



HAL
open science

Dispositifs nanofluidiques à électro-préconcentration sélective

Sokhna Mery Ngom

► **To cite this version:**

Sokhna Mery Ngom. Dispositifs nanofluidiques à électro-préconcentration sélective. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS459 . tel-02612249

HAL Id: tel-02612249

<https://theses.hal.science/tel-02612249>

Submitted on 19 May 2020

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.

Dispositifs nanofluidiques à électro-préconcentration sélective

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°575 electrical, optical bio: physics and engineering
(EOBE)
Spécialité de doctorat : Physique

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 13/12/2019, par

Sokhna Mery NGOM

Composition du Jury:

Claire Smadja Professeur - Université Paris Saclay Institut Galien (UMR8612), Chatenay-Malabry	Présidente
Yong Chen Directeur de Recherche ENS (UMR8640), Paris	Rapporteur
Katia Grenier Chargée de recherches CNRS (LAAS), Toulouse	Rapporteuse
Jumana Boussey Directrice de Recherche CEA - LETI (LTM), Grenoble	Examinatrice
Anne-Marie HAGHIRI Directeur de Recherche CNRS (C2N-UMR9001), Palaiseau	Directrice de thèse
Jean GAMBY Chargé de Recherche CNRS (C2N-UMR9001), Palaiseau	Co-Encadrant de thèse
Isabelle LE POTIER Professeur - Université Paris Saclay (C2N-UMR9001), Palaiseau	Co-encadrant, Invitée
Stéphane GUILLET IR-CNRS, C2N-UMR9001	Invité

Titre : Dispositifs nanofluidiques à électro-préconcentration sélective

Mots clés : Nanofluidique, Nanofabrication, Electrophorèse sur puce, Chimie analytique

Résumé : Détecter des biomolécules à l'état de traces reste l'un des enjeux actuels des biopuces. Les dispositifs nanofluidiques apparaissent aujourd'hui comme une voie prometteuse pour simultanément concentrer et détecter des biomolécules. Cette électro-préconcentration est possible grâce au caractère de perméabilité sélective de la nanofente (ou du nanocanal), qui se comporte sous champ électrique comme un «super-filtre» moléculaire à perméabilité sélective. Ce nanofiltre permet de piéger les analytes en amont ou en aval de la fente, dans l'un ou l'autre des réservoirs (anodique ou cathodique).

Au cours de ce doctorat, j'ai développé et étudié des dispositifs nanofluidiques sur la base de deux géométries différentes : des nanofentes horizontales uniques et des réseaux de nanocanaux verticaux, dans une géométrie de code-barres.

Pour les nanofentes horizontales, j'ai étudié l'évolution de la conductance en fonction de la force ionique et de la géométrie de la nanofente. Sur la base d'un protocole d'électro-préconcentration assistée en pression, j'ai établi des diagrammes « champ électrique/pression » qui permettent de prédire l'obtention d'un point focal stable où les analytes vont se concentrer. J'ai étudié le rôle de la longueur de la nanofente sur l'observation de ce point focal pour deux molécules modèles, la fluorescéine et l'ovalbumine.

Pour les dispositifs à code-barres, j'ai mis au point un procédé de nanostructuration par lithographie électronique couplée à de la gravure profonde et un protocole de collage verre-verre. Les profils d'électropréconcentration obtenus pour différentes nanofentes au sein des codes-barres dynamiques permettent de discuter du rôle de la géométrie sur l'observation du point focal.

Title: Nanofluidics devices for selective electro-preconcentration

Keywords: nanofluidics, nanofabrication, on-chip electrophoresis, chemical analysis

Abstract: Detecting trace biomolecules remains one of the current challenges for biochips. Nanofluidic devices appear today as a promising way to simultaneously concentrate and detect biomolecules. This electropreconcentration is possible thanks to the selective permeability of the fluidic nanoslit, which behaves under electric field as a molecular selective "super-filter". This nanofilter makes it possible to trap the analytes upstream or downstream of the slot, in one or the other of the reservoirs (anodic or cathodic). During this Ph.D., I developed and studied nanofluidic devices based on two different geometries: single horizontal nanoslits and vertical nanochannel arrays, in a barcode geometry.

For horizontal nanoslits, I studied the evolution of the conductance as a function of the ionic strength and the nanoslit geometry. Based on a pressure-assisted electro-preconcentration protocol, I have established "electric field/pressure" diagrams allowing predicting stabilization of a focal point where the analytes will concentrate. I have studied the role of the nanoslit length for two model molecules, fluorescein and ovalbumin.

For barcode devices, I developed both a nanostructuration process by electron beam nanolithography coupled with deep etching and a glass-glass bonding protocol. The electropreconcentration profiles obtained for different nanofentes is discussed based on different dynamic barcodes.

Remerciements

Mes sincères remerciements s'adressent à tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'étudier ma thèse.

J'adresse mes premiers remerciements à ma directrice de thèse, Anne-Marie Haghiri-Gosnet, et à mon encadrant, Jean Gamby, pour la confiance qu'ils m'ont accordé depuis le début de mon parcours. À la suite d'un stage en 2016, ils m'ont donné la possibilité de découvrir le monde de la recherche. Je leur exprime ma profonde gratitude aussi pour l'encadrement de qualité qu'ils m'ont réservé, pour les conseils prodigués, les encouragements, la patience et l'attention avec laquelle ils ont contribué à la préparation de ce manuscrit. Ils ont toujours trouvé du temps pour moi malgré leur emploi du temps surchargé. Recevez en ces quelques lignes toutes les marques de ma reconnaissance. Je remercie également ma co-encadrante Isabelle Le Potier, qui a été très disponible et d'une très grande aide pour mener à bien ces travaux et pour l'élaboration de ce manuscrit.

Je remercie aussi Antoine Pallandre et Stéphane Guilet (mon professeur de Jujutsu et de gravure) qui ont été également de grands contributeurs à ces travaux. Ils n'ont pas hésité à se libérer et à m'apporter leur aide à chaque fois que j'ai été confronté à un problème. Je les considère comme mes encadrants. Je vous dis merci d'avoir relu mon manuscrit alors que vous n'étiez pas obligé et pour bien d'autres choses encore.

Je remercie tous les membres de l'équipe Biosys, car ils m'ont encouragé et aidé pendant ces trois années. Je remercie particulièrement Julie Lachaux (ma partenaire de conférence), Alisier Paris (qui a été d'une grande aide sur l'imprimante 3D), Choayb Omar (mon colocataire de bureau), Fatima Flores mon binôme de travail, François Damien Delapierre, Gilgueng Hwang, Bacem Zbiri, Claire Poujouly, Pedro G Losada ainsi que Bernard Bartenlian. Vous m'avez donné envie de continuer l'aventure après mon stage.

Je remercie chaleureusement le laboratoire C2N de m'avoir accueilli dans un cadre de travail dynamique et propice à l'apprentissage de la recherche scientifique. Mes remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe de l'atelier mécanique et plus particulièrement à mes deux collègues préférés du C2N, Sébastien Lebaut (Mr PIPIN) et Olivier Benaud qui me transfère toujours leurs bonnes humeurs car ils m'ont toujours aidé à la conception de mes « chip holders » en me remontant toujours le moral. Votre camerounaise préférée va vous manquer ...

Je remercie aussi tout l'équipe PIMENT particulièrement Edmond Cambрил car il a contribué à l'avancement des travaux en effectuant toutes les lithographies électroniques. Je remercie de passage Jean René Coudevylle qui m'a aussi dépanné certaines fois où Edmond était en vacances. Je remercie le grand technologue Christophe Dupuis, à qui je dis merci de m'accorder toujours son temps, de m'avoir formé au Magellan et au Bonder (qui t'a créé beaucoup de soucis...); tes conversations très intéressantes et drôles vont me manquer. J'en profite pour remercier Nathalie Bardou. Merci aussi à Abdelmounaim Harouri pour son aide, ses conseils et pour m'avoir donné pleins d'astuces pour le travail

Remerciements

en salle blanche malgré qu'il me lance toujours des piques☺, nos désaccords sur le sport et nos discussions vont me manquer. Je sais que je ne pourrais pas lister tout l'équipe PIMENT mais je ne saurais finir sans remercier David Bouville qui a toujours été disponible pour m'aider avec le sourire, Jean Claude Esnault qui était toujours disponible aussi et serviable, Laurent Couraud toujours disponible pour m'aider à effectuer des mesures AFM, à Alan Durnez, à Jean Luc Cercus, à Nathalie Isac, à Etienne Herth..... Merci à tous pour votre aide et soutien.

Je réserve ses quelques lignes aux équipes des ressources humaines et plus particulièrement à Melissa Legendre, Marina Ferreira, Sylvie Lamour et Lydia Andalon pour leur aide et leur disponibilité, et à toute l'équipe SI particulièrement Medhi Idouhamed, Alain Péan et Maxime Provenzano.

Je remercie aussi également Laoges Thao ainsi que Koro Sokhona pour leur aide, leur soutien et disponibilités.

Je remercie grandement ma famille pour le soutien moral et leur encouragement continu plus particulièrement ma petite sœur Aida, mon grand frère Elhadji ainsi que mes parents : Ibrahima Ngom et Adama Beye. Tous vos encouragements ont porté leurs fruits.

Je ne saurais terminer sans remercier Kemo Solly, qui a été une ressource sur le plan moral et pour les corrections.

Mes amis m'ont beaucoup soutenu tout au long de cette expérience. Je remercie particulièrement mes deux protectrices: Adjil et Zahra (mes anges gardiennes☺), ma meilleure Rokhy Sané, mes amies Floriane, Henri, Abdelnour (nos pauses café vont me manquer), Adrien, Anaïs, Baba Wagué, Sham, Khalifa, Mamour

Ces quelques lignes sont écrits en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux et celles qui ont contribué à la réalisation de ces travaux.

Dédicaces

Ce travail, je le dédie particulièrement à :

Ma mère Adama Beye et à mon père Ibrahima NGOM, qui sans eux je n'aurais pas reçu d'éducation et ne serait pas là aujourd'hui.

Mes frères et mes sœurs qui n'ont pas hésité à m'aider et m'encourager au mieux de leurs possibilités particulièrement mon grand frère Elhadji et ma petite sœur Aida, ils n'hésitent pas à me donner de la force pour continuer ce combat. Merci à Abdoulaye Sarr, Marietou Sarr, Ndeye Rama Sané, Ndeye Dioly NGOM et à Fatou Gueye Sarr.

A toute ma famille sans exception (les familles NGOM et BEYE).

Mon Bardefer, tu te reconnaitras 😊

A tous mes amis et toutes mes amies particulièrement à mes meilleurs amies Rokhy sané, Zahra Diop Cissé et Adjilou Diarra Diédhiou qui ont été toujours là

A tous ceux qui me sont chers.

Veillez trouver ici l'expression de mon estime et de ma profonde amitié

Et à toute ma grande famille C2N 😊

Je vous dis merci du fond du cœur

Remerciements	3
Dédicaces	5
Préambule	8
Chapitre 1 :	10
Etat de l’art de l’électropréconcentration en nanofluidique	10
I - Introduction à l’électrophorèse sur puce :	11
I.1- Les enjeux des Laboratoires sur puce	11
<i>I.1.1- La séparation</i>	13
<i>I.1.2- La détection</i>	15
I.2– Electrophorèse : charges de surfaces et flux mis en jeux	15
<i>I.2.1– charge de surface et rôle de la force ionique</i>	15
<i>I.2.2– Flux électro-osmotique</i>	18
<i>I.2.3 – flux électrophorétique</i>	19
II – L’électropréconcentration par ICP dans une nanofente – un filtre ionique sélectif :	20
II.1- Les différentes méthodes de préconcentration basées sur des phénomènes électrocinétiques .	20
II.2- Perméabilité sélective d’une nanofente	23
II.3- Electro-préconcentration - observation des points focaux :	27
III - l’électro-préconcentration assistée en pression	31
Chapitre 2 : Techniques Expérimentales	33
I – Description des bancs de mesures et des protocoles et techniques expérimentales utilisés	34
I.1 – : voltamétrie cyclique	34
<i>I.1.1 – : dispositif expérimental de mesure de conductance :</i>	34
<i>I.1.2 – : Description du protocole de voltamétrie cyclique : méthode de mesure de la conductance de la nanofente.</i>	35
I.2 – : Electropréconcentration :.....	37
<i>I.2.1 – : Dispositif expérimental d’électrophorèse :</i>	37
<i>I.2.2– Description du protocole d’électropréconcentration.</i>	38
Chapitre 3 : Les puces à nanofente unique horizontale	41
I – Description des puces à nanofente horizontale unique :	42
I.1 - La technologie « verre/verre » :.....	42
III- Mesures de conductance	43
III.1- : Mesures de conductances : étude des paramètres géométriques.....	45
<i>III.1.1 – : Rôle de la longueur de la nanofente L_n :</i>	45
III.2- Modélisation de la conductance globale à travers une nanofente horizontale	47
<i>III.2.1 – Modèle simplifié</i>	47

III.2.2 – Modèle amélioré (8 paramètres).....	49
III.1.3 – Modèle Complet - Modélisation de la conductance à travers une structure micro-Nano-Micro (MNM).....	53
IV – L'électropréconcentration assistée en pression : cas d'une molécule modèle – la Fluorescéine	63
IV.1 Observation expérimentale des trois régimes :.....	67
IV.1.1 – : Pour KCl:	67
IV.1.2 – Pour NaCl:.....	69
IV.2 - Diagrammes « champ E/contre-pression P » :.....	71
V – L'électropréconcentration assistée en pression : cas d'une protéine d'intérêt l'ovalbumine.....	72
Chapitre 4 : le « code-barres » à nanofentes verticales.....	74
I – Description de la puce « code-barres » intégrant des nanofentes verticales en parallèle :.....	75
II – Le procédé de micro/nanofabrication étape par étape :.....	78
III – Procédé ICP-RIE optimisé pour la gravure de SiO₂ :	81
III.1 – La gravure ionique réactive : paramètres, mécanismes et plasma inductif.....	82
III.1.1 – les paramètres fondamentaux : sélectivité et anisotropie	82
III.1.2 – Mécanismes : réactions chimiques	88
III.2 – La gravure ICP-RIE traditionnelle (protocole 1):.....	90
III.2.1 – La gravure du film de SiO ₂ avec le mélange SF ₆ /O ₂ /Ar (protocole 1) :.....	90
III.2.3 –Etude de l'ajout de CHF ₃ dans le mélange SF ₆ /Ar/O ₂ (protocole1) :.....	92
III.2.3 –La gravure du film de SiO ₂ avec le mélange SF ₆ /CH ₄ /Ar/O ₂ :	93
III.2.4 –Le protocole de gravure ICP-RIE optimisé :.....	98
IV –Optimisation du collage SiO₂-SiO₂:.....	99
V –Electropréconcentration assistée en pression avec les puces à nanofentes verticales – vers un code-barres nanofluidique	104
V.1 –Electropréconcentration assistée en pression de la fluorescéine	105
V.2 –Electropréconcentration assistée en pression de l'ovalbumine	108
Conclusion générale et perspectives	112
Perspectives	114
Références bibliographiques	116
Annexes.....	124
Annexe 1 – Mise au point de la gravure du masque d'Aluminium.....	124
A –Montage de l'échantillon et suivi en temps réel	124
B – La gravure chlorée du masque Al :	125
Annexe 2 – Synthèse des puces fabriquées	126

Préambule

Que sont les nanotechnologies ? Lors de son discours du 29 décembre 1959 à la société américaine de physique, Richard Feynman fut le premier à évoquer ce domaine qu'il a appelé 'l'infiniment petit'.¹ Ses idées ont commencé à être mises en pratique 20 ans plus tard, en 1981, avec l'invention des microscopes à effet tunnel et à force atomique permettant d'observer et d'interagir avec la matière à une échelle atomique ou subatomique. Depuis lors, les nanotechnologies ont connu une rapide expansion qui a permis un développement important de certains domaines de recherche du domaine des nanosciences, comme la nanoélectronique puis la nanofluidique. La nanofluidique apparaît aujourd'hui comme un domaine très novateur et prometteur de la bioanalyse.

Rappelons qu'en microfluidique dans des canaux de taille micrométrique, on observe une exaltation des effets de surface comparativement aux effets de volume. L'écoulement devient laminaire, sans turbulence et avec peu d'inertie, et l'existence d'un transfert de masse par convection rend les échanges thermiques et diffusifs plus rapides. Il est donc possible en microfluidique de réaliser des expériences avec des temps très courts de mise à l'équilibre (ou réactionnels) ce qui permet de multiplier les mesures avec un coût minime.

La nanofluidique est une science très jeune, elle est née vers les années 2000, et succède à la microfluidique. Elle correspond à une branche de la nanophysique qui étudie les écoulements dans des canaux fluidiques, dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nanomètres. A cette échelle de la centaine de nanomètres, qui correspond dans le même ordre de grandeur que la longueur de Debye pour des solutions salines de faible force ionique, le fluide est soumis à des phénomènes spécifiques liés à la charge de surface qu'il présente. Ceci génère un comportement spécifique de perméabilité sélective de la nanofente vis-à-vis de la charge des ions, comportement que nous mettrons à profit dans ces travaux de doctorat pour effectuer en une seule étape la séparation, la concentration et la détection de l'analyte d'intérêt. Grâce aux travaux de recherche menés en micro/nanofluidique au cours de ces dix dernières années, un grand nombre de domaines tels que le diagnostic médical précoce, le suivi thérapeutique, les menaces environnementales et les menaces bioterroristes, ont vu apparaître de nouveaux dispositifs portatifs à haute sensibilité et spécificité, dont certains commencent à être commercialisés.

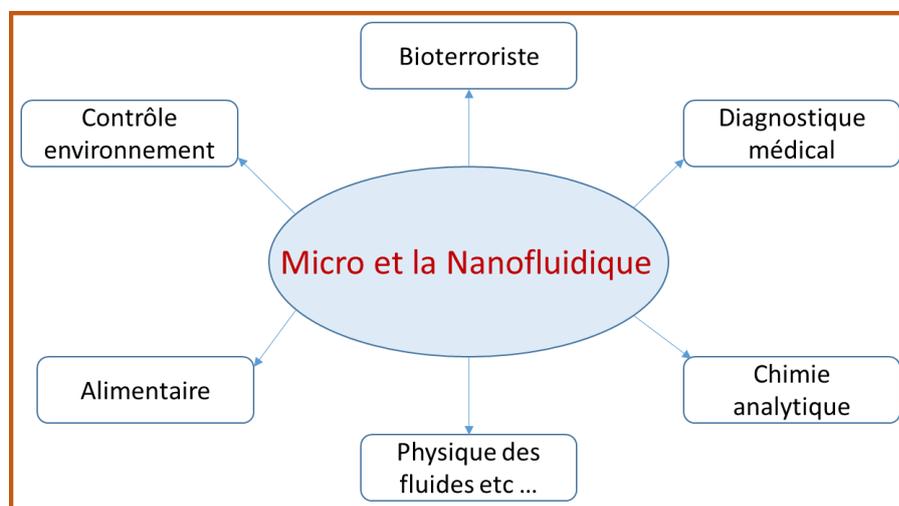


Figure 0 : Les différents domaines d'applications de la Micro/Nanofluidique

Dans le cadre de cette thèse, j'ai conçu plusieurs dispositifs nanofluidiques de géométries différentes et j'ai étudié leur réponse lors d'expériences d'électrophorèse assistée (ou non) en pression. J'ai principalement étudié cette réponse avec des solutions salines contenant des molécules modèles, dont le bi-anion Fluorescéine, la protéine Ovalbumine.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres :

- Le premier chapitre a pour but d'introduire le contexte général de mon travail de thèse en rappelant les notions de base de l'électropréconcentration, puis en décrivant l'état de l'art de cette méthode analytique en nanofluidique d'après les travaux menés à l'international depuis les années 2000.
- Le deuxième chapitre décrit les techniques expérimentales utilisées et les bancs de mesures expérimentaux (banc pour les mesures de conductance et banc d'électropréconcentration assistée en pression).
- Le troisième chapitre s'intéresse aux phénomènes observés pour des puces conventionnelles à nanofente horizontale unique de grande largeur (100 μ m) : j'y rapporterai mes expériences de mesures de conductance en fonction de la force ionique de la solution saline (sel de fond), puis les expériences menées en électropréconcentration « assistée en pression » pour des analytes modèles, la fluorescéine et l'ovalbumine, diluées dans ce sel de fond. J'y étudie principalement le rôle de la longueur de la nanofente sur la position du point focal de concentration et j'y rapporte des diagrammes « champ électrique/pression additionnelle » originaux qui permettent de prédire la nature du point focal (propageant, stable, etc...).
- Le quatrième chapitre étudie l'électro-préconcentration assistée en pression dans des puces à géométrie originale, appelée « code-barres ». Cette géométrie permet d'intégrer des séries de nanofentes verticales, obtenues par nanolithographie électronique couplée à de la gravure ICP/RIE en mode pulsé. La première partie du chapitre décrira la mise au point du procédé technologique de nanostructuration des lames de verre et la mise au point du collage. La deuxième partie du chapitre traitera aussi le rôle de la géométrie des nanofentes verticales sur la localisation des points focaux avec les mêmes molécules modèles que celles étudiées précédemment
- Enfin, le dernier chapitre de conclusion et de perspectives résumera les principaux résultats obtenus et proposera :
 - 1/ un nouveau procédé de fabrication rapide et à bas coût de puces « codes-barres » et
 - 2/ une expérience de détection d'ADN que je souhaite réaliser dans un milieu biologique plus pertinent que les solutions modèles, c'est-à-dire avec du sérum humain dilué dans NaCl.

« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées. »

*Marie Curie
Physicienne, Scientifique (1867 - 1934)*

Chapitre 1 : Etat de l'art de l'électropréconcentration en nanofluidique

Ce premier chapitre a pour but d'introduire le contexte général de mon travail de thèse autour de l'électrophorèse dans des dispositifs intégrant des nanocanaux.

La première partie de ce chapitre introduit les bases de l'électrophorèse sur puce, avec les notions de charge de surface dans la double-couche qui s'établit à la surface du verre immergé dans une solution saline. Ce chapitre se poursuit avec l'introduction du rôle de la nanofente qui se comporte comme un filtre à perméabilité sélective.

Après avoir rapporté les travaux effectués à l'international sur ce sujet, je décrirais le protocole d'électro-préconcentration assistée en pression qui permet d'obtenir des points focaux stables dans les réservoirs intermédiaires en amont et en aval du nanocanal. C'est ce protocole, que j'étudierai de manière détaillée dans les chapitres 3 et 4 expérimentaux.

I - Introduction à l'électrophorèse sur puce :

I.1- Les enjeux des Laboratoires sur puce

Depuis les années 1950, le développement des micro-nanotechnologies a permis l'évolution de la micro/nanoélectronique en augmentant les performances des dispositifs tout en réduisant leur coût. Au cours des trente dernières années, certains outils technologiques de micro/nanofabrication ont pu être appliqués à des domaines autres que les domaines classiques de la microélectronique, la nanospintronique ou la nanophotonique, à l'instar de la bioanalyse. Les progrès techniques en miniaturisation ont ainsi permis le développement de dispositifs d'analyse chimique performants pour le biomédical. Rappelons que les premiers projets de recherche sur la manipulation de liquides pour l'analyse ont démarré grâce au développement de la chromatographie en phase gazeuse, de la chromatographie en phase liquide à haute pression^{2,3} et de l'électrophorèse capillaire.⁴ Ces techniques ont révolutionné l'analyse chimique, car elles permettent d'analyser de petits volumes d'échantillons tout en conservant de hautes sensibilités et spécificités de détection de l'analyse.

La technologie microfluidique a permis de faire avancer la recherche fondamentale dans le domaine du diagnostic médical. Son évolution décrite dans la Figure 1.1 ci-dessous montre que, depuis les premières phases de commercialisation des dispositifs pour le diagnostic précoce de maladies dans les années 2000, cette science s'ouvre à d'autres applications pour le médical, comme le suivi thérapeutique personnalisé du patient.^{2,5} Le premier dispositif microfluidique d'analyse chimique a été développé par Terry et coll.^{6,7}, qui ont utilisé des techniques classiques de photolithographie, d'oxydation et de gravure chimique pour réaliser des puces d'électrophorèse sur silicium. Le concept de « laboratoire sur puce », appelé « Lab-on-a-Chip » en anglais (LOC) a été proposé par Manz et coll. en 1990⁸ et appliqué d'abord à des systèmes microfluidiques de chromatographie liquide sous haute pression, ainsi qu'à l'électrophorèse capillaire microfluidique en 1992.⁴ Ce dispositif devrait, à terme, être capable de réaliser toutes les différentes étapes d'une analyse, depuis la préparation de l'échantillon jusqu'à la détection finale de l'analyte (Figure 1.1B). Depuis les travaux de Manz qui ont véritablement introduit le concept de LOC, le développement et l'intérêt que suscitent les laboratoires sur puce n'ont cessé d'augmenter.

Si ces microsystèmes ouvrent de nouvelles voies pour la recherche médicale, ils offrent aussi de nouvelles perspectives dans d'autres domaines, tels que le contrôle sanitaire ou la protection de l'environnement. Un tel « laboratoire sur puce », que nous appellerons LOC par la suite, est un dispositif intégré rassemblant, sur un substrat miniaturisé, une ou plusieurs fonctions dont :

- La manipulation et le mélange des fluides
- La préparation de l'échantillon
- La séparation des analytes composant la solution
- La détection de l'analyte intéressé

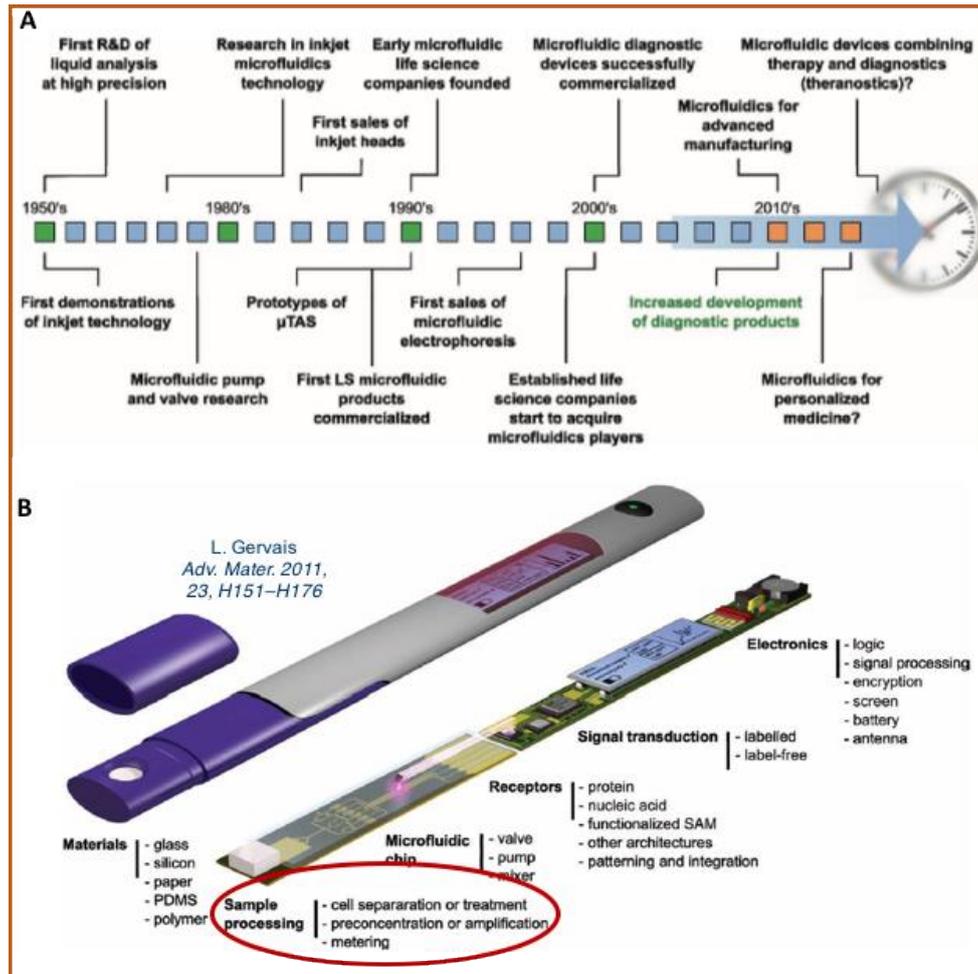


Figure 1.1 : A) Evolution temporelle de la microfluidique⁵ B) schéma d'un Laboratoire sur puce du futur selon Gervais et coll².

Les principaux avantages de ces dispositifs sont nombreux. Ils permettent d'économiser des réactifs et l'échantillon à analyser puisque le volume injecté est le plus souvent inférieur à $1\mu\text{l}$, et d'augmenter le gain en performances tout en diminuant les coûts. Dans le cadre de prélèvements d'échantillons rares de patients tels que les prématurés, les nouveau-nés, les adultes souffrant d'anémie et les personnes âgées⁹, ces dispositifs sont donc très pertinents. Pour que l'analyse soit pertinente avec peu de faux positifs, elle devra être réalisée de manière parallèle dans un grand nombre de canaux fluidiques indépendants : on parle d'analyse multiplexe sur un ou plusieurs biomarqueurs d'intérêt. Ces mesures multiplexées réalisées sur puce, sous flux, pourront identifier et quantifier plusieurs biomarqueurs (ADN ou protéine) de manière très spécifique. Les résultats quantitatifs pour chaque biomarqueur seraient obtenus en quelques minutes. La limite de sensibilité se situerait dans une plage de concentration en analyte allant du picomolaire au femtomolaire. La Figure 1.1.B montre une vue conceptuelle d'un tel système LOC de diagnostic idéal d'après Gervais et al.²

Je montrerai au cours de cette thèse que la technique d'électrophorèse au sein de dispositifs nanofluidiques permet de réaliser, en une seule étape, la séparation, la concentration et la détection du biomarqueur grâce aux propriétés exceptionnelles de perméabilité des nanocanaux. Avant de présenter ce dispositif nanofluidique, j'introduirai de manière générale les deux étapes essentielles pour l'obtention d'une préconcentration rapide et fiable, au sein du LOC qui sont : la séparation et la détection.

I.1.1- La séparation

Il existe de très nombreuses techniques de séparation d'analytes ou de biomolécules. Elles sont classées en deux grandes familles, la chromatographie et l'électrophorèse.

