



HAL
open science

Etude du transport ionique à travers un nanocanal fluidique : vers l'électropréconcentration sélective

Clément Nanteuil

► **To cite this version:**

Clément Nanteuil. Etude du transport ionique à travers un nanocanal fluidique : vers l'électropréconcentration sélective. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2010. Français. NNT : . tel-00674983

HAL Id: tel-00674983

<https://theses.hal.science/tel-00674983>

Submitted on 1 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° D'ORDRE : 9979



THÈSE DE DOCTORAT

SPECIALITE : PHYSIQUE

*Ecole Doctorale « Sciences et Technologies de l'Information des
Télécommunications et des Systèmes »*

Présentée par : Clément NANTEUIL

Sujet :

ETUDE DU TRANSPORT IONIQUE A TRAVERS UN NANOCANAL FLUIDIQUE: VERS
L'ELECTROPRECONCENTRATION SELECTIVE

Soutenue le 14 Octobre 2010 devant les membres du jury :

Mme DUFOUR-GERGAM Elisabeth (Présidente du jury)

Mme HAGHIRI-GOSNET Anne-Marie (Directrice de thèse)

Mme LE POTIER Isabelle (Examinatrice)

M MAILLY Dominique (Examineur)

M RENAUD Philippe (Examineur)

M SENEZ Vincent (Rapporteur)

M VIOVY Jean-Louis (Rapporteur)

Il y a peut-être un million de méthodes et même un peu plus, mais quant aux principes, ils sont en nombre limité. L'homme qui maîtrise les principes pourra avec succès choisir ses propres méthodes. L'homme qui essaye des méthodes, ignorant les principes, est condamné à avoir des problèmes

- Ralph Waldo EMERSON -

Toutes les actions comportent une part de risque. La prudence ne consiste pas à éviter le danger (c'est impossible) mais à calculer les risques et à agir avec détermination. Commettez des erreurs par ambition, non par paresse. Développez la force de faire des choses osées, pas la force de souffrir

- MACHIAVEL -

Préface

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein du Laboratoire de Photonique et Nanostructures (LPN), unité propre du CNRS (UPR 20). Ce laboratoire fait partie de l'une des cinq centrales technologiques nationales. J'ai été accueilli au sein de l'équipe Nanoflu sous la direction d'Anne-Marie Haghiri-Gosnet. Les recherches du groupe Nanoflu ont pour but la compréhension de phénomènes physico-chimiques ou biochimiques au sein de dispositifs microfluidiques ainsi que la valorisation, dans le domaine des sciences de la vie, de nouvelles technologies de nanofabrication.

Mes travaux de recherche ont porté sur la thématique de concentration de traces d'analytes dans un échantillon grâce à l'électropréconcentration dans un dispositif fluide contenant une nanofente. La technique étudiée, très récente, car mise en évidence il y a quelques années, a fait son apparition dans le groupe Nanoflu suite aux travaux préliminaires d'Adrien Plecis qui m'a précédé. Ces recherches avaient été entreprises au sein du laboratoire environ un an avant mon arrivée. En plus de la grande jeunesse de cette thématique, le groupe ne disposait que de très peu de recul sur les dispositifs microfluidiques intégrant une structure nanométrique. De nombreux paramètres sont impliqués dans l'électropréconcentration, dont une grande majorité sont difficilement maîtrisables, rendant l'interprétation des résultats très délicate. De nombreuses zones d'ombre, tant physiques que techniques, restaient encore à débroussailler et ont été à l'origine de nombreux imprévus. C'est dans ce contexte que ma thèse a commencée.

Le Chapitre 1 présente le contexte sociétal et économique qui justifient les efforts de recherche pour les dispositifs fluidiques intégrant des structures nanométriques.

Les techniques concurrentes qui y sont présentées permettent de fixer les limites actuelles et à dépasser avec la technique étudiée. Enfin, la théorie et l'état de l'art de l'électropréconcentration fixe le point de départ de ces trois années.

Le Chapitre 2 n'était initialement pas prévu à ces travaux. En effet, le procédé de fabrication utilisé avant mon arrivée qui y est mentionné était censé pouvoir permettre de réaliser toutes mes recherches. Les optimisations testées et leurs résultats sont décrits mais n'ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Une partie importante de ce travail de thèse a donc servi au développement d'une solution alternative qui a permis de continuer les expériences fluidiques. Le procédé innovant développé a d'ailleurs mené à une demande de dépôt de brevet du CNRS.

Le Chapitre 3 présente le banc expérimental que j'ai optimisé. Le protocole, très important pour les expériences d'électropréconcentration, a également été étudié afin de permettre d'obtenir des résultats fluidiques expérimentaux fiables.

Le Chapitre 4 décrit les expériences fluidiques réalisées au cours de ces trois ans. Les expériences originales de transport ionique à travers la nanofente grâce à une surpression y sont tout d'abord présentées. L'électropréconcentration classique, c'est-à-dire par une mise en mouvement dans le dispositif grâce à un champ électrique, telle que l'on peut la retrouver dans la littérature, a été étudiée dans une seconde partie. Ces travaux ont permis de mettre à jour de nouveaux phénomènes. Enfin, une méthode novatrice d'électropréconcentration, assistée par l'application d'une pression a permis d'étudier expérimentalement pour la première fois des propriétés de préconcentration d'analytes au sein d'un dispositif fluidique intégrant une structure nanométrique. Ces résultats, préliminaires et originaux, permettent d'envisager des perspectives de recherches et d'application sur ce sujet très prometteuses.

Enfin, bien plus qu'un travail de recherche, cette thèse a été pour moi une formation sans précédent. Je remercie à ce titre la direction du LPN ainsi que l'Ecole Doctorale STITS (et en particulier Dominique Martin) pour m'avoir permis de vivre cette expérience.

Je souhaite remercier, chaleureusement, une personne sans qui cette thèse ne se serait jamais déroulée : Fabien Bertholle. C'est lui qui, pendant son stage au LPN, m'a mis en relation avec le LPN. Bien plus qu'un simple entremetteur, il aura permis de rendre toutes mes études supérieures beaucoup plus amusantes et agréables grâce à d'innombrables fous rires notamment. Malgré les difficultés que nous avons rencontrées durant nos doctorats respectifs, il aura su rester un ami très proche et à l'écoute. Je suis content de le compter parmi mes amis sincères et garderai un souvenir imperrissable de ces huit dernières années.

La première année passée aux côtés d'Adrien Plecis m'aura permis une remise à niveau scientifique intensive sur ce sujet complexe. Il m'aura de plus permis, grâce à sa rigueur, d'accroître mes compétences de travail de façon très surprenante. Anne-Marie

Haghiri-Gosnet, ma directrice de thèse, grâce à son soutien et ses conseils au cours de ces trois années m'a permis de me réaliser pleinement dans cette épreuve qu'est la thèse. La poursuite à court terme de ma carrière dans des conditions optimales est en partie due au soutien, à la confiance et la liberté qu'elle m'a donnés.

Les rencontres qui ont eu lieu durant ces trois années ont permis de surmonter les embuches et les doutes. Je tiens à remercier le groupe Nanoflu ainsi que tous les techniciens, ingénieurs et chercheurs (en particulier Stéphane, David, les Christophe, Ali, Luc, Isabelle...) qui, entre deux tâches en Salle Blanche n'auront pas été avares en conseils et informations bien utiles. Les nombreuses discussions sérieuses ou non avec mes deux collègues de thèse Guillaume Aubry et Sébastien Méance, mais également avec Antoine MC Pallandre ont été de véritables bouffées d'air dans les moments difficiles. Anne-Claire Louër, arrivée plus tard dans l'aventure, aura eu la lourde tâche de me supporter en tant qu'encadrant pour son stage à la fin de ma troisième année. Je suis très heureux que se soit elle qui prenne la continuité de ce travail pour au moins trois ans. Même si le stage est fini, elle reste affectueusement « ma stagiaire ».

Un grand merci à ma famille et à mes parents tout particulièrement pour leur soutien depuis toujours, faisant preuve d'une grande ouverture et écoute. Je les remercie profondément de m'avoir toujours poussé à ne pas trop me laisser aller vers la facilité et la paresse. Je reconnais aujourd'hui ne pas leur avoir facilité leur rôle de parents mais j'espère qu'aujourd'hui ils sont fiers du chemin parcouru et de celui que je deviens jour après jour, fidèle aux valeurs qu'ils se sont donnés tant de mal à m'inculquer. Cette thèse est le fruit de près de 26 ans de leur travail.

Enfin, je tiens à finir ces remerciements avec une personne toute particulière qui a façonné cette thèse à divers niveaux. Elle m'aura permis de me dépasser, de tenir bon jusqu'au bout malgré mes nombreuses plaintes, ma mauvaise humeur quasi permanente pendant les deux dernières années de thèse. Ses nombreux conseils et corrections m'ont permis de finaliser un manuscrit et une soutenance bien au-delà de mes espérances. Sa présence tant professionnelle pour la thèse et pour mon avenir, que pour les épreuves personnelles qu'elle m'aide tous les jours à franchir, font d'elle une part entière de ce que je suis aujourd'hui. A tes côtés, tu m'as permis de devenir quelqu'un, je suis pressé que dans quelques mois tu deviennes Marjorie (THOMAS) NANTEUIL.

Table des matières

1	Charge de surface, confinement et nanofluidique	11
1.I	La microfluidique pour les sciences du vivant	11
1.I.A	Les besoins grandissants dans le biomédical	11
1.I.B	L'apport de la miniaturisation	14
1.I.B.1	Les puces à ADN	16
1.I.B.2	Les puces à protéines	17
1.I.B.3	Les laboratoires sur puces	17
1.I.C	Les techniques existantes de préconcentration et de séparation sur puce	21
1.I.C.1	Vitesse d'une macromolécule : vitesse du liquide et vi- tesse propre	21
1.I.C.2	La focalisation isoélectrique (ou IEF)	23
1.I.C.3	La focalisation par gradient de température	24
1.I.C.4	La focalisation par gradient de champ électrique	26
1.I.C.5	L'isotachophorèse	28
1.II	Vers de nouvelles solutions grâce à la nanofluidique : nanofluidique et électropréconcentration	32
1.II.A	Le vivant et la nanofluidique	32
1.II.B	Vers des nanocanaux artificiels	34
1.II.B.1	Les plus petits dispositifs nanofluidiques : les membranes nanoporeuses	34
1.II.B.2	Les nanopores artificiels pour la lecture de l'ADN	36
1.II.B.3	Les réseaux nanofluidiques pour la séparation de bio- molécules	37
1.II.C	Phénoménologie de l'électropréconcentration : les premières obser- vations expérimentales	39
1.III	Théorie	44
1.III.A	Charge de surface, potentiel électrostatique et confinement	44
1.III.A.1	Verre et charge de surface	44
1.III.A.2	De la charge de surface au potentiel Zeta	45
1.III.A.3	Le modèle de Gouy-Chapman	45
1.III.B	Les effets électrocinétiques dans les nanocanaux	51
1.III.B.1	L'effet Donnan : perméabilité sélective des nanocanaux	52

1.III.B.2	Mise en mouvement et transport ionique dans un dispositif micro - nano - micro fluïdique	54
1.III.B.2.a	Mise en mouvement électrique : le flux électro-osmotique	56
1.III.B.2.b	Le flux électroosmotique et la géométrie MNM	57
1.III.B.2.c	L'effet de polarisation en concentration	59
1.III.B.2.d	Les régimes de préconcentration	64
1.IV	Les enjeux de ce travail de recherche	71
1.IV.A	Un grand nombre de paramètres, peu de contrôle	71
1.IV.B	Conditions expérimentales et défi de mise en oeuvre	71
2	Les microtechnologies appliquées à la nanofluidique	73
2.I	Les procédés de fabrication en nanofluidique : état de l'art	74
2.I.A	La méthode de la couche sacrificielle : approche dite « bottom-up »	76
2.I.B	Le scellement de deux substrats rigides : approche dite « top-down »	78
2.I.B.1	Le collage direct : cas des matériaux silicium/verre	80
2.I.B.2	le collage thermique de deux lames de verre	83
2.I.B.3	Le collage anodique	83
2.I.B.4	Conclusions : le procédé de collage anodique utilisé au début de ma thèse	84
2.II	L'étude expérimentale du collage anodique	86
2.II.A	Principe	86
2.II.B	La modélisation du collage anodique	90
2.II.B.1	Représentation en circuit électrique équivalent : une méthode empirique	90
2.II.B.2	La modélisation du transport des ions à travers le verre	92
2.II.B.3	Conclusions	93
2.II.C	Les paramètres expérimentaux pertinents	94
2.II.C.1	Le montage expérimental	95
2.II.C.2	Quel critère choisir pour déterminer si la puce est bien collée ?	96
2.II.C.2.a	La méthode de suivi du courant	96
2.II.C.2.b	Le test mécanique de la scie	97
2.II.C.2.c	Le pourcentage de surface collée	98
2.II.C.3	L'influence du temps de collage	99
2.II.C.4	L'influence de la tension appliquée : vers une tentative d'analyse des phénomènes interfaciaux	100
2.II.C.5	L'influence de la température	104
2.II.C.6	L'influence de la pression mécanique	106
2.II.C.7	Les autres paramètres chimiques	108
2.II.C.7.a	Le rôle de la nature du verre	108
2.II.C.7.b	Nettoyage et prétraitement chimique	112

2.II.C.8	Conclusions sur la technologie « pyrex/a-Si(50 nm)/pyrex »	115
2.II.D	La première génération de puces « verre/a-Si/verre »	115
2.II.D.1	La non-reproductibilité : état de l'art à mon arrivée en thèse	115
2.II.D.2	Les puces « verre/a-Si/verre » sont elles viables ?	118
2.II.D.2.a	Mesures électrochimiques et durée de vie	118
2.II.D.3	Quel autre matériau comme film intermédiaire ?	123
2.II.D.4	Conclusions sur le collage anodique	125
2.III	Vers une nouvelle technologie « tout verre »	126
2.III.A	Le brevet	126
2.III.B	Mesures électriques et durée de vie des puces « tout verre » de seconde génération	127
2.III.C	Conclusions	128
2.IV	Conclusions sur la fabrication de dispositifs nanofluidiques	129
3	Banc microfluidique expérimental : à la recherche du plus grand nombre de paramètres contrôlables	131
3.I	Vers une géométrie optimale de la puce	131
3.I.A	Comment simplifier la géométrie pour faciliter la modélisation ?	132
3.I.B	Optimisation de la géométrie des réservoirs	133
3.II	Instrumentation externe et connectique	136
3.II.A	Les paramètres de contrôle	136
3.II.B	Les paramètres imposés	137
3.II.C	La connectique	138
3.II.D	Les paramètres mesurés	138
3.III	Validité et fiabilité des mesures	140
3.III.A	Temps de vie des réactifs et erreurs de mesure	141
3.III.B	Temps de mise en conditions initiales et protocole	142
3.III.C	Temps de vie des dispositifs	145
3.IV	Conclusion	146
4	Transport ionique dans la nanofente : études expérimentales	147
4.I	Mise en mouvement hydrodynamique et phénomène de rétention	148
4.I.A	Répulsion électrostatique et rétention	148
4.I.B	Théorie	149
4.I.B.1	Mise en équation du problème	149
4.I.B.2	Paramètres influants sur la rétention	153
4.I.B.2.a	Le coefficient de diffusion	155
4.I.B.2.b	La vitesse du fluide : paramètre de pression	156
4.I.B.2.c	L'exclusion	156
4.I.B.3	Conclusion sur la théorie de la rétention	157
4.I.C	Rétention et régime de préconcentration : simulations	158
4.I.D	Validation expérimentale	159

4.I.E	Conclusion sur les expériences de rétention	163
4.II	Mise en mouvement électrique et électropréconcentration	164
4.II.A	Introduction à l'électropréconcentration : rappel du Chapitre 1 . . .	164
4.II.B	Cinétique de l'électropréconcentration simple de la fluorescéine . .	166
4.III	Mise en mouvement combinant champ électrique et pression hydrodynamique : l'électropréconcentration modulée	174
4.III.A	Pression fixée, champ électrique variable	178
4.III.A.1	Champ électrique et pression dans le même sens (situation 1)	179
4.III.A.1.a	Le régime anodique saturant (Anodic Stacking (AS))	179
4.III.A.1.b	Le régime anodique focalisant (AF)	180
4.III.A.2	Champ électrique et pression dans le sens opposé (situation 2)	181
4.III.A.2.a	Le régime cathodique saturant (Cathodic Stacking (CS))	181
4.III.A.2.b	Le régime cathodique focalisant (CF)	182
4.III.A.3	Taux de préconcentration et régimes : diagrammes en tension	183
4.III.A.3.a	Les régimes cathodiques sont-ils les plus efficaces ?	187
4.III.A.3.b	La configuration avec un champ électrique et une pression opposés est-elle toujours optimale ?	188
4.III.B	Pression modifiée, champ électrique fixé	192
4.III.C	Conclusion sur l'électropréconcentration modulée	196
4.IV	Nouveaux développements envisageables	198
4.IV.A	A court terme : la nanofente comme un outil de diagnostic performant pour des tests immunologiques	198
4.IV.B	A long terme : vers une électropréconcentration sélective	199
4.V	Conclusion sur la nanofluidique	201
5	Annexes A : Les microtechnologies pour la nanofluidique disponibles au sein de la centrale technologique du LPN	205
6	Annexes B : calcul de la composante de la vitesse du liquide par le champ électrique externe	213

L'homme raisonnable s'adapte au monde ; l'homme déraisonnable s'obstine à essayer d'adapter le monde à lui-même. Tout progrès dépend donc de l'homme déraisonnable
- Georges Bernard SHAW -

Chapitre 1

Charge de surface, confinement et nanofluidique

1.I La microfluidique pour les sciences du vivant

1.I.A Les besoins grandissants dans le biomédical

La microfluidique, qui consiste à manipuler des fluides en milieu confiné au sein d'une micropuce, est un domaine jeune qui est en passe de révolutionner plusieurs domaines scientifiques à l'interface avec les sciences du vivant. C'est un domaine de recherche où le nombre de publications annuelles ne fait que croître pour atteindre aujourd'hui les 10 000 publications par an (figure 1.1).

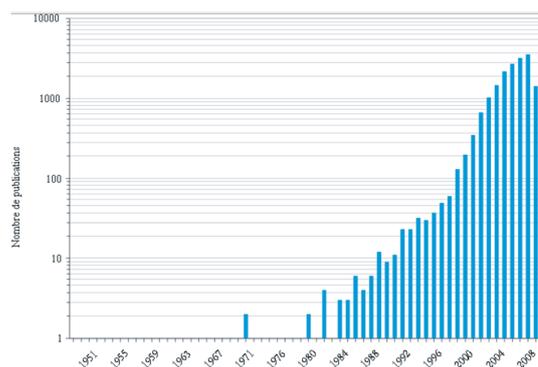


FIGURE 1.1 – L'évolution du nombre de publications parues dans des revues internationales en microfluidique depuis 1948.

Ce foisonnement s'explique aussi par la très grande diversité des domaines d'application que la microfluidique permet d'aborder, qu'il s'agisse de la physique des fluides en milieu microscopique confiné, la chimie de synthèse ou analytique, le domaine de la rhéologie ou de manière plus générale les applications biotechnologiques (figure 1.2). Ce caractère largement pluridisciplinaire de la microfluidique explique son développement extrêmement rapide et sa forte croissance. Au sein des microdispositifs miniaturisés où le rapport « surface/volume » est exalté (figure 1.3), il devient possible d'observer de nouveaux effets physiques, liés par exemple à la charge de surface.

S'il s'agit d'un domaine stimulant pour la recherche, l'intérêt des industriels est surtout lié au fait qu'il est possible de réduire considérablement les volumes de réactifs utilisés. On estime aujourd'hui à 2 milliards de dollars par an la part du marché pour la microfluidique appliquée au biomédical. Tous ces domaines de la microfluidique représentent un marché total en très forte expansion qui devrait atteindre en 2012 trois milliards de dollars par an [1]. Il s'agit d'un secteur très jeune, en plein essor, dynamique, qui est en cours de structuration et au sein duquel de nombreuses niches se développent [1].

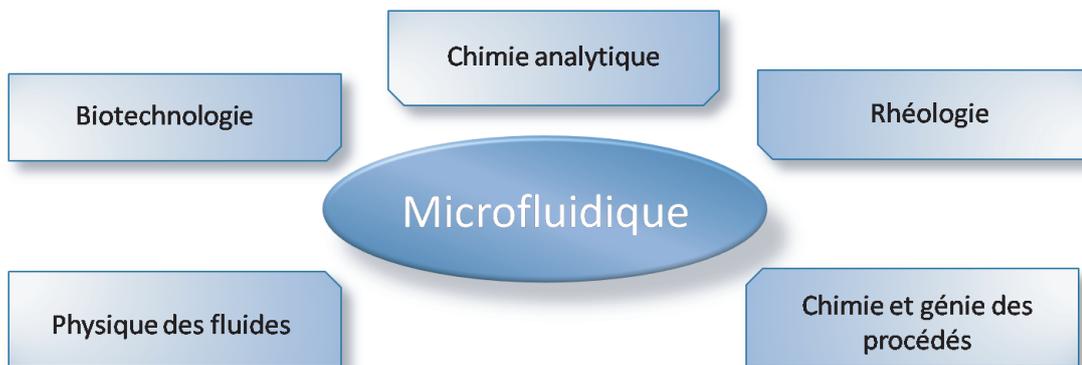


FIGURE 1.2 – Domaines majeurs de recherche dans lesquels la microfluidique est aujourd'hui utilisée.

Qu'est-ce que le génie biomédical ? C'est l'art d'appliquer les sciences et les techniques avancées à la conception d'appareils de diagnostic, de traitement et d'assistance souvent appelés dispositifs médicaux et qui ont pour but d'améliorer la qualité des soins aux patients. Les besoins grandissants pour le biomédical sont justifiés par plusieurs enjeux de société, parmi lesquels on peut citer par exemple :

- le vieillissement de la population,
- les cancers,
- les maladies nerveuses dégénératives,
- les maladies cardiovasculaires,
- les maladies auto-immunes...

Ils se répartissent dans plusieurs disciplines dont, par exemple :

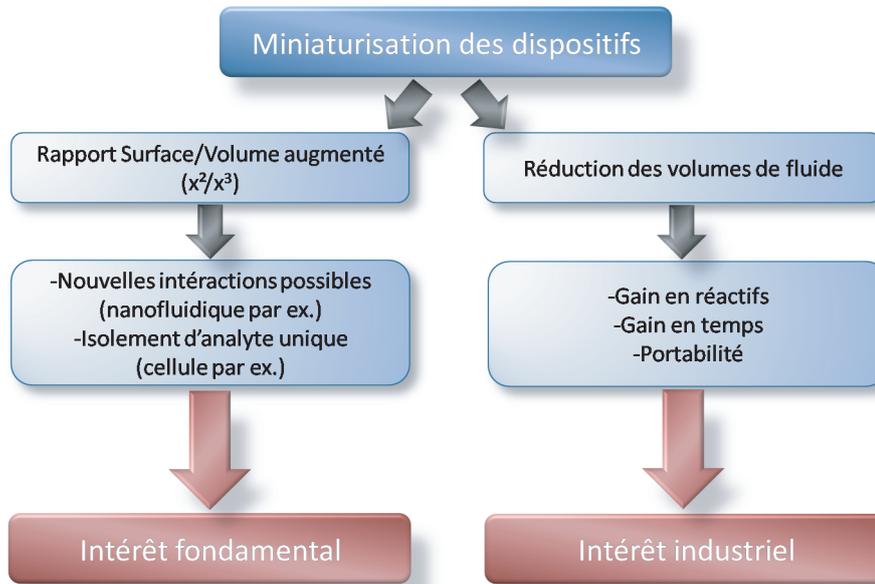


FIGURE 1.3 – L'intérêt double de la microfluidique en recherche et dans le secteur industriel.

- l'imagerie médicale qui permet au médecin d'examiner l'intérieur du corps d'un patient sans l'opérer. Elle est utilisée à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Il existe de nombreux appareils d'imagerie comme l'échographe, le scanner, l'imagerie par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique)...
- la biomécanique qui est la mécanique appliquée au vivant. Elle étudie et modélise par exemple la circulation sanguine, la respiration, les mouvements du corps humain, la résistance des organes aux chocs et le frottement dans les prothèses. Elle est utile à la conception d'implants (broches...), de prothèses (de hanche, de genou...) et d'appareils d'assistance au handicap.
- les biomatériaux qui sont utilisés pour fabriquer les prothèses, les implants et les instruments de chirurgie. Ils doivent être totalement biocompatibles pour éviter tout mécanisme de rejet par l'organisme. Ils peuvent être naturels (collagène, cellulose...) ou synthétiques (silicone, céramiques, aciers inoxydables, titane...).
- la télémédecine et l'informatique médicale qui consistent à appliquer les technologies de l'information et de la communication au domaine médical. Il devient alors possible d'établir la prestation de soins de santé à distance et d'échanger l'information médicale s'y rapportant. On peut citer comme exemples les réseaux d'imagerie, le télédiagnostic et la chirurgie à distance assistée par ordinateur.
- L'instrumentation biomédicale qui introduit l'électronique et les techniques de mesure dans les dispositifs médicaux. Du microprocesseur employé dans un instrument à usage unique, elle peut s'étendre jusqu'à la conception de systèmes médicaux complexes, comme par exemple les endoscopes, les pacemakers, les instruments de

chirurgie et les dialyseurs.

Dans ce contexte, la microfluidique permet de développer de nouvelles solutions pour l'instrumentation biomédicale, mais aussi pour un grand nombre de secteurs du biomédical, comme le diagnostic médical, la thérapie personnalisée, la toxicologie, les risques sanitaires et environnementaux ainsi que la chimie en milieu extrême. Analysons et décrivons maintenant ce que la microfluidique et les technologies des micropuces peuvent apporter dans le domaine du biomédical.

1.I.B L'apport de la miniaturisation

Dans son article de revue publié en 2006 dans Nature [2], Whitesides définit la microfluidique comme « la science et la technologie des systèmes qui manipulent de tous petits volumes de fluides (10^{-9} à 10^{-18} litres) dans des canaux de quelques dizaines de micromètres de large ». Comme expliqué précédemment, nous retrouvons ici l'intérêt double de la microfluidique pour la recherche scientifique d'une part, et pour le développement de nouvelles technologies d'autre part (cf. figure 1.3). En effet, grâce à la petite taille des canaux où circulent les fluides (avec au moins une des dimensions du canal micrométrique), de nouvelles voies d'applications et recherches s'entrouvent. Il devient possible par exemple de contrôler l'environnement d'une cellule biologique isolée au sein de microchambres de culture pour effectuer des études de croissance cellulaire. A plus petite échelle, typiquement celle du nanomètre, les propriétés de surface des canaux fluidiques sont exacerbées. En maîtrisant ce phénomène, il devient dès lors possible de moduler le transport de biomolécules qui peuvent être ainsi soit bloquées, soit acheminées. C'est sur ce deuxième sujet ambitieux et difficile qu'ont porté mes travaux de thèse où la charge de surface du verre, confinée à l'échelle nanométrique, permet de moduler le transport de biomolécules.

L'intérêt technologique de la microfluidique provient du fait que l'on dispose à ces échelles micrométriques du « plus petit tube à essai » manipulable, ce qui permet de réduire considérablement les quantités d'analyte, qui est un liquide biologique souvent coûteux. Les phénomènes de diffusion et l'inertie thermique étant également plus faibles avec la diminution des tailles caractéristiques, les expériences menées dans les dispositifs microfluidiques sont donc beaucoup plus rapides. De plus, à l'instar de la microélectronique, la miniaturisation permet d'imaginer des dispositifs du futur compacts et donc portables.

Les avancées technologiques ont permis très vite de fabriquer des « biopuces », qui sont des micropuces de quelques centimètres carrés où il devient possible d'effectuer toutes les étapes nécessaires à l'analyse de sang par exemple (cf. figure 1.4). Cette miniaturisation s'accompagne d'un gain de temps, de réactifs, et bien sûr d'une capacité d'analyse accrue. Ces « biopuces » sont en général appelées laboratoires sur puce, ou « Lab-on-a-chip » en anglais.

Le marché mondial des biopuces, toujours en très forte augmentation ces dernières années, est passé de 1.64 milliards de dollars en 2006 à plus de 2.11 milliards de dollars en 2008. Sa croissance devrait encore se poursuivre pour atteindre 3.84 milliards de dollars en 2013 soit une croissance annuelle de 12.7 %. Ce marché se segmente aujourd'hui en

trois catégories majeures : les puces à ADN, les puces à protéines et les laboratoires-sur-puce («Lab-on-a-chip») (cf. figure 1.5) [3].

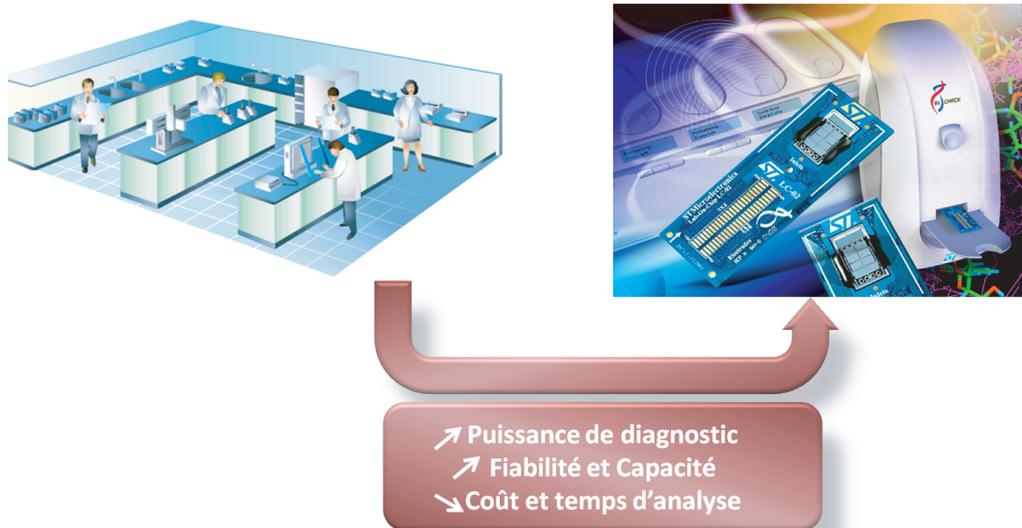


FIGURE 1.4 – Principe de la miniaturisation pour l'étude des fluides. A gauche : un laboratoire conventionnel d'analyses médicales et à droite : un exemple de laboratoire sur puce et de lecteur nécessaire à son utilisation qui sont commercialisés par ST Microelectronics.

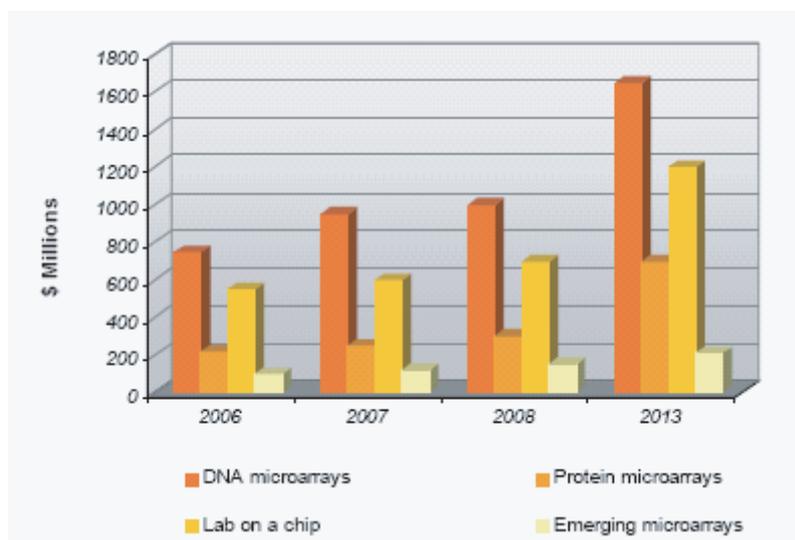


FIGURE 1.5 – Le marché des biopuces.

1.I.B.1 Les puces à ADN

Il s'agit aujourd'hui du segment principal des biopuces car leur technologie de fabrication est bien maîtrisée depuis plusieurs années (cf. figure 1.6). Le principe de la puce à ADN repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé à reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est porté face à un brin complémentaire (réaction d'hybridation). Les quatre bases azotées de l'ADN (A, G, C, T) ont en effet la particularité de s'unir deux à deux par des liaisons hydrogènes ($A \equiv T$ et $T \equiv A$; $G \equiv C$ et $C \equiv G$). Si un patient est porteur d'une maladie, les brins extraits de l'ARN d'un patient (et rétrotranscrits en ADN), vont donc pouvoir s'hybrider avec les brins d'ADN synthétiques représentatifs de la maladie [4]. Une puce à ADN est donc constituée d'un réseau de sites où sont fixer ces brins d'ADN synthétiques représentatifs de la maladie que l'on cherche à diagnostiquer.

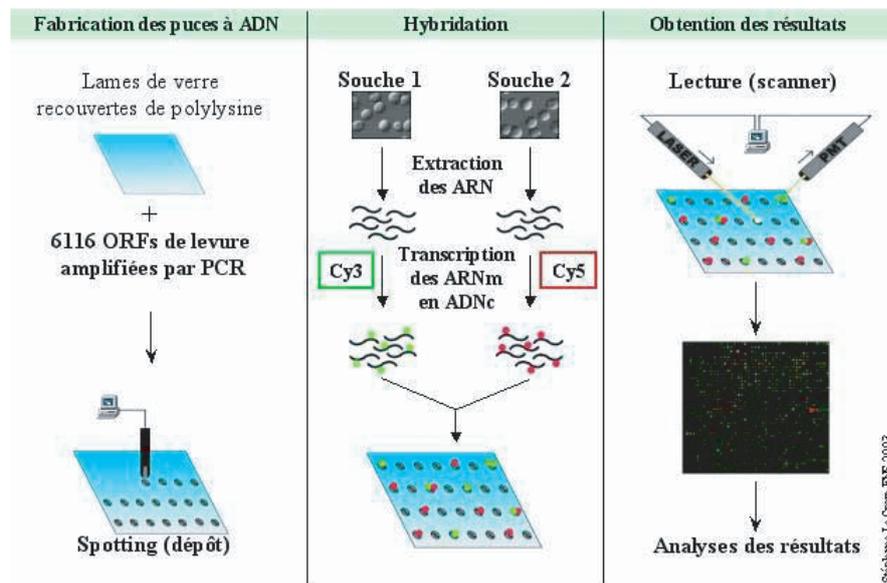


FIGURE 1.6 – Principe de la puce à ADN.

Le premier modèle a été mis sur le marché en 1994 par Affymetrix. Depuis, ce type de puce a envahi les laboratoires de recherche du monde entier. La course à l'équipement en puce à ADN n'est pas étonnante, car cette approche permet en une seule expérience, qui dure environ 2 jours, d'avoir une estimation sur l'expression de plus de 30000 gènes. D'autres acteurs, qui détiennent la propriété industrielle maîtresse, sont venus sur ce marché (Agilent technologies, NimbleGen Systems, Roche, Applied Biosystems...), qui devrait atteindre 1.6 milliards de dollars en 2013.

Le potentiel de ces puces est si important en terme d'applications que de nombreuses sociétés ont licencié auprès des acteurs prépondérants afin de développer de nouvelles applications. En effet, outre la génomique, ces puces peuvent aussi servir pour la recherche pharmaceutique (développement de nouveaux médicaments), le diagnostic

médical (exemple d'AmpliChip CYP450) et plus généralement pour les biotechnologies. Les enjeux de santé font bien évidemment partie des applications qui sont amenées à être commercialisées dans les prochaines années. En effet, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (ExonHit Therapeutics), de certains cancers et de maladies infectieuses à partir d'un échantillon sanguin sont déjà à l'étude.

1.I.B.2 Les puces à protéines

Le projet du génome humain a dévoilé un aspect important de la base moléculaire de la vie : l'ADN fabrique l'ARN qui fabrique les protéines. Comme pour les puces à ADN, la technologie des puces à protéines repose sur le principe d'appariement entre deux molécules. En effet, les protéines ont besoin de s'assembler avec d'autres molécules pour exercer leur fonction : un récepteur fixe et son hormone, un anticorps et son antigène, une enzyme et son substrat, etc... Toutes les protéines humaines sont déterminées par la séquence des nucléotides (dans la base ADN). Suite à la découverte par les scientifiques de l'existence de petites variations (différences ou changements) dans le contenu des nucléotides présents dans les gènes humains, il est devenu possible de procéder à des tests génétiques pour prédire par exemple les réactions aux médicaments. Les protéines étant les cibles de la plupart des thérapies, les principaux enjeux et développements de cette technologie sont donc sur :

- l'efficacité et la toxicité potentielle des médicaments avant les essais cliniques
- l'identification de nouveaux médicaments par l'appréciation d'expression différentielle des protéines
- la découverte des biomarqueurs protéiques qui indiquent les stades des maladies

La technologie des puces à biomolécules a pris naissance à la suite des travaux de Roger Ekins [5]. A la différence de la technologie des puces à ADN, l'un des problèmes majeurs rencontré dans la préparation des puces à protéines est le choix du support permettant d'assurer l'arrimage des protéines et le maintien de leur configuration spatiale authentique, condition cruciale pour évaluer les interactions spécifiques impliquées dans leurs fonctions. Ce marché semble un des plus prometteurs, il devrait tripler entre 2008 et 2013, passant de 200 à 600 millions de dollars par an.

1.I.B.3 Les laboratoires sur puces

La troisième famille de microdispositifs fluidiques pour des applications biomédicales est le laboratoire sur puce, où les liquides à analyser circulent dans un circuit fermé, par opposition aux puces à ADN et à protéines sur lesquelles les microgouttes sont déposées spot par spot. Un laboratoire sur puce est donc un vrai dispositif intégré microfluidique qui rassemble, sur un substrat miniaturisé, une ou plusieurs fonctions qui sont généralement effectuées dans un laboratoire centralisé (cf. figure 1.4). En anglais, on nomme μ TAS (pour « micro Total Analysis System ») ces laboratoires sur puce complets. Le domaine d'application et la finalité de ces dispositifs est si grande que l'on peut imaginer des systèmes (cf. figure 1.7) :

- permettant un diagnostic précoce de pathologies.
- diffusant de façon contrôlée un médicament, ce qui permet d'éviter des hospitalisations ou le recours à des infirmières à domicile.
- portables, dans la philosophie des glucomètres destinés au grand public et/ou pouvant intéresser aussi l'armée lors de missions loin des bases et des équipements médicaux (permet de s'affranchir d'hôpitaux pour des opérations d'aide à la population dans des zones défavorisées).
- permettant d'analyser en continu de gros volumes d'air et ainsi surveiller en temps réel des menaces sanitaires dans les zones à risques (métro, gares...).
- portables pour le contrôle sanitaire en permettant des analyses immédiates pour des produits alimentaires potentiellement impropres à la consommation. De telles solutions permettent une plus grande réactivité et protège donc le consommateur plus efficacement.

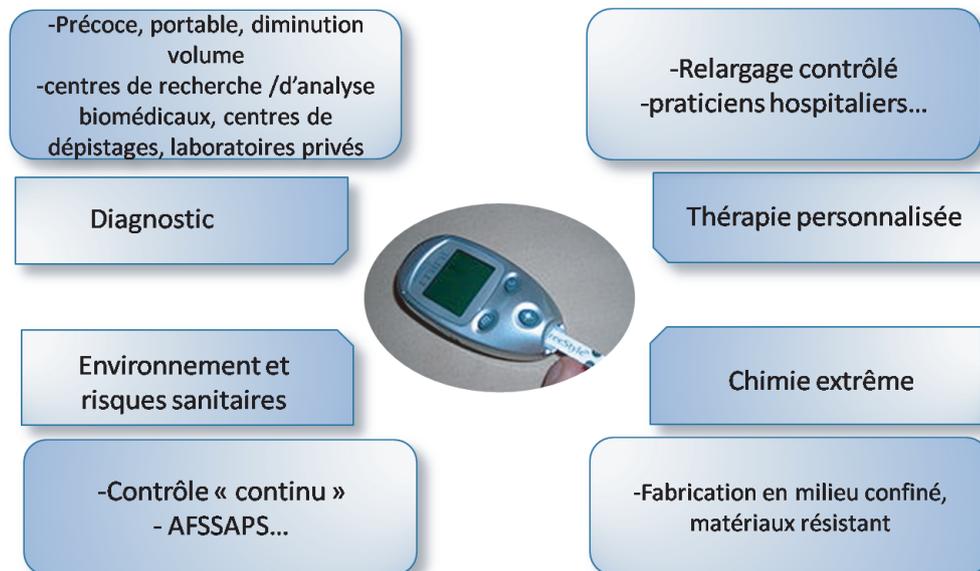


FIGURE 1.7 – Domaines d'application des Laboratoires sur puce. AFSSAPS : Agence Française de Sécurité SANitaire des Produits de Santé.

Comme nous pouvons le voir, la problématique du diagnostic médical est fortement représentée parmi les applications possibles des laboratoires sur puce. Ceci n'est pas étonnant puisque le diagnostic précoce de maladies graves répond à un besoin sociétal. C'est la raison pour laquelle cette application des laboratoires sur puce est la plus active dans le domaine de la recherche et la plus proche du marché industriel des pays développés. Il est important de souligner qu'à terme les pays en développement pourraient bénéficier des retombées de ces recherches. Ce n'est pas anodin puisque des enjeux de santé à l'échelle mondiale sont récemment apparus, comme :

- le suivi d'épidémie (SRAS, H1N1...) à l'échelle de toute la planète,

- le dépistage des maladies ayant un rôle important sur l'espérance de vie : le VIH, la malaria, la tuberculose qui conduisent toutes les 3 à une réduction de 32% de l'espérance de vie [6]; les infections respiratoires mineures et diarrhées (causes principales de mortalité infantile); les MST (HIV déjà cité, hépatites B et C, chlamydia, gonorrhoea, syphilis...)

Comme les puces à ADN et protéines, un laboratoire sur puce permet de réduire considérablement le temps d'analyse et les volumes d'analyte ce qui permet une forte réduction des coûts. De plus, l'intégration de plusieurs fonctionnalités et l'automatisation de la puce permettront de s'affranchir des laboratoires d'analyse conventionnels, où travaille en général une main d'oeuvre hautement qualifiée. Par rapport aux autres biopuces, les laboratoires miniaturisés sur puce présentent un grand nombre d'avantages puisqu'ils permettent de :

- réduire les coûts,
- palier le manque de main d'oeuvre qualifiée nécessaire aux instrumentations et protocoles présents dans les laboratoires,
- palier le manque d'accès à l'électricité,
- se passer d'instruments coûteux dans les laboratoires mal équipés,
- transporter et stocker de tels dispositifs aisément, sans précautions spéciales de manipulation.

Les dispositifs qui répondront à toutes ces propriétés seront donc réellement en mesure d'améliorer le diagnostic médical dans les pays en développement et sous développés. Le point clé pour parvenir à fabriquer de vrais laboratoires sur puces est de réussir à développer et à y intégrer des fonctions telles que :

- la manipulation des fluides,
- le prétraitement d'échantillon,
- la séparation d'analyte,
- l'amplification du signal,
- la détection du signal.

On considère généralement que le premier dispositif microfluidique d'analyse est celui développé par Terry et al. qui ont réalisé en 1979 un système miniaturisé d'analyse de gaz par chromatographie sur un substrat de silicium [8]. La figure 1.8 donne un exemple plus récent de laboratoire sur puce nécessitant cinq étapes successives (évaporation : préconcentration de l'échantillon dans la chambre 2 ; mesure de la conductivité de l'échantillon : phase d'étalonnage grâce aux électrodes E ; injection : manipulation du fluide grâce aux électrode A et B ; séparation : traitement de l'échantillon grâce aux électrodes C et D ; mesure par conductimétrie des analytes : collecte du résultat grâce aux électrodes 6). Suivant l'application visée, les fonctionnalités à miniaturiser sont différentes et doivent être développées (figure 1.8). La figure représente un exemple typique de ce que peuvent les laboratoires sur puce, celui-ci permettant un diagnostic d'une éventuelle intoxication au lithium grâce à l'analyse d'une simple goutte de sang.

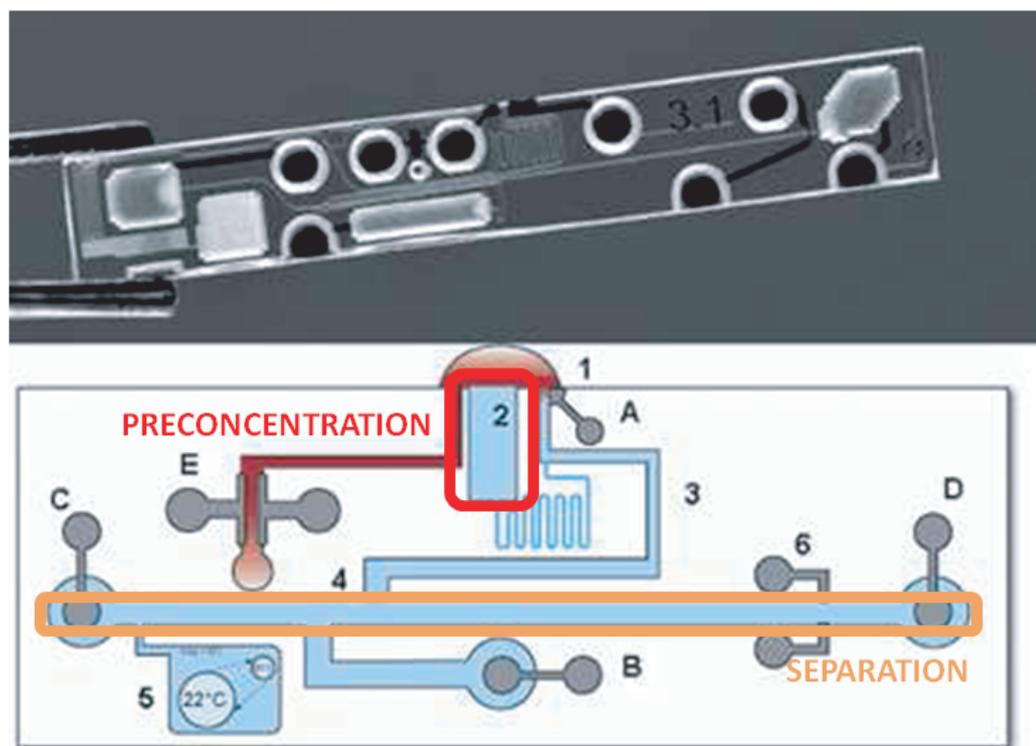


FIGURE 1.8 – Exemple de Laboratoire sur Puce permettant de diagnostiquer une intoxication au Lithium [7].

Suivant le cahier des charges du dispositif, le nombre et l'enchaînement des étapes sont plus ou moins complexes. Parmi la multitude d'applications, nous citons ici celle qui concerne la détection de traces dans un échantillon, qu'il s'agisse d'une biomolécule médicalement dangereuse pour la santé, comme un virus, ou d'une molécule chimique toxique (ion lourd métallique, etc.). L'analyse de trace est possible grâce à des puces où seulement trois étapes clés sont effectuées : une étape de préconcentration, une étape de séparation et une de détection. Pour ce travail de thèse, l'objectif a été de se focaliser sur l'étape de préconcentration, qui permet de préconcentrer des traces d'analyte dans un échantillon complexe, tout en le séparant du reste des constituants. Par opposition à la technique d'amplification chimique PCR (Polymerase Chain Reaction) sur puce, cette préconcentration pourra être effectuée pour tout analyte chargé, même s'il ne s'agit pas d'un composé biologique. C'est l'utilisation de nanocanaux qui permet de préconcentrer tout type de molécules ou d'ions, comme nous le verrons plus loin dans le manuscrit. La figure 1.9 présente un exemple de laboratoire sur puce qui permet de réaliser les étapes de préconcentration et de séparation, la détection nécessitant encore quant à elle une instrumentation externe importante non miniaturisée.

Les laboratoires sur puce connaissent donc une phase de développement importante surtout dans les secteurs pharmaceutiques et du diagnostic grâce aux avancées récentes

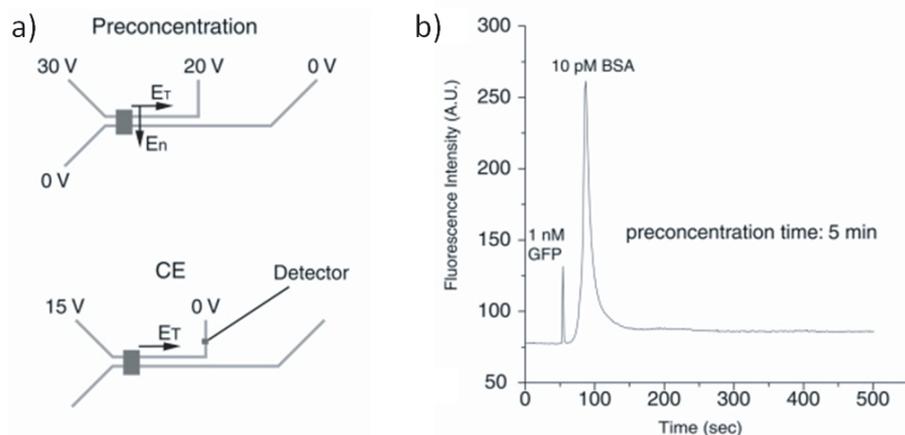


FIGURE 1.9 – a) Schéma d'un laboratoire sur puce permettant de préconcentrer des analytes chimiques et biologiques qui a été réalisé par Wang et al. [9], b) exemple de détection en bout de colonne de séparation : spectre temporel de fluorescence d'un échantillon dilué de sérum bovin d'Albumine (BSA) et de protéine fluorescente (GFP).

en intégration de nouvelles fonctionnalités. Ce secteur industriel représentait en 2008 625 millions de dollars, marché qui devrait quasiment doubler d'ici 2013.

1.1.C Les techniques existantes de préconcentration et de séparation sur puce

1.1.C.1 Vitesse d'une macromolécule : vitesse du liquide et vitesse propre

Au travers de la littérature scientifique, la séparation sous champ électrique apparaît comme l'une des voies privilégiées pour analyser et trier sur puce des objets de très petites tailles, comme des biomolécules ou des nanoparticules. En effet, selon leur mobilité électrophorétique, qui dépend de leur taille et de leur charge, celles-ci vont migrer à différentes vitesses dans le microcanal. Les techniques de préconcentration et de séparation sur puce sont donc basées sur ces différences de migration des analytes dans la solution. La vitesse totale est constituée en deux composantes différentes : la vitesse propre de l'analyte sous champ électrique appelée *vitesse électrophorétique* et la vitesse du liquide (référentiel dans lequel elles évoluent), qui correspond au mouvement du liquide induit aux parois. Ce mouvement aux parois est appelé flux électroosmotique (en anglais EOF pour Electro-Osmotic Flow - v_{EOF} *vitesse électro-osmotique*) et dépend du potentiel de surface des parois du canal fluide. Nous traiterons la théorie de cette mise en mouvement du fluide grâce au flux électroosmotique dans la Section 3 de ce chapitre.

Sous l'effet d'un champ électrique externe, les analytes chargés électriquement (ici les

protéines) se déplacent dans le canal vers l'électrode de charge inverse : c'est l'électromigration. Ces analytes ont donc une vitesse propre, appelée vitesse électrophorétique qui s'exprime par :

$$v_{\text{electrophoretique}}^{\vec{}} = \mu_{\text{electrophoretique}} \times \vec{E} \quad (1.1)$$

où $\mu_{\text{electrophoretique}}$ est la mobilité électrophorétique et E la force du champ électrique.

La mobilité électrophorétique est proportionnelle à la charge ionique de l'analyte et inversement proportionnelle à toute force de friction présente dans la solution. Lorsque deux espèces de protéines dans l'échantillon ont des charges différentes ou lorsqu'elles subissent des forces de friction différentes, elles seront séparées l'une de l'autre lors de leur migration à travers la solution tampon. Les forces de friction que subit un analyte (protéine chargée ici) dépendent de la viscosité (η) du milieu ainsi que de la taille et de la forme de cet ion. De cette façon, à un pH donné, la mobilité électrophorétique d'un analyte est :

$$\mu_{\text{electrophoretique}} = \frac{Z}{6\pi\eta r} \quad (1.2)$$

où Z est la charge nette de l'analyte et r est son rayon de Stokes. Le rayon de Stokes est quant à lui donné par la formule :

$$r = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_m} \quad (1.3)$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T est la température absolue en degrés Kelvin et D_m est le coefficient de diffusion de l'analyte. Cette expression de la mobilité électrophorétique est vraie pour des analytes ponctuels (ions). Dans le cas où d'objet de plus grande taille (nanoparticules, protéines, sédiments, bactéries, cellules...) la mobilité électrophorétique n'est plus proportionnelle la charge divisée par le coefficient de friction et devient même indépendante de la taille de l'objet. On définit alors la mobilité comme proportionnelle au potentiel de surface (ζ) au travers de la relation de Henry qui prend en compte la viscosité du fluide et la permittivité du milieu :

$$\mu_{\text{electrophoretique}} = \frac{2\epsilon_0\epsilon_r\zeta H(a/\lambda_D)}{3\eta}$$

La fonction de Henry H dépend du rapport du rayon a de la particule et de l'épaisseur λ_D de la couche de contre-ions se développant à la surface de la particule (cf. description de la double couche ci après).

La vitesse globale de l'analyte est donc la somme de la vitesse du liquide et celle propre de l'analyte (figure 1.10) :

$$v_{\text{molecule}}^{\vec{}} = (\mu_{EOF} + \mu_{\text{electrophoretique}}) \times \vec{E} \quad (1.4)$$

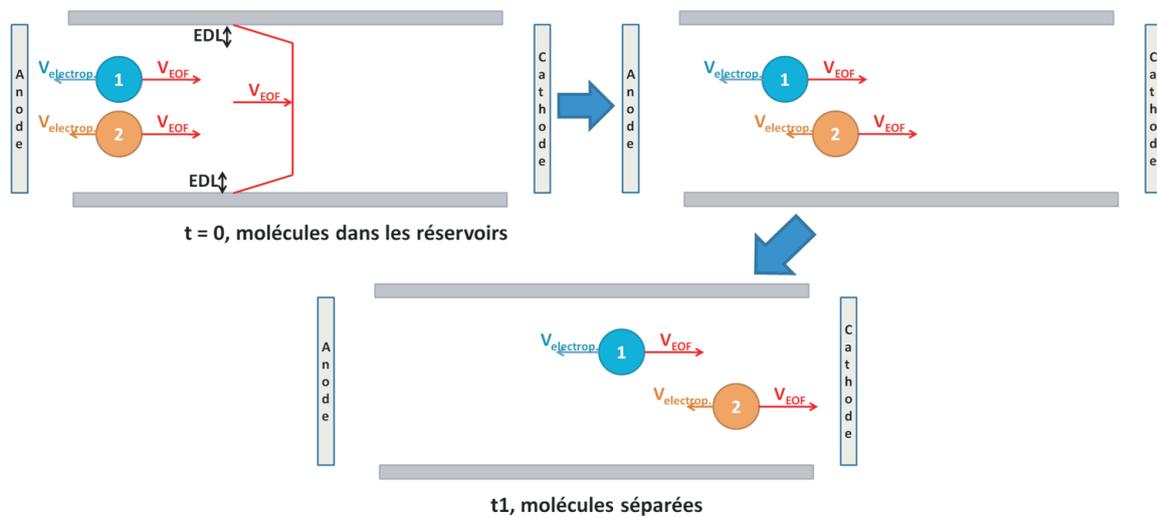


FIGURE 1.10 – Schéma des composantes de vitesse de molécules chargées négativement dans un dispositif où les parois sont chargées négativement. Pour ces deux types de molécules, les différences de vitesses électrophorétiques permettent de les séparer. Cette différence de vitesse électrophorétique est à la base de l'électrophorèse capillaire.

La première problématique de ce sujet est la préconcentration d'analyte. La stratégie s'appliquant à toute molécule chargée (stratégie la plus versatile, notamment par rapport à la PCR qui ne s'applique qu'à l'ADN et ses dérivés) consiste à obtenir une vitesse locale nulle pour préconcentrer en un point précis du capillaire (ou canal). En effet, toutes les molécules considérées vont migrer dans le dispositif jusqu'à ce qu'elles se stoppent et s'accumulent dans la zone de vitesse nulle. D'après ce qui vient d'être dit précédemment et notamment avec l'Eq. (1.4), l'enjeu est de pouvoir moduler localement les mobilités (électro-osmotique et électrophorétique) pour qu'elles s'annulent.

Le second objectif est de séparer les différents analytes. Le paramètre qui devient ici important, car indépendant pour chaque analyte, est la mobilité électrophorétique. Comme pour la préconcentration, un ajustement entre les mobilités permet des séparations optimales.

Nous allons maintenant présenter l'ensemble des méthodes pertinentes qui permettent sur puce de préconcentrer et de séparer des biomolécules.

1.I.C.2 La focalisation isoélectrique (ou IEF)

Cette technique s'applique aux protéines notamment car leur charge est directement dépendante du pH du milieu dans lequel elles sont. La vitesse totale est donc proportionnelle à la charge qui est elle-même proportionnelle à la différence entre le pH du milieu

et le point isoélectrique (pI) de la protéine. Au pI, la protéine ne possède aucune charge nette, le nombre de charges positives étant égal à celui de charges négatives. Donc à un pH égal au pI, les protéines ne peuvent pas se déplacer dans le champ électrique.

Le principe de base de la focalisation isoélectrique est de créer un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Les protéines migreront dans ce champ électrique. Arrivées au pH correspondant à leur pI, elles s'immobiliseront puisque leur charge nette sera nulle. De cette façon, il est possible de séparer et de préconcentrer les protéines d'une préparation selon leur pI.

Il est possible de créer un tel gradient de pH avec des polyélectrolytes portant un certain nombre de groupes ionisables positivement ou négativement (amines, carboxyles ou sulfates) et possédant un certain pouvoir tampon. Ces molécules sont appelées ampholytes. Soumises à un champ électrique borné par une solution d'un acide fort à l'anode et par une solution d'une base forte à la cathode, ces ampholytes migreront et se distribueront par ordre de pI. Leur capacité tampon aidera à maintenir autour d'elles une petite zone de pH égal à leur pI. Une série d'ampholytes ayant donc chacun un pI couvrant une certaine gamme de pH créera un gradient continu de pH. Si une petite quantité de protéines est introduites dans ce système, après ou durant sa formation, elles migreront aussi et s'immobiliseront à leur pI.

Cette technique est simple puisqu'elle est basée sur des gradients de pH, mais elle nécessite une préparation de la solution électrolyte de fond avant la focalisation isoélectrique en elle-même. La figure 1.11 présente un exemple de focalisation isoélectrique sur puce réalisé par Wang et al. [10] pour séparer deux protéines, la protéine fluorescente GFP et l'Ovalbumine. Cette technique, même si elle permet de séparer et de préconcentrer en une étape, donne des résolutions spatiales limitées. De plus, les taux de préconcentration, c'est à dire l'enrichissement en concentration (c_{max}/c_0), sont faibles et, en général, compris entre 10 et 100 [11].

1.I.C.3 La focalisation par gradient de température

Cette technique équilibre le flux électrophorétique et le flux électroosmotique d'une solution tampon traversant le microcanal en appliquant à la fois un champ électrique et un gradient de température tout le long du canal. Pour des solutions tampons ayant une force ionique dépendante de la température, le gradient de température appliqué entraîne un gradient de la vitesse électrophorétique d'un analyte chargé dans le canal. La vitesse du liquide peut ensuite être modifiée pour que la vitesse totale de l'analyte (somme des vitesses électrophorétique et électroosmotique) soit égale à zéro en un point du canal, et tous les analytes du canal seront concentrés en un point.

Cette technique permet de séparer et de préconcentrer des analytes de charges différentes, tout comme la focalisation isoélectrique permet de séparer et de préconcentrer des protéines. Par contre, elle est beaucoup plus simple à mettre en oeuvre et, contrairement à l'IEF, elle a l'avantage de fonctionner avec tout type d'analyte chargé, sans être restreinte aux protéines seules. Elle a été appliquée à différents analytes comme des colorants fluorescents [12], [13], des acides aminés, des protéines, de l'ADN [13] et des particules colloïdales. En outre, le facteur de préconcentration de cette technique peut

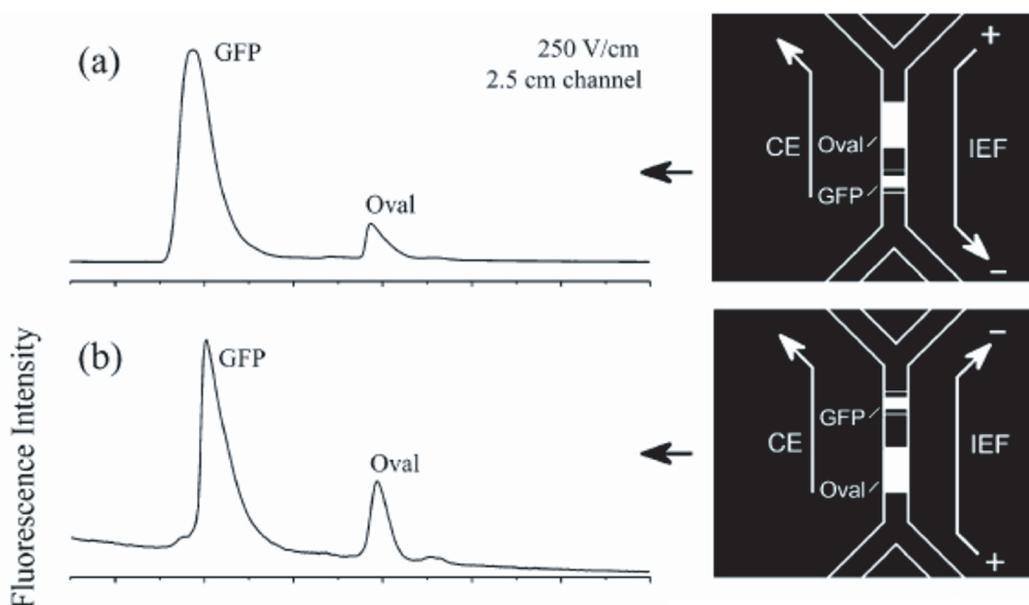


FIGURE 1.11 – Séparation par IEF d'un mélange Ovalbumin, GFP sur puce [10] : a) le gradient de pH assuré par les ampholytes va d'acide en haut à basique en bas l'image, les électrodes assurant l'électrophorèse capillaire (CE) sont positives en bas et négatives en haut de l'image. b) le gradient de pH assuré par les ampholytes va d'acide en bas à basique en haut de l'image, les électrodes assurant l'électrophorèse capillaire (CE) sont positives en bas et négatives en haut de l'image.

atteindre plusieurs ordres de grandeur (10 000 par exemple en 40 minutes [13]) à partir d'un analyte dilué.

Cette technique permet donc des expériences intéressantes de préconcentration par le contrôle d'un paramètre externe au canal microfluidique, la température. La faible inertie thermique au sein des canaux micrométriques permet une modification rapide et efficace des paramètres expérimentaux sans nécessiter d'étape préparatoire comme pour la méthode IEF décrite précédemment. La figure 1.12, extraite de l'article de Ross et al. [13], nous permet de visualiser la simplicité de cette méthode. Le système est posé sur 3 plaques permettant de contrôler la température : les réservoirs sont sur deux plaques froides, une troisième plaque chaude est entre ces deux-ci. La zone de visualisation se situe entre un réservoir et la plaque chaude, il se forme ainsi un gradient linéaire de température entre ces deux plaques. La séparation et concentration s'effectue comme décrit précédemment. Les figures 1.12 b à g montrent les spots fluorescents ainsi obtenus de biomolécules et de molécules chargées. Cependant, comme pour l'IEF, cette technique ne permet pas d'obtenir une bonne résolution spatiale (Figures 1.12 f et g) ce qui limite son utilisation si l'on veut traiter une solution comprenant un très grand nombre d'analytes.

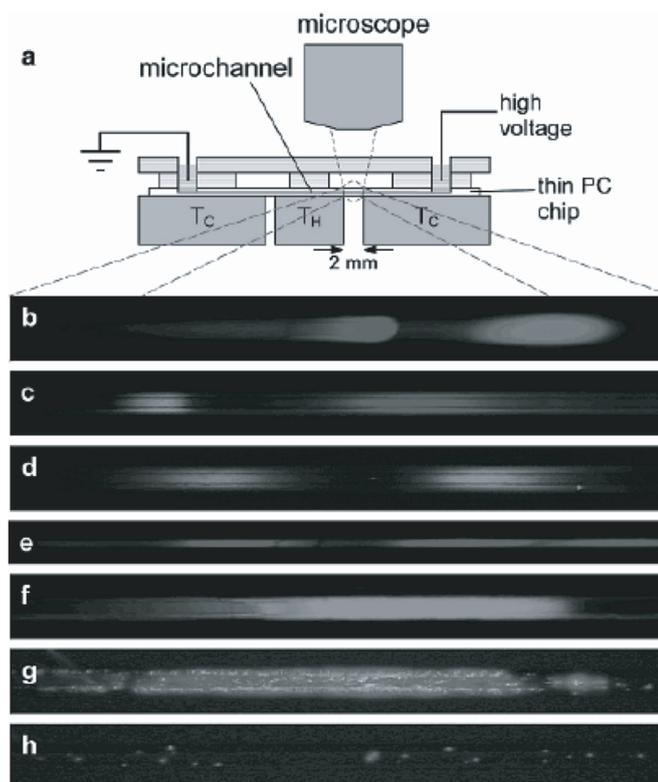


FIGURE 1.12 – a) Schéma du dispositif de TGF , b à g) images des zones d'analytes fluorescents préconcentrés b) Oregon Green 488 carboxylic acid et Cascade Blue hydrazide c) les deux produits de réactions d'acide aspartic marqué et de FQ d) CBQCA et tyrosine e) GFP f) ADN marqué par FITC et TAMRA g) particule de polystyrène de $6 \mu\text{m}$ de diamètre h) idem que g) mais après rinçage et sans application de TGF [13].

1.I.C.4 La focalisation par gradient de champ électrique

Par opposition à la méthode IEF, la focalisation par gradient de champ électrique (EFGF) est basée sur l'application de champs électriques différents. Ici le gradient de champ électrique n'est pas obtenu par des changements de conductivité (transition entre des zones de fortes et faibles conductivités), mais en intégrant plusieurs électrodes dans le microcanal. Si le champ électrique est suffisant pour permettre à tout analyte chargé d'avoir une vitesse supérieure à la vitesse du liquide, celle-ci va continuer à progresser dans le canal de séparation. Le principe de cette méthode EFGF est de diminuer progressivement zone par zone le champ électrique à la manière d'un filtre passe-haut, de telle sorte que les vitesses électrophorétiques sont elles-aussi modulées d'une zone à une autre. Dans la figure 1.13 ci-dessous, nous relatons une expérience de Myers et al. [14] qui ont intégré 5 électrodes différentes afin d'obtenir un champ électrique non uniforme et donc 5 zones du canal différentes pour la mobilité électrophorétique de l'espèce à séparer. Ils

ont porté chacune des 5 électrodes à des potentiels leur permettant d'obtenir 5 zones avec 5 cinq champs électriques différents (1.13 b). Par visualisation de la fluorescence des analytes (1.13 c et d) ils ont observé 6 pics, statiques, correspondant à leur 6 espèces présentes en solution.

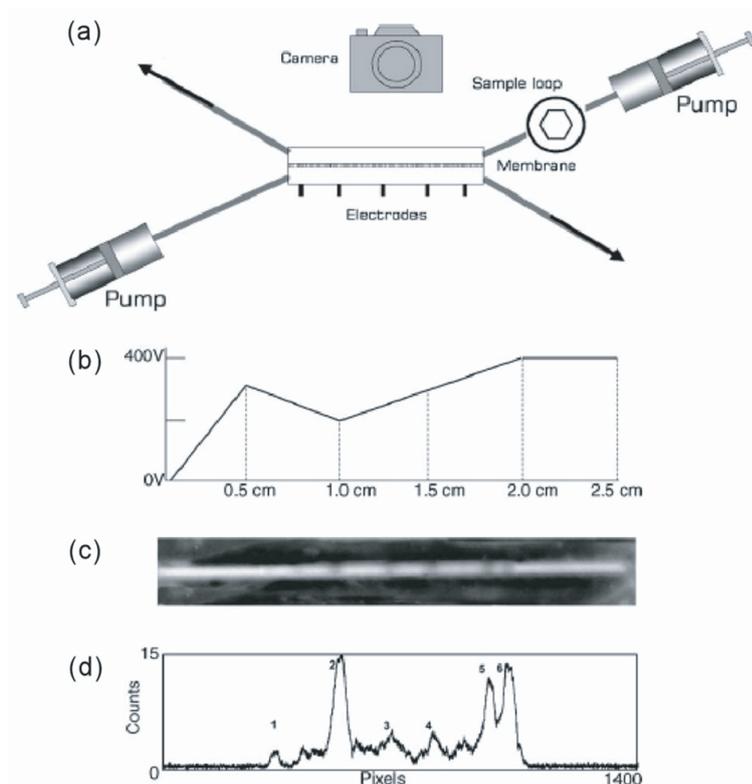


FIGURE 1.13 – a) Schéma du dispositif d'EFGF b) Profil de tension appliquée utilisée pour la séparation de protéines c) Image obtenue par la caméra des lors de l'EFGF mettant en évidence différents spots d) Intensité fluorescente de (1) aprotinin, (2) BSA, (3) galactosidase, (4) soybean trypsin inhibitor, (5) carbonic anhydrase, (6) myosin, obtenue à partir de l'image c) [14].

Ces dispositifs pour EFGF permettent de s'affranchir de la phase préparatoire mentionnée pour la technique IEF. De plus, cette technique illustre parfaitement bien les possibilités offertes par l'intégration d'électrodes ou d'actionneurs dans des dispositifs microfluidiques. Les champs électriques peuvent être changés très facilement et modulés en temps réel. Toutefois, cette méthode permet d'atteindre des taux modérés de préconcentration, par exemple jusqu'à 4000 pour Liu et al. [15]) et pour des temps relativement longs (10 à 100 minutes).

1.I.C.5 L'isotachophorèse

Parmi les méthodes de préconcentration, l'isotachophorèse (ITP) est une méthode extrêmement intéressante car elle permet de préconcentrer des composés, même lorsqu'ils sont présents dans des matrices de forte conductivité (eau de mer [16]; [17]; [18]), urine ([19]; [20]; [21]; [22]), sérum ([19]; [23]; [24]), plasma ([20]) etc.). L'isotachophorèse se déroule dans un milieu de séparation discontinu constitué d'un électrolyte meneur (LE côté positif) et d'un électrolyte terminal (TE côté négatif) qui contiennent un ion meneur (L) et un ion terminal (T) respectivement (figure 1.14a). Le fluide étant incompressible, chaque section doit avoir la même vitesse, quelque soit sa composition ($V_T = V_L$).

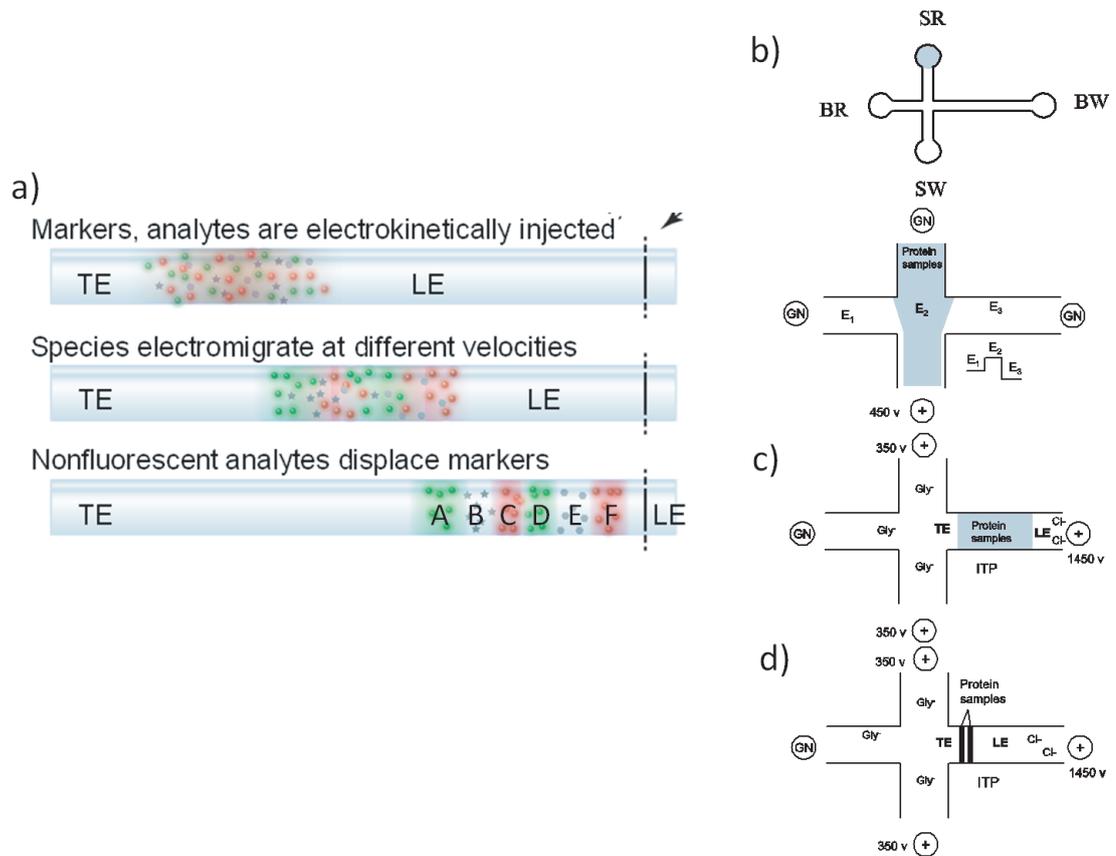


FIGURE 1.14 – a) Schéma de principe de la préconcentration par ITP. La préconcentration se fait par regroupement des ions par mobilité dans un sous volume du volume initial. De plus cette technique sépare dans la même étape. b) Schéma d'un microdispositif permettant de réaliser des ITP, principe de l'injection électrocinétique. c) et d) séparation par ITP.

Les ions meneurs et les ions terminaux doivent avoir une mobilité électrophorétique,

respectivement supérieure et inférieure, à celles des analytes à préconcentrer et doivent posséder une charge de même signe que celle des analytes. La mobilité μ des différents ions est donc la suivante :

$$\mu_T < \mu_A < \dots < \mu_F < \mu_L$$

Les ions L et T vont migrer à la même vitesse et encadrer les zones où sont présents les ions A, B, C, D, E et F (Figure 1.14a) car le fluide est incompressible. On aura donc :

$$V_T = \mu_T \times E_T = \mu_L \times E_L = V_L$$

Le champ est plus élevé dans le domaine de T et compense exactement leur mobilité plus faible.

Les ions A, B, C, D, E et F vont se séparer petit à petit. Les ions B se regroupent devant la zone A et le champ électrique dans la zone de mélange devient non homogène. Lorsque les ions A, B, C, D, E et F seront totalement séparés, on aura une valeur de champ pour la zone des A égale à E_A et une dans la zone des B égale à E_B ... L'égalité suivante est observée :

$$V_T = \mu_T \times E_T = V_A = \mu_A \times E_A = V_B = \dots = \mu_F \times E_B = V_L = \mu_L \times E_L$$

et :

$$E_T > E_A > \dots > E_F > E_L$$

Les valeurs du champ électrique dans chaque zone compensent exactement les différences de mobilité et finalement tous les ions sont exactement triés, par ordre de mobilité, chacun dans une zone exclusive des autres anions de mobilité différente. Le système est alors en état stationnaire, il s'établit un « train d'ions » (cf. figure 1.14a). La continuité électrique implique que les espèces ioniques, une fois séparées par mobilité décroissante, restent très proches au voisinage les unes des autres et se déplacent toutes à la même vitesse. Entre chaque domaine exclusif d'une espèce ionique, il existe alors un gradient de champ électrique qui dépend de la différence de mobilité avec les anions voisins. Un anion, qui sort de son domaine par diffusion, y est forcément ramené puisqu'il passe dans une zone de champ plus forte ou plus faible.

Ainsi par exemple, si A passe dans la zone de T, le champ en zone des T étant plus élevé que dans le domaine des A, l'ion A voit sa vitesse augmenter, puis sort de la zone des ions T et revient dans le domaine des ions A. Si les ions A passent dans la zone des ions B, puisque le champ en zone des ions B est plus faible que dans le domaine des ions A, il voit alors sa vitesse diminuer. Il est ainsi éjecté de la zone des ions B et revient dans le domaine des ions A.

L'isotachophorèse permet donc de préconcentrer en même temps qu'elle sépare les ions. La figure 1.14b donne un exemple de géométrie permettant de réaliser l'ITP sur

puce. La première étape permet une injection électrocinétique des ions meneurs, de la solution à séparer et préconcentrer et des ions terminaux. En modifiant le champ électrique dans le dispositif, l'ITP est réalisée très simplement. Dans un premier temps, les réservoirs contenant les ions meneurs (BW), terminaux (BR) et la solution (SR) sont injectés dans la partie centrale grâce à une tension appliquée positive vers le waste (SW). c) Le champ est modifié de sorte que les ions terminaux repoussent toutes les solutions : les ions terminaux sont reliés à l'électrode négative, tous les autres à la positive. d) Dans le canal de séparation, les ions de la solution à analyser sont encadrés par les ions terminaux et meneurs. La séparation se fait à partir de cette configuration comme décrit précédemment.

