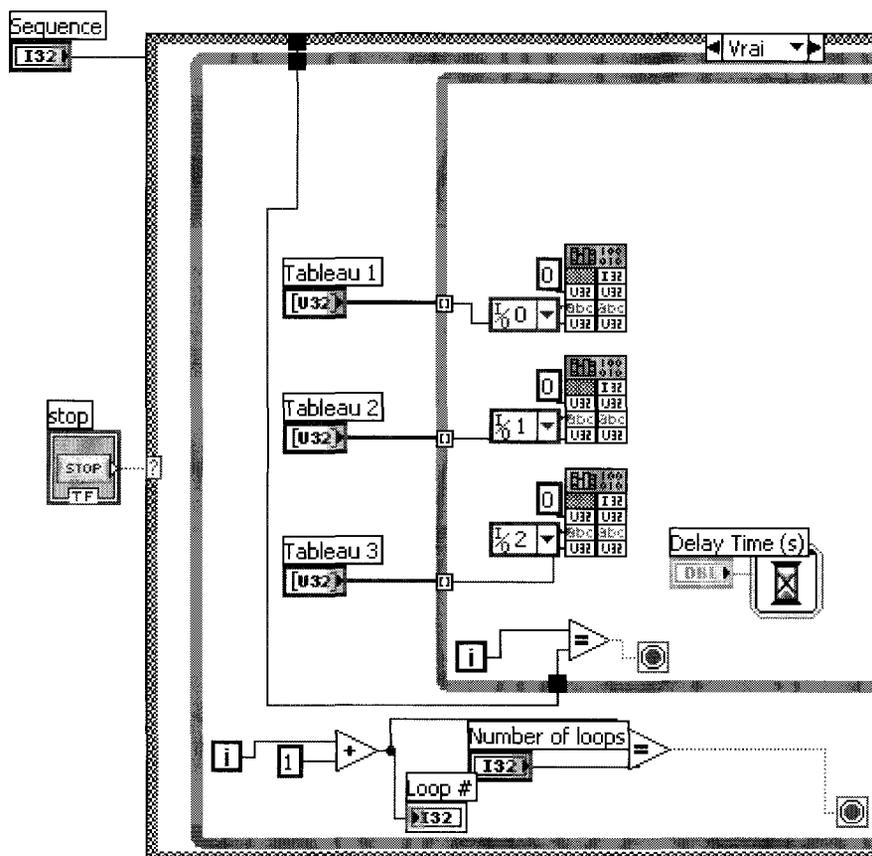


Figure A.12 - Structure itérative permettant d'envoyer, ligne par ligne, les valeurs contenues dans chaque tableau vers les trois ports correspondants.

2.4. Suivi en temps réel

Afin d'avoir une visualisation en temps réel, la valeur envoyée vers le port est également envoyée vers le cluster. Il est donc aisé de savoir précisément la position théorique de la goutte uniquement à partir de l'écran (très utile dans le cas d'un système opaque).