A – La Chromatographie

L'origine du mot chromatographie pourrait venir de la séparation de composés colorés puisque chroma en grec, signifie couleur et graphie signifie écrire.¹⁰ La chromatographie est une méthode physico-chimique qui sert à séparer les différentes substances présentes dans un mélange ou dans un échantillon en phase homogène liquide/liquide ou hétérogène liquide/solide. Le principe est basé sur les différences d'affinité des composés du mélange avec la phase stationnaire et la phase mobile. L'échantillon à analyser contenant une ou plusieurs espèces est entraîné par un courant de phase mobile au contact d'une phase solide stationnaire. Chaque espèce présente migre à une vitesse qui dépend de ses caractéristiques propres et de celles des deux phases en présence. On distingue la chromatographie en phase liquide et la chromatographie en phase gazeuse.

❖ La chromatographie en phase liquide :

On distingue cinq techniques différentes qui sont :

- **La chromatographie sur colonne (CPL)** est fondée principalement sur des phénomènes d'adsorption. La phase stationnaire remplit une colonne de longueur et de section variables. Le mélange, en solution très concentrée, est déposé au sommet de la colonne. La séparation des constituants du mélange résulte de l'écoulement continu d'un éluant à travers la colonne par gravité. Dans la technique classique, l'éluant est un solvant unique mais on peut accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des constituants du mélange.¹⁰
- **La chromatographie par échange d'ions** sépare les molécules selon leurs groupes chargés respectifs. Les ions de l'analyte subissent des interactions ioniques avec des charges opposées fixées sur la phase stationnaire, ce qui entraîne leur rétention. La phase stationnaire en question est constituée d'une matrice immobile qui contient des groupes fonctionnels chargés. Le développement de la technique a commencé au milieu des années 1970, lorsque l'on a découvert que des mélanges d'anions et de cations pouvaient être séparés à l'aide de colonnes CLHP (Chromatographie en phase liquide à haute performance) constituées de résines échangeuses de cations ou d'anions.¹¹
- **La chromatographie sur gel perméable** permet de séparer des macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique (de leur taille et de leur forme). Elle est notamment utilisée pour faire l'étude de polymères.¹² Il est utilisé des granules de gels poreux, dont les pores ont une taille voisine de celle des molécules des composés. La séparation résulte de la différence de taille est fondée sur la possibilité de soluté à pénétrer ou de ne pas pénétrer à l'intérieur des pores de la phase stationnaire (limite d'exclusion). Certaines molécules de l'échantillon sont assez petites pour pénétrer dans la matrice poreuse, tandis que les plus grandes restent dans le volume interstitiel de la phase stationnaire.
- **La chromatographie sur papier (CP)** est basée sur la différence d'affinité de deux phases : 1/ la phase stationnaire qui est constituée par l'eau qui est absorbée par la cellulose du papier ou qui est liée chimiquement à elle et 2/ la phase mobile qui est le plus souvent un solvant organique. L'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier et le solvant qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité.¹⁰ En général, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui

forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement.

- **La chromatographie sur couche mince (CCM).** La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

❖ La chromatographie en phase gazeuse :

La chromatographie en phase gazeuse quant à elle est applicable aux composés gazeux ou susceptible d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition. La phase mobile est un gaz, ce fluide traverse une colonne renfermant des granulés poreux qui constitue la phase stationnaire. Lorsqu'un échantillon à analyser est injecté et vaporisé, ces constituants sont entraînés à des vitesses inégales par la phase mobile. A la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur.

B – L'Electrophorèse

La technique de séparation qui nous intéresse et que l'on utilisera dans nos travaux est l'électrophorèse. C'est une méthode multicritère mettant en jeu plusieurs paramètres indépendants. En 1809, F. Ruess fut le premier à observer le phénomène de migration de particules en appliquant un champ électrique.¹³ C'est grâce à la miniaturisation des dispositifs que l'avènement de cette technique a pu devenir réel. Les premiers exemples d'électrophorèse capillaire dans des puces microfluidiques furent rapportées par Jorgenson et Lukacs.^{14,15} L'électrophorèse est une méthode de séparation des particules et molécules (ou analytes) en fonction de leur charge électrique et de leur taille. La séparation se fait par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Il existe plusieurs méthodes d'électrophorèse :

- L'électrophorèse isoélectrique capillaire
- L'électrophorèse sur gel
- L'électrophorèse bidimensionnelle
- L'électrophorèse sous champs pulsés
- L'immunoélectrophorèse
- L'électrophorèse en zone capillaire

Nous avons utilisé dans nos travaux l'électrophorèse en zone capillaire, dont le principe est basé sur l'utilisation d'un tube (appelé capillaire à l'échelle macroscopique). Les deux extrémités de ce capillaire sont plongées dans des réservoirs entre lesquels il est possible d'appliquer une différence de potentiel à l'aide d'un générateur de tension externe. Après injection de l'analyte aux entrées du capillaire, on parvient à faire migrer l'analyte grâce à l'application d'un champ électrique. Les paramètres importants qui interviennent sont la taille et la charge de l'analyte. Les flux mis en jeu lors de cette migration seront expliqués en détails dans les sections à venir (**Section I.2**).

I.1.2- La détection

Après avoir séparé les analytes de notre échantillon, il faut procéder à l'étape de détection. Pour détecter tous les composants d'un échantillon avec une grande sensibilité, il existe diverses techniques de détection qui sont classées en trois catégories : la détection optique, la détection mécanique et la détection électrique. Ces trois méthodes peuvent utiliser des marqueurs fluorescents ou non. On parle de détection avec marquage, si une molécule marquante (appelée « tag » en anglais) comme la fluorescéine a été greffée avant l'analyse sur le biomarqueur d'intérêt. On parlera de détection sans marquage (« label-free » en anglais) si l'analyte étudié est détecté directement sans aucune étape de marquage. Dans ce cas, cette détection se fait par reconnaissance moléculaire qui impose l'utilisation d'un capteur (optique, électrochimique ou mécanique) complété par une étape de préfonctionnalisation chimique du capteur par une molécule « sonde ».

Dans nos travaux nous avons utilisé la détection avec marquage par fluorescence.

Pour le marquage de nos analytes, nous avons utilisé l'immunofluorescence, qui est une technique d'immunomarquage qui utilise soit des anticorps (ou immunoglobulines), soit des fluorochromes. L'immunofluorescence directe utilise un anticorps dirigé contre la molécule recherchée et couplé à un fluorochrome. Dans le cas de l'immunofluorescence indirecte, deux anticorps sont utilisés : l'anticorps primaire qui est dirigé contre l'antigène recherché, puis un deuxième anticorps, marqué lui aussi par un fluorochrome, et possédant une haute affinité vis-à-vis de l'anticorps primaire.

Le principe de la fluorescence est le suivant : après excitation par une onde incidente, les molécules émettent de la fluorescence en se désexcitant à une longueur d'onde différente de la longueur d'onde d'excitation. Lors de son retour à un état d'équilibre, la molécule restitue une énergie qui est plus faible que celle absorbée, à cause du passage par un ou plusieurs niveaux énergétiques intermédiaires. Cette technique est très sensible, mais nécessite de marquer les molécules en amont de la détection. Elle implique aussi l'utilisation d'équipements suffisamment sensibles pour l'acquisition des images.

I.2- Electrophorèse : charges de surfaces et flux mis en jeu

Pour rappel l'électrophorèse en zone capillaire est une technique de séparation dont le principe est basé sur l'utilisation d'un capillaire en verre. Les deux extrémités de ce capillaire sont plongées dans des réservoirs entre lesquels, il est possible d'appliquer une différence de potentiel à l'aide d'un générateur de tension externe. Après injection de l'analyte aux entrées du capillaire, on parvient à faire migrer l'analyte grâce à l'application d'un champ électrique. La charge de surface étant l'un des paramètres clé de cette technique, nous allons voir, dans ce qui suit, comment elle influence les flux dans le système et, comment elle permet la séparation des biomolécules.

I.2.1- charge de surface et rôle de la force ionique

Les charges à l'interface liquide/solide gouvernent les phénomènes électrocinétiques observés en électrophorèse et, plus particulièrement, en électrophorèse au sein de puces micro/nano fluidiques.^{16,17,18} Il est donc nécessaire de rappeler les notions physico-chimiques de base du

phénomène de concentration sous champ, en commençant par expliquer les phénomènes interfaciaux de charge de surface, ainsi que les phénomènes électrocinétiques mises en jeux lors de l'application d'un champ électrique.

Le verre qui est le matériau de nos dispositifs nanofluidiques présente une surface chargée négativement lorsqu'il est plongé dans une solution aqueuse ou dans un sel comme KCl ou NaCl. En effet, à pH modéré (ou élevé), les groupements silanols situés à la surface à l'interface solide-liquide¹⁹ sont ionisés négativement comme dans l'exemple de l'équation 1.1 à un pH très faible : $2.5 \cdot 10^{-3}$.

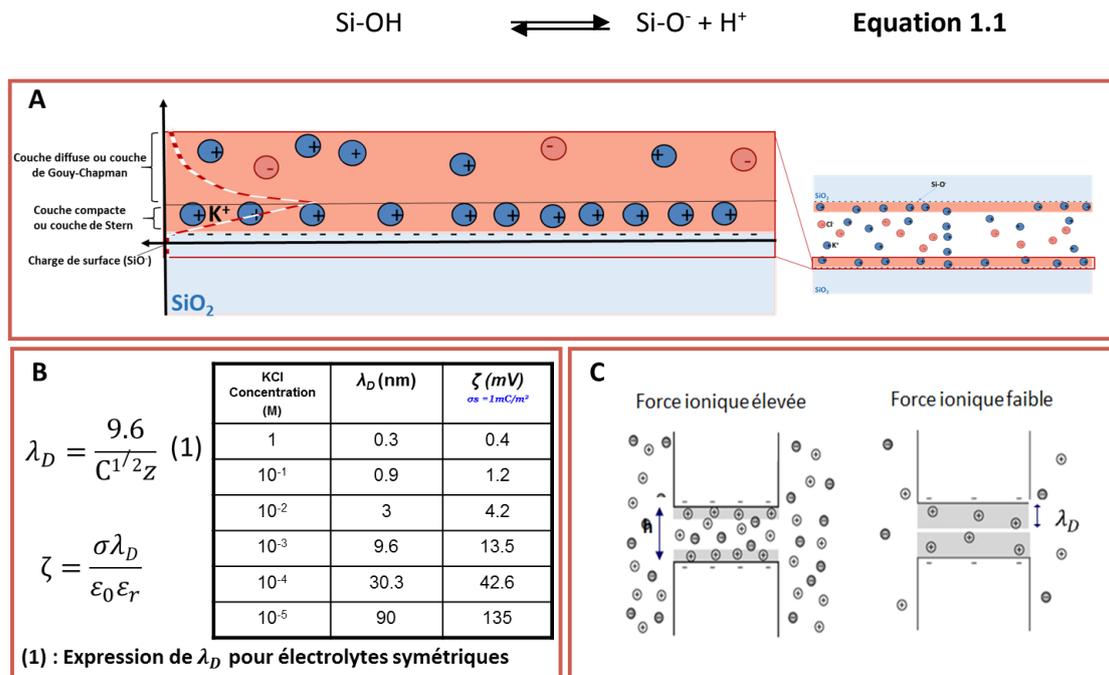


Figure 1.2: A) Phénomènes physiques à l'interface du verre et rôle de la charge de surface à l'interface verre-liquide, B) Valeurs de la longueur de Debye et du potentiel zêta en fonction de la concentration en sel de fond et c) mise en évidence de la variation de la longueur de Debye en fonction de la force ionique²⁰

Pour assurer l'électro-neutralité, une partie des cations présents dans la solution vont migrer vers l'interface et former une double couche électrique, appelée EDL (Electric Double Layer) en anglais. Celle-ci est constituée de deux couches : une couche compacte, appelée aussi couche de Stern, où les cations sont immobiles ; et une couche mobile (ou diffuse) appelée couche de Gouy-Chapman où tous les ions sont mobiles et vont pouvoir se déplacer sous l'effet du champ électrique.²¹ Le plan entre ces deux couches est appelé le « plan de glissement ou de cisaillement », c'est le plan qui sépare la couche compacte et la couche diffuse. La couche diffuse, chargée de manière opposée à la surface, écrante progressivement la charge de surface jusqu'à retrouver une neutralité locale dans l'électrolyte, loin de l'interface liquide solide. Le potentiel au niveau du plan de glissement est appelé « potentiel zêta » et est noté ζ . Pour un sel monovalent, il est lié à la densité de charge de surface σ_s par l'équation de Grahame :

$$\sigma_s = \sqrt{8C_{bulk}\epsilon k_B T} \sinh\left(\frac{e\zeta}{2k_B T}\right) \quad \text{Equation 1.2}$$

avec :

C_{bulk} : la concentration de solution en volume, s'exprime en ions/m³
 ϵ : la permittivité de la solution, exprimée en F/m

- T : La température, exprimée en kelvin (K)
e : La charge de l'électron, qui s'exprime en coulomb (C)
 ζ : le potentiel zêta (V)
 K_b : La constante de Boltzmann (J/k)

La distance nécessaire pour écranter la charge de surface est définie comme étant la longueur de Debye (λ_D), et elle est définie par:

$$\lambda_D = \sqrt{\left(\frac{\epsilon k_B T}{2e^2 C_{Bulk}}\right)} \quad \text{Equation 1.3}$$

Elle peut être obtenue grâce à l'équation de Poisson-Boltzmann :

$$\nabla^2 \overline{\Phi}(x) = \frac{1}{\lambda_D^2} \overline{\Phi}(x) \quad \text{Equation 1.4}$$

où $\overline{\Phi}(x)$ est le potentiel électrique local.

On peut relier la longueur de Debye et le potentiel Zêta grâce à la relation :

$$\sigma_s = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta}{\lambda_D} \quad \text{Equation 1.5}$$

avec σ_s est la densité de charge de surface

La longueur de Debye λ_D et le potentiel zêta ζ varient avec la force ionique comme le montre le tableau de la Figure 1.2B. En effet, plus la force ionique est faible, plus l'épaisseur de la couche diffuse est grande (images B et C de la Figure 1.2B). L'image C de la Figure 1.2 schématise les deux couches diffuses face-à-face dans un nanocanal (images extraites de la référence ²⁰). On y observe qu'à très faibles forces ioniques un recouvrement des deux double-couches est possible. Ce recouvrement conduit à une quasi-exclusion des co-ions dans le nanocanal. Le terme « d'exclusion ionique » est employé pour décrire ce phénomène. Comme discuté par Zangle et coll., nous verrons plus loin que l'exclusion ionique peut aller jusqu'à des hauteurs du nanocanal égale à 10 fois la longueur de Debye λ_D . ²² Le schéma de la Figure 1.2-C de droite n'est donc pas une représentation exacte.

Nous essayerons dans le chapitre 2 d'étudier le comportement de ces charges de surfaces par voltamétrie cyclique. Dans ce qui suit, il conviendra de décrire le comportement des charges de surface à l'interface liquide-verre quand on applique un champ électrique et les conséquences que cela aura sur les flux mis en jeux.

I.2.2- Flux électro-osmotique

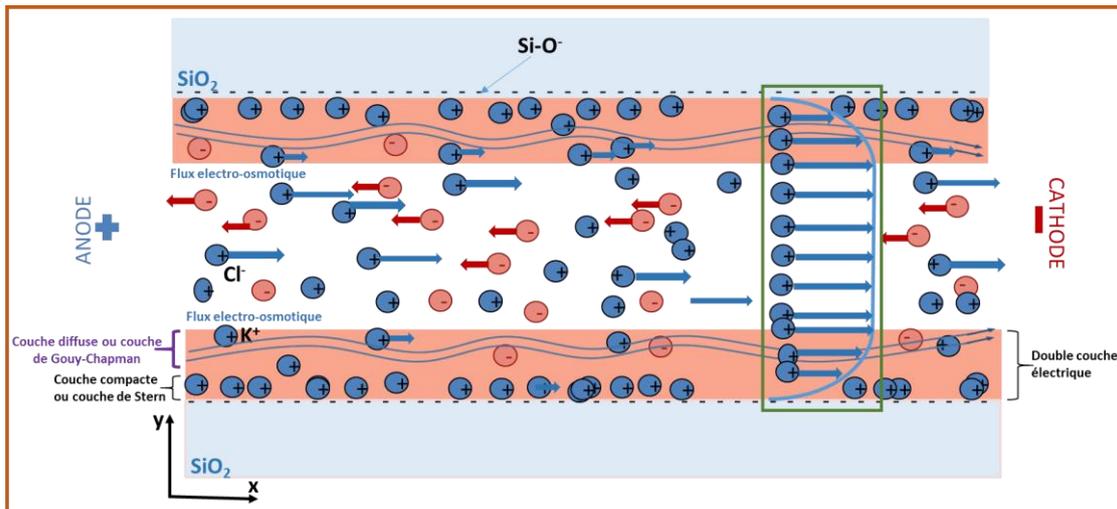


Figure 1.3: Flux électro-osmotique induit par le déplacement de la couche diffuse sous l'effet d'un champ électrique, déplacement du flux « comme un tapis roulant » de l'anode vers la cathode.

Comment se comportent les ions mobiles de la double-couche EDL, si on applique un champ électrique sur la solution saline? Sous l'application d'un champ électrique transverse d'un bout à l'autre du capillaire (ou du canal microfluidique), les cations de la couche compacte ne peuvent pas migrer. Par contre, les cations de la couche diffuse vont se déplacer de l'anode vers la cathode et entraîner avec eux tout le fluide, comme illustré sur la Figure 1.3. C'est ce déplacement qui peut être comparé à celui d'un tapis roulant. Ce mouvement de fluide est connu sous le nom de flux électroosmotique (J_{EOF}). L'écoulement du liquide est de type « bouchon », c'est-à-dire que la vitesse du liquide est constante sur une majorité du canal, comme illustré dans la Figure 1.3 encadré. Il existe une relation entre la vitesse du fluide et le potentiel zêta ζ qui est la suivante :

$$\vec{v} = -\varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\zeta}{\eta} \vec{E} \quad \text{Equation 1.6}$$

avec : ε_0 : la permittivité du vide
 ε_r : la constante diélectrique du milieu
 ζ : le potentiel zêta
 η : la viscosité du milieu

A force ionique élevée, lorsque la double-couche est très fine, la vitesse électroosmotique est définie comme étant **la valeur limite au centre du capillaire où le potentiel électrique est nul**. Cette vitesse est donnée par l'expression « Helmholtz-Smoluchowski » :

$$\vec{v}_{EOF} = -\varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\zeta}{\eta} \vec{E} = \mu_{EOF} \vec{E} \quad \text{Equation 1.7}$$

avec μ_{EOF} : la mobilité electro-osmotique définie par $\mu_{EOF} = -\varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\zeta}{\eta}$

Si la double couche est non négligeable par rapport à la section du microcanal, on peut considérer l'équation « Helmholtz-Smoluchowski » comme suit :

$$\vec{v}_{EOF} = -\varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\zeta_{app}}{\eta} \vec{E} \quad \text{Equation 1.8}$$

$$\text{avec } \zeta_{app} = \frac{1}{h} \int_0^h (\Phi(y) - \zeta) dy \quad \text{Equation 1.9}$$

avec ζ_{app} représente le potentiel moyen entre les deux doubles couches.

En considérant l'équation 1.7, on observe que la vitesse électroosmotique est proportionnelle au champ électrique dans le microcanal (à la tension appliquée) et au potentiel zêta ζ à l'interface solide-liquide. On peut donc contrôler la vitesse électroosmotique en jouant sur le champ électrique et/ou sur le potentiel zêta.

1.2.3 – flux électrophorétique

Introduisons maintenant notre analyte chargé négativement dans l'électrolyte de fond. Sous l'action du champ électrique, cet analyte chargé subit une migration qui correspond au phénomène de mise en mouvement, connu sous le nom de flux électrophorétique (J_{EP}). La vitesse électrophorétique (\vec{v}_{EP}) est donnée par la relation suivante :

$$\vec{v}_{EP} = \mu_{EP} \vec{E} \quad \text{Equation 1.10}$$

avec μ_{EP} : la mobilité électrophorétique de l'analyte définie par :

$$\mu_{EP} = \frac{z}{6\pi\eta r} \quad \text{Equation 1.11}$$

où z est la charge de l'analyte

η est la viscosité du liquide

r est le rayon moyen de la molécule

Pour conclure, il existe donc une compétition entre ces deux forces, la force électroosmotique et la force électrophorétique qui s'opposent dans le cas d'un analyte chargé négativement. L'analyte va subir ces deux flux (électroosmotique et électrophorétique) et la vitesse totale sera donc donnée par la relation suivante :

$$\vec{v} = \vec{v}_{EOF} + \vec{v}_{EP} = (\mu_{EOF} + \mu_{EP}) \vec{E} \quad \text{Equation 1.12}$$

Le flux électrophorétique est ainsi lié à la mobilité spécifique de l'analyte. Le but d'une séparation électrophorétique est d'utiliser la différence de mobilité des analytes pour pouvoir les séparer et de les détecter. De ce fait, si on a plusieurs analytes dans une puce, on pourra les séparer grâce à leur différence en mobilité et /ou en charge.

Dans le cas de nos puces nanofluidiques, nous verrons plus loin qu'il est possible de trouver des conditions expérimentales où ces deux flux (flux électroosmotique J_{EOF} et le flux électrophorétique J_{EP}) s'opposent parfaitement, créant un point focal où l'analyte est immobile. Ce dernier peut donc se préconcentrer localement au point focal au cours du temps. Cette technique de séparation et de détection est connue sous le nom d'électro-préconcentration par polarisation de la concentration en ions (ICP pour Ions Concentration Polarization en anglais) de la solution saline de fond. Nous reviendrons plus en détail sur cette méthode dans la section suivante. Il est important de souligner

que nous utiliserons ces conditions de concentration au point focal tout au long des expériences décrites plus loin dans la thèse.

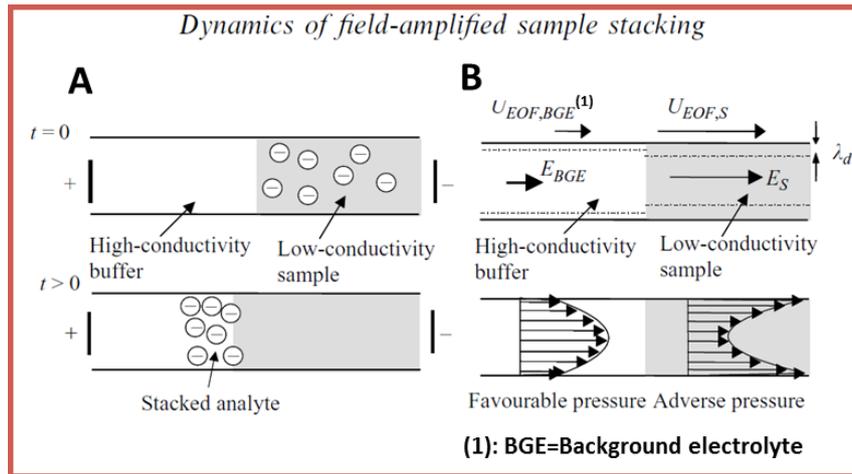
II – L'électropréconcentration par ICP dans une nanofente – un filtre ionique sélectif :

Dans le domaine de l'analyse biochimique, les laboratoires sur puce (LOC) doivent aujourd'hui relever le défi de maintenir un bon niveau en sélectivité, tout en diminuant fortement la concentration d'analyte. Les sensibilités de détection atteignent donc le domaine du picomolaire, voire le femtomolaire. On parle de détection d'ultra-traces. Pour effectuer une analyse complexe pour le diagnostic médical précoce, il est essentiel de coupler une bonne séparation à une détection spécifique sensible². Les méthodes de séparation consistant à contrôler la localisation spatiale de l'analyte dans le fluide au fil du temps^{23,24,25,26,27} peuvent souffrir d'un manque de sensibilité s'il n'y a pas de préconcentration en amont. Développer de nouvelles solutions pour la préconcentration des analytes dans les dispositifs fluidiques bioanalytiques reste donc une nécessité. Pour remédier à ce problème, de nombreuses techniques de focalisation basées sur des phénomènes électrocinétiques ont été proposées, parmi lesquelles : la polarisation de la concentration en ions^{28,29,30,22,31,32}, le FASS (Field Amplified Sample Stacking)^{16,33,34,35}, la concentration en gradient de concentration³⁶ et la focalisation isoélectrique.^{37,16,38,39}

II.1- Les différentes méthodes de préconcentration basées sur des phénomènes électrocinétiques

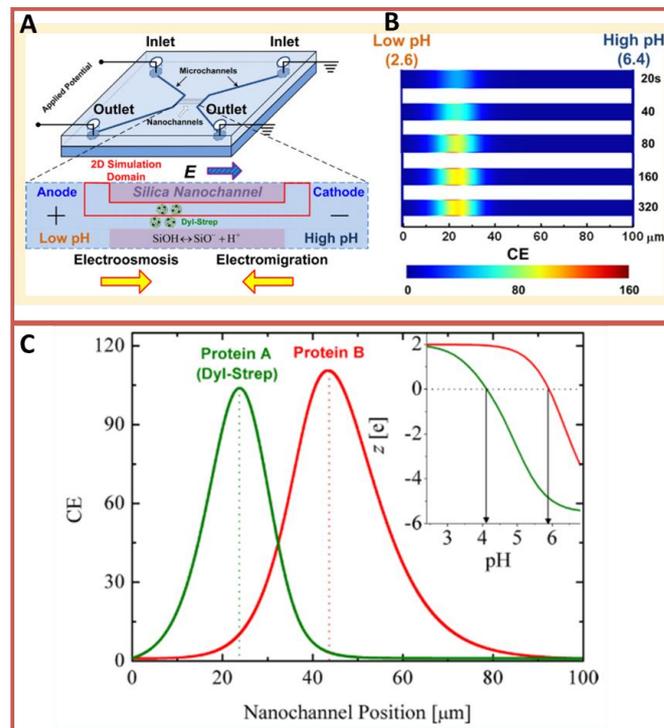
Nous allons effectuer ici une brève description de certaines techniques de préconcentration.

« Field-amplified sample stacking (FASS) » : ^{16,33,34,35} cette méthode utilise des gradients de conductivité entre un volume d'échantillon injecté et le tampon de séparation pour augmenter localement la concentration en biomolécules d'intérêt. Lors de l'application d'un champ électrique, le gradient axial de conductivité se traduit par un gradient de champ électrique. Étant donné que la densité de courant moyenne surfacique est uniforme le long de l'axe du canal, la section à faible conductivité est une région à champ électrique élevé, et la région à conductivité élevée contient un champ électrique relativement faible. Lorsque les ions de l'échantillon sortent de la zone de champ élevé/vitesse électrophorétique élevée et entrent dans la zone de basse vitesse, ils s'accumulent localement et augmentent en concentration. C'est donc à ce point où la vitesse des molécules diminue brutalement, que se produit la préconcentration.



R. Bharadwaj and J. G. Santiago., J. Fluid Mech., vol. 543, pp. 57–92, 2005

Figure 1.4 : A) Schéma montrant la méthode FASS sur des espèces anioniques : Lorsqu'un champ électrique est appliqué, le gradient axial de conductivité résulte en un gradient de champ électrique. La densité de courant moyenne surfacique est uniforme le long de l'axe du canal, la section à faible conductivité est une région à champ électrique élevé, et la région de haute conductivité contient un champ électrique relativement faible. Un gradient dans la concentration d'ions de l'électrolyte de fond est établi avec l'échantillon à l'interface faible conductivité/fort conductivité. B) Empilement en présence de l'EOF. Les gradients de conductivité génèrent des variations axiales du champ électrique et de la mobilité électroosmotique. Le système génère des gradients de pression interne qui ont tendance à disperser l'échantillon.³⁴



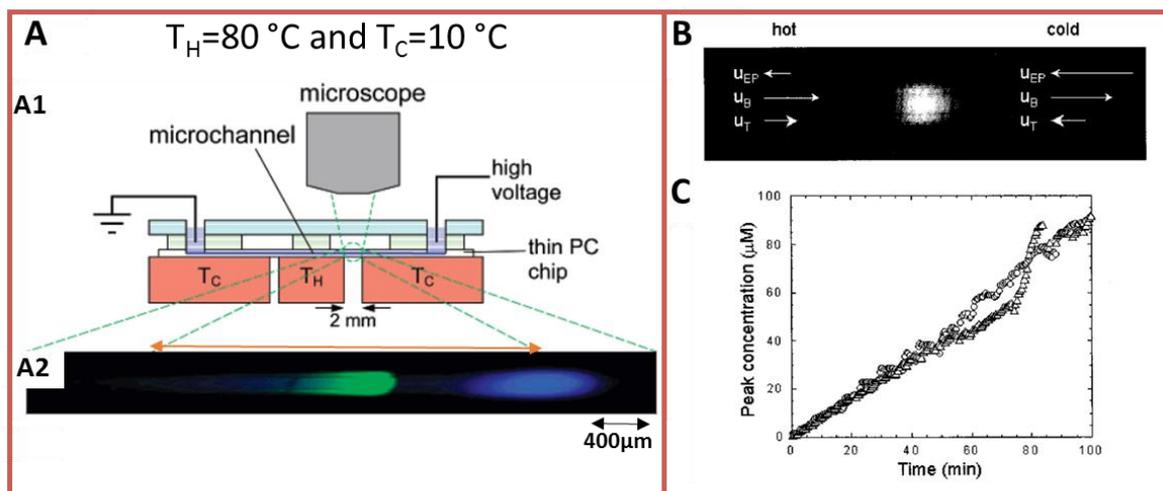
Wei.Hsu,D.Inglis,M. Startsev et al., Anal. Chem. 2014, 86, 8711–8718

Figure 1.5: A et B) Schéma de principe du dispositif nanofluidique à concentration/focalisation isoélectrique (les nanochannels ont une largeur de 20μm, une longueur de 100μm et une hauteur de 85nm) ; C) l'accroissement de la concentration (CE=Concentration Enhancement) de deux protéines présentant deux points focaux différents en hauteur dans le canal nanofluidique.³⁹

« Isoelectric focusing » : Cette méthode utilise les différences de points isoélectriques (appelés « pI ») pour préconcentrer et séparer des biomolécules dans un gel par exemple. Le point isoélectrique pI

d'une molécule correspond à la valeur de pH pour laquelle sa charge nette est nulle. En dessous de cette valeur de pH, la molécule est chargée positivement, tandis qu'au-dessus, elle est chargée négativement. A chaque pI correspondra un point dans le gel vers lequel convergeront les molécules correspondantes. On obtient ainsi simultanément une séparation et une préconcentration des molécules.^{37,16,38,39} La Figure 1.5 ci-dessus présente un exemple d'expériences basées sur cette technique qui a été effectuée par Wei-Lun Hsu et coll. en 2014.³⁹ Ils ont étudié par simulation numérique la focalisation isoélectrique des protéines dans un canal nanofluidique de silice remplie d'acide citrique et de di-sodium de phosphate. Les ions dans le canal migrent en réponse au champ électrique agissant sur leur charge, et au flux électroosmotique global. Les protéines sont concentrées près de l'extrémité à pH faible (anode) lorsque l'effet d'électromigration est plus important et plus près de l'extrémité à pH élevé (cathode) lorsque l'effet électroosmotique domine.³⁹

« Temperature gradient focusing (TGF) » : Cette technique permet une concentration et une séparation simultanées d'une manière similaire à celle de la méthode « d'Isoelectric focusing », mais elle est applicable à tout analyte chargé et ne se limite pas aux molécules ayant un pI spécifique. Elle est basée sur l'application d'un gradient de température.^{40,41} Une illustration de cette technique est représentée sur la Figure 1.6⁴⁰ ci-dessous. Un microcanal est chauffé à d'une coté et refroidi à l'autre côté, ce qui produit un gradient de température au milieu.