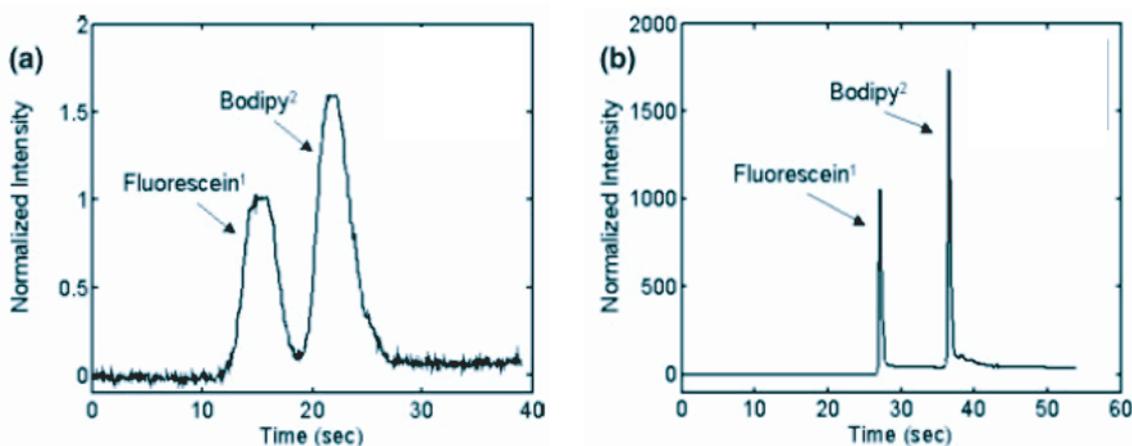


FIGURE 1.15 – Comparaison d’une séparation obtenue par électrophorèse capillaire de zone en milieu libre (a) et la méthode d’ITP (b) pour une solution de fluorescéine et de Bodipy [25].

Le fort intérêt de cette technique sur puce est qu’elle permet de séparer et préconcentrer en une seule étape. Les travaux de Jung et al. (figure 1.15) ont comparé le signal obtenu pour une séparation d’un mélange de fluorescéine et de Bodipy dans le cas d’une électrophorèse capillaire de zone en milieu libre (méthode de séparation sur puce la plus couramment utilisée) et l’ITP. Ils ont obtenu dans leurs conditions un signal 1000 fois plus important lorsqu’ils ont réalisé l’ITP par rapport à l’électrophorèse capillaire. De plus, la résolution des pics est fortement améliorée ce qui met en évidence le pouvoir de séparation bien plus puissant de l’ITP par rapport à une électrophorèse classique. Storey et al. [26] ont optimisé la méthode ITP en utilisant un contrôle de flux sur puce, en minimisant la dispersion, et en tirant parti de hauts champs électriques grâce à un rapport surface/volume élevé des microcanaux. L’ITP abaisse les limites de la détection (LOD) électrophorétique et permet d’augmenter la résolution spatiale par rapport à une électrophorèse capillaire standard (figure 1.15). Ils ont mis en évidence une préconcentration d’échantillons ioniques d’un facteur 10^6 en moins d’une minute.

Ces auteurs ont injecté, concentré, et détecté des concentrations initiales d'échantillon inférieures à 100 fM en moins de 50 secondes. Ils ont également appliqué avec succès cette méthode à l'analyse de différents analytes, tels que des ions organiques solubles dans l'eau, et des simples et doubles brins d'ADN. Parmi les techniques de préconcentration actuellement utilisées, c'est la méthode la plus efficace et la plus rapide. Toutefois, cette méthode a aussi ses limites : la préconcentration va être limitée par la quantité d'analyte présente initialement dans le volume injecté.

En conclusion à cette introduction aux techniques de préconcentration, le tableau ci-dessous résume les avantages et les inconvénients de chaque méthode et indique le taux maximal de préconcentration généralement observé dans la littérature. Une méthode n'apparaît pas dans ce tableau : la nanofluidique qui permet d'étudier des effets de rétention ionique et d'électropréconcentration. Ces effets peuvent être observés au sein de dispositifs fluidiques qui présentent au moins une dimension nanométrique, c'est à dire réduite en taille à l'échelle de la centaine de nanomètres. Il s'agit par exemple de dispositifs intégrant une nanofente ou un nanocanal. Ce thème a fait l'objet de ma thèse et nous verrons tout au long de ce manuscrit que la nanofluidique est un outil puissant pour électropréconcentrer des solutions diluées. Cette méthode est de plus complètement compétitives par rapport aux autres méthodes qui viennent d'être décrites, car l'électropréconcentration sélective devient même possible.

Nom	Efficacité	Avantages	Inconvénients
IEF	10 à 100 en 30 minutes		Applicable que pour les protéines; Très faible préconcentration
TGF	≥ 10000 en 40 minutes	Simple à appliquer; Préconcentre différents analytes chargés	tampons spéciaux; haute tension appliquée; contrôle précis de la température
EFGF	< 4000 en 30 minutes	Simple à appliquer	Fabrication d'un dispositif complexe et contrôle d'un nombre important d'actionneurs
ITP	$\geq 10^6$ en qq minutes	Applicable aux matrices de forte conductivité	Limitée par le volume initial

TABLE 1.1 – Tableau récapitulatif des propriétés des différentes techniques de préconcentration sur puce.

1.II Vers de nouvelles solutions grâce à la nanofluidique : nanofluidique et électropréconcentration

1.II.A Le vivant et la nanofluidique

La microfluidique qui est née à partir des années 1970, a commencée à émerger réellement il y a une vingtaine d'années grâce à l'amélioration des techniques de microfabrication. Ces techniques de microfabrication sont principalement issues du domaine de la microélectronique. Son essor dans les laboratoires s'est accéléré lorsque la fabrication de puces microfluidiques a été possible grâce à la manipulation d'un matériau polymère facile à mouler et ne nécessitant pas d'équipements lourds : le PDMS (polydiméthylsiloxane) [27]. Depuis, les techniques ont encore évolué jusqu'à permettre une structuration de la matière à l'échelle nanométrique dans des puces en verre, permettant ainsi l'émergence de la nanofluidique. La nanofluidique est, par analogie à la microfluidique, l'étude du comportement, la manipulation et le contrôle des fluides confinés dans des structures nanométriques (typiquement inférieures à une centaine de nanomètre). Dans de telles conditions de confinement, les fluides ont un comportement différent de celui observé à plus grande échelle. Ceci s'explique par le fait que les dimensions dans lesquelles s'écoulent les fluides approchent celles des longueurs physiques caractéristiques (longueur de Debye, rayon de Stokes).

Dans la nature de telles nanostructures existent et mettent à profit ces phénomènes physiques très spécifiques de perméabilité sélective. C'est le cas du rein par exemple. Le rein assure la filtration et l'excrétion de l'urine grâce au glomérule (figure 1.16). La fonction du glomérule est de filtrer le sang des capillaires glomérulaires et de former l'urine primitive, appelée également ultra-filtrat. Si l'on regarde plus en détail la structure, on se rend compte que l'effet stérique (taille) est en effet un point très important.

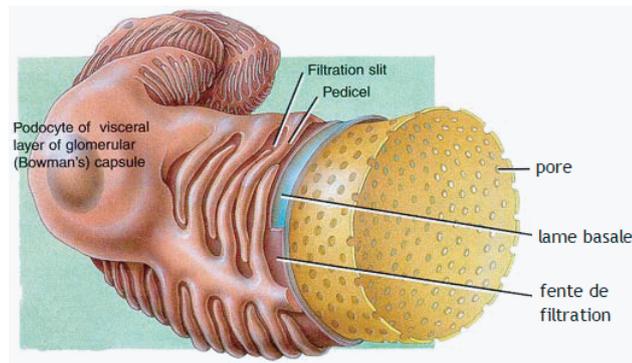


FIGURE 1.16 – Glomérule : la structure filtrante du rein.

La barrière de filtration du glomérule est composée de trois couches :

- l'endothélium fenestré des capillaires, pourvu de petits pores de 50 à 100 nm (nanomètres) de diamètre, qui permet le passage de substances comme l'eau, le sodium, l'urée, le glucose et les petites protéines, mais empêche celui des éléments

cellulaires du sang (leucocytes, érythrocytes, etc.) et des macromolécules dont le poids moléculaire est égal ou supérieur à 68 000 Da (Un dalton est défini comme égal à 1/12e de la masse d'un atome de carbone 12. Un acide aminé de protéine représente environ 110 Da, une base d'ADN (avec le désoxyribose et le phosphate, soit un nucléotide) environ 330 Da).

- la lame basale (d'une épaisseur de 240 à 340 nm), qui empêche le passage des grosses protéines.
- les fentes de filtration (d'une épaisseur de 25 nm) formées par les podocytes et recouvertes d'un mince diaphragme de 4 nm d'épaisseur. Ces fentes empêchent le passage des petites protéines.

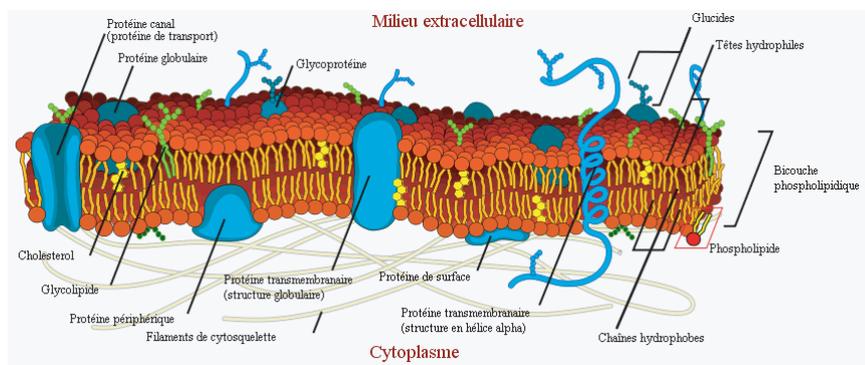


FIGURE 1.17 – Schéma de la membrane cellulaire.

Les membranes cellulaires sont également de bons exemples de structures présentant des ouvertures nanométriques afin de permettre les échanges entre le milieu intra (cytoplasme) et extra cellulaire (figure 1.17). La membrane cellulaire est perméable à l'eau, mais n'est pas perméable à toutes les substances dissoutes. Elle est semi-perméable de la manière suivante :

- l'eau, les ions et les petites molécules hydrophiles passent à travers des pores.
- les lipides passent directement à travers la bicouche lipidique.
- et certaines molécules, qui utilisent des transporteurs spécifiques, les font traverser.

Puisqu'il existe dans ce filtre une restriction liée à la charge électrique recouvrant les structures de la barrière capillaire, les molécules chargées positivement ou neutralement sont donc filtrées plus facilement.

Pour ces nanostructures naturelles, ce survol rapide de leur transport transmembranaire nous permet de comprendre que plusieurs mécanismes rentrent en jeu conjointement : les phénomènes électrostatiques et les effets stériques. Bien que ces structures existent dans la nature, ce n'est qu'en 1990 que le terme de « nanofluidique » est apparu dans le cadre du développement de la recherche pour les laboratoires sur puces [28].

1.II.B Vers des nanocanaux artificiels

Comme nous venons de le voir pour le rein, il existe différentes gammes de taille de structures nanométriques, chacune d'elles ayant une fonctionnalité propre. Les nanostructures artificielles n'échappent pas à ce constat. De manière générale, les nanopores de 1 à 20 nm sont utilisés pour la filtration stérique et la lecture de brin d'ADN et ses dérivés. Les structures plus grandes, qu'il s'agisse de pores ou de nanofentes de taille comprise entre 20 nm et 100 nm, sont quant à elles utilisées pour tirer profit du confinement des propriétés de surface et piloter les phénomènes électrocinétiques (déplacement de biomolécules sous champ électrique). Dans cette section, les opportunités nouvelles apportées par la nanostructuration sont présentées d'après la taille de la nanostructure. Dans un premier temps, je décris les membranes nanoporeuses pour la filtration, puis les nanopores pour la lecture d'ADN aux échelles inférieures à 20 nm. Ensuite, pour les structures de tailles supérieures à la dizaine de nanomètres, je montrerai comment les phénomènes électrocinétiques peuvent être utilisés pour séparer des biomolécules.

1.II.B.1 Les plus petits dispositifs nanofluidiques : les membranes nanoporeuses

Bien que la nanofluidique soit une science très jeune, les propriétés de perméabilité sélective ont pu être étudiées depuis un grand nombre d'années, grâce aux membranes nanoporeuses qui permettent par exemple de filtrer et de désaliniser l'eau pour la rendre propre à la consommation. Ces membranes, à bases de ionomères (copolymères thermoplastiques « réticulés ioniquement »), offre une très faible porosité. De plus, ces ionomères présentent des charges de surface en solution ce qui leur confèrent des propriétés de perméabilité sélective. Dans le procédé d'ultrafiltration, la membrane est constituée de milliers de fibres très fines, rassemblées à l'intérieur d'une gaine rigide. Les parois de chacune de ces fibres sont percées d'une multitude de pores dont le diamètre moyen est de l'ordre de 10 nanomètres. L'eau à traiter circule sous pression à l'intérieur des fibres et passe à travers les pores. Parmi toutes les substances contenues dans l'eau, seules celles dont l'encombrement est inférieur à la taille des pores peuvent traverser les parois des fibres. L'eau ainsi filtrée est récupérée à l'intérieur de la gaine. Les substances à l'encombrement trop important restent dans les fibres où elles sont lessivées par l'eau non filtrée.

Il existe un autre procédé plus récent : la nanofiltration. Son principe est très semblable à celui de l'ultrafiltration, la différence essentielle étant que la membrane de nanofiltration offre une porosité dix fois plus faible, de l'ordre du nanomètre. Constituée de trois couches de matériaux différents, elle est enroulée autour d'un tube central. Injectée sous pression, l'eau à traiter traverse la membrane et ressort filtrée par le tube central. La nanofiltration permet de retenir tous les polluants dissous, qu'ils soient biologiques, organiques ou minéraux et, quelle que soit leur concentration. Elle permet d'éviter l'utilisation de charbon actif pour l'adsorption et de diminuer notablement l'usage du chlore. Son seul inconvénient technique est que l'eau produite est tellement pure qu'il est nécessaire de la reminéraliser. Cette technique est utilisée en France depuis 1999 au sein

d'une nouvelle unité de l'usine de traitement des eaux de Méry-sur-Oise dans la région parisienne.

Ces membranes nanoporeuses sont aujourd'hui très prometteuses pour les piles à combustibles grâce à leur perméabilité sélective. Elles furent inventées au début des années 1960 par Willard Thomas Grubb et Lee Niedrach de General Electric. Elles sont notamment utilisées pour les piles à combustible à membrane d'échange de protons (en anglais « PEMFC pour Proton Exchange Membrane Fuel Cells »). Le principe de ces membranes est donné dans la figure 1.18. Si le développement des énergies vertes en fait une des applications extrêmement porteuse de la nanofluidique, ces membranes ont toutefois de faibles rendements (de l'ordre de 40 à 50%) qui sont liés aux paramètres expérimentaux d'utilisation. Par exemple, pour la membrane la plus couramment utilisée Nafion® de DuPont®, une humidification par de l'eau est nécessaire au transport des protons, ce qui implique une température de fonctionnement inférieure à 80 - 90 °C si l'on ne veut pas voir la membrane sécher (limitation due à la nature des matériaux de la membrane). Une autre limitation de ces membranes a été relevée : une limitation du courant due à la polarisation et aux instabilités liées à la non homogénéité de la géométrie des membranes [29] ; [30]. Les pressions que peuvent supporter ces membranes sont également limitées à quelques bars, à cause de la fragilité de la structure.

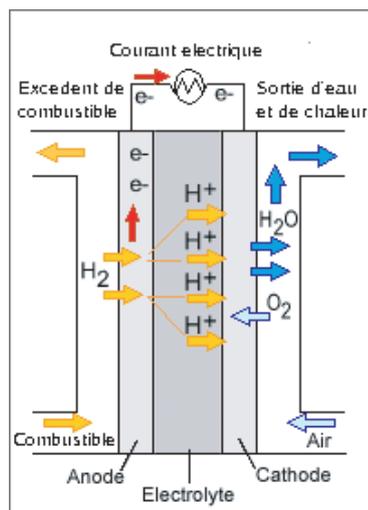


FIGURE 1.18 – Schéma de fonctionnement d'une PEMFC.

Même si ces premiers systèmes nanométriques ont permis de grandes avancées surtout applicatives, il apparait des limitations à leur utilisation qui sont principalement dues aux inhomogénéités structurales. Puisque ces membranes obtenues chimiquement présentent des tailles et formes souvent inhomogènes, on voit ici l'importance de la nanofabrication. Mettre en oeuvre des outils et des procédés de nanofabrication issues des techniques de lithographie et de gravure de la nanoélectronique permet d'obtenir des nanoobjets bien mieux contrôlés en taille et en forme.

1.II.B.2 Les nanopores artificiels pour la lecture de l'ADN

Une des premières motivations derrière le développement des outils de diagnostic miniaturisés a été de créer des nouveaux outils pour le développement de la génomique et la génétique. De nos jours, les efforts se concentrent sur la fabrication de dispositifs rapides et performants pour l'analyse de brins d'ADN. Ces recherches sont prometteuses par exemple pour l'identification de gènes responsables de maladies spécifiques. La méthode la plus populaire est de confiner dans une structure nanofluidique un seul analyte d'un mélange pour le détecter.

Cette stratégie s'est développée dans les années 1990 suite aux travaux réalisés avec l' α -hemolysin (protéine naturelle) qui forme un pore de 1.5 nm de diamètre lorsqu'elle s'adsorbe sur une membrane bilipidique (figure 1.19a). L'analyse du courant traversant la membrane (située entre deux réservoirs dont chacun est relié au générateur de tension/courant et au multimètre) (figure 1.19b), permet de discriminer la protéine ou le brin d'ARN traversant le pore en déterminant la signature électrique induite par les nucléotides (figure 1.19c) [31].

Les nucléotides sont des acides désoxyribonucléiques pour l'ADN et ribonucléiques pour l'ARN. Un nucléotide est composé de trois parties : 1) un groupement phosphate (ou acide phosphorique), identique pour les nucléotides de l'ADN et de l'ARN ; 2) un sucre à cinq atomes de carbone (désoxyribose pour l'ADN et ribose pour l'ARN) ; 3) une base azotée variable en fonction du type de nucléotide.

Puisque les phosphates et les sucres sont toujours les mêmes dans un acide nucléique donné, la nature du nucléotide est déterminée par la base azotée qu'il contient. La séquence d'un brin d'ADN ou d'ARN peut donc se résumer à la succession des bases azotées présentes. Les cinq principaux nucléotides sont nommés selon leur base azotée. La figure 1.19c montre les 2 signatures différentes de brins simples d'ARN de 100 nucléotides : la poly[C]₁₀₀ et la poly[U]₁₀₀. Lorsque que le pore conduit normalement le courant (c'est à dire lorsqu'il est non perturbé par le passage d'un brin d'ARN), le courant vaut 116 pA. Lorsque un ARN rentre dans le nanopore, le nombre de bloquages (c'est à dire de chute brutale du courant), le temps de chacun des bloquages et la valeur en courant des bloquages sont propres à chaque ARN et dépendent des nucléotides. Il est ainsi possible de « lire » des brins d'ADN ou ARN grâce à cette technique.

Depuis 1990, les efforts se sont portés sur la fabrication de nanopores artificiels permettant ainsi de pouvoir modifier la géométrie de celui-ci. La photo de la figure 1.19d est un exemple de nanopore réalisés au LPN sur une matrice de SiC de 20 nm d'épaisseur. Ce pore de 3 nm de diamètre a été réalisé grâce à une gravure du SiC par un Faisceau d'Ion Focalisé (FIB). Cette technique de gravure mise au point au LPN par J. Gierak est valorisée depuis 2005 par la société Raith GmbH (signature de licence exclusive du brevet).

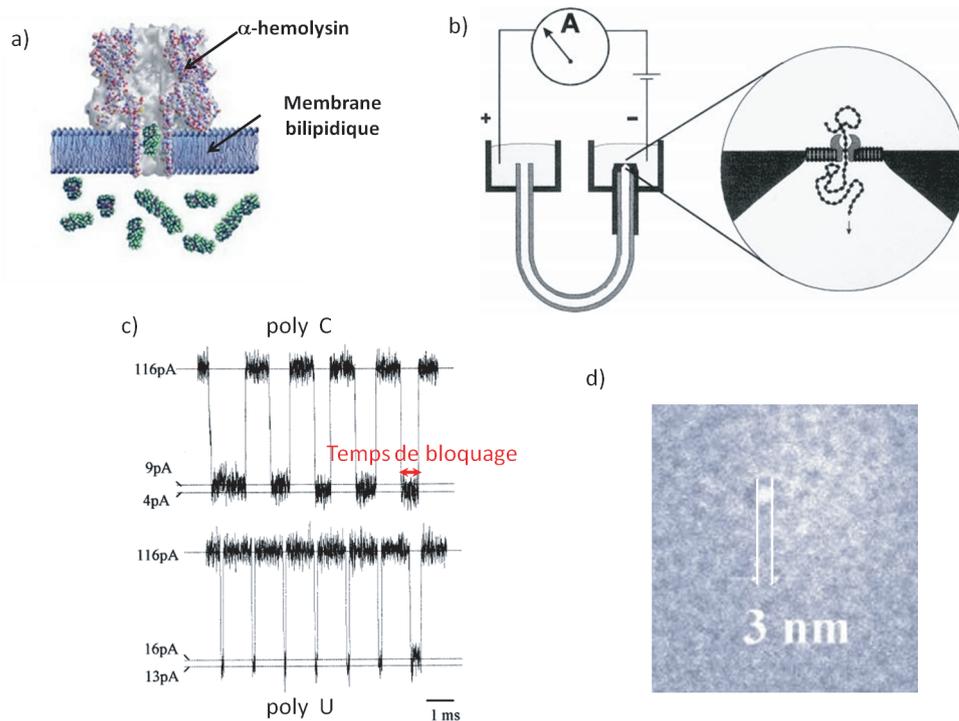


FIGURE 1.19 – a) Schéma de l' α -hémolysine sur une membrane bilipidique. b) schéma du montage utilisé par Akesson et al. [31] pour réaliser de la lecture de brin d'ARN avec de l' α -hémolysine. c) Signature électrique du passage d'un brin de poly[C]₁₀₀ et poly[U]₁₀₀. d) nanopore artificiel de 3 nm de diamètre réalisé sur une matrice de 20 nm d'épaisseur de SiC.

1.II.B.3 Les réseaux nanofluidiques pour la séparation de biomolécules

Plus récemment, toujours grâce aux progrès en nanostructuration, des systèmes de séparation performants, miniaturisés et pouvant être utilisés pour un grand nombre de biomolécules (ADN, protéines) ont été proposés. En 2007, Fu et al. [32] ont proposé un dispositif complet qui utilise les propriétés de confinement spatial pour mettre en évidence la faisabilité de cette séparation. Comme le montre la figure 1.20, ce dispositif est constitué d'un réseau anisotrope tri-dimensionnel de nanofentes ($L = 1 \mu\text{m}$, $l = 1 \mu\text{m}$, $h = 55 \text{ nm}$) et de nanocanaux ($1 \mu\text{m}$ de large et 300 nm de profondeur). Les canaux (nanocanaux profonds et fins, microcanaux reliant réservoirs et réseau anisotropique de séparation) ont été gravés par Reactive Ion Etching (cf. Annexes) après photolithographies. Les trous d'accès ont quant à eux été réalisés avec une gravure humide de KOH à 80°C . Afin d'isoler électriquement le silicium de la solution, l'oxydation de la couche supérieure du wafer (500 nm) est réalisée par oxydation thermique. Enfin, un scellement par bonding anodique permet de sceller le dispositif avec un capot transparent de Pyrex (cf. Chapitre II).

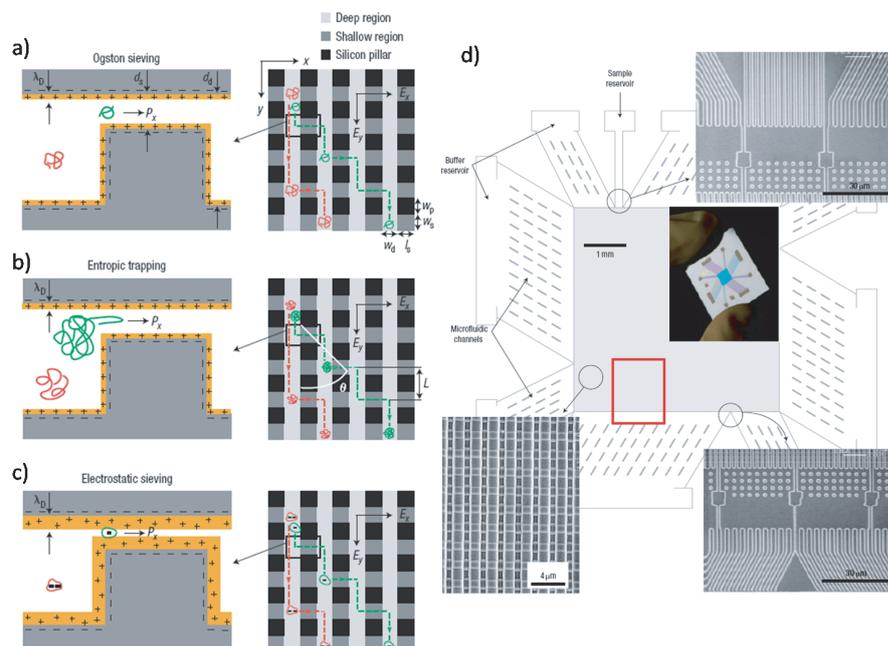


FIGURE 1.20 – Mouvement schématique bidirectionnel de macromolécules chargées dans un réseau anisotrope de nanofentes (de hauteur d_s) et de microcanaux (de hauteur d_d). Deux champs électriques orthogonaux (E_x et E_y) permettent la séparation. Le taux de passage (P_x) des macromolécules à travers une nanofente est différent suivant les biomolécules, et est gouverné par 3 mécanismes dus à l'Ogston sieving a), à l'entropic trapping b) et aux répulsions électrostatiques c) [32]. d) Structure du microdispositif. Le réseau anisotrope micro - nano est gravé sur une surface de $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$, les nanofentes ($L = 1 \text{ } \mu\text{m}$, $l = 1 \text{ } \mu\text{m}$, $h = 55 \text{ nm}$) sont séparées par des pilliers de $1 \text{ } \mu\text{m} \times 1 \text{ } \mu\text{m}$. Les canaux profonds font $1 \text{ } \mu\text{m}$ de large et 300 nm de profondeur.

Trois mécanismes ont été avancés qui permettent d'expliquer les différents régimes de transport des biomolécules à travers ce réseau croisé de nanofentes :

- le tamisage d'Ogston (en anglais « Ogston Sieving ») : pour ce régime, c'est l'encombrement stérique de la biomolécule qui est mis en jeu. Une biomolécule dont la taille est inférieure à la taille de la nanofente et à celle de la double couche de contre-ions passera de l'autre côté de la nanofente, contrairement à une biomolécule dont le rayon de giration est supérieur.
- le piégeage entropique (en anglais « Entropic trapping ») : pour les biomolécules dont le rayon de giration est supérieur à la nanofente, il est tout de même possible de passer. Pour cela, les biomolécules doivent se déplier. L'énergie nécessaire pour étirer le brin est alors le paramètre qui régit le taux de passage (P_x).
- les répulsions électrostatiques : pour ce régime, le taux de passage est relié à la barrière énergétique que représente la nanofente pour les biomolécules chargées.

Pour que cette barrière soit efficace, il faut que $\lambda_d \approx d_s$. La séparation est donc ici basée sur la charge de la biomolécule.

Citons enfin une dernière thématique de recherche des nanocanaux fluidiques qui est étudiée depuis plus d'une décennie car elle est extrêmement prometteuse : il s'agit de la préconcentration de molécules chargées grâce à l'introduction d'une nanofente dans un microcanal [9] [33] [34] [35] [36]. Ce sujet autour du contrôle des phénomènes électrocinétiques dans des structures fluidiques « Microcanal / Nanofente / Microcanal » (MNM) a fait l'objet de mon travail de thèse. Le but de mes travaux était de retrouver expérimentalement les régimes d'électropréconcentration prédits théoriquement [37]; [38]; [39], pour différentes solutions de protéines. Notre but ultime serait à terme de pouvoir utiliser cette méthode d'électropréconcentration, comme une étape d'amplification sélective de traces d'analytes et de pouvoir proposer des dispositifs simplifiés extrêmement performants par exemple pour l'identification d'agents du bio-risque.

La fin de ce chapitre est donc consacrée à la présentation de l'état de l'art international autour de cette méthode d'électropréconcentration dans des structures fluidiques MNM.

1.II.C Phénoménologie de l'électropréconcentration : les premières observations expérimentales

L'électropréconcentration de macromolécules à l'interface entre microcanaux et nanocanaux dans des structures MNM a été mise en évidence pour la première fois par Pu et al. en 2004 [40]. Bien que cette technique soit récente, des taux élevés de préconcentration (rapport C_{max}/C_0) ont été observés dès les premières publications. Cependant, cette jeunesse ne permettait pas encore de faire ressortir des modèles expliquant les conditions de focalisation en certains points précis des microcanaux, réservoirs d'entrée ou de sortie de la nanofente. Une multitude d'observations souvent contradictoires, quant aux profils de préconcentration obtenus, ont été par ailleurs rapportées dans la littérature, avec des points focaux observés pour une même protéine (GFP (Green Fluorescent Protein)), parfois du côté anodique [9], ou du côté cathodique [41]. Certaines expériences observent de plus ces points focaux, soit très loin en amont dans le microcanal réservoir, soit directement à l'entrée du nanocanal. Il est important de noter qu'il était de plus difficile de pouvoir comparer ces travaux entre eux, à cause des conditions expérimentales et des géométries différentes. Dans ce contexte, la modélisation de la dynamique des phénomènes d'électropréconcentration (sous champ électrique) et de rétention (sous gradient de pression) d'un nanocanal unique qui ne peut être analytique, devient pertinente. Sur ce point, mes travaux de thèse se sont appuyés sur les résultats théoriques obtenus par Adrien Plecis pendant sa thèse au Laboratoire de Photonique et de Nanostructures (LPN). Nous verrons à la fin de ce chapitre quels sont les 4 régimes théoriques pertinents qui découlent de l'effet de polarisation en concentration dans ces structures MNM.

Relatons d'abord les premières observations expérimentales, qui faisaient l'état de l'art il y a 5 ans dans la communauté nanofluidique. Retracer ces expériences va nous

permettre de mieux cibler les points clés et les verrous de cette technique.

Dès 2005, une publication de Wang et al. [9] a permis de mettre en évidence le fort potentiel de cette technique puisqu'un taux de préconcentration de 10^6 a été obtenu pour 40 minutes de préconcentration de GFP (cf. figure 1.21). Ce groupe, utilisant une astuce d'écoulement électroosmotique entre les microcanaux, a observé une préconcentration dans le microcanal du côté anodique à plusieurs centaines de microns de la nanofente de 40 nm de hauteur. Cet article a permis de mettre en évidence la compétitivité de cette technique, notamment par rapport à la méthode ITP présentée précédemment. Si le temps d'électropréconcentration est plus important tout en restant raisonnable, il est important de souligner que le volume initial à préconcentrer dans les structures MNM est celui des réservoirs. Il est donc « infini » comparativement au volume utilisé pour la méthode ITP.

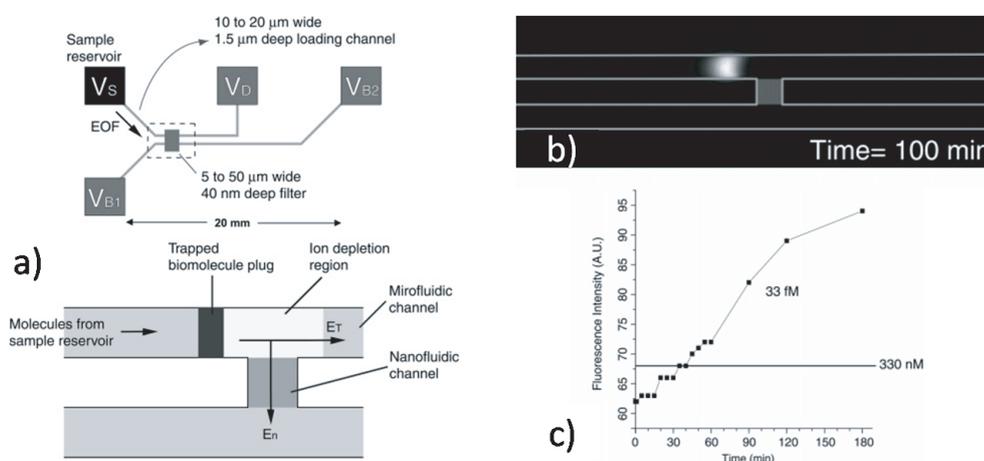


FIGURE 1.21 – a) Schéma du dispositif utilisé par Wang et al. : la zone de déplétion servant de filtre pour les biomolécules négatives en amont de la nanofente ; b) Visualisation par fluorescence de la zone préconcentrée anodiquement après 100 minutes d'expérience pour $V_S=10$ V, $V_D=5$ V et $V_{B1}=V_{B2}=0$ V ; c) Préconcentration de GFP diluée ($C_0=33$ fM) en fonction du temps.

Cependant, dans la thèse de Reto Schoch [41], en utilisant la même protéine, avec une géométrie assez proche et des tensions appliquées similaires, une préconcentration cathodique de GFP a été observée avec un taux de préconcentration de 600 (figure 1.22) et la cinétique de celle-ci dépend de la tension appliquée à travers le nanocanal (augmentation du taux de préconcentration avec la tension - figure 1.22b).

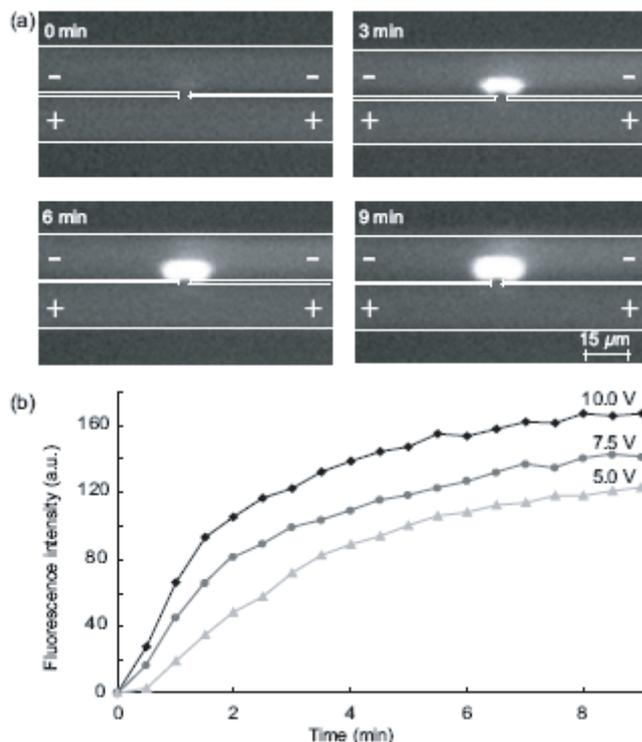


FIGURE 1.22 – a) Image en fluorescence de la préconcentration de GFP obtenu par Schoch, avec une zone de préconcentration proche du nanocanal et qui ne s’étend pas sur toute la largeur du microcanal; b) Suivi en fluorescence de la préconcentration des protéines GFP en fonction du temps pour 5V, 7.5 V et 10V.

En 2006, un article de Kim et al. s’est également intéressé à l’influence de la tension appliquée sur la préconcentration [42]. Cet auteur a utilisé un dispositif en PDMS en appliquant une tension élevée comprise entre 100V et 200V pour préconcentrer la protéine BSA dans une structure MNM intégrant une nanofente de 20 μm de long (figure 1.23a). Une préconcentration anodique importante de BSA (entre 10^3 et 10^6 est observée après 30 minutes avec comme précédemment une influence du champ électrique externe sur l’efficacité de la préconcentration (figure 1.23b). Ils mettent en évidence la non-linéarité du facteur de préconcentration entre 100V et 200V dans leurs conditions expérimentales. Notons que l’utilisation du matériau PDMS ne leur a pas permis d’explorer des tensions supérieures à 200V.

La petite molécule de Fluorescéine, à forte mobilité électrophorétique, a quant à elle été préconcentrée à plusieurs reprises [38] [43]. La position du front de préconcentration a toujours été observée du côté cathodique et de faibles taux de préconcentration ont été rapportés.

Enfin, l’électropréconcentration a aussi été possible en utilisant, à la place d’une nanofente, des réseaux de nanocanaux 2D [35] [43] [44] [45]. Le groupe de J. Han au

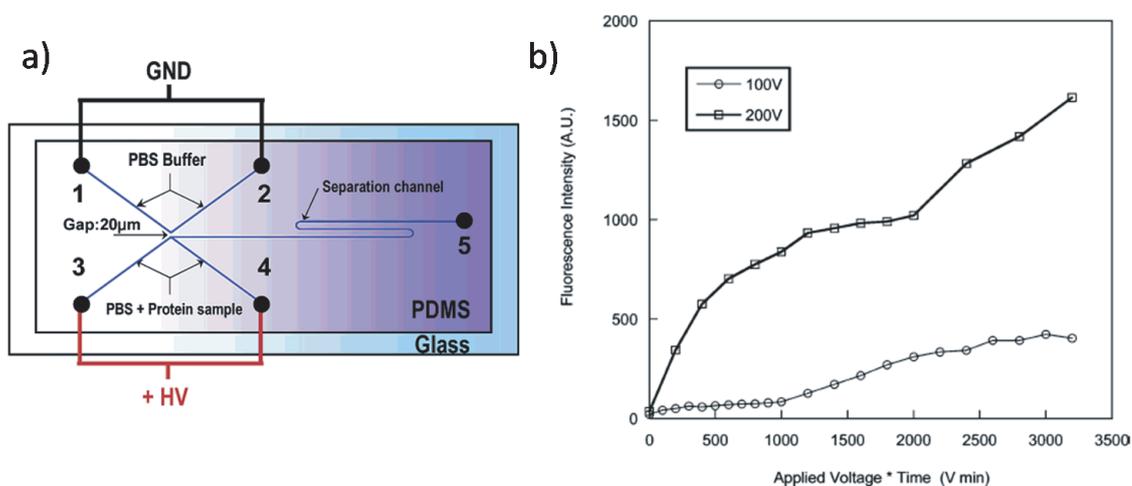


FIGURE 1.23 – a) Schéma du dispositif utilisé par Hasselbrink pour préconcentrer anodiquement de la BSA ; b) Mesure de la préconcentration par suivi de la fluorescence en fonction du temps × tension appliquée.

MIT est d'ailleurs progressivement passé de nanofentes simples [9] à de tels réseaux de nanocanaux 2D [44] puis plus récemment à des membranes nanoporeuses commerciales [45]. Malgré les limitations en courant et les instabilités liées aux membranes, le procédé de fabrication s'en est trouvé fortement simplifié.

Pour conclure, le tableau ci-dessous résume cet état de l'art en relatant les valeurs expérimentales obtenues pour le taux de préconcentration (C_{max}/C_0).

Référence biblio	Hauteur nano	Tension	Taux de préconcentration	Localisation	Solution tampon	Analyte
[9]	40 nm	10V, flux EOF entre μ canaux anodiques	10^6 en 40'	anodique	10 mM phosphate(dibasic sodium phosphate) (pH 9.1)	GFP
[41]		10V	600 en 10'	cathodique		GFP
[40]	60 nm	1000V		cathodique	70 μ M sodium tetraborate buffer (pH 8)	Fluorescéine
[44]	réseau nano 2D, 40 nm de hauteur	20V		anodique (loin) et cathodique (collé)	0.1 à 15 mM de GFP	GFP
[42]	PDMS, élastomère	200 V et 100V / 20 μ m , limité à 200V	10^3 à 10^6 en 30'	anodique	PBS (pH 7.4)	BSA
[43]	50 nanocanaux en //	500 V / 1 mm		cathodique	100 μ M sodium tetraborate (pH 9)	Fluorescéine
[35]	Membrane de silice nanoporeuse	1kV / 5 μ m	600 en 10'	anodique	50 mM Tris-borate (pH 8.9)	BSA , α lactalbumin, cabonic anhydrase...
[45]	membrane nanoporeuse Nanofon	25 et 50 V		anodique	1 mM phosphate buffer	β -phycoerythrin
[38]	50 nm	courant imposé : 800 pA		cathodique	Fluorescéine et Alexa Fluor 1 à 10 mM	Fluorescéine et Alexa
[46]	50 nm	100V / 100 μ m	< 10 en 10'	cathodique	10 μ M de KCl	Fluorescéine

TABLE 1.2 – Tableau récapitulatif des paramètres clés des expériences d'électropréconcentration.

De ces premières études, il apparaît que l'électropréconcentration dans des structures fluidiques MNM est très prometteuse, puisqu'elle permet d'obtenir des taux de préconcentration comparables à la technique d'IPT, avec des temps similaires [9] [42]. Plusieurs configurations expérimentales (géométrie de la structure MNM, tension, solution tampon et analytes) ont déjà été testées. Toutefois, il apparaît que les espèces très mobiles ayant une forte mobilité électrophorétique auront plutôt tendance à se préconcentrer faiblement dans le microcanal cathodique [38] [41] [43] [46], tandis que les protéines plus lourdes seront plus fortement concentrées du côté anodique. Revenons sur la différence importante entre les expériences de Schoch et al. et de Wang et al. avec la protéine GFP (figures 1.21 et 1.22), différence qui nous a interpellé au début de ma thèse. Le premier auteur obtient une faible préconcentration cathodique alors que le second auteur, en utilisant le même champ électrique, obtient une préconcentration de trois ordres de grandeur supérieure qui permet à la macromolécule de se préconcentrer dans le microcanal réservoir anodique. Ces deux expériences montrent combien ce sujet de l'électropréconcentration était mal maîtrisé il y a 3 ans. Comprendre et interpréter ces expériences multiparamètres est un sujet difficile que j'ai tenté d'aborder en m'appuyant sur les travaux théoriques d'A. Plecis. Introduisons la théorie qui va nous permettre d'expliquer les mécanismes électrocinétiques, qui régissent ces phénomènes complexes de l'électropréconcentration.

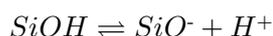
1.III Théorie

1.III.A Charge de surface, potentiel électrostatique et confinement

1.III.A.1 Verre et charge de surface

Pour permettre une meilleure compréhension de ces phénomènes électrocinétiques qui sont pilotés par le flux électro-osmotique (EOF), qui est lui-même gouverné par la charge de surface, j'ai utilisé des dispositifs fluidiques en verre. Explicitons cette charge à la surface du verre. Si l'on frotte un baguette de verre avec un chiffon, chacun sait qu'il est possible d'électrifier la baguette et d'attirer (ou de repousser) de petits objets. La présence de charge à la surface du verre est également possible, quand celui-ci est mis en contact d'une solution aqueuse ou saline.

Le verre est une silice qui présente en surface des liaisons Si-OH. Ces groupements silanols au contact de l'eau se déprotonent conduisant à la formation d'une couche à la surface du verre hydratée présentant des ions. Le bilan acido-basique suivant décrit la modulation de la charge de surface des groupements silanols en fonction du pH :



La dissociation de ces groupements en surface, ainsi que l'adsorption d'ions présents en solution sont donc à l'origine de cette charge de surface [47] ; [48], qui se définit par :

$$\sigma_s = \sum_i q_i/A;$$

avec σ_s la charge de surface, $q_i = Z_i \times e$ (e = la charge de l'électron ; Z_i la valence de l'ion i) et A la surface prise en considération.

Une valeur typique de charge de surface du verre est de -0.3 C/m^2 , ce qui correspond à une charge unique pour une surface 0.5 nm^2 . Toutefois, cette valeur est fortement dépendante du pH de la solution en contact du verre et peut atteindre un point de charge nulle à $\text{pH} = 2$ [49].

Dans le cadre de mes recherches, les protéines avaient tendance à se greffer très facilement à la surface du verre, modifiant la charge de celle-ci. Nous en reparlerons. Les protéines, tout comme le verre, sont elles-aussi sensibles aux variations de pH. C'est un point important à souligner, car ce paramètre parfois incontrôlable peut être source d'instabilités ou de non-reproductibilité des expériences.

1.III.A.2 De la charge de surface au potentiel Zeta

Les charges à la surface du verre sont donc à l'origine d'un potentiel électrostatique qui va à son tour attirer (repousser) les contre-ions positifs (co-ions négatifs) présents en solution. Cette couche enrichie en contre-ions contient quelques ions fixés à la surface et un grand nombre d'ions très mobiles au voisinage de la surface. Cette région, qui va écranter le potentiel de surface et qui est appelée double couche électrique (EDL : Electrical Double Layer), a été initialement introduite dans le modèle de Helmholtz, comme une simple capacité qui correspond physiquement à un ensemble de contre-ions fixes. Gouy et Chapman prirent l'hypothèse d'un plan chargé uniformément immergé dans une solution ionique, ce qui donne lieu à une couche diffuse et mobile [50].

Ne trouvant aucun de ces modèles satisfaisants, Stern a introduit une couche fixe représentant les espèces fixées à la surface, entre la surface elle-même et la couche diffuse : la couche de Stern (figure 1.24). La couche diffuse représente la zone, où les espèces attirées par les charges de surface sont complètement mobiles. Cette représentation de la surface est importante, car c'est celle qui est encore aujourd'hui utilisée et qui sert à déterminer le potentiel de surface appelé « potentiel ζ », dans le modèle de Gouy-Chapman [51]. Ce potentiel ζ représente physiquement le potentiel à partir duquel les espèces deviennent parfaitement mobiles. C'est ce potentiel qui est aujourd'hui mesuré expérimentalement.

1.III.A.3 Le modèle de Gouy-Chapman

Ce modèle permet de donner la distribution des ions mobiles dans la solution qui vont former la double-couche diffuse, que nous appellerons par la suite EDL. Pour simplifier

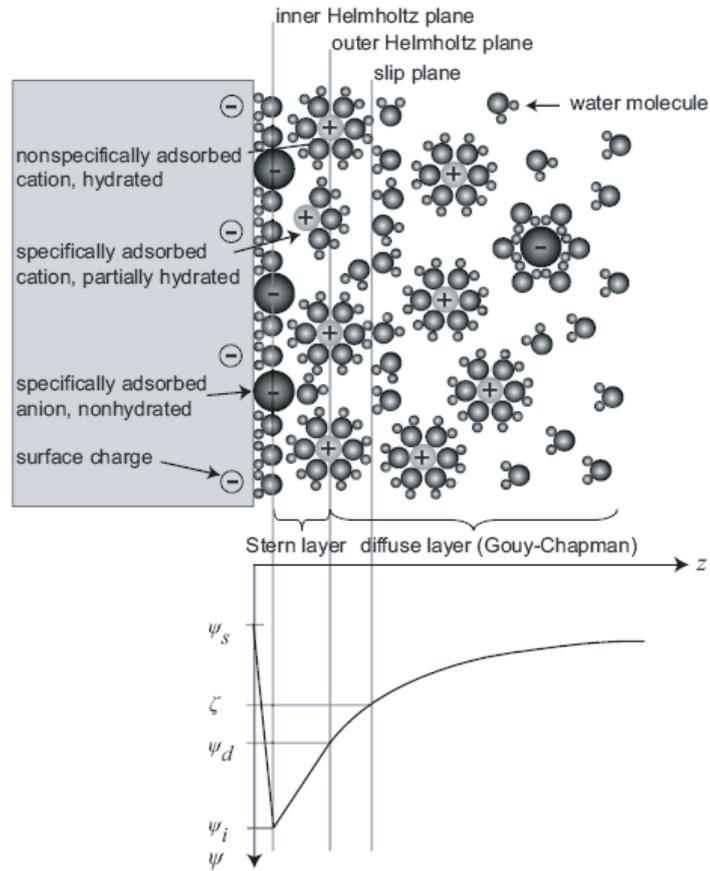


FIGURE 1.24 – Schéma de la représentation du potentiel électrostatique en solution ionique dû aux charges de surface.

les équations, nous ne traiterons ici que le cas d'une solution composée de deux ions monovalents et symétriques (ce qui est le cas d'une solution de KCl). Le problème est traité de façon générale dans le livre de Hunter [51]. A l'équilibre, les flux d'ions à travers une section dS sont égaux. Dans le cas d'ions en solution, proches d'un plan infini uniformément chargé, les flux électrostatique et diffusif s'équilibrent (la gravité étant négligée) :

$$J_{Diff} = RT \frac{dC}{dz} = J_{elec} = qE = CF \frac{d\varphi}{dz} \quad (1.5)$$

avec R la constante des gaz parfaits, T la température, z la direction normale au plan (figure 1.24), E le champ électrique en z , C la constante de Coulomb, F la constante de Faraday et φ le potentiel électrique.

En intégrant cette équation différentielle, on obtient :

$$C_+ = C_{\infty,+} \exp\left(\frac{-F\varphi}{RT}\right) \quad (1.6)$$

$$C_- = C_{\infty,-} \exp\left(\frac{F\varphi}{RT}\right) \quad (1.7)$$

où C_+ et C_- sont les concentrations locales des ions positifs et négatifs $C_{\infty,+}$ et $C_{\infty,-}$ sont les concentrations des ions positifs et négatifs loin de la surface chargée où $\varphi \xrightarrow{z \rightarrow \infty} 0$.

Au voisinage de la surface, la densité de charge est donnée par :

$$\rho = F \sum_i C_i Z_i \quad (1.8)$$

Enfin, une dernière équation importante est nécessaire pour déterminer le potentiel : l'équation de Poisson. Elle donne la distribution de charge excédentaire au voisinage de la surface en fonction de la distance à celle-ci.

$$\frac{d^2\varphi}{dz^2} = \frac{-\rho}{\epsilon_0\epsilon_r} \quad (1.9)$$

avec ϵ_0 et ϵ_r la permittivité du vide et la permittivité relative de la solution.

En substituant les équations (1.6), (1.7) et (1.8) dans (1.9), on obtient l'équation de Poisson Boltzmann :

$$\frac{d^2\varphi}{dz^2} = \frac{-F}{\epsilon_0\epsilon_r} \sum_i C_{\infty,i} Z_i \exp\left(\frac{-F Z_i \varphi(z)}{RT}\right); \quad (1.10)$$

Avec $C_{\infty,i}$ la concentration de l'ion i loin de la surface chargée. Une première approximation peut servir pour résoudre cette équation différentielle, l'approximation de Debye-Hückel. Si l'on considère qu'à toute distance du plan chargé $Z_i\varphi \ll 25,7$ mV à 25°C, on peut utiliser le développement du premier ordre $\exp^\alpha = 1 + \alpha$ pour α petit. On obtient :

$$\frac{d^2\varphi}{dz^2} = -\frac{F}{\epsilon_0\epsilon_r} \sum_i C_{\infty,i} Z_i + \sum_i C_{\infty,i} \frac{F^2 Z_i^2 C_{\infty,i} \varphi(z)}{\epsilon_0\epsilon_r RT}; \quad (1.11)$$

Pour satisfaire l'électroneutralité dans la solution, le premier terme est nul (loin des parois, où le potentiel est nul, les charges en solutions s'équilibrent, autant de charges positives que négatives)

Nous obtenons alors :

$$\frac{d^2\varphi}{dz^2} = \kappa^2 \varphi(z); \quad (1.12)$$

soit :

$$\varphi(z) = \zeta \exp(-\kappa z); \quad (1.13)$$

Concentration en KCl (M)	Longueur de Debye λ_D (nm)
10^0	0.3
10^{-1}	1.0
10^{-2}	3.1
10^{-3}	9.6
10^{-4}	30.5
10^{-5}	96.3

TABLE 1.3 – Valeurs des longueurs de Debye en fonction de la concentration d'une solution de KCl à 25°C.

avec

$$\kappa = \left(\frac{F^2 \sum_i C_{\infty,i} Z_i^2}{\epsilon_0 \epsilon_r RT} \right)^{1/2}; \quad (1.14)$$

κ est donc appelé « paramètre de Debye-Hückel » et est notamment dépendant de la concentration de la solution. Ce paramètre, fréquemment utilisé en première approximation pour connaître la taille typique de l'EDL, est appelé longueur de Debye λ_D et correspond à l'inverse de κ . Le tableau 3 donne un ordre de grandeur de la taille de l'EDL pour différentes concentrations de KCl à 25°C.

Même si la longueur de Debye est souvent utilisée comme première approximation de l'EDL, cette résolution du potentiel est peu utilisée, car les conditions expérimentales ne correspondent pas au cas où $Z_i \varphi \ll 25, 7\text{mV}$ à 25°C. Nous utilisons donc la résolution exacte de l'équation différentielle de l'Eq. (1.11). Pour simplifier l'écriture du calcul, prenons l'hypothèse d'une solution aqueuse avec des ions symétriques et monovalents ($C_{\infty,+} = C_{\infty,-}$, $Z_+ = -Z_- = 1$). L'équation (1.11) peut se réécrire :

$$\frac{d^2 \varphi}{dz^2} = \frac{FC_{\infty} (-\exp(\frac{-F\varphi}{RT}) + \exp(\frac{F\varphi}{RT}))}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (1.15)$$

$$\frac{d^2 \varphi}{dz^2} = \frac{2FC_{\infty} \sinh(\frac{F\varphi}{RT})}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (1.16)$$

Cette équation se résout analytiquement en multipliant l'équation (1.16) par la dérivée du potentiel et en intégrant de part et d'autre de l'égalité entre z et l'infini, on trouve :

$$\frac{1}{2} \left(\frac{d\varphi(z)}{dz} \right)^2 = \frac{2RT}{\epsilon_0 \epsilon_r} [\cosh(\frac{F\varphi(z)}{RT}) - 1] \quad (1.17)$$

avec comme conditions de bords :

$$\varphi(z \rightarrow \infty) = 0 \quad (1.18)$$

L'équation (1.17) se réécrit encore sous la forme :

$$\left(\frac{d\varphi(z)}{dz}\right)^2 = \frac{8RT}{\epsilon_0\epsilon_r} \sinh^2\left(\frac{F\varphi(z)}{2RT}\right) \quad (1.19)$$

ou encore :

$$\frac{1}{\sinh\left(\frac{F\varphi(z)}{2RT}\right)} \frac{d\varphi(z)}{dz} = \left(\frac{8RT}{\epsilon_0\epsilon_r}\right)^{1/2} \quad (1.20)$$

Cette équation s'intègre tel que :

$$\frac{-2RT}{F} \ln\left(\tanh\left(\frac{F\varphi(z)}{4RT}\right)\right) = \left(\frac{8RT}{\epsilon_0\epsilon_r}\right)^{1/2} z + cste \quad (1.21)$$

En prenant ζ comme condition de bord à cette équation, nous obtenons la solution particulière :

$$\varphi(z) = \frac{2RT}{F} \operatorname{arctanh}\left(\tanh\left(\frac{F\zeta}{2RT}\right) \exp\left(\frac{-z}{\lambda_D}\right)\right); \zeta = \varphi(z=0) \quad (1.22)$$

avec comme conditions de bords :

$$\frac{d\varphi(z=0)}{dz} = \frac{\sigma_s}{\epsilon_0\epsilon_r} \quad (1.23)$$

La figure 1.25 présente les solutions analytiques pour deux modèles, celui de Gouy-Chapman et celui de Debye Hückel. Dans les deux, il y a déplétion des co-ions et enrichissement des contre-ions. Dans le cas de Debye-Hückel, les espèces négatives repoussées sont en nombre équivalent aux espèces positives attirées. Dans le modèle de Gouy-Chapman, la concentration en espèce positives proche de la surface est extrêmement forte. Il y a dans ce modèle une forte dissymétrie entre les concentrations de ces deux espèces. Ce résultat tend à dire qu'au voisinage de la surface, il y a augmentation de la densité de charges. C'est donc la résolution du potentiel par le modèle de Gouy-Chapman qui est la méthode la plus couramment utilisée, car même si elle ne prend pas en compte l'encombrement stérique pour les contre-ions au voisinage de la surface, elle permet d'obtenir des résolutions dont le degré de finesse est le même que pour les expériences aujourd'hui réalisées.

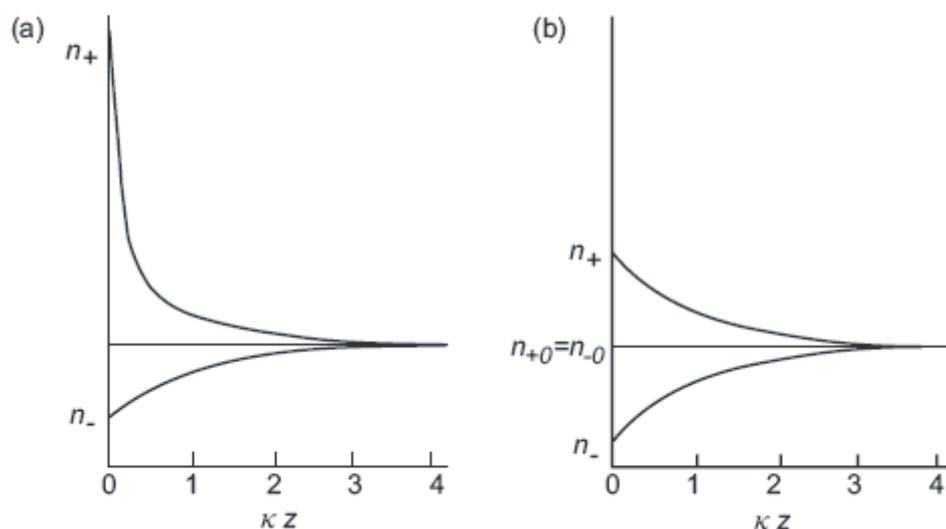


FIGURE 1.25 – Distributions des charges positives et négatives en fonction de la distance à la paroi pour les modèles de Gouy-Chapman (a) et Debye-Hückel (b). [51].

Les charges de surface entraînent une augmentation de la densité de charges (mobiles) dans l'EDL. Ce phénomène a été mis en évidence expérimentalement par Stein et al. [52]. Ils ont étudié l'influence de la modification de la charge de surface sur la conductance dans un nanocanal de 380 nm de hauteur (la taille et l'influence de l'EDL ne peuvent pas être négligées). Par modification du pH (de 3.5 à 9.5) (figure 1.26), ils ont modulé la charge de surface du verre sans prétraitement de surface (groupements silanols de surface) et avec prétraitement (coating préalable de groupements amines). Le verre présente une charge de surface négative de plus en plus importante en milieu basique sur cette gamme de pH. Par ailleurs, plus le pH augmente, plus la conductance augmente. Dans le cas de groupements amines en surface, la charge de surface est positive et augmente en milieu acide, comme précédemment, plus la charge de surface augmente (en valeur absolue), plus la conductance augmente. Ce phénomène est donc lié à l'augmentation de ζ et met en évidence que l'approximation de Debye-Hückel n'est pas suffisante dans le cas de nanocanaux puisque l'augmentation de la densité de surface n'est pas décrite.

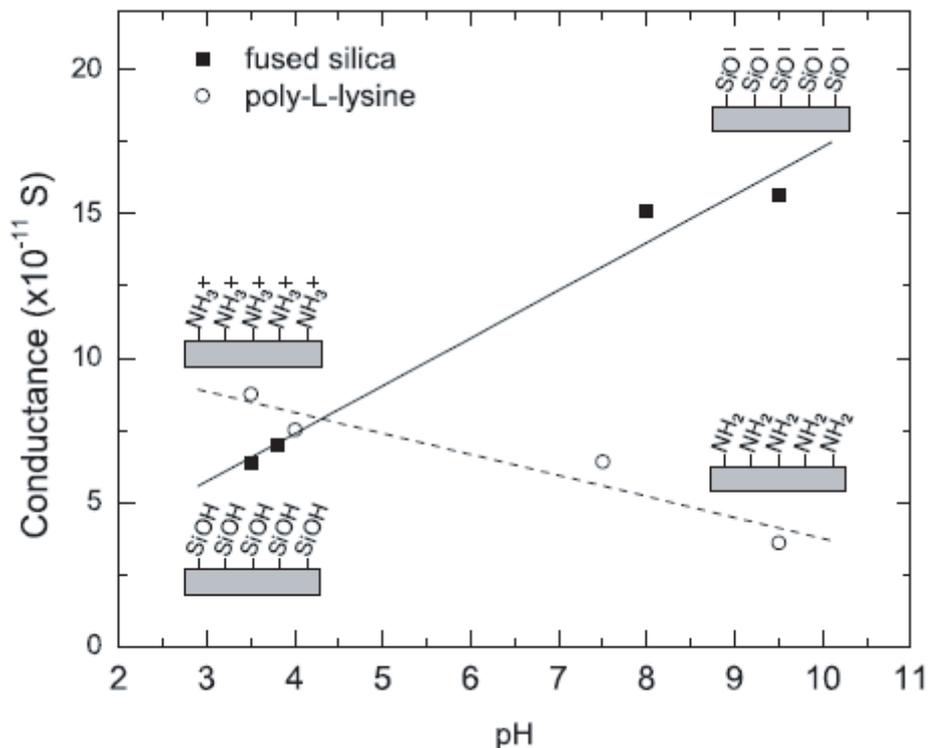


FIGURE 1.26 – Conductance d’un nanocanal de 380 nm de hauteur de silice rempli avec une solution de 10⁻⁴M de (HCl+NaOH). La charge de surface est modifiée par modification du pH agissant sur les groupes silanols du verre dans un cas, et sur les groupements amines du coating dans l’autre [52].

1.III.B Les effets électrocinétiques dans les nanocanaux

Deux restrictions nécessitent toutefois une résolution numérique de ce modèle : le cas de solutions contenant des espèces pluri-chargées et non symétriques ; le cas où deux plans se font face et pour lesquels la condition de bord de l’équation (1.18) n’est plus valide (figure 1.27). Maintenant que nous avons vu comment était modélisé le potentiel dans un canal unique, voyons quelles sont les conséquences de ce potentiel dans des nanocanaux et intéressons-nous au cas plus complexe de géométries Micro - Nano - Micro (MNM).

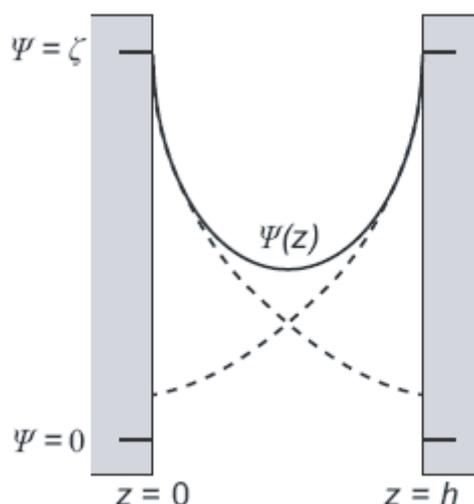


FIGURE 1.27 – Schéma du potentiel électrostatique entre 2 plans propres chargés uniformément.

1.III.B.1 L'effet Donnan : perméabilité sélective des nanocanaux

Nous venons de voir comment déterminer le potentiel dans un capillaire simple. Dans cette thèse, nous travaillons avec des géométries bien plus complexes car il ne s'agit pas d'un simple canal uniforme, mais d'une structure qui met en série un microcanal, un nanocanal et un second microcanal. Si l'on ramène le potentiel de surface par unité de volume dans chaque section (c'est à dire si on le normalise par la hauteur - dans notre cas, seule la hauteur change dans le dispositif complet = ϕ), il est clair qu'il y a une différence importante entre la nanofente et le microcanal (figure 1.28). Le champ électrique suivant x qui en découle s'exprime par :

$$\phi = \frac{\varphi}{h}$$

$$E_x = -\frac{\phi}{dx}$$

et entraîne un champ électrique à l'interface micro/nano appelé effet Donnan dans le cas de membranes semi-perméables. Ce champ électrique (E_{Donnan}) permet de comprendre l'enrichissement des espèces positives par l'attraction électrostatique (à l'intérieur du nanocanal) et l'exclusion des espèces négatives (dans le microcanal) par l'effet de la barrière électrostatique (figure 1.28).

Cet effet Donnan n'est pas uniquement responsable de l'effet d'enrichissement exclusion dans la nanofente. Lorsque les microcanaux sont remplis avec des solutions de

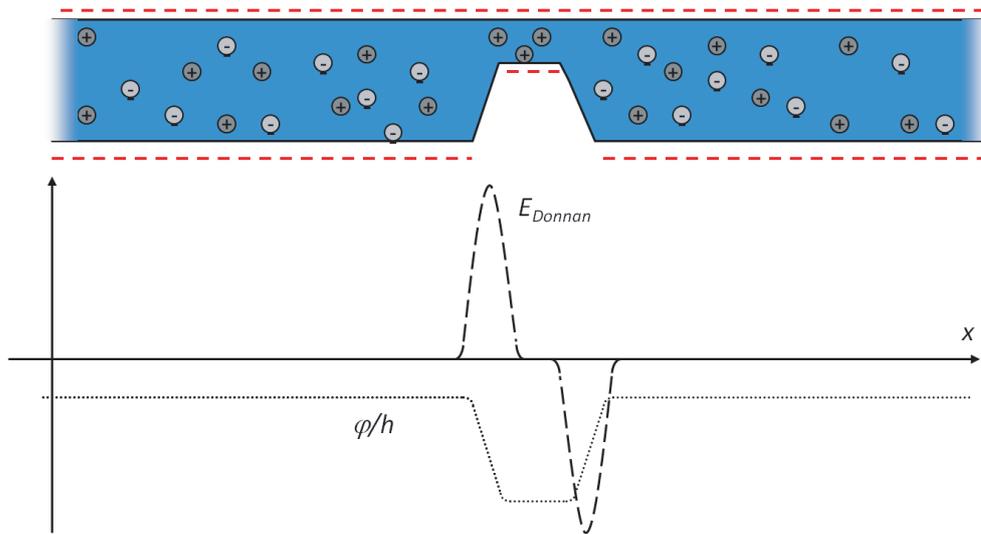


FIGURE 1.28 – Schéma du potentiel normalisé de Donnan dans une structure micro - nano - micro fluidique et du champ électrique associé.

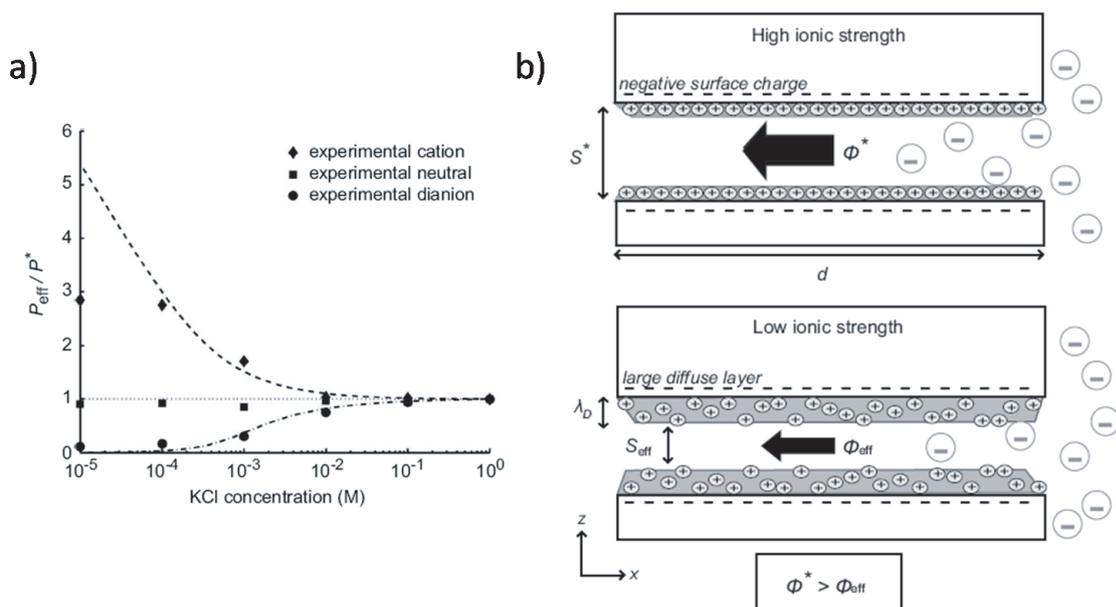


FIGURE 1.29 – a) Schéma principe de l'effet de la double couche : pour les co-ions la section ouverte correspond à la section de la nanofente moins l'EDL. b) Facteur de permittivité (transport diffusif) pour les co-ions, contre ions et espèces neutres, P^* correspondant au transport pour lequel l'EDL est négligeable (transport non sélectif).

concentrations différentes, la diffusion tend à équilibrer celles-ci. Or, puisque les deux EDL en surface ont des épaisseurs qui approchent celle de la hauteur de la nanofente, une barrière électrostatique existe aux interfaces entre les microcanaux et la nanofente qui réduit fortement le transport par diffusion. Cet effet a été mis en évidence par Plecis et al. [53] en 2005, grâce à des expériences de diffusion passive de biomolécules à travers une nanofente. En modulant la taille de l'EDL par la force ionique de la solution (tableau 1.3), Adrien Plecis a démontré expérimentalement que l'effet de répulsion de l'EDL pour les espèces négatives réduit le transport (figure 1.29). Au contraire, l'attraction dans l'EDL des espèces positives entraîne un « sur-transport » des cations. Ces expériences mettent clairement en évidence la perméabilité sélective de ces structures confinées c'est à dire que les contre-ions sont « sur-transportés », alors que les co-ions sont exclus de la nanostructure et sont donc peu ou pas transportés.

1.III.B.2 Mise en mouvement et transport ionique dans un dispositif micro - nano - micro fluidique

En plus de ce transport passif d'espèces ioniques à travers une nanofente, nous avons la possibilité de forcer la solution à s'écouler dans le dispositif. Afin de comprendre comment des modifications de concentration peuvent avoir lieu dans les géométries MNM, il faut s'intéresser aux flux d'ions à travers chaque section (section micrométrique anodique, section nanométrique et section micrométrique cathodique). Travailler avec les flux offre un avantage pour la géométrie considérée : il permet de s'affranchir des différences de hauteur entre les sections, car cela revient à normaliser toutes les vitesses par la hauteur de la section considérée.

L'effet barrière du rétrécissement engendre alors une réponse différente du système suivant la méthode utilisée (Figure 1.30).

Nous avons vu précédemment que la diffusion passive a permis de mettre en évidence la sélectivité du transport à travers une nanofente. Ce cas de diffusion passive est illustré sur la figure 1.30 en haut à gauche. Sur la figure 1.30, 3 autres types de transports actifs sont proposés :

- mise en mouvement par pression (figure 1.30b). Il s'agit de la rétention. Le liquide seul est mis en mouvement et les ions n'ont pas de vitesse propre et sont transportés par le fluide. Ici, le flux convectif (J_{conv}) dû à la pression hydrodynamique et le flux diffusif (J_D) rentrent en jeu.

Suite à ces deux premiers cas, regardons maintenant les deux autres cas qui font intervenir une composante de flux électrophorétique dû à l'application d'un champ électrique externe entre l'anode et la cathode :

- mise en mouvement grâce à un champ électrique (figure 1.30c). Il s'agit des expériences d'électropréconcentration. Le liquide entre en mouvement grâce à l'EOF (Flux Electro Osmotique), les ions également dans le sens imposé par leur charge. Les flux diffusif (J_D), convectif (J_{conv}) dû à la mise en mouvement du liquide par

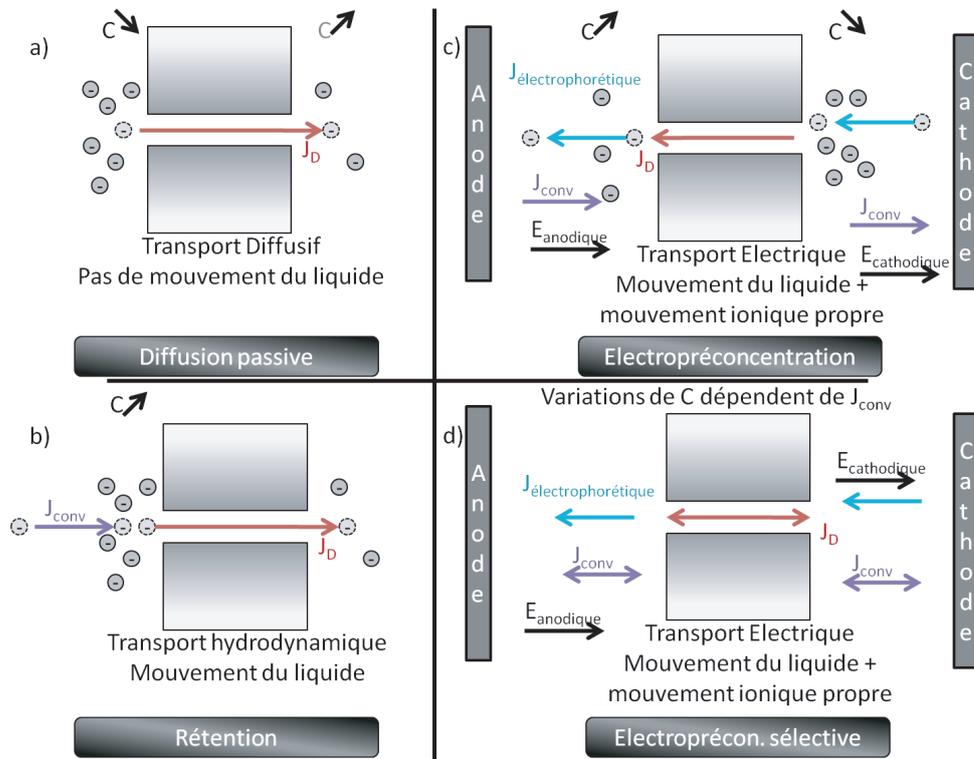


FIGURE 1.30 – Schéma principe du transport ionique dans le cas : a) du transport diffusif à travers la nanofente ; b) de la rétention ; c) de l'électropréconcentration ; d) de l'électropréconcentration sélective.

le champ électrique (flux électroomotique) et électrophorétique ($J_{\text{électrophorétique}}$) sont à prendre en compte.

- mise en mouvement par champ électrique et pression hydrodynamique (figure 1.30d). Ce type d'expérience où l'on couple l'effet d'un champ électrique et d'une pression hydrodynamique est complètement original et n'a jamais été étudié auparavant. Cette nouvelle méthode constitue une part importante de mes travaux de thèse (voir Chapitre 4). C'est le cas le plus complexe car il faut prendre en compte les flux diffusif (J_D), convectif électroosmotique et hydrodynamique (J_{conv}), électrophorétique ($J_{\text{électrophorétique}}$).

La suite de ce chapitre est consacrée aux phénomènes électriques des deux méthodes d'électropréconcentration (figures 1.30 c et d) pour lesquelles la littérature ainsi que les travaux théoriques réalisés dans le cadre de la thèse d'A. Plecis nous fournissent quelques éléments pour la compréhension des phénomènes. Tous ces phénomènes seront repris dans le Chapitre 4 pour l'interprétation des expériences réalisées tout au long de ces trois années.

1.III.B.2.a Mise en mouvement électrique : le flux électroosmotique

Tous les dispositifs ayant servi pour l'électropréconcentration ont pour principe d'imposer un champ électrique à travers un dispositif fluide MNM. Plusieurs paramètres sont alors à prendre à compte : la distribution locale de champ électrique et le coefficient de transport des macromolécules locales qui varient suivant que l'on soit dans un microcanal ou dans la nanofente. Ces différences locales induisent des variations des 2 composantes vitesses : la composante électro-osmotique (vitesse du fluide) et la composante électrophorétique (vitesse propre de l'analyte). Décrivons maintenant de manière détaillée le phénomène induit dans les microcanaux à proximité de la nanofente qui permet la préconcentration : il s'agit de l'effet de polarisation de la concentration qui est due à la perméabilité sélective de la nanofente.

Intéressons nous d'abord à la composante électroosmotique. Dans des canaux (c'est-à-dire dans une géométrie où deux plans chargés se font face), le déséquilibre de charge dans la double couche électrique EDL est utilisé pour mettre en mouvement le fluide. Ce type de mise en mouvement se fait préférentiellement dans des petits canaux. En effet, plus la section est importante plus la conductance est importante et plus le courant nécessaire à cette mise en mouvement est important. Si l'on applique un champ électrique longitudinalement aux plans chargés (suivant x figure 1.31), les espèces ioniques vont se mettre en mouvement. En appliquant le principe fondamental de la dynamique à l'équilibre, seules deux forces s'appliquent dans cette situation sur un volume élémentaire de fluide : la force électrique sur les ions et la force visqueuse avec les volumes élémentaires en contact.