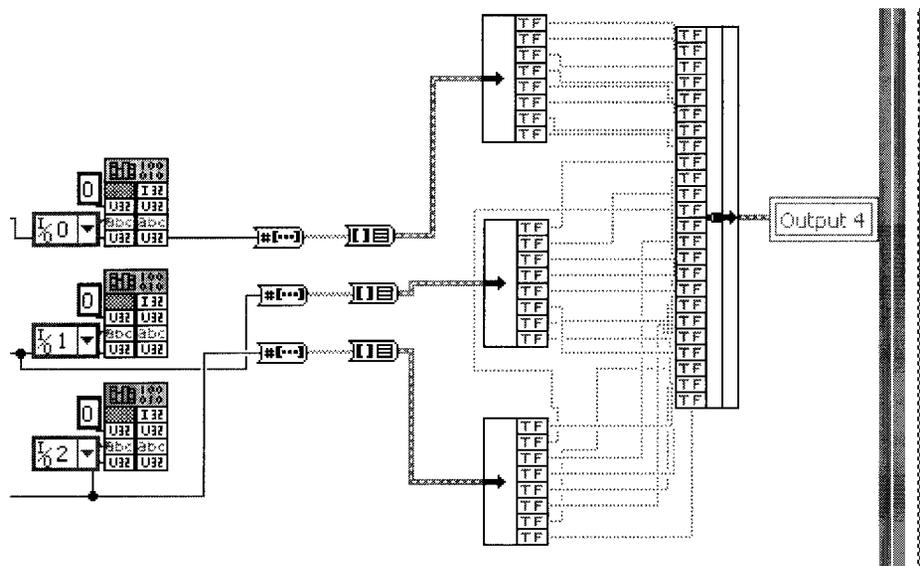


Figure A.13- Le logiciel envoie vers le cluster la donnée écrite sur le port pour une visualisation en temps réel.

Publications, brevets et communications

Publications internationales

N. Verplanck, Y. Coffinier, E. Galopin, J. C. Camart, R. Boukherroub and V. Thomy, "*Reversible electrowetting on superhydrophobic silicon nanowires*", Nano Lett. **7** (2007) 813-817.

N. Verplanck, Y. Coffinier, V. Thomy and R. Boukherroub, "*Wettability Switching on Nanostructured Surfaces*", Nanoscale Res Lett **2** (2007) 577–596.

Brevets

M. Wisztorski, **N. Verplanck**, V. Thomy, I. Fournier and M. Salzet, "*Masks useful for MALDI imaging of tissue sections, processes of manufacture and uses thereof*", Déclaration d'invention CNRS n° DI 00047-03 (2005), demande PCT n°EP/2007/054253 déposée le 2 mai 2007 sous priorité de la demande US PROVISoire N°60/796, 535 du 2 mai 2006. Date de publication internationale : 15 novembre 2007, n°WO 2007/128751A2.

Conférences internationales avec actes

R. Boukherroub, **N. Verplanck**, Y. Coffinier, G. Piret and V. Thomy, "*Superhydrophobic Surface enabling reversible electrowetting and mass spectrometry analysis*", First Shenyang International Colloquium on Microfluidics (SICOM I), Shenyang (China), October 21-24 (2007) 107-110. **(Oral)**

N. Verplanck, M. Wisztorski, J. Stauber, J.C. Camart, M. Salzet, I. Fournier and V. Thomy, "*Enhance spatial resolution of MALDI images by silicon masks*", The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2007), Paris (France), October 7-11 (2007) 41-43. **(Poster)**

N. Verplanck, Y. Coffinier, J.C. Camart, R. Blossey, R. Boukherroub and V. Thomy, "*Superhydrophobic surfaces: from irreversible to reversible EWOD*", The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2007), Paris (France), October 7-11 (2007) 1043-1045. **(Poster)**

N. Verplanck, Y. Coffinier, M. Wisztorski, G. Piret, V. Thomy, I. Fournier, J.C. Camart, P. Tabourier and R. Boukherroub, "*Nanostructured surface as EWOD counter electrode for matrix-free mass spectrometry analysis*", The 10th International Conference on Miniaturized

Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2006), Tokyo (Japan), November 5-9 (2006) 771-773. **(Poster)**

R. Boukherroub, **N. Verplanck**, Y. Coffinier, G. Piret, V. Thomy, I. Fournier, M. Salzet and J.C. Camart, "*Silicon nanowires: a novel platform for EWOD actuation and matrix-free mass spectrometry analysis*", 210th ECS Meeting (ElectroChemical Society), Cancun (Mexico), October 29 - November 3 (2006). **(Oral)**

Conférences internationales sans actes

Y. Coffinier, G. Piret, **N. Verplanck**, J.C. Camart, R. Boukherroub, R. Blossey, V. Thomy, '*Superhydrophobic Surface for a Total Reversible Electrowetting Effect*', Cost meeting, Twente (The Netherlands), October (2007). **(Poster)**

Y. Coffinier, G. Piret, **N. Verplanck**, V. Thomy, I. Fournier, J.C. Camart and R. Boukherroub, "*Silicon nanowires for mass spectrometry biomolecule analysis*", Nanobiotech 2006, Stockholm (Sweden), November 20-21 (2006). **(Oral)**