D.Ross et al., Anal. Chem. 2002, 74, 2556-2564

Figure 1.6: A) Démonstration de la focalisation et de la séparation de différents analytes à l'aide du TGF : A1) schéma du dispositif expérimental. A2) Imagerie par fluorescence de la zone de focalisation pour l'acide carboxylique Oregon 488 en vert et l'hydrazide Cascade en bleu à -1500V. B) Micrographie par fluorescence de l'échantillon focalisé à la fin du cycle de focalisation. Les flèches montrent schématiquement les amplitudes relatives des vitesses électrophorétiques (u_{EP}), du bulk ($u_B = u_{EOF}$) et la vitesse totale (u_T) résultante dans les parties chaude et froide du canal. C) Concentration maximale de l'échantillon (solution de 8 nM d'acide carboxylique Oregon 488) en fonction du temps pour deux cycles de focalisation différents (deux courbes de répétabilité). L'expérience a été menée deux jours différents et à différents microcanaux. Après 100 minutes de mise au point, la concentration maximale était de $\sim 90 \mu M$.⁴⁰

« Polarisation de la concentration en ions » : dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé cette technique connue aussi sous le nom de « Ion Concentration Polarisation » (ICP). Elle est basée sur le principe d'exclusion ionique obtenu à faible force ionique grâce au recouvrement de la couche diffuse dans les nanopores d'une membrane^{42,43,44,45} ou dans un ou plusieurs nanofentes^{29,46,47,48,49,50}. L'utilisation d'un canal nanofluidique nous permet bloquer le passage de certains ions en fonction

du signe de la charge de surface. Ce caractère de filtre ionique sélectif sera expliqué dans la partie suivante en I.2.

Toutes les techniques décrites ci-dessus permettent de focaliser l'analyte anionique en exploitant le transport ionique déséquilibré entre espèces anioniques et cationiques en raison de la compétition entre flux électroosmotique (EOF) et flux électrophorétique (EP).

II.2- Perméabilité sélective d'une nanofente

L'électropréconcentration est une technique de concentration d'analyte qui consiste à contrôler la localisation spatiale de l'analyte dans le canal fluidique en fonction du temps grâce à la compétition entre les deux flux : le flux électroosmotique J_{EOF} et le flux électrophorétique J_{EP} , cette compétition permet de trouver des conditions expérimentales où ces deux flux s'opposent parfaitement, créant dès lors un point focal où l'analyte est ralenti. La technique que nous utilisons consiste à intégrer dans un microcanal rectiligne une nanofente (ou plusieurs nanofentes) comme montré sur la Figure ci-dessous.

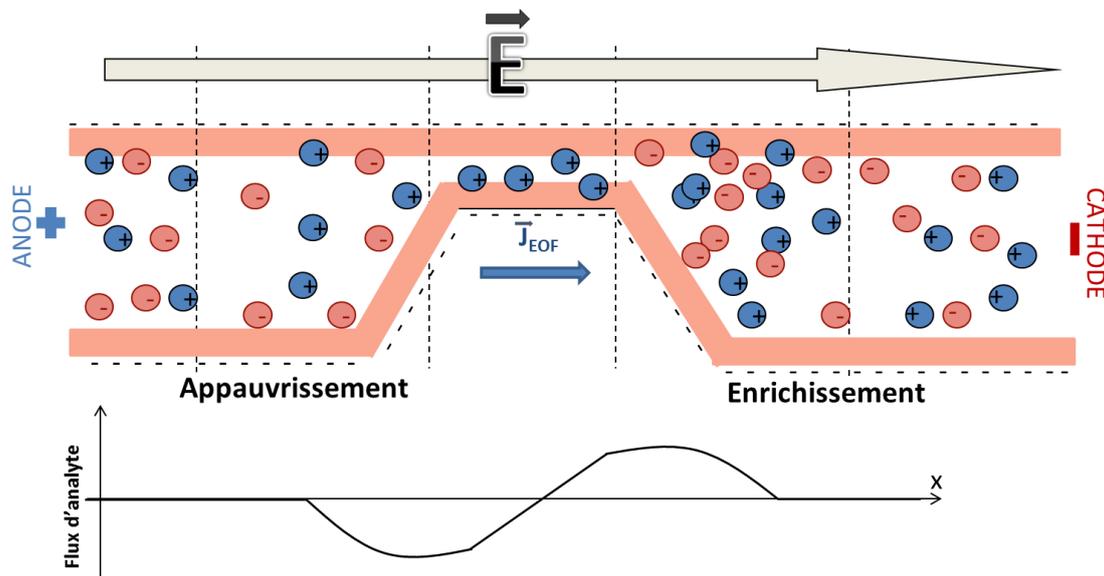


Figure 1.7: Exemple d'un dispositif micro-nano-microfluidique où l'on peut observer sous champ l'effet ICP avec la zone d'appauvrissement en ions de la solution saline dans le réservoir anodique en amont de la nanofente et celle d'enrichissement en ions dans le réservoir cathodique en aval de la fente

Récemment, l'utilisation de nanocanaux a suscité un intérêt croissant pour le transport ionique sélectif de charge. **Expliquons pourquoi le nanocanal se comporte comme un filtre ionique sélectif vis-à-vis de la charge des ions.** Lorsque la taille d'un canal microfluidique est égale à la longueur de Debye λ_D pour un sel de fond de concentration faible (typiquement $<10^{-4}M$), le recouvrement des doubles-couches induit un effet d'enrichissement par exclusion : en effet, les co-ions de la solution saline de fond (les ions Cl^- pour $NaCl$ ou KCl par exemple) transite difficilement à cause du barrière énergétique dans la nanofente au travers de la double couche, ce qui conduit à un appauvrissement en ions dans le réservoir anodique en entrée de fente et simultanément à un enrichissement en contre-ions (les ions Na^+ pour $NaCl$ par exemple). **Le résultat de ce déséquilibre en concentration est visible sur la Figure 1.7 ci-dessus. La nanofente joue bien ici le rôle de filtre ionique sélectif vis-à-vis de la charge des espèces qui circulent dans le liquide.** Ce phénomène d'appauvrissement et d'enrichissement d'ions respectivement en amont ou en aval de la nanofente est connu sous le nom de Polarisation de

la Concentration Ionique (ICP pour Ionique Concentration Polarisation)^{51,52}. Il est important de souligner que cet effet CP persiste même pour des hauteurs de nanofente égale à 10 fois la longueur de Debye λ_D c'est-à-dire au-delà du recouvrement des deux doubles-couches ; nous le montrerons expérimentalement dans le dernier chapitre qui traite de nanofentes de taille variable. Dans la suite du mémoire, on appellera ce phénomène « effet CP » (CP pour Concentration Polarisation).

Lorsque l'on rajoute dans le sel de fond un analyte chargé que l'on veut concentrer, celui-ci va subir la compétition entre les deux flux (électro-osmotique et électrophorétique) dans le profil de concentration obtenu, décrit Figure 1.7, en présence des zones de déplétion et d'enrichissement.

En 2004, Pu et coll²⁸ ont été les premiers à avoir démontré l'effet CP avec des molécules chargées négativement (la fluorescéine) et positivement (La rhodamine 6G). La puce intègre deux canaux en « U » reliés par huit nanocanaux. Ils ont mis en évidence le phénomène d'enrichissement / épuisement des ions, associé au caractère de filtration sélective du nanocanal. A cette époque, ces auteurs affirmaient que le degré d'enrichissement et d'épuisement était directement lié à l'ampleur du chevauchement des doubles couches. Il s'agissait des premières expériences d'électropréconcentration de la fluorescéine dans le réservoir cathodique (à gauche dans les images de la Figure 1.8-B).

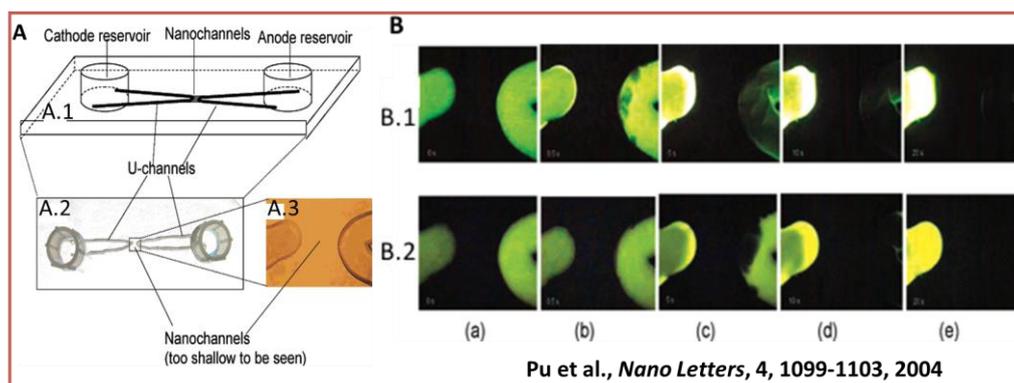
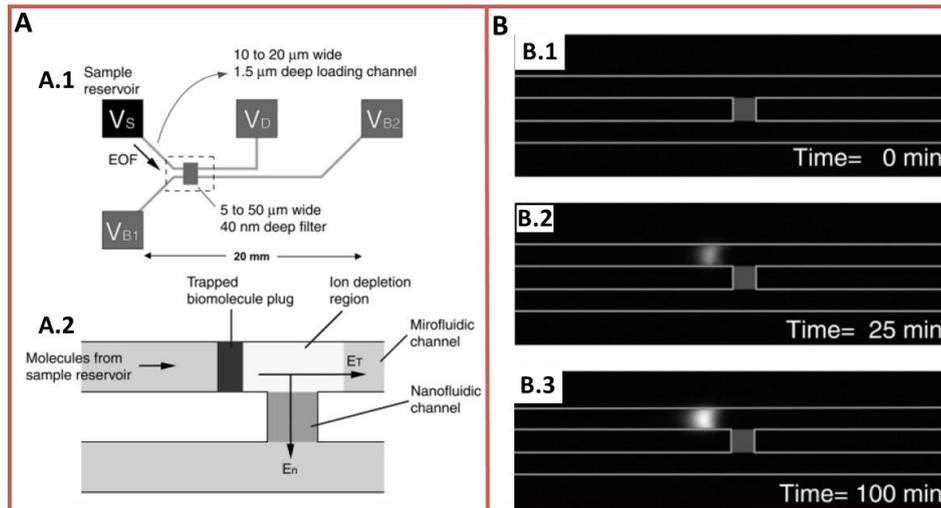


Figure 1.8 : A) Schéma du dispositif de deux grands canaux en U reliés par 8 nanocanaux. B) Les cinq images de chaque ligne (B.1 et B.2) représentent respectivement les intensités de fluorescence dans les deux canaux U avant l'application de toute tension (a), puis après une tension de 1000 V pendant 0,5 s (b), 5 s (c), 10 s (d) et 20 s (e). L'anode était à droite et la cathode à gauche des nanocanaux. Dans la rangée B.1: une solution de 30 µM de fluorescéine et 70 µM de tampon au tétraborate de sodium (pH=8), et dans la rangée B.2: la solution contenait 10 µM de rhodamine 6G dans 100 µM de tampon phosphate (pH=7).²⁸

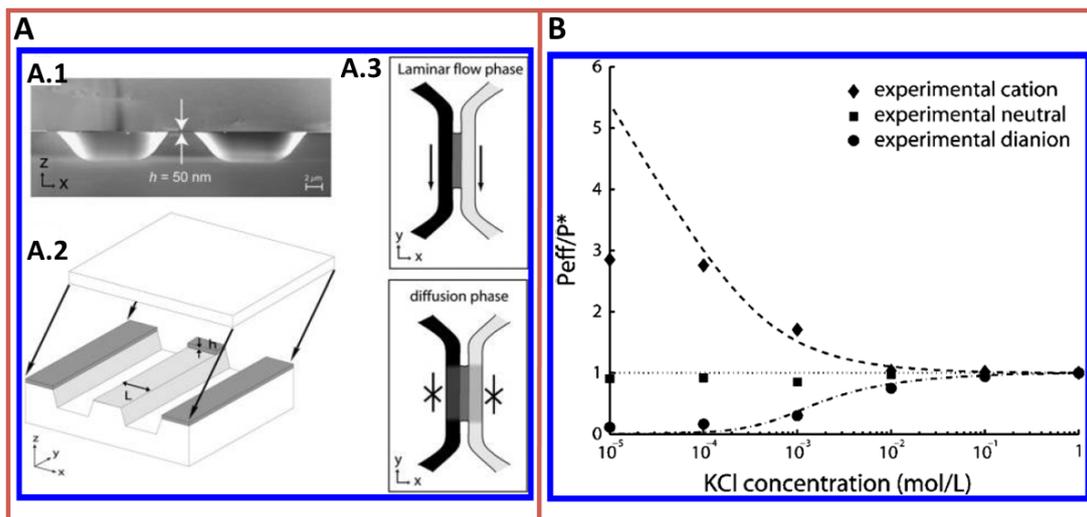
En 2005, Wang et coll.⁵³ du MIT ont fabriqué des dispositifs en silicium, intégrant des filtres nanofluidiques. La membrane sélective aux ions dans ce dispositif est le canal nanofluidique en silicium, qui est perpendiculaire à 2 microcanaux. Ils ont appliqué successivement deux champs E_n et E_T respectivement dans le nanocanal et dans le microcanal anodique. L'application de ces deux champs permet une accumulation rapide des biomolécules en amont de la zone de déplétion comme la montre la Figure 1.9-A.2. Cette zone de piégeage de l'analyte située au-dessus du nanocanal est clairement visible dans l'image B.3 de la Figure 1.9. Avec ce dispositif, ils ont obtenu des taux de concentration élevés pouvant atteindre $C_{max}/C_0 = 10^6 - 10^8$ en quelques heures. Ces travaux ont confirmé les premiers résultats de Wu et coll. Montrant que cette méthode de séparation/concentration pourrait être utile pour le domaine de la bioanalyse par sa simplicité, ses performances, et son intégrabilité à d'autres systèmes de séparation/détection.



Wang et al., Anal. Chem. 2005, 77, 4293-4299

Figure 1.9 : A) Préconcentrateur nanofluidique proposé par Wang et coll. B) Préconcentration avec différentes concentrations d'échantillon. (B.1) Image de 33 pM de GFP (green fluorescent protein) directement après le chargement de l'échantillon dans le canal microfluidique supérieur. (B.2) Image prise après 25 min d'application de $V_S=10V$, $V_D=5V$ et $V_{B1}=V_{B2}=0V$. (B.3) Image prise après 100 min avec les mêmes valeurs que (B.2).⁵³

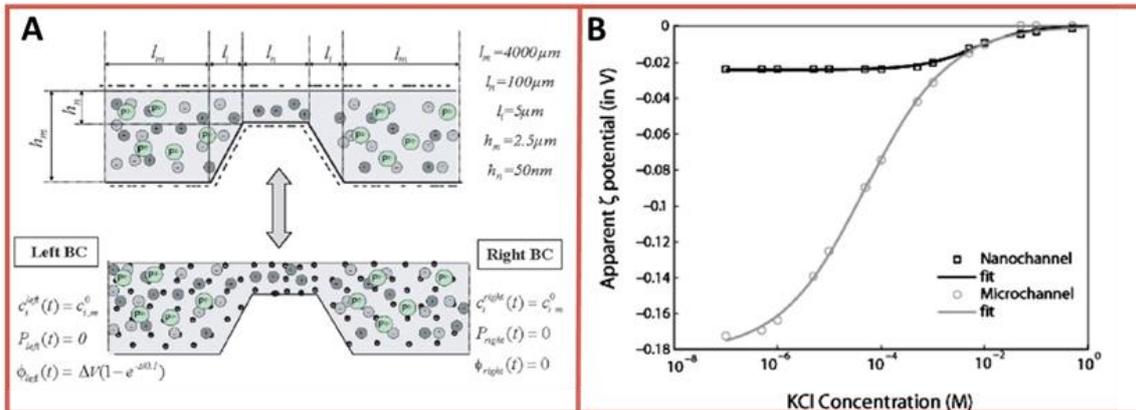
Toujours en 2005, pendant cette phase d'émergence de la méthode, Plecis, Schoch et Renaud⁵¹ ont aussi étudié ces phénomènes de déplétion et d'enrichissement d'espèces chargées à travers une nanofente de pyrex natif chargé négativement. Ils ont montré l'existence d'une barrière électrostatique aux interfaces entre les microcanaux et la nanofente épaisse de 50 nm. En modulant l'épaisseur de la double-couche par la force ionique de la solution, ils ont montré expérimentalement que le transport des espèces négatives au travers de la nanofente est fortement réduit. Au contraire, le transport des cations est facilité. Leurs expériences consistaient à mesurer la perméabilité de la nanofente qui dépend fortement de la force ionique comme le montre la courbe de perméabilité sur la Figure 1.10-B.



Plecis et al., Nano Letter., Vol. 5, No. 6, 2005

Figure 1.10 : A) Descriptif du dispositif utilisé : A.1) Image MEB de la coupe transversale du dispositif avec une profondeur de la nanofente de 50nm. A.2) Image de la puce avec le capot. A.3) Vue de dessus des deux régimes : flux laminaire ou diffuse. B) Variation de la perméabilité relative en fonction force ionique du tampon en KCl : les lignes en pointillés représentent les résultats théoriques et les « signes » les mesures expérimentales.

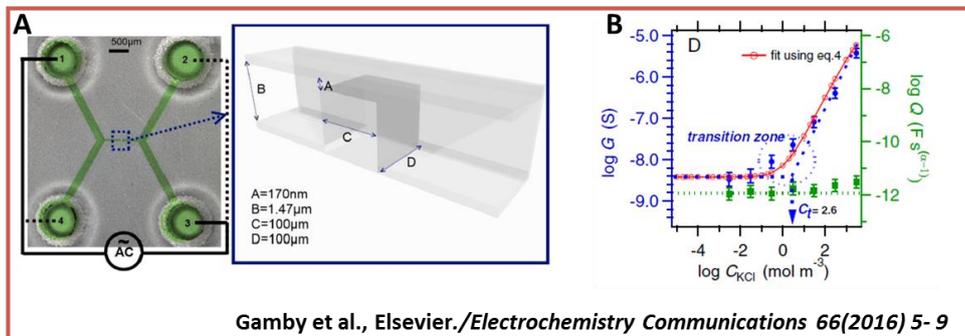
En 2008²⁹, pendant son doctorat au sein du laboratoire, Adrien Plecis a proposé une modélisation unidimensionnelle du processus d'électro-préconcentration sur la base de ces mécanismes d'exclusion ionique dans un système géométriquement plus simple que celui publié en 2005. Il s'agissait d'un microcanal rectiligne linéaire intégrant en son milieu une nanofente horizontale de 50nm d'épaisseur. Pour effectuer ces simulations, A. Plecis a estimé l'évolution de la valeur du potentiel zêta apparent ζ_{app} en fonction de la force ionique. On retrouve le fait qu'aux forces ioniques inférieures à $10^{-4}M$, ζ_{app} prend une valeur quasiment constante et fortement différente de la valeur mesurée en général dans un microcanal (voir Figure 1.11-B). Pour un nanocanal, à force ionique inférieure à $10^{-4}M$, ζ_{app} et donc la perméabilité reste constant.



Plecis et al., Analytical Chemistry., Vol. 80, No. 24, 2008

Figure 1.11 : A) Schéma du dispositif simulé. B) variation du potentiel zêta apparent ζ_{app} en fonction de la force ionique pour un micro et un nanocanal. ²⁹

Gamby et coll. ⁵⁴ ont aussi mis en évidence par spectroscopie d'impédance hyperfréquence l'existence de deux régimes de conductance en fonction de la force ionique, dans une puce nanofluidique ayant la même géométrie rectiligne que la puce d'A. Plecis avec une hauteur de nanofente de 170nm. Comme le montre la Figure 1.12-B, pour une force ionique C_{KCl} inférieure à $10^{-2}M$ ($\log C_{KCl} < -2$ dans la courbe), la conductance est constante. La capacité non idéale obtenue ne dépendant pas de la concentration en KCl, il s'agirait donc d'un paramètre intrinsèque purement géométrique, $C = (\epsilon_R \epsilon_0 w_n L_n) / h_n$, qui serait plus modulable en augmentant la longueur du nanocanal, L_n , que sa section h_n . Nous verrons dans la suite de ce manuscrit comment la longueur L_n du nanocanal permet en effet d'augmenter l'effet CP (voir plus loin chapitres 3 et 4).



Gamby et al., Elsevier./Electrochemistry Communications 66(2016) 5- 9

Figure 1.12: A) Vue globale de la puce microfluidique utilisée ; B) Variation de la conductance en fonction de la force ionique. ⁵⁴

Ceci démontre bien qu'il existe un écart à la neutralité dans la nanofente par la présence des deux doubles-couches en vis-à-vis. Les valeurs limites de conductance permettent de remonter à une longueur de Debye qui correspond exactement à la hauteur du nanocanal divisée par 2.

II.3- Electro-préconcentration - observation des points focaux :

Nous avons décrit, dans la partie I de ce chapitre, le rôle des différents flux mis en jeu en électrophorèse. Rappelons que la compétition entre les deux flux, le flux électroosmotique J_{EOF} et le flux électrophorétique J_{EP} , permet de trouver des conditions expérimentales pour lesquelles ces deux flux s'opposent parfaitement, créant alors un point focal où l'analyte est immobile. Ce dernier peut donc se préconcentrer au point focal au cours du temps. Le flux total est donc défini par :

$$J = J_{EOF} + J_{EP} \quad \text{Equation 1.13}$$

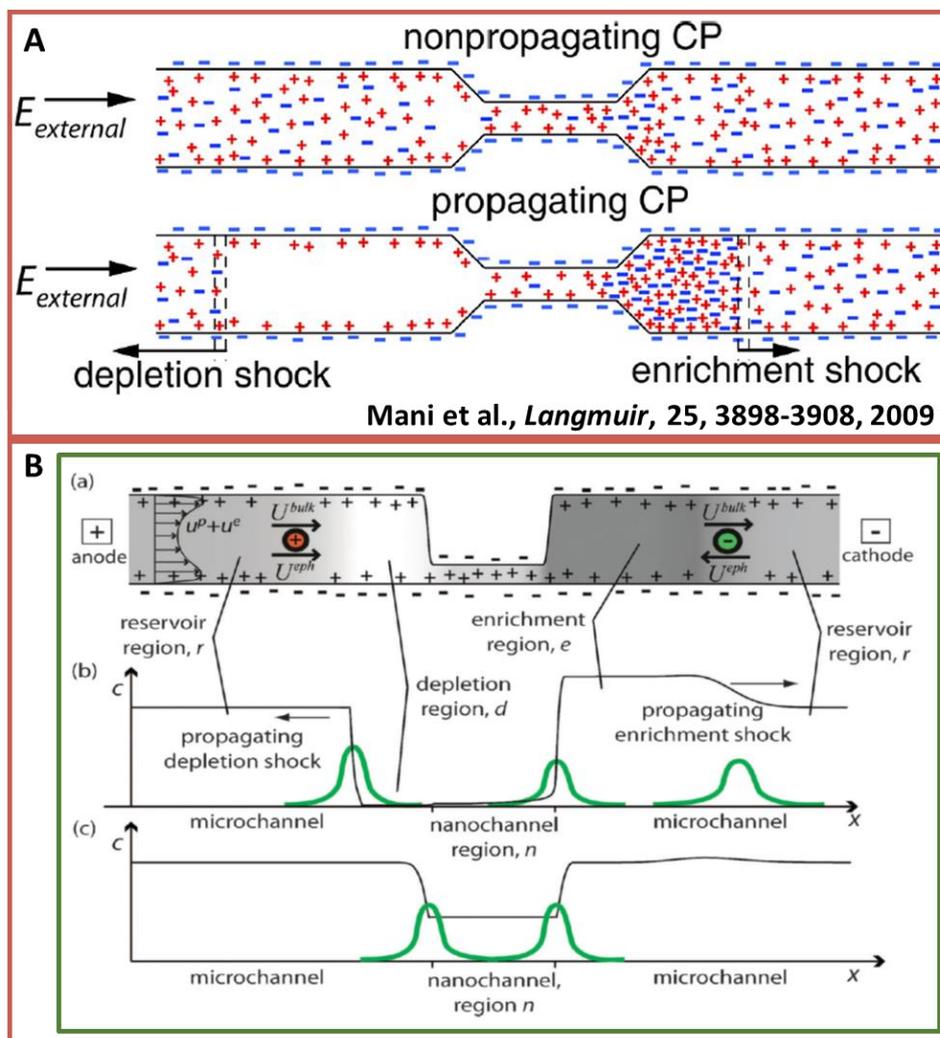


Figure 1.13 : A) Les deux régimes de préconcentrations qui ont été identifiés par l'équipe de Santiago et coll. B) visualisation des 4 interfaces où l'analyte peut se concentrer et observation des deux régimes de préconcentration qui ont été identifiés par l'équipe de Santiago et coll, avec : b) le régime du CP propageant et en c) le CP non propageant qui conduit à une concentration en entrée ou sortie de la nanofente.^{52,55}

Nous venons aussi de voir que dans un dispositif nanofluidique intégrant des canaux de taille nanométrique, ce transport déséquilibré exacerbé produit aux deux extrémités du nanocanal **un effet d'enrichissement-exclusion appelé phénomène de polarisation de la concentration ionique (CP=Concentration polarisation)**.^{52,55} Cet effet CP est principalement régi par la concentration en électrolyte de fond (gouverné par la force ionique) et les contraintes géométriques imposées par la géométrie nanofluidique. De chaque côté du nanocanal, le CP génère des zones soit d'enrichissement en électrolyte de fond (réservoir cathodique) et soit d'appauvrissement (réservoir anodique) avec des conductivités respectivement élevée et faible. Ces gradients de la conductivité, puis les gradients correspondants de la vitesse d'électromigration locale des analytes permettent une focalisation à différentes interfaces. Parmi ces interfaces, **on distingue les deux interfaces entre la zone d'appauvrissement (ou d'enrichissement) et le réservoir (« depletion shock » et « enrichment shock » visibles sur la Figure 1.13A)**, et bien sûr les deux interfaces correspondant aux entrée et sortie de la nanofente. L'analyte peut donc se localiser à chacune de ces 4 interfaces, puis s'y concentrer.

Sur la base d'une théorie analytique générale de l'effet CP, l'équipe américaine de Santiago^{52,55} a examiné de manière exhaustive les divers mécanismes qui gouvernent cet effet CP. Ils ont montré l'importance des deux paramètres clés suivants :

- 1) Un nombre de Dukhin (Du) inverse, qui est en fait le rapport de la conductivité globale de la solution de fond sur la conductivité de la double-couche EDL ($G_{\text{bulk}}/G_{\text{EDL}}$), défini par :

$$\frac{1}{Du} = \frac{\text{Conductivité du Bulk}}{\text{Conductivité de EDL}} = \left(\frac{v_1 z_1 - v_2 z_2}{-2v_1 \sigma} \right) F h_n c_{r,0} = c_{0,r}^* h_n^* \quad \text{Equation 1.14}$$

où v_i et z_i sont respectivement la mobilité et le nombre de valence de l'ion ($i=+1$ pour Na^+ , K^+ et $=-1$ pour Cl^-), F est le nombre de Faraday, h_n^* est la hauteur normalisée de la nanofente sur la longueur de Debye typique : $h_n^* = \frac{h_n}{\lambda_D}$, σ est la charge de surface et $c_{0,r}$ est la concentration du co-ion dans le réservoir et Du est défini comme suit : $Du = \frac{\sigma_s}{F h_n z c_{r,0}}$ avec σ_s est la charge de surface.

- 2) La vitesse du co-ion normalisée par la vitesse électroosmotique :

$$v_{\text{Cl}^-}^* = \frac{\text{vitesse Cl}^- \text{ du tampon}}{\text{vitesse EOF}} = \frac{v_2 z_2 F \eta}{\zeta_n \varepsilon} \quad \text{Equation 1.15}$$

où ζ_n est la valeur du potentiel zêta supposée être uniforme le long de la structure, et η est la viscosité et ε est la permittivité.