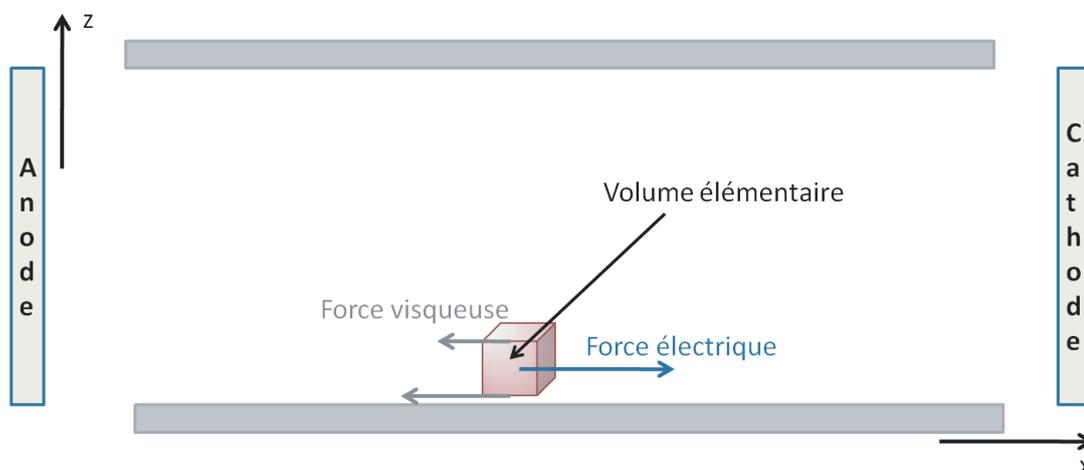


FIGURE 1.31 – Schéma principe de la mise en mouvement du liquide grâce aux déséquilibres de charges dans l'EDL sous l'effet d'un champ électrique longitudinal externe.

$$\sum \vec{Forces} = 0 = \vec{Force}_{\text{electrique}} + \vec{Force}_{\text{visqueuse}} \quad (1.24)$$

$$\vec{Force}_{\text{electrique}} = \rho F E_x \vec{u}_x = \frac{d^2 \varphi(z)}{dz^2} \epsilon_0 \epsilon_r F E_x \vec{u}_x \quad (1.25)$$

$$\vec{Force}_{\text{visqueuse}} = -\eta \frac{d^2 v_x(z)}{dz^2} \rho F E_x \vec{u}_x = -\frac{d^2 \varphi(z)}{dz^2} \epsilon_0 \epsilon_r F E_x \vec{u}_x = -\eta \frac{d^2 v(z)}{dz^2} \vec{u}_x \quad (1.26)$$

avec $v_x(z)$ la vitesse suivant x du volume de fluide élémentaire. En substituant les Eq. (1.21) et (1.22) dans (1.20), nous obtenons une équation différentielle du second ordre :

$$\rho F E_x = \frac{d^2 \varphi(z)}{dz^2} \epsilon_0 \epsilon_r F E_x = \eta \frac{d^2 v(z)}{dz^2} \quad (1.27)$$

qui se résout grâce aux conditions de non glissement aux parois :

$$v_x(z) = -\epsilon_0 \epsilon_r \frac{\zeta - \varphi(z)}{\eta} E_x \quad (1.28)$$

Il est intéressant de noter que la contribution de $\varphi(z)$ est nulle hors de l'EDL. Dans le cas de microcanaux, la distance entre les parois est très grande devant l'EDL (cf. tableau 3), elle donc est souvent négligée. Cette approximation donne l'expression de la vitesse dans un microcanal et est appelée la relation d'Helmholtz - Schmoluchowski :

$$v_{EOF} = -\epsilon_0 \epsilon_r \frac{\zeta}{\eta} E_x \quad (1.29)$$

où v_{EOF} est la vitesse électroosmotique engendrée par le champ électrique parallèle aux parois.

1.III.B.2.b Le flux électroosmotique et la géométrie MNM

Les débits obtenus par flux électroosmotique dans les microcanaux sont différents de celui dans la nanofente. Pour mettre ceci en évidence, repartons de l'Eq. (1.28) de la vitesse EOF en fonction de la distance aux parois :

$$v_{EOF}(z) = -\epsilon_0 \epsilon_r \frac{\zeta - \varphi(z)}{\eta} E_x$$

En considérant qu'il n'y a pas recouvrement des EDL, ζ est identique dans les microcanaux et la nanofente. Il faut intégrer ces vitesses dans chaque section pour obtenir le débit :

$$Q_{nano} = \int_{z=-h_{nano}/2}^{h_{nano}/2} v_{EOF}(z) \quad (1.30)$$

$$Q_{\mu} = \int_{z=-h_{\mu}/2}^{h_{\mu}/2} v_{EOF}(z) = \underbrace{\int_{z=-h_{nano}/2}^{h_{nano}/2} v_{EOF}(z)}_{Q_{nano}} + \int_{z=-h_{\mu}/2}^{-h_{nano}/2} v_{EOF}(z) + \int_{z=h_{nano}/2}^{h_{\mu}/2} v_{EOF}(z) \quad (1.31)$$

De cette différence de débit dans les microcanaux, il résulte des pressions hydrodynamiques internes aux interfaces entre les microcanaux et la nanofente. Cette surpression à l'interface entraîne un écoulement du type Poiseuille (parabolique) qui se distribue à l'interface en fonction de la résistance hydrodynamique de chaque section ($R_{hydro,\mu}$ et $R_{hydro,nano}$). Dans le cas de structure MNM, ces écoulements dûs à la surpression sont communément appelé flux Contre-Poiseuille. Par analogie électrique ($Q \Leftrightarrow I$) avec la loi des noeuds dans un circuit en série (figure 1.32), il est possible de calculer la valeur de ces écoulements. Nous obtenons :

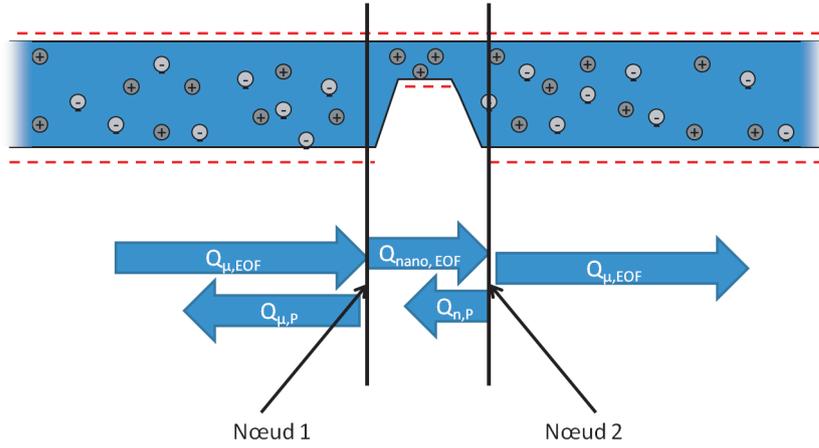


FIGURE 1.32 – Schéma électrique équivalent à notre système.

$$Q_{\mu,P} = \underbrace{Q_{nano}}_{Q_{entrant}} - \underbrace{Q_{\mu}}_{Q_{sortant}} = - \left(\int_{z=-h_{\mu}/2}^{-h_{nano}/2} v_{EOF}(z) + \int_{z=h_{nano}/2}^{h_{\mu}/2} v_{EOF}(z) \right) \times \frac{R_{hydro,nano}}{R_{hydro,nano} + R_{hydro,\mu}} \quad (1.32)$$

$$Q_{n,P} = \underbrace{Q_{\mu}}_{Q_{entrant}} - \underbrace{Q_{nano}}_{Q_{sortant}} = \left(\int_{z=-h_{\mu}/2}^{-h_{nano}/2} v_{EOF}(z) + \int_{z=h_{nano}/2}^{h_{\mu}/2} v_{EOF}(z) \right) \times \frac{R_{hydro,\mu}}{R_{hydro,nano} + R_{hydro,\mu}} \quad (1.33)$$

Dans une structure MNM, l'expression de la vitesse d'une molécule chargée sous l'effet d'un champ électrique externe est donc composée de la vitesse EOF, du flux Contre-Poiseuille et de la vitesse électrophorétique. La figure 1.33 permet de visualiser chacune des composantes de la vitesse du fluide.

$$v_{\text{molécule}} = \underbrace{v_{\text{EOF}} + v_{\text{Contre-Poiseuille}}}_{v_{\text{liquide}}} + v_{\text{électrophorétique}} \quad (1.34)$$

FIGURE 1.33 – Schéma explicatif de l’effet de variation de section dans une géométrie MNM sur le vitesse du liquide engendrée par un champ électrique externe.

1.III.B.2.c L’effet de polarisation en concentration

Essayons d’expliquer de façon simplifiée l’électropréconcentration. Prenons l’exemple modélisé en figure 1.34 en faisant l’hypothèse que notre courant se réduit à 4 charges. Voici le comportement que nous pouvons décrire :

- Les espèces positives sont attirées dans le liquide vers la cathode, passent le nanocanal. Une partie d’entre elles sont stoppées à l’interface cathodique micro - nano pour préserver l’électroneutralité à cet endroit. Dans notre exemple (figure 1.34), nous faisons l’hypothèse que deux charges positives passent de section en section.
- Les espèces négatives sont attirées dans le liquide vers l’anode et ne peuvent pas passer le nanocanal. Elles restent donc bloquées à l’interface micro - nano du côté cathodique. Dans notre exemple (figure 1.34), nous faisons l’hypothèse qu’une charge négative ne peut pas être transportée de la section 4 (S4) vers la section 3 (S3).
- Le transport électrique entre microcanal et nanocanal reste constant car le « sur-transport » positif équilibre le « non-transport » négatif. Une charge positive supplémentaire passe de S2 vers S3 et de S3 vers S4 (figure 1.34). Cet excès de transport permet de plus de conserver l’électroneutralité en S4 (1 charge négative

reste bloquée et est compensée par une positive supplémentaire provenant de S2 et S3).

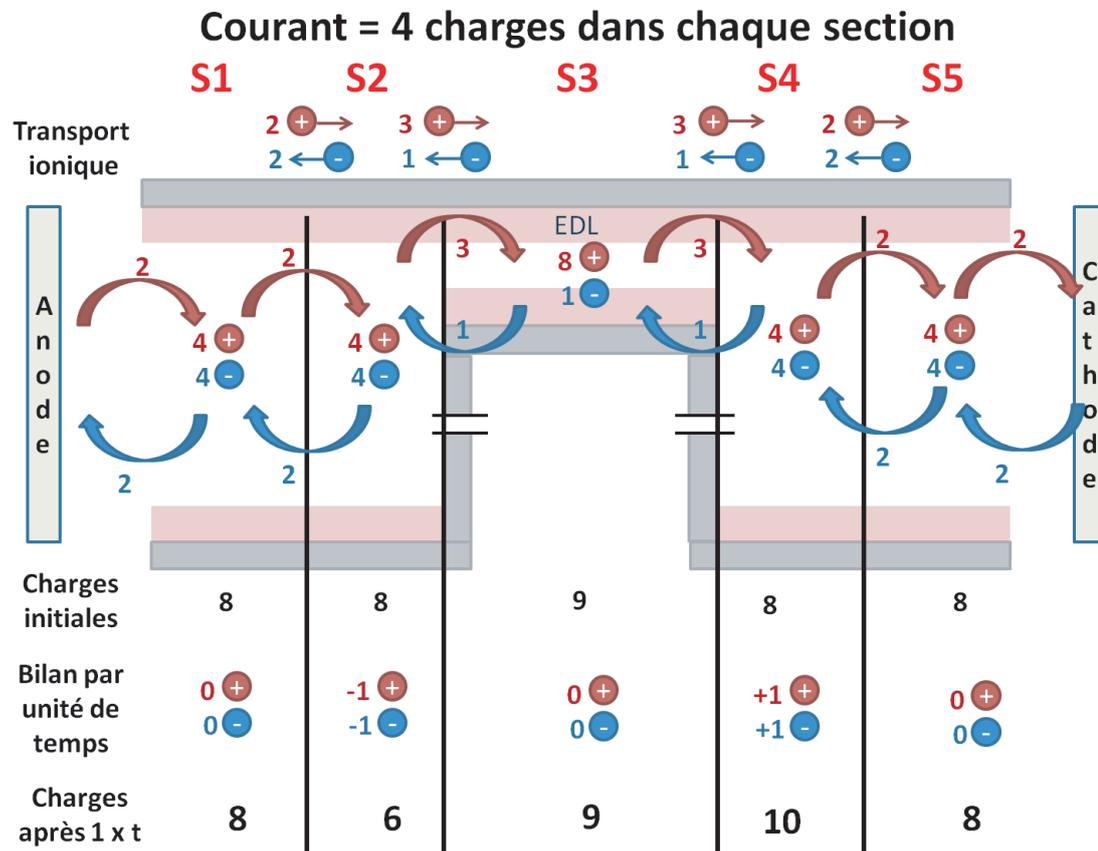


FIGURE 1.34 – Schéma principe du transport ionique à travers le nanocanal assisté par un champ électrique externe.

Si l'on s'intéresse au bilan par unité de temps de transport ionique entre les sections, il apparaît un déséquilibre de chaque côté de la nanofente. Dans notre exemple de la figure 1.34,

- La S2 donne deux anions et reçoit deux cations de S1 alors qu'elle reçoit un anion et donne trois cations à S3. Cette section perd donc deux ions par unité de temps.
- La S4 donne un anions et reçoit trois cations de S3 alors qu'elle reçoit deux anions et donne deux cations à S5. Cette section gagne donc deux ions par unité de temps.

L'évolution temporelle de l'enrichissement en S4 (soit microcanal cathodique) et de la déplétion en S2 (soit microcanal anodique) entraîne un front de concentration qui se propage en fonction du temps de chaque côté de la nanofente (figure 1.35).

Avec ce modèle simplifié, il est possible de comprendre l'effet de polarisation de concentration de chaque côté du nanocanal : enrichissement cathodique et déplétion

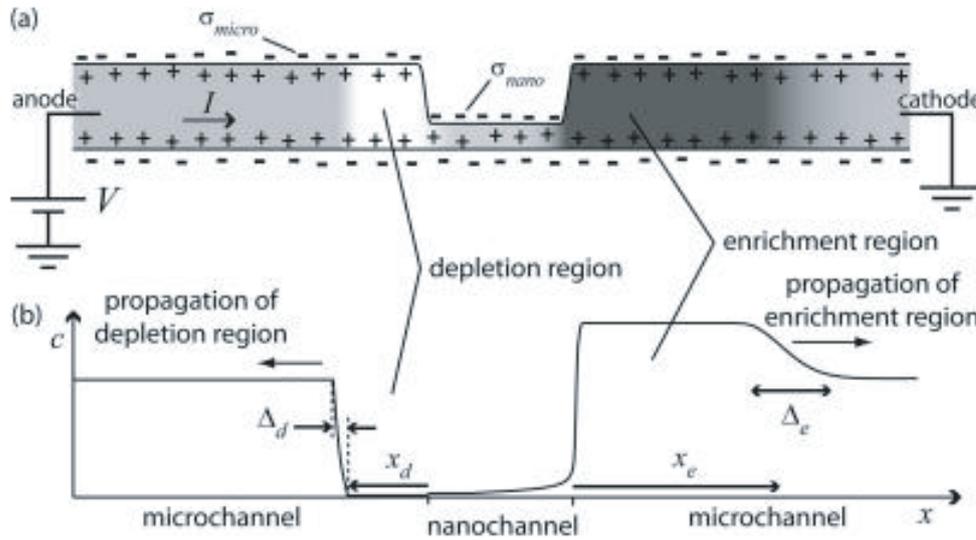


FIGURE 1.35 – Schéma principe de l'évolution des fronts déplétés et enrichis de chaque côté de la nanofente [38].

anodique. L'électropréconcentration est, dans ce cas, cathodique quel que soit l'analyte, ce qui ne correspond pas bien sûr à toutes les observations expérimentales.

La théorie de ce phénomène est en fait bien plus complexe, car il faut intégrer la vitesse du liquide dans chaque section (vitesse électroosmotique différente dans les sections, effet Venturi aux interfaces micro - nano). L'effet Venturi, du nom du physicien italien Giovanni Battista Venturi, est le nom donné à un phénomène de la dynamique des fluides où les particules gazeuses ou liquides se retrouvent accélérées à cause d'un rétrécissement de leur zone de circulation.

Les distributions locales du champ électrique (conduction plus faible dans le nanocanal, différence de conduction suivant les concentrations dans les microcanaux dû à l'enrichissement - déplétion) entraînent des champs électriques locaux qui évoluent au cours du temps. La figure 1.36 illustre de manière très schématique l'évolution temporelle de la polarisation en concentration.

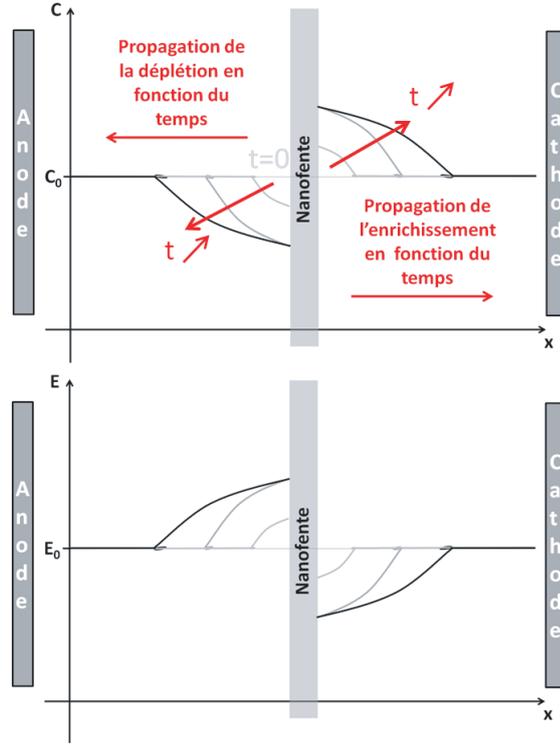


FIGURE 1.36 – Evolution en fonction du temps des zones de déplétion et d'enrichissement.

Mani et al. [37] ont simulé ce phénomène grâce à l'équation de Navier Stokes appliqué à un fluide incompressible. Les différences de débits entre les microcanaux et la nanofente (plus faible pour la nanofente de section plus petite) sont responsables du flux de Contre-Poiseuille dans les microcanaux ce qui réduit le débit. Des pressions hydrodynamiques locales se créent aux interfaces micro - nano. Dans leur simulation, le champ électrique est calculé localement en fonction de la concentration locale telle que :

$$E_{tot} = E_{micro,ano} + E_{nano} + E_{micro,cat} \quad (1.35)$$

$$E_{micro,ano} = E_{tot} \frac{R_{micro,ano}}{R_{tot}} \quad (1.36)$$

$$E_{nano} = E_{tot} \frac{R_{nano}}{R_{tot}} \quad (1.37)$$

$$E_{micro,cat} = E_{tot} \frac{R_{micro,cat}}{R_{tot}} \quad (1.38)$$

Avec E_{tot} le champ électrique imposé dans le dispositif, $E_{micro,ano}$ le champ électrique dans le microcanal anodique, E_{nano} le champ électrique dans la nanofente et $E_{micro,cat}$ le champ électrique dans le microcanal cathodique. Pour une solution ionique, la résistance est donnée par :

$$R = \frac{l}{\sigma S} \quad (1.39)$$

avec l la longueur de la section considérée, σ la conductivité de la solution et S la section.

$$\sigma = \sum_i \lambda_i C_i \quad (1.40)$$

où λ_i est la conductivité molaire de l'espèce ionique i , C_i la concentration de l'espèce i .

Dans les dispositifs d'électropréconcentration, les concentrations sont différentes dans chacune des sections, les champs électriques le sont donc également, et la vitesse du fluide est plus importante dans le nanocanal. En prenant en compte chacun de ces paramètres, Mani et al. ont montré qu'il était possible de calculer l'effet de polarisation. Les diagrammes de la figure 1.37 représentent la concentration en fonction de la position par rapport à la nanofente (abscisse) et du temps (ordonnée). Cette concentration est noire lorsqu'elle est au plus faible et varie jusqu'au blanc lorsqu'elle atteint ses plus fortes valeurs. Les deux premières colonnes représentent les expériences (numériques et expérimentales) pour une solution d'1 mM d'Alexa Fluor (petite molécule ayant une mobilité électrophorétique proche de la Fluorescéine) pour une nanofente de 50 nm de hauteur. La concentration augmente linéairement en fonction du temps dans le microcanal cathodique et diminue linéairement en fonction du temps dans le microcanal anodique. Ceci est conforme à la littérature pour une molécule rapide. Entre la première et deuxième colonne, le courant (et donc la tension appliquée) est augmenté, passant de 200 pA à 800 pA. La cinétique d'enrichissement / déplétion est accrue ce qui est toujours conforme aux précédentes observations de la littérature.

Enfin, la dernière colonne représente les expériences numérique et expérimentale pour une nanofente plus grande (100 nm) et pour une force ionique plus importante (10 mM de Fluorescéine). Dans ce cas, il n'y a pas de réponse du système. En effet, l'augmentation de la force ionique entraîne une diminution la taille de l'EDL est diminuée alors que la hauteur de la nanofente a été augmentée. La sélectivité du transport ionique n'est alors plus suffisamment importante pour permettre une électropréconcentration.

Ces travaux de Mani et al. [37] ont permis de modéliser l'effet de polarisation de concentration et permettent d'expliquer la préconcentration du côté cathodique. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, certaines expériences ont aussi permis d'observer une électropréconcentration dans le microcanal du réservoir anodique. Ces expériences n'étant pas expliquées par ces simulations, je vais maintenant décrire le modèle théorique mis en place par A. Plecis et qui m'a servi de support tout au long de mon travail de thèse.

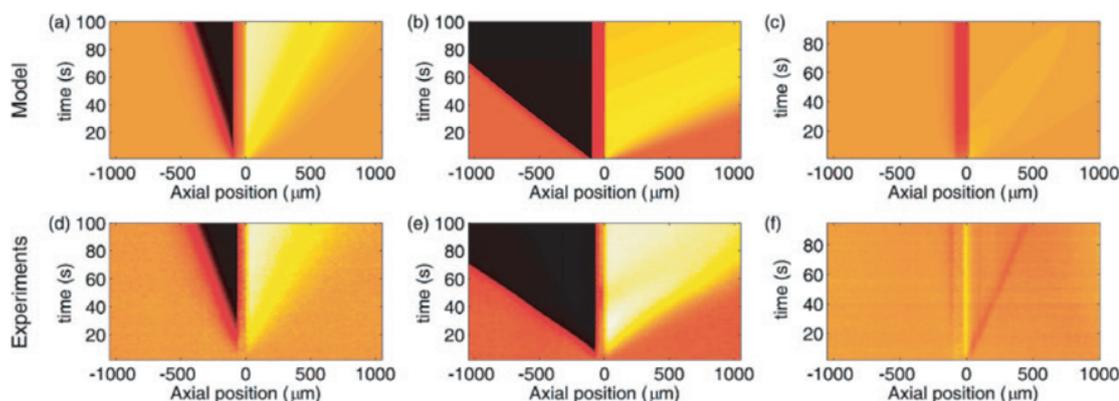


FIGURE 1.37 – a) 200 pA, 1 mM d'Alexa Fluor 488, 50 nm de haut pour la nanofente et $\sigma_{\text{nano}}=0.25 \sigma \text{ micro}$ (b) 800 pA, 1 mM d'Alexa Fluor 488, 50 nm de haut pour la nanofente.(c) 800 pA, 10 mM Fluorescein, 100 nm de haut pour la nanofente et $\sigma_{\text{nano}}=\sigma \text{ micro}$. (d) 200 pA, 1 mM d'Alexa Fluor 488, 50 nm de haut pour la nanofente, (e) 800 pA, 1 mM d'Alexa Fluor 488, 50 nm de haut pour la nanofente.(f) 800 pA, 10 mM Fluorescein et 100 nm de haut pour la nanofente

1.III.B.2.d Les régimes de préconcentration

Au début de ma thèse, Adrien Plecis, partant de l'observation que la localisation pouvait être différente suivant les biomolécules, a cherché à comprendre quel phénomène pouvait expliquer cette différence. Une relecture attentive du tableau 1.2 (page 41) permet de remarquer que les taux d'électro-préconcentration observés du côté anodique conduisent à des taux de préconcentration très élevés, de l'ordre de 10^6 en quelques minutes.

Pour comprendre comment les molécules se focalisent en un point d'un système MNM, il faut comprendre pourquoi ces molécules se focalisent en un point. Le point de focalisation des molécules correspond au point où le flux est nul. L'Eq. (1.34) donne les composantes de la vitesse (et donc du flux $= v/h$) d'une molécule. Nous avons déjà discuté du flux électroosmotique, du flux de Contre-Poiseuille, il nous reste à traiter du cas du flux électrophorétique correspondant à la mobilité propre de la biomolécule.

En combinant l'effet Donnan au phénomène d'enrichissement/déplétion, nous obtenons un champ électrique qui varie localement. La zone de forte concentration est moins résistive et le champ diminue. Inversement le champ augmente dans la zone déplétée. Ce champ externe génère un flux de molécules grâce aux forces électrostatiques (figure 1.38).

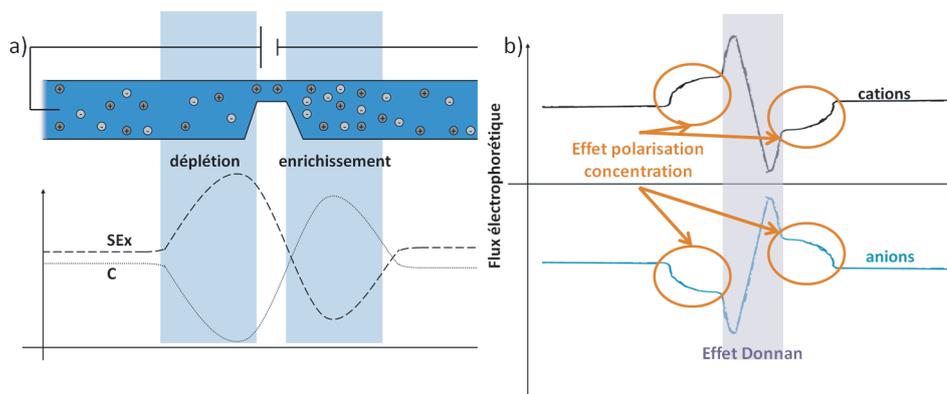


FIGURE 1.38 – a) Schéma de l'allure du champ électrique local dû à l'effet de polarisation ; b) Allure des flux électrophorétiques pour les espèces positives et négatives.

D'après l'équation (1.34), pour que l'on puisse obtenir un flux nul, il faut que la molécule soit un anion pour que le flux électrophorétique soit opposé à la vitesse du liquide. Le flux de liquide, pour satisfaire la non compressibilité du fluide, correspond à un flux positif constant (qui dépend de la composante électroosmotique et du Contre-poiseuille). Cette compétition entre flux de la molécule (négatif) et flux du liquide (positif) permet d'obtenir 4 situations (2 pour lesquelles la contribution de Donnan stoppe la molécule, 2 pour lesquelles c'est l'effet d'enrichissement / déplétion qui la bloque) pour lesquelles il existe deux points de flux local nul (figure 1.39a). Or dans la littérature, il a toujours été rapporté un seul et unique point de focalisation pour une espèce dans une géométrie donnée. Un de ces deux points de flux local nul ne conduit donc pas à un point de focalisation.

Un seul de ces points correspond à un point de focalisation stable : celui pour lequel il y a convergence des flux (point A figure 1.39b). En amont de ce point, le flux d'analyte est positif et amène l'anion vers le point de flux nul. Si ce point est dépassé (en aval) le flux devient négatif et ramène alors l'anion vers le point de flux nul. Les anions sont amenés vers ce point de flux nul stable (si l'anion diffuse de ce point de flux nul, l'anion est ramené vers ce point. C'est l'inverse pour le point de front instable (point B figure 1.39b) : en amont, le flux est négatif et éloigne l'analyte. En aval, le flux est positif et entraîne l'anion vers le réservoir cathodique.

On obtient donc 4 régimes de préconcentration différents qui permettent d'expliquer correctement les résultats expérimentaux de la littérature. Deux régimes correspondent à une préconcentration dans le microcanal anodique et les deux autres à une préconcentration dans le microcanal cathodique. Des simulations 1D ont donc été menées par A. Plecis, en supposant fixes les résistances hydrodynamiques et les charges volumiques. Ces simulations ont permis de restituer les propriétés de transport fluidiques et électriques des structures MNM 2D, et ainsi de retrouver théoriquement les 4 régimes que nous venons de décrire [39]. La compétition entre le flux du liquide et le flux électrophorétique régissant la localisation du point de focalisation, les régimes sont

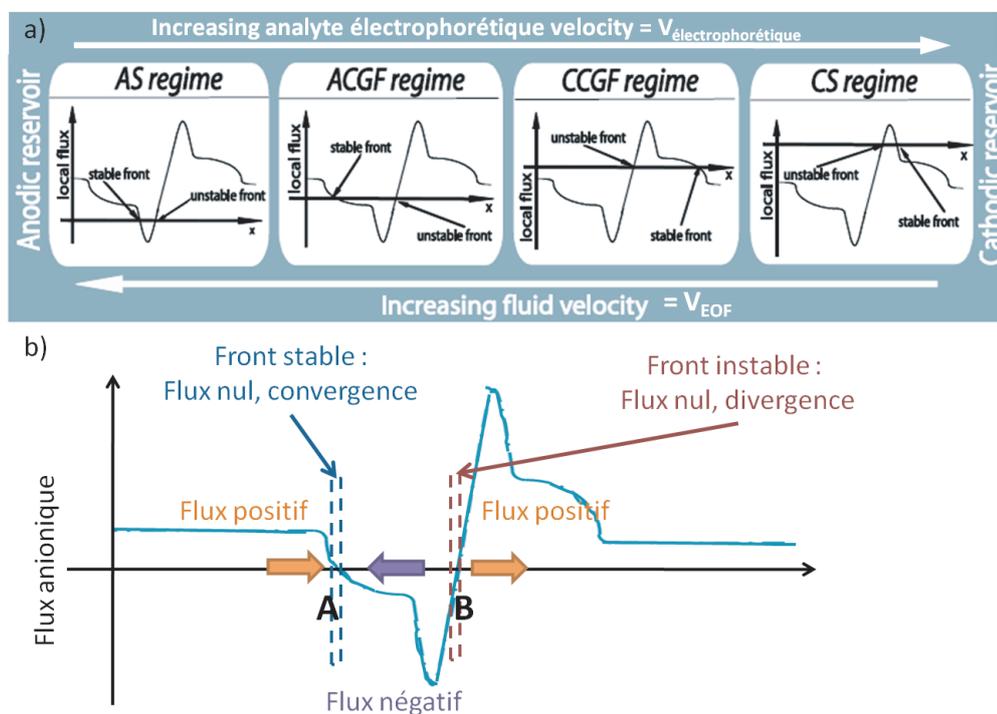


FIGURE 1.39 – a) Schéma de principe des 4 régimes d'électropréconcentration : de gauche à droite le flux électrophorétique devient de plus en plus prépondérante. b) Schéma du flux pour un anion, le point stable et donc de préconcentration correspond au point où le flux converge.

décrits dans la partie qui suit par ordre croissant de $v_{\text{liquide}}/v_{\text{electro}}$ (c'est à dire de gauche à droite dans la figure 1.39 a) :

- **Un régime anodique d'accumulation, ou « Stacking Anodique (AS) »** en anglais. L'espèce négative possède dans ce cas une composante électrophorétique très faible par rapport à la vitesse électro-osmotique du liquide. Les espèces négatives sont emportées par le liquide jusqu'à la nanofente, où l'effet barrière les stoppe. La préconcentration s'effectue donc directement à l'entrée de la nanofente (figure 1.40). Ce cas est très proche du phénomène de rétention (correspondant à une vitesse électrophorétique nulle). Les simulations effectuées par Adrien Plecis décrivent une préconcentration saturante. Cette saturation a été attribué aux « fuites » de molécules à travers la nanofente par diffusion. La théorie de cette saturation sera reprise dans le modèle de la rétention, décrite au Chapitre 4.

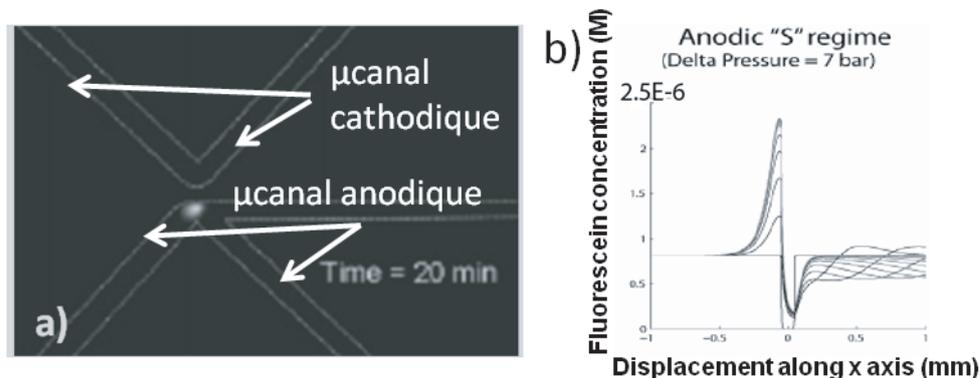


FIGURE 1.40 – a) Régime expérimental de Stacking Anodique obtenu pour de la BSA [42] : le point de focalisation est collé à la nanofente. b) Simulations du profil de préconcentration de la Fluorescéine pour des conditions où la vitesse du liquide entraîne un AS [39].

- **Un régime anodique de focalisation, ou « Counter Gradient Focusing Anodique (ACGF) ».** L'espèce négative possède ici une composante électrophorétique faible par rapport à la vitesse du liquide loin de la nanofente et est emportée du réservoir anodique vers la cathode. Au voisinage de la nanofente dans le microcanal anodique, l'effet de polarisation augmente le champ électrique. La composante électrophorétique de l'analyte augmente ce qui a pour effet de stopper l'analyte en un point précis du canal anodique. Ce point focal qui correspond à une vitesse nulle ($VEOF = -VE$) se situe en amont loin de l'entrée de la nanofente (figure 1.41). Les simulations effectuées par Adrien Plecis décrivent une préconcentration qui augmente linéairement avec le temps.

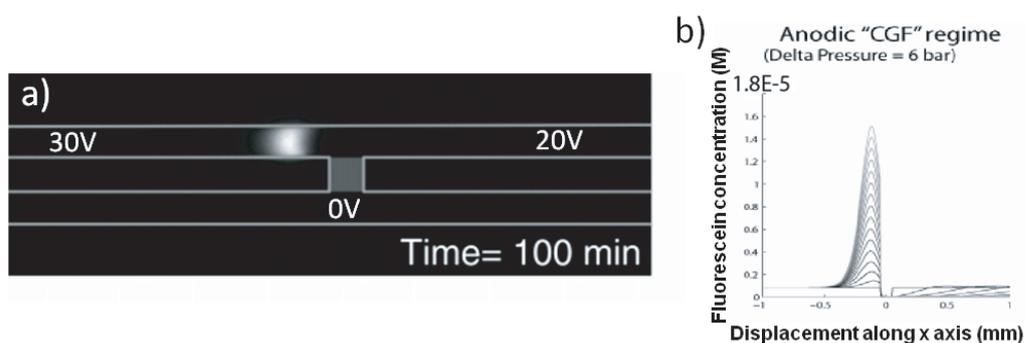


FIGURE 1.41 – a) Régime expérimental d'ACGF obtenu par Wang et al. [9] : le point de focalisation est dans le microcanal anodique à quelques microns de la nanofente. b) Simulations du profil de préconcentration de la Fluorescéine pour des conditions où la vitesse du liquide entraîne un ACGF [39].

De très fortes concentrations sont donc envisageables avec ce régime ce qui est conforme à la littérature et notamment aux résultats de Wang et al. [9] qui ont obtenus des taux de préconcentration de plus d'un million.

- **Un régime cathodique de focalisation, ou « Counter Gradient Focusing Cathodique (CCGF) ».** L'espèce négative possède une composante électrophorétique forte par rapport à la vitesse électro-osmotique du liquide loin de la nanofente. La biomolécule est emportée du réservoir cathodique vers l'anode. Au voisinage de la nanofente dans le microcanal cathodique, l'effet de polarisation réduit le champ électrique qui diminue la contribution électrophorétique de l'analyte. Celui-ci se stoppe lorsque les deux vitesses se compensent (figure 1.42). Contrairement au régime ACGF qui se focalise également loin de la nanofente, les simulations d'A. Plecis prédisent ici une saturation aux temps longs. Celle-ci ne peut pas être attribuée à de la diffusion à travers la nanofente. Cette saturation s'explique par la diminution du champ électrique au cours du temps dû à l'enrichissement en concentration dans cette région.

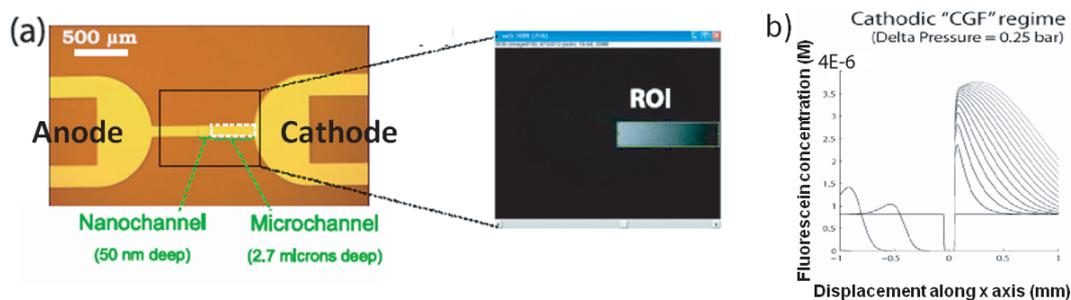


FIGURE 1.42 – a) Régime expérimental de CCGF obtenu par A. Plecis [46] : le point de focalisation est dans le microcanal cathodique à quelques microns de la nanofente. b) Simulations du profil de préconcentration de la fluorescéine pour des conditions où la vitesse du liquide entraîne un CCGF [39].

- **Un régime cathodique d'accumulation, ou « Stacking Cathodique (CS) ».** L'espèce négative possède une composante électrophorétique très forte par rapport à la vitesse du liquide. Ces espèces sont emportées par le liquide, du réservoir cathodique vers l'anode, jusqu'à la nanofente où l'effet barrière les stoppe (figure 1.43). Comme pour le régime d'AS discuté précédemment, les simulations faites prédisent une saturation de la concentration en fonction du temps. Ce résultat n'est pas étonnant car le CS étant collé à la nanofente, les molécules diffusent également à travers la nanofente.

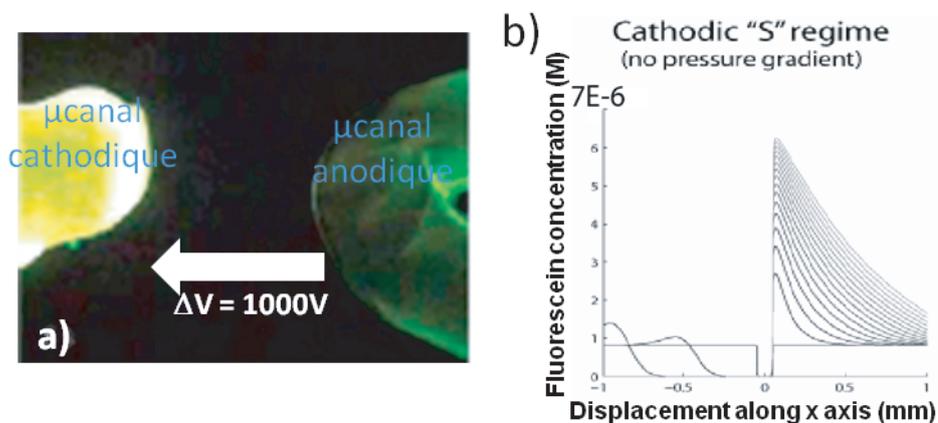


FIGURE 1.43 – a) Régime de CS obtenu par Pu et al. [40] : le point de focalisation est dans le microcanal cathodique collée à la nanofente. b) Simulations du profil de préconcentration de la Fluorescéine pour des conditions où la vitesse du liquide entraîne un CS [39].

Chacun de ces régimes découle donc de la compétition entre le composante du flux électrophorétique (négative et variable dans le dispositif MNM) de la molécule et de la composante du flux de liquide (positive et constante dans le dispositif MNM). Il devient possible de comprendre l'importance de la géométrie (modifiant la vitesse du liquide notamment) et de l'analyte (mobilité électrophorétique différente suivant la nature).

Il ressort de cette étude théorique que le ratio « vitesse du liquide / vitesse de l'analyte » est à l'origine de la localisation de l'électropréconcentration :

- Les espèces à forte mobilité électrophorétique négative (comme la fluorescéine) qui se dirigent vers l'anode et sont « stoppées » par l'effet de la nanofente dans le réservoir cathodique. Ces espèces se préconcentrent donc dans le microcanal cathodique suivant l'un des 2 régimes CCGF et CS.
- Les espèces à faible mobilité électrophorétique négative ont tendance à suivre le liquide et se retrouvent « stoppées » par l'effet de la nanofente. Ces espèces se préconcentrent donc dans le microcanal anodique suivant l'un des 2 régimes ACGF et AS.

Nous venons de voir que les quatre régimes de préconcentration sont possibles en fonction du ratio vitesse liquide / vitesse électrophorétique. Le tableau (1.2) page 40, nous a permis de constater qu'à ce jour les très fortes préconcentrations capables de rivaliser avec la méthode d'ITP avaient été obtenues grâce à des électropréconcentrations anodiques, principalement pour le régime ACGF. Ceci s'explique physiquement par le fait que :

- les régimes de stacking sont limités par la diffusion à travers la nanofente. Ils sont saturants et ne sont pas privilégiés pour préconcentrer des traces dans un échantillon.
- les régimes de CGF sont meilleurs car la diffusion à travers la nanofente est supprimée. Cependant, dans les simulations, les deux régimes de gradient focusing ne sont pas équivalents : le CCGF correspond à un CGF présentant une saturation.

Puisque le ratio déterminant est le rapport vitesse fluide / vitesse analyte, il apparait donc important de pouvoir moduler ce ratio pour se placer dans les conditions de focalisation par contre gradient (Counter Gradient Focusing).

Dans la littérature, le rapport vitesse fluide / vitesse analyte est fixé par la molécule considérée et la géométrie (le potentiel appliqué par les électrodes modulant linéairement la vitesse EOF et la vitesse électrophorétique). L'objectif de cette thèse sera donc d'être capable de dissocier la vitesse du fluide de celle du champ électrique externe :

$$v_{\vec{molécule}} = v_{\vec{liquide}} + v_{EOF} + v_{\text{Contre-Poiseuille}} + v_{\vec{electrophoretique}} \quad (1.41)$$

Ainsi, il est possible de moduler la vitesse du fluide sans modifier le champ électrique. La vitesse du fluide devient ainsi indépendante de la vitesse électrophorétique.

Cependant, les observations de fortes préconcentrations ont été peu nombreuses et basées sur des géométries et molécules très différentes. Ces perspectives, réalisées par Adrien Plecis, mon encadrant de début de thèse, ont cependant permis de fixer les objectifs de mon travail de thèse.

1.IV Les enjeux de ce travail de recherche

1.IV.A Un grand nombre de paramètres, peu de contrôle

Nous avons décrit en début de chapitre l'importance du biomédical pour les prochaines années. Les enjeux sociétaux en France et à l'international justifient que des recherches soient effectuées aujourd'hui dans les laboratoires français afin de garder une place privilégiée sur le marché. Dans cette thématique, la microfluidique est une des avancées majeures qui permet de grands bonds technologiques. Les laboratoires sur puces sont amenés à prendre de plus en plus de place et à rentrer dans notre vie quotidienne que ce soit pour le diagnostic, la thérapie où la fabrication de médicament. Dans le diagnostic plus précisément, la phase de préparation de l'échantillon avant sa quantification contient une étape primordiale : la préconcentration. L'amélioration de cette phase doit permettre de détecter et diagnostiquer de plus en plus précocement les pathologies pour permettre une prise en charge toujours meilleure des patients.

Ce travail de thèse s'intéresse à cette problématique de préconcentration. Il se focalise sur une méthode jeune, puisque découverte il y a moins de dix ans, mais très prometteuse. Sa jeunesse explique son manque de compréhension complète. De nombreux paramètres impliqués doivent être contrôlés, parmi lesquels le potentiel de surface, la géométrie, le champ électrique externe, la nature du fluide (viscosité, concentration en ions, vitesse), la mobilité électroosmotique, la mobilité électrophorétique... Malheureusement, l'expérimentateur ne peut piloter que quelques uns de ces paramètres : le champ électrique externe et la géométrie du dispositif qu'il fabrique. L'enjeu de ma thèse a donc été double : cartographier de façon systématique le rôle de ces deux paramètres dans l'efficacité de la préconcentration, mais également aller plus loin dans le contrôle en étant capable de moduler la vitesse du fluide autrement que par la vitesse électroosmotique. Cette dernière étape permettra expérimentalement de travailler sur l'efficacité et la localisation de l'électropréconcentration.

1.IV.B Conditions expérimentales et défi de mise en oeuvre

Nous avons fait le choix de moduler par pression hydrodynamique la vitesse du fluide. Des contraintes mécaniques supplémentaires ont du être prises en compte pour la technologie de fabrication des puces fluidiques. Les dispositifs devant supporter de forts champs électriques et de fortes pressions. Ces développements technologiques feront l'objet du Chapitre 2 de cette thèse. Il m'aura fallu un an et demi auront pour mener à bien cette étape clé de la fabrication de la puce.

Les modifications de géométrie de la puce, et du banc expérimental seront décrites dans le Chapitre 3.

Enfin, les expériences de préconcentration feront l'objet du Chapitre 4. Une étude avec une mise en mouvement par pression seule fera l'objet de la première partie afin de vérifier qu'il n'y a pas de perturbations engendrées par une mise en mouvement hydrodynamique. Une étude systématique d'électropréconcentration simple avec la fluorescéine sera étudiée ensuite afin de déterminer expérimentalement la dépendance en fonction de

la tension appliquée et de la taille de la nanofente. Enfin, des expériences originales avec pression et champ électrique permettront de confirmer ou non les expériences numériques menées au début de la thèse. Leur intérêt pour les applications et l'intégration dans des laboratoires sur puce sera discuté.

*Un expert est une personne qui a commis toutes les erreurs possibles dans un domaine
très restreint*
- Niels BOHR -

*Si vous ne commettez pas d'erreur, c'est que vous ne travaillez pas assez dur sur les
problèmes. Et ça, c'est une grande erreur*
- Franz WILCZEK -

Chapitre 2

Les microtechnologies appliquées à la nanofluidique

Bien plus qu'une présentation des procédés de microfabrication, ce chapitre relate une part importante du travail que j'ai effectué au cours de ces trois années. L'obtention d'une puce nanofluidique correctement scellée et pouvant supporter des champs électrophorétiques forts couplés à de hautes pressions de liquide n'est pas simple. C'est cet objectif qui a motivé le travail technologique que je rapporte dans ce chapitre.

A mon arrivée au LPN, il y a trois ans, nous disposions d'un procédé de collage anodique très similaire à celui qui avait été breveté par Monsieur P. Renaud de l'EPFL [54]. Au cours de ma première année de thèse, ce procédé de collage anodique a rapidement montré ses limites, principalement parce que les puces ne résistaient pas longtemps aux champs électriques forts appliqués dans un milieu aqueux (problème important d'électrochimie). J'ai tout d'abord tenté d'optimiser ce procédé pendant une période de 6 mois, avant de l'abandonner pour me tourner vers une nouvelle méthode de scellement à basse température, qui permet d'obtenir des puces « tout verre » aux propriétés remarquables. Ces puces en verre, sont en effet, complètement isolantes et inertes chimiquement. Pour des raisons de confidentialité, je ne pourrai pas décrire ce nouveau procédé de manière très détaillée puisqu'un brevet a été déposé, mais je présenterai les caractéristiques des puces finales (Chapitre 3), qui seront utilisées pour les études d'électropréconcentration (Chapitre 4).

En parallèle de ce dépôt de brevet par le CNRS [55], je vais poursuivre, après mon doctorat, une démarche de valorisation de ce procédé innovant. En effet, j'ai récemment obtenu un financement de CDD, une formation à Centrale Paris (Région Ile-de-France, CNano IdF) et un soutien du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche / OSEO (Concours National d'Aide à la Création d'Entreprises de Technologies Innovantes 2010 catégorie Emergence) en tant que jeune créateur d'entreprise. Le LPN et le groupe NANOFU continueront à me soutenir dans ce projet de valorisation, puisque la société en émergence sera accueillie au laboratoire avec un soutien fort notamment pour la R&D.

2.I Les procédés de fabrication en nanofluidique : état de l'art

Une grande partie des procédés de fabrication utilisés en micro et nanofluidique ont été mis au point pour la microélectronique. En effet, cette industrie, qui est devenue depuis 1960 la première industrie au monde devant l'automobile, n'a pas cessé de faire des progrès considérables en structuration grâce aux progrès des techniques lithographiques et à la gravure plasma. La microfluidique, qui est une science bien plus jeune, s'est développée dès les années 1980 en s'appuyant sur ces méthodes de structuration. Pendant ma thèse, les techniques usuelles comme la lithographie optique et la gravure par plasma réactif ont été fréquemment utilisées dans la centrale technologique du LPN. Par souci de concision et de clarté du mémoire, leur présentation a été mise en Annexe du mémoire.

En microfluidique, les puces les plus simples sont en général constituées d'un capot en Polydimethylsiloxane (PDMS) collé sur le circuit fluidique, qui peut être en silicium recouvert de silice ou de verre. Ces puces à capot en PDMS ont eu un succès énorme en raison de leur simplicité de scellement. Le collage se réalise après avoir « activé » les deux surfaces, c'est à dire celle du verre (ou du SiO_2) et celle du PDMS dans un plasma à base d'oxygène. Ce plasma produit des liaisons pendantes Si-OH en surface et rend donc les surfaces parfaitement hydrophiles [56]. Il est ensuite facile de coller ces puces en quelques minutes sans aucun équipement lourd. Même si cette technologie a déjà été utilisée en nanofluidique [42], ce polymère n'est cependant pas adapté à cause de son faible module d'Young (quelques MPa). Il ne permet pas un bon contrôle de la taille du canal, parce que celui-ci se déforme sous contrainte. Toutefois, on peut citer les travaux du groupe de Han qui a utilisé ce procédé à base de PDMS pour insérer des membranes nanoporeuses de manière très simple dans des circuits fluidiques [45] (figure 2.1).

Sur la figure 2.1a, nous pouvons voir les deux procédés utilisés au MIT par le groupe de Han qui permettent d'intégrer ces membranes nanoporeuses à base de polymère dans un circuit microfluidique. Sur la figure 2.1a de gauche, un premier moule en PDMS permet d'injecter et de modeler la couche de résine de Nafion. Ce premier moule est

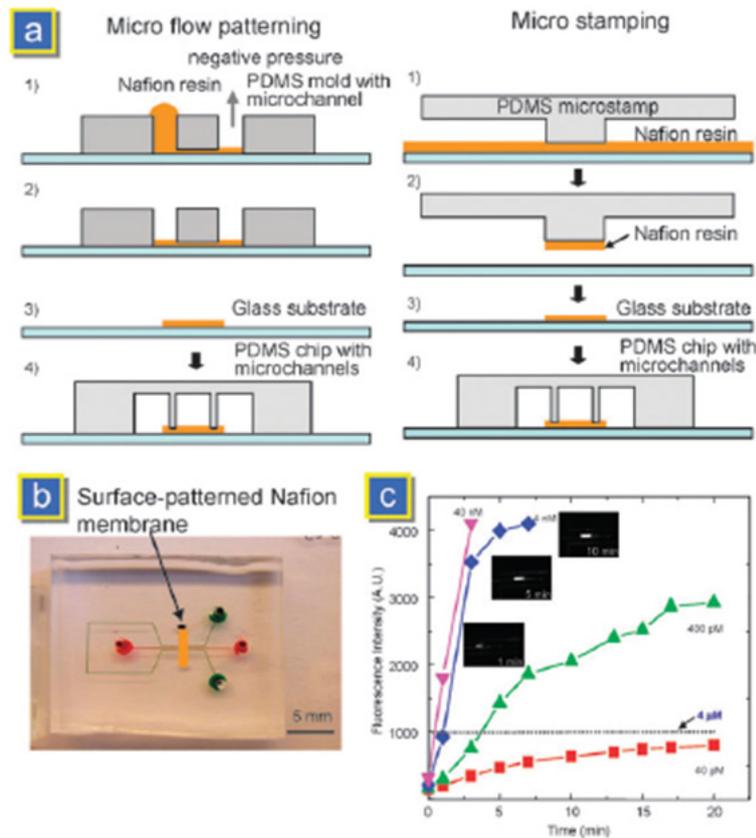


FIGURE 2.1 – Schéma de deux procédés de fabrication de puce nanofluidique PDMS/verre qui ont permis d’intégrer une membrane nanoporeuse. a) Schéma des deux procédés permettant de coller le capot en PDMS, et b) vue de la puce contenant le préconcentrateur à base de membrane à perméabilité sélective et c) Préconcentration de β -phycoerythrin en fonction du temps de piégeage.

ensuite enlever puis un capôt en PDMS (comportant le circuit définitif Micro Nano Micro fluidique (MNM)) est scellé définitivement et permet de relier deux microcanaux grâce à la membrane nanoporeuse Nafion. Dans le deuxième procédé utilisé sur la figure 2.1a de droite, une couche de résine Nafion est déposée sur un premier substrat. Un tampon de PDMS permet de venir récupérer la résine suivant le motif micrométrique du tampon. La résine est alors redéposée sur le substrat final et scellée définitivement avec le capot de PDMS microstructuré. Ces deux techniques permettent d’obtenir des dispositifs MNM pour l’électropréconcentration.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous limiterons aux puces rigides qui permettent d’obtenir des nanocanaux (ou nanofentes) non déformables, et qui sont le plus souvent réalisées dans une géométrie planaire. Puisqu’il existe un nombre important de procédés

permettant de fabriquer ces dispositifs, il est important de choisir le procédé le plus approprié. Pour cela, regardons d'abord les propriétés très spécifiques qui sont imposées par nos expériences de nanofluidique.

Nous avons retenu trois propriétés importantes pour ces puces rigides :

- premièrement, nous souhaitons pouvoir observer des sondes fluorescentes dans les canaux en fonction du temps et des conditions expérimentales. Un dispositif transparent est donc nécessaire, principalement au niveau des canaux pour permettre une observation sous microscope.
- l'utilisation de champs électriques forts et d'une grande pression hydrodynamique qui sont les deux paramètres pertinents pour la mise en mouvement du liquide à l'intérieur du système. Un dispositif robuste aussi bien mécaniquement qu'électriquement est donc préférable.
- enfin, la possible intégration d'électrodes métalliques dans ce type de dispositif limite également la gamme de température supportable par l'échantillon.

C'est sur la base de ces quelques points clés que nous nous sommes penchés sur les différentes solutions présentes dans la littérature. Pour la fabrication de nanocanaux intégrés à un circuit microfluidique, deux approches sont couramment rencontrées dans la littérature : l'approche dite « bottom-up » basée sur la méthode de la couche sacrificielle et l'approche « top-down » par collage de substrats rigides [57].

2.I.A La méthode de la couche sacrificielle : approche dite « bottom-up »

Le principe est de se servir d'un substrat comme « fondation », puis, à l'image de la construction d'une maison, d'assembler plusieurs couches les unes sur les autres. Après une étape de lithographie dans une résine optique servant de couche sacrificielle (en rouge dans la figure 2.2), on vient déposer un film épais qui sert de capot à la structure (en bleu ciel dans la figure 2.2). Enfin, la dernière étape permet la gravure et le retrait de la couche sacrificielle permettant un passage fluide de quelques nanomètres de hauteur (correspondant à la hauteur de la couche sacrificielle).

La figure 2.3 illustre bien cette technique. Sur un substrat de silicium (oxydé sur 1 μm) sont premièrement déposées une couche de TEOS et de Si_3N_4 de 50 nm chacune. Ensuite une couche de a-Si (silicium amorphe) est déposée et gravée : c'est elle qui servira de couche sacrificielle et qui définit la géométrie des nanocanaux. Elle est recouverte d'une couche capôt de Si_3N_4 (50 nm), TEOS (50 nm), Si_3N_4 (50 nm) et PSG 1 micron. Sur la figure 2.3b, nous pouvons observer le nanocanal vu de coupe après gravure de celui-ci par une solution à base de TMAH (gravure sélective du a-Si par rapport au Si_3N_4).

Finalement, la couche intermédiaire sacrificielle est retirée pour laisser apparaître un canal de la hauteur de la couche supprimée. Cette technique a l'avantage de pouvoir aisément fabriquer des circuits fluidiques sur plusieurs niveaux en combinant plusieurs

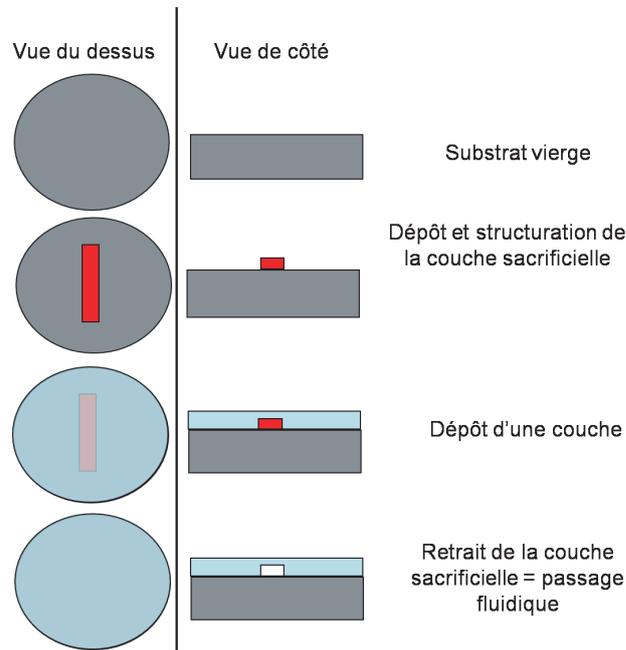


FIGURE 2.2 – Schéma du procédé de fabrication de couche sacrificielle permettant d’obtenir un dispositif nanofluidique.

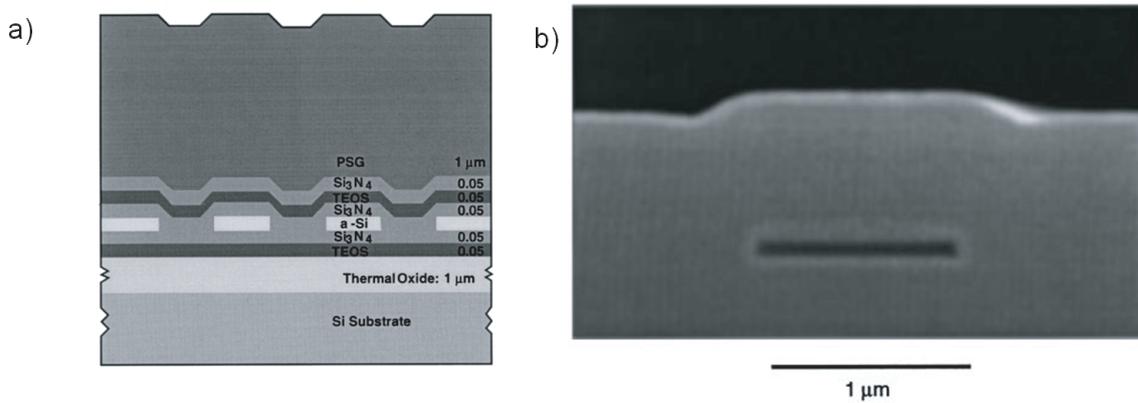


FIGURE 2.3 – a) Schéma du procédé de fabrication, avec couche sacrificielle, utilisé par Stern et al. [58]. b) Microscopie électronique du nanocanal, vu en coupe, obtenu après gravure sélective du a-Si par rapport au Si_3N_4 avec une solution à base de TMAH.

couches sacrificielles. Cependant, elle souffre de deux principaux défauts : le temps important nécessaire pour retirer la couche sacrificielle, et le risque d’effondrement de la structure. Celle-ci impose, de plus, des limites aussi bien en largeur qu’en épaisseur de canal fluide.

Pour donner une idée du temps de retrait de la couche sacrificielle, Stern et al. [58] ont eu besoin d'effectuer des gravures allant de 60 à 80 heures pour retirer des canaux de 2 mm de long. Bien que de nombreuses améliorations aient été apportées à cette technique (optimisation de la gravure, choix de matériaux, intégration d'électrode (les temps liés à la technique de gravure par voie électrochimique présentée en figure 2.4 sont de 4 minutes pour des canaux de 100 nm x 300 μ m x 20 mm),...) [59], le temps de gravure reste encore un facteur limitant. Il est également important de noter que la section du canal n'est souvent pas constante dans toute sa largeur (et longueur) puisque des variations en épaisseur gravée sont souvent observées pour des temps de gravure aussi élevés.

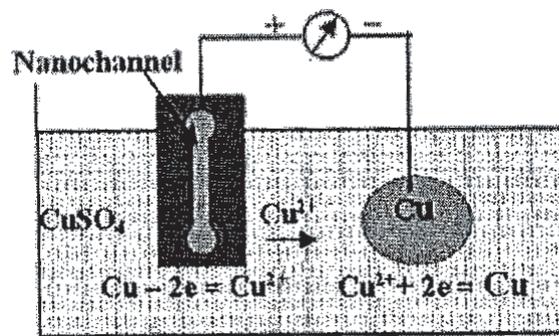


FIGURE 2.4 – Schéma du procédé de gravure électrochimique utilisé par Cheng et al. pour diminuer considérablement le temps de gravure de la couche.

Le deuxième défaut de cette approche technologique concerne la faible résistance mécanique de ces canaux. En effet, les largeurs maximales qu'autorise cette technique sont fréquemment discutées dans les articles [58] et [59] où un effondrement des canaux larges est souvent rapporté. Il faut également tenir compte de l'épaisseur maximale qui peut être déposée d'après la méthode de dépôt utilisée, et qui limite de même la résistance maximale à la contrainte de l'ensemble. Cette faible résistance mécanique finale des dispositifs nous a poussé à ne pas choisir cette approche technologique et à travailler plutôt avec une méthode de scellement utilisant deux substrats rigides (approche « top-down »).

2.I.B Le scellement de deux substrats rigides : approche dite « top-down »

Cette technique consiste à graver dans un premier substrat le motif fluidique (structure micro/nano/micro MNM) puis à le sceller avec un deuxième substrat. L'un des deux substrats doit aussi être nanostructuré à l'endroit précis voulu pour une nanofente par exemple. Puisque nous cherchons à réaliser un réseau fluidique comprenant une partie micrométrique et une partie nanométrique (structure MNM), seule une technique de

gravure utilisant des ions focalisés (FIB pour Focused Ion beam en anglais) permettrait de réaliser en une seule étape cette structure multiveaux. La méthode de gravure FIB étant très lente et peu adaptée à la production d'un grand nombre d'échantillons, le circuit fluidique est donc le plus souvent obtenu après deux étapes successives de gravure conventionnelles et une étape de scellement.

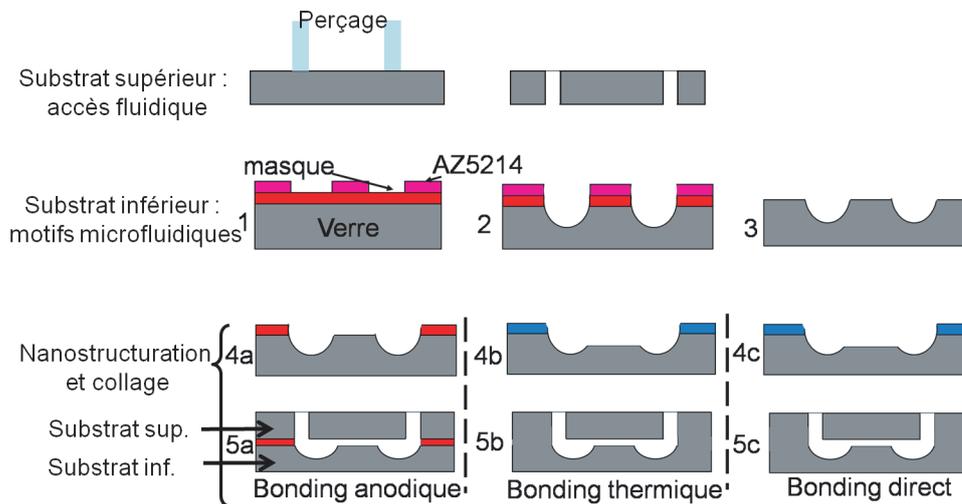


FIGURE 2.5 – Procédé de fabrication de puce « dure ». 1) Dépôt d'un masque et lithographie optique pour usiner le masque. 2) Transfert du masque et gravure des microcanaux. 3) Élimination du masque. 4a) dépôt et gravure d'un film mince diélectrique. 4b et c) dépôt d'un masque pour réalisation de la gravure du nanocanal. 5) Scellement de deux substrats par : a) collage anodique ; b) collage thermique ; c) collage direct

- Puisque les deux substrats sont rigides, l'un des deux doit avoir été préalablement percé localement afin de permettre les connections fluidiques. Une première étape consiste donc à préparer la lame capot percée (figure 2.5).
- Une deuxième étape consiste à structurer la deuxième lame qui constituera le fond de circuit fluidique. On définit ici seulement les grands canaux micrométriques avec une gravure sur un à quelques microns de profondeur (haut de la figure 2.5 - étapes 1, 2 et 3). La lame du fond du dispositif fluidique (étape 3 de la figure 2.5) contient ainsi tous les circuits utiles à l'exception de la partie nanostructurée.
- Enfin, il faut réaliser la nanofente dans la lame de fond de circuit avant de sceller la lame percée sur la lame de fond. Il existe ici plusieurs méthodes pour obtenir la nanofente. Nous décrivons ici les trois méthodes de scellement différentes sont représentées dans l'étape 5 de la figure 2.5 :
 - soit on utilise un film intermédiaire, dont l'épaisseur nanométrique correspond exactement à la hauteur souhaitée pour la nanofente. Ce matériau peut être par exemple un film mince de silicium amorphe (en rouge sur l'étape 4a de la figure 2.5). Dans cette première version du procédé, la deuxième étape de gravure consiste à graver sur toute sa hauteur le film intermédiaire. Ce film

est ensuite structurer pour laisser un passage fluide (nanométrique) entre les microcanaux. *Un collage anodique* du dispositif contenant une nanofente vient finir par sceller définitivement le dispositif (étape 5a de la figure 2.5). Nous reviendrons en détail par la suite sur les avantages et les inconvénients de cette méthode de collage anodique, qui a été étudiée au début de ma thèse.

- on peut aussi déposer un film intermédiaire (en bleu sur l'étape 4b de la figure 2.5), qui une fois lithographié servira de masque pour sur-graver le substrat de fond de la profondeur nanométrique souhaitée. Pour cette autre variante du procédé, après cette deuxième gravure, le film intermédiaire est retiré. Il existe ensuite deux méthodes de scellement : *le collage thermique* à très haute température (entre 800°C et 1000°C) par fusion des deux lames de verre (figure 2.5- 5b) ou *le collage direct* qui peut être mis en oeuvre si les deux lames sont l'une en silicium et l'autre en verre (figure 2.5- 5c).

Discutons des avantages et des inconvénients de chacune des trois méthodes de scellement de manière à déterminer la méthode qui sera la plus adaptée à notre cahier des charges.

2.I.B.1 Le collage direct : cas des matériaux silicium/verre

Le collage du verre et du silicium cristallin a été proposé pour réaliser des dispositifs à nanofentes planaires (quelques nanomètres de hauteur, largeur micrométrique) ou verticales (hauteur micrométrique ou nanométrique, largeur nanométrique) [60] (figure 2.7). La figure 2.8 donne un exemple de dispositif à nanofente obtenu par collage d'une lame de verre (couvercle du dispositif) sur une plaque de Si structuré par gravure chimique anisotrope au KOH. La lame de silicium structurée et la lame de verre sont activées chimiquement en surface. Une solution est d'utiliser un bain d'ammoniaque (1 heure à 70°C dans un bain $H_2O/NH_4OH/H_2O_2$) qui permet d'obtenir des groupements -OH en surface des deux plaques (ou alors tout simplement d'oxyder la plaque de silicium par recuit thermique pour le silicium) [61] [62]. Ces deux activations de surface permettent un vrai collage moléculaire par pontage des liaisons Si-O-H, comme décrit sur la figure 2.6.

Des traitements thermiques post collage effectués à des températures supérieures à 150 °C renforce l'énergie de liaison hydrogène entre les deux surfaces. Il faut atteindre des températures plus élevées, par exemple 800 °C, pour créer des liaisons fortes covalentes SiOSi et obtenir un collage intime [62]. Ce procédé offre de bonnes propriétés mécaniques finales surtout après un recuit haute température. Malgré tout, l'adhésion peut être suffisante, même avec un recuit proche de 150°C pour permettre une étanchéité du dispositif fluide collé par cette technique. Cependant, le substrat en Si n'est pas transparent (figure 2.8c) pour l'observation par microscopie et les deux surfaces sont de nature différente. L'étude des phénomènes de surface devient alors délicate du fait de la non symétrie du système. Il devient impossible de discriminer la contribution due aux phénomènes de chacune des surfaces.

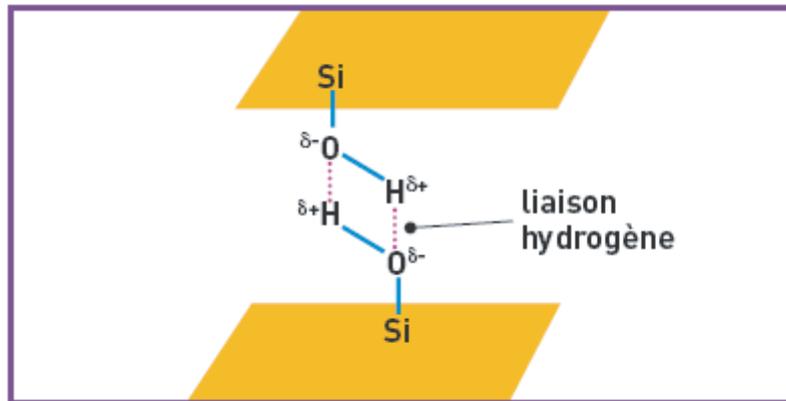


FIGURE 2.6 – Collage moléculaire de deux surfaces par liaisons hydrogène entre des liaisons silanols (SiOH-SiOH) de surface.

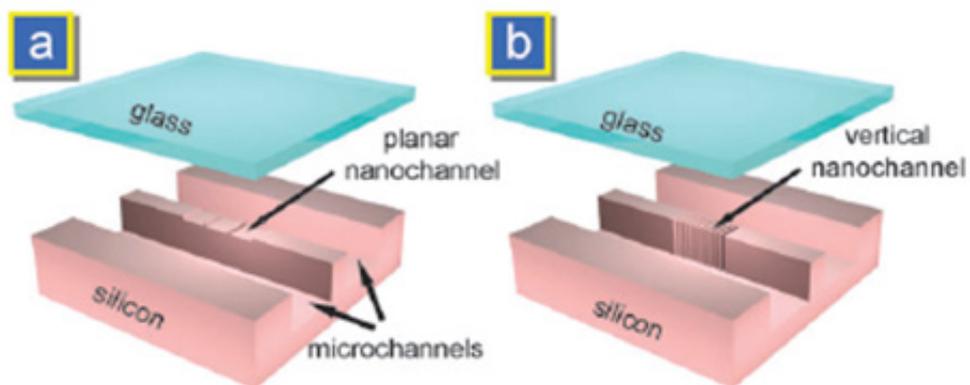


FIGURE 2.7 – Microdispositifs utilisés par Han et al. [60]. Dans les deux cas, deux microcanaux sont gravés par gravure chimique au KOH. a) ils sont reliés par une nanofente planaire (hauteur nanométrique) ; b) ils sont reliés par un réseau de nanofentes verticales (largeur nanométrique).

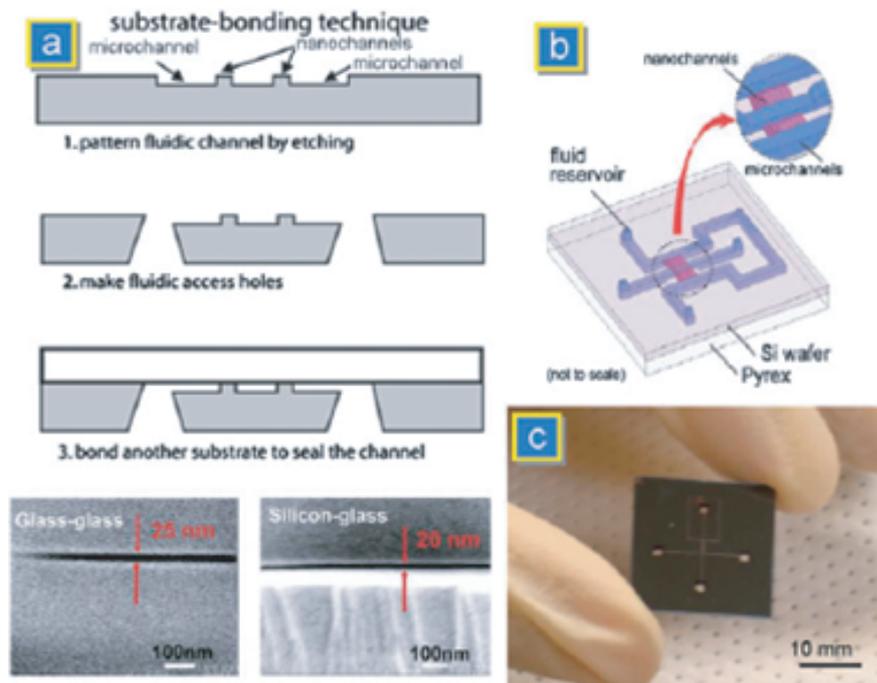


FIGURE 2.8 – a) Schéma de fabrication des dispositif de la figure 2.7, b) schéma de la puce complète en verre-silicium, c) photo du dispositif

2.I.B.2 le collage thermique de deux lames de verre

Le principe de cette technique consiste à chauffer le verre près de sa température de fusion sous pression. Une fois la température de transition vitreuse du matériau atteinte, sous l'effet de la pression mécanique, il y a interpénétration des couches surfaciques de verre « ramollies ». Ce procédé de collage permet donc d'obtenir des microdispositifs fluidiques en verre. La principale contrainte est la forte température nécessaire pour ce collage : la température de fusion du pyrex est en effet proche de 700°C, celle de la silice proche de 1100°C [63]. Ces températures élevées rendent l'instrumentation embarquée dans les dispositifs fluidiques délicates puisque seuls les matériaux à forte température de fusion seraient intégrables.

2.I.B.3 Le collage anodique

Cette technique de collage est utilisée depuis la fin des années 1960 [64] par l'industrie des semi-conducteurs afin de coller différents matériaux sur du verre. Les mécanismes inhérents à cette méthode de collage, aussi connue sous le nom de « collage électrostatique », ne sont que partiellement compris malgré son utilisation intensive. Dans la littérature, de nombreuses familles de matériaux ont déjà été associées par collage anodique : les métaux (Al, Fe, Mo...), les semi-conducteurs (GaAs, Ge, Si), les alliages métalliques (SiC, Fe-Cr, Kovar...)[65]. Le but est de créer des liaisons covalentes entre le diélectrique (métal) et le verre sous l'effet d'un fort champ électrique à une température modérée (inférieure à 400°C).

Dans le cas particulier de la fabrication de puce fluidique, une couche mince, déposée sur un substrat de pyrex, vient se coller et se sceller efficacement à un second substrat de pyrex [54]. Les techniques de dépôts de couches minces de diélectriques permettent facilement de déposer une couche de quelques nanomètres. L'épaisseur de la couche mince détermine alors la hauteur du canal. Il est possible de structurer cette couche pour créer un canal reliant les deux parties micrométriques gravées dans la masse du pyrex (figure 2.9). Notons alors que, dans ce cas, la section du canal fluidique se compose donc de deux matériaux puisque les parois du nanocanal sont en matériau diélectrique, tandis que le couvercle et le fond de la puce sont en verre. Nous reviendrons sur cette méthode qui a été la première méthode utilisée dans ma thèse. Mes premiers dispositifs intègraient des canaux de 100 microns de large sur une centaine de nanomètres de hauteur. Nous pouvons donc considérer que l'influence des parois en diélectrique sera négligeable puisque la surface en diélectrique est très faible comparativement à celle du verre (figure 2.9).

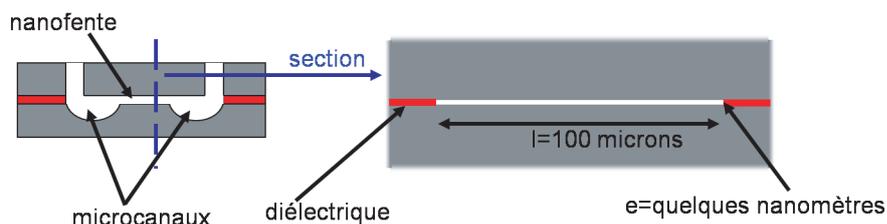


FIGURE 2.9 – Schéma permettant de visualiser l'intérêt de la couche intermédiaire comme nano-calcaie en épaisseur. La surface à l'interface est presque entièrement composée de verre puisque $S = 2 \times l + 2 \times e \approx 2 \times l$

2.I.B.4 Conclusions : le procédé de collage anodique utilisé au début de ma thèse

Nous venons de voir qu'il existe un nombre important de procédés qui permettent de fabriquer des dispositifs fluidiques. Cependant, pour l'étude des propriétés de transport ionique à travers un nanocanal fluide, comme nous l'avons déjà expliqué précédemment, certains de ces procédés ne sont pas adaptés. Rappelons une dernière fois nos besoins :

- il est nécessaire de fabriquer des puces transparentes dans le visible, dans une gamme de longueur d'onde adaptée aux sondes fluorescentes.
- des solutions acido-basiques et des solvants seront alternativement utilisés. Les parois du canal fluide doivent donc être inertes chimiquement. Nous éviterons donc les polymères, qui apparaissent inadaptés. De plus, pour être capable de moduler la charge de surface des canaux, ces parois pourraient être en verre.
- nous souhaitons disposer d'un dispositif fluide robuste, c'est-à-dire capable de supporter de fortes pressions. Les technologies à base de couche sacrificielle (approche dite « bottom-up ») devront donc être évitées. Il est préférable de travailler avec des puces rigides.
- le dispositif devrait être constitué d'un seul matériau très peu déformable aux contraintes mécaniques. Le collage direct « verre/silicium » décrit précédemment n'est pas une solution viable.
- l'intégration à court terme d'électrode entraîne une limitation sur la température maximum du procédé après le dépôt de celles-ci. Le collage thermique du verre doit donc être écarté.