B. Salhi, Y. Coffinier, **N. Verplanck**, M. Wisztorski, G. Piret, V. Thomy, I. Fournier, M. Salzet, J.C. Camart and R. Boukherroub, "*Nanostructured surface as EWOD counter electrode for matrix-free mass spectrometry analysis*", Trends in NanoTechnology (TNT2006), Grenoble (France), September 4-8 (2006). **(Poster)**

N. Verplanck, J.C. Camart and V. Thomy, "*EWOD valves for the creation of a microdroplet array: cancerous cell isolation*", 5th International Meeting on Electrowetting, Rochester (NY, USA), May 31 – June 2 (2006). **(Poster)**

N. Verplanck, E. Galopin, V. Thomy, J. Carlier, R. Boukherroub, I. El Yazidi-Belkoura, J.C. Camart, C. Druon, H. Hondermarck and P. Tabourier, "*Microfluidics and nanotechnology: detection of expressed proteins from isolated cancerous cells on a chip*", 3rd International Conference on Nanobiotechnology, Nice (France) , June (2005). **(Oral)**

Conférences nationales avec actes

N. Verplanck, Y. Coffinier, M. Wisztorski, G. Piret, I. Fournier, J.C. Camart, R. Boukherroub and V. Thomy, "*Utilisation de surfaces nanostructurées comme contre-électrode EWOD : Application à la spectrométrie de masse DIOS*", 10^{èmes} Journées Nationales du Réseau Doctoral en Microélectronique (JNRDM 2007), Lille (France), May (2007). **(Poster)**

N. Verplanck, V. Thomy and J.C. Camart, "*Création d'un réseau de microgouttes par EWOD pour l'isolation de cellules cancéreuses*", 3^{ème} Congrès Français de Microfluidique, Société Hydrotechnique de France, Toulouse (France), December 14-16 (2006). **(Poster)**

N. Verplanck, "*Création d'un réseau de microgouttes par EWOD pour la culture de cellules cancéreuses uniques isolées*", 9^{èmes} Journées Nationales du Réseau Doctoral en Microélectronique (JNRDM 2006), Rennes (France), May (2006). **(Oral)**

E. Galopin, **N. Verplanck**, "*Lab-on-chip intégrant un microréseau de cellules isolées et un nanodispositif fluide de détection de protéines*", 8^{èmes} Journées Nationales du Réseau Doctoral en Microélectronique (JNRDM 2005), Paris (France), May (2005). **(Oral)**

E. Galopin, **N. Verplanck**, V. Thomy, R. Boukherroub, H. Hondermarck, J.C. Camart, C. Druon and P. Tabourier, "*Microfluidique pour l'analyse des protéines exprimées par des cellules cancéreuses isolées sur un microréseau d'immobilisation*", 2^{ème} Congrès Français de Microfluidique, Société Hydrotechnique de France, Toulouse (France), December 14-16 (2004). **(Poster)**

Conférences nationales sans actes

Y. Coffinier, G. Piret, **N. Verplanck**, V. Thomy, I. Fournier, M. Salzet and R. Boukherroub, "*Nanostructured surfaces as EWOD counter electrode for matrix-free mass spectrometry analysis*", 10^{èmes} Journées de la Matière Condensée (JMC2006), Toulouse (France), August 28 – September 1st (2006). **(Poster)**

Y. Coffinier, **N. Verplanck**, M. Wisztorski, G. Piret, V. Thomy, I. Fournier, J.C. Camart, P. Tabourier and R. Boukherroub, "*Nanostructured surfaces as EWOD counter electrode for matrix-free mass spectrometry analysis*", Workshop Nanofils semiconducteurs, Lille (France), July 5-7 (2006). **(Poster)**

Ils parlent de nous

Tom Simonite, "*Tangled Nanowires morph water droplet*", NewScientist.com news service, February 21 (2007). Lien : <http://www.newscientisttech.com/article/dn11229>

Jean-François Haït, "Les rois de la nanoglisse", Journal du CNRS, n° 212 p. 10, septembre 2007. Lien : <http://www2.cnrs.fr/presse/journal/3520.htm>