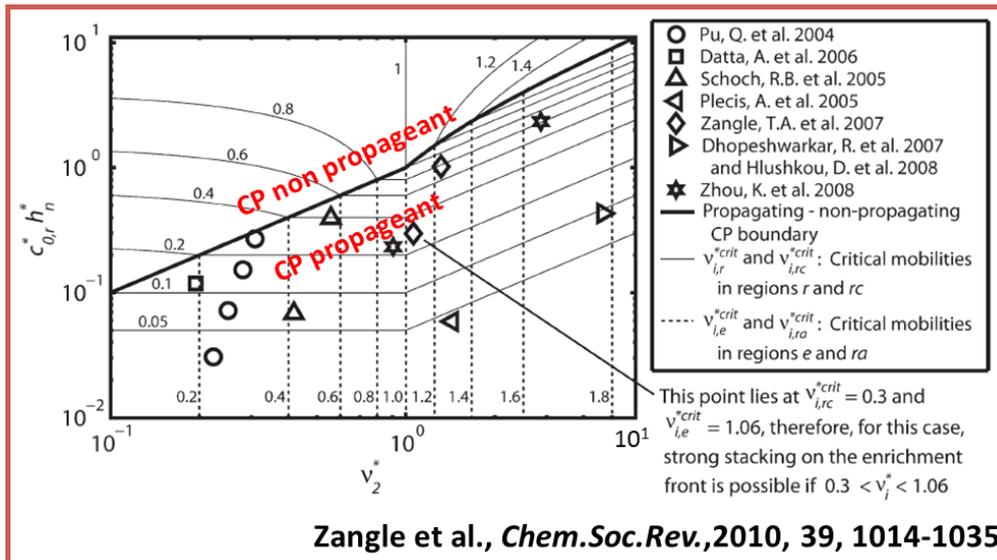


Figure 1.14 : le diagramme $c_{0,r} h_n$ (inverse du nombre de Dukhin) en fonction de v_2^* (la vitesse du co-ion normalisée par la vitesse électroosmotique). La ligne continue représente la limite entre un CP propageant et un CP non propageant.

Aux valeurs élevées de $c_{0,r}^* h_n^*$ (partie haute du diagramme), l'analyte concentré s'empilera aux deux interfaces entrée et sortie du nanocanal, dans un régime appelé «CP sans propagation» comme indiqué dans la Figure 1.14).⁵⁵ Ces conditions d'électrophorèse ne pourront être utilisées pour des applications réelles puisque l'analyte concentré est confiné au voisinage du nanocanal.

Au contraire, à faible nombre de Dukhin inverse $c_{0,r}^* h_n^* \ll 1$ (partie basse du diagramme), l'analyte s'empilera à l'interface avec la zone d'enrichissement (réservoir cathodique) ou bien il se focalisera à l'interface avec la zone de déplétion (réservoir anodique): ces deux points de concentration sont appropriés pour la séparation puisqu'ils se situent à plusieurs centaines de micromètres de l'entrée (ou de la sortie) du nanocanal. **Nous verrons plus loin dans nos travaux expérimentaux (chapitres 3 et 4) que l'interface où nos analytes se focaliseront sera celui avec la zone d'enrichissement (réservoir cathodique).**

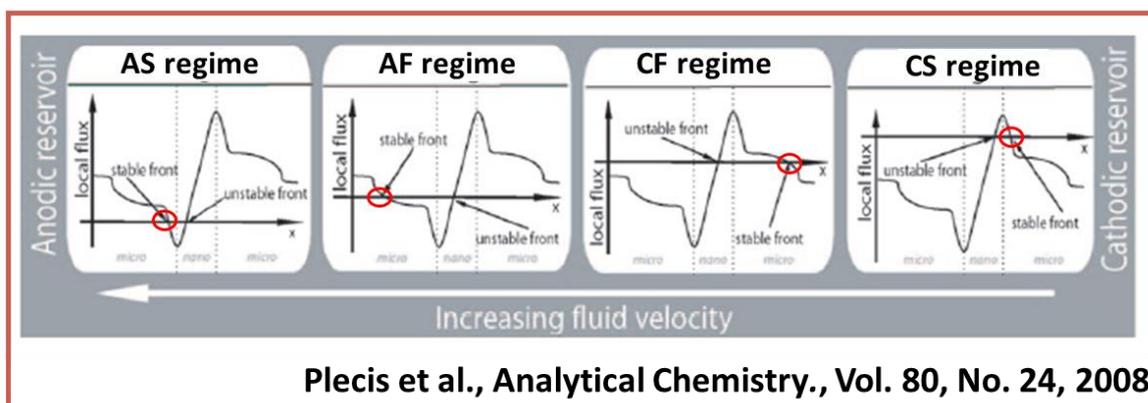


Figure 1.15: Mise en évidence des 4 régimes de préconcentration par A. Plecis.²⁹

En 2008²⁹, A. Plecis et coll. ont mené une étude théorique dans une configuration géométrique complètement similaire à celle de l'étude analytique de l'équipe de Santiago, toujours avec un

microcanal rectiligne intégrant une nanofente centrale. Ces deux études sont donc comparables. Celle d'A. Plecis repose sur une modélisation 1D avec un calcul en tout point de la concentration. Cette étude a mis en évidence l'existence des 4 régimes de préconcentration précédemment décrits par Santiago et coll., à savoir : les deux régimes de stacking (S) en entrée/sortie de la nanofente, et les deux régimes focalisant (F), pour lesquels la préconcentration apparaît à une centaine de microns de la nanofente. L'évolution du profil du flux comme conséquence de l'effet CP pour chacun de ces 4 différents régimes est décrite sur la Figure 1.15 ci-dessus. Typiquement, la variation du flux électrophorétique le long de la structure micro/nano/micro peut être expliquée par deux phénomènes:²⁹

- i) aux entrées du nanocanal, une forte augmentation du potentiel est en raison de l'effet d'enrichissement par exclusion ;
- ii) dans les microcanaux réservoirs, suite à l'effet CP qui augmente (diminue) la concentration ionique du côté cathodique (anodique) du nanocanal, il en résulte une diminution (augmentation) douce du flux électrophorétique dans les microcanaux cathodiques (anodiques) lorsque les molécules tentent de traverser le nanocanal.

Contrairement aux travaux de Zangle, les simulations de Plecis ont également montré qu'il était possible d'obtenir **un point focal CF stable dans une région de transition de charge surfacique nette, entre le régime du CF en propagation à charge surfacique élevée et le régime CS d'empilement située à l'entrée du nanocanal à charge surfacique faible**. Cependant, étant donné que la gamme de paramètres (charge de surface et champ électrique) permettant d'obtenir ce point CF stable est trop étroite, peu d'expériences ont été rapportées. À titre d'exemple, Hluskou et coll.⁵⁶ ont expérimentalement rapporté une concentration cathodique de sérum bovin d'albumine (BSA chargée négativement), avec une dynamique caractéristique des espèces co-ioniques à l'interface entre la zone d'enrichissement et le réservoir cathodique. Ils ont obtenu un taux de concentration de 100 après 200 secondes.

Les résultats expérimentaux obtenus par Anne-Claire Louer pendant son doctorat au LPN ont confirmé les simulations de Plecis. Elle a démontré expérimentalement la présence de ces 4 régimes de préconcentration expérimentalement et l'existence du mode propageant. Pour des molécules chargées négativement de faible poids moléculaire telles que la fluorescéine, la préconcentration s'effectue dans le canal cathodique.^{50,57}

Pour résumer l'électro-préconcentration classique conduit à 4 régimes de préconcentration:

- ❖ le régime dit « **Cathodic stacking (CS)** » qui correspond à une accumulation de l'analyte juste à l'entrée de la nanofente. Ce régime est observé pour les analytes ayant une mobilité électrophorétique très grande. Le flux électrophorétique domine le flux électroosmotique.
- ❖ le régime dit « **Cathodic focusing (CF)** » : l'analyte étudié se préconcentre aussi dans le réservoir cathodique mais à une centaine de 100 μ m de l'entrée de la nanofente, à l'interface de la zone d'enrichissement. Dans ce régime, l'analyte a une mobilité électrophorétique un tout petit plus faible que dans le cas du CS.
- ❖ le régime dit « **Anodic focusing (AF)** » : Ici, la mobilité électrophorétique de l'analyte est faible et le flux électroosmotique domine sur le flux électrophorétique. Le point de focalisation s'effectue à une centaine de micromètres de la nanofente à l'interface de la zone de dépletion dans le canal anodique.
- ❖ le régime dit « **Anodic Stacking (AS)** » : Dans ce cas où la mobilité électrophorétique est très faible par rapport à la vitesse électroosmotique, l'électropréconcentration s'effectue à la sortie de la nanofente.

Il est important de préciser que la mobilité électrophorétique d'un analyte est fonction de sa masse et de sa charge. **Pour un analyte donné, en fonction de la géométrie de la nanofente (longueur, largeur et hauteur) et de la solution saline de fond choisie, la compétition entre les deux flux (électro-osmotique et électrophorétique) dans le profil de flux imposé par l'effet CP conduira à une localisation de l'analyte en l'un de ces 4 points focaux possibles.** Comme discuté précédemment les régimes cathodiques seront obtenus pour des molécules de faible poids moléculaire et fortement chargés, tandis que les régimes anodiques seront ceux où l'on observera plutôt les grandes molécules à haut poids moléculaire et faiblement chargées.

III - l'électro-préconcentration assistée en pression

Puisqu'un analyte donné ne peut se concentrer qu'en un seul des 4 régimes décrits précédemment, cette méthode d'électro-préconcentration a été assez peu utilisée en pratique. Pour pouvoir choisir à volonté la localisation de l'analyte, un paramètre supplémentaire a été ajouté au système^{50,56}: **l'ajout d'une pression supplémentaire hydrodynamique externe $J_{\text{pressure}}=J_p$.**

Le débit total est alors donné par :

$$J = J_{EOF} + J_{EP} + J_p \quad \text{Equation 1.16}$$

où le débit hydrodynamique supplémentaire J_p peut prendre des valeurs positives ou négatives. En l'absence de pression hydrodynamique ($J_p=0$), nous utiliserons les notations « classique » ou « conventionnelle » pour décrire l'électropréconcentration.

L'électro-préconcentration assistée par pression consiste donc à appliquer une pression hydrodynamique externe à travers le nanocanal. **Outre les flux électroosmotique (J_{EOF}) et**

électrophorétique (J_{EP}) qui sont en concurrence sous l'effet CP, ce flux hydrodynamique supplémentaire (J_p) permet de réduire (ou d'augmenter) le flux électroosmotique à volonté et, ainsi, de déplacer la position du point focal de l'analyte dans une direction qui dépend de la direction de la pression appliquée.

Sur la Figure 1.16 ci-dessous, on observe, par exemple, que l'application d'une pression anodique imposée du réservoir anodique vers la nanofente (flèches rouge et violette dans la Figure 1.16) permet de contre-carrer le flux électroosmotique et de contrôler l'emplacement de la ligne de front de préconcentration dans le réservoir anodique. De manière similaire, l'ajout d'une pression cathodique imposée du réservoir cathodique vers la nanofente (flèches bleue et verte) permet d'augmenter le flux électro-osmotique et de déplacer le point focal vers la nanofente.

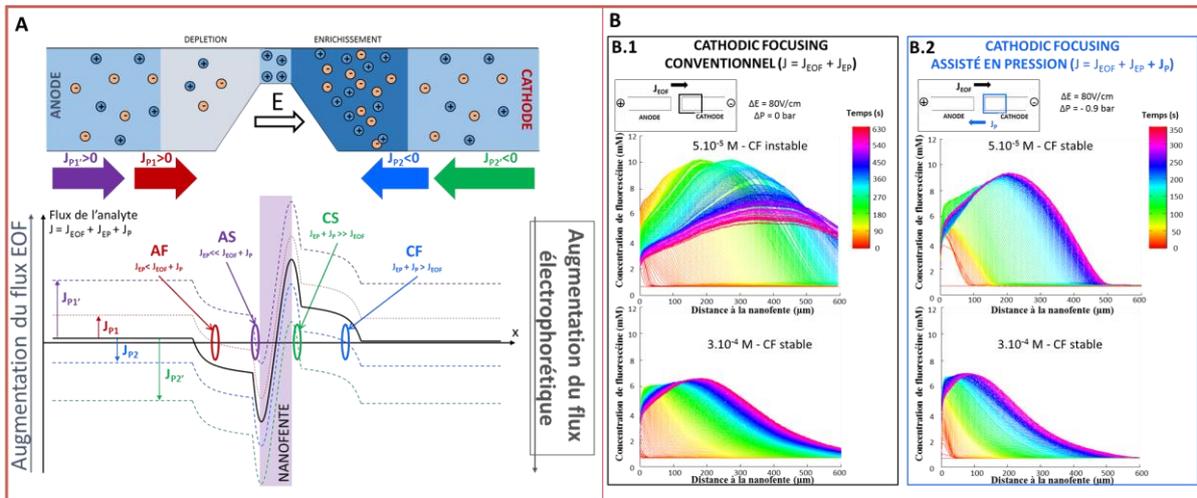


Figure 1.16: A) Mise en évidence du rôle de l'ajout du flux hydrodynamique. B) Exemple de stabilisation du front de préconcentration de la fluorescéine grâce à l'application de la pression.⁵⁷

En conclusion, de ce premier chapitre introductif, je vais étudier au cours de mon doctorat ce protocole d'électro-préconcentration assistée en pression pour stabiliser des points focaux dans les réservoirs intermédiaires.

Mon objectif principal sera d'étudier le rôle de la géométrie de la nanofente sur cette stabilisation.

Pour les puces à nanofente unique horizontale, qui sont étudiées au chapitre 3, je vais d'abord mesurer l'évolution de la conductance avec la force ionique du sel de fond pour montrer qu'il existe un plateau de conductance à force ionique faible (correspondant au potentiel zeta apparent ζ_{app}). Ensuite, je vais établir des diagrammes « champ électrique/pression additionnelle » qui permettent de prédire les conditions d'observation du point focal stable de concentration pour deux molécules modèles, la fluorescéine et l'ovalbumine. J'étudierai le rôle de la longueur de la nanofente sur le diagramme E/P.

Pour les puces à réseaux de nanofentes verticales, je vais mettre au point un procédé technologique de nanofabrication basé sur de la lithographie électronique de haute résolution couplée à une gravure profonde de la silice, ainsi qu'un procédé de collage atomique « verre/verre » pour sceller les puces. Toujours avec les solutions modèles de fluorescéine ou d'ovalbumine diluées dans NaCl, j'étudierai le rôle de la géométrie des fentes sur l'obtention du régime stable de concentration.

« La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre. »

Albert Einstein

Mathématicien, Physicien, Scientifique (1879 - 1955)

Chapitre 2 : Techniques Expérimentales

Dans ce chapitre, nous décrirons en détail les bancs expérimentaux et les techniques de mesures utilisées pour : la voltamétrie cyclique et l'électrophorèse.

I - Description des bancs de mesures et des protocoles et techniques expérimentales utilisés

I.1 - : voltamétrie cyclique

I.1.1 - : dispositif expérimental de mesure de conductance :

Le dispositif expérimental de mesure par voltamétrie cyclique est représenté sur la Figure 2.1, il est composé :

- D'un potentiostat/Galvanostat Biologic® permettant d'imposer une intensité, un potentiel ou un balayage courant tension en fonction du temps.
- De 3 électrodes : électrode dite « de travail (WE) », de référence (REF) dont le potentiel est fixe et contre-électrode (CE) qui fonctionne comme un collecteur de courant. Une électrodéposition d'un amalgame Ag/AgCl a été réalisée sur les électrodes de platine (fil de diamètre ($\Phi = 500\mu\text{m}$) pour limiter les variations du potentiel de repos dans les réservoirs.
- D'un ordinateur et du logiciel « Ec-lab » qui contrôle l'ensemble des instruments et permet de tracer les courbes courant-tension (I/V) mesurées.

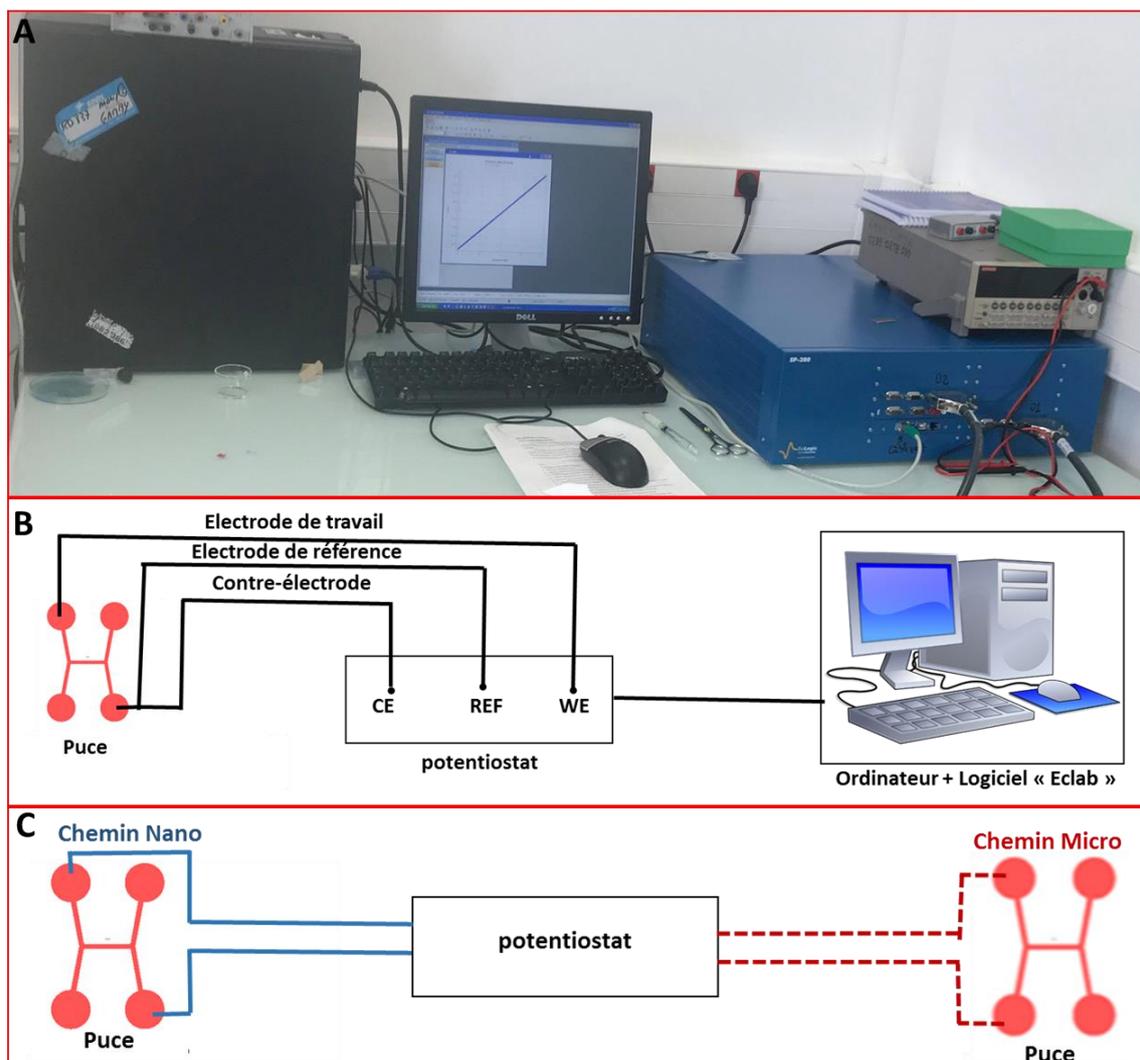


Figure 2.1 : Descriptif du dispositif expérimental. Le chemin nano correspond au chemin qui passe par la nanofente alors que le chemin micro correspond au chemin à travers les micro-canaux.

I.1.2 – : Description du protocole de voltamétrie cyclique : méthode de mesure de la conductance de la nanofente

La voltamétrie cyclique (CV) est une technique de mesure électrochimique potentiodynamique. Au cours du processus, le potentiel de l'électrode de travail augmente (ou diminue) linéairement entre deux valeurs initiale et finale imposées (E_i et E_f) avec le temps. Une fois le balayage « aller » de E_i vers le potentiel E_f atteint, le balayage linéaire est appliqué afin de revenir au potentiel initial. Ces cycles de balayages en potentiel sont répétés autant de fois que nécessaire. Le courant sur l'électrode de travail est tracé en fonction de la surtension appliquée pour donner le voltamogramme cyclique. La voltamétrie cyclique est généralement utilisée pour étudier les propriétés électrochimiques d'un analyte en solution ou d'une molécule adsorbée sur l'électrode.

Comme nous l'avons dit plus haut, une expérience CV standard utilise trois électrodes: une électrode de référence, une électrode de travail et une contre-électrode. Un électrolyte à concentration molaire au minimum 10 fois plus élevée que la concentration de l'analyte (ou sel de fond) est généralement ajouté à la solution échantillon pour assurer la migration des charges ioniques. La composition du solvant (ici aqueux), de l'électrolyte et du matériau de l'électrode de travail détermine la plage de potentiel accessible (ou fenêtre) pendant l'expérience. La contre-électrode, également appelée électrode auxiliaire ou seconde électrode, peut être faite de n'importe quel matériau qui conduit facilement le courant et ne réagit pas avec la solution.

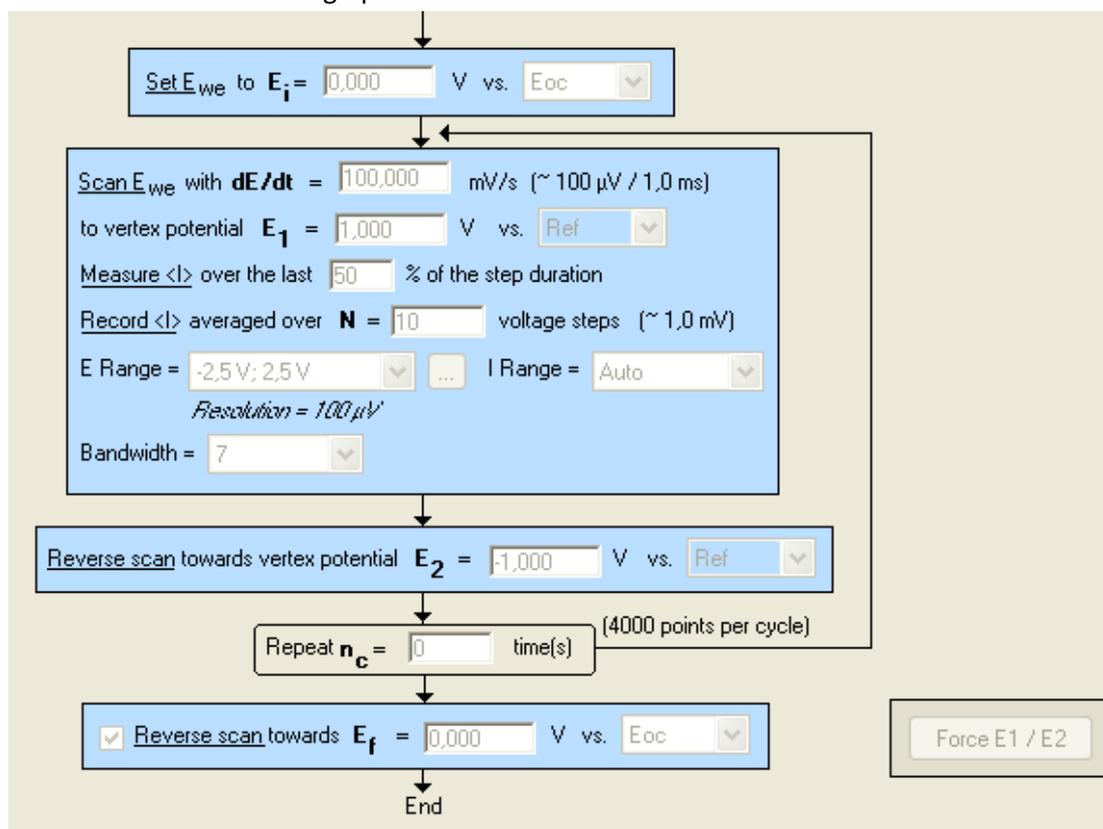


Figure 2.3 : protocole pour la procédure de la mesure en voltamétrie cyclique.

Dans le cas des expériences menées dans les systèmes MNM où seul l'électrolyte est présent dans le milieu, aucune réaction de transfert de charge (pas d'analyte rédox dilué) ne se produit dans la puce. Le courant mesuré en réponse à une application linéaire du potentiel est principalement un courant ohmique (migration des ions) entre deux électrodes espacées d'une certaine longueur. Ce courant ohmique est aussi fortement dépendant la géométrie du dispositif. Nous nous plaçons dans le cas d'un système symétrique où la même concentration d'électrolyte se trouve dans chaque compartiment de part et d'autre de la nanofente de façon à ne pas faire varier le potentiel de repos entre les deux électrodes. Le système aura un comportement purement ohmique qui se traduit par une variation linéaire du courant.

Pour lancer l'expérience, on crée un nouveau protocole (voltamétrie cyclique) dans le logiciel « Eclab » en utilisant les paramètres que sont la fenêtre de potentiel balayée: -1V et 1V (Voir E_1 et E_2 de la Figure 2.3) et une vitesse de balayage de 100mV/s (Voir dE/dt sur la Figure 2.3).

Après avoir lancé l'expérience, on obtient une courbe (Figure 2.4-A) décrivant le courant ohmique en fonction de la tension appliquée. Pour une concentration donnée, la pente donne la conductance G (I/V). On trace ainsi la variation de la conductance G en fonction de la concentration en NaCl C_{NaCl} de de 10^{-1} M à 10^{-8} M.

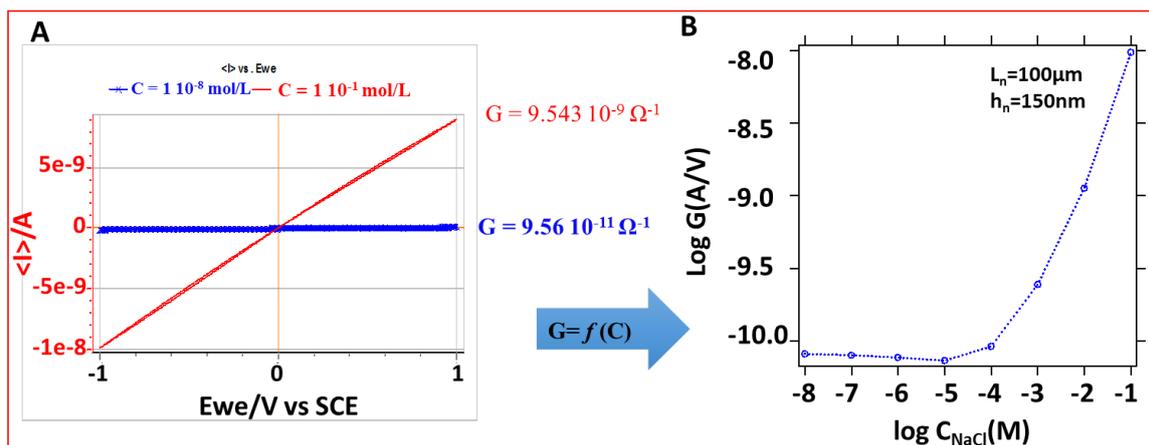


Figure 2.4: A) Mesure de la variation du courant mesurée suite à une rampe de potentiel entre -1 et 1V (Voir procédure Figure 2.3) dans une puce MNM pour une largeur (w_n) et une longueur de la nanofente(L_n) de 100 μm et une hauteur (h_n) de 150 nm remplie d'une solution de NaCl à deux concentrations extrêmes (10^{-8} et 10^{-1} mol/L). B) Evolution de la conductance : le tracé de la variation de la pente (Figure2.4A) en fonction de la concentration de NaCl.

I.2 – : Electropréconcentration :

I.2.1 – : Dispositif expérimental d'électrophorèse :

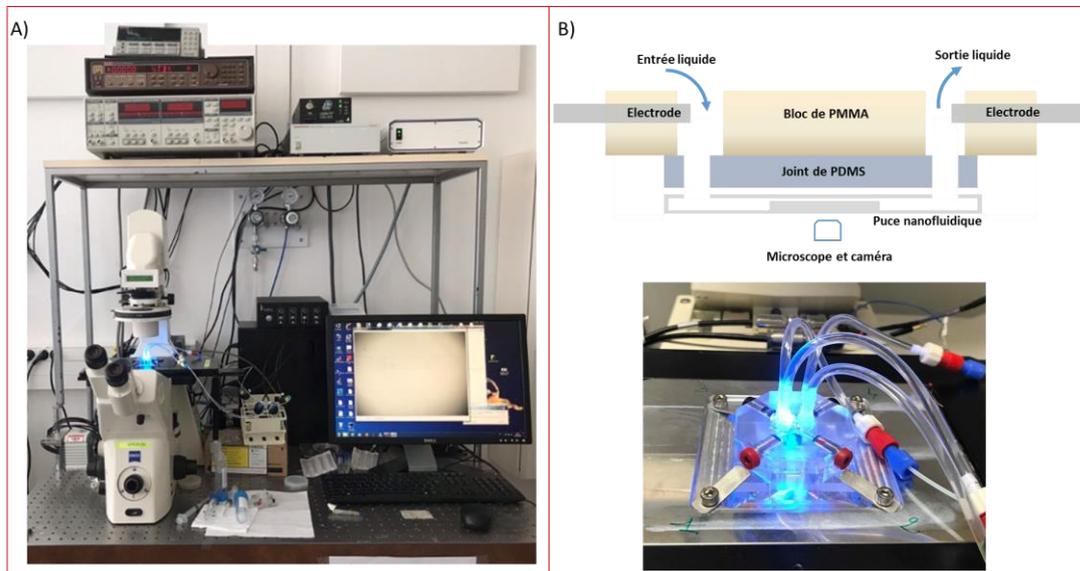


Figure 2.2 : Descriptif du dispositif expérimental : A) Vue générale de l'installation ; B) Schéma du bloc en PMMA (nom complet PMMA) permettant de réaliser les connexions fluidiques et électriques avec la puce.

Nos expériences de préconcentration nécessitant deux composantes principales, à savoir l'application d'un champ électrique et d'une pression externe. Notre banc expérimental se compose :

- D'une puce en verre.
- D'un bloc de PMMA (poly (méthacrylate de méthyle)) via lequel les liquides seront injectés et les tensions appliquées. Un joint en PDMS assurera l'étanchéité et de la connexion avec la puce.
- D'un générateur de tension couplé à un multiplexeur.
- D'un contrôleur de pression, la pression est appliquée dans les réservoirs du bloc de PMMA (voir Figure 2.2) via des tuyaux en plastique souple, au même niveau que les électrodes.
- D'une caméra (Orca-ER, Hamamatsu) reliée à un microscope inversé (Axiovert 200, Zeiss). Celui-ci autorise l'éclairage de l'échantillon tout aussi bien avec une lampe halogène qu'avec une lampe à mercure, et permet de réaliser des mesures en fluorescence même à des intensités lumineuses faibles.
- Le microscope inversé est couplé à un shutter (Uniblitz VCMD1), ce qui permet de limiter la photo blanchiment en n'exposant pas continuellement l'échantillon. L'enregistrement via la camera est déclenché grâce à un trigger externe qui contrôle et le shutter et la caméra.