Pour toutes ces raisons, le collage anodique s'imposait donc comme méthode de scellement au début de mes travaux. Le verre répond quant à lui à tous ces critères, tant sur la transparence que pour ses propriétés mécaniques et sa bonne résistance aux agressions chimiques (à l'exception toutefois des dérivés d'acides fluorhydriques). J'ai donc débuté ma thèse en reprenant le protocole de fabrication qu'utilisaient Adrien

Plecis et Panayotis Svarnas au LPN avant mon arrivée. Ce protocole est basé sur le collage anodique de deux lames de verre, où celle du fond comporte une fine couche de silicium amorphe de hauteur égale à celle de la nanofente (figures 2.9 et 2.10).

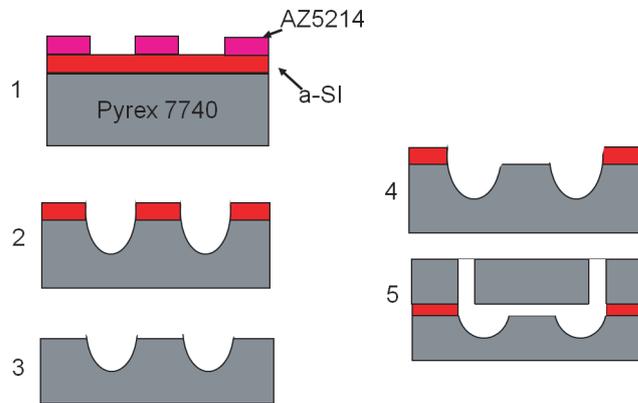


FIGURE 2.10 – Protocole pour la fabrication des premières générations de puce nanofluidique basé sur le collage anodique

Ce procédé de fabrication des puces rigides permet de réaliser des motifs micrométriques et nanométriques. Il se déroule comme suit :

- étape 1 (figure 2.10) - sur un substrat 2 pouces en Pyrex 7740 (Optiteck S.A.) d'épaisseur $500\ \mu\text{m}$, un fin dépôt (300 nm) de silicium amorphe (a-Si) est réalisé par PECVD (cf. Annexes). Un recuit de 4h à 400°C permet de relâcher les contraintes internes au film mince. Une lithographie optique est ensuite réalisée pour définir les réservoirs et les grands canaux fluidiques.
- étape 2 - le film mince a-Si est gravé par gravure ionique réactive (RIE) en atmosphère fluorée (SF_6) avec comme masque de gravure la couche de résine photosensible (AZ5214E) (cf. Annexes pour les paramètres). La résine est enlevée avec immersion dans un bain d'acétone et le substrat est séché avec de l'azote. Les microcanaux de $2.5\ \mu\text{m}$ sont alors gravés chimiquement dans le substrat de Pyrex (5 minutes dans une solution de $\text{HF}(40\%)/\text{HCl}(36\%)/\text{H}_2\text{O}\ 10 : 3 : 20$ à température ambiante), le a-Si servant de masque.
- étape 3 - le masque de a-Si est retiré au cours d'une seconde gravure RIE. Cette étape termine la fabrication des microcanaux.
- étape 4 - un 2ème dépôt de a-Si de quelques dizaines de nanomètres est déposé par PECVD. Ce dépôt fixe la hauteur de la structure nanométrique. De manière similaire aux étapes 1 et 2, ce masque est localement gravé par RIE via l'utilisation d'un masque de résine photosensible (cf. toute la partie claire de la figure 2.11, la partie centrale entourée ne dispose pas de microcanaux). Les microcanaux ainsi qu'une zone large de $100\ \mu\text{m}$ sont elles aussi gravées. Les parties restantes servant de « cale » pour l'étape de collage qui suit (toute la partie brune de la figure 2.11).
- étape 5 - le substrat avec ses micro et nanostructures est finalement scellé par col-

lage anodique à un substrat de Pyrex de $300\ \mu\text{m}$ d'épaisseur qui a été préalablement percé par microsablage pour définir les arrivées fluidiques. Cette technique permet d'obtenir, en une journée, avec des techniques simples de la microélectronique, des puces fluidiques comprenant un nanocanal reliant deux microcanaux (figure 2.11). Chaque plaquette de 2 pouces contient 4 dispositifs, qui sont isolés les uns des autres par sciage.

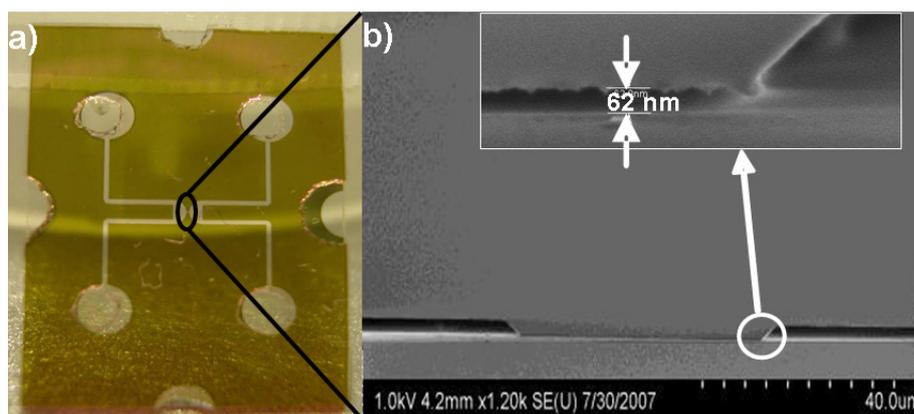


FIGURE 2.11 – a) Exemple de puce obtenue après sciage du wafer 2 pouces. b) Image MEB du nanocanal d'un dispositif coupé

L'étape de collage anodique étant complexe et très importante en terme d'étanchéité et de tenue mécanique, la suite de ce chapitre va être dédiée à l'étude des phénomènes mis en jeu pour optimiser la qualité du collage anodique.

2.II L'étude expérimentale du collage anodique

2.II.A Principe

Breveté depuis 1968 par Pomerantz, cette technique est depuis couramment utilisée dans l'industrie. Rapidement, de nombreuses familles de matériaux ont pu ainsi être collées au verre : les métaux (Al, Fe, Mo...), les semi-conducteurs (GaAs, Ge, CVD Si...) et les alliages métalliques (SiC, Fe-Cr, Kovar...) [65]. Toutes ces études rapportent le cas simple du collage entre un substrat de verre et un substrat de métal / diélectrique à température modérée et sous forte tension. Pour ce collage anodique, il est important de respecter la polarité comme illustré sur la figure 2.12.

Lors de ce collage entre une lame de verre et une fine couche de silicium, un contact intime se crée aux deux interfaces. Sous l'effet du champ électrique et d'une température modérée (comprise entre 200 et 500 °C), certains oxydes présents dans le Pyrex se dissocient sous forme ionique. Ces ions libérés participent au transport du courant favorisant ainsi le collage. Etudions quelles sont les espèces qui se dissocient. Le Pyrex ayant

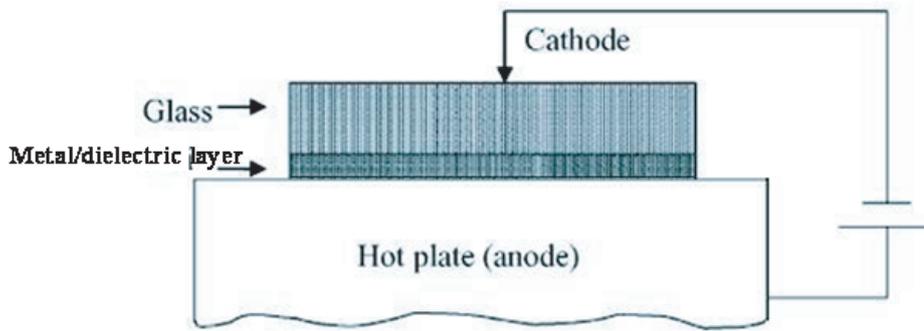


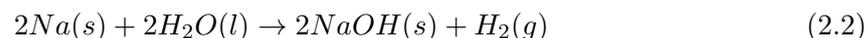
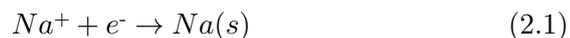
FIGURE 2.12 – Représentation schématique du système le plus couramment utilisé lors des études de collage anodique.

une composition complexe (tableau 2.1), plusieurs oxydes peuvent intervenir dans ces mécanismes de dissociation ionique.

Constituant	Composition massique (100%)
SiO ₂	80.6
B ₂ O ₃	12.6
Na ₂ O	4.2
Al ₂ O ₃	2.2
CaO	0.1
Cl	0.1
Mg	0.05
Fe ₂ O ₃	0.04

TABLE 2.1 – Composition massique du Pyrex 7740

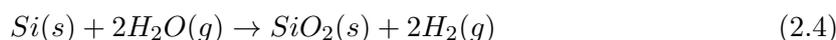
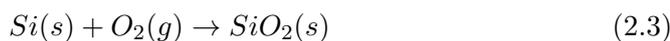
Pour déterminer quels oxydes sont mis en jeu, les réactions du côté anodique et cathodique du verre ont été étudiées. Côté cathodique, un dépôt de sodium a été observé [66] [67] [68]. L'oxyde de sodium se dissocie donc dans le Pyrex avant de migrer jusqu'à la cathode, suivant la réaction (2.1), et le sodium réagit aussi avec l'eau environnante (ou présente dans le verre) comme indiquée par la deuxième réaction (2.2).



L'ion Na⁺ monovalent est très important car il est le principal porteur du courant dans le verre [69]. Je reviendrai un peu plus tard sur l'influence du courant qui sera discutée.

Sur la face anodique du verre (interface verre / diélectrique de la figure 2.12), la formation d'un oxyde est quant à elle toujours observée. Dans le cas spécifique des collages

« Pyrex / silicium », la littérature rapporte la formation de liaisons Si–O–Si. On peut se demander d'où proviennent les oxygènes qui entrent dans la formation de cet oxyde à l'interface entre le film a-Si et le verre. D'après les premiers modèles, ils provenaient de l'oxyde de sodium qui s'était dissocié sous l'action simultanée d'une tension et d'une température modérée [70]. D'autres auteurs ont suggéré qu'ils provenaient de la surface du pyrex, soit sous forme d'eau, soit depuis l'air environnant [71] [72] [73]. Les équations bilans proposées pour la formation de silice à l'interface du verre et du silicium sont alors [74] :



Toutefois, des résultats plus récents mentionnent que les oxygènes dissociés de l'oxyde de sodium sont trop peu mobiles pour rejoindre l'interface et qu'ils ne pourraient donc pas créer des liaisons dans le Pyrex [75]. Cette étude attribue par contre un rôle prépondérant à l'eau infiltrée dans le squelette du verre. La couche hydratée d'épaisseur voisine de 500 nm fournirait ainsi des ions H^+ et OH^- . Les ions H^+ peu mobiles resteraient au voisinage de l'interface et permettraient de conserver une électroneutralité en compensant les ions Na^+ mobiles, qui migrent vers la cathode. Les groupes hydroxydes OH^- sont quant à eux mobiles et se déplacent vers l'anode, permettant la création des liaisons Si–O–Si à l'interface avec le silicium. Ce sont ces liaisons Si–O–Si issues de la réaction entre le film a-Si (ou le substrat de silicium) et l'eau du verre qui permet une cohésion de l'ensemble à l'issue du collage anodique.

Toutes les études ont observé une évolution radiale du collage depuis son point de contact initial (en général le centre de la plaque). La différence de potentiel appliquée entre les électrodes permet aussi de rapprocher géométriquement les deux substrats. La dissociation de Na_2O et le transport du Na^+ entraîne la polarisation du pyrex avec une chute de potentiel complètement localisée à l'interface (figure 2.13). La force électrostatique rapproche petit à petit les deux substrats qui, une fois en contact, permettent la création de vraies liaisons covalentes Si–O–Si.

Si l'origine de la formation de liaisons intimes entre les substrats commence à être comprise, l'obtention d'un collage parfait sur toute la surface porte à discussion. Cette technique souffre encore aujourd'hui d'un manque de compréhension. Certains auteurs restent flous quant aux critères selon lesquels ils ont jugés le collage achevé [76] ; d'autres se basent sur des critères visuels (pourcentage de surface collée par le biais de l'observation des franges d'interférences) [77].

En plus de déterminer le pourcentage de surface collée d'une plaque de 4 pouces, Hsieh et al. [78] ont tenter de corréliser le succès du collage avec la courbe de suivi en courant débité à travers le système en fonction du temps (figure 2.14).

Nous voyons sur cette figure que le courant augmente dans un premier temps fortement puis diminue exponentiellement pour atteindre un courant de saturation. L'allure des courbes est différente pour les deux échantillons (valeur du courant ainsi que vitesse

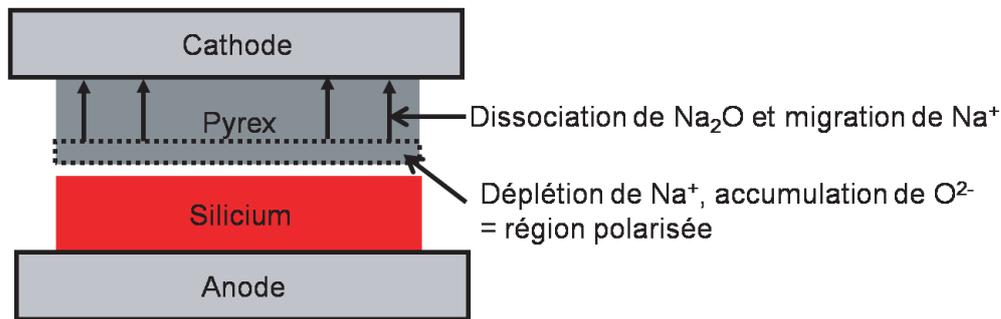


FIGURE 2.13 – Schéma de la formation de la zone de polarisation due à la migration dans le Pyrex des ions Sodium. Cette polarisation est à l'origine de la pression électrostatique entre les substrats

a)

Case no.	Deposited film	Bonding pressure (mbar)	Bonding time ^b (min)	Bonded area (%)
1	-(Glass to Si)	1000	5	95
2	1.5 μm SiN_x	1000	5	40
3	1.5 μm SiN_x	2000	5	45
4	1.5 μm SiN_x	2000	30	80

b)

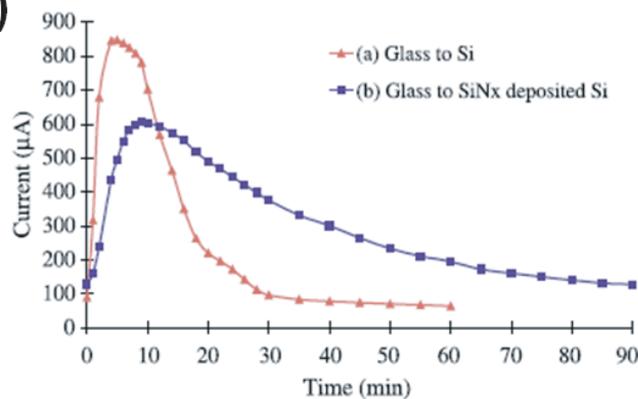


FIGURE 2.14 – a) Evolution de la surface bondée en fonction du temps pour le SiN_x comme couche intermédiaire en fonction du temps de collage et de la pression mécanique exercée sur le système pour rapprochée les interfaces. b) En rouge, évolution du courant en fonction du temps pour le cas 1 (a); en bleu, évolution du courant en fonction du temps pour le cas 2 (a).

de décroissance). Cette méthode de suivi permet donc de discriminer le système dans un cas verre-Si, dans l'autre verre-SiNx pour lesquels les résistances de chaque matériau diffèrent : les résistances dépendent de la méthode de fabrication / dépôt, de la pureté du matériau ainsi que de sa structure cristalline. Cependant de façon générale, le nitrure de silicium est plus isolant que le silicium, ceci est à relier au courant initial plus faible qui entraîne une plus faible décroissance pour le nitrure de silicium. Cette méthode de suivi de courant pendant le collage est fréquemment rencontrée car c'est une méthode simple à mettre en oeuvre. La littérature rapporte toujours une diminution du courant en fonction du temps au cours du collage. Le plus souvent, un pourcentage du courant initial, choisi empiriquement suivant le système (matériaux, épaisseur des substrats, tension appliquée, température) détermine la fin du collage.

Dans ce contexte à la lecture de la littérature, il convient de se poser un certain nombre de questions. Pourquoi n'y a-t-il pas de consensus sur le critère de succès d'un collage anodique? Existe-t-il des modèles et dans quelle mesure sont-ils applicables? Quels sont les paramètres physiques qui sont associés?

2.II.B La modélisation du collage anodique

2.II.B.1 Représentation en circuit électrique équivalent : une méthode empirique

Un grand nombre d'études ont tenté de caractériser ce collage anodique grâce à la méthode du suivi du courant traversant le système au cours du temps. Rappelons que ce système est constitué d'une plaque de verre placée à l'anode et d'un diélectrique ou métal relié à la cathode (figure 2.12). Tous les travaux rapportent un seul et unique comportement : une décroissance exponentielle du courant comme nous l'avons-nous même observé avec nos structures « pyrex/a-Si/pyrex » (figure 2.15).

Des auteurs ont tenté de proposer des modèles obtenus par analogie avec des circuits électriques pour expliquer la décroissance temporelle du courant [80] [81] [82] [79] [83] [84]. Le système est modélisé par une association de résistances et de capacités. Ces modèles, purement empiriques, permettent de simuler les courbes expérimentales sans partir de la physique du phénomène. La figure 2.16 présente l'un de ces modèles qui a été proposé par Anthony et al. [79]. Puis les auteurs ont tenté d'attribuer un sens physique à chaque élément électrique. Les valeurs qui en découlent sont donc à priori complètement empiriques et non physiques. Ainsi, dans le modèle d'Anthony et al., R_0 modélise la résistance du verre. L'élément C_1 - R_1 représente quant à lui la zone de contact verre - diélectrique. Ce modèle permet d'après le circuit électrique équivalent de calculer la charge Q . Ce modèle fait l'hypothèse que Q correspond à la charge des N ions (par unité de volume de verre) de charge Z qui sont mobiles dans une zone de déplétion d'épaisseur l et de section A au voisinage de l'interface entre les substrats à coller :

$$Q = N \times Z \times l \times A$$

En appliquant les lois de Kirchoff à ce système, la charge Q au cours du temps dans la

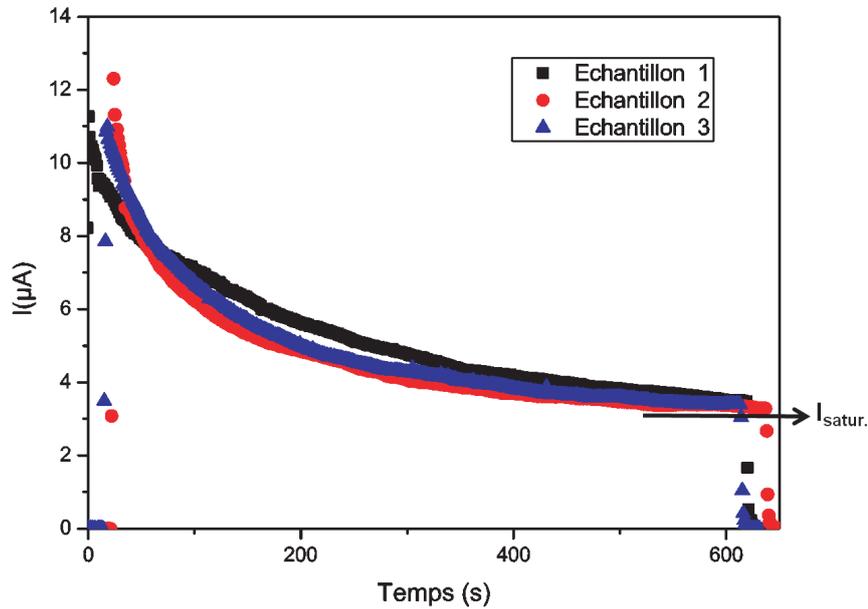


FIGURE 2.15 – Courbes de suivi en courant lors du collage anodique des structures « Pyrex ($500 \mu\text{m}$)/a-Si (50nm)/Pyrex ($300 \mu\text{m}$) » sous une température de $350 \text{ }^\circ\text{C}$ et avec une tension appliquée de 500V .

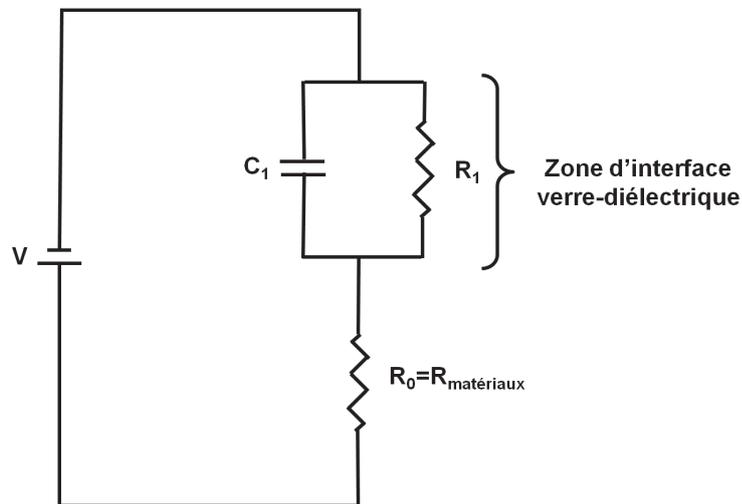


FIGURE 2.16 – Schéma électrique équivalent proposé par Anthony et al. [79] pour modéliser le phénomène du collage anodique.

capacité satisfait l'équation suivante :

$$R_0 \times \frac{\partial Q}{\partial t} + \frac{R_0 + R_1}{R_1} \times \frac{Q}{C_1} = V$$

Ce modèle fait l'hypothèse que R_0 , R_1 et C_1 sont constants au cours du temps et que la pression électrostatique appliquée durant le collage est proportionnelle à Q^2 . Le courant mesuré dans le circuit est alors de la forme :

$$I = \frac{\partial Q}{\partial t} + \frac{Q}{C_1 \times R_1} = \frac{V}{R_0} \times \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + \frac{V}{R_0 + R_1} \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)\right]$$

avec

$$\tau = \frac{R_0 \times R_1}{R_0 + R_1} \times C_1$$

Grâce à ce modèle simple, les caractéristiques électriques du système et notamment celle du verre et de la zone de déplétion peuvent être prédites. Cependant, tous ces modèles simples, dont celui d'Anthony et al., décrivent seulement l'évolution de la polarisation du verre et non l'évolution de la formation de liaisons interfaciales. Il ressort donc de ces modèles des lacunes physiques notamment sur les valeurs empiriques attribuées aux valeurs des résistances du verre et de l'interface. Aucun de ces modèles ne parvient, à partir du suivi du courant, à prendre en compte la formation de liaisons à l'interface ni le suivi de celles-ci, puisqu'ils ne prennent en compte que les charges stockées dans la zone de polarisation.

2.II.B.2 La modélisation du transport des ions à travers le verre

Récemment, et grâce aux progrès des techniques de simulation et des outils dédiés aux calculs, une approche par éléments finis a pu être appliquée au collage anodique du verre et du silicium. En s'appuyant sur les récentes avancées sur l'origine des oxygènes formant les liaisons à l'interface que j'ai décrites précédemment, ces travaux ont permis de modéliser le déplacement dans le verre des ions sous l'effet du champ électrique ainsi que l'évolution temporelle du courant en fonction des mobilités des ions contenus dans le verre (figure 2.17).

Les ions considérés sont donc Na^+ , OH^- et H^+ . La hauteur de la région déplétée, ainsi que la chute de potentiel sont étudiées en fonction de la mobilité des espèces. Les résultats obtenus pour les valeurs de mobilité des espèces en présence donnent un bon accord avec les expériences. Malheureusement, dans cette étude, les réactions interfaciales entre le silicium et le Pyrex, et donc la formation d'une fine couche de silice à l'interface, ne sont pas prises en compte. Ceci est pourtant un point très important du collage anodique. Le suivi en courant permet uniquement de vérifier que les composés contenus dans le Pyrex (notamment le Na_2) se dissocient et que la zone de polarisation se forme. Ce phénomène est certes indispensable à la formation de liaisons interfaciales (forte tension à l'interface, ions disponibles aux interfaces pour former des liaisons) mais n'est cependant pas garant

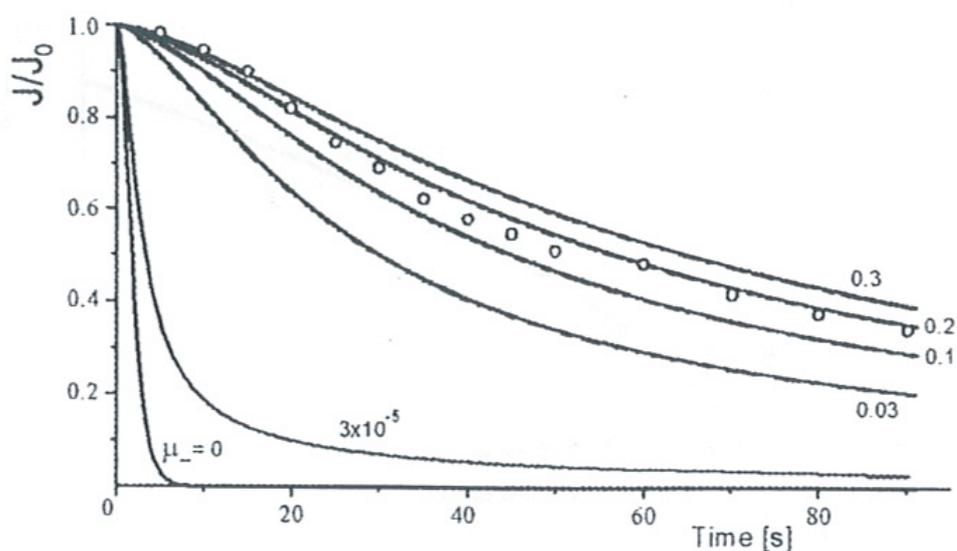


FIGURE 2.17 – Décroissance temporelle du courant normalisé en fonction des mobilités normalisées (mobilité du sodium = 1). La courbe représentée par les points ronds a été obtenue expérimentalement par Albaugh et al. [81]. Les courbes continues sont les résultats numériques.

de la réelle formation de liaisons. Comment expliquer que, dans ces simulations, la théorie soit en relative adéquation avec les expériences si ce nouveau modèle ne prend pas en compte le phénomène majeur du collage, à savoir la formation de la silice interfaciale ?

2.II.B.3 Conclusions

La littérature sur le collage anodique fournit seulement quelques éléments de réponse sur les mécanismes physiques mis en jeu pendant le collage. Il n'existe pas d'étude permettant de simuler le collage et tous ses mécanismes physico-chimiques. En effet, tous les modèles proposés jusqu'à aujourd'hui s'appuient sur l'étude simple du suivi du courant à travers le système. La décroissance temporelle du courant ne permet à elle seule que d'étudier comment la polarisation s'effectue dans le verre, sur la base de la dissociation des oxydes à base de sodium (ion mobile dans le verre pendant le collage anodique) présents dans le Pyrex.

Il est impossible d'obtenir des informations sur la formation de silice interfaciale grâce au suivi en courant puisque la résistance associée à cette silice interfaciale est très faible comparativement aux autres résistances du système. Pourtant cette fine silice est plus résistante que le silicium (ou que le métal à coller), on pourrait donc s'attendre à ce que la résistance totale du système augmente lors de la formation de liaisons interfaciales. Pour comprendre pourquoi celle-ci n'a pas de contribution majeure, comparons les ordres de grandeurs de l'augmentation de résistance due à la polarisation (et donc à

l'appauvrissement en ions mobiles dans le verre) et l'augmentation due à la formation de silice. La littérature rapporte que la hauteur de la zone déplétée est de l'ordre du micron pour un collage anodique de 15 minutes à 1000V et 350°C [85] alors qu'une épaisseur de l'ordre de 20 nanomètres de silicium est consommée pour 15 minutes à 1000V et 450°C (conditions plus sévères) [86]. En supposant que la résistance de la zone déplétée est proche de celle de la silice (pas d'espèce mobile comme pour une matrice de silice), deux ordres de grandeur séparent ces deux phénomènes, rendant l'influence de la silice formée négligeable.

- Les modèles proposés dans la littérature sont tous basés sur le suivi en courant débité dans le système lors du collage.
- Ces modèles permettent de suivre l'évolution de la zone de polarisation à l'interface verre-diélectrique. Ceci est un phénomène ANNEXE mais nécessaire au bon déroulement du collage anodique.
- La variation de résistance due à la formation de silice n'est pas prise en compte à l'interface car elle est négligeable devant l'évolution de la résistance due à la formation de la zone de polarisation à l'interface. Le suivi en courant ne permet pas d'obtenir d'informations sur le phénomène en lui même de formation de liaisons. Ces modèles ne sont donc pas adaptés pour suivre réellement l'évolution du collage anodique en lui même.

La littérature et les modèles proposés ne permettant pas de prédire l'efficacité d'un collage par le biais du nombre de liaisons créées à l'interface, nous avons alors décidé de déterminer expérimentalement quels sont les paramètres influençant le plus le collage anodique pour trouver le meilleur protocole à appliquer aux puces « pyrex/a-Si/pyrex » nanofluidiques.

2.II.C Les paramètres expérimentaux pertinents

Comme nous l'allons vu dans la section précédente, il n'y a pas unanimité dans la littérature quant aux critères d'évaluation du collage anodique. Nous venons de voir qu'il n'existe pas de modèle pertinent qui prenne en compte la formation des liaisons aux interfaces à coller. Ce manque de compréhension des phénomènes physiques, couplé à l'absence de modèle théorique, n'a donc pas permis de faire ressortir les paramètres expérimentaux les plus critiques pour obtenir un bon collage. Une partie des auteurs étudient le pourcentage de surface collée [77], d'autres font une corrélation avec le courant et/ou le pourcentage de surface collée [78], enfin, d'autres étudient les propriétés mécaniques et notamment la force nécessaire pour décoller deux substrats collés anodiquement [43]. Lequel de ces critères est le plus approprié à notre utilisation finale ? Sont-ils pertinents ou en faut-il un autre ? Faut-il en combiner plusieurs pour être certain de la qualité du collage ?

La suite de ce chapitre va être consacrée à une étude expérimentale très pragmatique du collage « pyrex/a-Si/pyrex », dans une recherche des paramètres les plus pertinents.

2.II.C.1 Le montage expérimental

J'ai eu à ma disposition un appareil de collage « fait maison » (figure 2.18a) composé d'une plaque chauffante en céramique sur lequel reposent les électrodes en laiton reliées à un générateur haute tension. Le suivi du courant s'effectue à l'aide d'un multimètre Keithley Multimeter 2000. Nous disposons également de différentes tailles d'électrodes cathodiques en laiton qui nous ont permis d'effectuer des collages avec différentes surfaces (figure 2.18b).

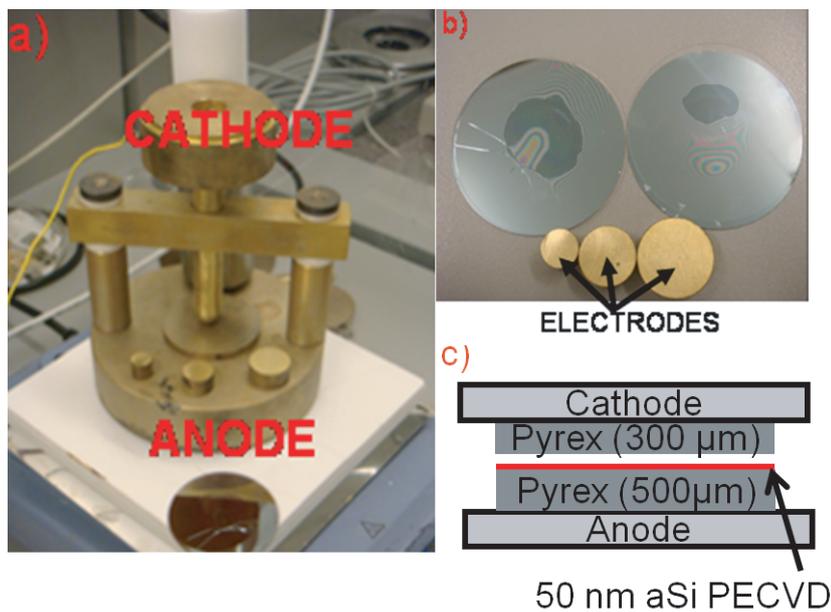


FIGURE 2.18 – a) Photo de notre appareil de collage, les électrodes sont en laiton avec des diamètres allant de 0.5 cm jusqu'à 4 cm. La plaque chauffante se situe sous l'anode. b) Exemple de collage de substrats de D263 (à gauche) et de Pyrex (à droite) grâce aux trois électrodes en dessous. c) Configuration type ayant servie dans ce chapitre.

La pression mécanique est simplement modifiée en ajoutant des masses sur la cathode. Ce dispositif permet d'obtenir une gamme de température allant de l'ambiante à 350°C et d'appliquer une tension jusqu'à 5000V. Tous les tests de ce chapitre (sauf mention particulière) ont été réalisés sur des substrats de pyrex 2 pouces recouverts d'un film mince de silicium amorphe a-Si déposé en PECVD (figure 2.18 c).

2.II.C.2 Quel critère choisir pour déterminer si la puce est bien collée ?

2.II.C.2.a La méthode de suivi du courant

Nous avons vu précédemment qu'un grand nombre d'études ont été menées en se basant sur un modèle de circuit électrique constitué de résistances et de capacités [80] [81] [82] [79] [83] [84]. Nous avons également discuté du fait qu'un premier modèle simple (figure 2.16) prend en compte la seule polarisation du verre qui conduit à la dissociation et à la migration des ions sodium vers la cathode. Un modèle plus récent qui étudie le transport ionique dans le verre a aussi été proposé [87]. Il étudie également les phénomènes de migration sans prendre en compte les réactions à l'interface. Tous ces modèles semblent donc insuffisants pour décrire le collage puisqu'ils ne tiennent compte que des effets de migration des ions sans tenir compte des réactions chimiques à l'interface verre/a-Si.

Pour tester les limites de ces modèles de suivi en courant, j'ai effectué une expérience simple : la même expérience de collage a été réalisée avec deux empilements structuraux différents. Le premier est constitué de deux lames de Pyrex seules « Pyrex/Pyrex » et le deuxième est l'empilement normal « Pyrex/a-Si(50 nm)/Pyrex » de notre étude. Au cours de ces deux expériences de collage anodique à 350°C et sous 500V, j'ai mesuré la décroissance temporelle du courant. La figure 2.19 montre ce suivi en courant pendant ces deux expériences. Les deux courbes sont quasiment identiques avec une valeur du courant limite pour les temps supérieurs à 600 secondes qui est parfaitement identique (environ 4 μ A). Dans le cas de la structure normale « Pyrex/a-Si(50 nm)/Pyrex », il y a eu collage, tandis que pour les deux lames de pyrex de la 2ème expérience il n'y pas eu collage.

Cette expérience est *extrêmement importante*, car elle nous permet de conclure sans ambiguïté que la méthode de suivi temporel de courant n'apporte aucune information sur la nature des effets interfaciaux. La décroissance du courant est en effet reliée aux mécanismes de migration des ions sous l'effet de la polarisation, mais elle ne renseigne pas sur les réactions chimiques interfaciales et la formation d'une fine couche de silice à l'interface. J'ai donc décidé de ne pas retenir cette technique du suivi de courant, comme critère de détermination d'un bon collage. Toutefois, j'ai continué à effectuer la mesure de la décroissance temporelle du courant car elle permet de vérifier si les phénomènes de migration des ions ont bien lieu. Je pouvais ainsi vérifier s'il n'y avait pas de problème de connections électriques lors du collage.

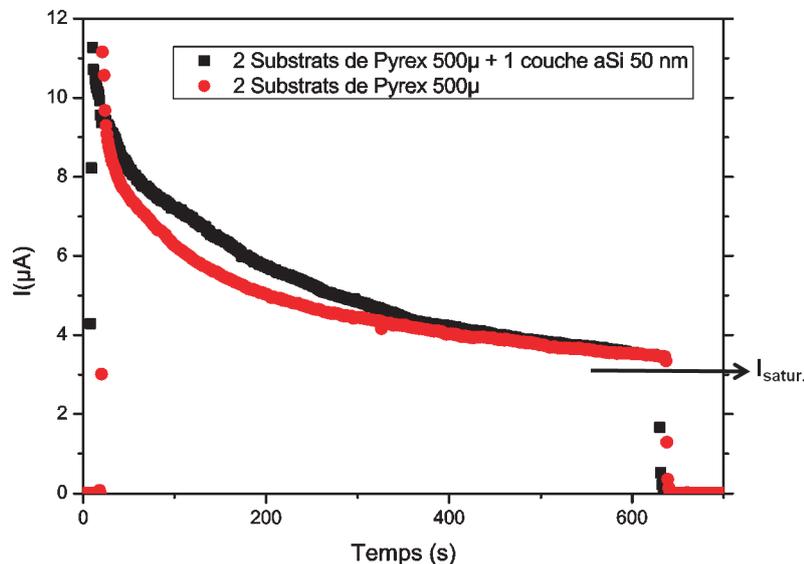


FIGURE 2.19 – Suivi du courant lors d'expérience de collage anodique de substrats de Pyrex. En rouge, pour deux substrats de $500\ \mu\text{m}$. En noir, pour un substrat de $500\ \mu\text{m}$ recouvert d'un film mince de a-Si de $50\ \text{nm}$ et d'un autre substrat de $300\ \mu\text{m}$

2.II.C.2.b Le test mécanique de la scie

Lors des premières réalisations de puce, nous avons fixé dans notre protocole 10 minutes de collage pour chacune des électrodes (1 cm, 2 cm et 3 cm de diamètre) avec poids total de 3 kg (correspondant à une pression de $2.35\ \text{kg}/\text{cm}^2$, $1.18\ \text{kg}/\text{cm}^2$, $0.78\ \text{kg}/\text{cm}^2$) à 350°C et sous 500V. La moitié des échantillons fabriqués n'étaient pas viables. Une partie des puces se décollaient au niveau des motifs, c'est à dire au centre de la puce. De plus, les puces « visuellement collées » au niveau du canal fluidique fuyaient lors des expériences fluidiques après application d'une pression de l'ordre d'1 bar.

J'ai donc réalisé des séries de collage et effectué un test mécanique de découpe à la scie. Après plusieurs séries de puces, mon analyse expérimentale fait apparaître que seules les puces pour lesquels aucun décollement n'avait eu lieu aux alentours du trait de coupe de la scie pouvaient supporter des pressions jusqu'à environ 5 bars. Les propriétés mécaniques du collage sont donc essentielles pour l'application finale visée.

Ne disposant pas de machine de traction, j'ai alors décidé d'utiliser la scie comme test mécanique des échantillons. Le protocole de test retenu est donc l'utilisation d'une scie ESSEC avec une lame résine de $300\ \mu\text{m}$ de large qui tourne à 3000 tours minutes avec une vitesse de sciage de 1 inch/minute. Il est important de rappeler ici que chaque puce contient 4 dispositifs fluidiques. Donc, cette étape finale de sciage est systématique sur tous les échantillons « pyrex/a-Si(50 nm)/pyrex ». Ce sciage se fait autour du circuit

fluidique pour ne pas détruire celui-ci.

2.II.C.2.c Le pourcentage de surface collée

Nous avons vu qu'une autre méthode pour tester la qualité du collage est la mesure du pourcentage de surface collée entre les substrats [77] [78]. Je me suis penché sur la pertinence de ce critère. Trois différents échantillons ont été collés anodiquement à 350°C et sous 500V (figure 2.20). Pour ces 3 échantillons, il s'agit d'un collage classique de la structure normale « pyrex/a-Si(50 nm)/pyrex ». Pour les deux premiers échantillons, présentés dans les deux images du haut de la figure 2.20, la surface collée est importante, mais ces échantillons n'ont pas résisté au test mécanique de la scie et se sont décollés. Seul l'échantillon présenté dans l'image du bas de la figure 2.20, malgré sa plus faible surface collée, présentait une bonne résistance mécanique.

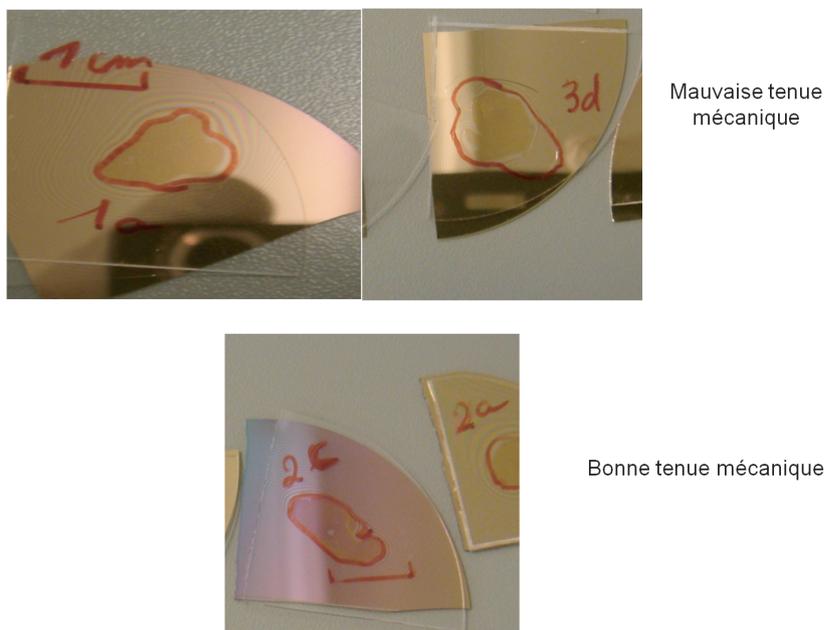


FIGURE 2.20 – Echantillons obtenus par collage anodique de Pyrex (500 μm)/a-Si (50 nm) - Pyrex (300 μm). Les échantillons en haut se sont décollés lors de nos tests de résistance mécanique contrairement à l'échantillon de la photo du bas malgré sa plus faible surface de contact

Utiliser le pourcentage de surface collée comme critère ne semble donc pas adapté. Il faut de plus noter qu'avec notre dispositif expérimental, la cinétique de propagation du collage sur toute la surface n'est pas reproductible, puisque ces 3 collages successifs différaient en efficacité. Cette non-reproductibilité est gênante pour pouvoir établir un protocole fiable de collage.

Un test mécanique semble bien plus adapté pour déterminer si un collage anodique est bien effectué. Le test que j'ai mis en place est une découpe des échantillons avec une scie ESSEC afin de déterminer si l'adhésion obtenue permet de supporter des contraintes de plus de 5 bars dans les dispositifs fluidiques. De plus, ce test n'est pas destructif pour les puces fluidiques car les dispositifs sont coupés depuis le wafer dans lesquels ils sont fabriqués sans toucher les circuits fluidiques.

2.II.C.3 L'influence du temps de collage

Des études théoriques et expérimentales [81] utilisent la méthode de suivi en courant et se réfèrent au temps $t_{I/2}$ nécessaire pour que le courant diminue de moitié par rapport au courant initial (temps pour lequel le courant a diminué de moitié par rapport à $t=0$). Ce paramètre est fréquemment utilisé comme paramètre d'arrêt du collage. La forte dépendance entre le temps $t_{I/2}$ et la tension est également mise en évidence. J'ai cherché à démontrer si ce paramètre de contrôle, purement empirique, est adapté à notre système en étudiant les propriétés d'adhésion pour différents temps de collage (la figure 2.19 donne un courant initial proche de $12 \mu A$ soit $I/2 = 6 \mu A$ atteint au bout d'environ 200 secondes). Cette partie a pour but d'étudier les propriétés mécaniques du collage en fonction du temps de collage. 4 échantillons ont été collés dans les mêmes conditions de collage à $350^\circ C$ et sous 500V mais avec des temps de collage différents : 5, 10, 30 et 45 minutes (cf. 2.2). Ces échantillons ont donc subi le test à la scie. Un décollement même partiel a pour conséquence de mettre au rebus l'échantillon. Le tableau 2.2 indique le ratio d'échantillons, pour chaque temps, qui ne se sont pas décollés durant le test de la scie.

Temps de collage	5'	10'	30'	45'	60'
Ratio d'échantillons sans décollement	0/4	1/4	0/4	2/4	4/4 OK

TABLE 2.2 – Ratio d'échantillon «pyrex/a-Si(50 nm)/pyrex» collés à $350^\circ C$ et sous 500V ayant passé avec succès le test de tenue mécanique pour 5 temps différents : 5, 10, 30, 45 et 60 minutes.

Nous pouvons voir d'après le Tableau 4 que le nombre d'échantillons ne présentant pas de décollement après le test de tenue mécanique augmente avec le temps de collage. Au bout de 60 minutes, tous les échantillons disposent d'une force d'adhésion supérieure aux contraintes mécaniques qu'engendre une découpe.

Par la suite, j'ai scellé toutes mes puces en utilisant un temps de collage de 60 minutes, tous les échantillons ont alors passé sans problème le test mécanique à la scie et n'ont ensuite pas cédé durant les expériences fluidiques.

2.II.C.4 L'influence de la tension appliquée : vers une tentative d'analyse des phénomènes interfaciaux

La littérature mentionne une forte influence de la tension appliquée entre les électrodes sur la qualité du collage anodique. Dans certaines études [77] [78] [84], l'utilisation de fortes tensions permet de réduire considérablement le temps de collage. La référence [77] indique qu'en passant de 100 V à 500 V, le temps de collage (déterminé à l'aide d'une méthode visuelle) est divisé par 8 pour un collage du type « pyrex-Si ». Lee et al. [77] ont étudié le rôle de la tension appliquée en caractérisant un bon collage entre le Pyrex et du silicium (cristallin, silice, nitrure de silicium) par visualisation de la surface collée (estimation faite à l'oeil nu). Ils mettent en évidence que le temps de collage diminue aussi fortement avec la tension appliquée (figure 2.21).

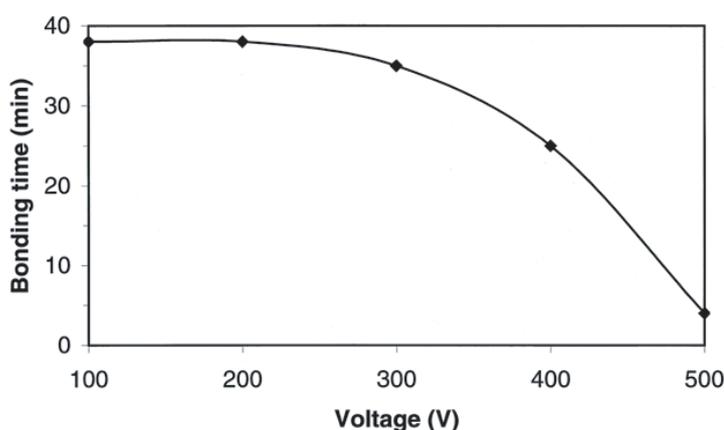


FIGURE 2.21 – Dépendance du temps de collage en fonction de la tension appliquée à 300°C. Les matériaux utilisés sont du Si type-p et du Pyrex, préalablement nettoyés à l'acétone [77].

Il paraît donc utile d'augmenter fortement la tension appliquée lors du collage. Cependant, lors des résultats préliminaires obtenus avant le début de mes travaux de thèse [46], il avait été remarqué une forte consommation de a-Si à l'interface avec les motifs fluidiques, comme on peut l'observer sur la figure 2.22. Il est de plus très important de conserver l'intégrité du film intermédiaire en a-Si pour éviter de laisser apparaître des chemins fluidiques parallèles destructeurs pour nos expériences de fluide. L'utilisation de fortes tensions pour réduire le temps de collage conduit à une détérioration du film mince en a-Si avec une mauvaise étanchéité fluide. La figure 2.23 montre de l'eau progressant à l'intérieur de notre puce, hors des circuits fluidiques.

Notons qu'à forts champs, une quantité importante de dépôt noir se retrouvait sur la cathode (figure 2.24). Il est alors frappant que le dépôt se fasse préférentiellement suivant le motif fluide au cœur du système. Nous pouvons donc penser que l'état de surface a une influence. Pour déterminer si ce phénomène est dû au claquage de la couche de diélectrique ou à la formation d'un composé de silicium, nous avons réalisé

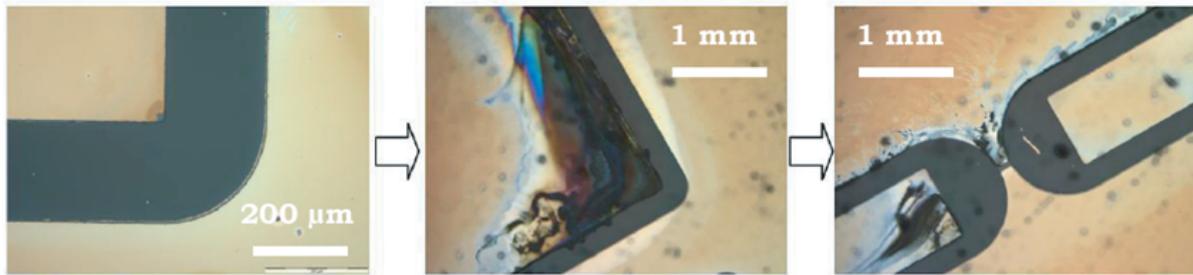


FIGURE 2.22 – Détérioration de la couche intermédiaire de a-Si à proximité du circuit fluide (D'après la thèse d'A. Plecis [46])

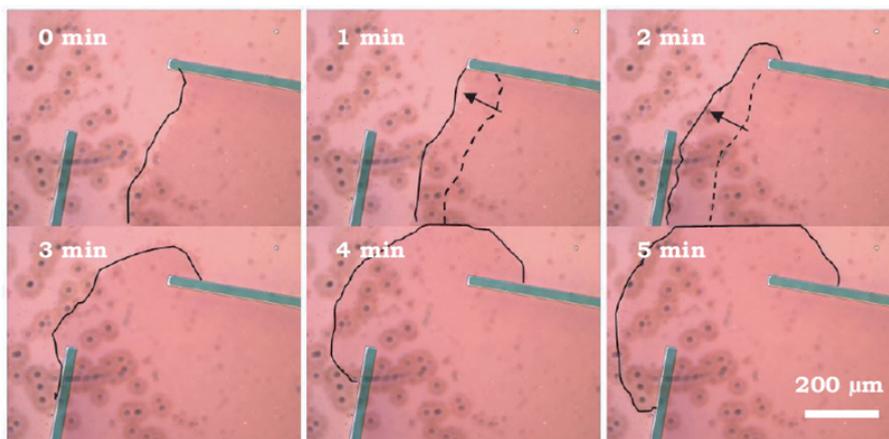
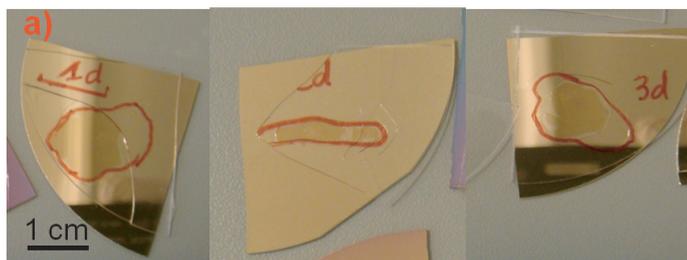


FIGURE 2.23 – Mise en évidence de la mauvaise étanchéité d'une puce fluide à la suite d'un collage anodique à forte tension : 1500 V et à 200°C, dont les suivis visuel et électriques répondaient aux critères de la littérature (d'après la thèse d'A. Plecis [46]).



FIGURE 2.24 – Dépôt sur la cathode (électrode en laiton) observé à l'issue de collage anodique à forts champs électriques.



Électrode 1 cm de diamètre, 500V



Électrode 1,5 cm de diamètre, 900V

FIGURE 2.25 – Influence de la tension appliquée pour des collages anodiques de 45 minutes à 350°C. a) des décollements sont observés et la zone de collage est proche de la taille de l'électrode. b) collage à 900V pour lequel un changement de couleur inhabituel a été observé, la surface de collage est supérieure à la taille de l'électrode.

deux expériences sous faible (500V) et forte (900V) tension appliquée (figure 2.25). Visuellement, nous retrouvons ici le fait que la surface de collage est plus grande pour une tension forte. Sous 500V, nous avons utilisé une électrode de 1cm de diamètre et la surface collée est toujours inférieure à 100% de l'électrode. Sous 900 V avec une électrode de 1,5 cm de diamètre, plus de 100% de la surface sous l'électrode a été collée et le collage s'est propagé au-delà de la surface sous l'électrode.

Un changement de couleur de l'échantillon de l'orange au violet-bleu est observé à forte tension. Une étude de la composition en surface du film mince de a-Si a donc été menée par spectroscopie RX de photoélectrons (XPS pour X-Ray Photoelectron Spectroscopy en anglais), avec l'aide de Stéphane Guilet du LPN, sur l'échantillon de la figure 2.25 b et sur un échantillon présentant une couleur orange-bleu (changement moindre de la couleur). Notons que ce changement de couleur est très peu reproductible à forte tension, bien que les dégradations du film intermédiaire en a-Si soient fréquentes. Cette étude XPS devrait nous permettre de mettre en évidence si un composé vient migrer du Pyrex dans le diélectrique en altérant ses propriétés.

La spectroscopie XPS permet de mesurer le nombre d'électrons émis dans un inter-

valle d'énergie en fonction de l'énergie de liaison des électrons. On appelle ces électrons des photo-électrons, car ils sont éjectés de la matière sous un rayonnement X à 1486 eV. Les électrons ayant un faible parcours moyen ne subissent pas de collision. Cette technique permet une analyse chimique fine de la surface sur une profondeur atomique. Chaque élément chimique étant caractérisé par un spectre unique, cette méthode spectroscopique permet d'analyser précisément la nature chimique d'un matériau donné. Des analyses semi-quantitatives peuvent être également extraites des spectres XPS normalisés, en se basant sur la hauteur des pics et sur l'aire sous les pics. L'identification de l'état chimique d'un élément peut être obtenue à partir de la mesure exacte de la position des pics et de leurs séparations en énergie.

Ici, la surface étudiée par XPS est celle du silicium amorphe qui a été décollée. Les courbes correspondant à nos échantillons sont présentées dans la figure 2.26. Elles nous permettent de mettre en évidence les éléments présents à la surface à savoir : le Silicium, le Carbone, l'Azote, l'Oxygène, le Fluor ainsi que le Sodium. La sensibilité de cette technique nous permet de discriminer deux environnements différents pour le Silicium : le silicium métallique et le silicium dans la silice (cf. encarts 2.26).

Nous étudions la surface de a-Si qui a été en contact puis collée anodiquement avec un substrat de Pyrex. La présence de silicium métallique (a-Si) est donc normale. La présence de liaisons SiO₂ est conforme à la littérature qui rapporte la formation de silice à l'interface verre - diélectrique. Le carbone présent est souvent présent dans ces analyses de surface en raison de la présence de poussières (pollution à l'air libre). Pour l'échantillon de la figure 2.25 b, le rapport semi quantitatif obtenu (rapport stoechiométrique SiO₂ : environ 500 coups pour le Si_{2P} et 900 coups pour le O_{1S}) nous permet de penser avec certitude que tout l'oxygène apporté à l'interface est engagé dans la formation de silice. La forte présence d'oxygène sur le 1er échantillon n'est pas expliquée (peut-on la relier à la coloration de l'échantillon ?)

Les différences entre les deux courbes sont faibles. La présence, faible, de sodium sur les spectres indique qu'une partie du sodium parvient à passer à travers la couche de diélectrique et ainsi à rejoindre la zone déplétée (ce qui permet d'expliquer que le courant ne soit jamais égal à zéro même aux temps longs). Ces différences sont peu significatives et ne permettent pas de conclure sur le possible changement de couleur à forte tension appliquée.

Il reste par ailleurs quelques interrogations sur les deux spectres : des espèces apparaissent sans que nous les attendions : le Fluor et l'Azote. Nous supposons que la présence de Fluor provient du nettoyage HF (cf. partie suivante sur le nettoyage des échantillons) effectué juste avant le collage et mal rincé. L'azote quant à lui n'intervenant pas dans le procédé pourrait être adsorbé à la surface depuis l'air ambiant. Ce phénomène de changement de couleur étant très peu reproductible, nous avons décidé d'arrêter ici l'investigation sur ce phénomène, pensant trouver avec cette méthode XPS une espèce dont nous n'attendions pas la présence et qui aurait formé un oxyde altérant ainsi la couleur de la puce.

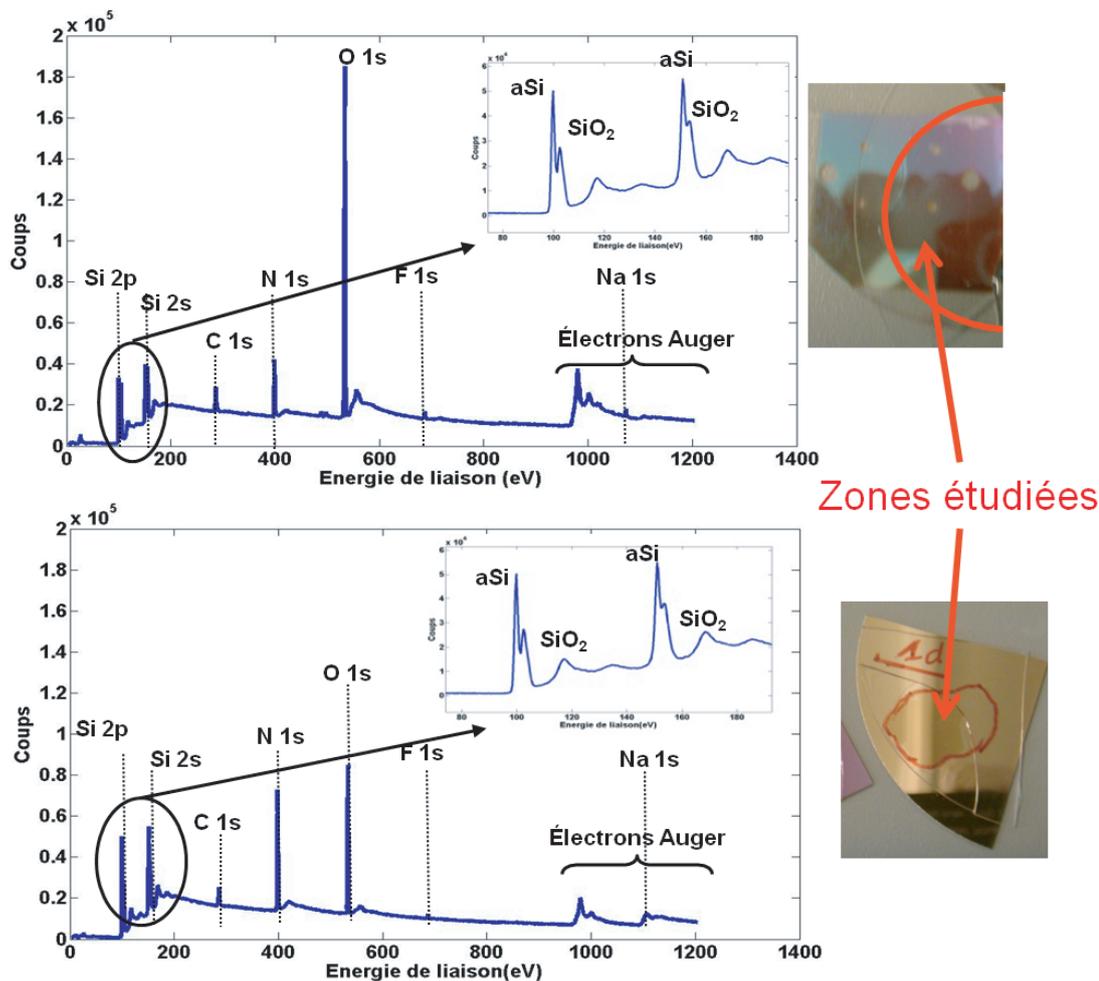


FIGURE 2.26 – Spectres de la surface du silicium amorphe après un collage anodique à 900V et 350°C obtenus par XPS. Le spectre de haut est celui de l'échantillon bleu violet (couleur anormale), le spectre du bas est celui de l'échantillon pour lequel la couleur est quasiment normale.

Cette étude en tension nous a néanmoins permis de fixer la tension à la valeur maximale de 500V (pour une $T=350^{\circ}\text{C}$) pour ne pas dégrader la couche diélectrique.

2.II.C.5 L'influence de la température

Lors d'un collage anodique, le système est chauffé à une température « faible » inférieure à la température de transition vitreuse du Pyrex, par opposition au collage thermique. Ainsi pour un collage du type verre - silicium, nous avons relevé dans la littérature

des températures allant de 200 à 500°C (la température de ramollissement du Pyrex étant de 821°C). Dans la littérature, la température varie en général entre 150 et 400 °C. Dans le figure 2.27, nous pouvons voir que Kanda et al. [84] ont testé pour trois différentes tensions appliquées (600, 800 et 1000 V) à trois températures différentes (300, 350 et 400°C) le collage anodique entre un substrat de Pyrex (10 x 10 x 3 mm) et de silicium type-p (10 x 10 x 0.3 mm). Quelque soit la tension appliquée, le temps nécessaire pour que le courant diminue de moitié par rapport au courant initial ($t_{1/2}$) diminue avec la température. A 600 V, $t_{1/2}$ passe de 30 s à 300 °C, à 7.5 s à 350°C et à 3.3 s à 400°C.

A 800 V, $t_{1/2}$ passe de 23 s à 300 °C, à 6 s à 350°C et à 1.2 s à 400°C.

A 1000 V, $t_{1/2}$ passe de 17 s à 300 °C, à 4.5 s à 350°C et à 1.5 s à 400°C.

Plus on diminue la température, plus la tension appliquée doit être augmentée pour assurer un bon collage.

Voltage (V) Temperature (°C)	600			800			1000		
	300	350	400	300	350	400	300	350	400
<i>Experimental</i>									
Peak current (mA)	0.33	1.1	2.9	0.49	2.0	5.0	0.86	2.7	7.1
Q_{exp} (mC)	18	20	29	23	29	41	28	37	56
Half-value time (s)	30	7.5	3.3	23	6.0	1.2	17	4.5	1.5

FIGURE 2.27 – Influence de la température sur le collage anodique. Paramètres expérimentaux relevés par Kanda et al. [84] pour 9 conditions de collages anodiques.

Pour savoir quelle est l'influence de la température sur les propriétés de collage, nous avons réalisé deux expériences sur des quarts de substrats 2 pouces de Pyrex à l'aide d'une électrode de 1 cm de diamètre. Les collages ont été réalisés sous 500V pendant 5 minutes, pour deux températures : 350°C et 215°C (figure 2.28).



FIGURE 2.28 – Influence de la température sur le collage anodique. A gauche, l'auréole rouge correspond à la toute petite zone collée qui a été repérée juste après le collage à 350°C, à droite, il n'y pas collage à 215°C

L'échantillon collé à 350°C a collé sur une faible surface (auréole rouge) mais celui-ci a cédé de lui-même au bout d'un jour. En revanche pour l'échantillon collé à température

plus faible, 215°C, au bout de 5 minutes, aucune adhésion entre les substrats n'était visible(ou alors trop faible pour ne pas se décoller en le manipulant).

Bien que ces protocoles expérimentaux ne soient pas optimaux pour ce test, nous pouvons conclure qu'en augmentant la température nous favorisons le collage. Ceci s'explique par le fait que la température facilite la dissociation du sodium contenu dans le Pyrex, ce qui rend le Pyrex plus conducteur.

Doremus et al. [69] ont d'ailleurs estimé que le Pyrex a une résistance de $10^7.9\Omega/\text{cm}$ et $10^6.4\Omega/\text{cm}$ à 250°C et 350°C respectivement. Ils ont également évalué l'énergie d'activation de dissociation à 93KJ/mol d'oxyde de sodium. Nous avons vu que la dissociation n'expliquait pas directement le collage, mais qu'elle permet la migration des ions dans le verre de manière indirecte. De plus, en diminuant la résistance des substrats, la chute de potentiel peut se concentrer à l'interface, augmentant la pression électrostatique et la bonne mise en contact.

2.II.C.6 L'influence de la pression mécanique

Un autre paramètre important sur lequel il est facile de jouer lors d'une étape de collage est la force exercée sur le système qui doit permettre une meilleure mise en contact initiale des substrats. Peu d'articles sont consacrés au problème de la quantification de la force d'adhésion. Datta et al. [43] donnent quelques mesures quantifiées de tests mécaniques de traction sur des échantillons collés anodiquement (Pyrex/a-Si/Pyrex). Il est aussi rapporté que la pression mécanique facilite le collage [78]. Dans les travaux de Hsieh et al. [78] sur des structures SiN_x - Pyrex, il a été montré une augmentation de la surface collée en augmentant la pression de 1000 Pa à 2000 Pa. Les auteurs concluent à une amélioration du collage malgré les limites de ce critère de pourcentage de surface collée comme nous l'avons discuté précédemment.

Nous avons remarqué que la courbure de nos substrats pouvait jouer un rôle important. La figure 2.29 de gauche présente des mesures de courbure typiques effectuées sur un substrat convexe (deux mesures effectuées avec une rotation de 90° sur le même substrat). Celle de droite décrit comment la courbure initiale des deux substrats peut avoir un rôle pendant le collage. Il convient d'utiliser plutôt deux substrats convexes et de les mettre en vis à vis centre contre centre. Dans ce cas (figure 2.29 en haut à droite), la pression extérieure permettra de faire progresser le collage du centre de la puce vers l'extérieur.

J'ai donc cherché à vérifier que cette géométrie de plaquage des deux substrats pouvait avoir un rôle important. Quatre différents protocoles ont été testés et m'ont permis d'obtenir une information qualitative quant à la relation entre la qualité du collage et la courbure des substrats (cf. tableau 2.3). Le sens de concavité des substrats a été testé : situation 1 avec des plaques concaves et situation 2 avec des plaques convexes comme indiqué dans la figure 2.29. J'ai aussi testé la manière d'appliquer une pression sur les substrats, en appliquant deux protocoles :

- « protocole à trois étapes de pression » : de façon progressive avec 1/ sous 1 électrode de 1 cm de diamètre avec 2 poids correspondant à une pression de 3.82

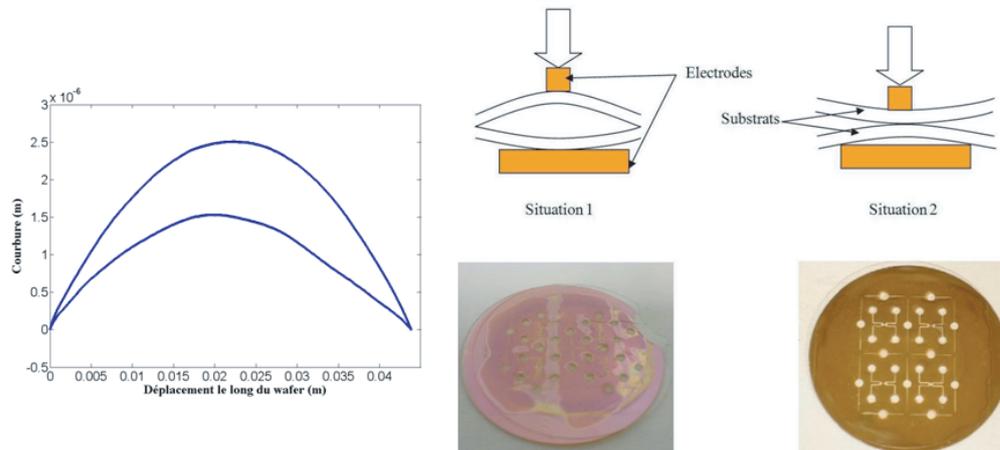


FIGURE 2.29 – A gauche, courbure typique d’un substrat convexe de Pyrex de 500 μm d’épaisseur : les deux mesures de courbure sont réalisées à 90° sur le même substrat. A droite, influence de la concavité des substrats de Pyrex sur la géométrie

kg/cm² pendant 10 minutes, puis 2/ sous une seconde électrode de 1,5 cm de diamètre avec 3 poids pour une pression de 2.82 kg/cm² pendant 10 minutes, et enfin 3/ sous une électrode de 2 cm de diamètre avec 4 poids soit une pression de 2.23 kg/cm² pendant une heure.

- « protocole à une seule étape de pression » : dans ce cas, on effectue uniquement la dernière étape sous une pression de 2.23 kg/cm² pendant une heure 20 minutes.

Protocole	1 étape de collage	3 étapes de collage
Situation 1	non homogène	non homogène
Situation 2	non homogène	homogène

TABLE 2.3 – Influence du protocole d’application de la pression mécanique sur la qualité du collage

Ces observations s’expliquent par la courbure des substrats. En effet, nous avons vu que la pression électrostatique rapproche de proche en proche les substrats, la pression mécanique s’ajoute alors à celle-ci permettant une surface en contact plus importante dès le début de l’expérience. Dans notre cas, le protocole multi électrodes en 3 étapes permet de s’affranchir du mauvais contrôle de l’application de la pression de notre système expérimental où la planarité des électrodes en laiton est impossible. En commençant par une petite surface, nous limitons les effets néfastes due à la mauvaise planarité des électrodes. Le protocole en trois étapes, avec les substrats flèche contre flèche (situation 2) a été retenu à la suite des observations de ce paragraphe.

- Dans cette sous partie, j'ai étudié expérimentalement (pas de théorie suffisante sur l'influence des paramètres pertinents) quelles étaient les conditions les plus favorables pour obtenir un dispositif fluidique opérationnel.
- Un protocole optimal a pu être développé prenant en compte les paramètres pertinents de la littérature : le temps de collage, la tension et la température appliquées pendant le collage anodique.
- La tension appliquée a été fixée à 500V : tension maximale appliquée pour ne pas causer de claquage dans la couche nanométrique de silicium amorphe (plus la tension appliquée est forte, plus la temps de collage est faible).
- La température a été fixée par le set-up : il s'agit de la température maximale du bondeur (plus la température est forte plus le collage est rapide).
- Le temps d'une heure est le temps minimal pour le couple (V,T) retenu.
- Les trois paramètres étant interdépendants, le trio retenu pour la suite est (temps = 1 heure, tension appliquée = 500V, température = 350°C).

2.II.C.7 Les autres paramètres chimiques

Nous venons de traiter dans la partie précédente, les paramètres les plus fréquemment discutés et rencontrés dans la littérature. Cependant, j'ai voulu optimiser encore plus le temps de collage. Des paramètres annexes sont donc discutés dans cette partie dans le but d'optimiser encore plus le temps de collage et pourquoi pas, aller plus loin dans la compréhension du phénomène.

2.II.C.7.a Le rôle de la nature du verre

Les premiers travaux sur le collage anodique rapportent un collage entre un verre contenant du sodium et des métaux [64] [80] [88]. Parmi les verres contenant du sodium on peut citer le Pyrex qui est le verre borosilicate le plus connu. Il n'a pas été rapporté de limitation quant à l'épaisseur des substrats en verre, même s'il existe dans la littérature une grande diversité dans ce domaine [80]. Cependant, il ressort de la bibliographie que la nature du matériau à coller au verre est déterminante pour le collage [64] et pour la cinétique de migration des ions.

La dissociation des oxydes de sodium et la migration des ions sodium (et pas des ions oxygène) étant à l'origine de la polarisation à l'interface verre-diélectrique, on comprend que la composition du verre choisi est très importante.

Nous avons cherché à savoir si le pyrex était le seul verre permettant de réaliser un collage anodique. Nous avons donc testé un autre verre borosilicate : le D263 Schott. Même si ses caractéristiques physiques diffèrent légèrement de celles du Pyrex (voir tableau 2.2), sa concentration en Na_2O est proche de celle du Pyrex.

	Pyrex	D263
Propriétés thermiques		
Coefficient thermique d'expansion (0/300°C)	$32 \times 10^{-7} \text{ m/}^\circ\text{C}$	$72 \times 10^{-7} \text{ m/}^\circ\text{C}$
Température de recuit	560°C	557°C
Température de ramollissement	821°C	736°C
Propriétés mécaniques		
Densité	2.23 g/cc	2.51 g/cc
Module d'Young	64 GPa	72.9 GPa

TABLE 2.4 – Propriétés physiques des deux types de verre testés.

Nous n'avons cependant pas eu accès à sa composition précise. J'ai déterminé sa vitesse de gravure en milieu acide dans un bain HF (HF(40%)/H₂O/HCl(37%) 10 : 20 : 3) à température ambiante. Elle est de 2,1 $\mu\text{m}/\text{min}$, soit 5 fois plus grande que celle du Pyrex dans les mêmes conditions (figure 2.30). Notons aussi que le coefficient de dilatation du D263 est plus élevé que celui du pyrex et plus proche de celui du film a-Si.

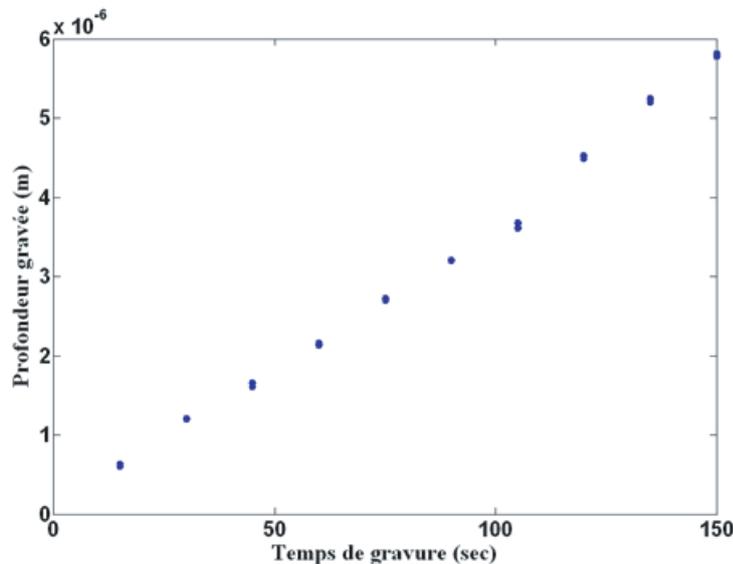


FIGURE 2.30 – Vitesse de gravure du D263 mesurée après immersion dans une solution de H₂O/HF (40%)/HCl (37%) 20 :10 :3

J'ai, en premier lieu, cherché à vérifier la qualité de surface de ces types de verre puisque nous avons vu précédemment qu'amorcer un contact intime entre les deux plaques est très important. La figure 2.31 présente les mesures AFM enregistrés sur deux substrats de verre vierges, qui ont juste subi un nettoyage dans un bain d'acétone

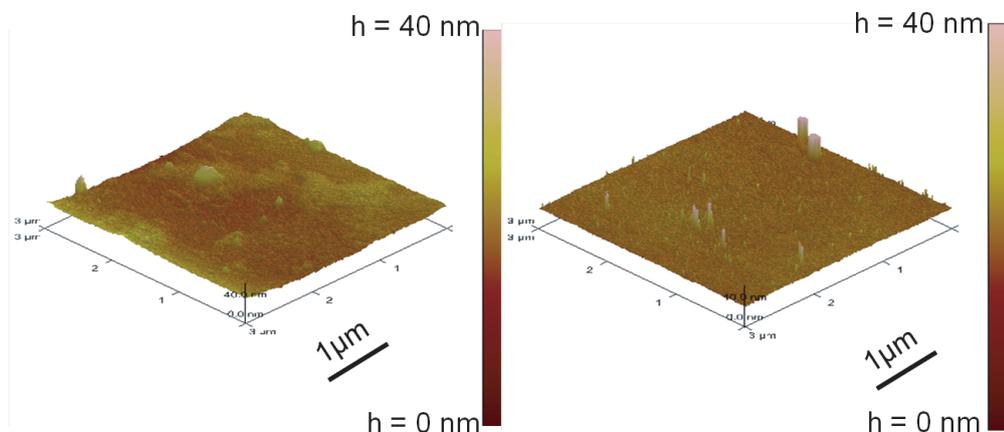


FIGURE 2.31 – Cartographie de la surface obtenue par microscopie à force atomique (AFM) des substrats de Pyrex à gauche et de D263 à droite.

sous ultrasons pendant 15 minutes. La rugosité globale moyenne (RMS = Root Mean Square, ou valeur quadratique moyenne) du D263 est de 4.37 nm (à droite sur la figure 2.31), alors que celle du Pyrex est de 0.4 nm, soit 10 fois plus faible (à gauche sur la figure 2.31).

La courbure des plaques est également différente, comme le montre la figure 2.32 : le verre D263 présente un changement de courbure à 90° dans le plan et « ressemble à une chips » alors que le Pyrex présente une déformation convexe régulière sous forme de calotte sphérique.