La puce en verre est connectée à un bloc de PMMA grâce à un joint de PDMS percé de 4 trous dans l'alignement des réservoirs de la puce. Ce bloc de PMMA présente quatre grandes cavités contenant chacune une électrode de platine (plongeur). Le liquide est injecté au sein de ces cavités à l'aide d'une seringue. Les électrodes de platine immergées dans le liquide sont connectées directement au générateur pour appliquer une différence de potentiel. Cette tension est générée par une alimentation DC Keithley 238 associée à un multiplexeur Keithley 7001. La pression hydrodynamique supplémentaire est appliquée via un générateur de pression ELVEFLOW® AF1, tandis que l'injection et

L'arrêt du débit sont gérés par un multiplexeur ELVEFLOW®. Le pilotage de tous les instruments ainsi que l'analyse des données sont réalisés sous Matlab.

I.2.2- Description du protocole d'électropréconcentration

Au cours des expériences de préconcentration, la fluorescéine a été diluée dans du KCl ou du NaCl à 10 μ M (pH=7), tandis que l'ovalbumine a été diluée dans du tampon HEPES ou NaCl (pH=7) à 10 μ M. La reproductibilité étant essentielle, deux étapes de nettoyage sont réalisées avant chaque expérience. Pour résumer, voici les principales étapes pour lancer une expérience :

- Injecter la solution d'analyte avec une seringue dans les quatre réservoirs,
- 1^{er} nettoyage : Tout d'abord, chaque nouvelle puce est nettoyée avec plusieurs solutions : 10 minutes avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1 M, 10 minutes avec une solution de NaOH à 0,1 M, 15 minutes avec de l'eau déionisée et 2 heures avec la solution tampon. Ce premier nettoyage permet d'obtenir une charge de surface comparable de puce en puce,
- 2^{ème} nettoyage : Par ailleurs, pour obtenir le même état initial avant chaque expérience, on procède à un second nettoyage électrique en 3 étapes : i) Après une première injection de tampon on applique une tension de 20 V pendant 2 minutes, ii) On injecte à nouveau du tampon pendant 10 minutes pour renouveler la solution, et enfin iii) on applique une pression identique dans les quatre réservoirs pendant 10 minutes,
- La solution d'analyte dilué dans le tampon KCl (ou NaCl) est ensuite injectée avec une seringue dans les quatre réservoirs et différentes tensions et pressions sont appliquées au sein de la puce. Afin d'observer le comportement de l'analyte, celui-ci est marqué en fluorescence FITC marqué dans le vert d'une longueur d'onde maximum d'absorption à 494 nm et un maximum d'émission de 520 nm (d'une longueur d'onde maximum d'absorption à 596 nm et un maximum d'émission de 615 nm pour le Texas RED) et éclairé via une lampe à mercure. Les images sont capturées à intervalles réguliers pendant les expériences de préconcentration (10 secondes pendant la première minute, puis toutes les 60 secondes). Un programme Matlab® contrôle tous les appareils au cours des expériences d'électropréconcentration (Image A de la Figure 2.5),
- Une fois l'expérience achevée, on utilise aussi Matlab pour analyser les mesures réalisées. Des images typiques d'une expérience réussie sont présentées sur l'image D de la Figure 2.5.

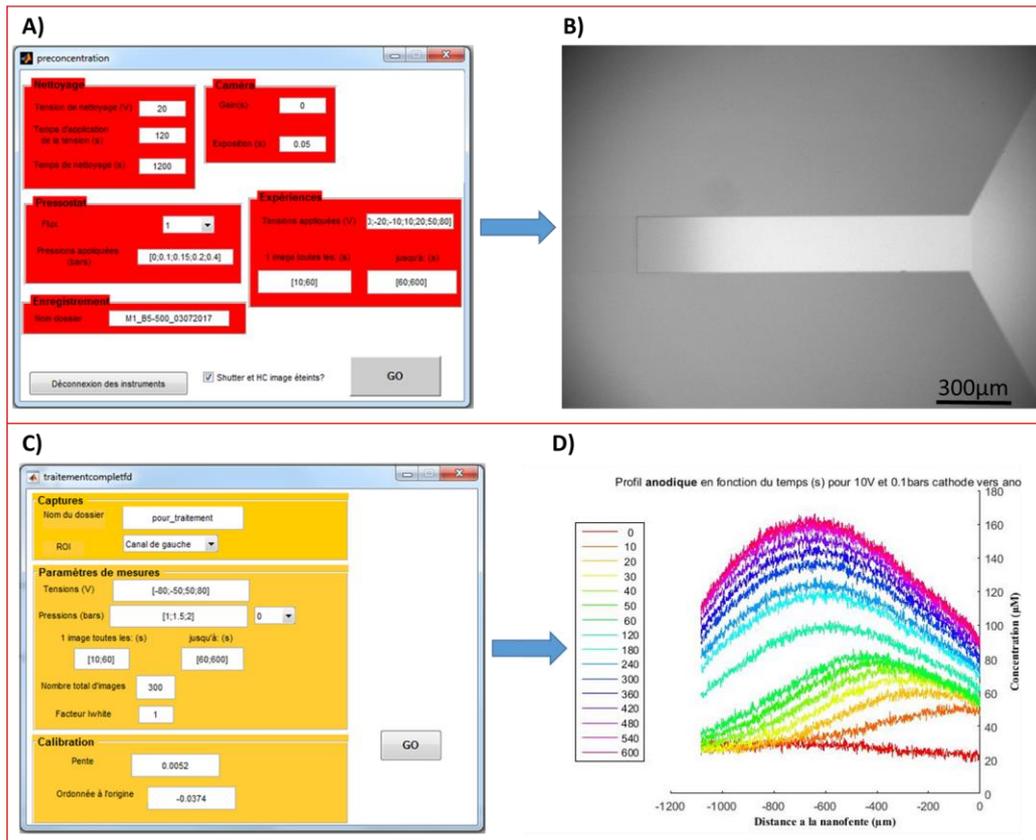


Figure 2.5 : A) Interface de préconcentration utilisé pour lancer les expériences B) Exemple d'image obtenue à la fin de la manip C) Interface de traitement de données sur Matlab D) Exemple de profil de préconcentration obtenu après traitement.

Les images recueillies lors de l'expérience sont traitées sur Matlab pour tracer les profils de concentration de l'analyte dans tout le canal au cours du temps. Pour estimer correctement la concentration locale, il est nécessaire de corriger l'intensité lumineuse brute en tenant compte des conditions initiales, du bruit de fond, de la lumière environnante ainsi que de nombreux paramètres expérimentaux (caméra etc.). Nous avons donc utilisé la formule suivante⁵⁷ :

$$I_{correctée} = \frac{I_{mes}}{I_{ref}} = \frac{I_{brut} - I_{black}}{I_{white} - I_{blackw}} \quad \text{Equation 2.1}$$

avec I_{brut} : L'intensité dans le canal avec les conditions de l'expérience.

I_{black} : L'intensité hors du canal avec les conditions de l'expérience.

I_{white} : La valeur de l'intensité de référence à $C=10\mu\text{M}$ dans les conditions de l'expérience mais sans appliquer un champ électrique.

I_{blackw} :L'intensité pour $C=0\mu\text{M}$ dans les conditions de l'expérience sans appliquer un champ électrique.

Avant chaque expérience, une calibration doit être réalisée. Nous utilisons pour ce faire une puce appelée « puce de référence », constituée d'un canal simple de mêmes dimensions (et caractéristiques) que les microcanaux de notre puce de préconcentration pour éviter toute contamination. En effet, la mesure du I_{white} nécessite l'injection d'une solution fluorescente et va donc

changer l'état de surface de la puce ce qui pourrait influencer directement sur les préconcentrations ultérieures, d'où l'utilisation d'une puce dédiée pour la calibration (Image A de la Figure 2.5). Le canal de cette puce est rempli d'une solution fluorescente de concentration connue afin de pouvoir effectuer des comparaisons entre chaque courbe. On définit alors I_{mes} et I_{ref} par :

$$I_{ref} = I_{ROI A} - I_{ROI B} \quad \text{Et} \quad I_{mes} = I_{ROI 1} - I_{ROI 2}$$

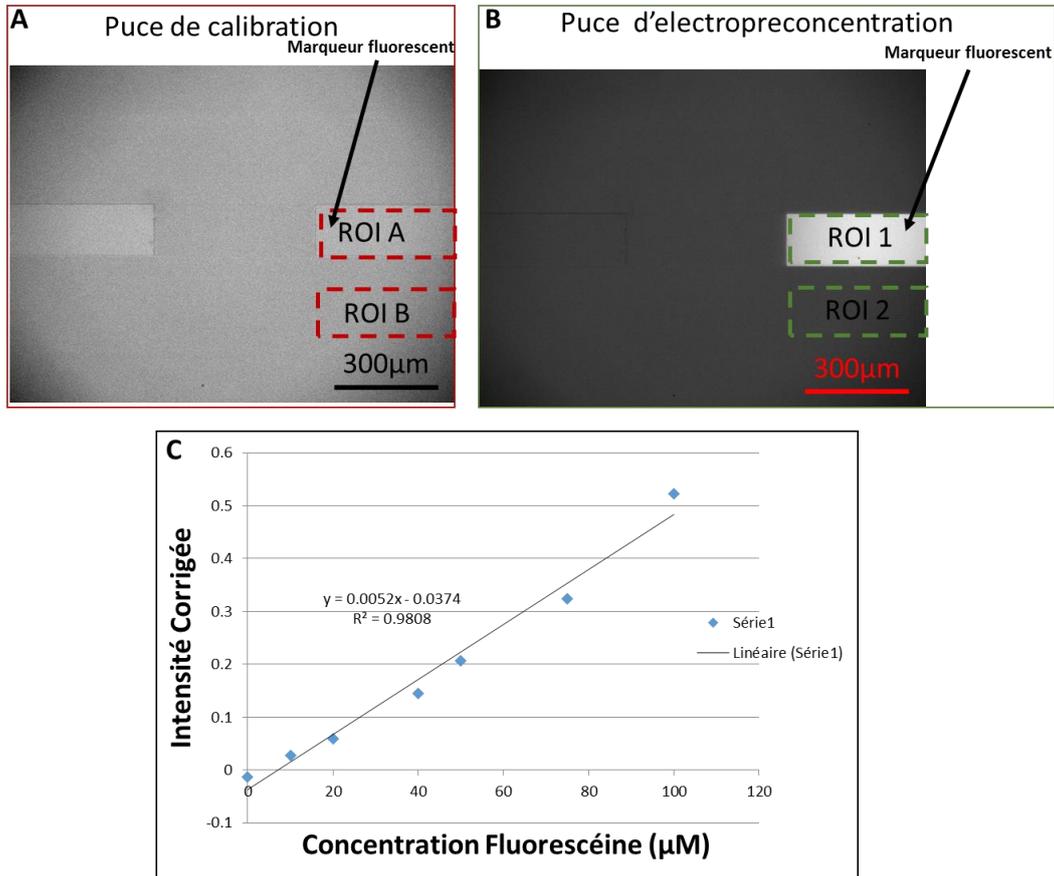


Figure 2.6: A) Image d'une puce de calibration expliquant les techniques de mesures de $I_{ROI A}$ et $I_{ROI B}$ B) Image d'une puce de préconcentration expliquant le calcul de l'intensité de fluorescence pendant une expérience et C) Courbes de calibration représentant de la relation la relation linéaire entre concentration de la fluorescéine et l'intensité de fluorescence

En injectant différentes concentrations connues de l'analyte, l'évolution de l'intensité corrigée en fonction de la concentration peut être tracée, et nous obtenons ainsi une courbe de calibration (Image C de la Figure 2.6). Il est important de conserver les mêmes paramètres d'acquisition lors de la calibration et lors de l'expérience de préconcentration. La calibration est essentielle pour permettre le calcul de la concentration réelle, à partir de l'intensité corrigée de la fluorescence obtenue pendant une expérience de concentration d'un analyte. Les données peuvent être automatiquement traitées par une interface Matlab présentée sur l'image C de la Figure 2.5. Après avoir fourni au programme les paramètres de l'expérience et de la courbe de calibration, il est possible de choisir la zone du réservoir où l'on fera les calculs (zone appelée ROI dans la figure 2.6). Le logiciel calcule ensuite la concentration locale au cours du temps sur toute la longueur de la zone ROI sélectionnée (moyennée sur la largeur) et trace les courbes de concentration, dont on peut voir un exemple sur la Figure 2.5D.

« Lorsque deux forces sont jointes, leur efficacité est double. »

Isaac Newton

Astronome, Mathématicien, Physicien, Scientifique (1642 - 1727)

Chapitre 3 : Les puces à nanofente unique horizontale

Après avoir vu dans le chapitre 1 le rôle de la nanofente, nous allons étudier le cas de l'électropréconcentration assistée en pression au sein d'une puce micro/nanofluidique intégrant une unique nanofente horizontale.

Nous décrirons en détail cette géométrie dans une première partie, puis nous présenteront une étude de la conductance de ces dispositifs, et de la charge de surface dans les dispositifs micro/nano/microfluidiques. Enfin, dans une dernière partie, nous rapporterons les expériences de préconcentrations assistées en pression réalisées avec deux molécules modèles : la fluorescéine et l'ovalbumine.

I - Description des puces à nanofente horizontale unique :

I.1 - La technologie « verre/verre » :

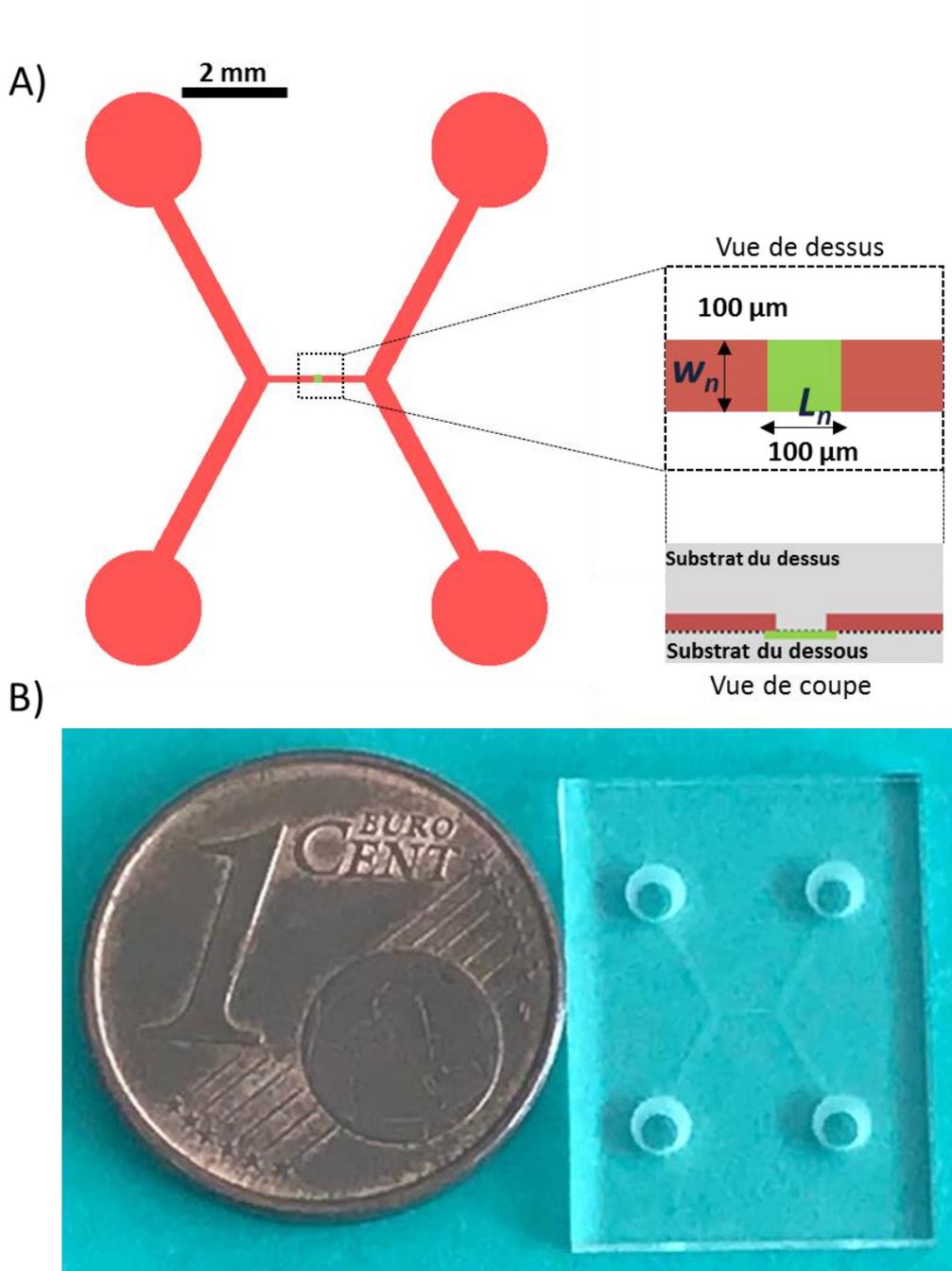


Figure 3.1 : Photographie d'une puce de nanofluidique verre/verre

De nombreux matériaux peuvent être employés pour fabriquer des puces micro/nanofluidiques. Les plus utilisés restent cependant le verre et le PDMS. Les matériaux rigides sont cependant plus adaptés à la fabrication de puces intégrant des canaux nanofluidiques car un affaissement de la structure même minime peut venir les obstruer. Le verre a donc été privilégié pour cette étude, d'autant plus qu'il est compatible avec de nombreux échantillons biologiques,

contrairement au PDMS, plus susceptible d'adsorber des molécules ou de relarguer dans le milieu des fragments non réticulés. Cependant, la perméabilité du PDMS est très importante pour certaines applications biologiques.

Une puce est constituée d'un microcanal dont la hauteur est réduite à une échelle nanométrique en son centre. Si l'on considère notre géométrie standard, la longueur du microcanal est d'environ 1 cm de long pour 100 μm de large et 1,5 μm de hauteur. Au milieu du microcanal, la hauteur h est réduite à environ 150 nm \pm 10 nm sur une longueur L_n variable, mais typiquement comprise entre 100 μm et 500 μm (100, 200,300 et 500 μm ont été testées). La largeur (100 μm) ne varie pas dans la portion nanométrique. Les puces ont soit été fabriquées dans la salle blanche du LPN en employant le protocole décrit sur la figure suivante,^{50,57} soit commandées auprès de Micronit®. En effet jusqu'au début de la thèse on utilisait un protocole de fabrication de ces puces dont la fabrication est décrite brièvement sur la Figure 3.2 ci-dessous. Cependant par soucis de gain de temps on a effectué les commandes de ces puces à Micronit. Une puce réalisée par micronit est présentée dans la Figure 3.1.

Le protocole de fabrication de ces puces, élaboré par A-C Louer,^{50,57} est décrit sur la figure suivante :

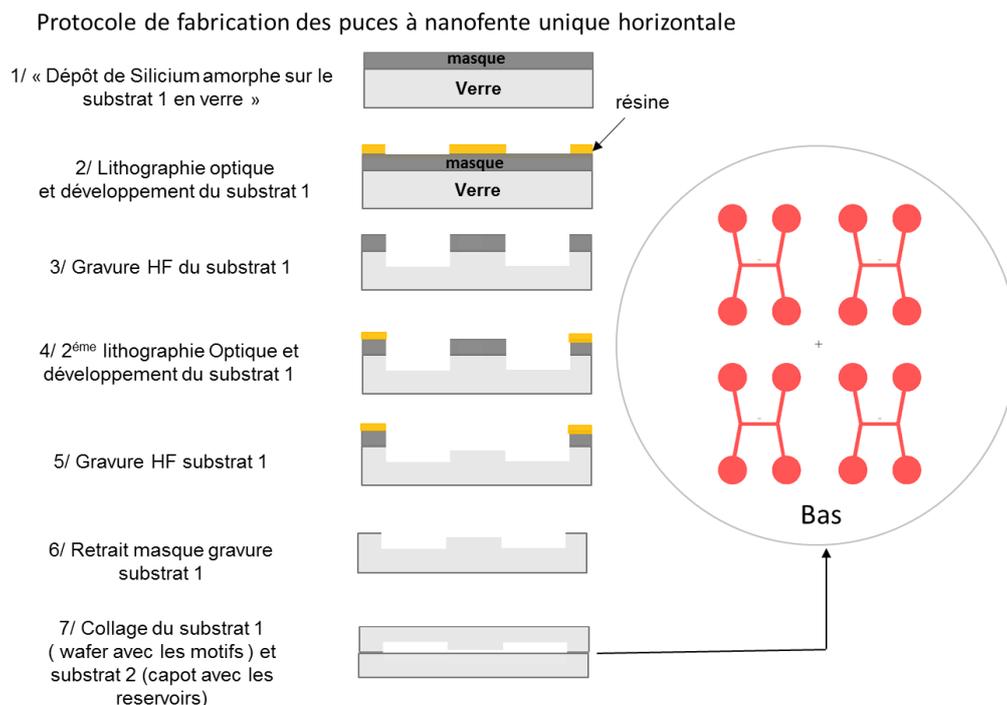


Figure 3.2: Protocole de fabrication des puces à nanofente unique horizontale

III- Mesures de conductance

La compréhension de la physique du transport ionique dans les dispositifs nanofluidiques offre de nouvelles perspectives allant de la biologie aux domaines de stockage d'énergie^{58,59,60,61,62,16}. Les progrès récents dans la fabrication de systèmes fluidiques ultra-confinés tels que les dispositifs de type « laboratoire sur puce » de taille nanométrique soulèvent des questions fondamentales sur l'influence des surfaces sur le transport des ions. En particulier, la surface des charges induit un filtrage électrostatique des ions et des effets électrocinétiques tels que l'électro-osmose, les potentiels et les courants pouvant avoir des effets importants sur la conductance dans les nanocanaux. Dans de tels

systèmes caractérisés par au moins une dimension nanométrique, le rôle de la charge de surface est exacerbée^{63,64}, et de nouveaux phénomènes tels que le transport par charge de surface et la perm-sélectivité apparaissent^{51,29}.

Le transport ionique déséquilibré entre les espèces anioniques et cationiques à travers des structures nanofluidiques initie un effet de polarisation lié au domaine de concentration, qui peut être appliqué pour focaliser et localiser à l'avance les espèces ioniques. Par rapport au champ microfluidique classique, la dimension nanométrique du canal nécessite des prédictions théoriques spécifiques et des discussions expérimentales.

Stein et coll⁶⁵ ont démontré que la loi de conductance à travers les nanocanaux dépend de la force ionique de l'électrolyte du tampon utilisé; et que la conductance variait en fonction de la profondeur (hauteur h) de la nanofente.

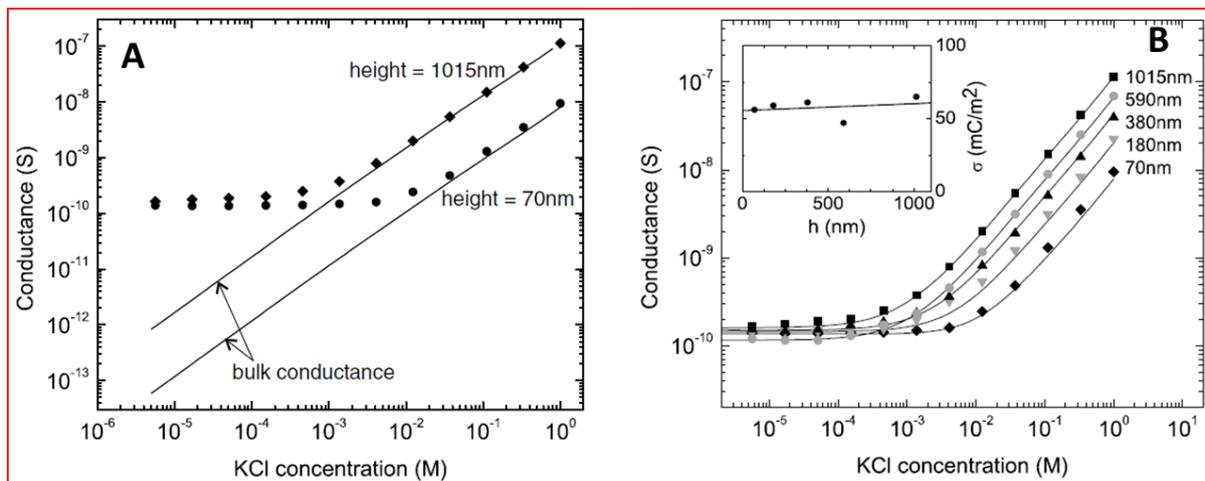


Figure 3.3: Comportement de la conductance en fonction de la concentration pour des hauteurs de nanofentes différents (D'après Stein et coll⁶⁵).

Aux concentrations élevées, dans lesquelles la longueur de Debye est bien inférieure à la hauteur du canal, la conductance à travers le nanocanal suit la conductivité de la solution ; à faible concentration correspondant à une grande longueur de Debye par rapport à la hauteur du canal, la conductance du nanocanal devient indépendante de la concentration et est entièrement régie par la charge de surface et les espèces ioniques en solution.

Comme Stein et coll⁶⁵, Schoch et coll⁶⁶ et Gamby et coll⁶⁰ ont aussi étudié ce comportement type « plateau » et ont mesuré une conductance remarquable à faible concentration dans des nanofentes qui est indépendante de la concentration du « bulk »^{66,59,60}. Schoch et coll expliquent cela par l'excès de contre-ions mobiles dans les nanofentes qui dominent à faible concentrations et concluent qu'un plateau de conductance avec une échelle log-log peut être obtenu sans chevauchement des doubles couches électriques (EDL) en raison de la dominance de la densité de charge effective en surface. Leurs expériences de modification de surface effectuées par ajustement du pH permettent de contrôler la densité de charge effective en surface σ_s ^{66,59}.

Au vu de tout cela, il devient primordial et d'un grand intérêt pour nous de développer notre propre banc de mesure de la conductance dans nos nouvelles géométries de puce. Dans ce contexte, on a utilisé dans le cadre de cette thèse la voltamétrie cyclique (VC) méthode permettant de déterminer

avec précision les propriétés électriques de la nanofente dans un dispositif micro / nano / microfluidique.

III.1- : Mesures de conductances : étude des paramètres géométriques

III.1.1 – : Rôle de la longueur de la nanofente L_n :

Plusieurs travaux ont été menés sur le rôle des surfaces dans les processus d'exclusion ionique et sur la préconcentration en étudiant l'influence de divers paramètres, comme la force ionique, le rôle du pH de l'électrolyte, la hauteur de la nanofente etc. Nous nous sommes concentrés sur le rôle de la longueur de cette dernière.

La puce a été nettoyée à l'eau déionisée. Ensuite, la solution moins concentrée de NaCl (10^{-8} mol.L $^{-1}$) a été introduite dans la puce. Après un temps de stabilisation (30 minutes), la conductance du système a été mesurée par VC (entre -1V et + 1V) comme décrit dans le chapitre II. Ces mesures ont été répétées 3 fois au minimum. Le même procédé a été utilisé pour toutes les puces en fonction de la longueur de la nanofente, en augmentant la concentration d'un ordre de grandeur ($\times 10$) à chaque fois jusqu'à atteindre la concentration de (10^{-1} mol.L $^{-1}$). Les mesures I/V brutes fournies par le potentiostat sont exploitées à l'aide du logiciel EClab (Biologic SA) donnent les pentes en conductances (G). Nous faisons la moyenne de ces valeurs et obtenons la conductance $G (= 1/R)$ de la solution au travers de nanofente. Enfin, nous traçons un graphique (Figure 3.4) montrant l'influence de la force ionique C_{NaCl} sur la conductance du système $G : \log(G) = f(\log(C_{NaCl}))$.

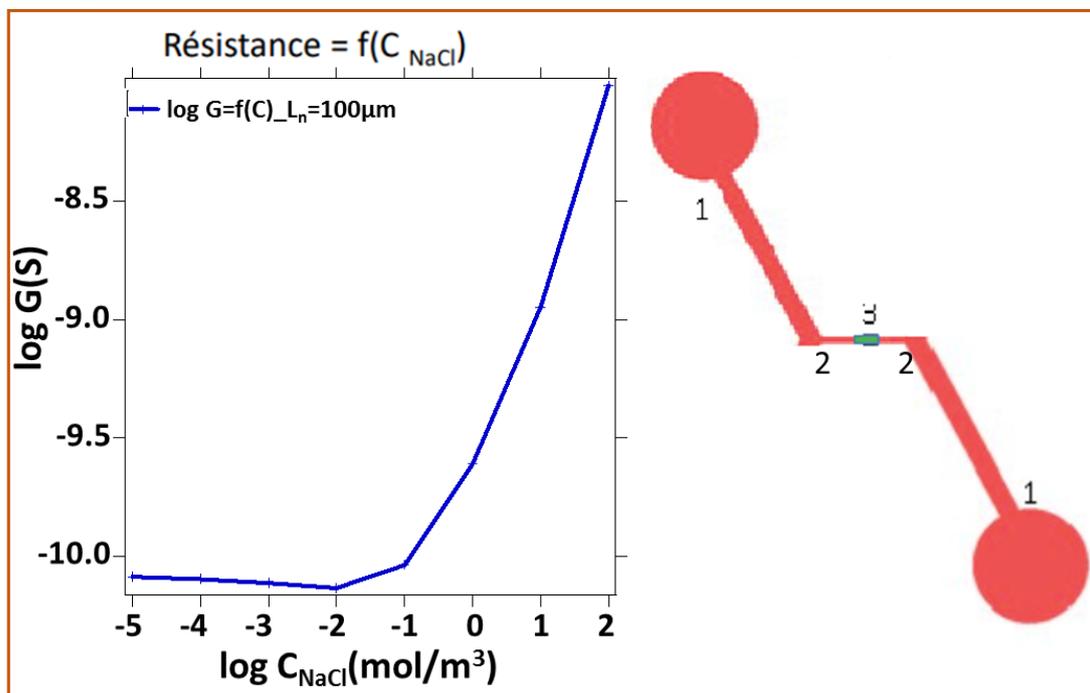


Figure 3.4: Courbe de variation de la conductance en fonction de la force ionique (concentration C_{NaCl} (mol/m³)). (1) réservoirs où sont introduits les plongeurs Ag/AgCl pour la mesure de conductance expérimentale. (2) microcanaux de part et d'autre de la nanofente. (3) portion de longueur ($L_n=100\mu m$) pour la nanofente de hauteur $h_n=150nm$ et largeur de $w_n=100\mu m$.