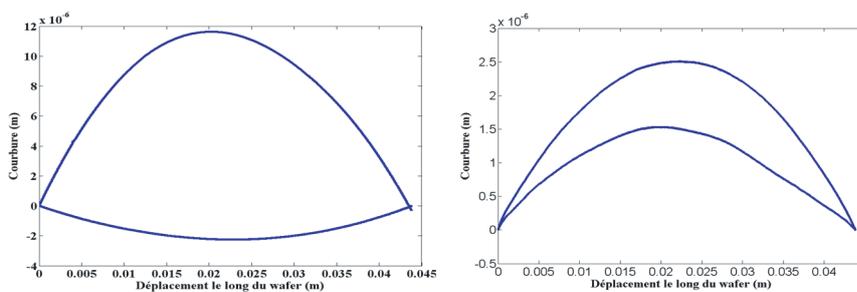


FIGURE 2.32 – Courbure typique des verres en D263 (à gauche) et Pyrex dont je disposais durant ma thèse. Les deux mesures sont réalisées sur le même substrat à 90° .

Pour comparer ces deux verres borosilicates, j'ai estimé leur capacité respective à coller sur un film mince en a-Si. Un dépôt de 300 nm de a-Si obtenu par PECVD a été réalisé sur les deux substrats différents. Un recuit de 4h à 400°C est effectué pour relâcher les contraintes de la couche de a-Si et pour assurer une bonne adhésion à l'in-

terface substrat - diélectrique. Les substrats sont nettoyés sommairement (flux d'azote comprimé), puis mis en contact et collés anodiquement sur un montage fait maison (figure 2.33a). Pour la dernière étape, les substrats sont portés à 230°C sous 1500 V pendant 10 minutes, sous une électrode cathodique de diamètre 1 cm et une pression de 3.82 kg/cm². Ensuite, l'électrode est changée (diamètre 1,5 cm) et une pression de 2.82 kg/cm² est appliquée pendant 10 minutes supplémentaires. Enfin, la dernière étape de collage consiste à appliquer la grande électrode de 2 cm de diamètre pendant une heure sous une pression de 2.23 kg/cm².

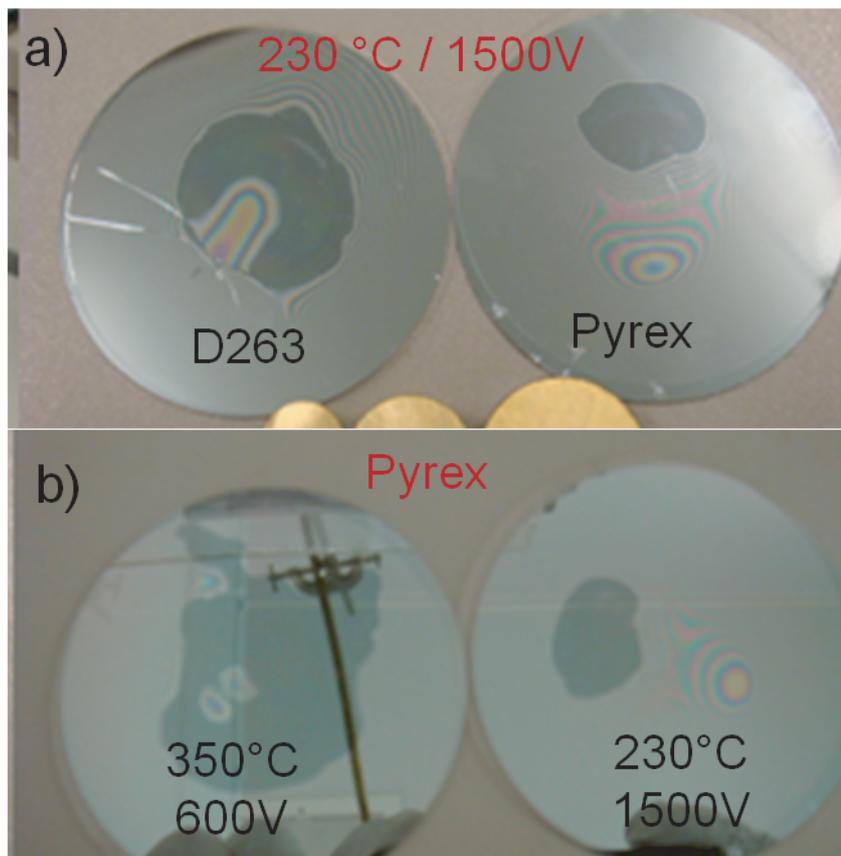


FIGURE 2.33 – a) Collage anodique à 230°C et sous 1500 V de 2 verres borosilicates - à gauche D263 et à droite Pyrex©. b) substrats de pyrex© de 2 pouces, à gauche collé à 350°C et sous 600 V ; à droite collé à 230°C et sous 1500 V.

Sur la figure 2.33 a), le verre D263 est visible sur la photo de gauche et le Pyrex sur la photo de droite. La zone collée est sensiblement la même, pour ces deux photos enregistrées plus d'un jour après le collage. La force d'adhésion semble visuellement un peu moins bonne pour le Pyrex. Toutefois, nous connaissons les limites de ce critère du pourcentage de surface collée. Malgré un coefficient de dilatation thermique du D263 plus

proche de celui du film mince a-Si, on observe une fissure sur le substrat supérieur (la figure 2.33 a) de gauche), qui met en évidence une plus grande fragilité du D263 à la température. A faible température, le D263 semble donc un meilleur candidat, mais à plus forte température, il se fragilise et le Pyrex semble être un meilleur substrat avec notre protocole.

La figure 2.33 b) quant à elle montre deux substrats de Pyrex collés suivant deux conditions différentes. Ici, nous n'avons pas observé de retrait du front de collage plusieurs jours après le collage. Le collage à 350°C et sous 500 V permet donc d'obtenir une meilleure tenue mécanique d'adhésion du tricouche. Notons que le D263 n'a pas pu être testé à 350°C, car il éclate s'il est posé directement sur les électrodes à cette température. Cette plus grande fragilité du D263 à haute température s'explique par un coefficient de dilatation thermique double de celui du Pyrex (cf. tableau 2.2 : 3.2 et 7.2 $\mu\text{m}/^\circ\text{C}$ respectivement pour le Pyrex et le D263), qui quant à lui est bien connu pour sa bonne résistance thermique. En conclusion, pour toutes ces raisons, le Pyrex a été préféré pour toutes nos expériences en collage anodique.

2.II.C.7.b Nettoyage et prétraitement chimique

Que ce soit dans le domaine de la microélectronique ou de la microfluidique, les poussières peuvent avoir un effet très néfaste sur les dispositifs finaux. Ceci est aussi critique pour l'étape du collage. En effet, avec des substrats rigides, qui ne peuvent pas se déformer autour d'une impureté, il en résulte une zone non collée. Plusieurs nettoyages ont été recensés dans la littérature. Pour retirer d'abord les graisses, on utilise des nettoyages aux solvants (trichloréthylène, acétone, isopropanol). On prolonge le nettoyage par une gravure humide en milieu acide. Les nettoyages acides les plus fréquents sont ceux qui utilisent l'acide fluorhydrique (HF) et/ou la solution dite « piranha » (à base d'acide sulfurique). En plus d'éliminer les poussières à la surface, ces nettoyages vont avoir une influence sur l'étape de collage [77] [78]. La littérature mentionne qu'après un nettoyage acide (à base de HF), le temps de collage anodique est réduit. Nitzsche et al. [75] rapporte aussi l'importance de la présence d'eau absorbée à la surface du verre.

Nous avons testé le rôle d'une gravure acide sur le collage d'un film de 50 nm de a-Si (figure 2.34). La courbe en noir présente l'évolution du courant en fonction du temps enregistrée lors d'un collage effectué juste à la sortie du bâti de PECVD. La seconde courbe en rouge montre l'évolution du courant d'un même film a-Si/verre un jour après le dépôt PECVD et après un nettoyage $\text{H}_2\text{SO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ (3 :1). La photo de la figure 2.34 montre le collage ainsi obtenu. Les traitements de surface ont donc une influence ce qui n'est pas surprenant puisqu'ils modifient la composition chimique des substrats à l'interface. La littérature fait également référence à l'influence des nettoyages [77] et à celle des prétraitements chimiques (sous plasma [89] ou sous atmosphère riche en oxygène [73]).

Nous avons cherché à identifier quelle est la meilleure préparation de l'état de surface des échantillons. Plusieurs paramètres tels que les bains (AF, NaOH, ammoniacque), la rugosité du substrat de verre ainsi que les recuits du diélectrique ont été testés (tableau 2.5).

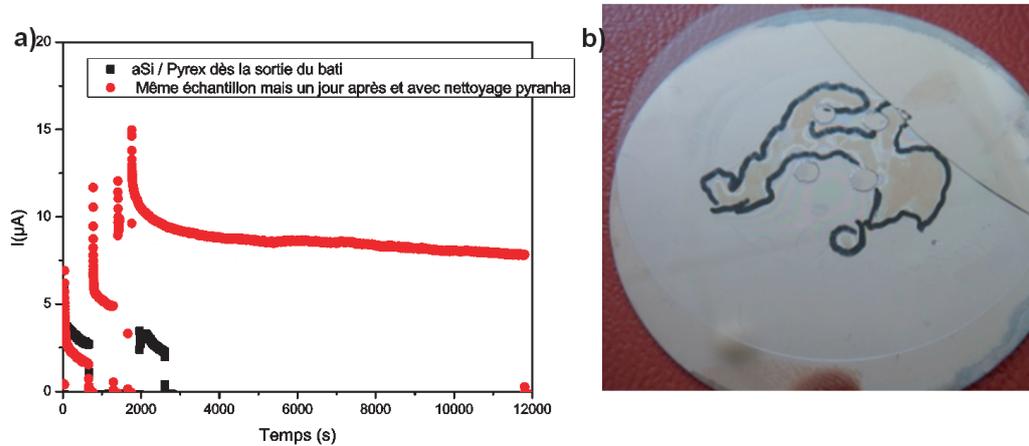


FIGURE 2.34 – Illustration des propriétés de collage en fonction du temps de collage et d'un prétraitement. a) En noir, collage immédiat après dépôt diélectrique, en rouge collage d'un même film le lendemain matin qui suit le dépôt et après un nettoyage au piranha et rincage à l'eau EDI. b) photo du dispositif après étape du collage en rouge.

Conditions de collage	I	II	III	IV	V	VI
Ratio d'échantillons OK après test mécanique	0/4	4/4	0/4	1/4	2/4	2/4
Rq		Surface collée supérieure à 100%			Grande surface, grains entre les substrats	Grains entre les substrats

TABLE 2.5 – Ratio d'échantillon « pyrex/a-Si(50 nm)/pyrex » collés à 350°C et sous 500 V ayant passé avec succès le test de tenue mécanique pour différents protocoles de collage : I) La rugosité du substrat de verre a été augmentée par RIE pour atteindre une RMS de 20 nm, le temps de collage a été de 30 minutes ; II) juste avant le collage, les 2 substrats ont été plongés dans un bain AF pendant 1 minute puis rincés 30 secondes à l'EDI, le temps de collage est de 30 minutes ; III) même protocole mais bain à base d'ammoniaque de 30 minutes à la place du bain d'AF ; IV) même protocole mais bain NaOH (0,25 M) pendant 1 minute ; V) pas de prétraitement chimique mais recuit après dépôt et avant collage de la couche de a-Si de 4h à 400°C, temps de collage de 45 minutes ; VI) idem mais avec un recuit de 8h.

La rugosité du substrat de verre passe d'une valeur RMS de l'ordre du nm à 20 nm après gravure RIE (plasma à base SF₆) (colonne I). Cette rugosité n'a pas eu de réels effets puisque les rapports restent inchangés par rapport à un collage de 30 minutes avec une rugosité proche du nanomètre (cf. tableau 2.2).

Les bains RCA (NH₃ (28%)/H₂O₂/H₂O 1 : 1 : 5), colonne III, et NaOH, colonne IV, n'ont pas non plus eu d'effets notables sur le collage.

Les recuits à 400°C du a-Si après dépôt PECVD (colonnes V et VI), ne change pas la qualité du collage. Cependant, visuellement la zone collée est plus importante que sans le recuit. Par contre, on commence à observer de nombreux grains dans la couche de a-Si. Ces grains sont-ils des grains de sodium ? Leur observation à l'interface suggère que le transport des ions sodium est facilité par la haute température. Ces grains peuvent laisser penser que la couche de silicium est fragilisée et que l'étanchéité de cette couche n'est plus assurée.

Seul le nettoyage AF permet une tenue suffisante des substrats dès 30 minutes de collage. Notons également que la zone de collage s'étend visuellement au-delà des électrodes (= surface collée > 100%)

Les bons résultats obtenus avec le prétraitement à l'acide fluorhydrique AF s'expliquent par le fait que ce prétraitement supprime la couche de silice native à la surface du a-Si. On sait que cette couche fine de quelques nanomètres se développe par oxydation sous l'air ambiant. Le collage doit donc avoir lieu juste après le bain AF et un rinçage EDI court de 30 secondes, pour éviter que la couche de silice ne se reforme. Sans couche de silice pré-existante, la formation des liaisons Si-O-Si à l'interface avec le pyrex est améliorée.

Les deux autres bains n'ont pas conduit aux mêmes résultats. Nous avons testé le bain RCA pour sa propriété à rendre les surfaces hydrophiles avec des liaisons -OH en surface. Le but du NaOH était d'augmenter la taille de la couche d'eau adsorbée à la surface du Pyrex. En effet, une étude récente [75] mentionnait que l'adhésion provenait de la présence d'une fine couche d'eau diffuse à la surface du Pyrex. Cette couche mesurant typiquement 500 nm, nous avons cherché à augmenter son épaisseur par le traitement au NaOH. Nos tests tendent à démontrer que, soit la couche d'eau naturellement présente dans le verre de 500 nm suffit, soit ce n'est pas un paramètre pertinent pour le collage anodique.

Cette dernière partie nous a permis de démontrer le rôle important de la préparation chimique de la surface avant collage, paramètre clé qui vient s'ajouter à tous les autres paramètres cités précédemment comme la température et la tension pour obtenir un collage viable et fabriquer des puces fluidiques dures. Dans la suite, nos échantillons seront toujours nettoyés avec un bain d'AF qui optimise le protocole de collage anodique.

2.II.C.8 Conclusions sur la technologie « pyrex/a-Si(50 nm)/pyrex »

- Cette partie m’a permis, à partir de la littérature ainsi que des premiers tests de collage anodique réalisés au LPN par P. Svarnas et A. Plecis de lister les paramètres pertinents jouant sur le collage anodique : température, tension, temps de collage, protocole de mise en contact ainsi que prétraitement chimique.
- L’étude, d’après la littérature, des phénomènes mis en jeu et les modélisations existantes permettent aujourd’hui de comprendre l’importance du type de verre choisi. En effet, le Pyrex, même si il n’est pas le seul possible, est un des candidats privilégiés pour cette technique au vue de sa composition chimique. La présence de sodium en son sein est nécessaire à la formation d’une région polarisée dans le verre en face du diélectrique. La migration du Na semble d’ailleurs à ce jour bien comprise et modélisée [87].
- Cependant, aucun modèle ne permet de comprendre précisément la cinétique de formation de liaisons interfaciales permettant l’adhésion.
- Un protocole précis pour le système a également pu être défini. En effet, lors de mon arrivée en thèse au LPN, seulement la moitié des dispositifs fabriqués étaient viables. Ce manque de reproductibilité de dispositif fiable était d’autant plus problématique qu’une partie des puces ne cédaient qu’une fois installées sur le set-up. Des fuites de liquide rendaient alors inexploitable une partie des données recueillies.

Le protocole ainsi retenu à l’issue de cette étude est donc le suivant :

→ Nettoyage et traitement chimique des substrats dans un bain de Fluorure d’Ammonium (AF) (Sigma Aldrich référence 40207) pendant 1 minute et rinçage à l’EDI pendant 30 secondes.

→ Mise en contact des substrats sur la plaque chauffante (et chaude) à 350°C.

→ Mise sous tension à 500V avec une petite électrode (1 cm de diamètre) au centre du motif pendant 10 minutes.

→ Changement de l’électrode (2 cm de diamètre) et 500V pendant 10 minutes.

→ Changement d’électrode pour une électrode recouvrant l’intégralité du motif (4 cm de diamètre) et 500 V pendant 1 heure.

→ Eviter les fortes descentes de température (ne pas enlever les substrats collés pour les mettre sur une pièce métallique froide par exemple.)

2.II.D La première génération de puces « verre/a-Si/verre »

2.II.D.1 La non-reproductibilité : état de l’art à mon arrivée en thèse

Juste avant mon arrivée en thèse, un stage de 4 mois a eu lieu pour amorcer les recherches sur les propriétés de transport ionique à travers une nanofente au LPN. La figure 2.35 représente le circuit fluidique de la première génération de puce, fabriquée

comme décrit dans le paragraphe précédent.

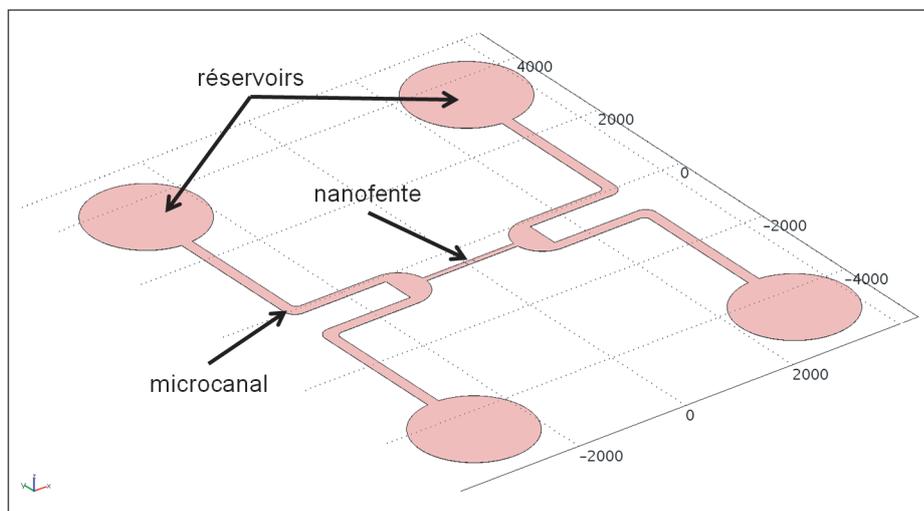


FIGURE 2.35 – Schéma de la géométrie des puces fluidiques utilisées avant et au début de ma thèse, les cotes sont en microns (largeur des canaux = $100\ \mu\text{m}$; longueur nanofente = $100\ \mu\text{m}$; hauteur microcanal = $2.5\ \mu\text{m}$ et hauteur nanofente = $60\ \text{nm}$).

Ces premiers résultats obtenus par Darwinn Duong et Adrien Plecis [46] ont permis d'effectuer les premières électropréconcentrations du LPN (figure 2.36). La ROI (Region of Interest) représente la zone dans laquelle l'intensité fluorescente est observée. L'anode est à gauche de l'image et la cathode à droite, la ROI est donc dans le microcanal cathodique, $x = 0$ étant à l'interface nanofente / microcanal cathodique.

Les courbes de la figure 2.37 représentent les profils de concentration de la fluorescéine en fonction de la position dans le microcanal cathodique pour plusieurs temps (du plus foncé au plus clair pour suivre l'évolution temporelle). Ces résultats sont obtenus par visualisation de fluorescéine dans une solution de $10\ \mu\text{M}$ de KCl. Nous pouvons voir que plus le temps augmente plus la concentration augmente. Ces observations sont conformes à la littérature en ce qui concerne la préconcentration cathodique de fluorescéine. En effet, la préconcentration d'ions très mobiles (c'est-à-dire à forte mobilité électrophorétique) a déjà été observée du côté cathodique de la nanofente [43].

Cependant, il est important de noter la forte dispersion des mesures représentées. La série d'expériences de la figure 2.37 a permis de mettre en évidence un manque de reproductibilité. Le même protocole a été utilisé pour ces 4 séries de courbes de cette figure, elles ont toutes été réalisées dans la même heure. Le comportement est fortement modifié, car en plus de l'augmentation progressive du maximum de préconcentration entre la première série et la dernière, le point de focalisation se déplace de plus en plus et s'éloigne de la nanofente. En conséquence, les résultats qui en résultent comportent une incertitude d'environ 30 %. Ces résultats ne sont donc que qualitatifs. Pour obtenir des résultats fiables et facilement comparables avec la théorie, je me suis attaché dès le

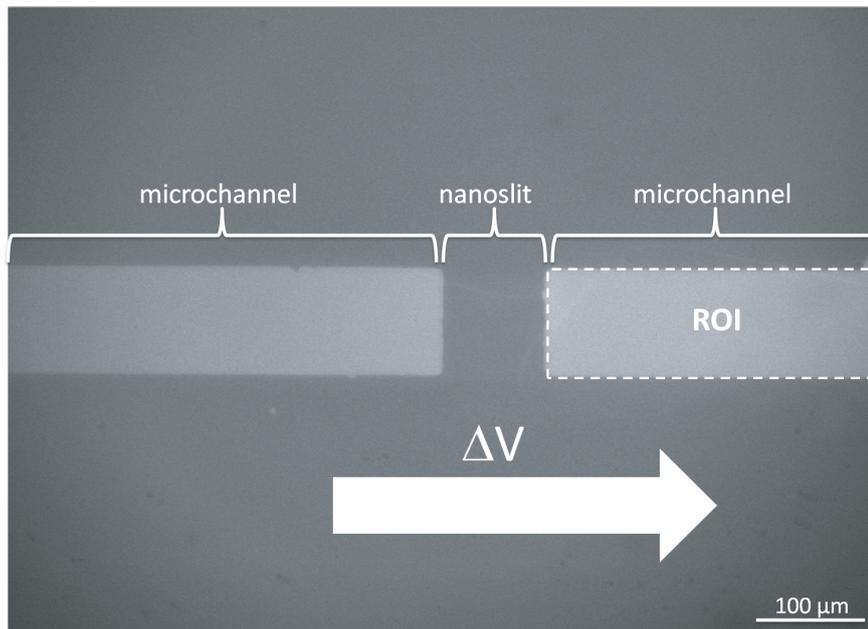


FIGURE 2.36 – Image de la zone MNM pendant les expériences d'électropréconcentration, la ROI (Region of Interest) représente la zone dans laquelle l'intensité fluorescente est observée. L'anode est à gauche de l'image et la cathode à droite, la zone d'observation ROI est donc située dans le microcanal cathodique.

début de ma thèse à améliorer la reproductibilité des expériences.

Pour quelles raisons obtenait-on de telles variations pour une expérience identique ?

Si l'on se réfère à la théorie de l'électropréconcentration développée dans le premier Chapitre, nous obtenons un nombre conséquent de paramètres et donc un grand nombre d'explications possibles. Parmi elles notons qu'interviennent la charge de surface, le potentiel électrique, la géométrie, la force ionique, la mobilité de la sonde étudiée ainsi que les propriétés mécaniques (i.e. la viscosité) du fluide.

La géométrie que nous utilisons une technologie de puce « dure » donc à priori très peu déformable. Il en est de même la viscosité du fluide car, pour les concentrations des produits que nous étudions, il ne doit pas y avoir de phénomènes rhéologiques.

Reste le problème de la charge de surface et de la mobilité de la sonde qui pourraient être dues à des modifications de pH d'une expérience à l'autre (cinétique de modification des charges de surface du verre). Il reste aussi le potentiel électrique appliqué. Celui-ci est appliqué à l'aide d'un S.M.U (Source Measurement Unit) Keithley 237 (cf. Chapitre 3) qui est à priori très stable pour la précision voulue (de l'ordre du volt). Cependant, il faut que toute la chute de potentiel ait lieu à travers le circuit fluidique. Nous savons qu'il se crée une zone de polarisation et que ce phénomène modifie la concentration

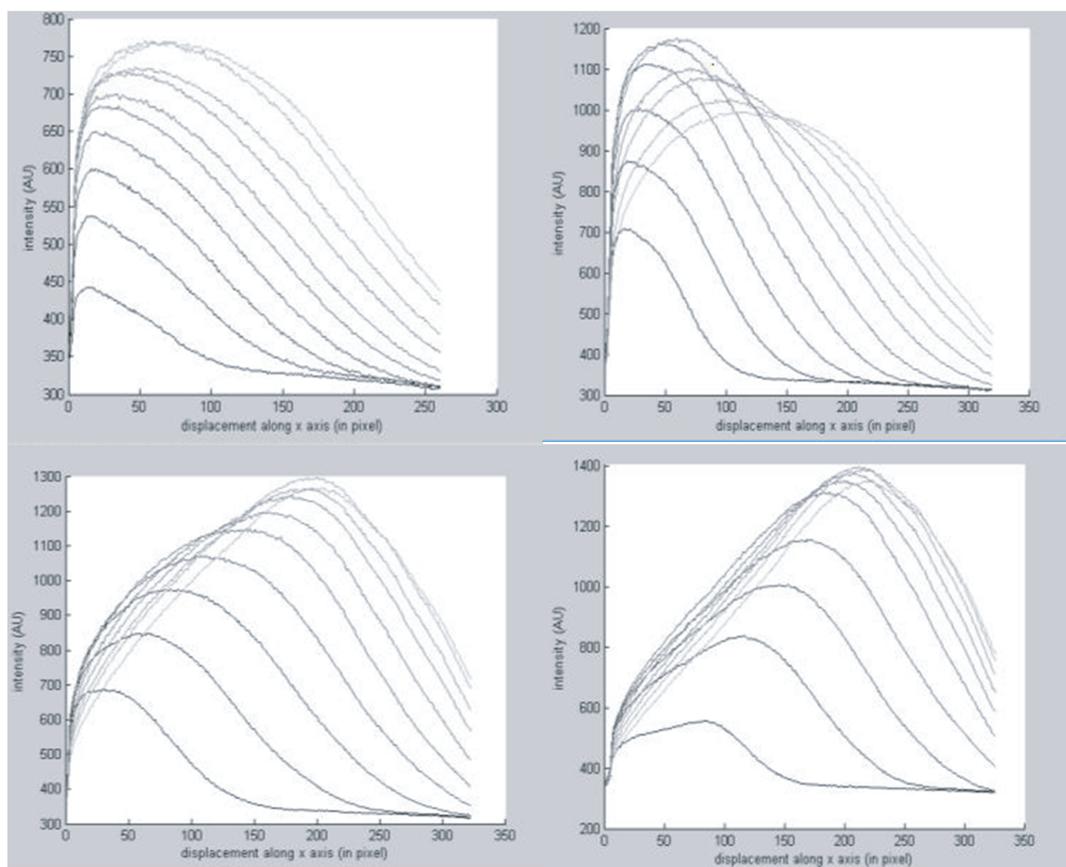


FIGURE 2.37 – Variation de la figure de préconcentration à faible force ionique, en fonction de la position dans le microcanal cathodique. Quatre séries de 3 préconcentrations successives à $10 \mu\text{M}$ de KCl (50 V entre les réservoirs) ont été effectuées après avoir laissé le dispositif pendant une nuit dans l'eau déionisée. On observe le décollement progressif du front de préconcentration qui semble impliquer une augmentation de la charge de surface et du flux electro osmotique au cours des expériences (chronologie de gauche à droite et de haut en bas).

localement. Il s'agirait donc plutôt de savoir pourquoi la modification de celle-ci n'est pas reproductible. Ceci pose le problème des éventuelles fuites électriques à travers les matériaux. La partie suivante est consacrée à la compréhension et à la recherche et à l'amélioration de notre puce pour augmenter la fiabilité de nos mesures.

2.II.D.2 Les puces « verre/a-Si/verre » sont elles viables ?

2.II.D.2.a Mesures électrochimiques et durée de vie

Une des premières priorités de mes travaux aura été de comprendre l'origine de la non reproductibilité et de réduire les erreurs sur nos mesures. Le plus simple des tests à

réaliser était de s'assurer que les conditions initiales en concentration étaient correctes. En effet, dans la partie centrale comprenant la nanofente entre les microcanaux, il est difficile d'amener des espèces ioniques sans créer de polarisation (effet de perméabilité sélective de la nanofente). Nous nous sommes rendus compte qu'au bout d'une journée de test, la puce était dégradée (figure 2.38), engendrant des résultats aberrants. L'image de la figure 2.38 montre une forte dégradation de la couche intermédiaire en a-Si côté anodique.

L'hypothèse de la consommation de a-Si créant ainsi des passages fluidiques « parallèles » et des fuites (ou court-circuits) électriques a donc été étudiée.

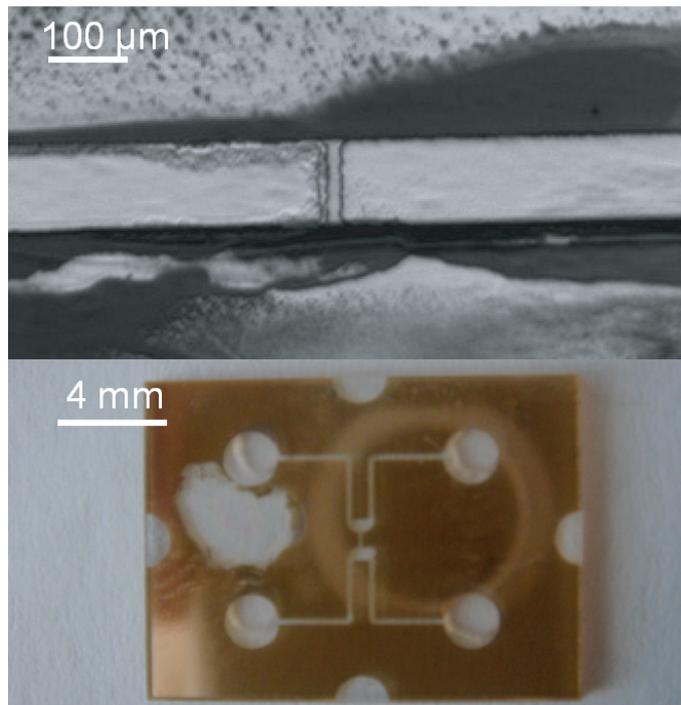


FIGURE 2.38 – Mise en évidence de la dégradation de la couche intermédiaire de a-Si après expériences. En haut, aux alentours de la nanofente de $20 \mu\text{m}$ de large (image au microscope) ; en bas, à côté des réservoirs (vue macro).

Un design spécifique de puce fluidique, proche de celui des puces pour électropréconcentration a été réalisé (figure 2.39). Deux microcanaux ont été séparés au centre par une zone de $20 \mu\text{m}$ de a-Si. La zone de séparation supporte la quasi totalité de la chute de potentiel dans la puce, c'est donc à cet endroit que surviennent les dégradations. Ainsi, la consommation d'une bande de a-Si a pu être étudiée en milieu aqueux.

Deux types de mesures électriques ont été effectués grâce à ces puces (figures 2.40 et 2.41). La résistance entre les deux microcanaux en fonction du potentiel appliqué a d'abord été mesurée. Le suivi de la résistance pour un tension appliquée fixée de 100V

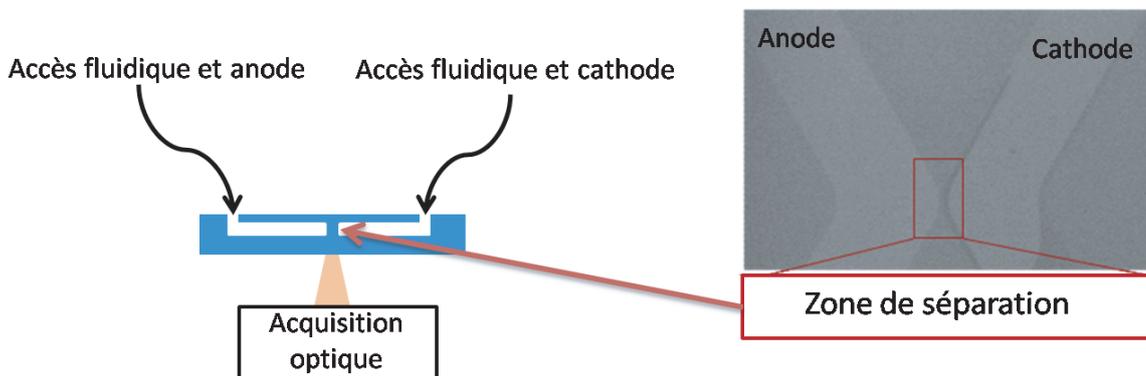


FIGURE 2.39 – A gauche : schéma du dispositif permettant de tester la résistance à l'électrochimie de nos dispositifs. La zone de séparation supporte la quasi totalité de la chute de potentiel dans la puce, c'est donc à cet endroit que surviennent les dégradations. A droite, image de la puce et de la zone de séparation.

en fonction du temps a ensuite été réalisé. Durant ces expériences un écoulement (du haut vers le bas sur la figure 2.39 droite) d'une solution de KCl de 1M a été effectué pour renouveler le liquide. Sur la figure 2.40, trois zones distinctes peuvent être observées : proche de zéro la résistance tend vers l'infini, puis la résistance reste à peu près stable à quelques MOhms, puis vers 40 V elle augmente brutalement (une dizaine de MOhms) avec le potentiel et la courbe est plus « accidentée ». A mesure que la résistance augmente, nous avons observé la croissance de bulles du côté cathodique (figure 2.40b). Les chutes puis remontées de résistances sont dues à l'éjection d'une bulle à l'interface, lorsque la bulle se reforme, la résistance augmente de nouveau.

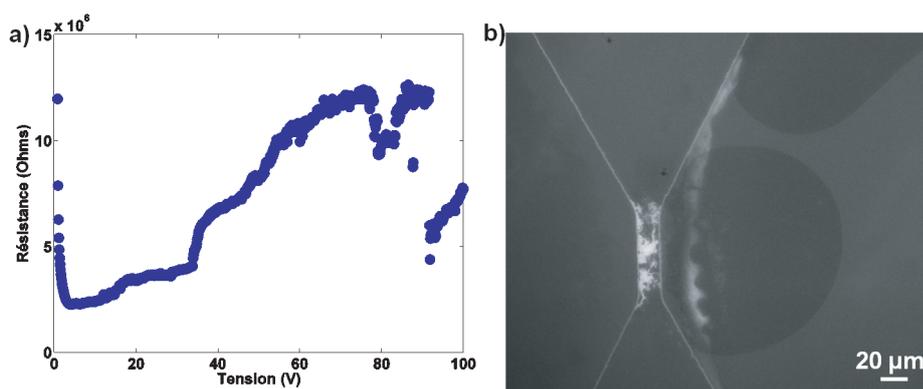
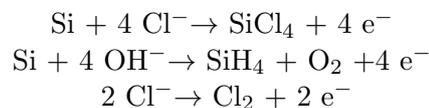


FIGURE 2.40 – Tests électriques de résistance de la couche intermédiaire de a-Si. a) Suivi de la résistance du système en fonction de tension appliquée pour une solution de 1M de KCl et une circulation de fluide imposée par une pression de 0.9 bar dans les microcanaux. b) Visualisation des bulles se développant lors de l'expérience b).

A partir des figures 2.40 a et b, plusieurs éléments montrent que la couche de a-Si réagit électrochimiquement avec la solution de KCl. La résistance proche de 0V tend vers l'infini pour chuter brusquement. Cette chute à lieu à la tension de seuil électrochimique pour que les électrons puissent entrer ou sortir de la solution (interface liquide / solide).

Ayant deux interfaces solide-liquide, nous ne pouvons déterminer s'il s'agit d'un transfert électronique avec les électrodes de platine ou s'il s'agit de l'électrochimie entre KCl et a-Si. L'augmentation de la résistance dans la dernière partie de la courbe a ainsi que la figure b est due à la formation de bulles visualisées sur la figure 2.40b. En effet, sans circulation efficace de fluide, les bulles du gaz produit par électrochimie ne sont pas évacuées et réduisent la surface de contact solide-liquide. La visualisation de la formation des bulles dans les canaux, surtout côté cathodique, nous permet de conclure à l'électrochimie entre le a-Si et le KCl (ou molécules d'eau). Les réactions avec l'anode et dégageant un gaz nous donnent trois possibilités :



La dernière équation n'expliquant pas la consommation de la couche intermédiaire, elle n'a pas d'intérêt pour notre problème de dégradation de puce. Pour savoir laquelle de ces réactions consomme le a-Si, j'ai procédé à un changement de solution : une solution de PB (Phosphate Buffer) à 50 mM et une solution d'EDI qui ne contenaient pas d'ions chlorure. La résistance augmente alors à une valeur d'environ 100 MOhms et nous n'observons plus de bulles au microscope. La consommation de la couche a-Si serait donc due à la présence d'ions Cl^- dans la solution, qui rendraient la première équation bilan prépondérante. Cependant, peut-on conclure que la détérioration de nos puces peut être éliminée en changeant de solution ? N'y a-t-il pas tout de même consommation de a-Si par le biais de la deuxième équation (ou autre) ?

Pour tester la durée de vie de nos dispositifs, j'ai imposé un potentiel de 100V entre les deux microcanaux. J'ai suivi au cours du temps l'évolution de la résistance (figure 2.41). Sur la courbe a), le temps $t=0$ seconde correspond au premier point de mesure après trois expériences de 4000 secondes à 100 V soit plus de trois heures. Nous pouvons voir vers 2000 secondes (soit 14 000 secondes en prenant en compte les 3 précédentes expériences) une chute assez brutale de la résistance. Je pense qu'à ce moment, le a-Si ayant été consommé, un circuit fluide parallèle s'est créé à travers la couche intermédiaire. La photo en haut de la figure 2.41b montre le dispositif utilisé avec le KCl à la fin des expériences. La consommation de a-Si est ici flagrante. La photo en bas de la figure 2.41b est une puce après expérience, mais avec une solution de PB 50mM. Les images de la figure 2.41c montrent la dégradation s'accroissant avec le temps passé à forte tension pendant les expériences avec KCl.

Grâce à la chute brutale de la résistance, nous avons pu déterminer la durée de vie pour ce type de puce. Malgré un ordre de grandeur pour les valeurs de résistance (tableau 2.6), la durée de vie reste la même que se soit pour une solution de KCl, de PB ou d'EDI.

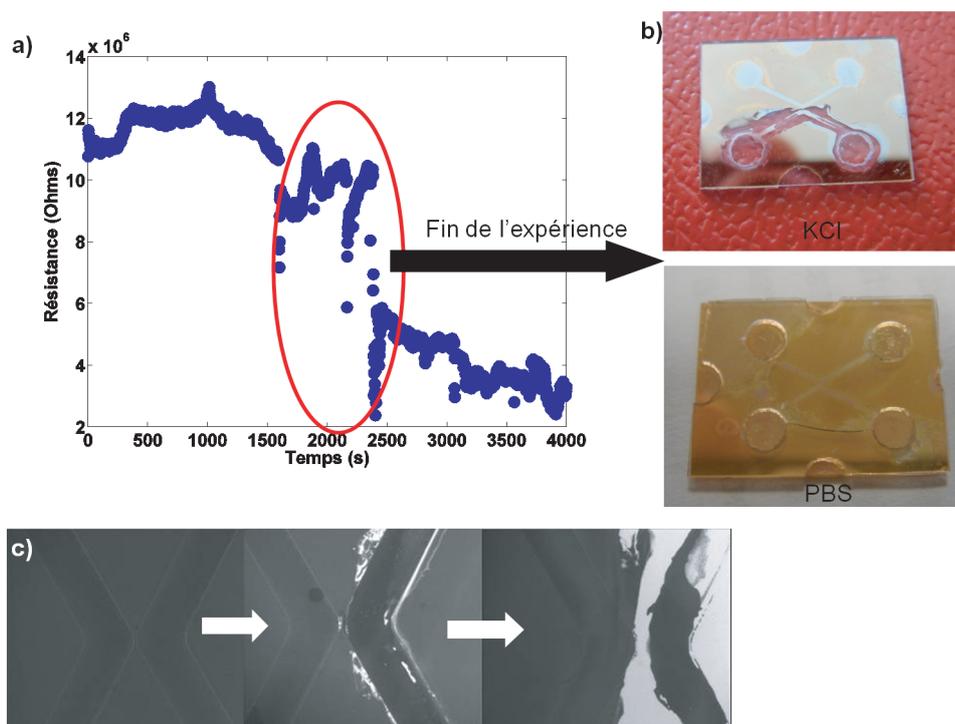


FIGURE 2.41 – a) Suivi de l'évolution de la résistance électrique à travers le dispositif pour une tension de 100V. b) Photo de dispositif après ces expériences mettant en évidence la consommation du a-Si. c) Dégradation au cours du temps de la couche intermédiaire visualisée grâce au microscope.

	R_{EDI}	R_{PB} (50mM)	R_{KCl} (1M)	Durée de vie
a-Si (50nm)	$\approx 90M\Omega$	$\approx 100M\Omega$	$\approx 10M\Omega$	> 4h à 100V

TABLE 2.6 – Résistance et durée de vie des puces fluidiques dédiées aux tests électriques pour différentes solutions.

Cependant, nous pouvons voir sur les photos de la figure 2.41b que l'état final de la puce après expérience est très différent suivant que la solution contienne ou non du KCl. La consommation importante de a-Si dans le microcanal cathodique indique le rôle important du KCl. Ces résultats nous montrent que le a-Si semble un meilleur conducteur que la solution. Le courant une fois transporté dans le diélectrique, repasse dans le liquide loin de la zone par laquelle il est entré dans le solide (zone de séparation). Le Chlore semble avoir un rôle important dans le transfert d'électron électrochimique, abaissant de façon importante le potentiel Faradique (tension seuil) à l'interface solide - liquide. Ceci engendre de fortes fuites de courant et court-circuite alors la zone de $20 \mu\text{m}$

de large séparant les microcanaux. A ce stade, seule la réaction avec les ions hydroxydes attaque prioritairement la nanofente.

Nous venons de voir que le a-Si est inadapté car il réagit avec les ions hydroxydes présents en solution.

A partir de ces conclusions, j'ai alors décidé de trouver un matériau alternatif au a-Si pour sceller nos dispositifs fluidiques. La partie suivante y est dédiée.

2.II.D.3 Quel autre matériau comme film intermédiaire ?

La littérature fournit de nombreux matériaux possibles pour coller anodiquement le verre [65]. Malheureusement, la plupart d'entre eux ne sont pas de bons isolants. Ainsi les métaux ont été éliminés. Le nitrure de silicium (Si_3N_4) et la silice [65] [77] [78] ont été deux pistes puisqu'ils sont facilement déposables en couche mince par PECVD au LPN. Ils sont de plus connus pour être très isolants (du moins bien plus que le a-Si) et pourraient donc être moins sensibles à l'électrochimie. Différents type de dépôts ont donc été effectués grâce aux 5 procédés mis au point au laboratoire par David Chouteau, allant des dépôts avec faible ou forte proportion d'hydrogène, sous compression ou tension. Le dépôt par sputtering (voir Annexes) a également été testé.

Malheureusement, il ne nous a pas été possible de réaliser un meilleur collage que celui la figure 2.42. Cet échec a eu lieu alors que nous avons suivi scrupuleusement les protocoles de Lee et al. [77] et de Hsieh et al. [78] et que bien nous ayons tenté plusieurs recuits.

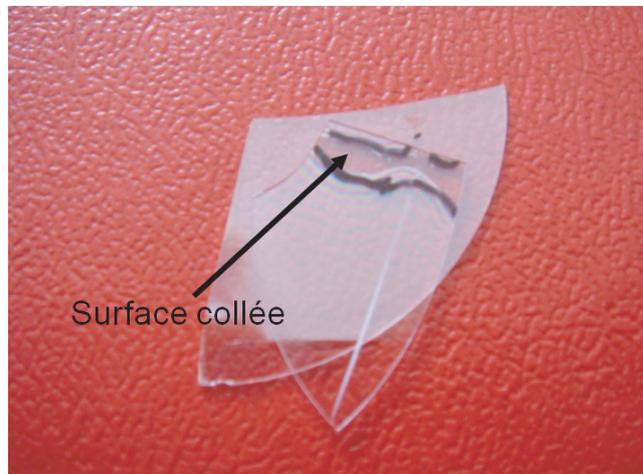


FIGURE 2.42 – Meilleur résultat obtenu pour un collage Pyrex / Si_3N_4 - Pyrex réalisé au cours de ma thèse.

Nous avons cherché quelles applications ces deux groupes ont alors fait de leurs études sur le collage de ces matériaux. L'un d'eux n'a pas eu d'activité découlant de collage anodique, et le groupe de Lee et al. [77] a, cinq ans après son premier article, utilisé le collage anodique du Si_3N_4 . Nous avons, dans celui-ci, pu noter une légère différence

quant aux résultats de la première étude. Dans leur introduction nous pouvons lire : «...it is well know that it is very difficult to obtain good bonding performance when there are intermediate layers such as silicon oxide or silicon nitride...». Le développement de ce type de technologie au LPN fut alors stoppé, après plusieurs mois, sans obtenir de collage suffisamment robuste pour nos applications fluidiques.

L'accroche du Si_3N_4 et SiO_2 n'ayant pas fait ses preuves nous avons voulu tester de rajouter une fine couche de a-Si sur un film de Si_3N_4 . L'épaisseur critique minimum de a-Si que nous avons réussi à coller est de 18 nm. Nous avons donc réalisé un dépôt PECVD d'une trentaine de nm de Si_3N_4 puis un dépôt de a-Si de 18 nm, suivi d'un collage anodique. Les propriétés mécaniques ont, pour ce multicouche, été conservées. La valeur de la résistance a été fortement améliorée par l'utilisation de ce bicouche, passant de 90 M Ω pour le a-Si à près de 300 M Ω pour le bicouche. Il est intéressant de remarquer que la résistance est multipliée par trois alors que l'épaisseur de a-Si a été divisée par 3. Ceci met en évidence la forte résistance électrochimique de la couche de Si_3N_4 .

Malheureusement, la durée de vie est très fortement réduite puisqu'elle n'est que de quelques minutes. Nous expliquons cette chute drastique par le fait que nous avons réduit le nombre de a-Si disponibles pour créer des liaisons. De plus, ceux-ci réagissent avec le liquide lors de l'application d'un champ électrique. La proportion de liaisons consommées sur le nombre total de liaisons initiales devient rapidement critique et le système se décolle rapidement localement. Sur la figure 2.43, nous pouvons voir l'importante dégradation de la puce fluidique après moins de 30 minutes à 15V, suggérant que la part de a-Si consommée est très importante par rapport au a-Si initial. Ces résultats nous montrent que le a-Si est à bannir de nos puces car en grande quantité il favorise les fuites mais si nous réduisons sa quantité les propriétés mécaniques ne sont plus assurées.



FIGURE 2.43 – Photo du dispositif Pyrex - Si_3N_4 - a-Si / Pyrex après les expériences électriques.

2.II.D.4 Conclusions sur le collage anodique

- Si des dispositifs fluidiques « verre/a-Si/verre » collés anodiquement ont pu être fabriqués, les propriétés mécaniques finales ne permettent pas d'appliquer les tensions nécessaires à l'électropréconcentration. Toutefois, ces puces ont permis de réaliser des expériences nécessitant de fortes pression (cf. la Rétention dans le Chapitre 4).
- Les résultats obtenus avant mon arrivée souffraient de forts écarts-types empêchant toute analyse quantitative. Les observations faites sur la couche intermédiaire de a-Si après les expériences nous ont permis de cibler nos recherches sur celle-ci. La mise au point d'un test visant à évaluer la durée de vie des puces fluidiques sous contraintes électriques en milieu aqueux a mis à jour la forte réactivité électrochimique du a-Si. J'ai également mis en évidence que le KCl, bonne solution modèle pour la théorie (électrolyte symétrique), dégrade fortement le a-Si et favorise les échanges électroniques et les fuites de courant. Les solutions tampons biologiques (et plus particulièrement le PB) ont démontré sur ce point qu'ils étaient plus appropriés ce qui représente un avantage pour l'étude avec les protéines.
- La trop faible résistance du film mince de a-Si à l'électrochimie m'a alors poussé à rechercher un matériau de substitution dans la littérature pour coller anodiquement le verre avec un diélectrique. Deux matériaux isolants et donc à priori faiblement réactifs électrochimiquement ont été trouvés dans la littérature : la silice et le nitrure de silicium. Cependant le collage sur de grande surface n'a pas été possible au sein du laboratoire malgré de nombreux tests. Nous n'avons pas trouvé d'application du collage de ces matériaux collés anodiquement mais plutôt l'aveu postérieur d'un groupe ayant publié des premiers résultats de collage de Si_3N_4 concluant avec le verre pour avancer quelques années plus tard les mauvaises qualités mécaniques de celui-ci.
- Dans la littérature, il nous restait alors la possibilité du collage thermique et le bonding direct. Les raisons qui nous ont poussées à choisir le bonding anodique (intégration future d'électrode, matériau rigide, transparence), nous ont fait chercher et développer une nouvelle technologie afin de sceller efficacement deux substrats de verre à basse température, hermétiquement et pouvant supporter de fortes contraintes mécaniques et électriques. La section suivante est dédiée à la technologie que j'ai développée au sein du LPN afin de satisfaire ces critères.

2.III Vers une nouvelle technologie « tout verre »

2.III.A Le brevet

Les conclusions de la partie précédente nous ont fait prendre un virage quant à la stratégie de collage permettant de sceller une puce microfluidique. Ainsi, j'ai mis au point une nouvelle technologie de scellement du verre à basse température. Le fort potentiel des puces ainsi obtenues nous a fait opter pour une protection de cette innovation (Demande de brevet d'invention français n° 1054183 du 28 mai 2010), nous ne communiquerons donc pas sur la technique elle-même. Le potentiel de valorisation de ces puces, tout verre et donc extrêmement résistantes et adaptées à la science du vivant, couplé à un procédé basse température est extrêmement prometteur. Il permet notamment de lever un verrou technologique pour la microfluidique : la possibilité d'intégrer des capteurs et actionneurs au sein d'un laboratoire sur puce résistant physiquement et chimiquement. Des sociétés (telles que Micronit ou Dolomite) fabriquent des puces tout verre sans instrumentation embarquée qui auraient pu être utilisées pour ces travaux de thèse. Cependant, étant accueilli dans une centrale technologique de premier rang, l'indépendance pour la fabrication des dispositifs était primordiale. De plus, par rapport au procédé de collage thermique, l'aspect environnemental et économique de la baisse de température s'est également révélé être un avantage de notre technique par rapport à l'existant.

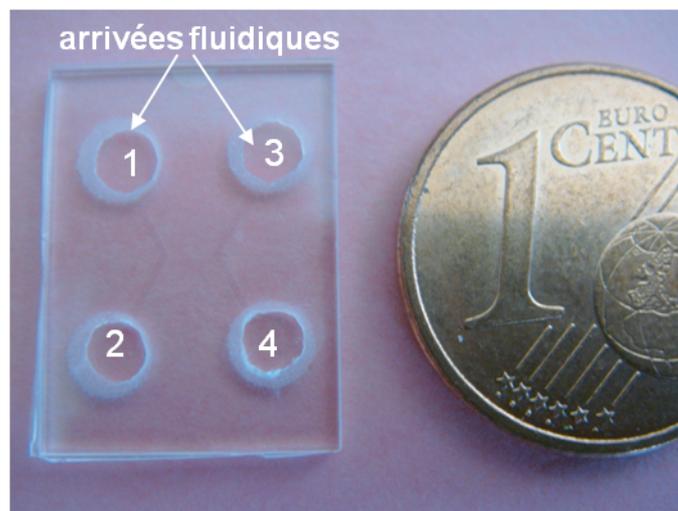


FIGURE 2.44 – Photo d'une puce MNM obtenue grâce à notre nouveau procédé de fabrication.

Les puces « tout verre » qui sont désormais fabriquées au LPN permettent donc de travailler avec un unique matériau : le verre, mais aussi une résistance exceptionnelle notamment à l'électrochimie et ce, à basse température, durant le procédé de fabrication.

2.III.B Mesures électriques et durée de vie des puces « tout verre » de seconde génération

Comme pour les puces à base de silicium amorphe, il nous a fallu évaluer que nos nouveaux dispositifs étaient appropriés à l'utilisation de champs électriques forts. Nous avons donc reproduit les mêmes expériences que pour les puces à base de silicium amorphe (figure 2.45).

Comme précédemment, la chute de potentiel étant concentrée dans la zone de séparation, nous pouvons vérifier si notre procédé innovant n'altère pas les propriétés du verre et qu'il n'y a pas de faiblesse. Nous avons donc, comme précédemment, cherché une signature électrochimique (présence d'un courant faradique) en suivant la résistance du dispositif en fonction de la tension appliquée mais également l'évolution de la résistance en fonction du temps pour une tension de 100 V appliquée à la puce (ce qui représente 5 MV/m) (Figure 2.45).

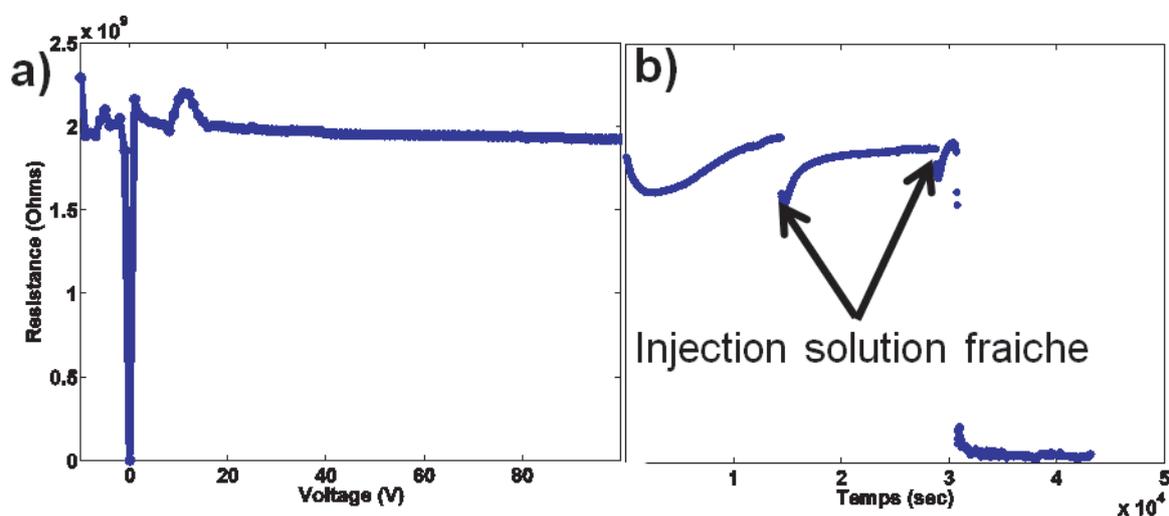


FIGURE 2.45 – a) Courbe de la résistance du dispositif en fonction de la tension appliquée à travers la zone de séparation. b) Evolution temporelle de la résistance du dispositif pour une tension de 100V. Comme pour la figure 2.41, la chute soudaine de la résistance sert de paramètre de contrôle pour estimer la durée de vie de nos dispositifs dans ces conditions extrêmes.

Sur la figure 2.45a, nous pouvons voir que la résistance de notre puce nouvelle génération est supérieure au GOhm (contre une centaine de MOhm pour le a-Si), et ce jusqu'à 5MV/m. Proche de 0 V nous pouvons toujours voir l'effet de l'offset du SMU pour ces mesures très bas bruit. Si nous comparons désormais cette courbe avec la figure 2.45, nous pouvons tout de suite noter la grande stabilité de la puce « tout verre ». De plus la résistance est d'un ordre de grandeur supérieur. Ces résultats mettent donc en évidence le caractère exceptionnellement isolant de nos nouveaux dispositifs.

Concernant la durée de vie, nous observons sur la figure 2.45b une chute brutale de la

résistance, signature d'une durée de vie de la puce limitée malgré son caractère isolant. Cependant, si l'on compare le temps de vie nous passons de moins de 4 heures pour le a-Si à près de 10 heures pour nos nouveaux systèmes en verre. Rappelons de plus qu'il s'agit ici de puces très spécifiques avec un étranglement de $20\ \mu\text{m}$ de large de verre entre les microcanaux et que les contraintes électriques sont beaucoup plus extrêmes que dans les expériences fluidiques.

2.III.C Conclusions

Les résultats de résistance à l'électrochimie présentés ici permettent de démontrer que nos systèmes ont une résistance exceptionnelle aux conditions extrêmes de champ électrique et qu'ils sont adaptés à des expériences d'électropréconcentration et d'électrophorèse. En effet, même si il n'est pas possible aujourd'hui de communiquer sur le procédé en lui même, les expériences nous ont permis de mettre en évidence une inertie à l'électrochimie et une durée de vie proche de 10 heures pour ces conditions extrêmes de champs ($5\ \text{MV/m}$). Cette avancée notable par rapport au collage anodique du pyrex et du a-Si, nous a permis de valider notre technologie et notre procédé de fabrication. Ces résultats permettent d'envisager une plus grande reproductibilité des résultats d'électropréconcentration à travers une nanofente fluidique.

2.IV Conclusions sur la fabrication de dispositifs nanofluidiques

A la fin de ma deuxième année de thèse, j'ai développé un nouveau procédé innovant de collage du verre à basse température me permettant d'obtenir des puces micro-nanofluidiques adaptées à des expériences sous champs électriques forts et ayant une résistance mécanique élevée.

Après quelques « errements » notamment sur la recherche de matériaux alternatifs pour le collage anodique (publications contradictoires de certains groupes en quelques années d'intervalles), j'ai alors cherché à obtenir, avec des matériaux courants, des puces d'une grande résistance physico-chimique.

J'ai cherché à sceller le verre, matériau de choix, par des procédés alternatifs. L'utilisation de puces « tout verre » avait été écartée au début de ma thèse car les conditions de fabrication (et notamment le recuit à très haute température) ne coïncidaient pas avec les perspectives du sujet. En effet, nous souhaitions pouvoir intégrer des électrodes polarisables dans les canaux. La forte température est effectivement un obstacle à l'intégration de capteurs et d'actionneurs.

Une demande de dépôt de brevet (Demande de brevet d'invention français n° 1054183 du 28 mai 2010) est en cours pour cette nouvelle technologie alternative de scellement du verre qui permet de réduire fortement les besoins en énergie grâce à sa faible température, et qui permet d'envisager une instrumentation embarquée dans le verre. Une telle intégration était jusqu'à aujourd'hui un verrou technologique de la microfluidique pour l'obtention de laboratoires sur puces de plus en plus évolués et robustes. Pour le moment, seule la résistance aux champs électriques a été quantifiée, mais dès l'année prochaine lors des phases de validation technique de la valorisation de cette innovation, des tests mécaniques complèteront l'analyse de la résistance globale. Quoiqu'il en soit, ces résultats sont suffisants pour mener de manière reproductible les expériences d'électropréconcentration de ma troisième année de thèse.

La perfection, ce n'est pas quand il n'y a plus rien à ajouter mais plus rien à supprimer

- Antoine DE SAINT-EXUPERY -

Il est vain de faire avec plus ce qui peut l'être avec moins

- William OF OCCAM -

Chapitre 3

Banc microfluidique expérimental : à la recherche du plus grand nombre de paramètres contrôlables

3.I Vers une géométrie optimale de la puce

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 1, le phénomène d'électropréconcentration est encore très mal compris et, si quelques simulations permettent de pressentir le rôle des différents paramètres [37] [38] [39] dont il dépend. La multitude de paramètres à contrôler rend ce sujet difficile à aborder. Il est important de noter que les quelques démonstrations expérimentales existantes dans la bibliographie reposent toutes sur des géométries de structures MNM (micro - nano - micro) différentes. Dans la figure 3.1 ci-dessous, je rapporte trois exemples d'expériences d'électropréconcentration pour lesquelles les différences de géométries sont marquantes [35] [40] [42].

Il est extrêmement difficile de les comparer de manière simple, puisque chacune possède sa géométrie MNM particulière de puce. Par exemple, la géométrie choisie par Kim et al. (figure 3.1a) est un « X » dont l'intersection est une nanofente séparant en deux le haut et le bas. Comme nous l'avons vu dans le premier Chapitre, ce dispositif est fabriqué à base de PDMS ce qui limite la tension appliquée à 200V mais surtout n'offre pas un bon contrôle sur la taille de la nanofente qui se déforme sous contrainte. La préconcentration est très localisée à l'interface micro - nano et s'étend radialement.

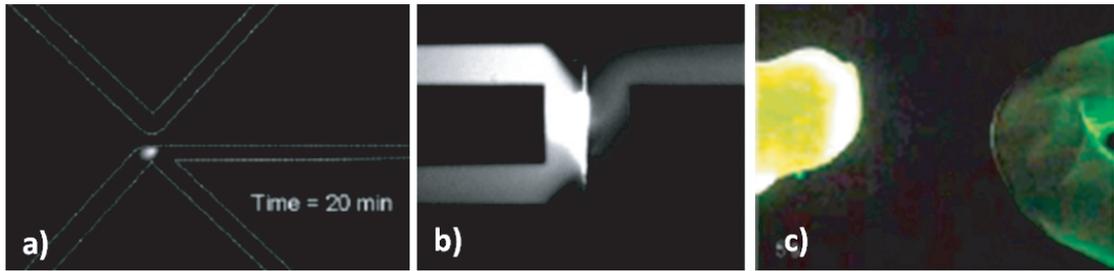


FIGURE 3.1 – Images des dispositifs utilisés par : a) Kim et al. [42] ; b) Foote et al.[35] ; c) Pu et al. [40].

Foote et al. (figure 3.1b) ont également choisi une géométrie en X mais avec une section à l'intersection plus importante. Cette intersection permet également de séparer les microcanaux grâce à une membrane nanoporeuse. Dans ce cas, le volume de passage nanométrique est très hétérogène comparé à une simple nanofente. La préconcentration s'initie à l'interface de la membrane (au milieu de celle-ci) puis se propage radialement dans les microcanaux.

Enfin, Pu et al. (figure 3.1c) ont opté pour une géométrie proche d'un X. Cependant dans leur cas, les deux branches ne sont pas symétriques par rapport à la nanofente (les branches font des angles différents de chaque côté de la nanofente). Ici la préconcentration se fait sur toute l'interface micro / nano et se propage de façon hétérogène.

Ces géométries, en plus d'être toutes différentes et donc difficilement comparables en détail, ne permettent pas de simuler facilement le phénomène d'électropréconcentration. En effet, la préconcentration s'initie dans la zone d'intersection entre les 4 branches ce qui entraîne une préconcentration qui croît radialement et est difficilement modélisable (par rapport à un canal droit notamment).

3.I.A Comment simplifier la géométrie pour faciliter la modélisation ?

Au début de ma thèse, Adrien Plecis a choisi volontairement une géométrie simple pour les simulations numériques. Une géométrie linéaire pour la partie MNM a ainsi été choisie. La figure 3.2 présente la géométrie des dispositifs qui ont été étudiés au début de ma thèse. Les zones extérieures d'alimentation (en bleu gris sur la figure du haut) relient deux réservoirs grâce à des microcanaux pour faciliter le nettoyage, dans cette zone où le transport des espèces en solutions n'est pas sélectif. Cette structure en H avec deux entrées et deux sorties facilite le nettoyage. Celui-ci doit être réalisé avec soin entre chaque expérience, surtout dans le cas où l'on change la nature et/ou la concentration de l'analyte et de la solution tampon. La partie centrale MNM du dispositif est donc linéaire, ce qui signifie que seule la hauteur change au centre de la structure, là où se trouve la nanofente. La largeur de cette structure MNM est constante ($100 \mu\text{m}$, $l_\mu = l_{nano}$) sur toute sa longueur (environ $1 \text{ cm} = 2L_\mu + L_{nano}$) et le nettoyage ne peut s'y faire que par diffusion des espèces.

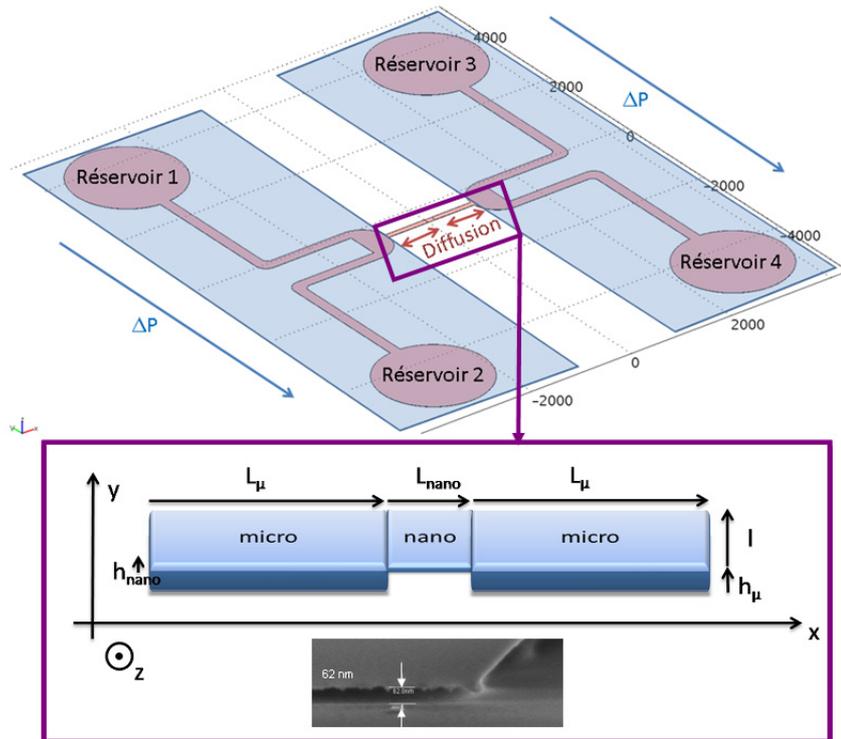


FIGURE 3.2 – Géométrie des dispositifs fluidiques micro - nano - micro (MNM) étudiés dans ma thèse. L'insert en bas donne le détail de la partie centrale MNM linéaire, avec une image en coupe obtenue par microscopie électronique pour une nanofente de 62 nm de haut, sur un échantillon coupé. Les parties extérieures macroscopiques (bleutées) sont nettoyées par injection hydrodynamique, la partie centrale MNM est nettoyée par diffusion seule.

3.I.B Optimisation de la géométrie des réservoirs

Dès le début de mes expériences, je me suis rendu compte très vite que cette géométrie des demi-cercles en entrée et en sortie de la zone MNM était inadaptée (voir Figure 3.2). Ce constat était d'autant plus flagrant lors des expériences d'électropréconcentration, où un flux additionnel sous pression était superposé à l'application du champ électrique. Dans ces demi-cercles, je voyais apparaître une zone d'accumulation pour les biomolécules, qui pouvait s'avérer gênante.

Pour trouver l'origine de ces zones d'accumulation et optimiser la géométrie optimale des réservoirs, j'ai donc réalisé des simulations 2D sous COMSOL Multiphysics. Pour simplifier cette étude rapide, je n'ai pas intégré la nanofente dans mes calculs numériques, puisque l'accumulation parasite a lieu loin de celle-ci, dans une région qui n'est pas concernée par l'électropréconcentration due à la nanofente.

Le champ électrique a été obtenu grâce aux équations d'électromagnétisme pour un

milieu conducteur :

$$-\nabla \cdot d(\sigma \nabla V - \vec{J}^e) = dQ_j$$

avec d l'épaisseur de la zone considérée (en m), σ la conductivité électrique (5.99×10^7 S/m), \vec{J}^e la densité de courant externe (en A/m²), V le potentiel électrique (en V) et Q_j la source de courant (en A/m³).

Le champ de vitesse a été obtenu d'après les équations de Navier Stokes en régime d'écoulement laminaire ($\nabla \cdot \vec{v} = 0$) :

$$\rho \vec{v} \cdot \nabla \vec{v} = \nabla \cdot [-P\vec{I} + \eta(\nabla \vec{v} + (\nabla \vec{v})^T)] + F$$

avec v la vitesse de l'écoulement (en m/s), P la pression appliquée (en Pa), η la viscosité dynamique du liquide (0.01 Pa.s), ρ la masse volumique du liquide (1000 kg/m³), F les forces extérieures appliquées sur un volume élémentaire et \vec{I} l'axe portant la pression.

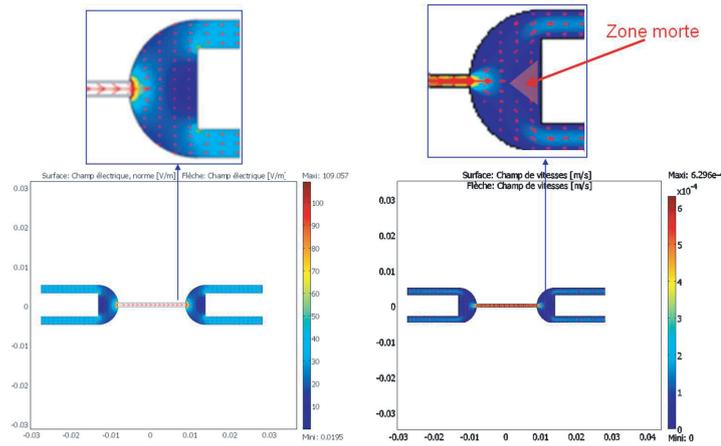


FIGURE 3.3 – A gauche les lignes de champ électrique, à droite les lignes de champ de vitesse pour la géométrie des puces de 1ère génération.

La figure 3.3 présente les résultats obtenus pour un potentiel électrique d'entrée de 1 V à gauche, et pour une pression d'entrée à gauche de 1 Pa, en supposant une condition de non-glissement aux parois. Pour que le choix de la valeur de la pression soit pertinente et représentative par rapport aux expériences dans lesquelles il y a un nanocanal, il est important de se placer dans des conditions où les nombres de Reynolds simulés et expérimentaux sont proches :

J'ai donc calculé la vitesse réelle du fluide dans le microcanal **AVEC** la nanofente, grâce aux équations (4.27) et (4.29). J'ai ainsi pu déterminer le débit en fonction de la géométrie et de la pression (fixée à 1 bar par exemple). J'obtiens alors une

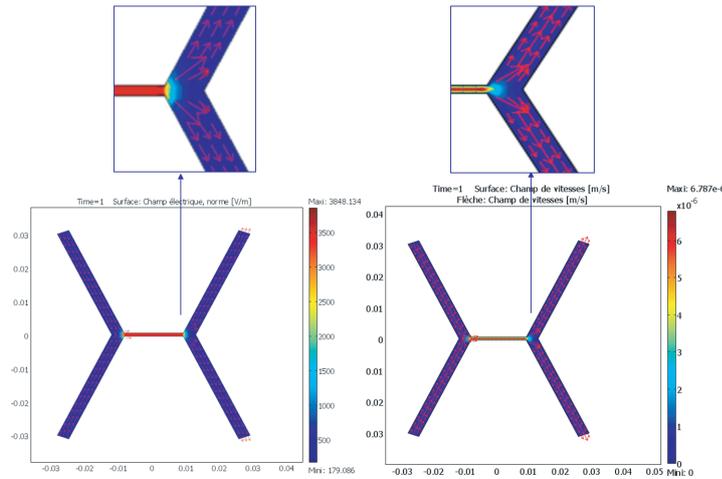


FIGURE 3.4 – A gauche les lignes de champ électrique, à droite les lignes de champ de vitesse pour la géométrie optimale des puces de 2ème génération.

vitesse de $10 \mu\text{m} / \text{s}$ soit un Re de 2.5×10^{-6} . Si je considère pour mes simulations que le Re doit être identique pour permettre d'être représentatif de la réalité, j'obtiens :

$$\begin{aligned} Re_{simu} &= Re_{exp} \\ \frac{U_{simu} x \eta}{L_{simu}} &= \frac{U_{exp} x \eta}{L_{exp}} \\ U_{simu} &= 40 U_{exp} \end{aligned}$$

Soit une pression de 1 Pa.

On y voit clairement les différents comportements des champs dans le demi-cercle :

- pour le champ électrique (voir figure 3.3 de gauche), le champ électrique est intense dans la partie centrale puis est rapidement redistribué dans le demi cercle pour rejoindre les branches qui mènent aux réservoirs. Dans le demi cercle, la valeur du champ électrique est également très faible.
- pour le champ de vitesse hydrodynamique (voir Figure 3.3 à droite), on note une zone morte à la paroi du demi-cercle.
- en revanche, dans le microcanal central, on observe une bonne superposition des deux distributions de champ.

Cette non superposition des champs, qui a lieu dans les deux demi-cercles est gênante, car elle conduit à des zones mortes où les flux de liquide ne sont pas équilibrés. Pour remédier à ce problème, j'ai donc conçu une autre géométrie qui permet d'éviter les zones mortes. La figure 3.4 présente le résultat de la simulation pour cette nouvelle géométrie de réservoir en V. Cette nouvelle structure apparaît optimale, surtout dans la partie extérieure au microcanal, où l'on observe une parfaite superposition des champs

de vitesse et électrique. Au centre, dans le microcanal, on observe toujours une légère différence entre les deux distributions de champ (figure 3.4 en haut à droite) : il y a un non glissement aux parois pour le champ de vitesse, ce qui implique un gradient de vitesse au voisinage des parois, gradient que l'on ne retrouve pas pour le champ électrique. Ce gradient de vitesse au voisinage des parois du microcanal central pourrait avoir comme conséquence une préconcentration non uniforme dans la section du microcanal. Je reviendrai sur ce point dans la partie expérimentale du Chapitre 4. Cette géométrie en V a été choisie pour toutes les expériences réalisées au cours de mon travail de thèse (figure 3.5).

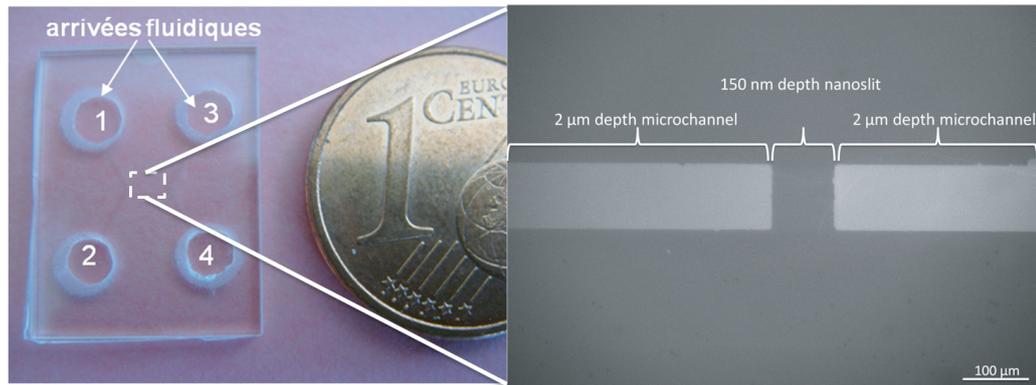


FIGURE 3.5 – Puce fluïdique de 2^{ème} génération élaborée avec le nouveau procédé de fabrication (brevet) et disposant de la géométrie optimisée.

3.II Instrumentation externe et connectique

3.II.A Les paramètres de contrôle

Comme nous l'avons discuté dans le premier Chapitre, les mécanismes d'électro-préconcentration sont gouvernés par un grand nombre de paramètres. Citons ceux qui m'ont tout particulièrement intéressé au cours de ce travail :

- En plus d'appliquer un champ électrique transverse, j'ai souhaité aussi moduler la vitesse du fluide. Les paramètres hydrodynamiques importants sont : la viscosité du liquide, la température, la géométrie de la puce ainsi que la pression, qui va induire cette vitesse de fluide additionnelle. Les paramètres électrocinétiques importants sont : le potentiel de surface (charge de surface), le champ électrique externe, la température, le pH et la force ionique (concentration du buffer et de l'analyte).
- Pour qu'il y ait électropréconcentration, il faut que la vitesse électrophorétique soit localement l'opposé de la vitesse du liquide. Les paramètres qui vont gouverner ces deux vitesses sont donc : le pH, la force ionique (concentrations de la solution tampon et de l'analyte), la température, le champ électrique externe, la viscosité du fluide et la masse de l'analyte.

Parmi tous ces paramètres, certains peuvent être contrôlés et parfaitement choisis, d'autres sont malheureusement incontrôlables et inhérents aux protocoles. Citons en particulier les phénomènes d'adsorption parasite des protéines sur les parois en verre des canaux, qui peuvent conduire à une évolution ou même à une dérive de la préconcentration sans que l'on ne puisse maîtriser cette évolution durant les expériences. Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 1, les expériences citées dans la littérature sont difficilement comparables, et souvent, seul le rôle de la hauteur de la nanofente, des concentrations initiales et des tensions est mentionné. En ce qui me concerne, j'ai pu également étudier l'influence de ces paramètres et me suis en plus attaché à contrôler la pression. La photo de la figure 3.6 présente le banc de mesure microfluidique expérimental sur lequel toutes mes expériences ont été effectuées.