Nous avons effectué ces mesures pour différents longueur de la nanofente (L_n) : 100 μm à 500 μm . La comparaison de deux longueurs ($L_n = 100$ et 500 μm) est présentée sur la Figure 3.5.

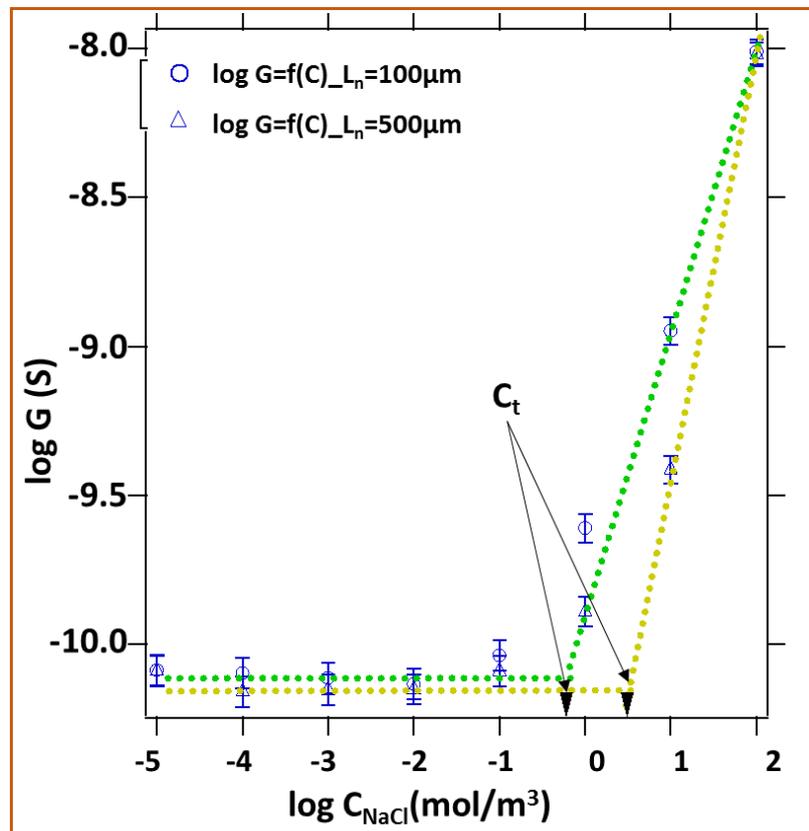


Figure 3.5: Comparaison de la variation de la conductance en fonction de la force ionique (concentration C_{NaCl} (mol/m^3)) pour deux longueurs de nanofente $L_n=100\mu\text{m}$ et $L_n=500\mu\text{m}$.

D'un point de vue qualitatif nous constatons que dans la zone de transition (autour de 1 mol/m^3) plus la longueur de la nanofente augmente, plus les valeurs de conductance diminuent. Cette tendance affecte la concentration de transition (C_t) entre les comportements surfacique et « bulk ». En effet, comme indiqué dans la Figure 3.5, la concentration de transition pour laquelle on passe d'un comportement à un autre est représentée par l'intersection des deux droites pointillées. On lit graphiquement les valeurs égales à 5 mol/m^3 pour une longueur de $L_n=500\mu\text{m}$ et 0.75 mol/m^3 pour $L_n=100\mu\text{m}$. On peut donc supposer que cet effet est bien lié à la longueur de la nanofente qui est assimilée à un filtre ionique sélectif possédant une capacité géométrique ($C_{\text{géométrique}}$) imposée par la relation suivante qui tient compte de ses dimensions:

$$C_{\text{géométrique}} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 w_n L_n}{h_n} \quad \text{Equation 3.1}$$

avec ϵ_0 est la permittivité du vide, elle est égale à $8,85 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$

ϵ_r est la permittivité du solvant, ici 80

w_n est la largeur de la nanofente (100 μm)

h_n est la hauteur de la nanofente (150 nm)

L_n : est la longueur de la nanofente, il varie entre 100 μm à 500 μm .

En effectuant l'application numérique pour les deux valeurs extrêmes de L_n , on obtient :

$$C_{Géométrique}^{500} = 2,361. 10^{-10} F \text{ et } C_{Géométrique}^{100} = 4,72. 10^{-11} F$$

Toutes choses étant égales par ailleurs, le ratio entre les capacités géométriques dépend que du ratio entre les longueurs selon la relation suivante :

$$\frac{C_{Géométrique}^{500}}{C_{Géométrique}^{100}} = \frac{l_{500}}{l_{100}} \longrightarrow C_{Géométrique}^{500} = 5C_{Géométrique}^{100} \quad \text{Equation 3.2}$$

D'après cette relation et les résultats expérimentaux que l'on a obtenu (Figure 3.5), nous avons confirmé les suppositions de Gamby et coll⁶⁰ qui prédisait que la conductance de la nanofente pourrait être modulée en augmentant la capacité, et donc la longueur de celle-ci.

III.2- Modélisation de la conductance globale à travers une nanofente horizontale

III.2.1 – Modèle simplifié

Dans une première approche, nous avons étudié le système composé de la nanofente et de la solution qu'elle contient. Deux origines principales de la conductance ont déjà été identifiées^{65,66,60}: la conductance volumique (G_V) et la conductance en surface (G_S). A priori, à l'échelle nanométrique, nous ne pouvons pas négliger un terme par rapport à l'autre, d'où la relation :

$$G^{nano} = G_V^{nano} + G_S^{nano} \quad \text{Equation 3.3}$$

G_V est la conductance au centre de la solution (« bulk » en anglais) dans la nanofente; elle varie linéairement avec la concentration et la mobilité des ions. G_S est la conductance de la solution près des parois solides de la nanofente dans la double couche diélectrique. Cette couche compense les charges de surface (côté paroi : négatives dans ce cas) en ne contenant que des ions de charges opposées (côté solution : principalement des cations). La conductance à l'intérieur de cette couche est totalement différente de celle au cœur de la solution. La double couche diélectrique est caractérisée par la longueur de Debye, λ_D , qui dépend de la force ionique (voir Figure 1.2-C illustrant l'interface nanofente/fluide). La longueur de Debye λ_D dépend sur la force ionique de la solution.

A- Conductance volumique dans la nanofente

La hauteur h de la nanofente étant très faible (une centaine de nanomètres), l'épaisseur de cette double couche diélectrique peut devenir non négligeable et affecter la conductivité totale. En effet, si l'on considère le cas extrême pour lequel, $\lambda_D = \frac{h_n}{2}$, la nanofente est presque complètement fermée aux anions.

Ainsi, comme démontré dans d'autres travaux issus de la littérature^{60,67,68}, l'expression de la conductance au sein du volume de la nanofente est définie comme suit :

$$G_V^{nano} = F \sum_i \mu_i [i] h_n \frac{w_n}{L_n} \quad \text{Equation 3.4}$$

où μ_i est la mobilité ionique de l'espèce ionique i , F est la constante de Faraday, h_n , w_n et L_n sont respectivement, la hauteur, la largeur et la longueur de la nanofente.

B- Conductance surfacique dans la nanofente

La conductance de surface est indépendante de la concentration ionique ; elle dépend uniquement de la nature des charges en surface (d'où σ_s) et de la mobilité des cations. Nous avons utilisé l'expression suivante admise dans la littérature^{60,66} :

$$G_S^{nano} = 2 \mu_+ \sigma_s \frac{w_n}{L_n} \quad \text{Equation 3.5}$$

où σ_s est la charge de surface du verre.

Enfin, du fait que les puces aient plusieurs longueurs, nous avons l'équation globale suivante :

$$G^{nano} = F \sum_i \mu_i [i] h_n \frac{w_n}{L_n} + 2\mu_+ \sigma_s \frac{w_n}{L_n} \quad \text{Equation 3.6}$$

Pour ce premier essai, nous avons pris directement Equation 3.6 et considérons que les solutions ne contenaient que le cation (Na^+) et le contre-ion (Cl^-).

Les quatre paramètres d'ajustement ont donc été définis comme étant : μ_+ , μ_- , σ_s et h_n .

Dans le premier test d'ajustement, nous avons laissé tous les paramètres varier pour atteindre la courbe d'ajustement la plus proche avant d'imposer certains d'entre eux. Comme attendu, les ajustements libres peuvent conduire visuellement à de bons résultats d'ajustements en termes de coefficients de corrélation mais la hauteur du canal et les mobilités ioniques déduites étaient radicalement différentes de leurs valeurs théoriques et variaient beaucoup selon la solution étudiée alors qu'elles devraient être les mêmes. Nous avons ensuite fixé soit les dimensions géométriques (h_n , w_n , L_n), soit les deux mobilités ioniques et la charge de surface. De plus, si on fixe les mobilités à leurs valeurs théoriques, on obtient des valeurs incohérentes de la hauteur de la nanofente h_n . Réciproquement, lorsqu'on fixe la hauteur de la nanofente et la longueur de celle-ci, ceci conduit à des valeurs non homogènes la charge de surface. Des illustrations des résultats obtenus pour NaCl sont représentées sur la Figure 3.6.

Finalement, nous n'avons pas pu parvenir à une bonne adéquation entre les valeurs expérimentales et les ajustements avec ce modèle simplifié quand la longueur L_n de la fente varie avec une hauteur identique h_n .

4 paramètres	Puce $L_n=100$	Puce $L_n=500$
$h(m)$	$1.5 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-7}$
$\mu_{Na} (m^2V^{-1}s^{-1})$	$5.2 \cdot 10^{-8}$	$5.2 \cdot 10^{-8}$
$\mu_{Cl} (m^2V^{-1}s^{-1})$	$7.91 \cdot 10^{-8}$	$7.91 \cdot 10^{-8}$
σ_s	0.05	0.05
w_n	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-4}$
L_n	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$5.0 \cdot 10^{-4}$

Tableau 3.1: Valeurs pour la simulation de la conductance en bloquant les paramètres. Voir figure 3.6-A et 3.6-B.

4 paramètres	Puce $L_n=100$	Puce $L_n=500$
$h(m)$	$1.5 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-7}$
$\mu_{Na} (m^2V^{-1}s^{-1})$	$5.2 \cdot 10^{-8}$	$5.2 \cdot 10^{-8}$
$\mu_{Cl} (m^2V^{-1}s^{-1})$	$7.91 \cdot 10^{-8}$	$7.91 \cdot 10^{-8}$
σ_s	0.00075	0.0035
w_n	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-4}$
L_n	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$5.0 \cdot 10^{-4}$

Tableau 3.2: Valeurs déterminées pour l'ajustement de la conductance en imposant les paramètres mais en laissant σ_s libre. Voir figure 3.6-C et 3.6-D.

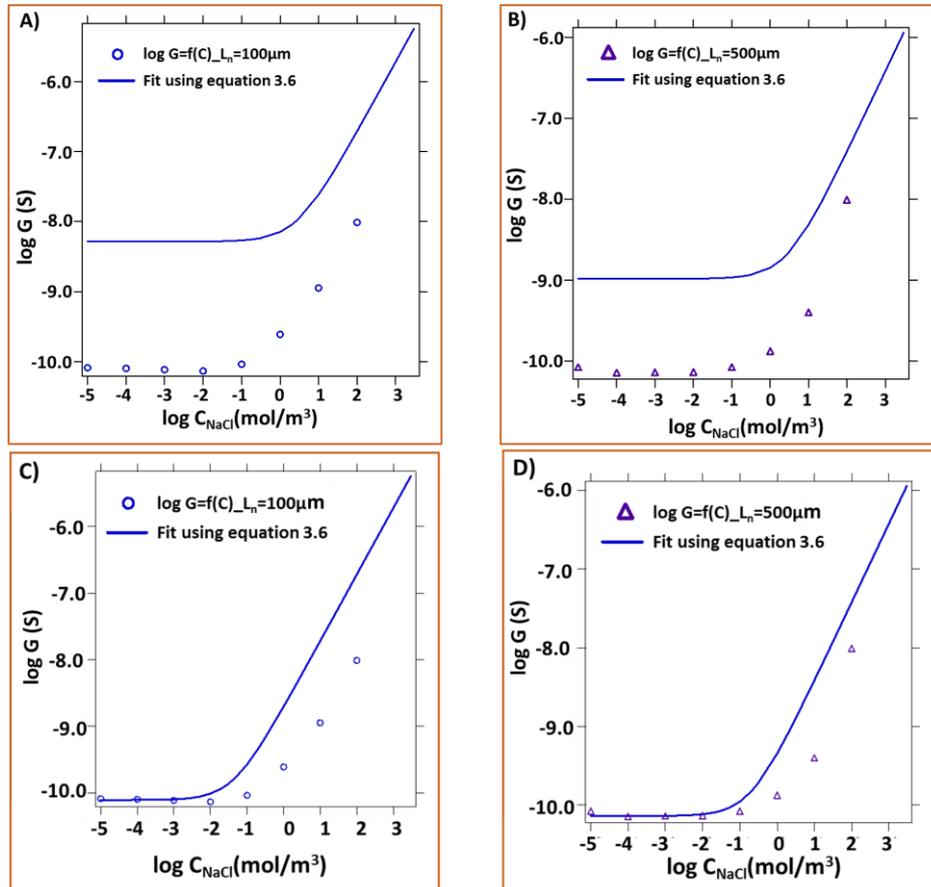


Figure 3.6: Les différentes courbes obtenues par l'équation 3.6 (modèle d'ajustement simplifié) pour les solutions NaCl à différentes concentrations ioniques : A), B) tous les paramètres sont fixés à leurs valeurs théoriques attendues (tableau 3.1). C) et D) σ_s est libre et tous les autres paramètres ont été fixés (Tableau 3.2).

III.2.2 – Modèle amélioré (8 paramètres)

Deux éléments principaux qui peuvent influencer la conductance de la solution G_V dans la nanofente : le pH de la solution et la nature de l'interface nanofente/liquide,⁶⁷ n'ont pas été pris en compte dans l'équation 3.6.

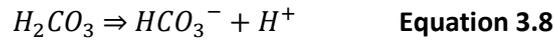
Nous avons donc décidé de tenir compte du fait que nos solutions étaient plus complexes que dans notre première approximation. Deux autres types d'ions ont été inclus dans notre deuxième modèle pour tenir compte du fait, que les solutions ne sont pas décarbonatées: H^+ et HCO_3^- . Si on reprend l'équation 3.6 largement utilisée dans la littérature, nous devons calculer les concentrations de ces différentes espèces pour déterminer la conductance réelle en solution.

Premièrement, par définition la concentration des protons donnée par la relation :

$$[H^+] = 10^{-pH+3} \quad \text{Equation 3.7}$$

exprimée mol.m⁻³

Nous savons alors que l'eau liquide en équilibre avec l'air à 20°C a une concentration en acide carbonique d'environ $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. L'équilibre suivant (Equation 3.8) pour formation de l'ion HCO_3^- doit être pris en compte



avec
$$K_c = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = 10^{-6,37} \quad \text{Equation 3.9}$$

ainsi :
$$[\text{HCO}_3^-] = 10^{-8,29+pH} \quad \text{Equation 3.10}$$

exprimée mol.m^{-3}

Enfin, la solution étant électriquement neutre, nous pouvons relier les concentrations entre-elles avec l'équation de l'électroneutralité suivante :

$$[\text{H}^+] + [\text{Na}^+] = [\text{HCO}_3^-] + [\text{Cl}^-] \quad \text{Equation 3.11}$$

Ceci conduit aux expressions suivantes pour les différentes concentrations ioniques (C étant la concentration de NaCl dissocié dans la solution). Le fait que ces concentrations ioniques soient liées entre-elles permettent d'éviter que les paramètres d'ajustements varient de façon indépendantes les unes des autres. Cette approche réduit ainsi le nombre de paramètres inconnu pour l'ajustement des courbes expérimentales.

$[\text{H}^+] = 10^{-pH+3} \quad \text{mol. m}^{-3}$ $[\text{HCO}_3^-] = 10^{-8,29+pH} \quad \text{mol. m}^{-3}$ $[\text{Na}^+] = C \quad \text{mol. m}^{-3}$ $[\text{Cl}^-] = C + 10^{-pH+3} - 10^{-8,29+pH} \quad \text{mol. m}^{-3}$	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Equation 3.12</div>
---	---

Une autre manière d'augmenter la qualité des ajustements est aussi de lier ces paramètres à la conductance surfacique G_s . Les principales charges superficielles dans la puce tout en verre sont dues à l'équilibre (Equation 3.13) entre les groupes SiOH et SiO⁻ à l'interface solide/liquide :



$$\sigma_s = e \cdot \frac{\Gamma_{\text{SiOH}} \cdot 10^{-pK_c}}{10^{-pK_c} + 10^{-pH}} \quad \text{Equation 3.14}$$

avec $\Gamma_{\text{SiOH}} = 8 \text{ nm}^{-2}$

Enfin, le modèle amélioré se résume à l'équation suivante :

$$G^{nano} = \frac{w_n}{L_n} \left(F \sum_i \mu_i [i] h_n + 2 \mu_+ e \frac{\Gamma_{\text{SiOH}} 10^{-pK_c}}{10^{-pK_c} + 10^{-pH}} \right) \quad \text{Equation 3.15}$$

où [i] correspond aux concentrations ioniques définies par l'équation 3.12.

Dans le cas des nanofentes avec $L_n=w_n=100 \mu\text{m}$, le terme (w_n/L_n) disparaît dans l'expression de l'équation 3.15.

Au final, huit paramètres pourraient varier sur cette nouvelle équation d'ajustement : le pH, le pKc, la concentration surfacique Γ , la hauteur h_n du canal, et les mobilités μ des quatre ions.

Comme pour le modèle précédent, nous avons pu faire plusieurs types de simulations avec cette équation. Nous avons essayé de faire varier tous les paramètres. Puis nous avons fixé les mobilités ou la hauteur. Les résultats sont présentés au tableau 3.3.

8 paramètres	Puce $L_n=100$	Puce $L_n=500$
pKc	7.70	7.70
pH	4.78	4.78
h (m)	$1.5 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-7}$
μ_{Na} ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$5.2 \cdot 10^{-8}$	$5.2 \cdot 10^{-8}$
μ_{Cl} ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$7.91 \cdot 10^{-8}$	$7.91 \cdot 10^{-8}$
μ_{H} ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$3.63 \cdot 10^{-7}$	$3.63 \cdot 10^{-7}$
μ_{HCO_3} ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$4.65 \cdot 10^{-8}$	$4.65 \cdot 10^{-8}$
Γ_{SiOH} (m^{-2})	$2 \cdot 10^{18}$	$2 \cdot 10^{18}$
w_n	$100 \cdot 10^{-6}$	$100 \cdot 10^{-6}$
L_n	$100 \cdot 10^{-6}$	$500 \cdot 10^{-6}$
χ^2	1.61	1.62

Tableau 3.3: Valeurs déterminées pour les paramètres d'ajustement en fixant les mobilités en utilisant l'équation 3.15.

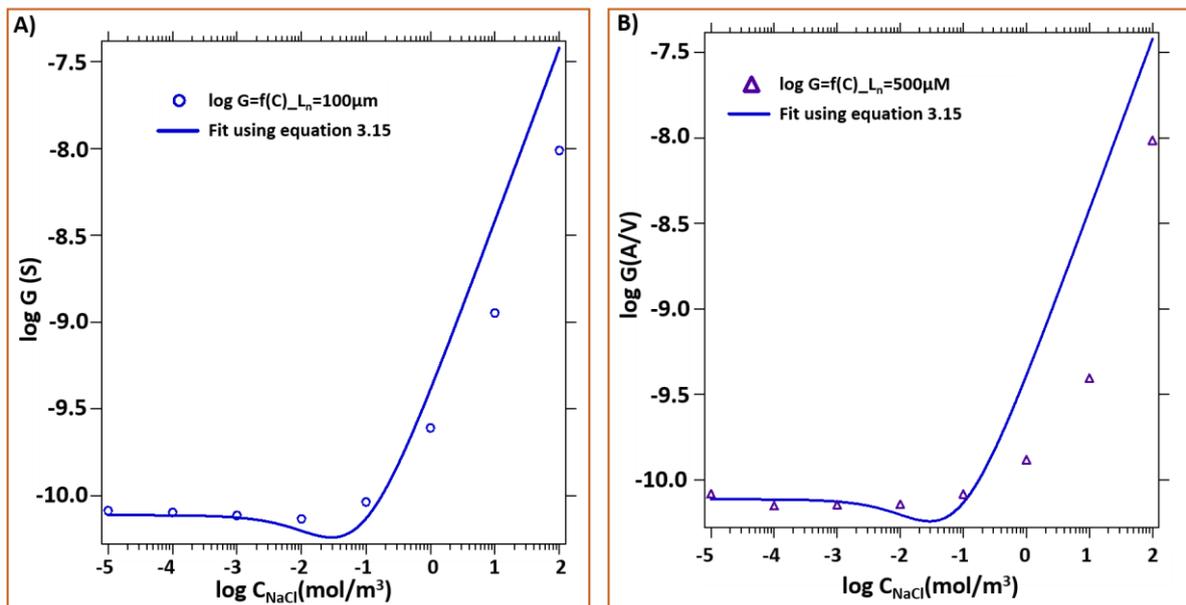


Figure 3.7: Deux exemples de courbes ajustées avec l'équation 3.15 (modèle d'ajustement amélioré) pour conductances expérimentales en fonction de la concentration ionique en NaCl en fixant les mobilités : A) $L_n=100\mu\text{m}$ et B) $L_n=500\mu\text{m}$.

Ce modèle amélioré a permis de mieux se rapprocher des points expérimentaux que ne l'était le modèle simplifié. En effet, comme le montre le tableau 3.3, même si les valeurs semblent cohérentes avec ce qui est donné dans la littérature la modélisation de la partie « bulk » n'est pas aboutie.

Ce modèle a donc donné des résultats encourageants. Toutefois, il doit encore être affiné et des questions subsistent car en laissant, cette fois ci, les mobilités libres (voir Figure 3.8), on aboutit à une très bonne qualité des ajustements mais les valeurs trouvées pour les mobilités (tableau 3.4) n'ont pas de sens physique (valeurs négatives pour certaines d'entre-elles).

8 paramètres	Puce $L_n=100$	Puce $L_n=500$
pKc	7.70	7.70
pH	4.78	4.78
h (m)	$1.5 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-7}$
μ_{Na} ($m^2V^{-1}s^{-1}$)	$2.41656 \cdot 10^{-8}$	$-1.40457 \cdot 10^{-7}$
μ_{Cl} ($m^2V^{-1}s^{-1}$)	$1.27748 \cdot 10^{-8}$	$1.60718 \cdot 10^{-7}$
μ_H ($m^2V^{-1}s^{-1}$)	$-3.7861 \cdot 10^{-8}$	$-1.11216 \cdot 10^{-7}$
μ_{HCO_3} ($m^2V^{-1}s^{-1}$)	$9.32756 \cdot 10^{-5}$	$9.32756 \cdot 10^{-5}$
Γ_{SiOH} (m^{-2})	$2 \cdot 10^{18}$	$2 \cdot 10^{18}$
w_n	$100 \cdot 10^{-6}$	$100 \cdot 10^{-6}$
l_n	$100 \cdot 10^{-6}$	$500 \cdot 10^{-6}$
χ^2	0.016	0.098

Tableau 3.4: Valeurs déterminées pour les paramètres d'ajustement en faisant varier les mobilités et en fixant tous les autres paramètres (Equation 3.15).

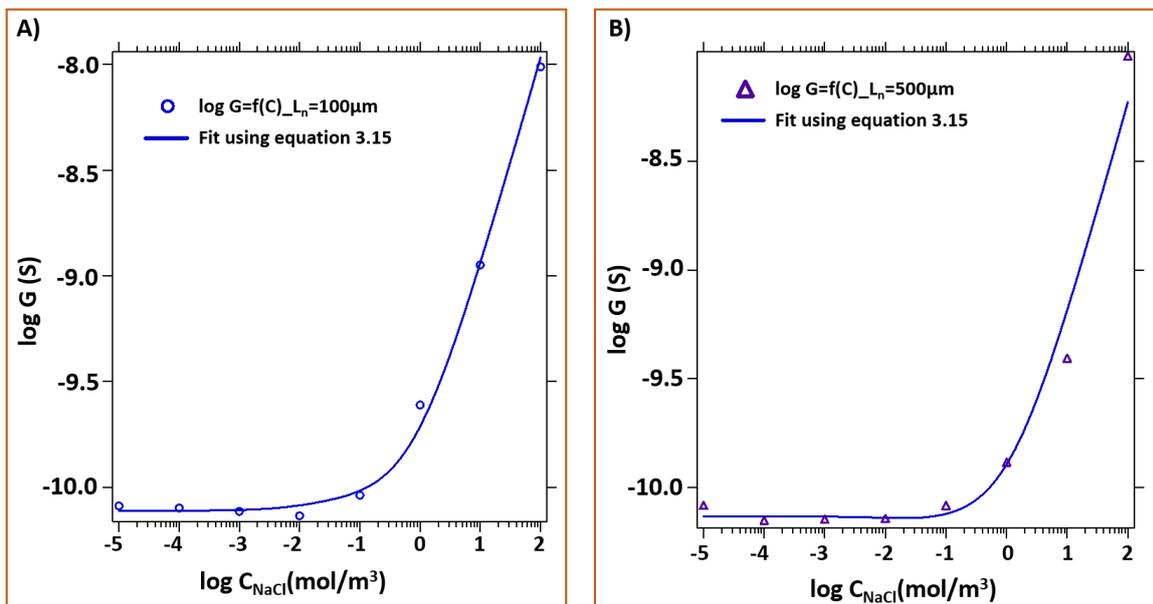


Figure 3.8: Les différentes courbes obtenues par l'équation 3.15 (modèle d'ajustement amélioré) pour les solutions NaCl en faisant varier les mobilités et en fixant tous les autres paramètres: A) $L_n=100\mu m$ et B) $L_n=500\mu m$.

III.1.3 – Modèle Complet - Modélisation de la conductance à travers une structure micro-Nano-Micro (MNM)

Nous avons vu qu'une modélisation simple ne représentait la réalité de la conductance dans une nanofente dès lors que l'on fait varier un paramètre telle que la longueur de celle-ci. Nous avons aussi vu que même un modèle amélioré avec des ajustements en belle apparence qualitative n'ont pas de véritable sens physique. Toutes ces observations nous ont mis sur la piste d'un autre facteur à prendre en compte sur la partie « bulk ». C'est pour cela que l'influence des microcanaux centraux et externes a vraisemblablement une influence sur la conductance apparente mesurée. Nous avons donc exploré cette piste en regardant de plus près les dimensions géométriques précises notre dispositif micro/nano/micro-fluidique pour les prendre en compte dans notre modèle complet. En effet, comme le montre la figure (Figure 3.9), la puce MNM possède plusieurs branches et des interfaces de transition micro/nano. Afin d'améliorer encore la qualité du modèle et de mieux comprendre la variation de conductance dans nos mesures, nous devons prendre en compte de ces facteurs géométriques.⁶⁹

A- Influence réelle de la géométrie MNM

En effet, la plupart des études considèrent que la structure ayant un nanofente, est la seule responsable de la conductance totale du système. Cependant, celle-ci peut être partiellement ou complètement fautive selon la géométrie (rapports d'aspect) de la puce et des concentrations ioniques introduites. Afin de savoir quelles parties ou branches du système MNM peuvent être négligées, nous allons procéder aux hypothèses suivantes détaillées dans les paragraphes qui suivent.

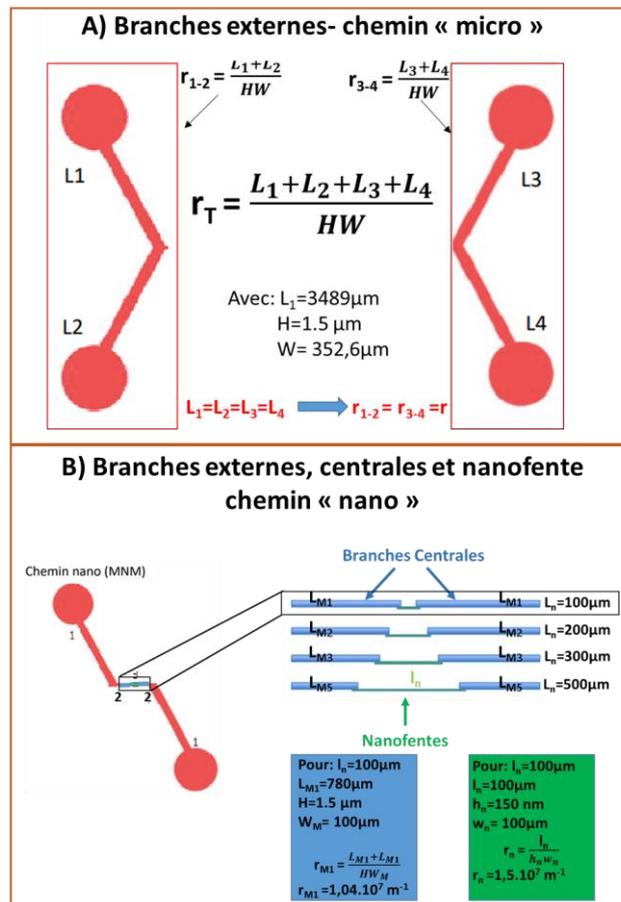


Figure 3.9 : Caractéristiques géométriques des branches (externes et centrales) et des interfaces de transition micro/nano étudiés dans ce chapitre.

Comme le montre la Figure 3.9, nous pouvons séparer notre système en 3 zones : les deux microcanaux (branches externes (1)), les microcanaux latéraux (branches centrales (2)) et la nanofente (3), ainsi que les interfaces de transition ((1->2) et (2->3)). Toutes ces zones peuvent être modélisées par des résistances en série (voir figure 3.10). Nous y reviendrons ultérieurement.