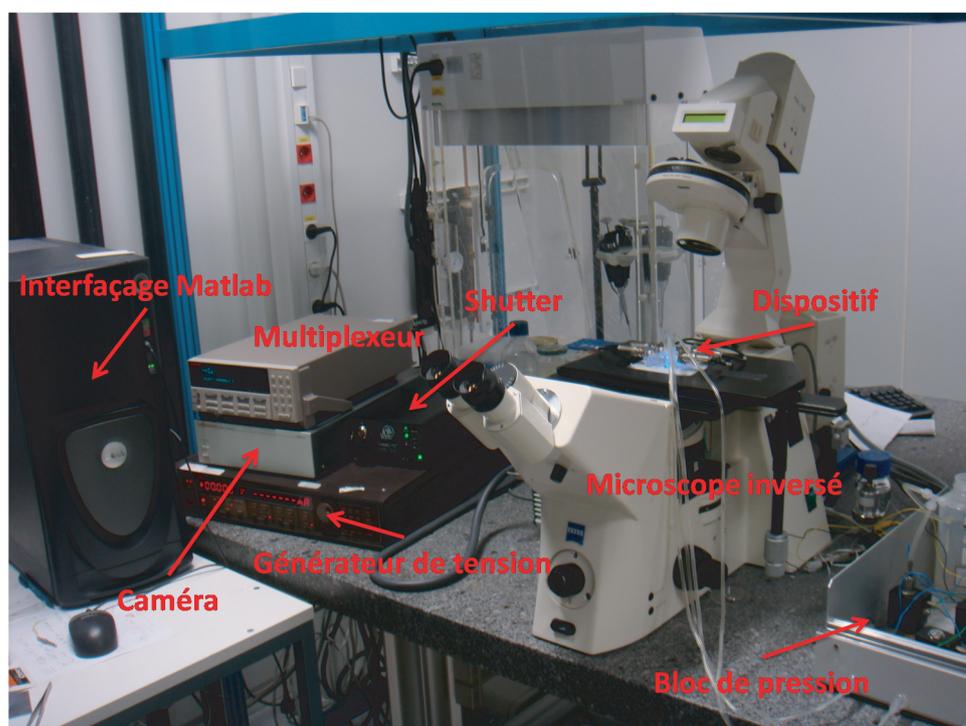


FIGURE 3.6 – Le banc complet expérimental.

3.II.B Les paramètres imposés

Le paramètre le plus important pour moduler la composante électrophorétique est la tension (ou différence de potentiel). Rappelons, en effet, que plus le champ électrique augmente, plus la préconcentration est efficace [41] [42]. Cependant, les mesures rapportées dans la littérature ne permettent pas de conclure de manière précise sur la dépendance de la préconcentration vis à vis de la tension appliquée. Au cours de mes expériences, j'ai

utilisé un générateur de tension (Keithley 238) couplé à un multiplexeur (Keithley 7001 et carte 7153) ce qui m'a permis d'appliquer dans les 4 réservoirs soit une tension V , soit une mise à la masse. Je décrirai un peu plus loin la géométrie des électrodes plongeuses utilisées.

Le deuxième paramètre que nous avons souhaité contrôler est la pression de liquide injecté. Pour imposer une pression, j'ai fabriqué un bloc de pression maison constitué d'électrovannes pilotables. J'ai choisi de contrôler la pression du liquide plutôt que son débit avec, par exemple un pousse-seringue, parce qu'il est important de maîtriser la vitesse dans le dispositif. En effet l'utilisation d'un pousse-seringue aurait conduit à des temps de stabilisation du débit dans la puce trop longs et donc incompatibles avec mes expériences (dus aux connectiques déformables et donc à la variation de volume hors dispositif qui est lente à se stabiliser à cause de l'injection de débits extrêmement faibles). Mon bloc de pression basique permet de plus une remise à la pression atmosphérique (ou en surpression) indépendamment dans chacune des entrées fluidiques.

Grâce à ce banc expérimental, nous sommes donc capables d'imposer toutes les combinaisons possibles de pression et de tension pour chacun des 4 réservoirs, et ceci, en moins d'une seconde par commutation.

3.II.C La connectique

Les connectiques entre mon microdispositif fluide et les instruments de mesure étant essentiellement macrométriques, j'ai développé en interne un bloc de connectique simple qui permet un raccordement aisé de toutes les arrivées fluidiques et des connexions électriques (Figure 3.7).

Remarquons que j'ai fait le choix de déporter les électrodes loin du réservoir et de la puce fluide. En effet, puisque cette étude nécessitait l'application de potentiels pouvant atteindre des valeurs élevées jusqu'à 110 V, il fallait éviter toute pollution électrochimique parasite des électrodes de platine qui baignent dans le liquide jusqu'à la partie MNM centrale. Pour éviter que les produits de réaction électrochimique ne perturbent les conditions (notamment le pH et la force ionique) expérimentales, les électrodes ont été placées loin de la zone expérimentale. Ainsi, il y a peu de chance que ces produits ne soient transportés jusqu'à la nanofente durant l'expérience ce qui limite les erreurs sur les expériences. De plus, comme nous l'avons vu dans le Chapitre 2, ceci permettait d'éviter l'intégration d'électrodes lithographiées en Pt dans la puce simplifiant ainsi le procédé de fabrication des puces en verre.

3.II.D Les paramètres mesurés

Comment peut-on déduire le taux de préconcentration C_{max} de notre analyte dans les conditions expérimentales choisies ?

La mesure de la concentration en analyte se fait grâce à une mesure de fluorescence. Grâce à une illumination adaptée (lampe à Mercure HBO 100 d'Osram et filtre FITC pour mes conditions) couplée à une caméra rapide et sensible sur le microscope inversé, mon montage expérimental m'a permis de mesurer des intensités de fluorescence faibles

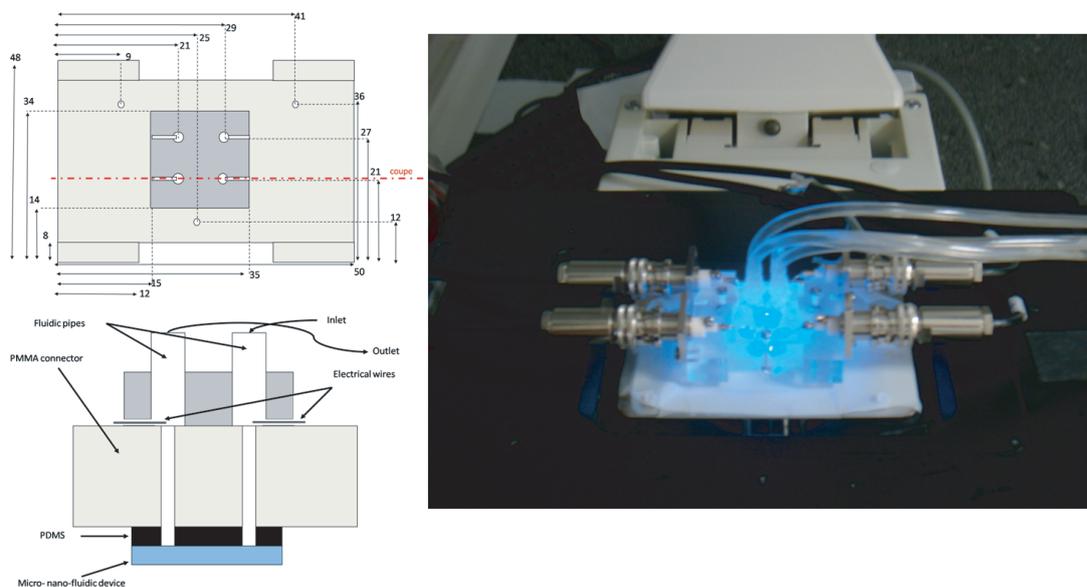


FIGURE 3.7 – A gauche, schémas en vue du dessus et en coupe du bloc de connectique en PMMA qui permet les raccordements électrique et hydrodynamique vers la puce MNM fluïdique. A droite, photo du bloc de connectique monté sur le banc expérimental avec les 4 entrées fluïdiques et électriques.

et ainsi de détecter des concentrations de l'ordre du μM . J'ai donc utilisé des biomolécules sondes qui étaient, soit naturellement fluorescentes, soit marquées c'est à dire qu'elles avaient subies un greffage adapté d'un marqueur fluorescent. Pour visualiser l'intensité de la fluorescence, j'ai utilisé une caméra rapide à fluorescence (Hamamatsu ORCA-ER) couplée à un shutter (Uniblitz VCMD1) qui permet de limiter le photoblanchiment. Le déclenchement de l'acquisition de la caméra s'effectue grâce au trigger du shutter qui pilote le déclenchement de la caméra.

La figure 3.8 présente cette relation linéaire mesurée dans le cas de la fluorescéine se déplaçant dans un microcanal de $2.5 \mu\text{m}$ de haut. Dans les conditions de préconcentration de la sonde fluorescente, nous obtenons une dépendance linéaire entre le signal fluorescent et la concentration. Nous n'observons pas de « quenching » : le quenching fait référence à tout mécanisme qui réduit la fluorescence d'une substance donnée. Un grand nombre de phénomènes peuvent être à l'origine de quenching dans notre cas, la réadsorption d'une partie de l'énergie fluorescente ou la diffraction d'une partie du signal dans des concentrations élevées a déjà été observée. La courbe linéaire signifie que nous travaillons dans des concentrations où ce phénomène ne perturbe pas le signal.

Tous les instruments de mesure sont pilotés via Matlab, de manière à éviter tout problème de synchronisation. A l'issue des expériences, les données sont traitées avec ce même programme. Un des objectifs de mon travail était de réaliser des mesures très

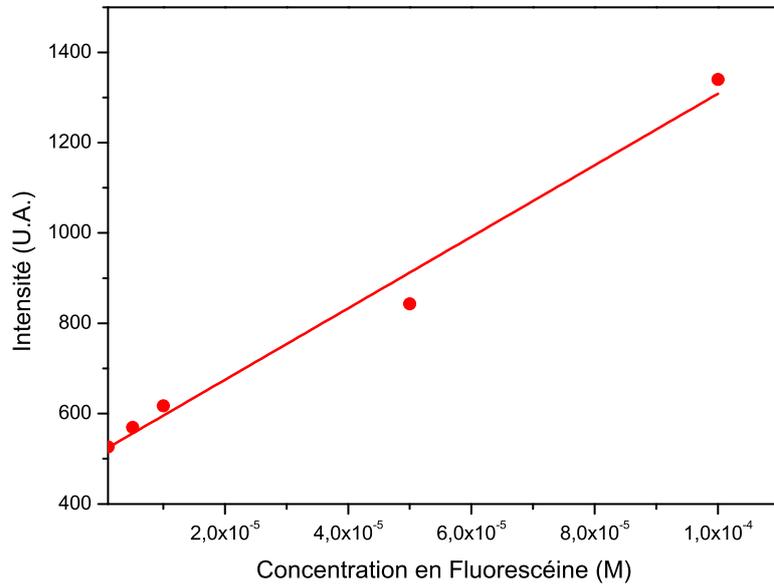


FIGURE 3.8 – Intensité lumineuse en fonction de la concentration initiale de fluorescéine.

systematiques, par exemple, pour tester l'influence de la tension sur l'électropréconcentration. Ces mesures répétitives ont ainsi pu être obtenues facilement grâce à l'automatisation des expériences sous Matlab. Des séries de mesure sur plusieurs heures ont pu être faites sans avoir besoin d'être présent en permanence devant le banc expérimental. Lors des campagnes de mesure, certaines expériences ont pu ainsi être réalisées sans arrêt, soit 24 heures sur 24.

3.III Validité et fiabilité des mesures

Lors de mon arrivée en thèse, les résultats préliminaires sur l'électropréconcentration souffraient d'un manque de reproductibilité et les écarts types moyens étaient de l'ordre de 30 %. La dernière partie de ce chapitre est consacrée à l'amélioration de la reproductibilité des mesures. Cette étude a pu être menée dès que les puces de dernière génération tout en verre ont pu être fabriquées avec le nouveau procédé breveté [55]. Nous verrons que tous ces progrès, en terme de reproductibilité et de fiabilité des mesures, découlent des propriétés spécifiques de ces puces en verre de dernière génération et d'un protocole de nettoyage adapté.

3.III.A Temps de vie des réactifs et erreurs de mesure

Les phénomènes de photoblanchiment sont assez courants pour les biomolécules fluorescentes. Le photoblanchiment est la perte de fluorescence d'une molécule. Une molécule fluorescente à l'état excité peut soit émettre un photon, soit être engagée dans une réaction photochimique qui va empêcher son retour à un état excitable. Il peut s'agir d'une réaction avec l'oxygène sous forme de radicaux libres. Plus on excite un fluorochrome, plus la proportion de fluorochrome photoblanchi est grande, jusqu'à extinction de la fluorescence. Chaque fluorochrome présente donc une cinétique de photoblanchiment particulière.

Le photoblanchiment peut être une limite à plusieurs méthodes de microscopie utilisant la fluorescence. Dans nos expériences, les molécules sont stoppées et se concentrent en un point de focalisation, elles ne sont donc pas renouvelées si elles photoblanchissent. Pour vérifier que notre mesure de fluorescence n'était pas altérée par ce mécanisme de photoblanchiment, j'ai mesuré la fluorescence de la molécule fluorescéine (petit di-anion) dans le microcanal en l'illuminant de façon constante sur un temps long. Cette mesure est reportée sur la figure 3.9, où chaque point correspond à une mesure effectuée toutes les 15 secondes.

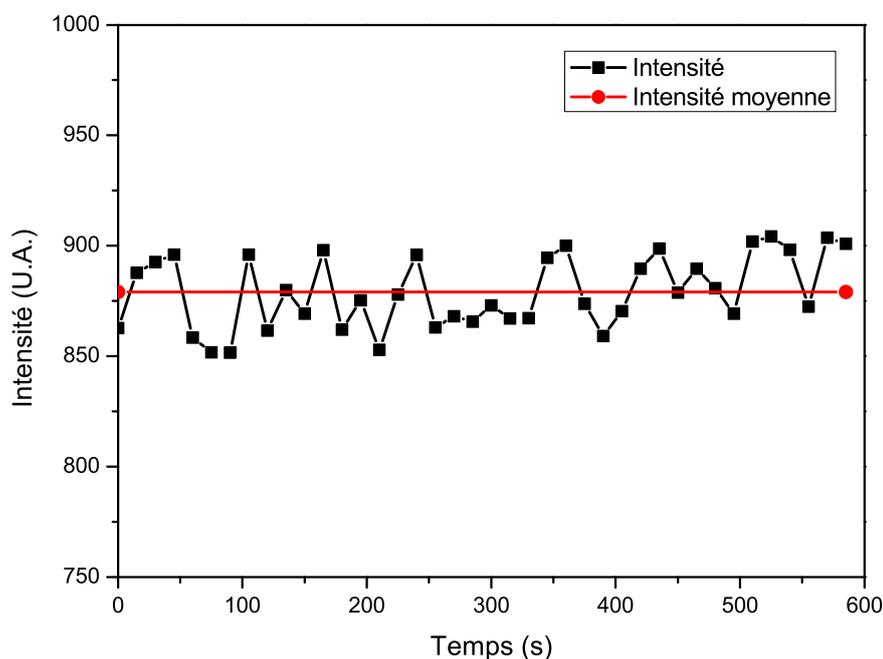


FIGURE 3.9 – Photo-stabilité de la fluorescéine illuminée de façon constante pendant 10 minutes dans des conditions normales expérimentales (intensité de lampe).

Comme nous pouvons le constater, le signal est constant et ne souffre pas d'affaiblissement même après 10 minutes. Par ailleurs, l'écart type est inférieur à 2% ce qui est un résultat excellent pour des temps très supérieurs au temps d'illumination sur la totalité d'une expérience. L'erreur de mesure ne provient donc pas du manque de stabilité de la lampe, ni de la sonde.

3.III.B Temps de mise en conditions initiales et protocole

Nous avons vu précédemment que la géométrie en H avait été privilégiée pour permettre un nettoyage facile de la puce et un apport simplifié des solutions initiales, la diffusion étant le seul mécanisme permettant un transport non sélectif dans la zone centrale due à la présence de la nanofente. Si l'on se réfère à l'état de l'art, les expériences réalisées par Stanford [38] étaient toujours précédées d'un temps de repos de 40 minutes afin de permettre aux conditions initiales de s'établir. Dans les travaux préliminaires menés par Adrien Plecis [46], le temps de repos avant mesure n'était par contre que de 45 secondes.

J'ai donc cherché à optimiser ce protocole de préparation de la puce avant les mesures d'électropréconcentration, c'est à dire avant l'application de la tension ou de la pression. Pour mettre au point ce protocole, j'ai d'abord injecté le fluide dans la puce comme indiqué sur la figure 3.2. J'ai ensuite imposé un temps d'attente pendant lequel le fluide est au repos et seule la diffusion permet aux analytes de progresser dans la zone centrale du microdispositif. Enfin suite à cette préparation, une expérience de préconcentration simple avec une solution de PB (Phosphate Buffer) à 0.5 mM (pH=6.9) et 10 μ M de fluorescéine est effectuée (cf. figure 3.10). Pour toutes les expériences décrites dans cette fin de chapitre, nous avons utilisé cette procédure, qui va nous permettre de conclure sur la meilleure méthode de préparation de la puce.

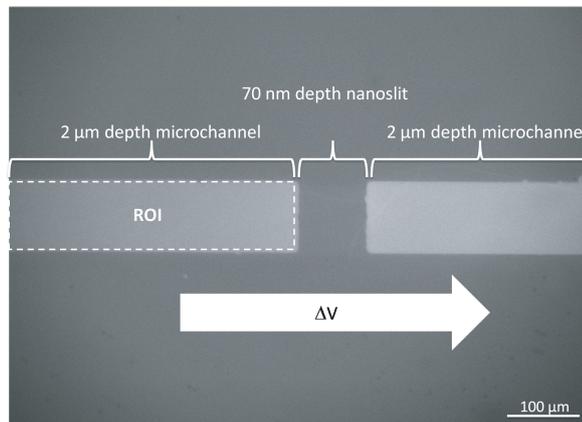


FIGURE 3.10 – Image obtenue grâce à la caméra sensible sur notre banc expérimental. La ROI (« Region Of Interest ») correspond à la zone dans laquelle la fluorescence est étudiée en fonction du temps.

La figure 3.11 présente l'influence de ce temps de repos du liquide avant le début de l'expérience (application de la tension). Chaque courbe correspond à 2 expériences successives de 180 secondes avec pour chacune d'elles :

- une déstabilisation préliminaire de la concentration (100V pendant 3 minutes) avant un temps de repos.
- le temps de repos est divisé en deux étapes : 1/ l'injection du liquide par pression dans la puce puis 2/ la mise à l'équilibre de tous les réservoirs.

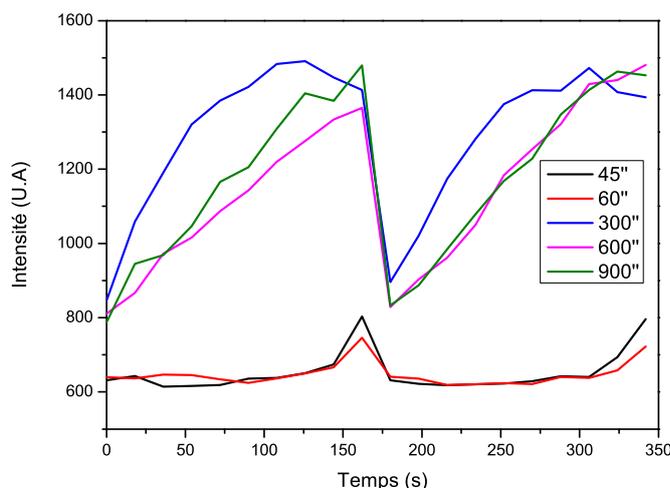


FIGURE 3.11 – Variation de la préconcentration en fonction du temps d'électropréconcentration pour différents temps d'attente avant l'expérience de préconcentration proprement dite (45'', 60'', 300'', 600'' et 900'').

Il est clair ici que le protocole de nettoyage avant expérience est primordial puisque seules les courbes correspondant à des temps d'attente supérieurs à 10 minutes sont superposables. Pour confirmer cette observation, j'ai poursuivi ce type d'expérience pour des temps d'attente beaucoup plus longs. La figure 3.12 présente les résultats obtenus pour des séries de 2 expériences successives de 180 secondes. Pour cette deuxième série d'expériences, la déstabilisation sous 100V n'a été effectuée qu'au début de la première électropréconcentration et non pas avant chaque expérience.

Les résultats pour l'ensemble de ces trois séries d'expériences sont très similaires. Un temps d'attente (nettoyage : 10 minutes d'injection hydrodynamique suivi de 10 minutes où tous les réservoirs sont à l'équilibre en pression) supérieur à 20 minutes conduit à une dynamique de préconcentration reproductible. Par contre, il est apparu un phénomène inattendu : le système conserve une mémoire de la valeur du champ électrique imposé (100 V), comme le montre la différence entre 1ère (0 à 170s en abscisse) et deuxième (170 à 340 s en abscisse) expérience de chaque série. Ceci est vrai même pour des temps longs de nettoyage hydrodynamique.

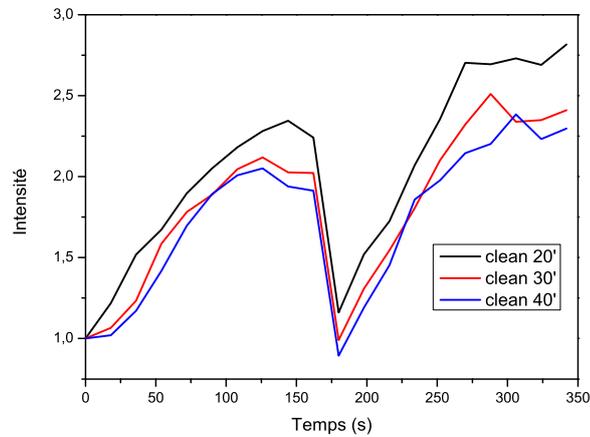


FIGURE 3.12 – Expérience d'électropréconcentration pour différents temps d'attente avant la mesure proprement dite. Une déstabilisation des conditions initiales n'a été effectuée que pour la première des deux expériences de chaque série.

Il ressort donc de la figure 3.12 l'importance d'effectuer aussi un « prénettoyage électrique ». L'influence de la valeur du champ électrique de « prénettoyage » imposé avant le temps d'attente a donc été testé, de manière à vérifier s'il était possible d'obtenir des conditions initiales totalement identiques et reproductibles.

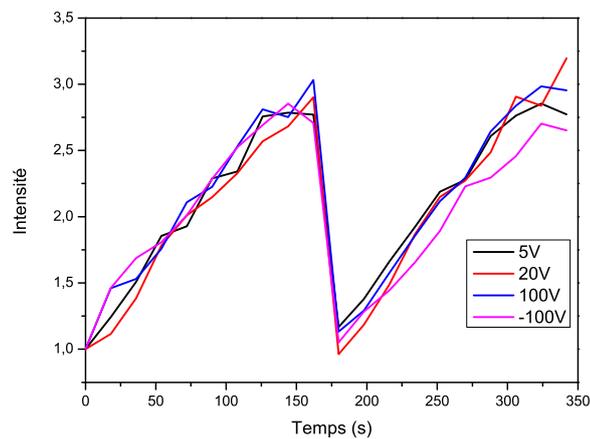


FIGURE 3.13 – Influence de la valeur du champ électrique pour le nettoyage électrique. Le nettoyage comprend donc un champ électrique imposé pendant une minute puis 10 minutes d'injection par pression du liquide, puis 10 minutes de repos.

Ces dernières expériences sont présentées dans la figure 3.13. Elles montrent qu'il est possible d'obtenir une très bonne reproductibilité sur le court terme puisque la déviation standard est inférieure à 8%. La valeur du champ électrique de nettoyage n'a pas d'influence, il semble cependant qu'un nettoyage électrique soit nécessaire sans que nous sachions pourquoi.

A la suite de ces résultats, j'ai convergé vers le protocole optimal de préparation de la puce qui devra être réalisé avant chaque mesure pour assurer un écart type de l'ordre de 10% :

- Nettoyage électrique par application de 20 V pendant 3 minutes
- Injection hydrodynamique de liquide pendant 10 minutes afin de renouveler la solution dans le dispositif
- Mise à l'équilibre en pression dans les 4 réservoirs pendant 10 minutes.

3.III.C Temps de vie des dispositifs

Il reste encore un dernier point à vérifier : la reproductibilité pour de très longs temps d'expérience. Nous avons vu dans le Chapitre 2 que les dispositifs de 1ère génération, c'est-à-dire fabriqués à base de silicium amorphe, réagissaient électrochimiquement. Cette dégradation sur quelques heures peut expliquer les différences significatives observées d'expérience en expérience et la non reproductibilité pour des expériences longues. Une série de deux expériences successives d'électropréconcentration à -75 V (avec le protocole décrit précédemment) a été réalisée dans le même microdispositif sur plusieurs jours. Le résultat de ces expériences est répertorié dans la figure 3.14. L'allure et la signification physique de ces courbes seront discutées dans le chapitre suivant dédié aux expériences d'électropréconcentration. L'information importante que l'on peut extraire de ces courbes est l'excellente reproductibilité de 13% observée.

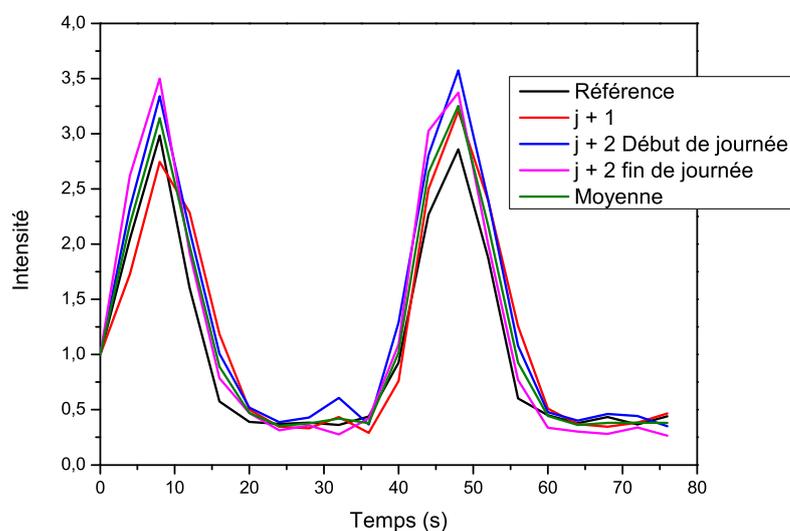


FIGURE 3.14 – Reproductibilité sur le long terme pour deux expériences de 40 secondes d'électropréconcentration chacune réalisées sur plusieurs jours. D'autres expériences ont été réalisées (différentes tensions appliquées) ont a lieu pendant ces 3 jours, ce qui aurait pu endommager la puce.

3.IV Conclusion

Le banc expérimental de mesures a été amélioré afin de pouvoir maîtriser l'application des paramètres pertinents d'électropréconcentration (pression et champ électrique) dans des dispositifs micro - nano - fluidiques de manière indépendante pour chaque réservoir. J'ai également testé la fiabilité des mesures qui seront présentées dans le chapitre suivant. Les optimisations, que j'ai apportées à la technologie de fabrication des puces mais également au protocole, ont permis d'obtenir des mesures avec une marge d'erreur de l'ordre de 10% tant pour les temps courts que sur les expériences longues. Rappelons que le gain est important puisque l'écart type était de 30% lors de mon arrivée en thèse. Les barres d'erreur qui sont de l'ordre de 10% ne figureront pas sur les graphes du prochain chapitre.

Il aura fallu attendre qu'une expérience décisive révèle qu'elles étaient erronées pour que nombre de ces théories soient jetées à bas... Ainsi en toute science, le travail le plus précieux est-il accompli par l'expérimentateur qui doit garder les théoriciens dans le droit chemin

- Michio KAKU -

Chapitre 4

Transport ionique dans la nanofente : études expérimentales

Ce chapitre est composé de trois parties. Chacune d'elle correspond à un type de mise en mouvement de liquide à travers le dispositif MNM (figure 1.30). Tout d'abord, je me suis intéressé à la mise en mouvement du liquide par simple pression hydrodynamique. Ces expériences appelées de rétention n'avaient encore jamais été étudiées dans un dispositif nanofluidique MNM. Elles permettent de caractériser la nanofente et de déterminer son coefficient d'exclusion. La deuxième section est consacrée à l'approfondissement de l'électropréconcentration simple avec une mise en mouvement sous champ électrique. Enfin, la troisième correspond aux expériences réellement originales de cette thèse : l'électropréconcentration modulée. Dans ce cas la mise en mouvement se fait en combinant une pression hydrodynamique et un champ électrique.

Comme nous l'avons discuté dans le Chapitre 1, l'efficacité de la préconcentration dépend de la compétition entre vitesse du fluide et vitesse propre de l'analyte. Pour étudier le rôle de la vitesse propre de l'analyte, j'ai utilisé deux sondes modèles : la fluorescéine qui est un petit di-anion ayant une forte mobilité électrophorétique et la BSA beaucoup plus lente.

4.I Mise en mouvement hydrodynamique et phénomène de rétention

4.I.A Répulsion électrostatique et rétention

Grâce au banc expérimental décrit dans le chapitre précédant, j'ai pu dès la première année de thèse réaliser des expériences avec une mise en mouvement par pression seule dans un dispositif micro-nanofluidique. Nous appellerons « rétention » la préconcentration résultante à l'entrée de la nanofente (voir la figure 1.30b du Chapitre 1). Ces expériences ont eu un double intérêt puisqu'elles ont permis d'une part d'obtenir une première observation expérimentale de ce phénomène de rétention dans un dispositif microfluidique, et d'autre part de s'assurer qu'aucune instabilité ne pourrait rendre impossible les expériences d'électropréconcentration modulée. Dans tout ce chapitre, la structure étudiée est celle qui est définie dans la figure 4.1.

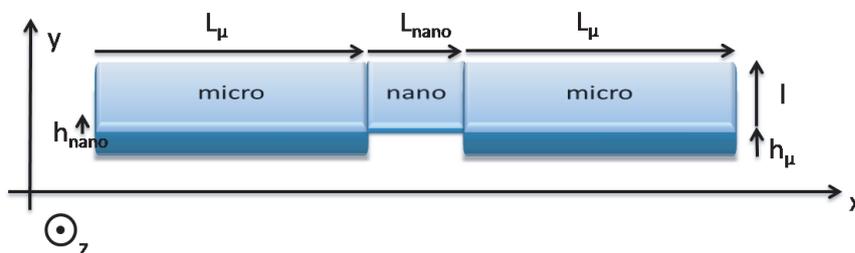


FIGURE 4.1 – Structure micro-nano-micro fluidique étudiée dans ce chapitre. La largeur des canaux (l) = $100 \mu\text{m}$, la longueur des microcanaux (L_μ) = 1 cm , les autres valeurs (h_μ , h_{nano} et L_{nano} respectivement hauteur des microcanaux, de la nanofente et longueur de la nanofente) varient d'une expérience à l'autre et seront indiquées pour chacune d'elles.

La partie suivante, consacrée à la rétention, permet de mieux comprendre la dynamique ainsi que l'efficacité de ce phénomène. Un modèle a été élaboré et est étayé expérimentalement.

Pour ces expériences, une surpression hydrodynamique est imposée à travers la nanofente de 50 nm de hauteur et $20 \mu\text{m}$ de long. Le liquide est forcé à s'écouler dans la nanofente, entraînant avec lui les ions. Une partie de ceux-ci sont piégés à l'entrée du fait de la perméabilité sélective (figure 4.2b).

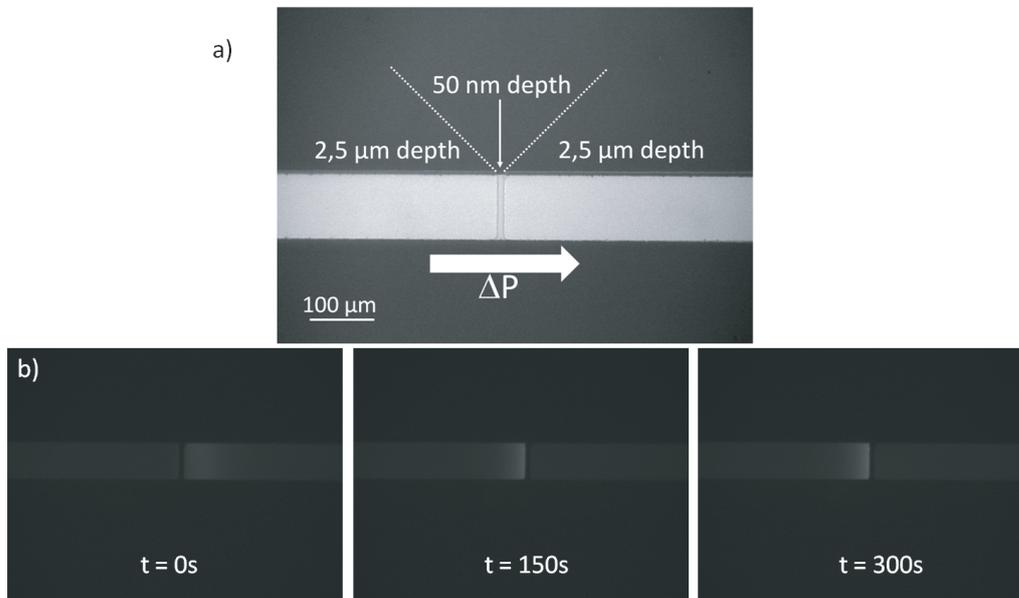


FIGURE 4.2 – a) Principe de mouvement dans le dispositif pour les expériences de rétention. b) Evolution et localisation de la concentration de la fluorescéine durant les expériences avec une pression de 1 bar.

4.I.B Théorie

Cette partie est consacrée à la mise en équation du phénomène de rétention. Ces calculs permettent notamment de calculer et donc prévoir la préconcentration maximale atteignable. La détermination expérimentale du coefficient d'exclusion dans la nanofente α permet, grâce à ce modèle, de remonter au potentiel zeta.

Cette section a pour but de comprendre quels sont les mécanismes de transport d'ions négatifs (dans ce cas la fluorescéine) à l'interface micro / nano à l'origine d'un enrichissement localisé (figure 4.2b). Le modèle présenté ici permet de discuter théoriquement des paramètres (diffusion, répulsion, longueur de la nanofente). Ce modèle permet de prédire la valeur de la concentration à saturation C_{max} et le taux maximal de préconcentration par rétention. Le rôle de chaque paramètre sur C_{max} est discuté théoriquement puis expérimentalement. Ces paramètres donnent des tendances qui peuvent permettre d'améliorer de prochaines expériences de rétention, dans le but d'obtenir de très fortes concentrations.

4.I.B.1 Mise en équation du problème

Comme pour tout type d'expérience dans cette géométrie, le phénomène d'enrichissement et d'exclusion d'ions dans la nanofente à cause de la répulsion électrostatique

limite le transport ionique. Afin de comprendre comment ce transport sélectif est affecté par un mouvement du liquide initié par une pression externe, je me suis intéressé au suivi de la concentration à l'interface micro-nano, les flux en présence sont représentés sur la figure 4.3.

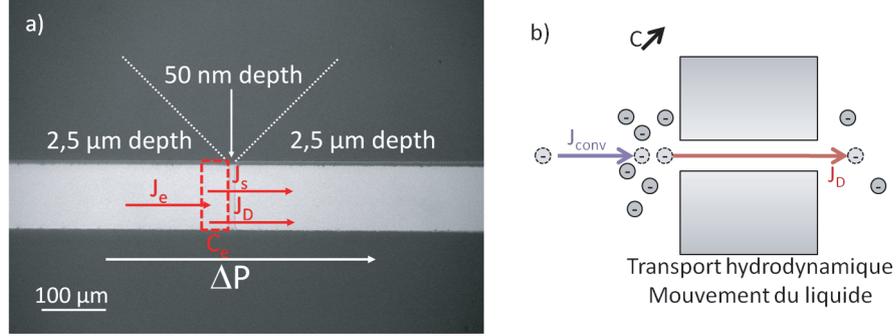


FIGURE 4.3 – Flux utilisés pour modéliser la préconcentration due au phénomène de rétention.

Je ne me suis intéressé expérimentalement qu'aux flux de fluorescéine (espèces avec deux charges négatives) utilisée comme sonde dans la partie expérimentale. La diffusion en amont de la nanofente dans le microcanal est négligée, car, dans ce cas, elle est négligeable devant la convection (J_e) (pic de concentration très localisé à l'entrée de la nanofente). Si l'on se place à l'entrée et la sortie de la nanofente, on obtient des flux convectifs tels que :

$$J_e = C_0 \times v_\mu \quad (4.1)$$

$$J_s = \frac{1}{h_{nano}} \int_{z=0}^{h_{nano}} C_e \exp\left(\frac{2F\varphi}{RT}\right) \times v_\mu \times dz \quad (4.2)$$

Avec J_e et J_s les flux de fluorescéine dans les microcanaux à l'entrée et la sortie de la nanofente, C_0 la concentration dans les réservoirs qui est amenée des réservoirs vers l'interface micro-nano par le liquide en mouvement, C_e la concentration à l'entrée de la nanofente, F la constante de Faraday, φ le potentiel électrostatique dans la nanofente, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue, v_μ la vitesse dans les microcanaux et S la section. Pour simplifier le problème, je considère v_μ indépendante de z (hypothèse que le profil est droit et non parabolique dans la section).

L'Eq. (4.2) met en évidence l'effet barrière de la nanofente qui se traduit par un transport réduit pour les espèces négatives dans l'EDL et s'écrit :

$$J_s = C_e \times v_\mu \times \alpha / \alpha = \frac{1}{h_{nano}} \int_{z=0}^{h_{nano}} \exp\left(\frac{2F\varphi(z)}{RT}\right) dz$$

(4.3)

Par la suite, je nommerai α le coefficient d'exclusion des ions négatifs dans la nanofente. Le cas d'un potentiel négatif très intense (tendant vers $-\infty$ en moyenne dans la nanofente), empêche le passage de fluorescéine et donne $\alpha \rightarrow 0$. Pour un très faible potentiel dans la nanofente (tendant vers 0 dans la nanofente), il n'y aura pas de perméabilité sélective, avec $\alpha \rightarrow 1$.

Ce paramètre évolue donc entre ces deux cas limites soit : 0 (répulsion infinie) $\leq \alpha \leq 1$ (pas de répulsion).

Le transport diffusif (J_D) à travers la nanofente dû aux différences de concentration entre l'entrée de la nanofente (C_e) et la sortie de la nanofente ($C_s = C_0$) s'écrit :

$$J_D = -D \frac{dC}{dx} = D \frac{C_e - C_0}{L_{nano}} \quad (4.4)$$

avec D le coefficient de diffusion de l'analyte. La différence entre flux entrants et sortants donne l'évolution temporelle de la concentration grâce au principe de conservation de la matière :

$$\frac{dC}{dt} = J_e - J_s - J_D \quad (4.5)$$

Si l'on insère l'Eq. (4.1), (4.2), (4.4) dans l'Eq. (4.5), on obtient :

$$\frac{dC}{dt} = C_0 \times v_\mu - C_e \alpha \times v_\mu + D \frac{C_e - C_0}{L_{nano}} \quad (4.6)$$

A l'équilibre des concentrations en fonction du temps on obtient :

$$\frac{dC}{dt} = 0 \quad (4.7)$$

soit

$$0 = C_0 \times v_\mu - C_{max} \alpha \times v_\mu + D \frac{C_{max} - C_0}{L_{nano}} \quad (4.8)$$

d'où l'expression de la concentration à la saturation :

$$C_{max} = C_0 \frac{(v_\mu - D/L_{nano})}{v_\mu \alpha - D/L_{nano}} \quad (4.9)$$

avec C_{max} la concentration maximale à l'entrée de la nanofente.

Cette équation nous donne le domaine de validité de ce modèle : il n'est valable que pour les vitesses telles que

$$v_\mu \geq D/\alpha L_{nano} \quad (4.10)$$

Si l'équation (4.10) n'était pas respectée, la concentration maximale serait négative ce qui n'est pas acceptable physiquement. Ceci signifie qu'il faut une vitesse d'apport de fluorescéine dans le microcanal qui soit supérieure à la vitesse de diffusion. En effet, si la diffusion est supérieure à la vitesse de la fluorescéine, la diffusion l'emporte sur tous les autres phénomènes et la concentration reste constante et homogène dans tout le système.

Sur mon banc de mesure, j'ai été capable de déterminer cette concentration maximale ainsi que son évolution temporelle. La concentration à l'entrée de la nanofente est donc régie par l'Eq. (4.6) qui se réécrit :

$$\frac{dC_e}{dt} = -C_e\left(\alpha v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}\right) + C_0\left(v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}\right) \quad (4.11)$$

Cette équation différentielle du premier ordre avec second membre est de la forme $y' = ay + b$; avec $y' = \frac{dC_e}{dt}$, $y = C_e$, $a = -\left(\alpha v_\mu - \frac{D}{L}\right)$ et $b = C_0\left(v_\mu - \frac{D}{L}\right)$. La solution générale d'une telle équation est :

$$y = -\frac{b}{a} + A \exp(at) \quad (4.12)$$

soit

$$C_e(t) = \frac{C_0\left(v_\mu + \frac{D}{L_{nano}}\right)}{\alpha v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}} + A e^{-\left(\alpha v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}\right) \times t}; \quad (4.13)$$

avec A une constante à déterminer à partir des conditions initiales. A $t=0$, la concentration à l'entrée de la nanofente est égale à C_0 : il n'y a pas encore de préconcentration, car la concentration est homogène dans les microcanaux. En se servant des Eq. (4.10) et (4.11), nous obtenons donc :

$$C_e(t=0) = C_0 = \frac{C_0\left(v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}\right)}{\alpha v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}} + A e^{-\left(\alpha v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}\right) \times 0} \quad (4.14)$$

$$A = C_0 \left(1 - \frac{\left(v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}\right)}{\alpha v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}}\right) \quad (4.15)$$

En réinjectant l'Eq. (4.15) dans (4.13), on obtient finalement l'expression de la concentration à l'entrée de la nanofente :

$$C_e(t) = \frac{C_0\left(v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}\right)}{\alpha v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}} + C_0 \left(1 - \frac{\left(v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}\right)}{\alpha v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}}\right) e^{-\left(\alpha v_\mu - \frac{D}{L_{nano}}\right) \times t} \quad (4.16)$$

Cette équation répond bien à notre problème :

à $t = 0$

$$\frac{C_0(v_\mu - D/L_{nano})}{\alpha v_\mu - D/L_{nano}} + C_0(1 - \frac{(v_\mu - D/L_{nano})}{\alpha v_\mu - D/L_{nano}})e^0 = C_0 \quad (4.17)$$

à $t \rightarrow \infty$:

$$\frac{C_0(v_\mu + D/L_{nano})}{\alpha v_\mu - D/L_{nano}} + C_0(1 - \frac{(v_\mu - D/L_{nano})}{\alpha v_\mu - D/L_{nano}})lim_{t \rightarrow \infty} e^{-Cste \times t} = \frac{C_0(v_\mu - D/L_{nano})}{\alpha v_\mu - D/L_{nano}} = C_{max} \quad (4.18)$$

qui correspond à la valeur trouvée dans l'Eq. (4.9). **Ce résultat permet de mettre en évidence que la préconcentration est limitée pour la rétention. En fonction des conditions expérimentales, elle peut même avoir une efficacité minime et donc être très peu intéressante.**

Etudions maintenant les paramètres expérimentaux influant sur l'efficacité de ce type de préconcentration par rétention.

4.I.B.2 Paramètres influants sur la rétention

Les équations (4.9) et (4.18) nous permettent de discuter l'efficacité de la préconcentration. Quatre paramètres sont présents dans cette équation : la longueur de la nanofente (L_{nano}), le coefficient de diffusion de l'espèce considérée (D), la vitesse dans le microcanal (v_μ) et le coefficient de répulsion électrostatique (α). Je vais ici discuter de chacun d'entre eux.

La longueur de la nanofente (L_{nano}) semble au premier abord un paramètre important. Cependant, nous appliquons la vitesse grâce à une différence de pression dans notre structure. La résistance hydrodynamique due aux frottements aux parois est également reliée à la géométrie. A partir de l'équation de Navier Stokes, pour un système où l'écoulement est établi et stationnaire, invariant suivant x et y ($v_x = v_x(z)$), et sans force de volume, nous obtenons sur x :

$$\eta \frac{\partial^2 v(z)}{\partial z^2} = \frac{\delta P}{L} \quad (4.19)$$

En intégrant deux fois en fonction de z avec des conditions de non glissement aux parois ($v(z=0)=0$ et $v(z=h_{nano})=0$) dans la nanofente, nous obtenons :

$$\frac{dv(z)}{dz} = \frac{\delta P}{L\eta} z + C1 \quad (4.20)$$

$$v(z) = \frac{\delta P}{2L\eta} z^2 + C1 \times z + C2 \quad (4.21)$$

Les conditions de non glissement aux parois ($v(z=0)$ et $v(z=h_{nano})=0$) nous donnent la solution particulière :

$$v(z) = \frac{\delta P}{2L\eta}(h_{nano}z - z^2) \quad (4.22)$$

En intégrant sur la section normale à x (cf. figure 4.1), nous obtenons un débit :

$$Q = \int_{z=0}^h \int_{y=0}^l v(z) dS = \frac{\delta P h^3 l}{12L\eta} \quad (4.23)$$

$$Q = \frac{\delta P h^3 l}{12L\eta} \quad (4.24)$$

Une fois que le débit est connu, par analogie électrique, nous sommes capables de déterminer la résistance hydrodynamique telle que :

$$\delta P = R_{hyd} \times Q \quad (4.25)$$

$$R_{hyd} = \delta P / Q = \frac{12L\eta}{h^3 l} \quad (4.26)$$

Dans le cas particulier de notre structure MNM où nous avons en série 2 microcanaux et une nanofente, nous obtenons un débit total :

$$Q = \frac{\delta P}{R_{hyd,tot}} \quad (4.27)$$

$$R_{hyd,tot} = 2R_{hyd,micro} + R_{hyd,nano} \quad (4.28)$$

$$R_{hyd,tot} = 2 \frac{12L_{micro}\eta}{h_{micro}^3 l} + \frac{12L_{nano}\eta}{h_{nano}^3 l} \quad (4.29)$$

Puisque $h_{nano}^3 \ll h_{micro}^3$, nous pouvons négliger la résistance dans les microcanaux. D'où :

$$Q = \frac{\delta P h_{nano}^3 l}{12 L_{nano} \eta} \quad (4.30)$$

$$v_{\mu} = \frac{Q}{S_{\mu}} = \frac{\delta P h_{nano}^3 l}{12 L_{nano} \eta} \times \frac{1}{h_{\mu} l} = \frac{\delta P h_{nano}^3}{12 L_{nano} \eta h_{\mu}} = v_{\mu} \quad (4.31)$$

L'Eq. (4.31) nous montre que la vitesse est inversement proportionnelle à la longueur L_{nano} de la nanofente. En remplaçant v_{μ} dans l'Eq. (4.9) on obtient :

$$C_{max} = C_0 \frac{\left(\frac{\delta P h_{nano}^3}{12 L_{nano} \eta h_{\mu}} - D/L_{nano} \right)}{\frac{\delta P h_{nano}^3}{12 L_{nano} \eta h_{\mu}} \alpha - D/L_{nano}} \quad (4.32)$$

Dans notre structure MNM, la concentration C_{max} est donc indépendante de la longueur de la nanofente. Puisque théoriquement, la longueur de la nanofente est un paramètre sans importance, la pression devient le paramètre déterminant à contrôler.

Expérimentalement, la pression maximale imposable est limitée par la résistance de la puce et des connectiques. Ceci limite donc la vitesse maximale atteignable dans les microcanaux et par la même, la concentration maximale.

4.I.B.2.a Le coefficient de diffusion

Ce paramètre est complexe, car il fait intervenir la convection à travers la nanofente et le transport sélectif des espèces négatives. Une mesure expérimentale directe de ce terme est impossible. Nous discuterons donc ici des seuls cas limites :

- Pour de très grands coefficients de diffusion de l'espèce que l'on cherche à préconcentrer, la vitesse de diffusion est supérieure à la vitesse à laquelle l'analyte est ramenée vers la nanofente, il n'y a pas de préconcentration et $C(t) = \text{constante} = C_0$.
- Dans le cas où ce coefficient est très faible devant la vitesse du liquide, nous obtenons l'expression de la concentration maximale suivante :

$$C_{max} = C_0 / \alpha \quad (4.33)$$

impliquant que **seul le facteur d'exclusion dans la nanofente régit le transport à travers la nanofente.**

La préconcentration sera donc meilleure pour des faibles coefficients de diffusion. En effet, en diminuant le taux de passage de l'analyte, la rétention est plus efficace.

4.I.B.2.b La vitesse du fluide : paramètre de pression

Pour voir l'évolution de l'efficacité de la préconcentration, reprenons les 2 cas limites. Pour le premier, la vitesse limite suit la condition de l'Eq. (4.10) et l'on a :

$$v_\mu - (D/\alpha L_{nano}) \rightarrow 0+ \quad (4.34)$$

$$C_{max} = C_0 \frac{D}{\alpha L_{nano}} \left(\frac{1/\alpha - 1}{0+} \right) \rightarrow +\infty \quad (4.35)$$

Ce résultat est très intéressant, car nous obtenons une concentration maximale et donc une préconcentration très importante pour de très faibles vitesses, juste supérieures à la vitesse de diffusion.

Dans le second cas, pour une vitesse infinie, la diffusion est dans ce cas négligeable et on se retrouve dans le cas de l'Eq. (4.33).

L'efficacité maximale que l'on puisse atteindre semble donc plus faible plus la vitesse du fluide est importante. Cette dépendance est confirmée en dérivant C_{max} en fonction de v_μ :

$$\frac{dC_{max}}{dv_\mu} = \frac{C_0 D/L(1-\alpha)}{(\alpha v_\mu - (D/L))^2} < 0 \quad (4.36)$$

car $0 < \alpha < 1$.

La dérivée de la concentration maximale en fonction de la vitesse du fluide étant négative, nous obtenons une meilleure préconcentration maximale en limitant la vitesse du fluide. C'est ce terme que j'ai décidé de tester expérimentalement. Grâce à mon banc expérimental et avec les puces de première génération à base de a-Si dont je disposais durant ma première année, j'ai pu moduler la vitesse par surpression hydrodynamique.

4.I.B.2.c L'exclusion

$$\alpha = \frac{1}{h_{nano}} \int_{z=0}^{h_{nano}} \exp\left(\frac{2F\varphi(z)}{RT}\right) dz$$

Comme nous l'avons vu, l'exclusion est caractérisée par l'Eq. (4.3) telle que : $0 \leq \alpha \leq 1$.

- Avec $\alpha = 0$ lorsque la répulsion est importante, il n'y a pas de transport d'analyte de charge négative à travers la nanofente . La concentration maximale vaut :

$$C_{max} = C_0 \frac{v_\mu - (D/L_{nano})}{D/L_{nano}}; \alpha \rightarrow 0 \quad (4.37)$$

Il est intéressant de noter que D est également dépendant du paramètre α [53]. Plus la répulsion est importante et plus le coefficient de transport diffusif est faible. Avec ces considérations cela nous ramène à :

$$C_{max} = C_0 \frac{v_\mu - (D/L_{nano})}{D/L_{nano}} \xrightarrow{\alpha \rightarrow 0} C_0 \frac{v_\mu}{D/L_{nano}} \xrightarrow{\alpha \rightarrow 0, D \rightarrow 0} \infty \quad (4.38)$$

Physiquement cela traduit le fait que, dans ce cas, toutes les espèces négatives sont bloquées par la nanofente. La concentration augmente donc en permanence.

- Avec $\alpha \leq 1$ lorsqu'il n'y a pas de répulsion, le transport devient non sélectif. La valeur maximale de la concentration vaut :

$$C_{max} = C_0; \alpha \rightarrow 1 \quad (4.39)$$

Il n'y a pas de répulsion et toutes les espèces passent, n'entraînant pas de préconcentration.

4.I.B.3 Conclusion sur la théorie de la rétention

Grâce à ce modèle (basé sur l'étude des flux entrants et sortants de la nanofente), j'ai été capable de déterminer théoriquement l'évolution de la concentration due à la rétention. L'effet de saturation a pu être mis en évidence, et la valeur maximale a pu être déterminée en fonction des paramètres expérimentaux. Pour ce mécanisme de rétention, deux d'entre eux sont importants puisqu'ils influent sur l'efficacité de la rétention :

- la vitesse imposée au fluide par le biais d'une différence de pression de part et d'autre de la nanofente. Plus la différence de pression est faible, plus la valeur maximale est importante. Cependant, notons que le temps nécessaire à une forte augmentation de concentration est plus long (l'analyte étant très lentement transporté des réservoirs vers la nanofente).
- le facteur d'exclusion dans la nanofente. Plus celui-ci est élevé plus la concentration à la saturation est importante. Ce facteur est quant-à lui très difficile à maîtriser expérimentalement. Il est néanmoins possible, grâce à ce modèle, de remonter à sa valeur et donc de déterminer la valeur du potentiel zeta (potentiel de surface aux parois). D'après ce modèle, la rétention pourrait donc être une technique de détermination expérimentale du potentiel zeta.

4.I.C Rétention et régime de préconcentration : simulations

Des simulations sur la rétention ont été réalisées par A. Plecis [46] grâce à l'algorithme permettant de simuler les régimes d'électropréconcentration (figure 4.4). Parmi les régimes de préconcentration proposés à la fin du Chapitre 1, la rétention peut s'assimiler à un régime de Stacking puisque le potentiel extérieur tend vers 0V.

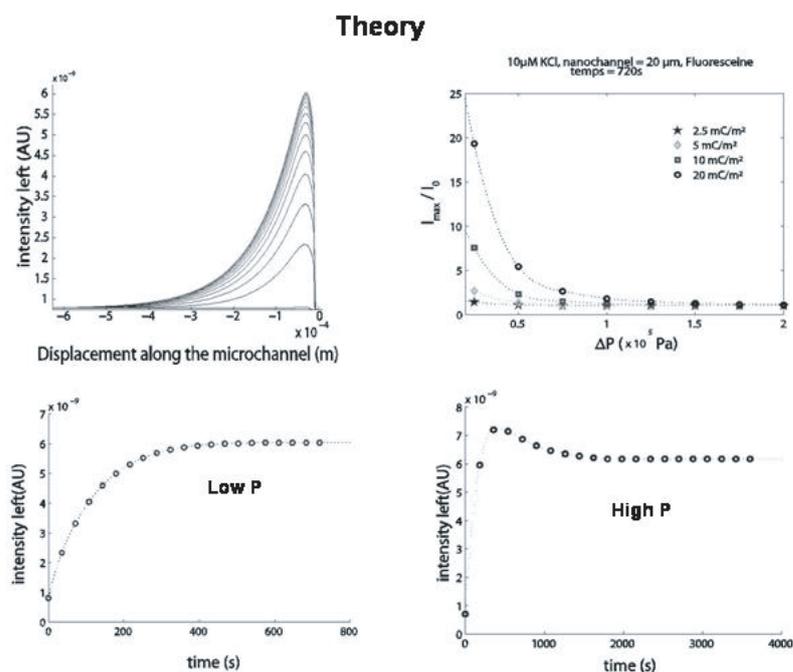


FIGURE 4.4 – En haut à gauche : profil de concentration en fonction du temps de la fluorescéine pour un nanofente de 50 nm de hauteur, des microcanaux de 2.5 μm de hauteur. En haut à droite : préconcentration normalisée de la saturation en fonction de la surpression appliquée pour une charge de surface de 2.5 mC, 5 mC, 10 mC et 20 mC. En bas : préconcentration de la fluorescéine en fonction du temps pour une faible surpression appliquée (à gauche) et une forte surpression (à droite).

Le profil de concentration en fonction du temps (figure 4.4 en haut à gauche) augmente à l'entrée de la nanofente dans le microcanal où la surpression est imposée. Cette concentration augmente jusqu'à une saturation.

Cette valeur à saturation décroît lorsque l'on augmente la surpression (figure 4.4 en haut à droite). Cette observation est en accord avec la théorie basée sur les flux précédemment décrite. Plus on augmente la surpression, plus l'énergie apportée à la molécule pour franchir la barrière de potentiel de la nanofente est importante. Ces simulations m'ont permis de tester l'effet barrière de la nanofente sur la préconcentration. La valeur de la saturation augmente avec la valeur de la charge de surface (et donc du

potentiel ζ et de l'effet d'exclusion dans la nanofente).

Enfin, nous retrouvons la cinétique de préconcentration en fonction du temps pour les faibles et fortes pressions.

La section suivante est dédiée à la validation expérimentale du modèle théorique que j'ai développé dans cette première partie, pour le paramètre de vitesse.

4.I.D Validation expérimentale

Sur mon banc expérimental, j'ai pu mesurer en temps réel la concentration d'un analyte marqué en fluorescence. Pour ces expériences, la sonde modèle est la fluorescéine qui est un di-anion et qui possède un fort coefficient de diffusion. Toutes les courbes dans cette section ont été obtenues avec des solutions à $10\mu\text{M}$ de KCl et à $1\mu\text{M}$ de fluoresceine.

La figure 4.5 suivante décrit une expérience de préconcentration par rétention obtenue après cinq minutes d'application d'une pression de 1 bar.

Dans cette partie destinée à la validation expérimentale, la concentration C_0 n'était pas déterminable car trop proche du bruit (dû à la sensibilité de la caméra et de la lumière environnante) dans les conditions expérimentales. Les résultats présentés sont donc en unité arbitraire et ne peuvent pas être normalisés.

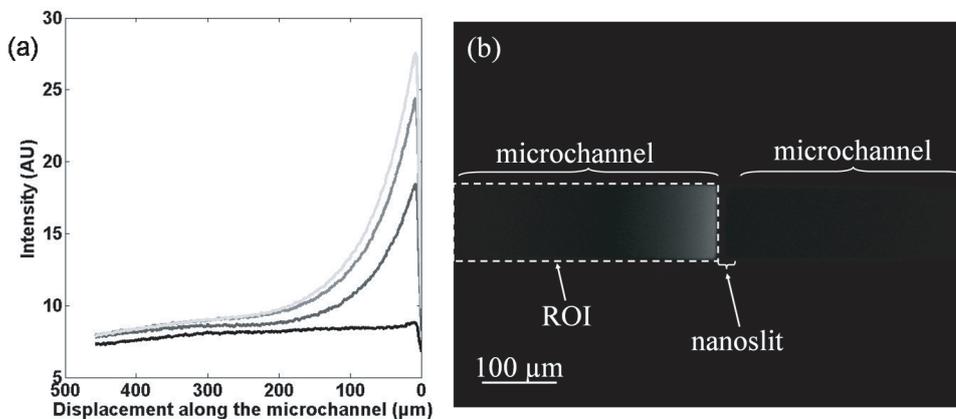


FIGURE 4.5 – A gauche : profils de concentration obtenus dans la ROI (Region Of Interest, cf. Chapitre 3) à une minute d'intervalle. L'évolution temporelle se fait de la courbe la plus foncée à la courbe la plus claire. A droite, image obtenue durant l'expérience mettant en évidence la localisation de la préconcentration.

A partir de ces profils spatiaux de concentration, on retrouve une préconcentration localisée à l'entrée de la nanofente, les différences de transport ionique des espèces négatives entre microcanal et nanofente permettant de stopper une partie du flux ionique. La figure 4.6 donne un exemple de la dépendance temporelle de la concentration

à l'entrée de la nanofente lorsqu'une pression est appliquée. On observe une évolution spatiale expérimentale (figure 4.5) en accord avec les profils simulés (figure 4.4 gauche haut). Cette préconcentration correspond, si l'on se réfère à la terminologie de la fin du premier chapitre, à un régime dit de Stacking.

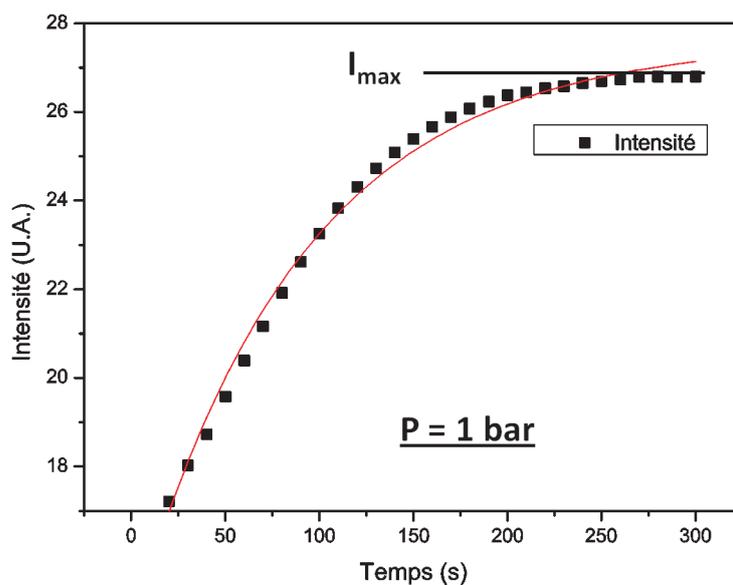


FIGURE 4.6 – Evolution temporelle de la concentration à l'entrée de la nanofente pour une pression de 1 bar. La valeur I_{\max} correspond à $I(t=\infty)$ soit l'intensité à laquelle la concentration sature.

L'évolution temporelle vers une saturation peut s'exprimer comme :

$$C(t) = A + Be^{(-d \times t)}$$

Les coefficients obtenus grâce à la régression de cette courbe ne permettent pas, dans ce cas précis, de remonter aux paramètres théoriques, car l'intensité de la concentration initiale (C_0) n'est pas discernable du bruit. Cependant, le bon accord permet de valider l'expression générale de la concentration en fonction du temps (le léger décalage est notamment dû au fait que C_0 soit dans le bruit de la mesure).

Mon modèle nous a permis précédemment de discuter de l'influence de la vitesse du fluide sur la valeur de la concentration maximale (I_{\max} dans nos mesures).

Expérimentalement, nous faisons varier la pression. Or d'après l'Eq. (4.32) la relation entre la pression et la vitesse est linéaire, d'où une dépendance de C_{\max} en fonction la pression du type $f(x) = (b + cx)/(1 + ax)$. L'Eq. (4.32) théorique peut donc se réécrire en fonction du paramètre de pression comme suit :

$$C_{max} = \frac{-\frac{C_0 h_{nano}^3}{12D\eta h_\mu} P + C_0}{-\frac{h_{nano}^3 \alpha}{12D\eta h_\mu} P + 1} \quad (4.40)$$

ce qui donne $b=-C_0$, $c=-\frac{C_0 h_{nano}^3}{12D\eta h_\mu}$, $x=P$ et $a=-\frac{h_{nano}^3 \alpha}{12D\eta h_\mu}$.

La courbe de la figure 4.7 présente l'évolution expérimentale de C_{max} à saturation avec pression, ainsi que le fit calculé d'après la théorie.

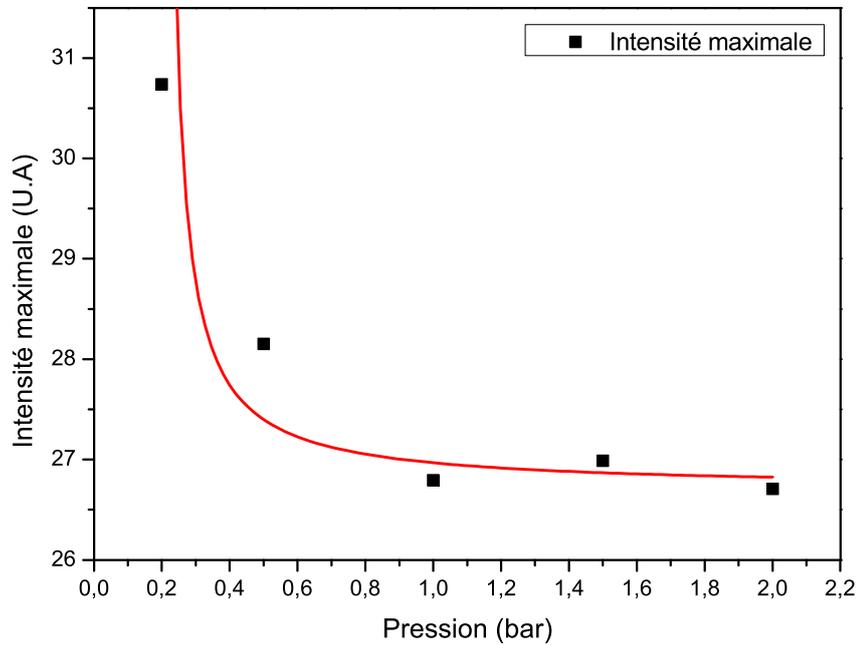


FIGURE 4.7 – Concentration maximale obtenue au bout de 5 minutes d'expérience de rétention en fonction de la pression appliquée. 5 minutes ont été suffisantes pour obtenir la saturation de la concentration.

Nous obtenons bien une décroissance de la concentration en fonction de la pression (et de la vitesse) imposée. Comme pour la courbe présentée en figure 4.6, il est impossible de relier les coefficients aux paramètres du modèle du fait que C_0 n'est pas discernable du bruit.

Durant ces expériences, j'ai observé une cinétique de préconcentration différente pour des fortes pressions. La figure 4.8 illustre à titre d'exemple la rétention qui se produit à une pression maintenue à deux bars.

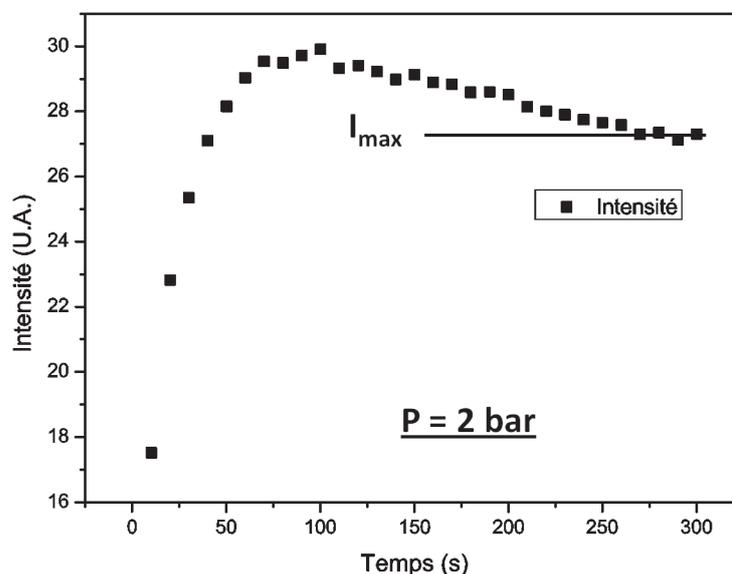


FIGURE 4.8 – Evolution temporelle de la concentration à l'entrée de la nanofente pour une pression de 2 bars. La valeur I_{\max} correspond à $I(t=\infty)$ soit l'intensité à laquelle la concentration sature.

Cette courbe se décompose en deux parties : la première, croissante, correspond à l'allure de la courbe de la figure 4.6 ; suivie d'une décroissance. On retrouve une allure de courbe semblable à celle simulée (figure 4.4). Physiquement, cette décroissance avant saturation peut se comprendre par le fait que la diffusion dans une nanofente est très lente [53]. Dans ce cas, je pense que la vitesse d'apport des analytes est très supérieure à la vitesse de diffusion durant la première phase. L'apport en biomolécule est très supérieur à la diffusion. Si l'on compare le maximum local pour 2 bars (30) au maximum pour 1 bar (27), celui-ci est en effet supérieur. Ensuite la concentration diminue pour atteindre une saturation. Pour les hautes pressions, nous retrouvons donc bien la présence d'un maximum local avant la saturation comme observé dans les simulations.

Cette dynamique n'est pas observée dans le cas où les vitesses sont faibles, car, dans ce cas, la vitesse du fluide doit probablement être inférieure à la vitesse de diffusion à travers la nanofente.

4.I.E Conclusion sur les expériences de rétention

J'ai pu vérifier que l'utilisation d'une pression comme technique de mise en mouvement du liquide dans notre dispositif n'engendrait pas de problème particulier sur le transport ionique à travers la nanofente. L'exclusion électrostatique dans un milieu confiné régit toujours le passage des co-ions. Le modèle développé dans ce chapitre permet de remonter à certains paramètres expérimentaux dont le potentiel zeta (contenu dans le terme α du modèle). Cette technique permet expérimentalement en quelques minutes d'avoir accès à la valeur du potentiel de surface.

Ces expériences nous ont également permis de tester l'efficacité de la rétention comme technique de préconcentration sur puce. Même si, en théorie, il est possible d'obtenir de très grosses augmentations de concentration, le temps nécessaire pour obtenir de tels résultats reste trop élevé. Cette considération réduit fortement l'intérêt d'utiliser cette technique pour préconcentrer sur puce de manière efficace et rapide.

4.II Mise en mouvement électrique et électropréconcentration

4.II.A Introduction à l'électropréconcentration : rappel du Chapitre 1

Nous avons vu qu'il existait 4 régimes d'électropréconcentration qui dépendaient de la compétition entre la vitesse électrophorétique et la vitesse électroosmotique (figure 4.9).

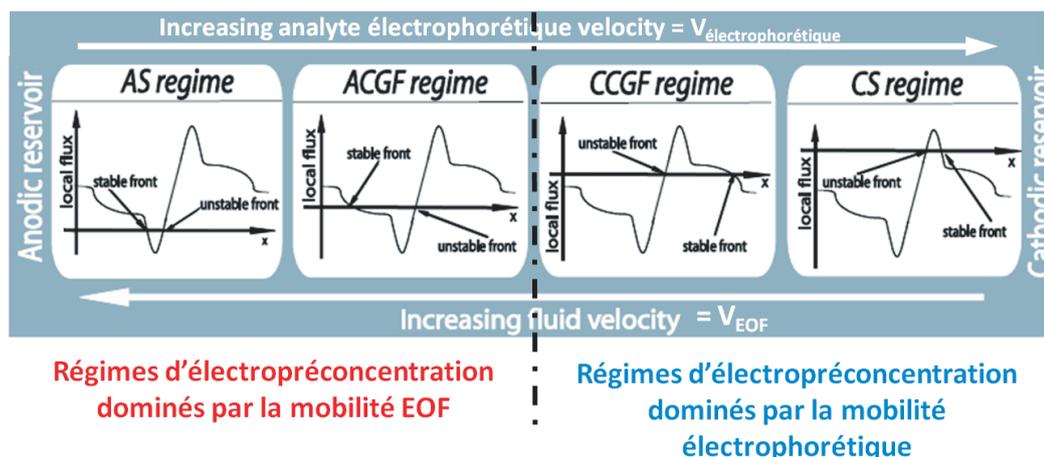


FIGURE 4.9 – Schéma de principe des 4 régimes d'électropréconcentration : de gauche à droite le flux électrophorétique devient de plus en plus prépondérant.

De façon générale, on peut distinguer deux types de molécules : celles qui présentent une forte mobilité électrophorétique et celles qui sont plus lentes. Dans la suite de ce chapitre, deux différentes sondes modèles ont été utilisées : la fluorescéine qui possède une forte mobilité et la BSA qui est une plus grosse biomolécule et qui présente une plus faible mobilité.

Cette section II est consacrée à l'étude du cas simple de l'électropréconcentration avec la fluorescéine. Les régimes de CS et CCGF sont donc attendus pour cette molécule rapide (comme décrit dans la figure 4.9 de droite).

L'utilisation d'une sonde fluorescente modèle plus lente a été utilisée dans la section III suivante. Les régimes anodiques (et notamment l'ACGF pour lequel de forts taux de préconcentration ont été annoncés) sont donc attendus (figure 4.9 de gauche). Le régime anodique (ACGF) a déjà permis d'obtenir de forts taux d'électropréconcentration. Wang et al. [9], grâce à des astuces géométriques permettant une modulation de la vitesse dans les microcanaux à l'interface micro - nano - fluïdique, ont obtenus des taux de préconcentration d'un million en 40 minutes. Plecis et al. [39], par une étude théorique de la préconcentration dans un système linéaire micro - nano - micro fluïdique en série dans laquelle la vitesse de l'analyte peut être modulée, a obtenu numériquement des préconcentration de l'ordre de 10^3 en quelques minutes.

L'article de Plecis et al. prédit quatre régimes de préconcentration (figure 4.10). Ils se définissent notamment grâce à la position par rapport à la nanofente. Ces expériences numériques ont permis de faire varier la vitesse de l'analyte tout en gardant la vitesse du fluide constante. On peut ainsi écrire la vitesse de la particule :

$$v_{particule} = \underbrace{(\mu_{EOF} + \mu_{Contre-Poiseuille})}_{constante} + \underbrace{\mu_{électrophorétique}}_{variable} \times \underbrace{E}_{constante} \quad (4.41)$$

$$v_{particule} = \underbrace{v_{liquide}}_{constante} + \underbrace{v_{électrophorétique}}_{variable} \quad (4.42)$$

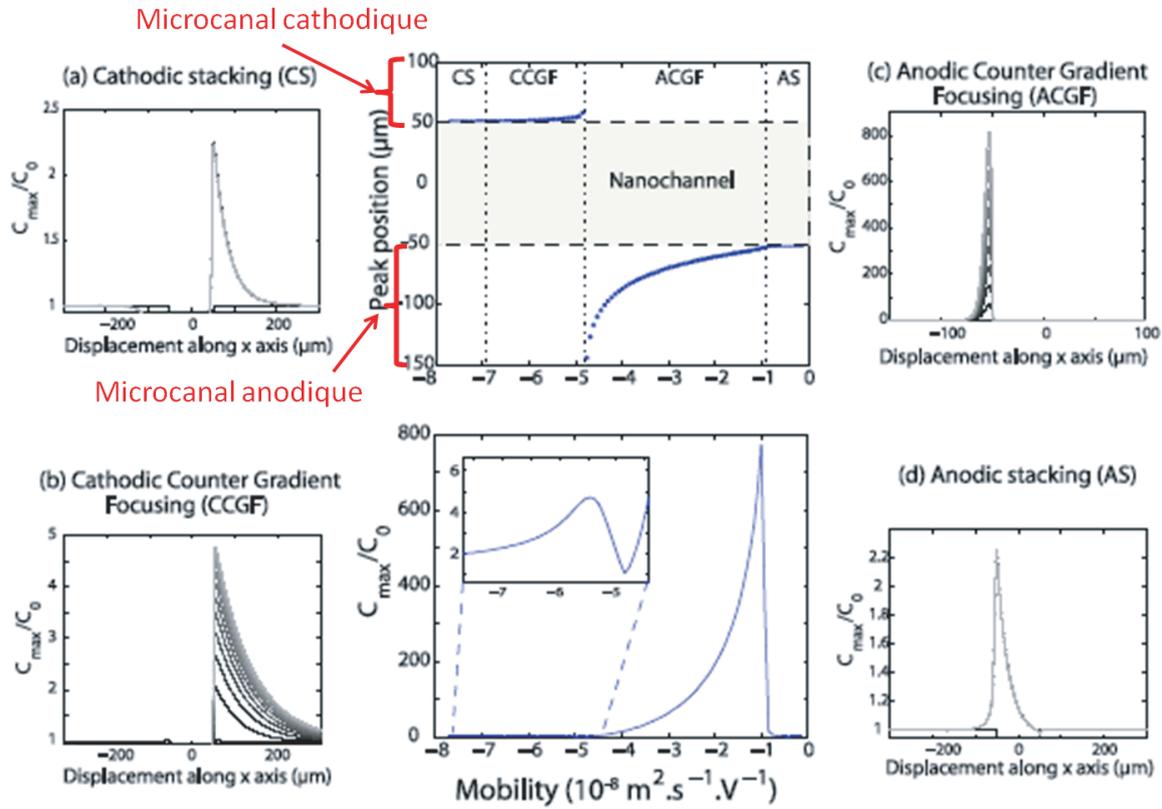


FIGURE 4.10 – Position (centre-haut) et taux (centre-bas) de la préconcentration maximale le long de la structure MNM après 1 minute. Les profils de préconcentration rapportés en a, b, c et d correspondent à des molécules de mobilité électrophorétique décroissante (respectivement 7.1 , 5.4 , 1 and $0.54 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) [46].

On observe que les régimes saturants de Stacking (anodique AS (figure 4.10d) et cathodique CS (figure 4.10a)) ne permettent pas d'obtenir de forte préconcentration : le taux de préconcentration est de l'ordre de 2.2 dans les simulations. Les régimes focalisants présentent quant à eux de meilleurs taux de préconcentration : environ 5 pour le

CCGF et près de 800 pour l'ACGF (figure 4.10 c et centre bas). C'est donc ce régime ACGF que l'on va chercher à retrouver expérimentalement. De cette étude par simulations, il ressort que les régimes de Stacking sont limités par la diffusion de l'analyte à travers la nanofente. Le régime CCGF est, quant à lui, limité par la baisse du champ électrique du côté cathodique, car l'enrichissement en concentration dans le microcanal cathodique entraîne une baisse du champ électrique qui diminue l'effet de focalisation de l'électropréconcentration.

La section III présentera enfin une méthode originale d'électropréconcentration modulée avec la BSA. Nous verrons que cette technique permet, avec **la même biomolécule** de nouvelles perspectives de focalisation.

4.II.B Cinétique de l'électropréconcentration simple de la fluorescéine

Nous allons maintenant nous intéresser au cas de l'électropréconcentration décrite dans la figure 1.30c du Chapitre 1. La mise en mouvement se fait par application d'un champ électrique externe. Nous avons vu dans le Chapitre 1, qu'il n'existe pas d'expériences systématiques et que pour la fluorescéine, plusieurs régimes de préconcentration ont pu être observés : Schoch et al. [41], Pu et al. [40] ont obtenu un stacking cathodique alors que Plecis al. [46] a publié des électropréconcentrations en régime dit de « Counter Gradient Focusing Cathodique » (CCGF). La figure 4.11 rappelle les flux mis en jeu ainsi que les profils de concentration qui ont été simulés pour la fluorescéine pour nos géométries MNM.