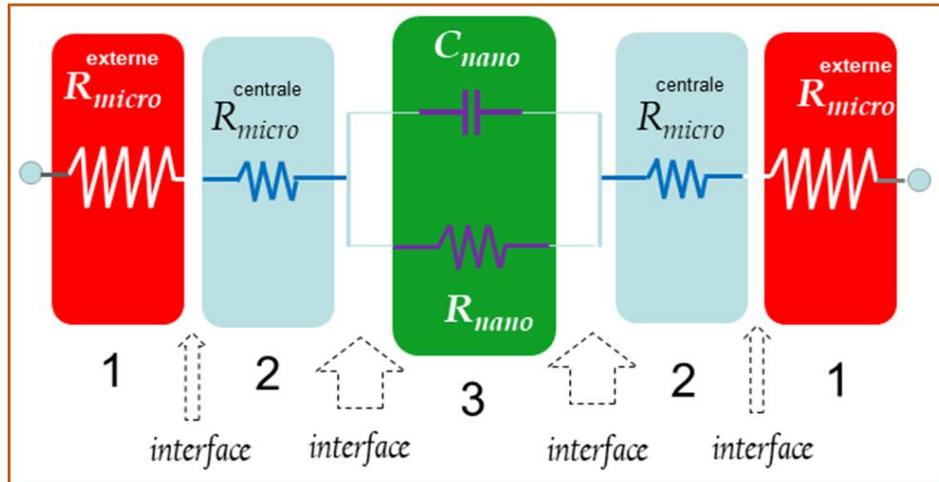


Figure 3.10 : Circuit électrique équivalent de la structure MNM. Zone 1 : résistance globale dans les branches externes. Zone 2 : résistance globale dans les branches centrales. Zone 3 : la nanofente est assimilée à un filtre ionique où C_{nano} correspond à la capacité géométrique (voir équation 3.1) et R_{nano} correspond à la résistance globale de la nanofente.

Sur ces critères, nous voyons clairement que nous ne pouvons pas négliger l'influence de la conductance dans les branches externes, centrales par rapport à la conductance apparente mesurée pour la nanofente. Le problème est de savoir comment nous allons les prendre en compte dans notre modèle globale.

Comme exemple, on voit sur la figure 3.9 ci-dessus le chemin « micro » ou chemin « nano », pour lesquels les rapports géométriques sont définis comme suit:

$$r = \frac{L_1 + L_2}{HW} \quad \text{ou} \quad r_n = \frac{l_n}{h_n w_n} \quad \text{Equation 3.16}$$

avec : L_1 et L_2 : étant les longueurs des 2 branches

H : hauteur (profondeur) des branches, h_n : hauteur de la nanofente

W : largeur des branches ; w_n : largeur de la nanofente

Longueur de la nanofente μm	Rapport géométrique Chemin Micro		Rapport géométrique Chemin Nano	
	Branches externes		Branches centrales	Nanofente
$L_n = 100 \mu\text{m}$	$r = 1,32 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_t = 2,64 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_{M1} = 1,04 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_n = 1,5 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$
$L_n = 200 \mu\text{m}$	$r = 1,32 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_t = 2,64 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_{M2} = 0,97 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_n = 3 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$
$L_n = 300 \mu\text{m}$	$r = 1,32 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_t = 2,64 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_{M3} = 0,907 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_n = 4,5 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$
$L_n = 500 \mu\text{m}$	$r = 1,32 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_t = 2,64 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_{M5} = 0,773 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$	$r_n = 7,5 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$

Tableau 3.5 : Etude de l'influence des branches externes et centrales par rapport à la nanofente en fonction de la longueur de la nanofente.

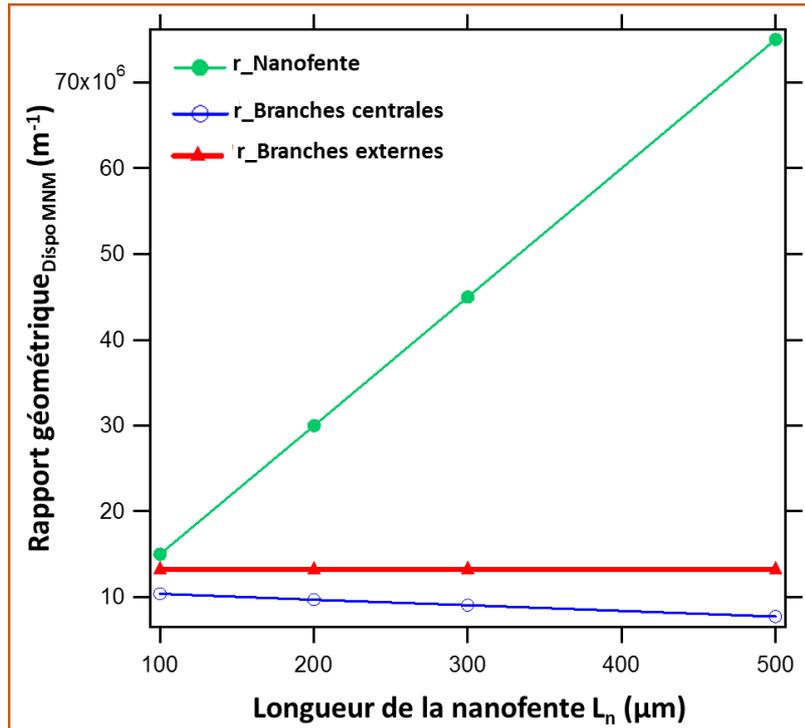


Figure 3.11 : Droites de variation du rapport géométrique en fonction des zones (1), (2) et (3) dans les structures micro-nano-microfluidiques (MNM).

L'évolution des rapports géométriques en fonction de la géométrie des dispositifs MNM est tracée dans la figure 3.11. On peut en déduire différentes informations. Premièrement, l'influence des branches externes est loin d'être négligeable et a un rapport constant quel que soit la longueur du dispositif. Ce résultat n'est pas très surprenant dès lors que cette partie de la puce reste identique. Puisque ce rapport est théoriquement constant, on peut donc envisager de la supprimer mathématiquement par une procédure de déconvolution. Nous y reviendrons ultérieurement. Deuxièmement, nous remarquons que l'influence des branches centrales est elle aussi non négligeable. Toutefois, contrairement aux branches externes cette influence diminue à mesure que la longueur de la nanofente augmente au détriment de la longueur des branches centrales (cf. Figure 3.9-B). Troisièmement, en adéquation avec les observations précédentes, l'influence de la longueur de la nanofente est bien la plus importante. Cette influence est sans commune mesure avec les systèmes MNM (longueur unique $L_n=100\mu\text{m}$) que nous utilisons jusqu'ici.

En conclusion, cette analyse met bien en évidence le rôle du facteur géométrique où l'on note clairement un comportement totalement différent entre les longueurs 100 et 500 μm et permettent de comprendre pourquoi les modélisations doivent absolument prendre en compte ce rapport géométrique.

B- Influence du « Duhkin number »

Ensuite, comme nous l'avons rappelé précédemment chaque partie du système MNM peut contribuer à la conductance globale à la fois par des conductances volumiques et surfaciques. Le système peut être modélisé par un circuit équivalent, comme illustré à la Figure 3.12.

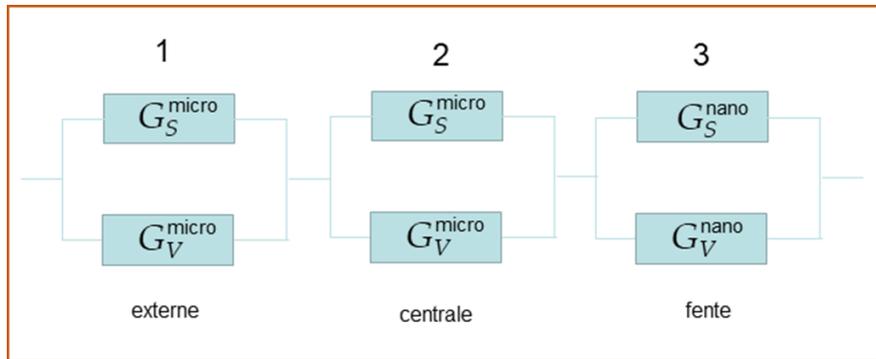


Figure 3.12 : Circuit électrique équivalent illustrant la contribution des effets de surface et en volume sur la conductance globale dans les zones 1 à 3 (voir équation 3.6). Zone 1 : conductance globale dans les branches externes. Zone 2 : conductance globale dans les branches centrales. Zone 3 : conductance globale dans la nanofente.

Il faut donc aussi déterminer dans quels domaines de concentrations ioniques nous avons la prédominance de la conductance volumique (G_v) par rapport à la conductance surfacique (G_s) (équation 3.6). Cette détermination peut être effectuée en calculant le nombre de Duhkin (Du) pour chaque partie du système et pour chaque concentration ionique (C)^{68,70}. En effet, ce nombre adimensionnel prédit dans quelle plage de concentration ionique la conductance de surface est pertinente ($Du \gg 1$) ou non ($Du \ll 1$) :

$$Du = \frac{\text{conductance de surface}}{\text{conductance de volume}} \quad \text{Equation 3.17}$$

$$Du = \frac{G_s}{G_v} \approx \frac{\sigma_s}{Fh_n z C_0} \quad \text{Equation 3.18}$$

où σ_s est la charge de surface, F est la constante de Faraday et z est la valence ionique.

La charge de surface sur le verre est calculée selon l'équation 3.14 avec $\Gamma_{\text{SiOH}} = 8 \text{ nm}^2$, $\text{pK} = 6,37$ et $\text{pH} = 5$.

Comportement « Permselective »							Comportement « bulk »						
Nanofente							Branches externes et centrales						
pK	pH	H(m)	F (sA/mol)	σ (C/m ²)	C (mol/m ³)	Du (NaCl)	pK	pH	H(m)	F (sA/mol)	σ (C/m ²)	C (mol/m ³)	Du (NaCl)
6,37	5	1,5.10 ⁻⁷	96485,3329	5,24.10 ⁻²	100	3,62.10 ⁻²	6,37	5	1,5.10 ⁻⁶	96485,3329	5,24.10 ⁻²	100	3,62.10 ⁻³
Transition 10 ⁻³ mol/L →					10	3,62.10 ⁻¹	Transition 10 ⁻⁴ mol/L →					10	3,62.10 ⁻²
					1	3,62						1	3,62.10 ⁻¹
					0,1	3,62.10 ⁻¹						0,1	3,62
					0,01	3,62.10 ⁻²						0,01	3,62.10 ⁻¹
					0,001	3,62.10 ⁻³						0,001	3,62.10 ⁻²
					0,0001	3,62.10 ⁻⁴						0,0001	3,62.10 ⁻³
					0,00001	3,62.10 ⁻⁵						0,00001	3,62.10 ⁻⁴

Tableau 3.6 : Etude du nombre de Duhkin en fonction de la concentration ionique pour la nanofente et pour les branches externes et centrales.

Dans le tableau 3.6, il est intéressant de remarquer que la conductance de surface montre qu'à de très faibles concentrations, la conductivité de surface doit être prise en compte, même dans les microcanaux (branches externes et centrales). De plus, cette observation est en cohérence avec le rapport x10 entre la hauteur des microcanaux par rapport à celle de la nanofente. En effet, la transition entre les deux comportements est observée à 1 et à 0,1 mol.m³.

C- Modèle Complet

Enfin, au regard du fait que les simplifications ne puissent pas être opérées comme présentées dans la plupart des travaux, la résistance totale que nous nommerons désormais, R^{totale} doit prendre en compte toutes les contributions suivantes en plus de la conductance de la nanofente :

$$R^{totale} = R_{externe}^{micro} + R_{centrale}^{micro} + R_{interface}^{micro/nano} + \frac{1}{G^{nano}} \quad \text{Equation 3.19}$$

Ainsi, la conductance globale peut s'écrire sous la forme :

$$G^{totale} = \frac{1}{R_{externe}^{micro} + R_{centrale}^{micro} + R_{interface}^{micro/nano} + \frac{1}{G^{nano}}} \quad \text{Equation 3.20}$$

Ou bien

$$G^{totale} = G^{nano} \frac{1}{1+\gamma_g} \quad \text{Equation 3.21}$$

avec

$$\gamma_g = G^{nano} (R_{externe}^{micro} + R_{centrale}^{micro} + R_{interface}^{micro/nano}) \quad \text{Equation 3.22}$$

D'après l'équation 3.22, le nombre sans dimension γ_g que nous avons établi dépend de la conductance de la nanofente G_{nano} et des résistances des microcanaux (externes et centraux) et des interfaces. Cela peut fortement dépendre de la concentration ionique. Nous supposons que ces influences se

cumulent et peuvent donc être représentées par le paramètre γ_g qui sera l'image du facteur géométrique dans nos systèmes MNM pour aboutir au modèle complet.

Enfin, après toutes les considérations précédentes, nous incluons le pH, les mobilités ioniques μ_i , la constante d'équilibre des réactions de surface verre-eau (pKc), la hauteur des microcanaux et nanofente (h_n), et la densité de groupes SiOH à la surface du verre Γ_{SiOH} .

L'équation 3.15 est ainsi adaptée en ajoutant un facteur géométrique K_g pour prendre en compte l'influence des microcanaux et des interfaces micro/ nano lors de la mesure de conductance dans une structure MNM.

$$G^{totale} = \frac{1}{1+\gamma_g} \left\{ \frac{w_n}{L_n} \left(F \sum_i \mu_i [i] h_n + 2 \mu_+ e \frac{\Gamma_{\text{SiOH}} 10^{-\text{pKc}}}{10^{-\text{pKc}} + 10^{-\text{pH}}} \right) \right\} \quad \text{Equation 3.23}$$

Ou plus encore

$$G^{totale} = K_g \left\{ \left(F \sum_i \mu_i [i] h_n + 2 \mu_+ e \frac{\Gamma_{\text{SiOH}} 10^{-\text{pKc}}}{10^{-\text{pKc}} + 10^{-\text{pH}}} \right) \right\} \quad \text{Equation 3.24}$$

$$\text{avec } K_g = \frac{1}{1+\gamma_g} \times \frac{w_n}{L_n} \quad \text{Equation 3.25}$$

❖ Modélisation des microcanaux externes

Comme présenté dans la section expérimentale (cf. chapitre 2 - Figure 2.1) et à la Figure 3.9, la conductance globale est cette fois mesurée suivant le « chemin micro » de façon à pouvoir évaluer clairement l'influence des branches externes en accord avec les observations précédentes (Tableau 3.5 et Figure 3.11). Nous avons simulé les points expérimentaux pour chaque chemin « nano » et « micro » dans chacune des puces ($L_n=100 \mu\text{m}$ à $500 \mu\text{m}$). Pour ne pas surcharger les figures nous ne présentons que les résultats pour 100 et 500 sachant que les chemins « micro » pour toutes les puces sont théoriquement identiques si on ne passe pas par la nanofente. Dans un premier temps, pour chaque type de puce MNM, les mobilités sont fixées ainsi que les hauteurs des nanofentes et des microcanaux externes (150 nm et 1500 nm). Ensuite, nous avons fixé le pKc et le pH. Les graphiques résultants et les meilleurs paramètres sont illustrés à la Figure 3.13. Les ajustements fonctionnent mieux et nous trouvons un couple de paramètres géométriques (h_n , K_g) qui correspond mieux aux courbes expérimentales et prend en compte les deux hauteurs, à la fois pour les chemins « micro » et « nano ». Nous remarquons également que les valeurs des mobilités ioniques μ , Kc, [H+], Γ_{SiOH} restent dans une gamme raisonnable, et ce, avec un coefficient de variation χ^2 acceptable (voir Tableaux 3.7).

paramètres	Puce L _n =100 Chemin "nano"	Puce L _n =100 Chemin "micro"	Puce L _n =500 Chemin "nano"	Puce L _n =500 Chemin "micro"
pKc	6,27	6,98	6,76	6,62
pH	4,44	5,17	3,56	4,08
h _n (m)	1,5 10 ⁻⁰⁷	1.5 10 ⁻⁰⁶	1,5 10 ⁻⁰⁷	1.5 10 ⁻⁰⁶
μ _{Na} (m ² V ⁻¹ s ⁻¹)	5,87 10 ⁻⁰⁸	5.2 10 ⁻⁰⁸	5,2 10 ⁻⁰⁸	5.2 10 ⁻⁰⁸
μ _{Cl} (m ² V ⁻¹ s ⁻¹)	7,91 10 ⁻⁰⁸	7.91 10 ⁻⁰⁸	7,91 10 ⁻⁰⁸	7.91 10 ⁻⁰⁸
μ _H (m ² V ⁻¹ s ⁻¹)	4,75 10 ⁻⁰⁷	3.63 10 ⁻⁰⁷	3,63 10 ⁻⁰⁷	3.63 10 ⁻⁰⁷
μ _{HCO₃} (m ² V ⁻¹ s ⁻¹)	3,35 10 ⁻⁰⁸	4.65 10 ⁻⁰⁸	4,65 10 ⁻⁰⁸	4.65 10 ⁻⁰⁸
Γ _{SiOH} (m ⁻²)	8 10 ⁺¹⁸	7,95 10 ⁺¹⁸	8,15 10 ⁺¹⁸	8,55 10 ⁺¹⁸
Kg	0,046	0,028	0,031	0,016
χ ²	0,023	0,078	0,097	0,51

Tableau 3.7: Valeurs déterminées pour les paramètres d'ajustement en suivant soit le chemin « nano » ou le chemin « micro » en utilisant l'équation 3.24.

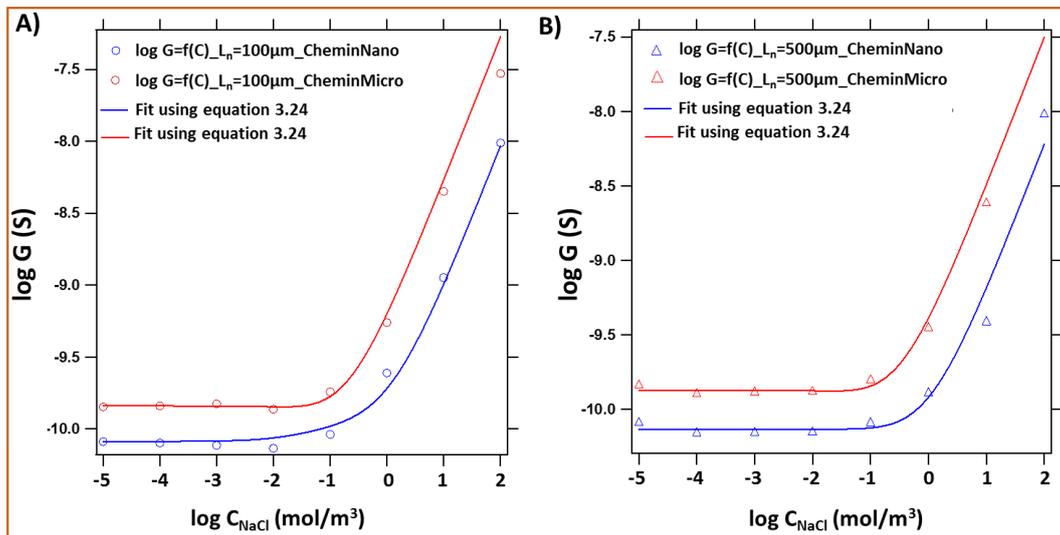


Figure 3.13 Courbes expérimentales et simulées avec l'expression 3.24 (modèle complet) appliquée sur les chemins « nano » et chemin « micro » : A.) Puce L_n= 100 µm. B.) L_n = 500 µm.

❖ Déconvolution par élimination de l'influence microcanaux externes

Dans cette dernière modélisation, au vu de la mise en évidence de l'influence des microcanaux externes pour toutes les puces, nous avons effectué l'élimination du signal de conductance expérimentale des branches externes en effectuant une déconvolution mathématique (sur la conductance totale) avant de procéder aux ajustements. Il reste donc que l'influence des branches centrales sur la conductance de la nanofente. La formule utilisée pour la déconvolution est la suivante en considérant une association en série des conductances :

$$\frac{1}{G^{totale}} = \frac{1}{G^{micro}} + \frac{1}{G^{MNM}} \text{ avec } G^{MNM} = \frac{G^{totale} \times G^{micro}}{G^{micro} - G^{totale}} \quad \text{Equation 3.26}$$

G^{totale} étant la conductance totale mesurée (branches externes, centrales et nanofente), G^{micro} la conductance des branches externes, et G^{MNM} étant désormais réduite ici à la portion branches centrales et la nanofente.

L'influence des branches externes étant considérablement réduite, nous intégrons les rapports (w_n/L_n) pour chaque ajustement. En conséquence le pré-facteur ($1/1+\gamma_G$) peut être sorti de l'expression générale de K_g .

Cette ultime étape nous permet donc de valider le modèle complet pour toutes les longueurs de nanofente (100 à 500).

paramètres	Puce $L_n=100$ "deconvolution"	Puce $L_n=200$ "deconvolution"	Puce $L_n=300$ "deconvolution"	Puce $L_n=500$ "deconvolution"
pKc	6.27	6.89	7.41	6.23
pH	4.426	4.56	5.25	4.56
h_n (m)	$1.5 \cdot 10^{-07}$	$1.5 \cdot 10^{-07}$	$1.5 \cdot 10^{-07}$	$1.5 \cdot 10^{-07}$
μ_{Na} ($m^2V^{-1}s^{-1}$)	$5.87 \cdot 10^{-08}$	$1.09 \cdot 10^{-07}$	$2 \cdot 10^{-07}$	$1.09 \cdot 10^{-07}$
μ_{Cl} ($m^2V^{-1}s^{-1}$)	$7.91 \cdot 10^{-08}$	$7.29 \cdot 10^{-08}$	$3.25 \cdot 10^{-08}$	$7.29 \cdot 10^{-08}$
μ_H ($m^2V^{-1}s^{-1}$)	$4.76 \cdot 10^{-08}$	$1.35 \cdot 10^{-07}$	$2.13 \cdot 10^{-07}$	$1.35 \cdot 10^{-07}$
μ_{HCO_3} ($m^2V^{-1}s^{-1}$)	$3.357 \cdot 10^{-08}$	$3.35 \cdot 10^{-08}$	$3.35 \cdot 10^{-08}$	$3.35 \cdot 10^{-08}$
Γ_{SiOH} (m^{-2})	$8.0 \cdot 10^{+18}$	$6.0 \cdot 10^{+18}$	$6.0 \cdot 10^{+18}$	$6.78 \cdot 10^{+18}$
w_n (m)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
L_n (m)	0.0001	0.0002	0.0003	0.0005
$(1/1+\gamma_G)$	0.0874	0.196	0.201	0.133
χ^2	0.039	0.15	0.14	0.12

Tableau 3.8 : Valeurs déterminées pour les paramètres d'ajustement en utilisant l'équation 3.24 pour l'ensemble des puces MNM avec les valeurs déconvoluées (élimination de la contribution des branches externes (Cf. Figure 3.9 et équation 3.26).

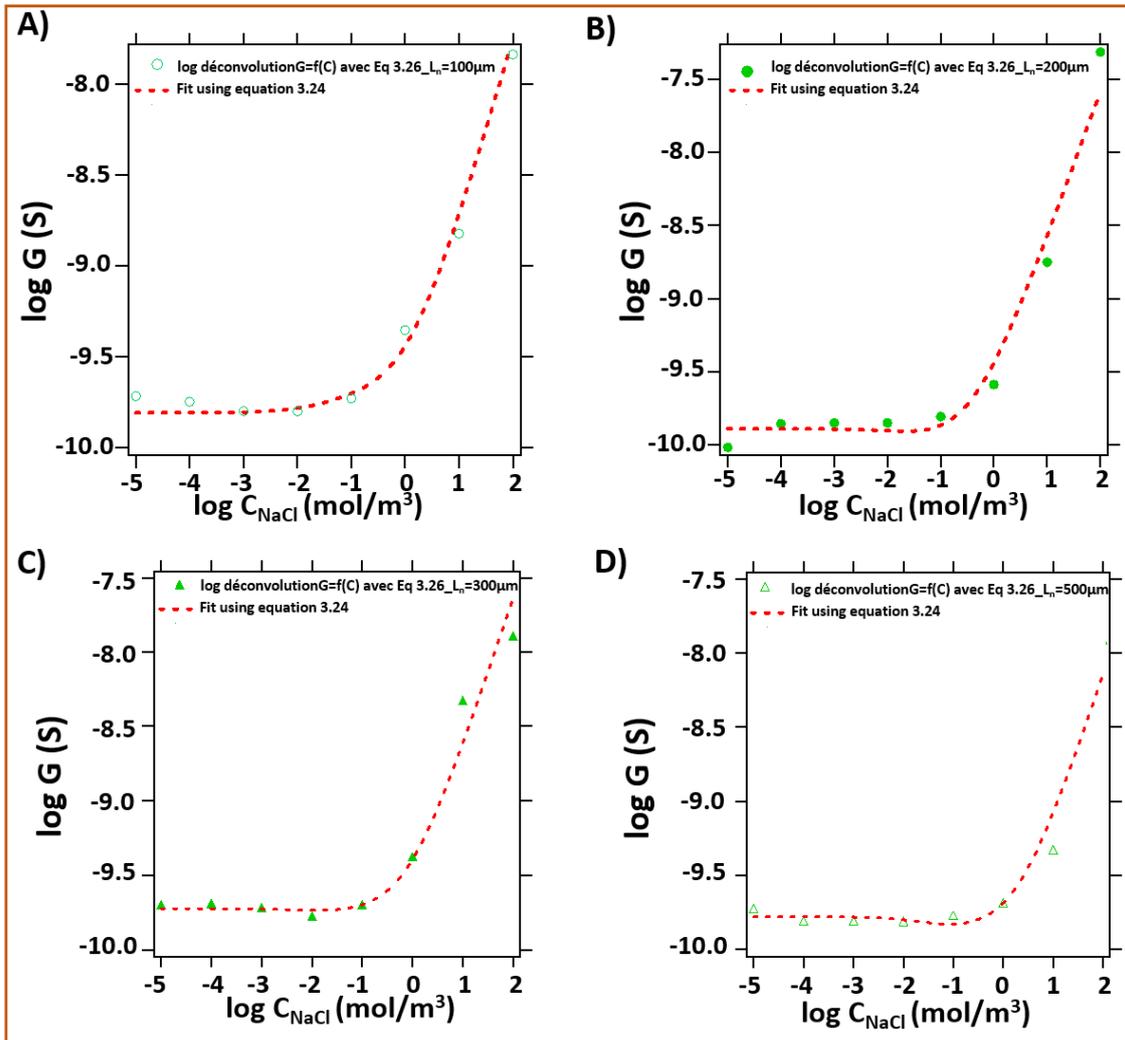


Figure 3.14. Courbes expérimentales déconvoluées avec l'expression 3.26 et ajustées avec l'équation modèle complet 3.24 prenant en compte que la partie centrale MNM (cf. Figure 3.9) :A) puce $L_n=100 \mu\text{m}$. B.) puce $L_n=200 \mu\text{m}$ C.) puce $L_n=300 \mu\text{m}$ D.) puce $L_n=500 \mu\text{m}$.

Nous avons mis en évidence expérimentalement que la longueur de la nanofente affecte la zone intermédiaire ou gamme de concentration autour d'une valeur de transition (C_t). Ce comportement était prévisible dès lors que la capacité géométrique de la puce augmente d'un facteur 5. Nous avons abouti à un modèle complet de la modélisation de la conductance en choisissant une stratégie progressive et en s'aidant des observations de la littérature :

- 1) Un modèle simplifié de la conductance de la nanofente largement utilisé dans la littérature s'est révélé insuffisant car il ne rend pas compte de l'influence de la longueur (augmentation d'un facteur 5). Les paramètres au nombre de quatre (μ_{Na^+} , μ_{Cl^-} , h , σ_s) ont été utilisés pour ajuster les résultats expérimentaux sans donner de résultats concluants,
- 2) Un modèle amélioré de la conductance de la nanofente en prenant en compte les concentrations et les mobilités d'autres ions, en plus de Na^+ et de Cl^- , à savoir H^+ et HCO_3^- . La dépendance de la charge de surface par rapport à l'électroneutralité a été aussi introduite pour lier les paramètres entre elles. Ce modèle dit « amélioré » ayant présenté des limites sur le sens physique des paramètres, en particulier sur les mobilités, a rendu nécessaire la prise en compte des effets géométriques.
- 3) Un modèle complet pour un système MNM a été mise au point en faisant un calcul théorique systématique sur toutes les zones (microcanaux, nanofente) et interfaces existantes dans la puce MNM, à savoir, les rapports géométriques des branches externes, et centrales) influençant la conductance totale mesurée.

Ces calculs nous ont permis de corroborer ces influences avec un calcul prévisionnel (nombre de Dukhin) qui a confirmé que les microcanaux adjacents ayant une hauteur 10 fois supérieure à la nanofente et des longueurs assez conséquentes, ne pouvaient pas être négligés dans la mesure globale de conductance de la nanofente. Ce résultat non intuitif permet de mieux comprendre les effets de polarisation dans les systèmes MNM où des phénomènes de conductance de surface ont lieu également dans les microcanaux et aux interfaces nano/ micro.

- 4) Enfin, une procédure d'élimination par déconvolution de la conductance des branches externes à partir de la conductance globale a permis de valider l'ajustement de toutes les courbes expérimentales de conductance, et ce, pour les 4 longueurs différentes (100, 200, 300 et 500 μm) de la nanofente.

IV – L'électropréconcentration assistée en pression : cas d'une molécule modèle – la Fluorescéine

Dans cette partie, nous rapportons des expériences d'électro-préconcentration assistée en pression pour la fluorescéine en tant qu'analyte modèle. Nous discuterons nos résultats expérimentaux en se basant à la fois sur la théorie analytique de Zangle et al²² et sur les simulations de Plecis²⁹. Le rôle de la longueur de la nanofente sur la compétition entre la vitesse électrophorétique et la vitesse électro-osmotique au voisinage de la zone d'enrichissement du CP sera discuté sur la base d'expériences menées avec différentes longueurs de nanofente.

Comme discuté au chapitre 1, la fluorescéine étant un bi-anion sa mobilité électrophorétique est élevée. Cette petite molécule se concentre donc dans le réservoir cathodique.

Rappelons que les deux régimes de concentration dans le réservoir cathodique sont : 1/ le régime CS en sortie de la nanofente et 2/ le régime CF propageant à partir de l'interface de la zone d'enrichissement. Rappelons aussi qu'entre ces deux régimes, les simulations de Plecis ont montré qu'il existe un régime CF stable. **Nous verrons dans ce chapitre comment ce régime est plus facilement observable lorsque l'électro-préconcentration est assistée d'une pression cathodique appliquée du réservoir cathodique vers la nanofente. Enfin, je montrerai comment il est possible d'établir à partir de mes expériences un diagramme « E / P » qui rapporte les points focaux observés à différents champs électriques E et contre-pressions P. Nous montrerons comment ces diagrammes varient en fonction de la nature de la solution saline de fond (KCl et NaCl) pour la stabilisation du régime CF stable.**

Avant de décrire mes expériences, il est important de vérifier les valeurs des deux paramètres importants $c_{0,r}^* h_n^*$ et v_2^* qui gouvernent l'effet CP en les calculant d'après le modèle analytique de Zangle et coll. Ces valeurs vont permettre de prédire si la localisation de la préconcentration et la nature du régime (propageant ou non).