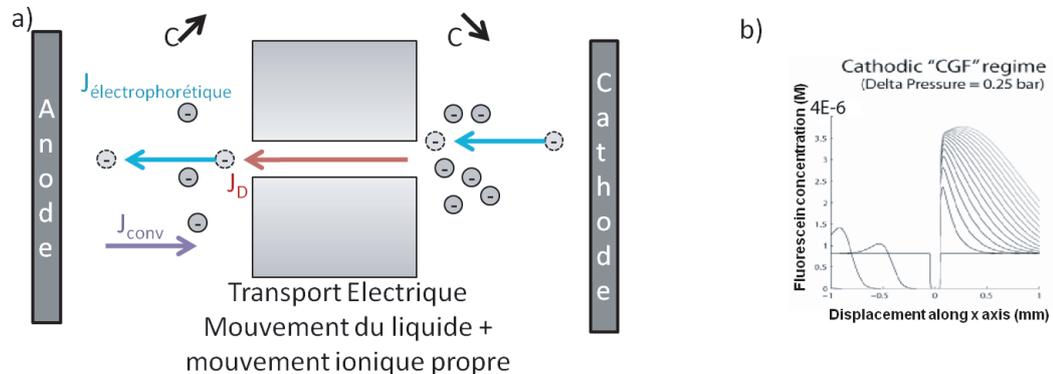


FIGURE 4.11 – A gauche : schéma des flux à prendre en compte pour les phénomènes d'électropréconcentration. A droite : Simulations des profils de concentration de la fluorescéine dans une solution tampon de $10 \mu\text{M}$ de KCl (hauteur nanofente = 50 nm , hauteur microcanaux = $2.5 \mu\text{m}$) en fonction du temps.

La fluorescéine étant un petit di-anion, elle possède une mobilité électrophorétique très forte. Ceci explique pourquoi seuls les régimes cathodiques de CS et de CCGF ont été observés.

Comme expliqué à la fin du Chapitre 1, il y a beaucoup d'inconnus sur les paramètres expérimentaux, mais parmi les paramètres accessibles, j'ai décidé de m'intéresser à la cinétique de préconcentration en étudiant l'influence de la géométrie et de la tension appliquée. Dans cette section, toutes les expériences ont été réalisées avec une solution de tampon phosphate (PB) à 0.5mM et de 50 μ M de fluorescéine. La géométrie des dispositifs [46] (cf. figure 4.12), a été modifiée en changeant simplement les hauteurs des microcanaux et de la nanofente.

La figure 4.12 présente un exemple de profils de concentration obtenus dans le réservoir cathodique obtenus à 100V, pour $h_{nano}=70$ nm et $h_{micro}=2$ μ m.

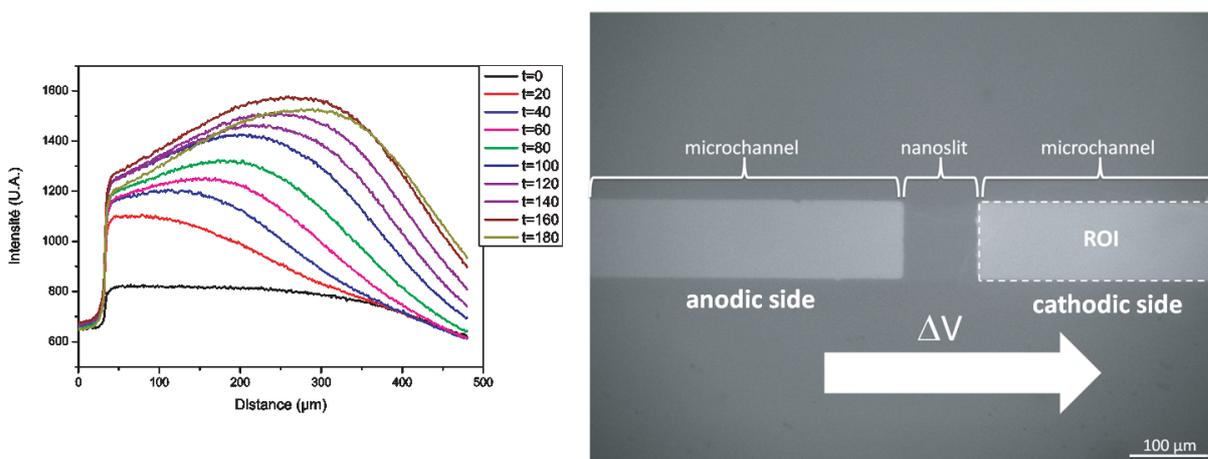


FIGURE 4.12 – A gauche, évolution temporelle de la concentration de fluorescéine dans le microcanal cathodique (ROI). A droite, géométrie utilisée pour cette section.

Grâce à ce type de profils spatiaux, nous sommes capables de remonter à la dynamique de la préconcentration de la fluorescéine dans notre géométrie, lorsque qu'un champ électrique est appliqué. La concentration commence par augmenter autour d'un point de focalisation dans un premier temps. Ce point de focalisation recule au cours du temps, puis devient de plus en plus « large » et diffus. Si l'on s'intéresse uniquement au point de focalisation qui correspond à l'intensité maximale, la concentration augmente dans un premier temps puis, à cause de la diffusion finit par diminuer (cf. courbe à 180 secondes de la figure 4.12). Cette diffusion est liée à l'enrichissement du côté cathodique ce qui entraîne une diminution locale du champ électrique, qui devient de plus en plus faible devant la diffusion.

Ces observations sont en accord avec un article très récent de Zangle et al. (figure 4.13) [38].

La figure 4.13 présente des diagrammes 3D de l'évolution de la concentration (en couleur), où l'axe des y correspond au temps. On remarque que Zangle et al. obtiennent une préconcentration cathodique de l'Alexa Fluor 488 (mobilité très proche de la fluorescéine) que se soit pour un courant constant (figure 4.13 de droite) ou une tension

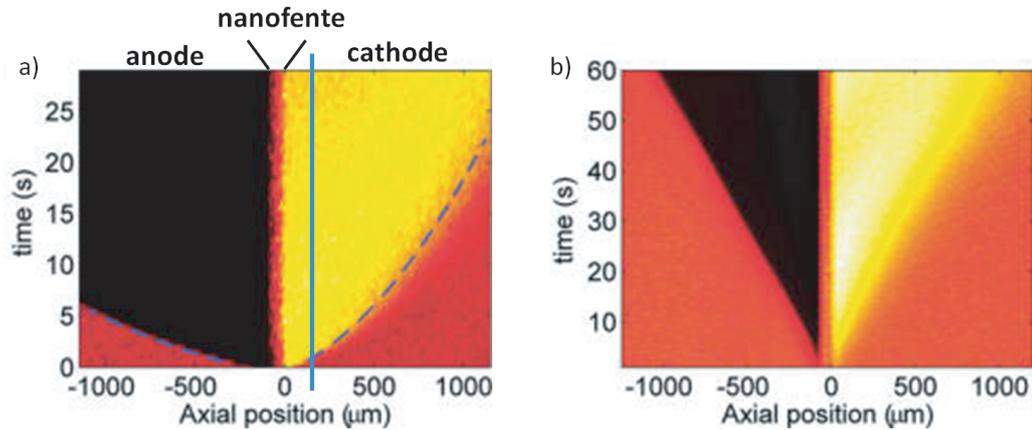


FIGURE 4.13 – Représentation spatiotemporelle de l'évolution de la concentration de l'Alexa Fluor 488 dans un dispositif MNM, le côté anodique étant sur la gauche de la courbe (valeur négative de l'abscisse). La distance est reportée en x , le temps sur l'axe y et la couleur permet de visualiser l'évolution de la concentration (noir = faible concentration, blanc - jaune = forte concentration). A gauche pour une tension appliquée constante de 100 V, à droite pour un courant constant de 800 pA.

appliquée constante (figure 4.13 de gauche). A 100 V (figure 4.13 de gauche), le front d'enrichissement progresse côté cathodique, comme la racine carrée du temps (courbe en pointillé). Si l'on regarde l'évolution de la concentration à $100 \mu\text{m}$ (ligne bleue sur la figure 4.13a), la concentration commence par augmenter (passage du rouge au jaune), puis semble stable (de 5 à 20 secondes) avant de rediminuer (couleur orange). L'augmentation de la concentration est responsable d'une baisse locale du champ électrique. La chute de résistance locale, combinée à cette chute du champ électrique entraîne une diminution de la focalisation dans cette région. Le flux électrophorétique diminue donc au cours du temps tandis que le flux diffusif dû à la convection reste constant.

Dans le cas d'un courant constant, le front d'enrichissement (et de déplétion) se propage linéairement en fonction du temps. Le système souffre moins de l'enrichissement car pour que le courant reste constant malgré la chute de la résistance et le potentiel augmente au cours du temps.

Mes propres expériences confirment ces résultats de Zangle et al. Ce constat peut être fait pour d'autres tailles de nanofente et tensions appliquées, comme le montre mes résultats expérimentaux qui sont résumés dans la figure 4.14.

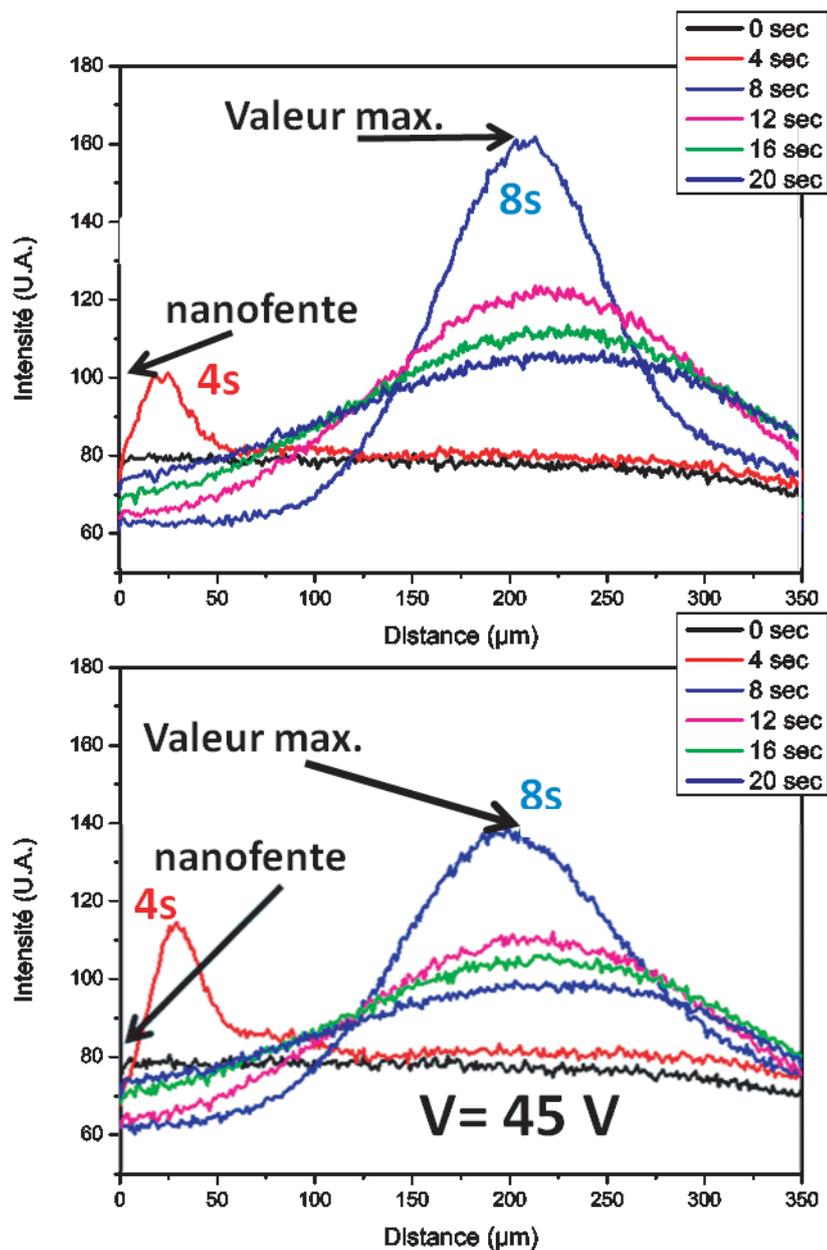


FIGURE 4.14 – Profils d'intensité fluorescente liée à la concentration de fluorescéine dans le microcanal cathodique obtenus pour : a) une électropréconcentration à 30 V dans un dispositif avec une nanofente de 200 nm de hauteur ; b) une électropréconcentration à 45 V dans le même dispositif.

La concentration du point de focalisation (maximum d'intensité) augmente tout en s'éloignant de la nanofente entre 4 et 8 sec. Puis le front se stabilise et le point de focalisation s'étale. Cette défocalisation a pour conséquence une diminution du maximum en concentration (figure 4.15).

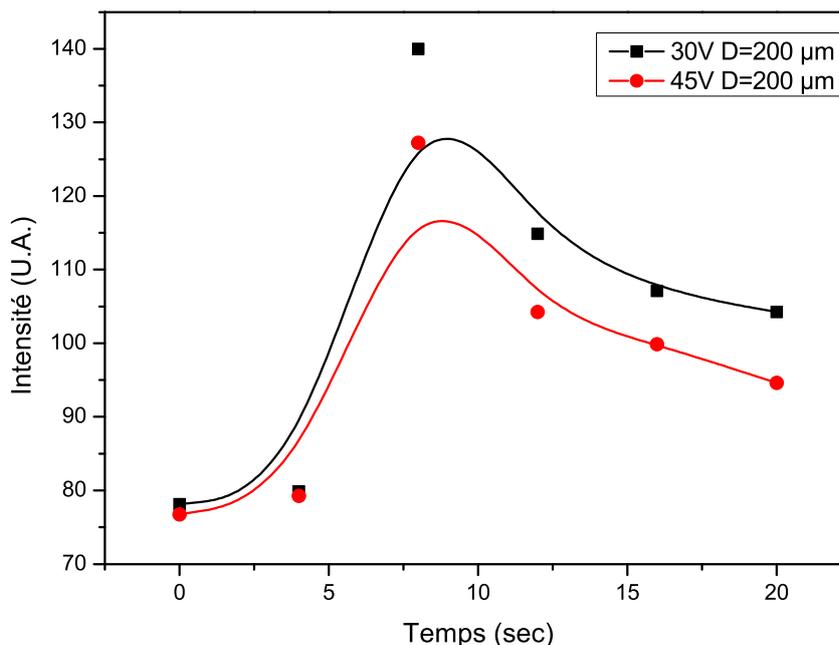


FIGURE 4.15 – Evolution de l'intensité fluorescente en fonction du temps pour 30 et 45 V à une distance de 200 µm de l'interface nano/micro cathodique.

J'ai tenté de quantifier le taux d'électropréconcentration en calculant le rapport I/I_0 (normalisation de l'intensité de fluorescence) au maximum de la phase ascendante. Les temps correspondant à la concentration maximale diffèrent suivant la hauteur : 160 sec pour la figure 4.12 soit une nanofente 70 nm de hauteur et un microcanal de 2 µm de hauteur ; contre 8 sec pour la figure 4.14 soit une nanofente de 200 nm de hauteur et un microcanal de 2 µm de hauteur. Les taux sont donc divisés par l'unité de temps.

La figure 4.16 présente l'influence de la tension sur la vitesse de préconcentration du point de focalisation (normalisée par C_0) pour plusieurs dimensions de canaux (à gauche hauteur de microcanaux de 2 µm, à droite hauteur de microcanaux de 4 µm).

Pour toutes ces géométries et tensions appliquées, le front de préconcentration cathodique de la fluorescéine s'éloigne de la nanofente au cours du temps. D'après la terminologie du Chapitre 1, il s'agirait d'un régime dit de Cathodic Counter Gradient

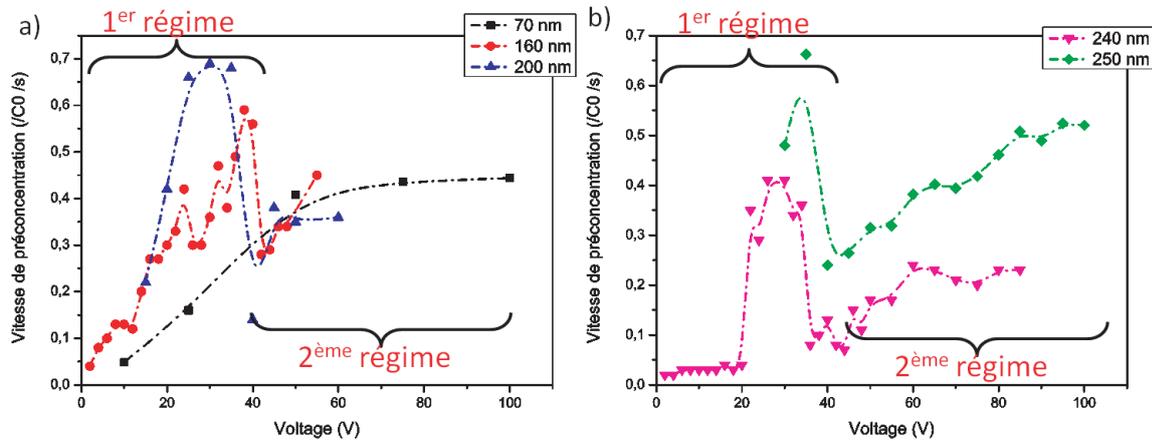


FIGURE 4.16 – Vitesse de préconcentration normalisée par la concentration initiale et du temps (en seconde) en fonction de la tension appliquée. a) pour des microcanaux de 2 μm de hauteur et différentes hauteurs de nanofente (70, 160 et 200 nm), b) pour des microcanaux de 4 μm de hauteur et différentes hauteurs de nanofente (240 et 250 nm).

Focusing (soit CCGF).

De ce fait, on pourrait s'attendre à ce que la préconcentration évolue avec la tension appliquée :

- soit linéairement, avec une vitesse d'apport en analyte donnée par :

$$v_{particule} = (\mu_{EOF} - \mu_{Contre-Poiseuille} + \mu_{électrophorétique}) \times E \quad (4.43)$$

Dans ce cas, la diffusion est négligée et il n'y a pas d'amortissement dues aux pertes diffusives.

- soit avec une allure croissante saturante, tenant compte de la diffusion qui augmente avec la vitesse du fluide.

Nous observons sur nos courbes, que quelque soit la géométrie utilisée, il y a en fait deux sous régimes d'électropréconcentration en CCGF pour la fluorescéine sur cette gamme de tension appliquée. Je les note « 1er régime » et « 2ème régime » sur la figure 4.16. Des mesures avec des pas de tension appliquée plus espacés (courbe avec $h_{nano}=70$ nm de la figure 4.16 pas de points de mesure entre 20 et 50V, [41]) donneraient une tendance générale à la hausse, en accord avec l'Eq. (4.41). Des mesures faites avec des pas de tensions appliquées plus petits permettent d'observer une évolution différente appelé « 1er régime ». Ce sous régime, n'a jamais été observé ni même prédit jusqu'à aujourd'hui. Il est également très frappant de noter que la gamme de tension appliquée semble très peu sensible à la géométrie puisque 5 combinaisons (hauteur *micro* ; hauteur *nano*) ont été testées et donnent sensiblement le même profil d'évolution en fonction de la tension.

Puisque ce résultat est inédit, j'ai recherché une autre signature de ce phénomène pour vérifier qu'il ne s'agissait pas d'instabilités liées à notre banc expérimental. La démarche que j'ai choisie a été de mesurer le courant circulant dans le dispositif. En effet, puisque les ions en solution portent le courant, si une partie de ceux-ci sont « filtrés » par le dispositif micro - nano - fluïdique, le courant doit diminuer dans la gamme de tension appliquée du premier régime. La figure 4.17 présente l'évolution la mesure du courant et de la résistance pour une rampe croissante, puis décroissante de la tension appliquée.

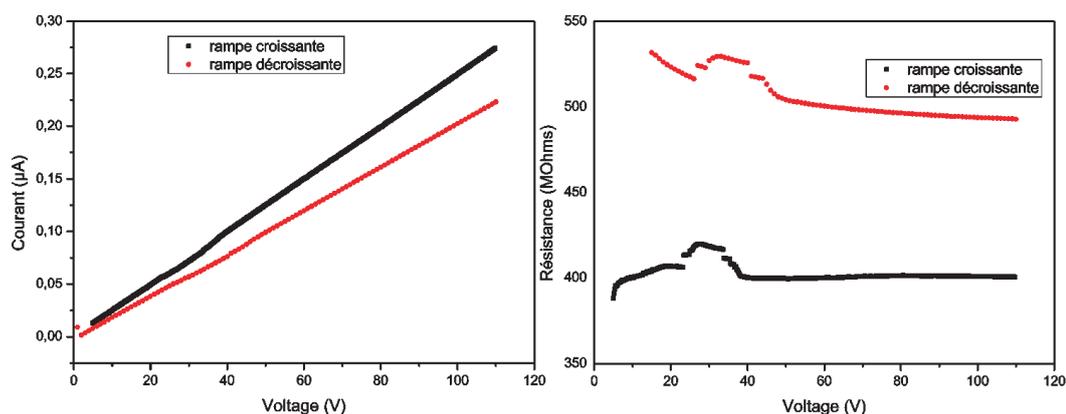


FIGURE 4.17 – A gauche, mesure du courant en fonction de la tension appliquée. A droite, résistance équivalente en fonction de la tension appliquée. Chaque point de mesure a été réalisé sur 3 secondes, les points ont été obtenus à la suite les uns des autres sans repos ni nettoyage.

Sur cette courbe, le courant semble quasi linéaire en fonction de la tension appliquée, mais si l'on regarde plus finement il est possible de voir une légère chute sur une gamme de tension appliquée (entre 25 et 40 V). Si l'on trace la variation de la résistance en fonction de la tension appliquée, il est plus facile de mettre en évidence ce phénomène qui a lieu que l'on fasse une rampe croissante ou décroissante et qui ne dépend donc pas d'un quelconque problème de protocole (problème de dynamique de l'enrichissement exclusion par exemple). La différence de pente entre la rampe croissante et la rampe décroissante en tension s'explique par le fait que la résistance est plus forte en commençant par les forts potentiels du fait que la polarisation de concentration dans le nanocanal est plus grande (résistance importante de la zone déplétée). Tentons d'interpréter cette variation de résistance. On l'observe dans la gamme de tension qui correspond au premier régime de la figure 4.16. L'augmentation de la résistance est donc clairement à relier au « surplus » de fluorescéine piégé dans ce sous-régime d'électropréconcentration. Cette méthode, extrêmement rapide pour scanner les sous régimes d'électropréconcentration privilégiés, ne peut malheureusement être mise en oeuvre que pour des concentrations d'analytes ayant une contribution non négligeable. Son application pour une utilisation dans des conditions « réelles », c'est-à-dire pour de la détection de quelques ppm en solution, est

inimaginable. Cependant, il s'agit d'une technique très efficace pour la mise au point et la caractérisation de notre outil grâce à nos solutions modèles.

Cette étude d'électropréconcentration simple sur avec de la fluorescéine en CCGF m'a permis d'avancer à plusieurs titres :

- Un nouveau phénomène, pour le moment inexpliqué, joue un rôle dans l'électropréconcentration. Ce phénomène qui permet, dans nos conditions, d'améliorer l'efficacité de l'électropréconcentration, n'avait à ce jour jamais été observé et soulève de nouvelles interrogations.
- La géométrie, notamment le ratio hauteur_{micro}/hauteur_{nano} semble avoir peu d'influence sur la valeur de la gamme de tension appliquée optimale. Ceci est d'autant plus étonnant que ce rapport influe sur des paramètres importants comme les résistances électriques et hydrodynamiques de chaque section et donc, au final, sur la vitesse totale dans les canaux. Cependant, des mesures systématiques permettraient tout de même de vérifier que cette fenêtre optimale n'a aucune dépendance avec ce rapport.
- Notre banc expérimental est adapté pour l'électropréconcentration et l'application de tension même élevées ne pose pas de problème majeur.

4.III Mise en mouvement combinant champ électrique et pression hydrodynamique : l'électropréconcentration modulée

L'application et l'efficacité de l'électropréconcentration sont ici clairement visées. Il s'agit de rendre le pouvoir de préconcentration du nanocanal optimal afin de tester si l'intégration d'un nanocanal est un bon outil de préconcentration dans un laboratoire sur puce (notamment en concurrence avec la technique d'ITP).

Comme nous l'avons vu précédemment dans notre étude expérimentale de l'électropréconcentration, le champ électrique est le seul paramètre ajustable qui ne permet pas à lui seul de piloter le dispositif pour choisir le régime de préconcentration optimal. Dans ce contexte, pour tenter de moduler l'électropréconcentration, j'ai cherché à moduler la vitesse grâce à un deuxième paramètre supplémentaire : une pression externe.

Dans ce cas, la vitesse de la particule se ré-écrit :

$$v_{particule} = (\nu_{EOF} + \nu_{Contre-Poiseuille} + \nu_{electrophoretique}) \times \underbrace{E}_{ajustable} + v_{pression} \quad (4.44)$$

soit :

$$v_{particule} = v_{electrique} + \underbrace{v_{pression}}_{ajustable} \quad (4.45)$$

Techniquement parlant, nous avons vérifié, pendant notre étude de la rétention, que la pression était applicable jusqu'à deux bars, et que des champs jusqu'à 100 V pouvaient être utilisés dans notre dispositif sans le dégrader. J'ai donc appliqué ces deux paramètres P et V simultanément comme décrit dans la figure 4.18. J'ai recherché cette preuve expérimentale pendant près de deux ans. J'ai commencé les expériences avec les premiers dispositifs à base de silicium amorphe, jusqu'à ce que je mette en évidence qu'ils n'étaient pas viables en présence d'un champ électrique (voir Chapitre 2). Ces expériences ont été mises de côté jusqu'à ce qu'à ce que je mette au point le nouveau procédé de fabrication des dispositifs « tout verre ». Je remercie dans cette section Anne Claire LOUER, étudiante en dernière année de l'ENSI Caen, qui durant son stage de fin d'études a réalisé de nombreuses expériences sur ces nouveaux dispositifs « tout verre ».

Jusqu'ici j'utilisais la fluorescéine comme sonde fluorescente. Les régimes de préconcentration étant dépendant de la compétition entre la vitesse du liquide et la vitesse de la molécule, j'ai utilisé des protéines qui ont des mobilités électrophorétiques plus faibles. Ceci m'a permis d'appliquer simultanément une pression hydrodynamique raisonnable et un champ électrique peu élevé (tension de quelques volts).

Une inconnue supplémentaire s'est alors rajoutée à ce travail de thèse : ces biomolécules, au contraire de la fluorescéine, s'adsorbent à la surface des dispositifs. Cette

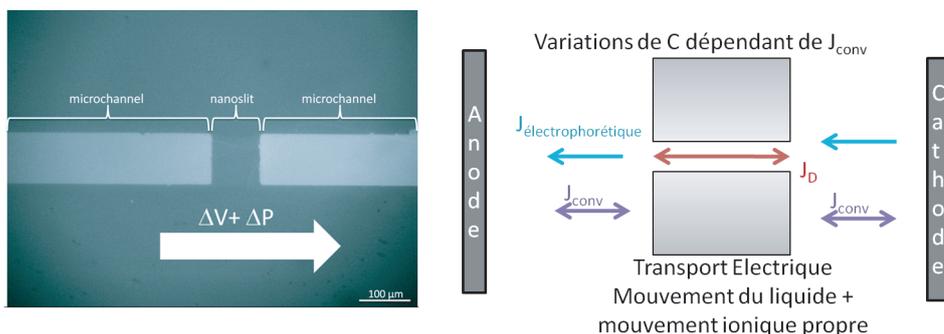


FIGURE 4.18 – À gauche, géométrie utilisée pour cette partie ; à droite, rappel des flux à prendre en compte.

adsorption pourrait éventuellement évoluer au cours du temps en fonction des concentrations locales dépendantes du temps et donc faire varier la charge de surface.

Pour permettre à la charge de surface de se stabiliser lors de l'injection d'une nouvelle biomolécule, j'ai laissé le fluide circuler pendant une heure. Après ce temps de stabilisation, toutes les expériences se sont déroulées avec le protocole qui a été décrit dans le Chapitre 3. Dans cette section, c'est la BSA (Bovine Serum Albumin) qui a été choisie comme sonde, car elle a déjà été utilisée dans plusieurs travaux sur l'électropréconcentration. Elle est également connue pour adhérer facilement aux parois. La BSA à 1 mg/ml dans un tampon phosphate (PB) de 0.5 mM a donc été utilisée dans les expériences décrites ici. Le choix d'une forte concentration initiale en BSA est en contradiction avec de la détection de traces d'analytes. La superposition d'un champ électrique et d'une pression étant exploratoire, j'ai fait le choix de me mettre d'abord dans ces conditions détectables. Puisque, la BSA est connue pour s'adsorber à la surface et perturber les mesures à cause du bruit engendré par cette pollution de surface, une concentration initiale élevée permettra de négliger la contribution fluorescente de la surface par rapport aux protéines présentes en volume dans la solution.

Afin d'empêcher l'adsorption de la protéine, l'utilisation de polymères a été envisagée mais un traitement par des polymères aurait pu modifier la charge de surface. Cette option a donc été, pour le moment, mise de côté pour ne pas compliquer encore plus les expériences et l'interprétation.

Cette technique originale de mise en mouvement qui n'avait jamais été testée auparavant offre plusieurs méthodes de mise en mouvement que nous appellerons « Situations ». Ainsi, il est possible d'imposer un champ électrique et une pression sont dans le même sens (situation 1) ou en sens opposé (situation 2).

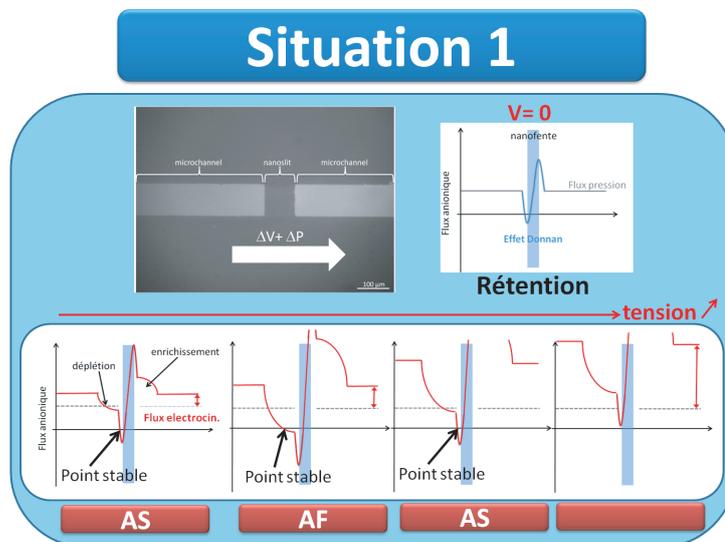


FIGURE 4.19 – Schéma explicatif de l'origine des régimes accessibles lorsque les gradients de pression et de tension sont appliqués dans le même sens et que le flux électrocinétique est positif.

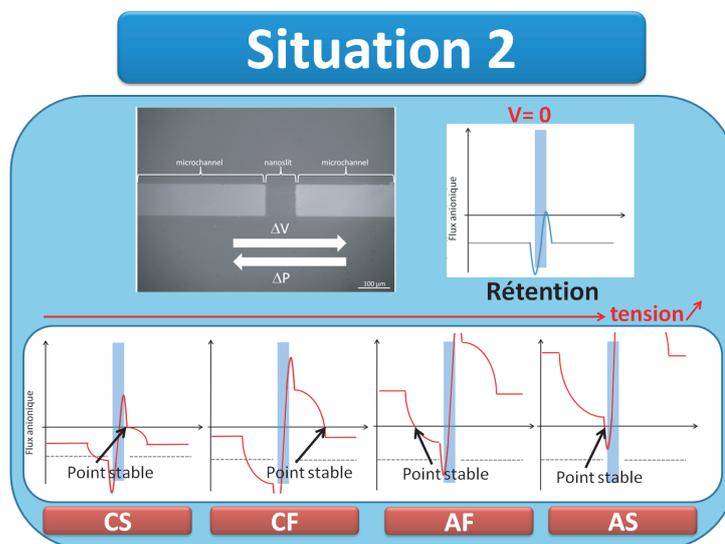


FIGURE 4.20 – Schéma explicatif de l'origine des régimes accessibles lorsque les gradients de pression et de tension sont appliqués dans le sens opposé et que le flux électrocinétique est positif.

Les figures 4.19 et 4.20 permettent de prévoir les profils de flux et leur évolution avec un champ électrique croissant. On constate que :

- la pression engendre un flux d'analyte constant dans les microcanaux. Ce flux est positif pour la situation 1, et négatif pour la situation 2.
- le flux électrocinétique (comprenant toutes les composantes de l'électropréconcentration classique : EOF, flux électroosmotique, Contre Poiseuille) se superpose au précédent flux. De plus, comme nous l'avons vu pour les dispositifs MNM, le phénomène d'enrichissement / exclusion est également à prendre en compte. Plus la tension est importante plus les phénomènes électrocinétiques sont prépondérants par rapport aux phénomènes hydrodynamiques.

Cette description schématique des profils de flux correspond au cas d'une biomolécule lente comme la BSA. Nous verrons plus loin comment ces profils changent lorsque la mobilité électrophorétique devient supérieure à la mobilité électroosmotique. Ces figures 4.19 et 4.20 vont nous permettre d'interpréter nos mesures expérimentales décrites plus loin.

Ces figures ressemblent à la figure 4.9 (page 160), mais dans le cas présent, une vitesse constante de liquide est imposée par la pression qui vient se superposer aux phénomènes électrocinétiques (flux EOF, Contre Poiseuille, flux électrophorétique et enrichissement / déplétion). Ces profils permettent de visualiser différentes situations de point stables de focalisation. L'influence des phénomènes électrocinétiques est modulée grâce à la tension appliquée. Ces régimes étant obtenus grâce à l'ajout d'une surpression, ils diffèrent un peu des 4 régimes présentés précédemment au Chapitre 1 et nous préférons les distinguer sous les noms simples de régimes *focalisants* (AF et CF) et de *stacking* (AS et CS).

Pour les gradients de pression et de tension dans le même sens (de l'anode vers la cathode, situation 1 figure 4.19) seuls 2 régimes anodiques peuvent être obtenus : AS et AF. Les régimes cathodiques ne peuvent pas être obtenus car le flux électrocinétique est positif (et donc du même sens que le gradient de tension), ce qui est le cas pour la BSA dans nos expériences. Le flux de pression est positif, le flux électrocinétique également et est même encore plus intense dans le microcanal cathodique. Il est impossible dans cette situation que le flux puisse s'annuler dans le microcanal cathodique.

Dans le cas où les gradients de pression et de tension sont de sens contraire (et que le flux électrocinétique est positif, ce qui est le cas pour la BSA dans nos expériences, figure 4.20), les 4 régimes peuvent être obtenus.

L'électropréconcentration modulée consiste donc à faire varier ces deux paramètres : la tension et la pression. Cette étude est découpée suivant deux approches :

- pression fixe et champ électrique externe variable :

$$v_{particule} = \underbrace{\mu_{electrocinetique}}_{constante} \times E + \underbrace{v_{pression}}_{constante} \quad (4.46)$$

avec

$$\mu_{electrocinetique} = \mu_{EOF} + \mu_{Contre-Poiseuille} + \mu_{electrophoretique} \quad (4.47)$$

- champ électrique fixe et pression variable :

$$v_{particule} = \underbrace{\mu_{electrocinetique}}_{constante} \times E + v_{pression} \quad (4.48)$$

4.III.A Pression fixée, champ électrique variable

Suivant la situation dans laquelle on se trouve (situation 1 ou 2 des figures 4.19 et 4.20), nous verrons que l'efficacité de la préconcentration est différente.

Expérimentalement, nous avons cherché à retrouver ces différents régimes, suivant les deux situations. Pour reproduire exactement l'étude théorique, il aurait fallu changer la charge de la protéine, car dans ce cas seule la vitesse électrophorétique aurait été modifiée. Nous aurions pu modifier le pH, mais cela aurait alors fait varier la charge de surface du verre dans nos canaux et l'intensité fluorescente de la sonde. Cette solution n'a donc pas été retenue pour simplifier la compréhension déjà complexe des phénomènes. Nous avons donc simplement modifié la tension pour moduler la vitesse électrocinétique (et donc la vitesse du fluide), tout en conservant une composante de la vitesse du liquide indépendante de la tension grâce à la composante en pression.

L'étude des régimes obtenus est expliquée suivant les deux situations correspondant aux figures 4.19 et 4.20.

4.III.A.1 Champ électrique et pression dans le même sens (situation 1)

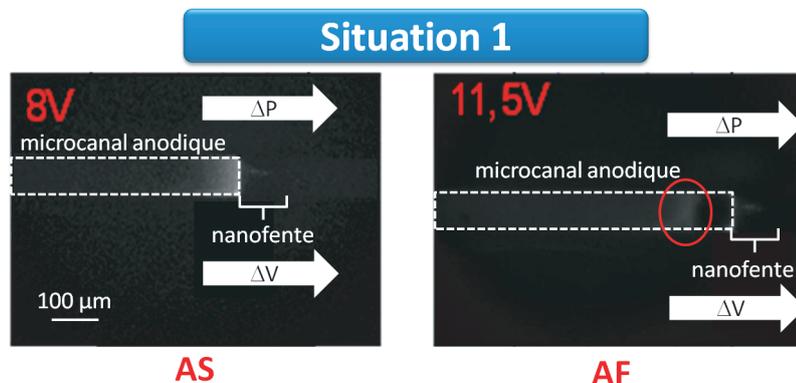


FIGURE 4.21 – Mise en évidence expérimentale d’une électropréconcentration modulée de BSA selon 2 régimes anodiques AS et AF prédit par la figure 4.19 (situation où pression et tension appliquée sont dans le même sens). Ici le dispositif possède une nanofente de 150 nm de hauteur.

4.III.A.1.a Le régime anodique saturant (Anodic Stacking (AS))

Expérimentalement, ce régime se caractérise par une préconcentration collée à la nanofente du côté anodique, comme le montre la figure 4.22 de gauche qui donne l’évolution spatiale du signal de fluorescence mesuré lors d’une expérience à 8V et sous une pression de 0.4 bar (appliqués dans le même sens). La figure 4.22b donne l’évolution temporelle du maximum de fluorescence.

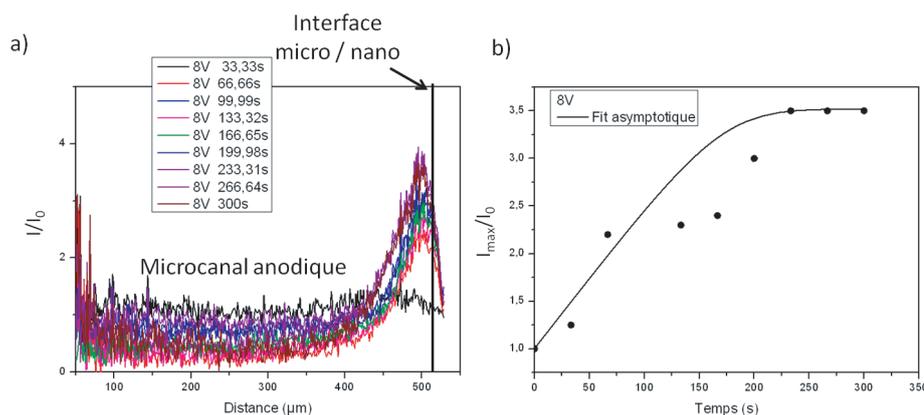


FIGURE 4.22 – a) Profils de concentration typiques du régime anodique AS obtenu pour $V = 8 \text{ V}$ et $P = 0.4 \text{ bars}$. b) Evolution du maximum de fluorescence en fonction du temps pour ce régime AS.

Ce cas ressemble à une expérience de rétention. On retrouve ainsi une saturation (figure 4.22b) que l'on peut associer au passage par diffusion, portée essentiellement par la convection à travers la nanofente. La composante électrique qui est, dans ce cas, inférieure à la composante hydrodynamique, module légèrement la valeur de la vitesse dans le microcanal. La préconcentration grâce à ce régime est très faible, car elle sature pour une valeur égale à 2 fois la concentration initiale (ordre de grandeur prévu numériquement).

4.III.A.1.b Le régime anodique focalisant (AF)

Ce régime se caractérise par une préconcentration dans le microcanal anodique qui se stabilise loin de la nanofente. C'est ce que l'on observe sur la figure 4.23 de gauche. De manière étonnante, on observe que le signal semble peu intense. En traçant le profil de fluorescence en fonction de la position dans le microcanal anodique (figure 4.23b), le taux de préconcentration vaut 2.2, une valeur assez similaire à celle de l'AS.

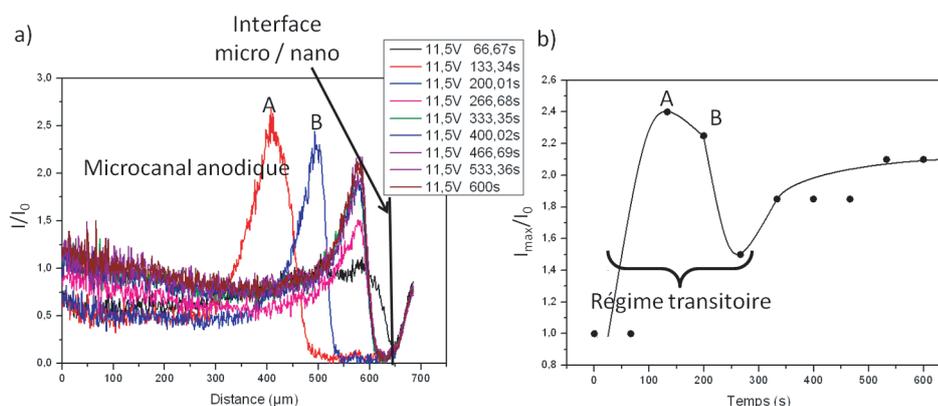


FIGURE 4.23 – a) Profils de concentration typiques du régime anodique AF obtenu pour $V = 11.5$ V et $P = 0.4$ bars. b) Evolution du maximum de fluorescence en fonction du temps pour ce régime AF.

Cette faible valeur du taux de préconcentration montre que ce régime AF diffère du régime ACGF en électropréconcentration (taux de 800), ce qui n'est pas étonnant puisque nos conditions expérimentales sont très différentes avec un paramètre de pression en plus. Nous y reviendrons plus tard dans la suite de ce chapitre.

Intéressons nous maintenant à l'évolution temporelle de la préconcentration du point d'intensité maximale (figure 4.23b). Nous remarquons que le profil n'est pas un profil saturant simple. La dynamique de préconcentration est ici particulière : dans un premier temps, la préconcentration augmente mais s'éloigne fortement de la nanofente (point A et B du régime transitoire), puis, entre 130 et 200 sec, le front se rapproche de la nanofente tout en réduisant la préconcentration (fin du régime transitoire). Cette dynamique pourrait s'expliquer par une augmentation de la résistance totale dans le dispositif comme nous l'avons discuté précédemment dans la section 2 de ce chapitre.

Ici, la diffusion à travers la nanofente n'explique pas la saturation qui n'est pas prédite par les simulations mais nous y reviendrons plus tard dans la dernière partie du chapitre.

4.III.A.2 Champ électrique et pression dans le sens opposé (situation 2)

Etudions maintenant les régimes que nous avons obtenus expérimentalement lorsque la pression et le champ électrique ont été appliqués dans le sens opposé comme décrit dans la figure 4.20.

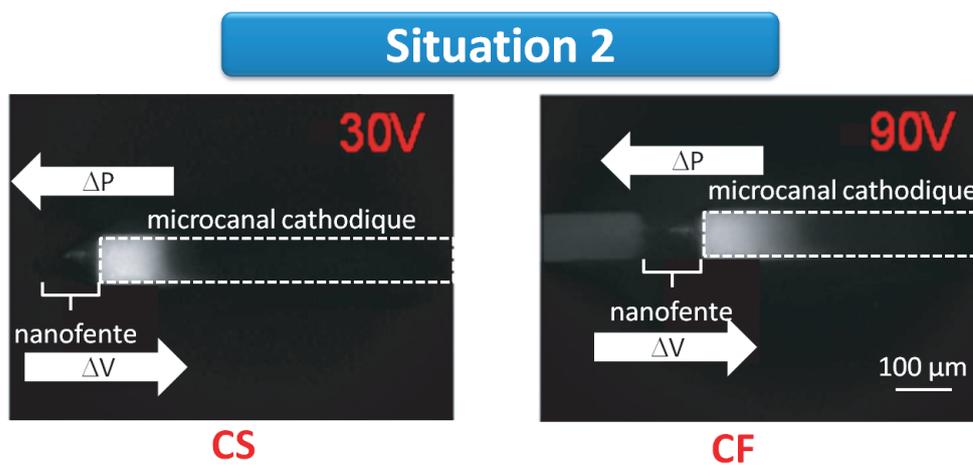


FIGURE 4.24 – Mise en évidence expérimentale d'une électropréconcentration modulée de BSA selon 2 premiers régimes cathodiques prédits par la figure 4.20 (situation 2 où pression et tension appliquée sont de sens opposés). Le dispositif possède une nanofente de 150 nm de hauteur.

4.III.A.2.a Le régime cathodic saturant (Cathodic Stacking (CS))

Ce régime est une fois de plus très similaire à la rétention avec maximum de la préconcentration à l'interface micro / nano et une saturation. Contrairement aux régimes anodiques précédemment décrits, la préconcentration est plus importante puisque proche de 30 fois la concentration initiale (figure 4.25b). Ceci s'explique par le fait que le flux électroosmotique et la pression s'opposent. Ainsi, la vitesse dans le microcanal diminue et l'effet de polarisation augmente à travers la nanofente ce qui augmente le facteur d'exclusion dans la nanofente. Ces deux phénomènes ont pour effet de diminuer la diffusion à travers la nanofente et de favoriser la préconcentration.

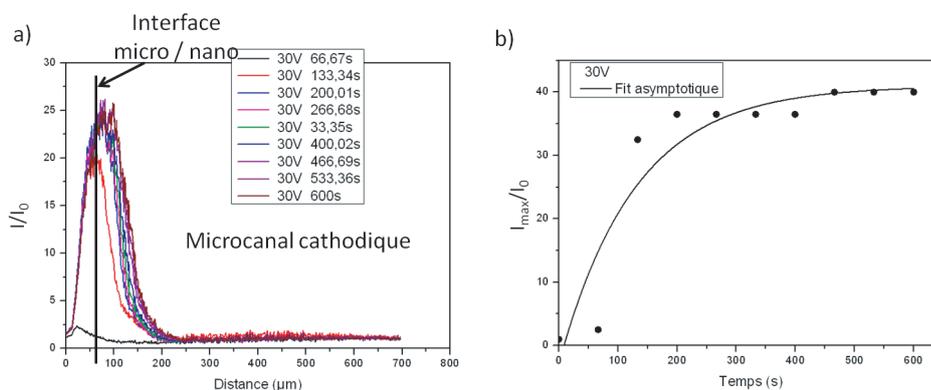


FIGURE 4.25 – a) Profils de concentration typiques du régime CS obtenu pour $V = 30$ V et $P = 0.4$ bars. b) Evolution du maximum de fluorescence en fonction du temps pour ce régime CS.

4.III.A.2.b Le régime cathodique focalisant (CF)

Ce régime se caractérise par une préconcentration dans le microcanal cathodique qui se stabilise éloigné de la nanofente, comme le montre la figure 4.26a.

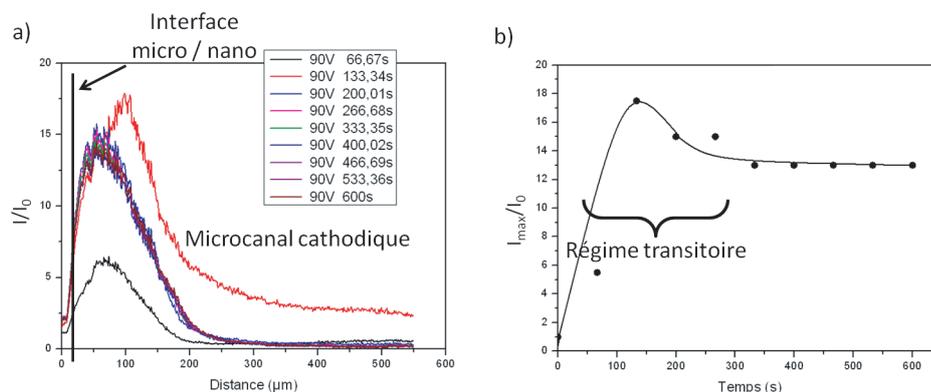


FIGURE 4.26 – a) Profils de concentration typiques du régime anodique CF obtenu pour $V = 90$ V et $P = 0.4$ bars. b) Evolution du maximum de fluorescence en fonction du temps pour ce régime CF.

L'étude de la dynamique du point de focalisation de la préconcentration nous montre que l'augmentation de concentration se fait tout d'abord au voisinage de la nanofente dans le microcanal cathodique. Puis, comme pour l'AF ce front recule dans un premier temps avec un maximum local (et temporaire). Après ce régime transitoire visible sur la figure 4.26, il se rapproche de la nanofente en diminuant en concentration. Une saturation est une nouvelle fois observée pour une concentration près de 10 fois supérieure à la concentration initiale.

- J’ai pu mettre en évidence, pour la première fois expérimentalement, que la localisation de l’électropréconcentration peut être choisie par l’application d’un couple (P,V). Une analyse descriptive de l’évolution des flux hydrodynamiques et électrocinétiques permet d’expliquer l’origine de ces nouveaux régimes.
- Comme prédit, nous observons des taux de préconcentrations qui dépendent des conditions expérimentales et, dans notre cas, notamment du couple (P, V).
- Contrairement à l’électropréconcentration simple, cette électropréconcentration assistée sous pression conduit à des taux élevés lorsque le champ électrique s’oppose à la pression. Dans notre cas, ils correspondent à des régimes cathodiques.

4.III.A.3 Taux de préconcentration et régimes : diagrammes en tension

La paragraphe suivant présente les expériences systématiques sur la gamme de tension appliquée allant de 0 à 100 V. La théorie développée par Plecis et al. [39] dans le cas de l’électropréconcentration simple (sans surpression) prévoit une efficacité de préconcentration qui dépend du régime. J’ai réalisé des mesures systématiques pour tenter d’évaluer expérimentalement l’évolution de l’efficacité de la préconcentration, dans notre cas particulier d’électropréconcentration « modulée » (assistée par pression). La figure 4.27 permet de visualiser comment évolue le taux de préconcentration (I/I_0) du point de focalisation en fonction de la tension appliquée.

Ces expériences ont été menées pendant 5 minutes sous une pression de 0.4 bar appliquée à travers la nanofente. Sur la courbe 4.27 sont présentés les quatre régimes de préconcentration correspondant aux deux situations (P et V dans le même sens ou non) décrites précédemment pour un dispositif de $h_{micro}=1 \mu\text{m}$, $h_{nano}=150 \text{ nm}$. Nous avons également réalisé ces expériences pour d’autres dispositifs présentant une géométrie différente : $h_{micro}=4 \mu\text{m}$, $h_{nano}=330 \text{ nm}$ (figure 4.28) pour tenter d’appréhender le rôle de cette géométrie sur les régimes observés et les taux de préconcentration.

4.III Mise en mouvement combinant champ électrique et pression hydrodynamique :
l'électropréconcentration modulée

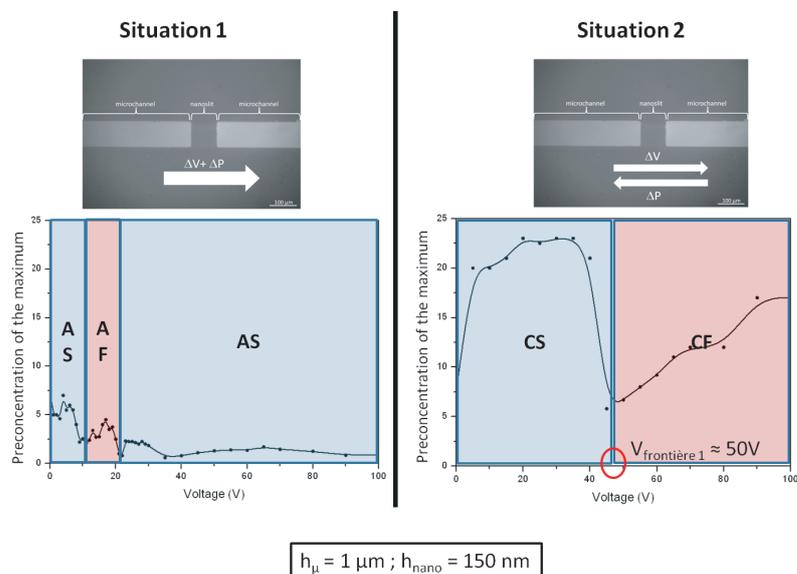


FIGURE 4.27 – Préconcentration du point de focalisation après cinq minutes d'expérience pour une pression de 0.4 bar en fonction de la tension appliquée pour la 1ère série de dispositifs $h_{micro}=1 \mu\text{m}$, $h_{nano}=150 \text{ nm}$.

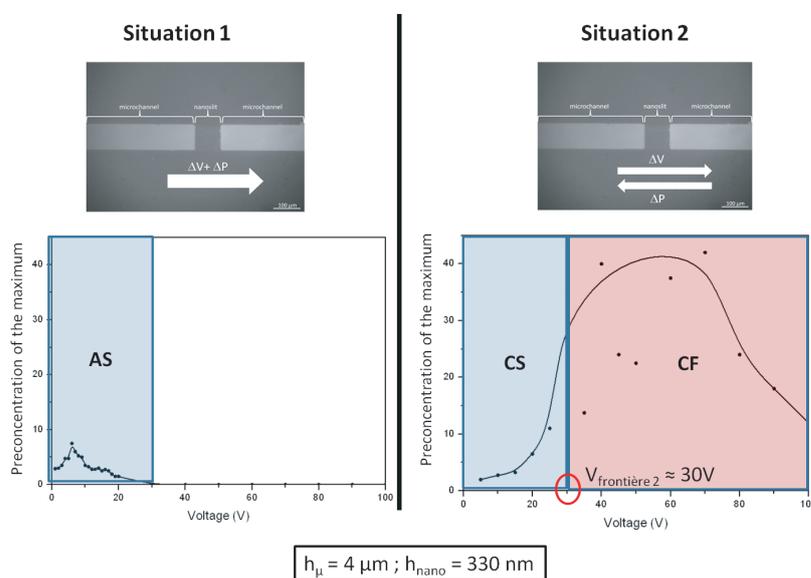


FIGURE 4.28 – Préconcentration du point de focalisation après cinq minutes d'expérience pour une pression de 0.4 bar en fonction de la tension appliquée pour la 2ème série de dispositifs $h_{micro}=4 \mu\text{m}$, $h_{nano}=330 \text{ nm}$.

- Pour les petites valeurs de tension appliquée, la préconcentration a lieu à l’interface microcanal / nanofente. Ce sont les régimes de Stacking pour lesquels la mobilité de l’analyte est très faible devant la vitesse du liquide :

$$(\mu_{\text{électrocinétique}}) \times E < v_{\text{pression}} \quad (4.49)$$

Les analytes vont donc du réservoir (anodique ou cathodique suivant la situation) vers la nanofente et sont stoppés par l’effet barrière. Pour la situation 2, la préconcentration augmente très rapidement avec la tension appliquée. En effet, l’effet de polarisation se renforce avec la tension appliquée qui vient lui même renforcer l’effet barrière de la nanofente. De plus, la composante de la vitesse électrocinétique ($\mu_{\text{électrocinétique}} \times E$) augmente aussi avec la tension, tout en s’opposant la vitesse hydrodynamique due à la pression. Comme pour la rétention, nous retrouvons ici le fait que, lorsque les analytes sont piégés par l’effet barrière, plus la vitesse à laquelle ils sont transportés est faible, plus la concentration maximale à saturation est importante. Pour cette situation 2, le régime saturant CS conduit donc à des taux élevés de préconcentration.

Un régime de Stacking anodique est également observable (très faible préconcentration, proche de la concentration initiale) conformément à la figure 4.19. L’efficacité de ce régime pour préconcentrer est quasi nulle. Le flux d’analytes est ici très important ce qui diminue la valeur de la concentration à la saturation.

- Pour les plus fortes tensions appliquées, conformément aux figures 4.19 et 4.20, la composante électrocinétique ($\mu_{\text{électrocinétique}} \times E$) permet d’augmenter la polarisation en concentration et d’obtenir un point de focalisation éloigné de la nanofente. Côté anodique, la préconcentration est plus faible que celle obtenue dans le microcanal cathodique. Pour le régime cathodique CF, nous voyons que l’efficacité de la préconcentration augmente avec la tension appliquée. Une étude à plus forte tension ($V > 100V$) aurait été intéressante, mais n’était pas faisable sur notre banc expérimental.

Regardons maintenant comment évolue ce diagramme pour les dispositifs présentant des nanofentes et des microcanaux plus grands. Si les comportements sont similaires pour les deux dispositifs, les taux de préconcentration obtenus sont différents. De manière surprenante, ce sont les nanofentes les plus grandes qui conduisent aux taux les plus élevés (environ 20 fois la concentration initiale pour la géométrie $h_{\text{micro}}=1 \mu\text{m}$, $h_{\text{nano}}=150 \text{ nm}$, contre près de 40 fois pour la géométrie $h_{\text{micro}} = 4 \mu\text{m}$, $h_{\text{nano}} = 330 \text{ nm}$).

A priori, seuls les flux sont modifiés lorsque la géométrie est modifiée. La résistance électrique dans un canal est inversement proportionnelle à la section, la répartition du champ électrique dans le dispositif s’en trouve altérée, ce qui affecte la valeur du flux EOF. De même, la section modifie la résistance hydrodynamique de chaque section ce qui modifie le flux de Contre-Poiseuille et le flux hydrodynamique.

La figure 4.29 donnent le résultat de mes calculs de la valeur de la vitesse moyenne

sur la section (EOF - C-P) dans les microcanaux (dont le détail est donné en Annexes) :

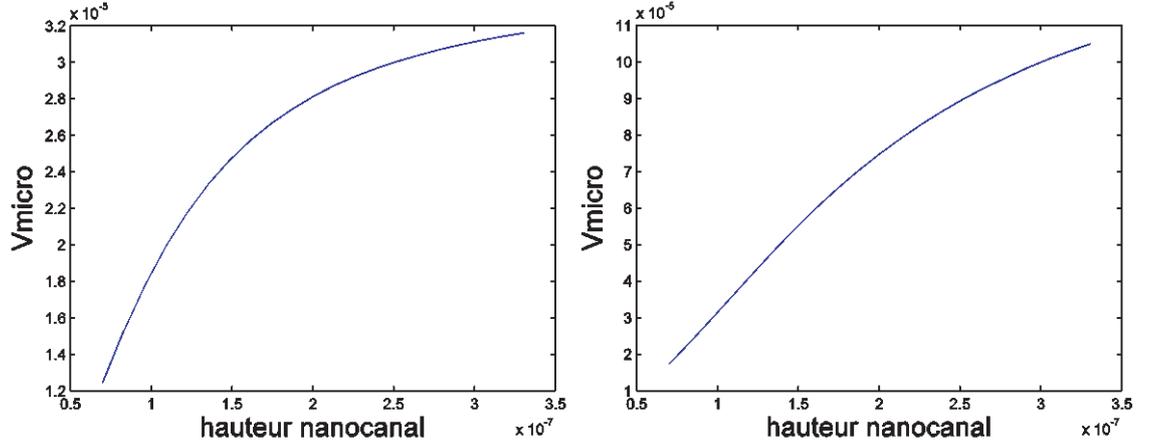


FIGURE 4.29 – A gauche : vitesse dans les microcanaux due au champ électrique externe pour un microcanal de $h_{micro}=1 \mu m$. A droite : vitesse dans les microcanaux due au champ électrique externe pour un microcanal de $h_{micro}=4 \mu m$

Les calculs pour la vitesse moyenne (sur la section) dans les microcanaux donnent :

- $V_{Pression,1}=80 \mu m/s$; $V_{EOF-CP,1}=24 \mu m/s$ à 50V pour le dispositif 1 : $h_{\mu}=1\mu m$, $h_{nano}=150 \text{ nm}$, $h_{\mu}/h_{nano}=7$, $E=50V$, $P=0,4 \text{ bar}$
- $V_{Pression,2}=200 \mu m/s$; $V_{EOF-CP,2}=100 \mu m/s$ à 50V pour le dispositif 2 : $h_{\mu}=4\mu m$, $h_{nano}=330 \text{ nm}$, $h_{\mu}/h_{nano}=12$, $E=50V$, $P=0,4 \text{ bar}$

Nous voyons, sur la figure 4.28, que la frontière entre les régimes CF et CS se trouve à 50V lorsque l'on utilise le dispositif 1 (rond rouge dans la figure 4.28) et à 30V lorsque l'on utilise le dispositif 2 (figure 4.28). Ces valeurs de frontières sont déterminées par la compétition entre les contributions hydrodynamique, électroosmotique et électrophorétique. Il est intéressant de tenter d'estimer le rapport des contributions pour les différents flux (EOF et hydrodynamique). Les valeurs de ces frontières peuvent donc être prédites.

Empiriquement, cette frontière semble être déterminée par le rapports des contributions entre pression et champ électrique :

$$frontiere,1 \times \frac{v_{EOF-CP,1}}{v_{pression,1}} = frontiere,2 \times \frac{v_{EOF-CP,2}}{v_{pression,2}} \quad (4.50)$$

soit dans nos expériences :

$$50 \times \frac{24}{80} = 30 \times \frac{100}{200} \quad (4.51)$$

Si la relation (4.50) est bien généralisable, quelque soit le dispositif i , un dispositif étalon permet d'écrire :

$$frontiere, i \times \frac{v_{EOF-CP,i}}{v_{pression,i}} = frontiere, etalon \times \frac{v_{EOF-CP,etalon}}{v_{pression,etalon}} \quad (4.52)$$

Alors, il sera possible de prévoir les tensions appliquées correspondant aux transitions de régimes, et ce, pour n'importe quelle géométrie de dispositif correspondant à notre modèle. Ce résultat est important, car il pourrait, par la suite, permettre de mieux optimiser les tailles de canaux afin d'obtenir aisément expérimentalement le régime désiré.

Une des perspectives à plus long terme serait de mettre en évidence les régimes anodiques, avec une géométrie optimale, lorsque le gradient de champ électrique et le gradient de pression s'opposent. De plus, il serait intéressant de réduire les gammes de tension appliquée pour chaque régime, par exemple en augmentant la contribution du flux EOF - CP par rapport au flux dû à la pression.

4.III.A.3.a Les régimes cathodiques sont-ils les plus efficaces ?

Ces premiers résultats expérimentaux semblent en désaccord avec les simulations d'A. Plecis pour l'électropréconcentration simple. Il semble important dans le cas de cette électropréconcentration modulée par pression d'appliquer de manière opposé champ électrique et pression (situation 2). Une première lecture pourrait faire tendre à croire que les régimes cathodiques sont à privilégier contrairement aux prédictions des simulations. Cependant, on peut aussi relier ces taux plus importants de préconcentration à la situation, puisque les fortes préconcentrations correspondent à des gradients de pression et de champ électrique opposés tandis que les faibles concentrations correspondent à des gradient de pression et de champ électrique dans le même sens. La figure 4.30 décrit les différences de combinaison des flux responsables du flux de vitesse pour ces deux situations.

Les deux profils obtenus sont très différents. Dans la situation 1, le profil ($V_{liquide}$ en vert) se rapproche d'un Poiseuille aplati. L'écoulement de Poiseuille est connu pour augmenter la dispersion à cause d'une vitesse de convection non uniforme dans la section.

Pour la situation 2, le profil de vitesse est plus complexe et plus inhomogène. La dispersion d'analyte est plus restreinte dans ce cas : la valeur moyenne de la vitesse sur la section est plus faible que dans le cas où pression et champ électrique sont alignés. Le point de focalisation est cependant plus large que pour le cas de la situation 1 : en effet, les régimes de la situation présentent des profils de concentration plus larges que pour la situation 1 (cf figures 4.21, 4.24, 4.22, 4.23, 4.25, 4.26).

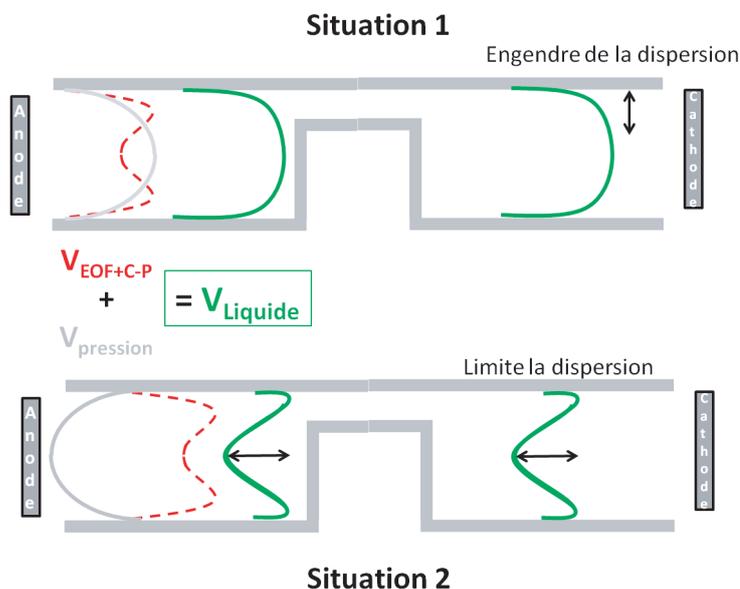


FIGURE 4.30 – Schéma des profils de flux du liquide dans le dispositif dans le cas de la situation 1 (en haut) et de la situation 2 (en bas).

Un point important doit être souligné d'après cette figure 4.20 : nous n'avons pas obtenu les régimes anodiques qui sont normalement prévisibles aux fortes tensions appliquées. Nous ne sommes pas allés à des tensions appliquées supérieures à 100V (situation 2). A 100V, pour une pression de 0.4 bar, nous sommes toujours dans la gamme de préconcentration cathodique. Ces régimes n'ont pas pu être atteints car ils nécessitent des tensions supérieures à 100 V. Une perspective importante pour la suite de ce sujet serait d'améliorer le banc de mesure, afin d'atteindre les conditions où l'analyte se préconcentrera anodiquement avec un gradient de pression et une tension opposés. Ces régimes anodiques pourraient alors correspondre à ceux prédits par les simulations, avec une efficacité de préconcentration intéressante pour l'intégration dans les laboratoires-sur-puce grâce à une dispersion réduite (les simulations font l'hypothèse de profils de vitesses plats ce qui n'est accessible expérimentalement).

4.III.A.3.b La configuration avec un champ électrique et une pression opposés est-elle toujours optimale ?

La Situation 2 est-elle toujours la configuration la plus efficace ? Pour expliquer les différences entre ces deux protocoles, j'ai choisi le cas où la mobilité de l'analyte est supérieure à la mobilité EOF (moins le Contre - Poiseuille). Ainsi on obtient :

$$\mu_{EOF} + \mu_{C-P} \leq \mu_{\text{électrophorétique}} \quad (4.53)$$

soit

$$\mu_{\text{électrophorétique}} \leq 0 \quad (4.54)$$

Cette inégalité est vérifiée pour nos expériences avec la BSA dans un tampon phosphate de 0.5 mM (pH 6.9) et notre géométrie. Dans le cas de l'électropréconcentration simple, la littérature rapporte de nombreux cas [40] [41] pour lesquels l'analyte est plus rapide que le fluide (électropréconcentration cathodique). Dans ce cas, les régimes accessibles pour nos deux situations sont modifiés, comme nous pouvons le voir sur la figure 4.31.

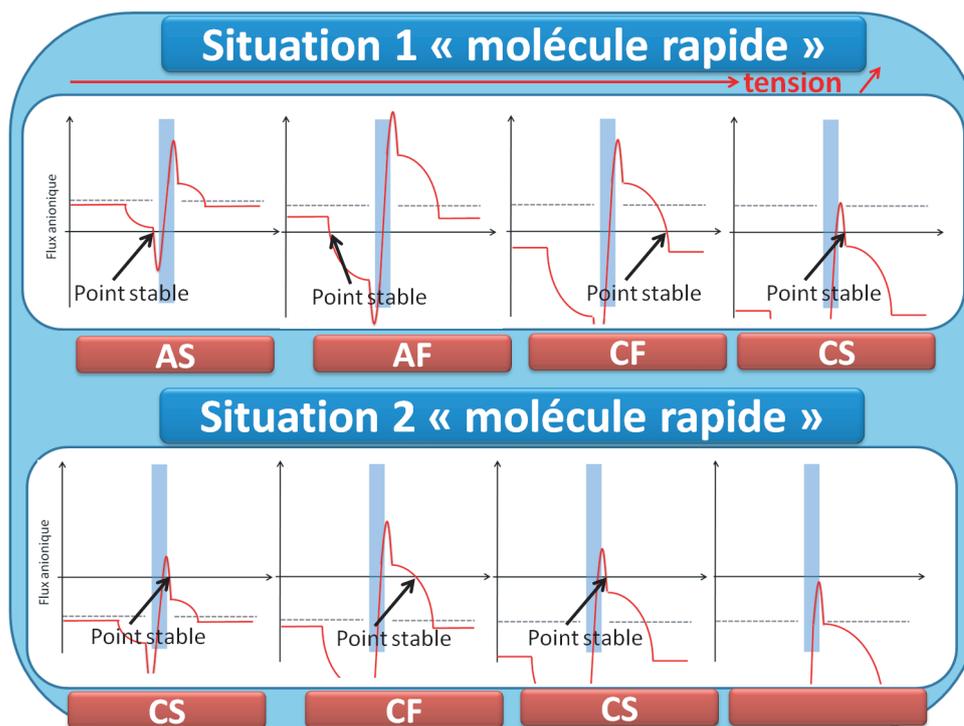


FIGURE 4.31 – Schéma des profils de flux d'analytes dans le cas où la mobilité électrophorétique est supérieure aux flux de liquide dues au champ électrique.

La situation 1 où la pression et le champ électrique sont appliqués dans le même sens permettrait d'obtenir les 4 régimes. La situation 2 ne permettrait désormais que d'accéder aux régimes cathodiques.

La question de l'efficacité des régimes suivant les situations n'a pas pu être faite durant cette thèse. Une autre perspective serait donc de montrer que pour une molécule très rapide (fluorescéine, insuline...), nous retrouvons ces prédictions. Cependant, notre banc expérimental nécessiterait de pouvoir imposer de très fortes pressions. Des pressions de 2 bars n'ont pas permis de moduler la fluorescéine, car sa mobilité électrophorétique est trop importante. Il faut cependant être prudent sur l'efficacité d'un tel protocole, car de fortes pressions vont générer des profils de Poiseuille importants qui vont aussi engendrer de la dispersion.

Les résultats préliminaires que j'ai obtenu permettent de conclure que :

- pour la situation 1 (Faible mobilité électrophorétique et gradients de pression et de champ électrique dans le même sens) : seuls les régimes d'AS et d'AF sont accessibles et avec une faible efficacité. Ils sont de plus sur une petite gamme de tension.
- pour la situation 2 (Faible mobilité électrophorétique et gradients de pression et de champ électrique de sens opposé) : les 4 régimes sont accessibles. Par ordre croissant de tension nous avons vu que nous obtenions le CS, le CF, l'AF puis l'AS. Seuls les deux premiers ont été observés mais nous pouvons extrapoler que les régimes anodiques présentent les meilleurs taux de préconcentration, conformément aux simulations.
- pour la situation 1 molécule rapide (Forte mobilité électrophorétique et gradients de pression et de champ électrique dans le même sens), par extrapolation nous obtenons les 4 régimes avec les mêmes tendances que pour la situation 2 (mais avec par ordre de tension croissante AS, AF, CF, CS).
- pour la situation 2 molécule rapide (Forte mobilité électrophorétique et gradients de pression et de champ électrique de sens opposé), par extrapolation nous obtenons les 2 régimes cathodiques avec les mêmes tendances que pour la situation 1.

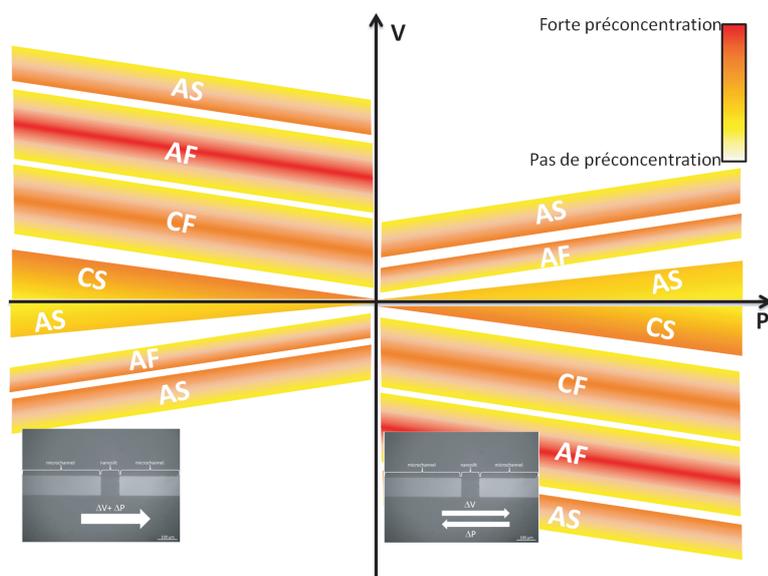


FIGURE 4.32 – Schéma de principe de la cartographie de l’efficacité de la préconcentration en fonction du couple (P,V) dans le cas où la vitesse électrocinétique est positive **pour** une molécule lente type **BSA**.

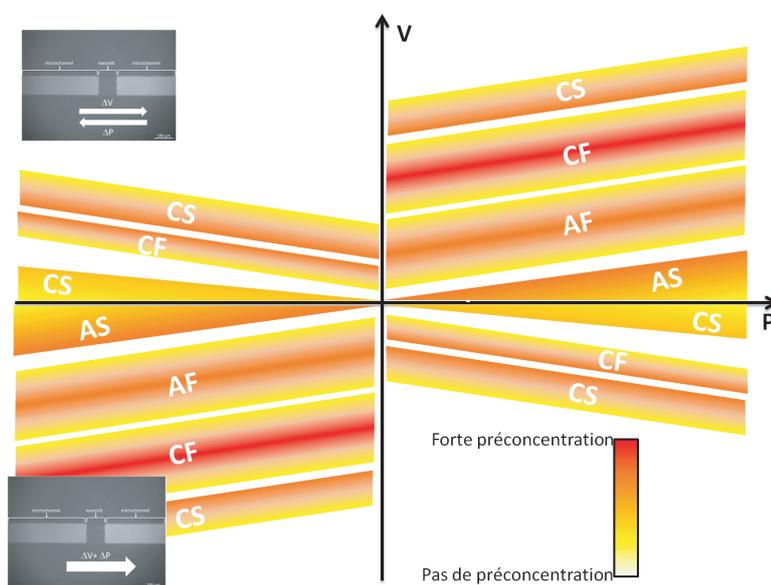


FIGURE 4.33 – Schéma de principe de la cartographie de l’efficacité de la préconcentration en fonction du couple (P,V) dans le cas où la vitesse électrocinétique est négative **pour** une molécule rapide type **fluorescéine**.

Dans cette partie, mes expériences ont pour la première fois permis de mettre en évidence :

- la possibilité de moduler expérimentalement simplement l'efficacité de l'électropréconcentration grâce à l'application d'un gradient de pression en plus du gradient de tension à travers le dispositif MNM (Micro Nano Micro).
- qu'il n'y a pas besoin d'utiliser des nanofentes dont la hauteur est comparable à la taille des EDL. J'ai utilisé des nanofentes dont la hauteur est bien supérieure à la taille des EDL. La différence de charges volumiques entre microcanal et nanofente est importante car c'est elle qui régit la polarisation. Les facteurs de taux maximum de préconcentration que nous avons obtenus sont même plus élevés que pour des fentes plus étroites.
- quatre différents régimes de préconcentration ont été observés pour l'électropréconcentration modulée sous pression. Ils diffèrent toutefois des simulations d'Adrien Plecis car les régimes cathodiques sont privilégiés expérimentalement pour la BSA. Les vitesses hydrodynamiques et électroosmotiques dans des directions opposées sont plus favorables, car la dispersion est limitée grâce à un profil de vitesse plus plan (figure 4.30). Les régimes anodiques souffrent par contre d'une plus grande dispersion qui n'a pas été prise en compte dans les calculs numériques, probablement à cause des profils paraboliques qui n'avaient pas été pris en compte dans les simulations.
- le rapport h_{micro}/h_{nano} permet de faire varier les frontières entre les régimes dans le diagramme en tension. Pour les forts rapports h_{micro}/h_{nano} , les valeurs des tensions appliquées aux frontières sont plus resserrées et les facteurs de préconcentration sont plus importants que pour de plus faibles rapports h_{micro}/h_{nano} . Ceci signifie que le paramètre pertinent est la charge de surface volumique (charges de surface normalisé par la hauteur de la section considérée).

4.III.B Pression modifiée, champ électrique fixé

Précédemment, j'ai émis une réserve quant à l'effectivité de l'efficacité de la préconcentration AF prédite numériquement. Mes expériences mettent en évidence de bien plus faible préconcentration et mettent en évidence un phénomène de compétition entre préconcentration et dispersion convective (due à l'inhomogénéité de la vitesse dans la section) négligée dans les calculs préliminaires. Cependant, mes expériences n'ont pas encore permis d'observer de préconcentrations anodiques dans le cas où les gradients de pression et de champ électriques sont de sens opposé. Les forts taux de préconcentration pourraient donc être retrouvés soit avec des géométries différentes, soit avec des mobilités électrophorétiques différentes, soit avec de fortes tensions.

Néanmoins, un phénomène caractérisé par les travaux d'A. Plecis se confirme expérimentalement : la forte dépendance de la localisation avec les contributions des vitesses dues aux gradient de pression et au gradient de champ électrique pour le régime ACGF de préconcentration (figure 4.10 centre haut) : on observe sur cette figure que pour le régime ACGF, la gamme de focalisation s'étend entre -150 et -50 μm . Ses expériences

montrent que cette position varie fortement suivant la mobilité de l'analyte en particulier dans le cas du régime d'ACGF.

J'ai tenté de retrouver expérimentalement ce résultat et de tirer parti de ce phénomène pour mettre en évidence la possibilité d'utiliser un dispositif micro - nano - micro fluide permettant de localiser, de façon précise, un analyte suivant sa mobilité. Comme discuté précédemment, la mobilité de l'analyte n'est pas simplement modifiable sans modifier la charge de surface, j'ai donc fait varier la pression hydrodynamique pour moduler la vitesse globale de l'analyte, ici la BSA, tout en fixant le champ électrique.

$$\text{théorie : } v_{particule} = \left(\underbrace{\nu_{EOF}}_{\text{constante}} + \underbrace{\nu_{\text{électrophorétique}}}_{\text{variable}} \right) \times \underbrace{E}_{\text{constante}} \quad (4.55)$$

$$\text{expérimental : } v_{particule} = \underbrace{(\nu_{EOF} + \nu_{\text{électrophorétique}})}_{\text{constante}} \times E + \underbrace{v_{\text{pression}}}_{\text{variable}} \quad (4.56)$$

Expérimentalement je me suis concentré sur la localisation de la préconcentration. J'ai défini une fenêtre de localisation (cf. ROI sur figure 4.34) loin de la nanofente, dans laquelle j'ai suivi la concentration moyenne en fonction de la pression. Visuellement, la mise en évidence expérimentale de la localisation est en bon accord avec la théorie comme le montre la figure 4.35.

Pour mes conditions, la dépendance du point focal de préconcentration avec le rapport (vitesse du liquide / vitesse de la particule) est très forte. En effet, de faibles variations de pression (de 0.45 à 1.10 bar) permettent de faire bouger le point de focalisation dans le microcanal anodique d'une centaine de microns (figure 4.34). Comme nous l'avons discuté précédemment, plus la contribution de la pression devient forte, plus le point focal se rapproche de la nanofente. La figure 4.35 présente les résultats théoriques du taux de préconcentration en fonction de la pression pour plusieurs valeurs de mobilité électrophorétique et mes résultats expérimentaux en fonction de la pression. Les courbes théoriques présentent le facteur de préconcentration par minute, la courbe expérimentale présente l'intensité normalisée après cinq minutes d'expérience.

Ces courbes sont en bon accord : un pic de concentration est observable autour d'une valeur optimale de pression pour une mobilité définie (celle de la BSA dans le PB pH 6.9). La sensibilité à la pression est beaucoup plus marquée dans nos conditions expérimentales, car le pic de préconcentration est resserré sur environ 0.1 bar contre environ 2 bars dans les calculs numériques. La raison de cette sensibilité accrue (quelques centièmes de bar pour être dans la fenêtre de préconcentration contre plusieurs bars dans la théorie) s'explique par la différence de géométrie. Les simulations ont été effectuées pour une hauteur de nanofente de 50 nm et pour des microcanaux de 2 μm de haut. La modulation de la vitesse grâce à la pression est donc plus faible pour une pression donnée à cause de la forte résistance hydrodynamique de la nanofente tandis que les conditions expérimentales sont $h_{\mu}=1 \mu\text{m}$ et $h_{nano}=150 \text{ nm}$ ce qui permet une modulation plus forte à pression donnée (voir Eq. (4.31)).

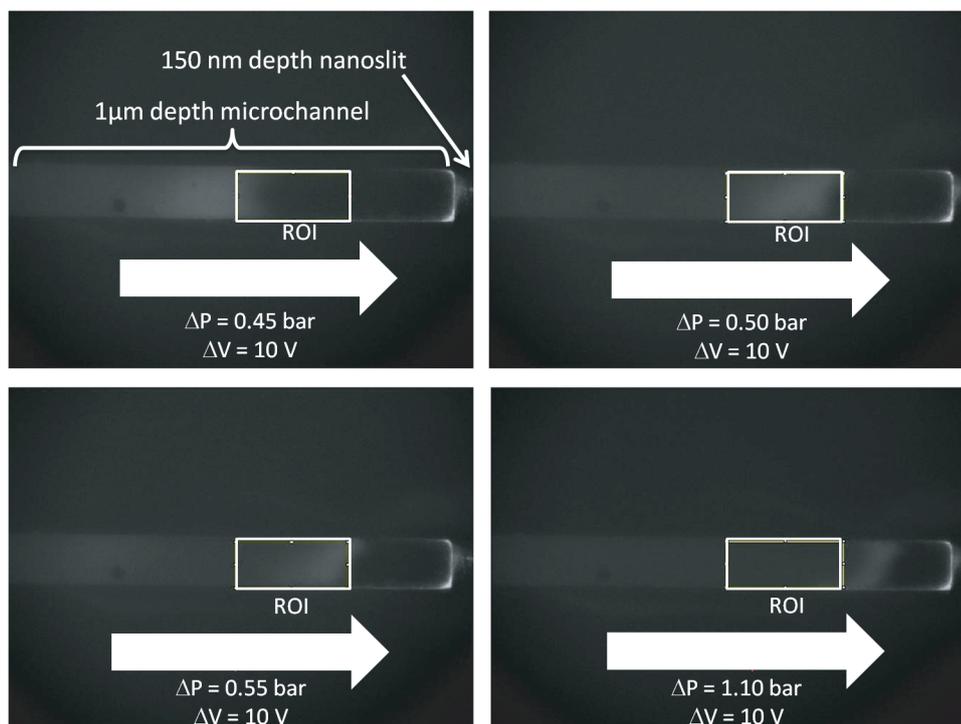


FIGURE 4.34 – Mise en évidence expérimentale de la dépendance forte de la localisation en régime ACGF en fonction de la pression. La fenêtre de localisation est définie sur ces images par la Region of Interest (ROI)

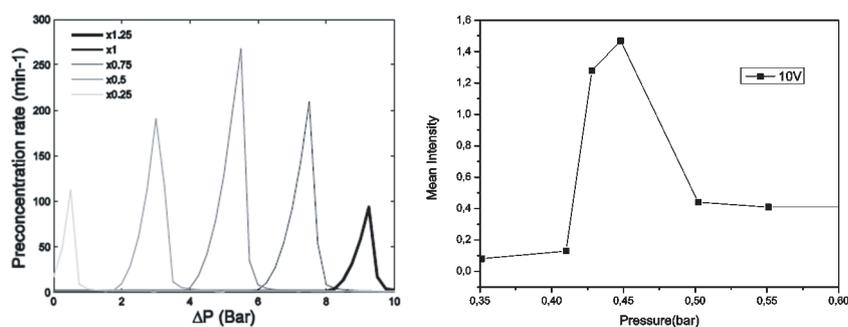


FIGURE 4.35 – A gauche : courbes théoriques du taux de la préconcentration en fonction de la pression appliquée pour différentes mobilités électrophorétiques. A droite : courbe expérimentale de la forte dépendance de la localisation du point focal de la préconcentration en AF en fonction de la pression appliquée pour une tension de 10 V

Les simulations effectuées par A. Plecis ont ouvert la voie à une préconcentration localisée en fonction des mobilités d'analyte. Le concept d'électropréconcentration sélective, permettant de préconcentrer et de séparer en une seule étape les différents analytes d'un mélange, a émergé. Les premiers résultats de localisation pour une protéine unique en fonction de la pression permettent de conforter expérimentalement cette idée d'un outil permettant de séparer et de concentrer les échantillons rapidement et en une seule étape sur puce. Cependant, les faibles taux de préconcentration anodique ne permettent pas, pour le moment, d'envisager une réelle préconcentration en même temps que la séparation.

4.III.C Conclusion sur l'électropréconcentration modulée

- J'ai pu pour la première fois mettre en évidence expérimentalement l'électropréconcentration d'une même molécule suivant 4 régimes.
- Chacun de ces régimes est défini par le rapport entre vitesse propre locale de la molécule sous champ électrique (variant localement à cause du phénomène d'enrichissement / déplétion) et vitesse du liquide (constante dans chaque section).
- L'efficacité de la préconcentration dépend du rapport entre ces vitesses. Dans les conditions expérimentales (BSA, force ionique modérée, géométrie) la situation pour laquelle pression et champ électrique sont opposés a été optimale.
 - Il reste néanmoins à observer expérimentalement les 4 régimes dans la situation où le champ électrique et la pression sont opposés. Ceci pourrait se faire en optimisant le banc expérimental (source de tension plus puissante), soit par modification de la géométrie du dispositif fluidique. Les résultats permettraient peut-être d'observer le régime d'AF privilégié obtenu numériquement (figure 4.32) : bonne préconcentration et localisation.
 - Dans le cas où la mobilité électrophorétique est supérieure à la vitesse électroosmotique (moins le Contre Poiseuille), c'est-à-dire pour un flux électrocinétique négatif, il reste à pouvoir qu'en appliquant dans le même sens pression et champ électrique on ait la situation à privilégier (figure 4.33) : 4 régimes accessibles et fortes préconcentrations.
 - ⇒ Suivant le dispositif (géométrie notamment), le but principal à poursuivre est de cartographier pour une molécule donnée la localisation et l'efficacité de la préconcentration soit $I=f(V, P)$ et $x=f(V,P)$.
- Les 4 régimes se définissent par leur position par rapport à la nanofente et aux électrodes : Stacking (à l'interface même micro - nano) anodique et cathodique ; Counter Gradient Focusing (point de focalisation décalé de la nanofente, dans la zone de polarisation) anodique et cathodique. Nous obtenons alors une première séparation grossière (couplée à une préconcentration) : 4 localisations correspondent à 4 gammes de mobilité électrophorétique (figure 4.36a).
 - ⇒ Dans le cas d'un mélange complexe (plusieurs analytes), il n'est pas possible de discriminer aisément un analyte en particulier. Une perspective de l'électropréconcentration modulé par une pression est de modifier légèrement soit la pression soit la tension appliquée de façon à décaler les limites de chaque régime. Si un analyte passe d'un régime à l'autre, l'intensité fluorescente est fortement modifiée (forte diminution pour le régime qu'il quitte, forte augmentation pour le régime qu'il rejoint). Si les limites des régimes sont préalablement cartographiés pour l'analyte en question, il devient alors possible d'identifier l'analyte changeant de mode de préconcentration (figure 4.36).

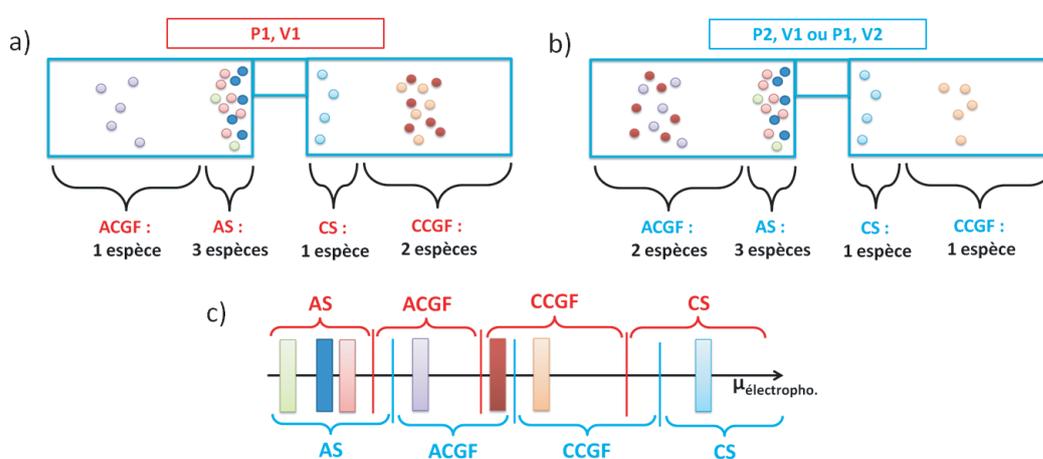


FIGURE 4.36 – Schéma de l'identification d'analyte dans un mélange complexe lors d'une électropréconcentration. a) Electropréconcentration de référence avec imposition de V1 et P1. b) Electropréconcentration avec modification de la tension ou de la pression : modification du signal fluorescent dû au changement de régime de préconcentration pour un analyte. c) Schéma des régimes de préconcentration pour le mélange complexe : dans les deux cas il y a séparation de 4 gammes de mobilité électrophorétique, par observation des différences il est possible de discriminer 1 analyte précis.

4.IV Nouveaux développements envisageables

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 1, les perspectives de la préconcentration étaient surtout de conditionner l'échantillon (préconcentrer des traces d'analytes) avant de l'analyser. Les résultats préliminaires de ces travaux de recherches permettent cependant d'envisager une application des nanocanaux pour combiner en une seule étape de préconcentration et de séparation de traces d'analytes dans un échantillon complexe. Je vais maintenant présenter, deux applications possibles comme perspectives de mon travail de recherche.

4.IV.A A court terme : la nanofente comme un outil de diagnostic performant pour des tests immunologiques

L'électropréconcentration sélective permettant de détecter, en une seule étape, des traces d'analytes au sein d'un échantillon complexe est encore un sujet de recherche très amont qui nécessite de nombreux développements. Cependant, le principe d'électropréconcentration *et* de localisation permettant une analyse en une seule étape pourrait être envisagé pour des applications plus simples. Une des voies de valorisation envisageable serait de se servir du système MNM pour préconcentrer et séparer des molécules de mobilités très différentes. Le but visé serait de travailler avec deux analytes qui correspondraient chacun à un régime différent, anodique pour l'un et cathodique pour l'autre.

Les tests immunologiques doivent détecter des anticorps sécrétés en réponse à une infection. Ces anticorps sont de grosses macromolécules (environ 150 kD) bien plus lentes que la plupart des protéines (entre 20 et 100 kD en général) auxquelles ils sont associés. La figure 4.37 présente le principe de fonctionnement du système MNM pour son utilisation en tant que test immunologique.

- l'échantillon du patient est mélangé à une solution contenant l'agent pathogène (protéine) marqué en fluorescence.
- dans le cas où le patient est sain, seul la protéine pathogène est fluorescente. Le système est étalonné pour que la protéine se préconcentre cathodiquement. Il n'y a qu'un spot fluorescent, le patient n'est pas infecté.
- dans le cas où le patient est malade, son système immunitaire aura fabriqué l'anticorps correspondant à la protéine fluorescente. Il va se former, dans la solution, un complexe fluorescent (protéine-anticorps) en plus des deux autres analytes protéines et anticorps. Le complexe étant très lent, celui-ci sera amené à se préconcentrer anodiquement. La protéine se préconcentre toujours cathodiquement. Peu importe où se préconcentre l'anticorps seul, car il n'est pas fluorescent. Il est alors possible de visualiser deux spots fluorescents (un côté anodique, l'autre côté cathodique) en mettant en évidence que le patient est (ou a été) infecté.

Grâce à ce système plus simple où l'on ne s'intéresse qu'à séparer grossièrement deux analytes (protéine seule et complexe protéine-anticorps), on peut espérer trouver plus rapidement des applications simples, rapides, peu coûteuses (temps et réactifs) pour diagnostiquer des traces de marqueurs pathogènes. Comme nous l'avons vu dans

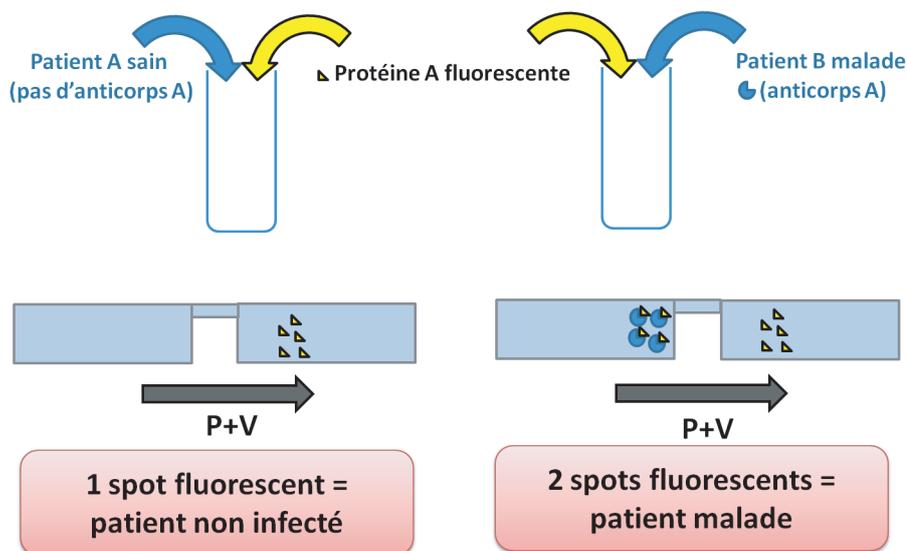


FIGURE 4.37 – Schéma principe de l'utilisation d'une structure MNM comme test immuno. Dans ce cas, les fortes différences de vélocité entre la protéine (petite molécule à forte mobilité) et l'anticorp correspondant (grosse molécule et plus lente que la protéine) permettent une séparation de la protéine seule et du complexe protéine-anticorp (très grosse molécule, lente). Les deux points de focalisation fluorescents correspondraient au complexe protéine-anticorps (très lent) côté anodique et à la protéine seule (plus rapide) côté cathodique.

le premier chapitre, ce type d'application miniaturisé permettant un diagnostic précoce peut, suivant l'agent pathogène, déboucher sur des marchés importants.

4.IV.B A long terme : vers une électropréconcentration sélective

Jusqu'ici, l'électropréconcentration a permis de préconcentrer en un point tous les composés d'un échantillon complexe. Cette étape de préconcentration était ensuite suivie d'une séparation [9] [42].

Suite à ces travaux de thèse, il est désormais envisageable de développer un dispositif MNM permettant de préconcentrer et de séparer les analytes au sein d'un mélange en une seule étape.

Le potentiel séparatif de tels dispositifs intégrant un nanocanal se base sur les expériences que j'ai réalisées en modifiant la pression à une tension appliquée donnée (figure 4.35). En régime ACGF, une faible variation de la vitesse du liquide induit une forte variation de la localisation du point de focalisation. Cela implique qu'une variation de la mobilité électrophorétique de l'analyte entraîne également une variation de la localisation. Les simulations menées par A. Plecis [46] confortent ces observations expérimentales pour lesquelles le régime ACGF permet de faire varier la localisation suivant la mobi-

lité de l'analyte (figure 4.38a). Pour aboutir finalement à une électropréconcentration sélective, la voie qui semble la plus prometteuse consisterait à se placer dans la gamme (P,V) pour une séparation en régime ACGF. La séparation des molécules se fera par mobilité électrophorétique (figure 4.38b).

Cependant cette perspective d'application, bien qu'extrêmement attrayante, est encore très exploratoire. En effet, pour le moment mes observations sur la localisation n'ont été réalisées qu'avec une seule molécule (BSA). La résolution du point de focalisation sera vraisemblablement le verrou majeur de cette technique qui est dépendante des nombreux paramètres de ce sujet (parmi lesquels la charge de surface, la géométrie, la pression, la tension appliquée, la force ionique, le pH...).

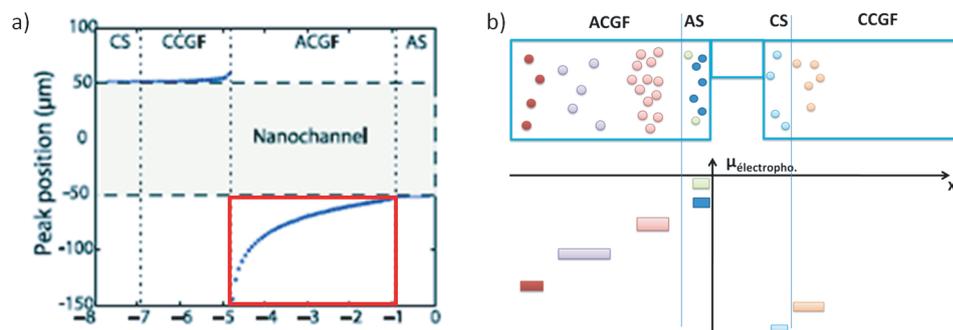


FIGURE 4.38 – a) Simulations numériques de la position du point de focalisation en fonction de la charge de la molécule (et donc de la mobilité électrophorétique), le mode ACGF permettant de mieux séparer en fonction des mobilités électrophorétiques. b) Schéma principe de l'électropréconcentration sélective tirant parti de la localisation propre de chaque molécule dans le régime d'ACGF en fonction de la mobilité électrophorétique.

4.V Conclusion sur la nanofluidique

Ce chapitre expérimental vient achever ce travail de thèse. Les phénomènes mis en jeu dans les dispositifs MNM étant très complexes et encore mal compris, de nombreux problèmes ont été rencontrés. Néanmoins, ce travail a permis de lever plusieurs verrous :

- Les expériences de rétention ont permis de valider un banc de mesure automatisé permettant d'appliquer une surpression dans des dispositifs MNM utilisés jusqu'ici pour des phénomènes électrocinétiques. La théorie développée pour la rétention permet quant à elle d'utiliser les dispositifs MNM pour remonter à une mesure du potentiel zéta de la nanofente en quelques minutes.
- Les expériences réalisées pour l'étude de l'électropréconcentration simple ont permis de valider ce banc automatisé permettant des mesures sur plus d'une journée (voire plus pour de plus gros réservoirs) et résistant à l'électrochimie. Des mesures systématiques en fonction de la tension appliquée ont permis de mettre en évidence des sous régimes d'électropréconcentration du régime CCGF de la fluorescéine. Ce phénomène n'avait jamais été prédit et souffre encore aujourd'hui d'un manque de compréhension.
- Les expériences d'électropréconcentration assistée par pression ont pour la première fois permis de mettre en évidence expérimentalement qu'une molécule pouvait se préconcentrer, AU SEIN D'UN MEME DISPOSITIF, suivant les quatre régimes différents (AS, ACGF, CS et CCGF) prédits par les simulations. Le rapport $V_{liquide}/V_{electrophorétique}$ permettant de choisir le régime désiré par l'utilisateur. Chaque couple (P,V) présente un couple (localisation, efficacité de préconcentration) qui lui est propre pour une mobilité électrophorétique donnée.

⇒ Le banc de mesure doit encore être amélioré afin d'obtenir les régimes permettant d'avoir des taux de préconcentration rivalisant avec la méthode d'ITP. Au cours de ma thèse, je n'y ai pas eu accès à cause du générateur de tension qui n'était pas assez puissant pour les géométries étudiées.

⇒ J'ai utilisé des concentrations fortes (μM) d'analytes fluorescents qui sont en contradiction avec la finalité d'étudier des traces d'analytes dans un échantillon (quelques fM). Cependant, cette gamme de concentration a permis d'observer de très faibles préconcentrations qui m'ont permis de comprendre la dynamique et l'efficacité de l'électropréconcentration assistée par pression pour chaque régime. Ces travaux de thèse sont donc à poursuivre avec des concentrations très diluées.

⇒ L'application la plus poussée qui pourrait déboucher des dispositifs MNM devrait permettre de préconcentrer et de séparer, en UNE SEULE étape, toutes les molécules contenues dans un échantillon complexe. De gros efforts de développement sont encore nécessaires pour valider ce concept, notamment sur la résolution d'une telle technique novatrice.

⇒ La précédente application étant très amont, des applications plus simples doivent être poursuivies. Etudier des systèmes binaires (protéines pathogènes, anticorps associés) devraient permettre à ces dispositifs MNM de déboucher sur des tests immunologiques

précoces, rapides et miniaturisés à fort potentiel, comme nous l'avons discuté dans le premier chapitre.

Conclusion générale

Le Chapitre 1 nous a permis de voir que les développements de dispositifs miniaturisés sont en passe de révolutionner de nombreux domaines du biomédical. A l'instar de la microélectronique, la microfluidique connaît un essor considérable et va dans les années à venir s'imposer comme la technologie permettant l'analyse rapide, peu chère de fluides (sang, air, échantillons alimentaires...). L'enjeu de ce marché est tel que des efforts importants sont réalisés à l'échelle mondiale afin de lever certains verrous existants. Parmi eux, le prétraitement de l'échantillon avant analyse est un point crucial. Ces travaux ont présenté les techniques existantes afin de mieux les comparer avec une technique récente utilisant des nanostructures dans un dispositif microfluidique afin de réaliser ce prétraitement.

Le Chapitre 2 a présenté une étude poussée du procédé de fabrication utilisé au début de ma thèse. De nombreux développements technologiques afin de rendre les dispositifs fabriqués à basse température compatibles avec la méthode d'électropréconcentration ont été testés. Une méthode d'étude du vieillissement des dispositifs sous champ électrique a mis en avant une trop forte altération des puces fabriquées initialement. Un procédé de fabrication, basse température de puce en verre, extrêmement résistante électriquement et mécaniquement a été développée. Ces développements ont donné lieu à une demande de dépôt de brevet de la part du CNRS.

Le Chapitre 3 a présenté le banc expérimental, ces optimisations au cours de ces trois dernières années. Le protocole expérimental, notamment de préparation du dispositif, a nécessité de grosses améliorations afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles.

Le Chapitre 4 comprend toutes les expériences fluidiques que j'ai réalisées. Il est séparé en trois grands types d'expériences : préconcentration assistée par pression ; électropréconcentration (champ électrique seul) ; électropréconcentration modulée (champ électrique et pression).

La première technique, n'avait jamais été étudiée dans un dispositif miniaturisé et pourrait être utilisée comme une méthode simple et efficace de détermination expérimentale du potentiel de surface.

Les mesures systématiques faites avec la seconde technique, pourtant déjà étudiée expérimentalement, a mis en évidence des propriétés de préconcentration d'analytes

comprenant plusieurs sous régimes. Ce comportement n'avait encore jamais été rapporté et pose de nouvelles interrogations sur la compréhension de ce sujet.

Enfin, l'électropréconcentration modulée, méthode novatrice, a pour la première fois permis de mettre en évidence la possibilité de contrôler plus efficacement les propriétés de préconcentration. L'optimisation de cette technique pouvant laisser espérer l'utilisation de nanofentes pour préconcentrer ET séparer des analytes d'un échantillon complexe en UNE SEULE ETAPE et plus compétitive que les techniques déjà existantes. Cette finalité étant encore cependant très amont, les dispositifs fluidiques intégrant des nanostructures pourraient néanmoins servir pour des applications nécessitant une maturité de la technique moins aboutie : les tests immunologiques sont un bon exemple de perspectives développées qui pourraient d'ici quelques années faire leur apparition sur le marché.

Cette thèse s'achève donc sur des résultats encourageants pour la poursuite de ces recherches. J'espère vous avoir convaincu, au cours de ce manuscrit, que la microfluidique est une science et une technologie extrêmement stimulante. Sa pluridisciplinarité (tant en microfabrication, qu'en phisico-chime des surface ou qu'en biologie) en font un domaine de recherche dans lequel j'ai apprécié m'épanouir. Je poursuis d'ailleurs à la suite de cette formation par la création d'une start-up en microfluidique ayant obtenu durant la dernière année le soutien de la Région Ile de France (via l'appel à projet valo C'Nano IdF), du Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche et d'Oséo (Concours National d'Aide à la Création d'Entreprises de Technologies Innovantes 2010).

Chapitre 5

Annexes A : Les microtechnologies pour la nanofluidique disponibles au sein de la centrale technologique du LPN

La lithographie optique

Principe

Cette technique utilise la lumière d'une lampe UV (G-line [$\lambda=436$ nm], H-line [$\lambda=405$ nm], I-line [$\lambda=365$ nm] suivant les filtres présents sur la machine) pour permettre de structurer des résines avec une résolution latérale de l'ordre du micron. Plusieurs types de résines sont disponibles selon le but à atteindre :

- les résines négatives pour lesquelles le rayonnement ultraviolet entraîne une polymérisation des zones exposées, conférant ainsi à ces zones une tenue particulière au solvant de révélation alors que les parties non insolées disparaissent sélectivement dans ce solvant (par exemple, la résine SU-8).
- les résines positives pour lesquelles le rayonnement UV produit une transformation chimique des macromolécules, entraînant une solubilité accrue des zones exposées dans le révélateur, (résines AZ 9260, S1818 et SJR 5740).
- les résines inversibles, qui ont la propriété de changer de polarité suite à une étape de recuit dit d'inversion (AZ 5214, TI09XR).

Pour comprendre brièvement le principe de cette technologie, prenons comme exemple une résine qui a été omni présente durant mes travaux la AZ 5214E (car la seule que j'ai utilisée durant ma thèse malgré le nombre important de résines qu'il existe). Le choix de cette résine s'est fait car elle est très bien connue au laboratoire, y est utilisée tous les jours et que les procédés sont bien connus pour les machines que nous utilisons. De

plus, celle-ci est inversible c'est-à-dire qu'elle est utilisable comme une résine positive (la zone qui a été exposée aux UV se retire) ou alors comme une résine négative (celle qui était protégée par le masque se retire) (cf. Figure 1). La lithographie optique se compose

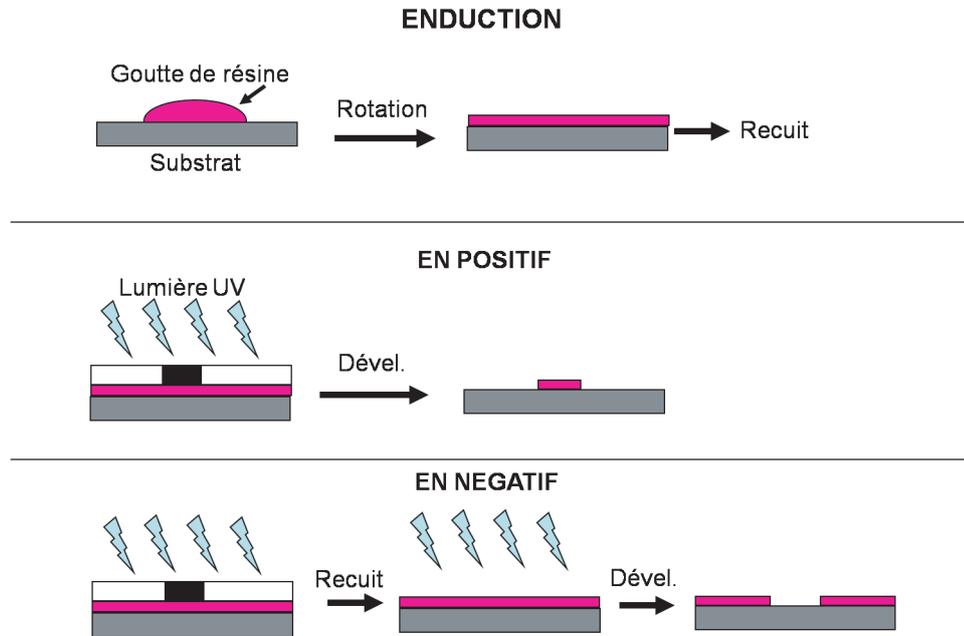


FIGURE 5.1 – Schéma principe de la lithographie optique pour résine en utilisation positive et négative

toujours d'au moins trois phases : enduction, développement (identique que l'on utilise la résine en positif ou négatif) et exposition (plus ou moins d'étapes suivant le mode positif ou négatif).

L'enduction a pour but de réaliser un dépôt homogène de la résine. Pour se faire, quelques gouttes de résine sont déposées sur le substrat propre et déshydraté (un substrat " humide " entraîne une mauvaise adhérence de la résine, un recuit d'une minute aux alentours de 100°C est utilisé). Ensuite le substrat est mis en rotation, ceci a pour effet : de répartir la résine et d'éliminer le surplus. La vitesse de rotation fixe l'épaisseur finale de film déposé en fonction de sa viscosité. Cette vitesse doit être maintenue constante pendant quelques secondes afin d'homogénéiser l'épaisseur et de commencer à éliminer le solvant contenu dans la résine. Le film est alors recuit afin d'éliminer le reste de solvant.

Pour les résines inversibles comme l'AZ5214E, deux types d'utilisations sont possibles : en positif et négatif. Suivant le but, l'une ou l'autre permet de rendre la partie exposée soluble ou résistante au solvant par rapport à la partie sous le masque optique.

But de la lithographie optique

La lithographie optique est utilisée pour structurer un matériau autre que la résine. Deux types de méthodes sont possibles : le "lift off" et la méthode directe (cf. Figure 2). Pour le "lift off" un dépôt est réalisé sur la résine préalablement structurée. Les zones où la résine a déjà été éliminée vont déterminer les zones où le dépôt secondaire restera. En effet, une fois le dépôt réalisé, la résine est enlevée entraînant avec elle le matériau déposé sur elle. Il est alors important que la couche de matériau déposé soit plus mince que la couche de résine pour permettre une séparation lors du lift off. Pour la méthode directe, la lithographie sert de masque de protection avant gravure du matériau sous la résine qui est enlevé complètement par la suite.

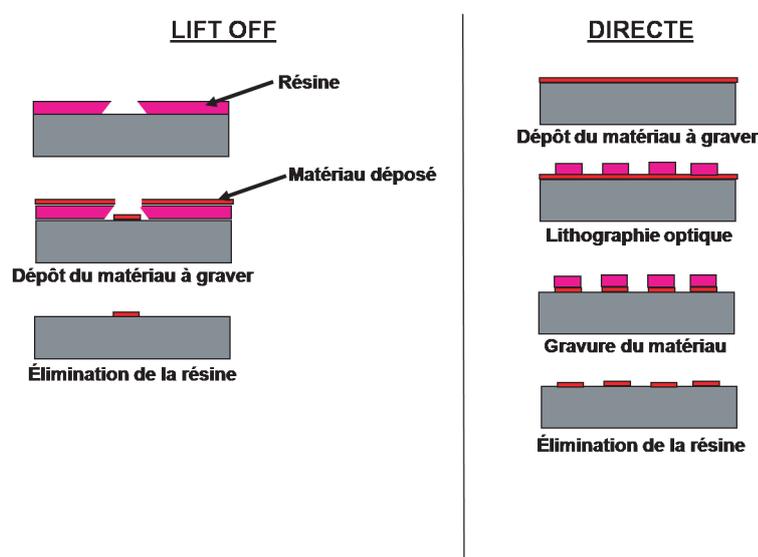


FIGURE 5.2 – Structuration de films minces par utilisation de la lithographie optique

Notre protocole

Comme je l'ai déjà mentionnée, la lithographie optique en utilisant la résine 5214E (MicroChemicals) est très bien connue au laboratoire. Je me suis donc servi des recettes mises au point par les ingénieurs de la Salle Blanche (Nathalie BARDOUX, Christophe DUPUIS, Jean-Claude ESNAULT et Christophe ROBLIN). Sur la machine MJB3 de Süss Microtech, équipée d'une lampe Mercure disposant des trois raies G, H et I. Pour une lithographie en positif :

- déshydratation à 125°C du substrat pendant environ une minute
- enduction de la résine (pas besoin de Primer) à 5000 tours/minute pendant 30 secondes avec une phase d'accélération de 2000 tours/minute². L'épaisseur de résine ainsi obtenue est de 1,4 .
- recuit de 1 minute à 125°C

-
- exposition de 15 secondes en contact du masque
 - développement pendant 35 secondes dans une solution de 726 MIF (MicroChemicals)
 - Pour l'utilisation en mode négatif :
 - déshydratation, enduction et recuit identiques
 - exposition de 6 secondes en contact du masque
 - 2ème recuit de 1 minute à 125°C
 - 2ème exposition sans masque (" Flood ") de 20 secondes
 - développement de 35 secondes dans une solution de 726 MIF

La lithographie par faisceau d'électron

Une technologie plus récente a permis de réaliser des structures avec des tailles nanométriques. Jusqu'ici, la diffusion de la lumière due à sa nature ondulatoire donnait une résolution latérale de l'ordre de deux fois sa longueur d'onde. Dans le cas de la lithographie par faisceau d'électron (e-beam), un faisceau d'électron est focalisé localement sur la résine. Il n'y a pas ici besoin de masque physique puisque le parcours du faisceau détermine la partie de la résine insolée. Cette technique permet d'obtenir des motifs de la taille du nanomètre mais son principal désavantage réside dans le coût important de la machine ainsi que le temps d'une telle lithographie (puisqu'il dépend de la densité de motif). Cette solution n'a pas été choisie dû au temps et du coût de fabrication, une solution alternative permettant à partir de lithographie optique d'obtenir une dimension du canal fluide nanométrique.

Les dépôts de couches minces

Les dépôts métalliques

Les couches minces métalliques sont également très fréquemment utilisées en micro électronique. Le large éventail de techniques et les sept bâtis dont dispose le LPN permettent de déposer une vingtaine de matériaux (Ti, Au, Ge, Ni, W, Co, Pt, Cr, Al, In, Ag, SiO). Cependant, durant mes travaux de thèse, mes besoins pour cette ressource ont été très faibles puisque je ne m'en suis servi que pour la réalisation de masque de Chrome pour la lithographie optique. En effet, pour réaliser mes structures, les motifs sont tout d'abord réalisés numériquement via L-Edit puis imprimés sur films polymères transparents par la société Selba avec une résolution de 25000 dpi/inch². Le transfert de film plastique vers un masque de Chrome sur plaque de verre se justifie par le fait que les films absorbent une partie du rayonnement UV et entraînent une perte de résolution, gênante pour des motifs proches du micron. Quelques tests d'intégration d'électrodes métalliques ont également été réalisés, mais ces faibles besoins n'ont pas justifiés que je sois formé à cette technique que je ne développerai donc pas plus en détail.

Les dépôts diélectriques

D'un très grand intérêt dans la micro électronique, ces dépôts sont généralement utilisés sur des semi-conducteurs. Ils ont pour principal but :

- masques de gravure des semi-conducteurs, masques d'implantation
- couches diélectriques pour l'isolation électrique
- couches diélectriques pour la passivation
- matériaux présentant des propriétés diélectriques spécifiques (forte tension de claquage, faible contrainte, indice optique spécifique, faible hydrogénation des couches, ...)

Deux grandes catégories de dépôt existent : le dépôt par pulvérisation (" sputtering ") et la PECVD (Plasma-enhanced chemical vapor deposition). Ces deux techniques transforment la matière en plasma avant que celle-ci ne se redépose sur le substrat. Pour la pulvérisation la matière première servant à former la couche mince provient d'une cible solide. L'application d'une différence de potentiel entre la cible et les parois du réacteur au sein d'une atmosphère raréfiée permet la création d'un plasma froid, composé d'électrons, d'ions, de photons et de neutres dans un état fondamental ou excité. Sous l'effet du champ électrique, les espèces positives du plasma se trouvent attirées par la cathode (cible) et entrent en collision avec cette dernière. Elles communiquent alors leur quantité de mouvement, provoquant ainsi la pulvérisation des atomes sous forme de particules neutres qui se condensent sur le substrat. Dans le cas de la PECVD, la matière provient de composés gazeux qui se dissocient grâce à une différence de potentiel à basse pression (quelques mTorr). Le principe est cependant proche de celui de la pulvérisation. Le LPN dispose pour cette technologie de quatre bâtis (2 PECVD, 1 de pulvérisation mais également un autre lui permettant d'évaporer le matériaux grâce à un canon à électron) lui permettant de réaliser des dépôts variés comme le carbure de silicium (SiC), la silice (SiO₂), le nitrure de silicium (Si₃N₄), le silicium amorphe (aSi), l'alumine (Al₂O₃)... Trois de ces dépôts ont été utilisés pendant cette thèse, tous trois calibrés par l'équipe de dépôt diélectrique du LPN (David Chouteau, Xavier Lafosse et Luc Le Gratiet) sur un bâti PECVD Unaxis D200 :

Le dépôt de aSi s'effectue à 280°C à basse pression (700 mTorr) avec des flux de 400 sccm de He et 50 sccm de SiH₄. Le plasma et l'accélération de celui ci vers les substrats s'est fait avec une puissance de 100 Watts.

Les gravures

La gravure humide : chimie classique

De nombreux produits chimiques sont utilisés en Salle Blanche pour la fabrication de micro et nano objets. Les deux principales utilisations sont le nettoyage et la préparation des surfaces (activation de surface) mais aussi la gravure de certains matériaux. Ce procédé permet d'obtenir une gravure isotropique, c'est-à-dire que dans un matériau donné il n'y a pas de direction privilégiée, dans le cas d'une gravure avec un masque, il y a sous gravure et le motif est plus grand que le masque initial (cf. Figure 3). Cette

alternative peut donc présenter certains avantages. Dans notre cas elle est relativement facile à mettre en oeuvre (faire attention aux normes de sécurité) et permet de creuser des canaux de section quasi semi circulaire.

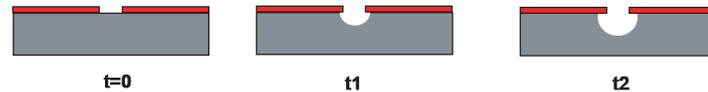


FIGURE 5.3 – Schéma du profil isotropique d'une gravure humide

La gravure sèche : gravure plasma

Il s'agit d'une gravure physico-chimique, car elle met en jeu à la fois un bombardement ionique, énergie mécanique, et une réaction chimique entre le gaz ionisé et les surfaces de l'échantillon. Les atomes du gaz réagissent avec les atomes de l'échantillon pour former une nouvelle espèce volatile qui sera évacuée par le groupe de pompage. On parle de gravure ionique réactive (RIE ou Reactive Ionic Etching) ou encore de gravure sèche car se déroulant au sein d'un plasma, par opposition à la gravure humide de matériau. Le réglage des différents paramètres (pression, puissance, température, polarisation) permet de donner plus ou moins d'importance à l'un ou l'autre des processus de gravure. Il est également important de distinguer les RIE des ICP-RIE, car pour la première la puissance ainsi que la polarisation du plasma sont contrôlée par un seul jeu d'électrode alors que sur le second le champ ionisant et le champ d'accélération sont décorrélés. Une faible polarisation, une pression et une température élevées vont favoriser le processus chimique. Par contre, une tension de polarisation importante et une pression basse vont favoriser le bombardement mécanique. On peut également obtenir des gravures isotropes et anisotropes : les réactions chimiques entre le gaz et l'échantillon produisent une gravure sélective et isotrope alors que l'érosion de la surface dû au bombardement ionique est anisotrope et non sélectif (des flans quasi droits peuvent être obtenus en privilégiant la gravure mécanique due aux chocs des ions avec le matériau). Ce second type de gravure permet d'obtenir des facteurs de formes importants (cf. Figure 4). Par le choix des gaz réactifs, fluorés ou chlorés, une large gamme de matériaux peut être gravés. Le laboratoire dispose notamment pour cette technique d'un bâti réalisant des plasmas à base de SF_6 très bien adapté à la gravure de composé à base de silicium. Le procédé utilisé se fait à $18\text{ }^\circ\text{C}$ avec une très faible pression de 30 mTorr (10 sccm de SF_6) avec une puissance de 10 Watts.

La gravure par sonde ionique focalisée (Focus Ion Beam)

La Sonde ionique focalisée, plus connue sous le nom du sigle anglais FIB (Focused ion beam), est un instrument scientifique qui ressemble au microscope électronique à balayage (MEB). Mais là où le MEB utilise un faisceau d'électrons focalisés pour faire l'image d'un échantillon, la "FIB" utilise un faisceau d'ions focalisés. Contrairement aux MEB, les FIB sont destructives. Par conséquent, leur domaine d'applications est plus

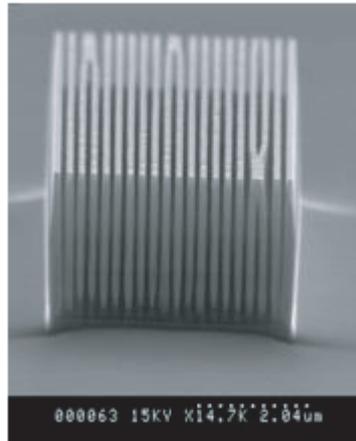


FIGURE 5.4 – Exemple de gravure sèche réalisée au LPN avec un facteur de forme important

la microfabrication que la microscopie. Par analogie avec la lithographie e-beam, cette technique de gravure est directe puisqu'il n'y a pas besoin de masque physique du fait de sa focalisation et permet une résolution de quelques nanomètres pour les faisceaux les plus fins (2.5 à 6 nm). Cette technique souffre néanmoins, comme l'e-beam d'un temps important pour la réalisation de structures.



Chapitre 6

Annexes B : calcul de la composante de la vitesse du liquide par le champ électrique externe

Un des objectifs de cette partie étant de déterminer l'influence de la hauteur de la nanofente sur l'électropréconcentration. La résistance hydrodynamique étant dépendante de la hauteur du nanocanal (cf. Eq. 26), il est important d'avoir un ordre d'idée de la vitesse dans le microcanal. La figure 6.1 ci dessous est une simulation 2D (pas de largeur considérée très grande devant la hauteur) permettant d'avoir une idée des vitesses de liquide dans nos dispositifs. Pour réaliser cette simulation j'ai :

- Divisé la hauteur de chaque section en 1000 sous domaines
- Calculé pour chacune d'elles la valeur du potentiel selon l'Eq. 15 du chapitre 1 (pour la concentration et les tailles des canaux, il existe une solution analytique car pas de recouvrement des EDL)
- Calculé la valeur du champ électrique externe suivant que l'on soit dans un microcanal ou la nanofente tel que :

$$E_{\mu} = E_{externe} \frac{h_{\mu}/L_{\mu}}{2(h_{\mu}/L_{\mu}) + (h_{nano}/L_{nano})} \quad (6.1)$$

$$E = E_{externe} \frac{h_{nano}/L_{nano}}{2(h_{\mu}/L_{\mu}) + (h_{nano}/L_{nano})} \quad (6.2)$$

- Calculé pour chaque sous domaine la vitesse électroosmotique locale. Cette vitesse a été moyennée sur toute la section ($v = \sum_i v_{EOF}^i/h$)
- pris en compte la formation de contre poiseuilles nécessaires pour satisfaire la

conservation de la masse et la non compressibilité du fluide :

$$v_{\mu} = v_{\mu,EOF} - \frac{v_{\mu,EOF} \times h_{\mu} - v_{nano,EOF} \times h_{nano}}{h_{\mu}} \times \frac{R_{\mu}}{R_{tot}} \quad (6.3)$$

$$v_{nano} = v_{nano,EOF} - \frac{v_{nano,EOF} \times h_{nano} - v_{\mu,EOF} \times h_{\mu}}{h_{nano}} \times \frac{R_{nano}}{R_{tot}} \quad (6.4)$$

Ces calculs ont été réalisés pour plusieurs valeurs de charge de surface car nous ne la maîtrisons pas. Ainsi nous sommes en mesure d'encadrer la vitesse expérimentale. Les simulations de la figure 6.1 ont été obtenues pour un voltage de 50 V et une concentration en buffer de 10 mM, un microcanal de 2 μm de hauteur, de 1 cm de longueur et une nanofente de 20 μm de longueur (cette longueur permet une dépendance avec la charge de surface et de la hauteur de la nanofente du même ordre de grandeur).

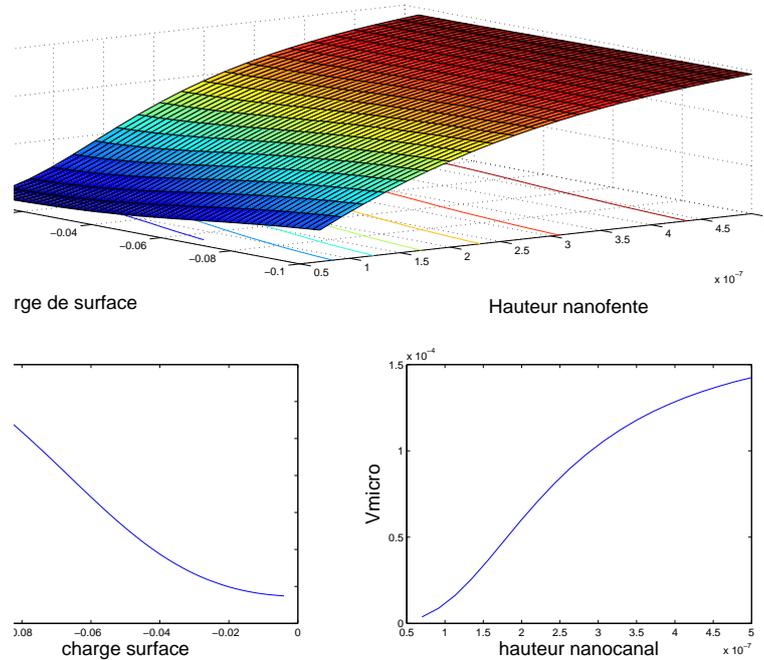


FIGURE 6.1 – Simulation de la vitesse électroosmotique dans les microcanaux en fonction de la charge de surface et de la hauteur de la nanofente.

Ces calculs ont été réalisés avec Matlab grâce aux codes suivants :
 fonction [Qm,Qn,rappMN,Sig,Xnano,Rm,Rn,Qmcor,Qncor,VMicrochannel,
 VNanoMean,B]=influenceh(e,xn,xm,E,C) ;
 Xnano=70e-9 :(xn-(70e-9))/20 :xn ; for i=1 :length(Xnano) [Qm,Qn,sig,Volt
 ,rappMN,RM,RN,CpM,CnM,CpN,CnN,CondM,CondN,Qmcor,Qncor,
 VMmean,VNmean]=influencesigma2(e,Xnano(i),xm,E,C) ;

```
Qm( :, :,i)=Qm ;
Qn( :, :,i)=Qn ;
Qmcor( :, :,i)=Qmcor ;
Qncor( :, :,i)=Qncor ;
rapportMN( :, :,i)=rappMN ;
Vmmean( :, :,i)=VMmean ;
Vnmean( :, :,i)=VNmean ;
Rm( :, :,i)=RM ;
Rn( :, :,i)=RN ;
end
VNanoMean( :, :)=Vnmean(1, :, :) ;
VNanoMean ;
Sig=sig ;
VMicrochannel( :, :)=Vmmean(1, :, :) ;
VMicrochannel ;
B( :, :)=Vmmean(1, :, :) ;
B ;

subplot(2,2,1 :2) ;surf(Xnano,Sig,B)
xlabel('Hauteur nanofente','FontSize',18)
ylabel('Charge de surface','FontSize',18)
zlabel('V micro mean','FontSize',18)
subplot(2,2,3) ;plot(Sig,B( :,1))
xlabel('charge surface','FontSize',18)
ylabel('Vmicro','FontSize',18)
subplot(2,2,4) ;plot(Xnano,B(1, :))
xlabel('hauteur nanocanal','FontSize',18)
ylabel('Vmicro','FontSize',18)
end

function [Qm,Qn,Sig,Volt,rappMN,RM,RN,CpM,CnM,CpN,CnN,CondM,CondN
,Qmcor,Qncor,Vmmean,Vnmean]=influencesigma2(e,xn,xm,E,C)
[veofM,veofN,Xm,Xn,sigma,volt,RM,RN,CpM,CnM,CpN,CnN,CondM,CondN]=
veof(e,xn,xm,E,C) ;
[Qn,Qm,rapportMN,Qmcor,Qncor]=debits(veofM,veofN,Xm,Xn,RM,RN) ;
Qm=Qm ;
Qn=Qn ;
Qmcor=Qmcor ;
Qncor=Qncor ;
VMmean=Qmcor/(2e-6) ;
VNmean=Qncor/(xn) ;

Volt=volt ;
```

```

length(volt);
for i=2 :length(sigma);
Sig(i-1)=sigma(i);
for j=1 :length(volt);

rappMN(j,i-1)=rapportMN(j,i);
Vmmean(j,i-1)=VMmean(j,i);
Vnmean(j,i-1)=VNmean(j,i);
end
end
sig=Sig;
RM=RM;
RN=RN;
CpM=CpM;
CnM=CnM;
CpN=CpN;
CnN=CnN;
CondM=CondM;
CondN=CondN;
end

function [veofM,veofN,Xm,Xn,sig,volt,RM,RN,CpM,CnM,CpN,CnN,ConductM,
ConductN]=veof(e,xn,xm,E,C)

T=300;
R=8.31;
F=9.65e4;
eps=80;
eps0=8.85e-12;
eta=0.01;
sigma=e/50 :e/50 :e;
A=10 :E/3 :E;
for i=1 :length(sigma);

[pottotN,XN]=phy(sigma(i),xn,E,C,i);
[pottotM,XM]=phy(sigma(i),xm,E,C,i);
POTENTIELN(i,:)=pottotN(1,:);
POTENTIELM(i,:)=pottotM(1,:);
[resistanceM,resistanceN,CposM,CnegM,CposN,CnegN,CondM,CondN]=
resistance(pottotN(i,:),pottotM(i,:),XN,XM,C);
RM(i)=resistanceM;
RN(i)=resistanceN;
CpM(:,i)=CposM;

```

```
CnM( :,i)=CnegM ;
CpN( :,i)=CposN ;
CnN( :,i)=CnegN ;
ConductN(i)=CondN ;
ConductM(i)=CondM ;
for j=1 :length(A) ;
VM(j,i)=A(j)*resistanceM/(resistanceM+resistanceN) ;
VN(j,i)=A(j)*resistanceN/(resistanceM+resistanceN) ;
veofM(j,i, :)=eps0*eps*VM(j,i)*(sigma(i)-POTENTIELM(i, :))/eta ;
veofN(j,i, :)=eps0*eps*VN(j,i)*(sigma(i)-POTENTIELN(i, :))/eta ;
end
end
veofM=veofM ;
veofN=veofN ;
Xm=XM ;
Xn=XN ;
sig=sigma ;
volt=A ;
end
```

```
function [Qn,Qm,rapportMN,Qmcor,Qncor]=
debits(veofM,veofN,Xm,Xn,RM,RN)
for i=1 :length(veofM( :,1,1)) ;
for j=1 :length(veofM(1, :,1)) ;
for k=1 :length(veofM(1,1, :)) ;
Veom(k)=veofM(i,j,k) ;
Veon(k)=veofN(i,j,k) ;
end
A=trapz(Veom,Xm) ;
B=trapz(Veon,Xn) ;
Qm(i,j)=A ;
Qn(i,j)=B ;
Qmcor(i,j)=(Qm(i,j)-Qn(i,j))*(RM(j)/2/(RN(j)+RM(j)/2))+Qm(i,j) ;
Qncor(i,j)=(Qm(i,j)-Qn(i,j))*RN(j)/(RN(j)+RM(j)/2)+Qn(i,j) ;
rapportMN(i,j)=(Qm(i,j)/Qn(i,j)) ;
end
end
```

```
function [resistanceM,resistanceN,CpM,CnM,CpN,CnN,CondM,
CondN]=resistance(potentielN,potentielM,xN,xM,C)
T=300 ;
R=8.31 ;
F=9.65e4 ;
```

```

l=100e-6;
LM=1e-2;
LN=20e-6;
hM=2e-6;
hN=xN(length(xN));
CposN=C*exp(-(F*potentielN/(R*T)));
CnegN=C*exp(F*potentielN/(R*T));
CposM=C*exp(-(F*potentielM/(R*T)));
CnegM=C*exp(F*potentielM/(R*T));
ConductN=trapz(CnegN,xN)+trapz(CposN,xN);
resistN=1/(ConductN*l*hN/LN);
ConductM=trapz(CnegM,xM)+trapz(CposM,xM);
resistM=1/(ConductM*l*hM/LM);

resistanceM=resistM;
resistanceN=resistN;
CpM=CposM;
CnM=CnegM;
CpN=CposN;
CnN=CnegN;
CondM=ConductM;
CondN=ConductN;
end

function [F,X]=phy(e,x,E,C,sigma)
T=300;
R=8.31;
F=9.65e4;
eps=80;
eps0=8.85e-12;
eta=0.01;
lambda=sqrt((eps*R*T*eps0)/(2*F*F*C));
X1=[0 :x/999 :x];
FF= exp(-(X1/lambda));
facteur=2*R*T/F*(atanh(tanh((F*e)/(2*R*T))*FF));
pot=facteur;
for i=1 :length(X1);
pottot(1,i)=pot(1,i)+pot(1,length(X1)-i+1);
end
for k=1 :length(pottot);
F(sigma,k)=0;
end
F(sigma, :)=pottot(1, :);

```

```
length(F);  
X=X1;  
end
```



Bibliographie

- [1] H. E. S. M. G. A. M. P. J. Newman, R. Zengerle, *Flow Map : Microfluidics Roadmap for the Life Sciences*. 2004.
- [2] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *NATURE*, vol. 442, pp. 368–373, JUL 27 2006.
- [3] “Focus adherent n1,” tech. rep., Opticsvalley, juillet 2009.
- [4] J.-B. Waldner, *Nano-informatique et Intelligence Ambiante - Inventer l'Ordinateur du XXIeme Siècle*, 121 p. 2007.
- [5] P. Ekins, “Immunoassay, DNA analysis, and other ligand binding assay techniques : From electropherograms to multiplexed, ultrasensitive microarrays on a chip,” *JOURNAL OF CHEMICAL EDUCATION*, vol. 76, pp. 769–780, JUN 1999. 9th Annual James L Waters Symposium at Pittcon, PITTSBURGH, PA, MAR, 1998.
- [6] N. Oxford University Press, New York, ed., *World Bank World Development Report 1993 : Investing in Health*. 1993.
- [7] S. L. E. S. D. K. J. E. Arjan Floris, Steven Staal and A. van den Berg, “A pre-filled, ready-to-use electrophoresis based lab-on-a-chip device for monitoring lithium in blood,” *Lab-on-a-Chip*, vol. 10, pp. 1799 – 1806, 2010.
- [8] S. TERRY, J. JERMAN, and J. ANGELL, “GAS-CHROMATOGRAPHIC AIR ANALYZER FABRICATED ON A SILICON-WAFER,” *IEEE TRANSACTIONS ON ELECTRON DEVICES*, vol. 26, no. 12, pp. 1880–1886, 1979.
- [9] Y. Wang, A. Stevens, and J. Han, “Million-fold preconcentration of proteins and peptides by nanofluidic filter,” *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 77, pp. 4293–4299, JUL 15 2005.
- [10] Y. Wang, M. Choi, and J. Han, “Two-dimensional protein separation with advanced sample and buffer isolation using microfluidic valves,” *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 76, pp. 4426–4431, AUG 1 2004.
- [11] K. Sueyoshi, F. Kitagawa, and K. Otsuka, “Recent progress of online sample preconcentration techniques in microchip electrophoresis,” *JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE*, vol. 31, pp. 2650–2666, AUG 2008.
- [12] T. Matsui, J. Franzke, A. Manz, and D. Janasek, “Temperature gradient focusing in a PDMS/glass hybrid microfluidic chip,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 28, pp. 4606–4611, DEC 2007.

-
- [13] D. Ross and L. Locascio, "Microfluidic temperature gradient focusing," *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 74, pp. 2556–2564, JUN 1 2002.
- [14] P. Myers and K. Bartle, "Towards a miniaturised system for dynamic field gradient focused separation of proteins," *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*, vol. 1044, pp. 253–258, JUL 30 2004.
- [15] J. Liu, X. Sun, P. Farnsworth, and M. Lee, "Fabrication of conductive membrane in a polymeric electric field gradient focusing microdevice," *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 78, pp. 4654–4662, JUL 1 2006.
- [16] Z. Huang, K. Ito, and T. Hirokawa, "Further research on iodine speciation in seawater by capillary zone electrophoresis with isotachopheresis preconcentration," *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*, vol. 1055, pp. 229–234, NOV 5 2004.
- [17] T. Hirokawa, T. Ichihara, K. Ito, and A. Timerbaev, "Trace ion analysis of seawater by capillary electrophoresis : Determination of iodide using transient isotachopheretic preconcentration," *ELECTROPHORESIS*, vol. 24, pp. 2328–2334, JUL 2003.
- [18] K. Fukushi, N. Ishio, M. Sumida, S. Takeda, S. Wakida, and K. Hiroy, "Improvement of capillary zone electrophoresis sensitivity with artificial seawater as the background electrolyte utilizing transient isotachopheresis for the determination of nitrite and nitrate ions in seawater," *ELECTROPHORESIS*, vol. 21, pp. 2866–2871, AUG 2000.
- [19] T. Hirokawa, M. Yoshioka, H. Okamoto, A. Timerbaev, and G. Blaschke, "High-sensitivity capillary electrophoresis determination of inorganic anions in serum and urine using on-line preconcentration by transient isotachopheresis," *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES*, vol. 811, pp. 165–170, NOV 25 2004.
- [20] M. Mazereeuw, V. Spikmans, U. Tjaden, and J. van der Greef, "On-line isotachopheretic sample focusing for loadability enhancement in capillary electrochromatography-mass spectrometry," *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*, vol. 879, pp. 219–233, MAY 26 2000.
- [21] A. Riaz, B. Kim, and D. Chung, "Capillary electrophoresis of trace metals in highly saline physiological sample matrices," *ELECTROPHORESIS*, vol. 24, pp. 2788–2795, AUG 2003.
- [22] A. Riaz and D. Chung, "Transient isotachopheresis of highly saline trace metals under strong electroosmotic flow conditions," *ELECTROPHORESIS*, vol. 26, pp. 668–673, FEB 2005.
- [23] H. Okamoto, A. Timerbaev, and T. Hirokawa, "Simultaneous determination of metal ions, amino acids, and other small biogenic molecules in human serum by capillary zone electrophoresis with transient isotachopheretic preconcentration," *JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE*, vol. 28, pp. 522–528, APR 2005.
- [24] L. Krivankova, P. Pantuckova, P. Gebauer, P. Bocek, J. Caslavská, and W. Thormann, "Chloride present in biological samples as a tool for enhancement of sensitivity in capillary zone electrophoretic analysis of anionic trace analytes," *ELECTROPHORESIS*, vol. 24, pp. 505–517, FEB 2003.

- [25] B. Jung, R. Bharadwaj, and J. Santiago, "Thousandfold signal increase using field-amplified sample stacking for on-chip electrophoresis," *ELECTROPHORESIS*, vol. 24, pp. 3476–3483, OCT 2003. 19th Annual Conference of the American-Electrophoresis-Society, INDIANAPOLIS, INDIANA, NOV, 2002.
- [26] B. Storey, B. Tilley, H. Lin, and J. Santiago, "Electrokinetic instabilities in thin microchannels," *PHYSICS OF FLUIDS*, vol. 17, JAN 2005.
- [27] G. Binyamin, *Plastic microfluidic devices : electrokinetic manipulations, life science applications, and production technologies, in Lab-on-a Chip : Miniaturized Systems. p. 83-112.*
- [28] A. MANZ, N. GRABER, and H. WIDMER, "MINIATURIZED TOTAL CHEMICAL-ANALYSIS SYSTEMS - A NOVEL CONCEPT FOR CHEMICAL SENSING," *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL*, vol. 1, pp. 244–248, JAN 1990. 5TH INTERNATIONAL CONF ON SOLID-STATE SENSORS AND ACTUATORS AND EUROSSENSORS 3 (TRANSDUCERS 89), MONTREUX, SWITZERLAND, JUN 25-30, 1989.
- [29] I. Rubinstein and B. Zaltzman, "Electro-osmotically induced convection at a permselective membrane," *PHYSICAL REVIEW E*, vol. 62, pp. 2238–2251, AUG 2000.
- [30] I. Rubinstein, B. Zaltzman, and O. Kedem, "Electric fields in and around ion-exchange membranes," *JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE*, vol. 125, pp. 17–21, MAR 5 1997.
- [31] M. Akeson, D. Branton, J. Kasianowicz, E. Brandin, and D. Deamer, "Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules," *BIOPHYSICAL JOURNAL*, vol. 77, pp. 3227–3233, DEC 1999.
- [32] J. Fu, R. B. Schoch, A. L. Stevens, S. R. Tannenbaum, and J. Han, "A patterned anisotropic nanofluidic sieving structure for continuous-flow separation of DNA and proteins," *NATURE NANOTECHNOLOGY*, vol. 2, pp. 121–128, FEB 2007.
- [33] J. Khandurina, S. Jacobson, L. Waters, R. Foote, and J. Ramsey, "Microfabricated porous membrane structure for sample concentration and electrophoretic analysis," *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 71, pp. 1815–1819, MAY 1 1999.
- [34] S. Song, A. Singh, and B. Kirby, "Electrophoretic concentration of proteins at laser-patterned nanoporous membranes in microchips," *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 76, pp. 4589–4592, AUG 1 2004.
- [35] R. Foote, J. Khandurina, S. Jacobson, and J. Ramsey, "Preconcentration of proteins on microfluidic devices using porous silica membranes," *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 77, pp. 57–63, JAN 1 2005.
- [36] A. V. Hatch, A. E. Herr, D. J. Throckmorton, J. S. Brennan, and A. K. Singh, "Integrated preconcentration SDS-PAGE of proteins in microchips using photopatterned cross-linked polyacrylamide gels," *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 78, pp. 4976–4984, JUL 15 2006.

-
- [37] A. Mani, T. A. Zangle, and J. G. Santiago, "On the Propagation of Concentration Polarization from Microchannel-Nanochannel Interfaces Part I : Analytical Model and Characteristic Analysis," *LANGMUIR*, vol. 25, pp. 3898–3908, MAR 17 2009.
- [38] T. A. Zangle, A. Mani, and J. G. Santiago, "On the Propagation of Concentration Polarization from Microchannel-Nanochannel Interfaces Part II : Numerical and Experimental Study," *LANGMUIR*, vol. 25, pp. 3909–3916, MAR 17 2009.
- [39] A. Plecis, C. Nanteuil, A.-M. Haghiri-Gosnet, and Y. Chen, "Electroconcentration with Charge-Selective Nanochannels," *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 80, pp. 9542–9550, DEC 15 2008.
- [40] Q. Pu, J. Yun, H. Temkin, and S. Liu, "Ion-enrichment and ion-depletion effect of nanochannel structures," *NANO LETTERS*, vol. 4, pp. 1099–1103, JUN 2004.
- [41] R. B. Schoch, *Transport phenomena in nanofluidics : from ionic studies to proteomic applications*. PhD thesis, EPFL, 2006.
- [42] S. M. Kim, M. A. Burns, and E. F. Hasselbrink, "Electrokinetic protein preconcentration using a simple glass/poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip," *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 78, pp. 4779–4785, JUL 15 2006.
- [43] A. Datta, S. Gangopadhyay, H. Temkin, Q. Pu, and S. Liu, "Nanofluidic channels by anodic bonding of amorphous silicon to glass to study ion-accumulation and ion-depletion effect," *TALANTA*, vol. 68, pp. 659–665, JAN 15 2006.
- [44] S. J. Kim, Y.-C. Wang, J. H. Lee, H. Jang, and J. Han, "Concentration polarization and nonlinear electrokinetic flow near a nanofluidic channel," *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, vol. 99, JUL 27 2007.
- [45] J. H. Lee, Y.-A. Song, and J. Han, "Multiplexed proteomic sample preconcentration device using surface-patterned ion-selective membrane," *LAB ON A CHIP*, vol. 8, no. 4, pp. 596–601, 2008.
- [46] A. Plecis, *Etude et contrôle de la charge de surface dans les dispositifs micro/nanofluidiques : nouveaux outils pour les sciences séparatives*. PhD thesis, Université Paris XI, 2008.
- [47] J. PERRAM, R. HUNTER, and H. WRIGHT, "CHARGE AND POTENTIAL AT OXIDE-SOLUTION INTERFACE," *CHEMICAL PHYSICS LETTERS*, vol. 23, no. 2, pp. 265–269, 1973.
- [48] S. Behrens and D. Grier, "The charge of glass and silica surfaces," *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*, vol. 115, pp. 6716–6721, OCT 8 2001.
- [49] G. PARKS, "ISOELECTRIC POINTS OF SOLID OXIDES SOLID HYDROXIDES AND AQUEOUS HYDROXO COMPLEX SYSTEMS," *CHEMICAL REVIEWS*, vol. 65, no. 2, pp. 177–&, 1965.
- [50] J. Overbeek, *Stability of hydrophobic colloids and emulsions*. In *Colloid Science*. 1952.
- [51] R. J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science*. 1981.

- [52] D. Stein, M. Kruithof, and C. Dekker, "Surface-charge-governed ion transport in nanofluidic channels," *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, vol. 93, JUL 16 2004.
- [53] A. Plecis, R. Schoch, and P. Renaud, "Ionic transport phenomena in nanofluidics : Experimental and theoretical study of the exclusion-enrichment effect on a chip," *NANO LETTERS*, vol. 5, pp. 1147–1155, JUN 2005.
- [54] D. M. P. Renaud, "Micro-machine device for fluids and method of manufacture," 06/11/2003.
- [55] H.-G. A.-M. NANTEUIL C., "Procédé de fabrication de puce microfluidique, puce et plaque associées," 2010.
- [56] J. McDonald, D. Duffy, J. Anderson, D. Chiu, H. Wu, O. Schueller, and G. Whitesides, "Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)," *ELECTROPHORESIS*, vol. 21, pp. 27–40, JAN 2000.
- [57] D. Mijatovic, J. Eijkel, and A. van den Berg, "Technologies for nanofluidic systems : top-down vs. bottom-up - a review," *LAB ON A CHIP*, vol. 5, no. 5, pp. 492–500, 2005.
- [58] M. Stern, M. Geis, and J. Curtin, "Nanochannel fabrication for chemical sensors," *JOURNAL OF VACUUM SCIENCE & TECHNOLOGY B*, vol. 15, pp. 2887–2891, NOV-DEC 1997. 41st International Conference on Electron, Ion, and Photon Beam Technology and Nanofabrication (EIBPN), DANA POINT, CALIFORNIA, MAY 27-30, 1997.
- [59] G. Cheng, D. Pirzada, and P. Dutta, "Design and fabrication of a hybrid nanofluidic channel," *JOURNAL OF MICROLITHOGRAPHY MICROFABRICATION AND MICROSYSTEMS*, vol. 4, JAN-MAR 2005.
- [60] J. Han and H. Craighead, "Separation of long DNA molecules in a microfabricated entropic trap array," *SCIENCE*, vol. 288, pp. 1026–1029, MAY 12 2000.
- [61] S. Bhattacharya, Y. Gao, V. Korampally, M. T. Othman, S. A. Grant, K. Gangopadhyay, and S. Gangopadhyay, "Mechanics of plasma exposed spin-on-glass (SOG) and polydimethyl siloxane (PDMS) surfaces and their impact on bond strength," *APPLIED SURFACE SCIENCE*, vol. 253, pp. 4220–4225, FEB 28 2007.
- [62] "Le collage moléculaire, une technique attractive," tech. rep., CEA.
- [63] S. JACOBSON, A. MOORE, and J. RAMSEY, "FUSED QUARTZ SUBSTRATES FOR MICROCHIP ELECTROPHORESIS," *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 67, pp. 2059–2063, JUL 1 1995.
- [64] G. WALLIS and POMERANT.DI, "FIELD ASSISTED GLASS-METAL SEALING," *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS*, vol. 40, no. 10, pp. 3946–&, 1969.
- [65] K. M. Knowles and A. T. J. van Helvoort, "Anodic bonding," *INTERNATIONAL MATERIALS REVIEWS*, vol. 51, pp. 273–311, OCT 2006.
- [66] P. DENEÉ, "LOW ENERGY METAL-GLASS BONDING," *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS*, vol. 40, no. 13, pp. 5396–&, 1969.

- [67] M. BOROM, "ELECTRON-MICROPROBE STUDY OF FIELD-ASSISTED BONDING OF GLASSES TO METALS," *JOURNAL OF THE AMERICAN CERAMIC SOCIETY*, vol. 56, no. 5, pp. 254–257, 1973.
- [68] K. ALBAUGH and D. RASMUSSEN, "RATE-PROCESSES DURING ANODIC BONDING," *JOURNAL OF THE AMERICAN CERAMIC SOCIETY*, vol. 75, pp. 2644–2648, OCT 1992.
- [69] R. Doremus, *Glass science*. 1994.
- [70] D. CARLSON, STOCKDAL.GF, and K. HANG, "ELECTRODE POLARIZATION IN ALKALI-CONTAINING GLASSES," *JOURNAL OF THE AMERICAN CERAMIC SOCIETY*, vol. 55, no. 7, pp. 337–&, 1972.
- [71] A. COZMA and B. PUERS, "CHARACTERIZATION OF THE ELECTROSTATIC BONDING OF SILICON AND PYREX GLASS," *JOURNAL OF MICRO-MECHANICS AND MICROENGINEERING*, vol. 5, pp. 98–102, JUN 1995. 5th European Workshop in MicroMechanics (MME 94), PISA, ITALY, SEP 05, 1994.
- [72] D. Lee, B. Ju, J. Jang, K. Lee, and M. Oh, "Effects of a hydrophilic surface in anodic bonding," *JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING*, vol. 9, pp. 313–318, DEC 1999.
- [73] D. Lee, Y. Lee, J. Jang, and B. Ju, "Glass-to-glass electrostatic bonding with intermediate amorphous silicon film for vacuum packaging of microelectronics and its application," *SENSORS AND ACTUATORS A-PHYSICAL*, vol. 89, pp. 43–48, MAR 20 2001.
- [74] S. S. L. J. W. Mayer, *Electronic Materials Science : For Integrated Circuits in SI and GaAs*. 1990.
- [75] P. Nitzsche, K. Lange, B. Schmidt, S. Grigull, U. Kreissig, B. Thomas, and K. Herzog, "Ion drift processes in pyrex-type alkali-borosilicate glass during anodic bonding," *JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY*, vol. 145, pp. 1755–1762, MAY 1998.
- [76] V. Kutchoukov, F. Laugere, W. van der Vlist, L. Pakula, Y. Garini, and A. Bossche, "Fabrication of nanofluidic devices using glass-to-glass anodic bonding," *SENSORS AND ACTUATORS A-PHYSICAL*, vol. 114, pp. 521–527, SEP 1 2004. 12th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS 03), BOSTON, MA, JUN 08-12, 2003.
- [77] T. Lee, D. Lee, C. Liaw, A. Lao, and I. Hsing, "Detailed characterization of anodic bonding process between glass and thin-film coated silicon substrates," *SENSORS AND ACTUATORS A-PHYSICAL*, vol. 86, pp. 103–107, OCT 30 2000.
- [78] G. Hsieh, C. Tsai, and W. Lin, "Anodic bonding of glass and silicon wafers with an intermediate silicon nitride film and its application to batch fabrication of SPM tip arrays," *MICROELECTRONICS JOURNAL*, vol. 36, pp. 678–682, JUL 2005. European Micro and Nano Systems Conference (EMN 04), Paris, FRANCE, OCT 20-21, 2004.

- [79] T. ANTHONY, "ANODIC BONDING OF IMPERFECT SURFACES," *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS*, vol. 54, no. 5, pp. 2419–2428, 1983.
- [80] G. WALLIS, "DIRECT-CURRENT POLARIZATION DURING FIELD-ASSISTED GLASS-METAL SEALING," *JOURNAL OF THE AMERICAN CERAMIC SOCIETY*, vol. 53, no. 10, pp. 563–&, 1970.
- [81] K. ALBAUGH, "ELECTRODE PHENOMENA DURING ANODIC BONDING OF SILICON TO SODIUM BOROSILICATE GLASS," *JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY*, vol. 138, pp. 3089–3094, OCT 1991.
- [82] S. Sassen, W. Kupke, and K. Bauer, "Anodic bonding of evaporated glass structured with lift-off technology for hermetical sealing," *SENSORS AND ACTUATORS A-PHYSICAL*, vol. 83, pp. 150–155, MAY 22 2000. 10th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, SENDAI, JAPAN, JUN 07-10, 1999.
- [83] W. Shih, C. Hui, and N. Tien, "Collapse of microchannels during anodic bonding : Theory and experiments," *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS*, vol. 95, pp. 2800–2808, MAR 1 2004.
- [84] Y. KANDA, K. MATSUDA, C. MURAYAMA, and J. SUGAYA, "THE MECHANISM OF FIELD-ASSISTED SILICON GLASS BONDING," *SENSORS AND ACTUATORS A-PHYSICAL*, vol. 23, pp. 939–943, APR 1990. 5TH INTERNATIONAL CONF ON SOLID-STATE SENSORS AND ACTUATORS AND EUROSENSORS 3, MONTREUX, SWITZERLAND, JUN 25-30, 1989.
- [85] A. van Helvoort, K. Knowles, and J. Fernie, "Characterization of cation depletion in pyrex during electrostatic bonding," *JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY*, vol. 150, pp. G624–G629, OCT 2003.
- [86] A. van Helvoort, K. Knowles, R. Holmestad, and J. Fernie, "Anodic oxidation during electrostatic bonding," *PHILOSOPHICAL MAGAZINE*, vol. 84, pp. 505–519, FEB 21 2004.
- [87] M. Fabbri and J. R. Senna, "Models of Ionic Transport for Silicon-Glass Anodic Bonding," *JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY*, vol. 155, no. 12, pp. G274–G282, 2008.
- [88] D. I. Pomerantz, "Anodic bonding," 1968.
- [89] S. Choi, W. Choi, Y. Lee, B. Ju, M. Sung, and B. Kim, "The analysis of oxygen plasma pretreatment for improving anodic bonding," *JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY*, vol. 149, pp. G8–G11, JAN 2002.

*Tout ou presque - les attentes des autres, l'orgueil, la peur de la honte ou de l'échec -,
toutes ces choses disparaissent face à la mort. Seul demeure ce qui est vraiment
important. Se souvenir que l'on va mourir est le meilleur moyen que je connaisse de ne
pas céder à la tentation stupide de croire que l'on a quelque chose à perdre*

- Steve JOBS -



Je suis né à la fin de ta vie active. Tu es parti à la fin de ma vie étudiante, comme pour mieux marquer la fin de ma vie d'enfant. Ta présence est désormais différente mais tu resteras en moi jusqu'à ce que je te rejoigne. Ce travail t'est dédié