Commençons par décrire l'effet CP observé pour un électrolyte de fond tel que KCl ou NaCl à faible force ionique ($C = 10 \mu\text{M}$). Nous avons donc calculé pour ces deux solutions les paramètres $c_{0,r}^* h_n^*$ et $v_{Cl^-}^*$. En partant des équations 1.14 et 1.15 du chapitre 1 et en insérant $\zeta = \frac{\sigma\lambda}{\varepsilon}$ dans l'équation 1.14, on obtient pour $c_{0,r}^* h_n^*$, qui décrit le rapport de la conductance globale du sel à la conductance de surface:

$$c_{0,r}^* h_n^* = \left(\frac{\nu_1 z_1 - \nu_2 z_2}{2\nu_1} \right) \frac{F h_n c_{0,r} \lambda}{-\varepsilon \zeta} = \frac{1}{Du} \quad \text{Equation 3.27}$$

où l'indice 1 correspond au cation (K^+ ou Na^+) tandis que l'indice 2 correspond à l'anion (Cl^-).

En simplifiant l'équation 1.15, on obtient pour v_2^* qui décrit le rapport entre la mobilité des anions Cl^- de l'électrolyte de fond et la mobilité électro-osmotique dans le nanocanal :

$$v_{Cl^-}^* = \frac{\mu_2 z_2 \eta}{\zeta_n \varepsilon} \quad \text{Equation 3.28}$$

Nous utilisons une puce de type H avec une nanofente de hauteur h de 150 nm. La longueur de Debye λ vaut environ 96 nm, le potentiel zêta ζ est de -135 mV, la permittivité ϵ vaut $7.1 \times 10^{-10} \frac{C^2}{Nm}$ et la viscosité η est de $1 \times 10^{-3} \frac{Ns}{m^2}$.

❖ Pour le KCl comme électrolyte de fond à une concentration de 10 μ M

Les mobilités électrophorétiques des ions K^+ et Cl^- , extraites de la littérature d'après l'article de Gamby⁶⁰, sont respectivement $\mu_1 = 7.62 \times 10^{-8} \frac{m^2}{Vs}$ et $\mu_2 = 7.91 \times 10^{-8} \frac{m^2}{Vs}$, ce qui conduit à un rapport entre les vitesses $\frac{v_2}{v_1} = 1.04$

L'application numérique des équations 3.1 et 3.2 donne pour KCl : $c_{0,r}^* h_n^* = 0.15$ et $v_2^* = 0.79$

❖ Pour le NaCl comme électrolyte de fond à une concentration de 10 μ M

Les mobilités électrophorétiques des ions Na^+ et Cl^- sont respectivement $\mu_1 = 5.2 \times 10^{-8} \frac{m^2}{Vs}$ et $\mu_2 = 6.5 \times 10^{-8} \frac{m^2}{Vs}$ et le rapport entre les vitesses est de $\frac{v_2}{v_1} = 1.52$

L'application numérique des équations 3.25 et 3.26 donne pour NaCl : $c_{0,r}^* h_n^* = 0.18$ et $v_2^* = 0.79$

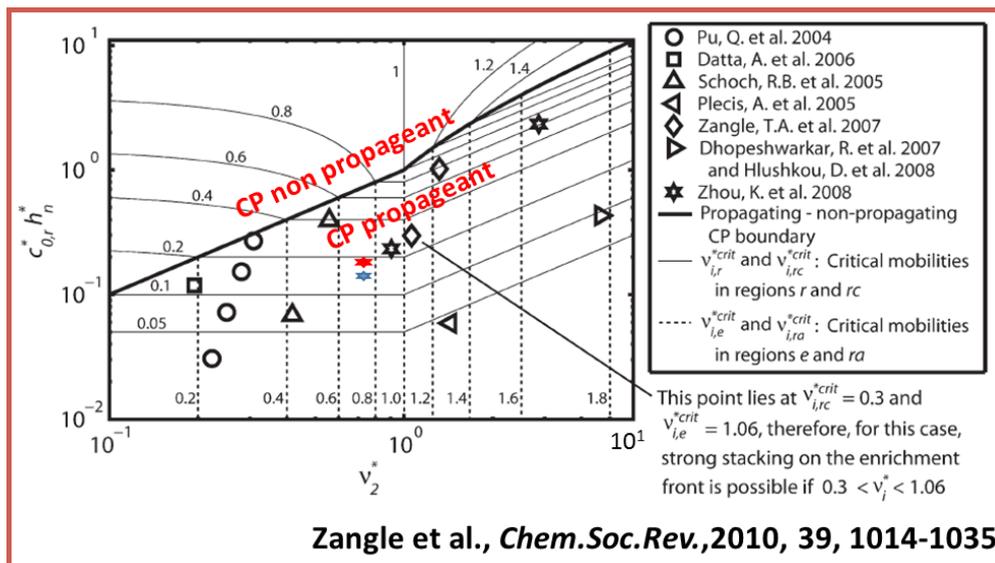


Figure 3.15 : Diagramme de l'effet CP: le point en rouge correspond à notre solution NaCl et le point bleu à notre solution KCl.²²

Si l'on positionne ces valeurs dans le diagramme de Zangle (Figure 3.15), on observe qu'ils se placent dans la partie basse du diagramme sous la ligne noire. Ce domaine correspond à des régimes où **l'analyte s'empilera à l'interface avec la zone d'enrichissement (dans le réservoir cathodique) ou bien à l'interface avec la zone de déplétion (dans le réservoir anodique).**

La théorie de Zangle permet aussi de prédire l'emplacement de la ligne de front de préconcentration en comparant la vitesse non dimensionnalisée de l'analyte aux valeurs critiques pour chaque région (nanocanal, zone d'enrichissement et réservoir cathodique)²². Ce modèle analytique permet de calculer simplement ces valeurs critiques dans chaque zone de la structure « microcanal/nanocanal/microcanal », comme le montre la figure 3.16 suivante.

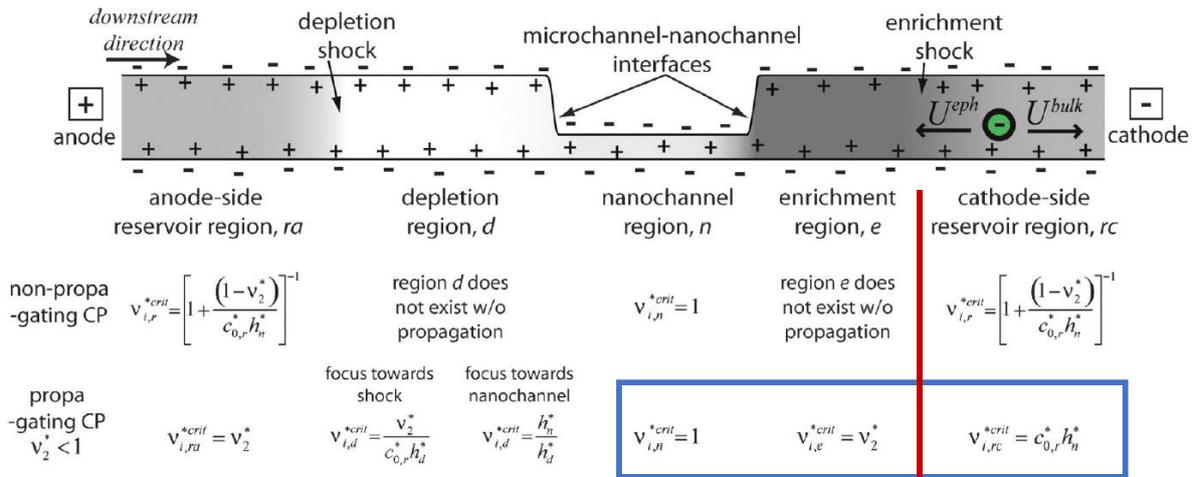


Figure 3.16 : prédiction analytique des vitesses critiques observables dans chaque région de la structure MNM proposée par Zangle et al.²²

Dans notre cas, puisque la valeur de v_2^* est inférieure à 1, les valeurs critiques des zones respectives « nanofente », « région d'enrichissement » et « réservoir cathodique » sont celles entourées en bleu dans la figure 3.16. Dans le profil de flux imposé par le CP, les analytes de mobilité v_i^* pourront se déplacer vers l'interface d'enrichissement (ligne rouge dans la figure 3.16) si leur mobilité est suffisamment faible pour se déplacer dans la direction du flux mais suffisamment élevée pour se déplacer à contre-courant dans le réservoir. La vitesse de l'analyte v_i^* doit donc respecter les conditions suivantes : $v_{i,e}^{*crit} > v_i^* > v_{i,cr}^{*crit}$ avec i étant l'analyte utilisé (dans ce cas il s'agit de la fluorescéine).

D'après le modèle de Zangle, les deux vitesses critiques dans la zone d'enrichissement et dans le réservoir cathodique sont respectivement $v_{i,e}^{*crit} = v_2^*$ and $v_{i,cr}^{*crit} = c_{0,r}^* h_n^*$. Pour savoir si l'analyte se concentrera sur l'interface d'enrichissement (ligne rouge), il suffit donc de vérifier si $v_2^* > v_i^* > c_{0,r}^* h_n^*$, soit pour KCl $0,79 > v_i^* > 0,15$ et pour NaCl $0,79 > v_i^* > 0,18$.

Prenons l'exemple de la fluorescéine à faible concentration ($C_{Fluo}=10\mu M$ and $\mu_{Fluo} = 36.10^{-9} m^2.V^{-1}.s^{-1}$): sa mobilité sera donc $v_{fluo}^* = 0,75$ dans une solution de KCl. **Ces calculs montrent que la condition $v_{i,e}^{*crit} > v_{fluo}^* > v_{i,cr}^{*crit}$ est toujours respectée dans nos expériences pour la fluorescéine dans du KCl. Nous prévoyons donc un empilement de fluorescéine à l'interface d'enrichissement dans le réservoir cathodique²⁹.**

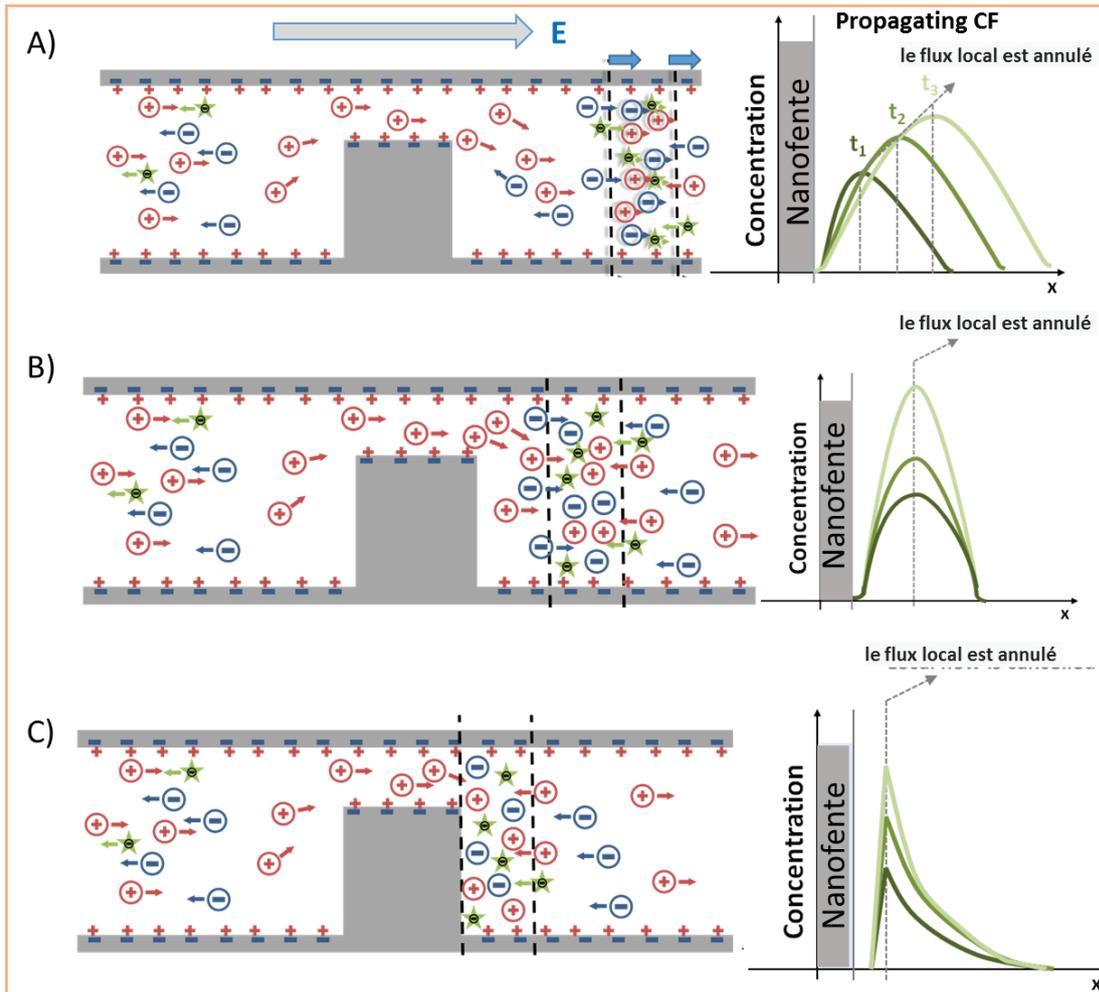


Figure 3.17: Schéma des régimes cathodiques observés (A) en électropréconcentration classique sans pression additionnelle ($J_p=0$) et en électropréconcentration assistée en pression avec (B) une pression modérée et (C) une pression élevée.

Nous décrivons maintenant comment l'électropréconcentration assistée en pression permet de modifier la position de la ligne du front qui se propage, et comment elle peut ainsi stabiliser un front propageant en un front stable. Dans le cas d'une pression supplémentaire appliquée de la cathode à l'anode (appelée "pression cathodique"), le flux électro-osmotique est réduit favorisant le composant électrophorétique. L'augmentation de J_p à des valeurs de pression modérées permet la stabilisation du profil CF en fonction du temps, comme décrit à la figure 3.17-B. **Un tel régime CF stable d'électropréconcentration est utilisable pour des applications, car il peut produire un taux de concentration élevé dont la valeur augmente avec le temps.** Sous l'application d'une contre-pression plus élevée (Fig.3.17-C), l'analyte est poussé vers l'entrée du nanocanal dans un régime de concentration d'empilement cathodique, peu intéressant du point de vue applicatif.

Décrivons maintenant les expériences qui ont permis de mettre en évidence ces 3 régimes, CF propageant en électropréconcentration classique ($J_p=0$) (Fig.3.17-A), CF stable au cours du temps (Fig.3.17-B) et CS (Fig.3.17-C).

IV.1 Observation expérimentale des trois régimes :

La concentration de l'électrolyte de fond a été maintenue à $10 \mu\text{M}$ dans toutes les expériences pour maintenir le même effet CP des solutions salines de fond, avec $c_{0,r}^* h_n^* = 0,15$ et $\nu_2^* = 0,79$ pour KCl et $c_{0,r}^* h_n^* = 0,18$ et $\nu_2^* = 0,79$ pour NaCl.

Afin d'étudier l'effet du champ électrique E et de la pression P sur la stabilisation du régime CF, des expériences avec la fluorescéine ont été effectuées avec un champ électrique E appliqué variant de 10 V/cm à 80 V/cm et pour une pression cathodique additionnelle P allant de 0 à $0,4$ bars. Plusieurs longueurs différentes de la nanofente ont été étudiées : $L_n=500 \mu\text{m}$ et $L_n=100 \mu\text{m}$.

IV.1.1 - : Pour KCl:

Comme décrit dans le chapitre 2 (voir section II.2.2, voir Figure 2.5), la Figure 3.18 représente le résultat final après traitement des données et image de l'intensité de fluorescence de la fluorescéine dans le réservoir cathodique.

Comme le montre la Figure 3.18(a), en l'absence d'une pression hydrodynamique, $J_p = 0$ (preconcentration conventionnelle), un profil de CF stable est observé au champ électrique faible de 10 V/cm , alors qu'un CF propageant est observé à des champs plus élevés: 20 V/cm et 50 V/cm . Il est à noter que plus le champ E est élevé, plus le profil se propage à l'intérieur du grand réservoir cathodique de sortie. Ces observations expérimentales sont en accord avec les calculs analytiques de Santiago^{52,55} et de Zangle²², ainsi qu'avec nos précédentes simulations²⁹, qui prédisent tous deux que le profil de focalisation cathodique (FC) sera instable dans le temps aux champs électriques forts et à très faible force ionique.

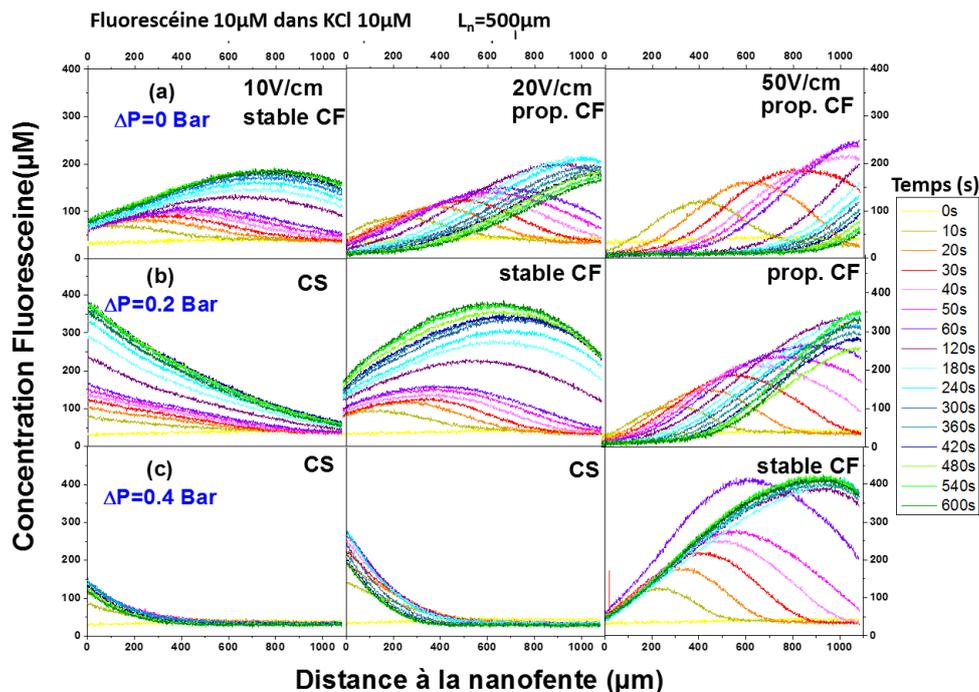


Figure 3.18: profils de concentration de la fluorescéine à $10\mu\text{M}$ dans une solution tampon de KCl $10\mu\text{M}$ à différents champs électriques et pressions appliqués.

L'application de la contre-pression cathodique P permet de stabiliser le profil de concentration en fluorescéine. Par exemple, à 20 V/cm et P = 0,2 Bar (Figure 3.18(a)), au bout de 3 minutes, l'intensité maximale de la fluorescence est observée constante et localisée à une distance de 600 μm de l'entrée nanofente. De même, à 50V / cm et P = 0,4 Bar ((Figure 3.18(c)), après 60 secondes, le pic CF se stabilise à une distance plus grande, à savoir 950 μm . De plus, la concentration ne diminue pas pendant de longues périodes, ce qui reflète un régime stable dans les CF. **Ce résultat montre qu'une pression hydrostatatique peut être utilisée pour ajuster l'effet tampon CP et obtenir un profil de concentration CF stable dans le temps.**

Ce rôle de l'ajout d'un flux supplémentaire sur l'effet CP a également été commenté par Wang et coll.⁵³ qui ont observé un CP en propagation dans leurs structures, alors qu'une région CP stable pourrait être obtenue en ajoutant un flux EOF transversal dans leur dispositif en forme de «H ».

À faible champ électrique, l'ajout d'une contre-pression élevée semble compresser le front de préconcentration vers la nanofente dans la même direction que le flux hydrodynamique supplémentaire. À 10V / cm et P = 0,2 Bar (Figure 3.18-b), ou 20V / cm et P = 0,4 Bar (Figure 3.18-.c), le profil est empilé à l'entrée de la nanofente produisant un régime CS. Des expériences similaires ont été réalisées avec des puces intégrant des nanofentes plus courtes ($L_n = 100 \mu\text{m}$ – les résultats seront montrés dans la section IV.2). **En conclusion, l'ajout d'une contre-pression cathodique lors de la préconcentration de la fluorescéine permet la manipulation et la stabilisation dans l'espace de la ligne du front de préconcentration.**

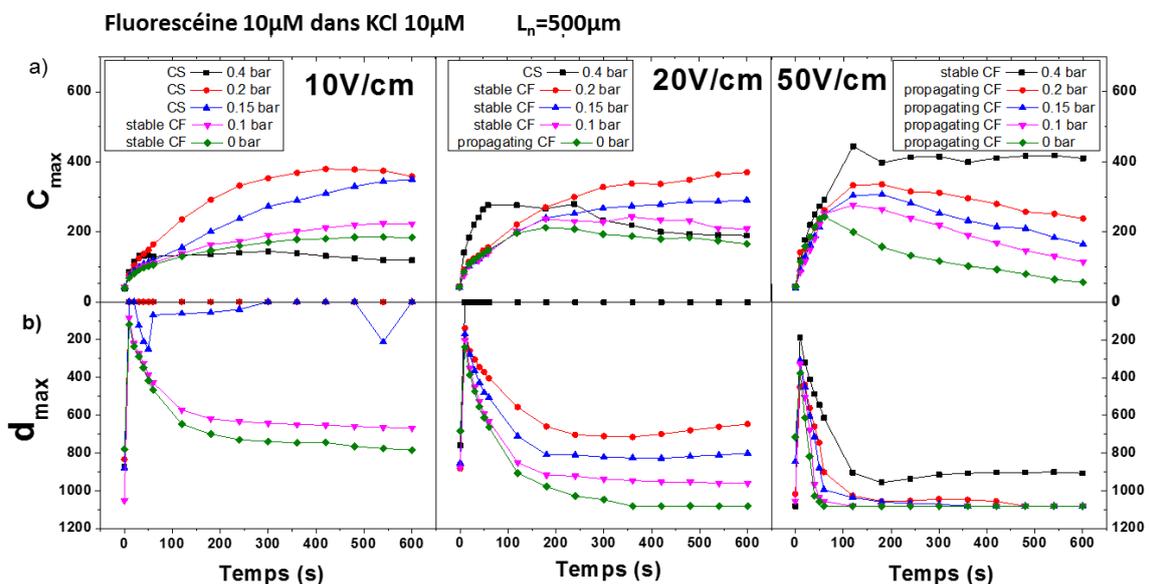


Figure 3.19 : évolution en fonction du temps a) de la concentration C_{max} correspondante au maximum du pic de concentration et b) de la distance à la nanofente d_{max} de ce maximum.

L'analyse de l'évolution en fonction du temps de l'emplacement du pic d_{max} (distance à la nanofente prise au point correspondant au maximum du profil) et de sa concentration correspondante C_{max} apparaît également d'un grand intérêt pour déterminer le taux de concentration $\tau = C_{max}/C_0$ et ainsi vérifier l'efficacité du nanodispositif pour concentrer l'analyte. Cela permet également de vérifier la

stabilité du régime CF pour des valeurs intermédiaires de contre-pression. La Figure 3.19 montre cette analyse à partir des résultats de la Figure 3.18 pour une longueur de nanofente $L = 500 \mu\text{m}$.

Comme le montre la Figure 3.19(a) pour $E = 20\text{V} / \text{cm}$, l'ajout d'une contre-pression P dans la plage de 0,1 à 0,2 bar permet de stabiliser le régime CF avec une localisation qui ne change pas pour des temps supérieurs à 200 secondes. On peut observer un décalage de l'emplacement du pic d'une position à $900 \mu\text{m}$ de l'entrée de la nanofente pour $P=0,1$ bar à une position à $600 \mu\text{m}$ lorsque la pression augmente à 0,2 bar. **La contre-pression optimale $P_{\text{opt}} = 0,2$ bar produit le régime CF le plus stable avec une concentration qui augmente avec le temps pour atteindre une concentration élevée $C_{\text{max}} = 450\mu\text{M}$ après 10 minutes. Dans ce cas le taux de préconcentration vaut $\tau = C_{\text{max}} / C_0 = 45$.**

À une pression plus élevée $P = 0,4$ bars, le profil est empilé à l'entrée de la nanofente, produisant un régime CS tel que décrit précédemment sur la Figure 3.17(c) et observé expérimentalement sur la Figure 3.18(c). On observe expérimentalement que plus le champ électrique est fort, plus P_{opt} optimal est élevée avec $P_{\text{opt}} = 0,1$ bar pour $E = 10\text{V} / \text{cm}$, $P_{\text{opt}} = 0,2$ bar pour $E = 20\text{V} / \text{cm}$ et $P_{\text{opt}} = 0,4$ bar pour $E = 50\text{V} / \text{cm}$.

Cependant, comme les deux champs $20\text{V} / \text{cm}$ et $50\text{V} / \text{cm}$ produisent le même taux de concentration τ d'environ 45, les meilleures conditions de préconcentration en utilisant KCl comme solution saline de fond sont $20\text{V} / \text{cm}$ et $P_{\text{opt}} = 0,2$ bar. Le taux de concentration atteint une limite en fonction du champ depuis la région d'enrichissement et le réservoir cathodique.

Il est très intéressant d'étudier comment la nature de l'électrolyte de fond peut affecter ces profils de préconcentration, d'où les expériences suivantes avec NaCl comme solution saline de fond.

IV.1.2 – Pour NaCl:

Des expériences similaires ont été effectuées avec du NaCl comme électrolyte de fond ($c_{0,r}^* h_n^* = 0,18$ et $v_2^* = 0,79$) comme indiqué sur la Figure 3.19. La figure 3.20 montre comment le pic de localisation d_{max} et la concentration maximale C_{max} évoluent avec le temps.

Par comparaison avec les expériences menées précédemment avec KCl (Figure 3.18), on observe une stabilisation du régime CF à des champs électriques inférieurs, à savoir $5\text{V}/\text{cm}$ et $10\text{V}/\text{cm}$. Les valeurs de contre-pression sont aussi inférieures, dès 0,15 bars. Le tracé des nouvelles valeurs des paramètres $c_{0,r}^* h_n^*$ et v_2^* dans le diagramme de Zangle et al²² prédise comme pour KCl un régime de propagation: voir le point rouge indiqué sur la Figure 3.16. Ces coordonnées sont toutefois plus proches de la limite entre les régimes de dispersion non propagateurs et les régimes de propagation (ligne noire du diagramme) pour NaCl. Ceci signifie que la stabilisation doit être plus facile avec NaCl comme électrolyte de fond, ce qui correspond bien à nos observations expérimentales.

On peut également observer les valeurs optimales P_{opt} :

- pour $E = 5\text{V}/\text{cm}$, P_{opt} correspond à la pression qui conduit au taux de concentration maximal soit $P = 0,15$ bars. Les pressions supérieures de 0,2 et 0,4 bars font s'effondrer ce taux avec l'observation d'un régime de stacking CS (Figure 3.20(c)). La localisation du point focal est voisine de $50 \mu\text{m}$, à une distance proche de l'entrée de la nanofente.
- pour $E = 10\text{V}/\text{cm}$, $P_{\text{opt}} = 0,2$ bars. La localisation du point focal est voisine de $500 \mu\text{m}$.

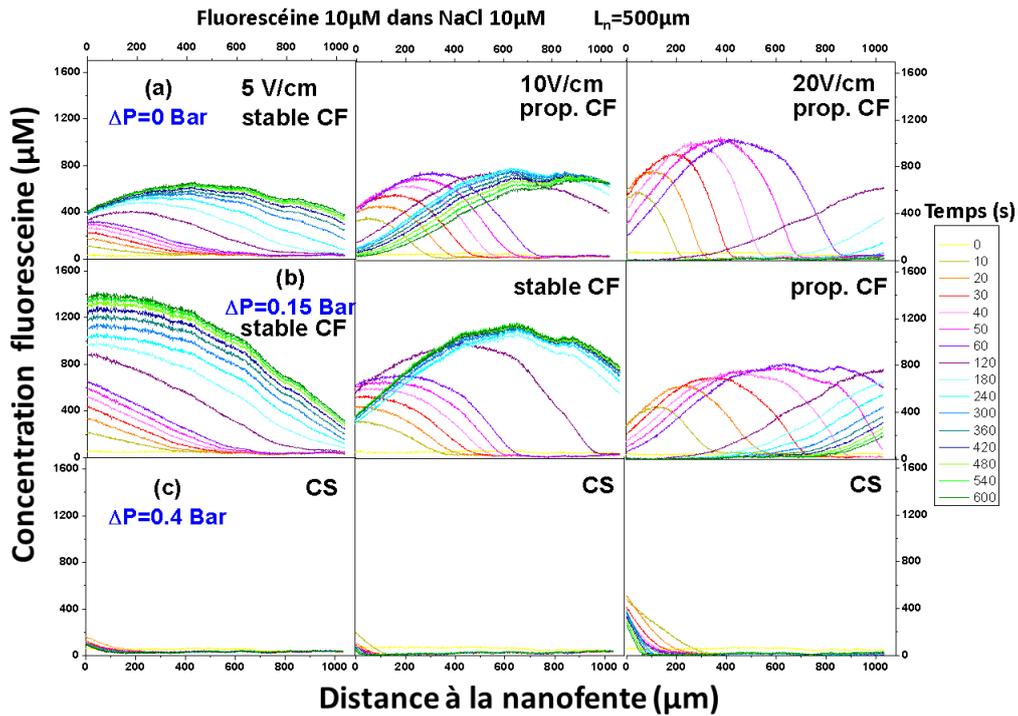


Figure 3.20: profils de concentration de la fluoresceïne à $10\mu\text{M}$ dans une solution tampon de NaCl $10\mu\text{M}$ à différents champs électriques et pressions appliqués

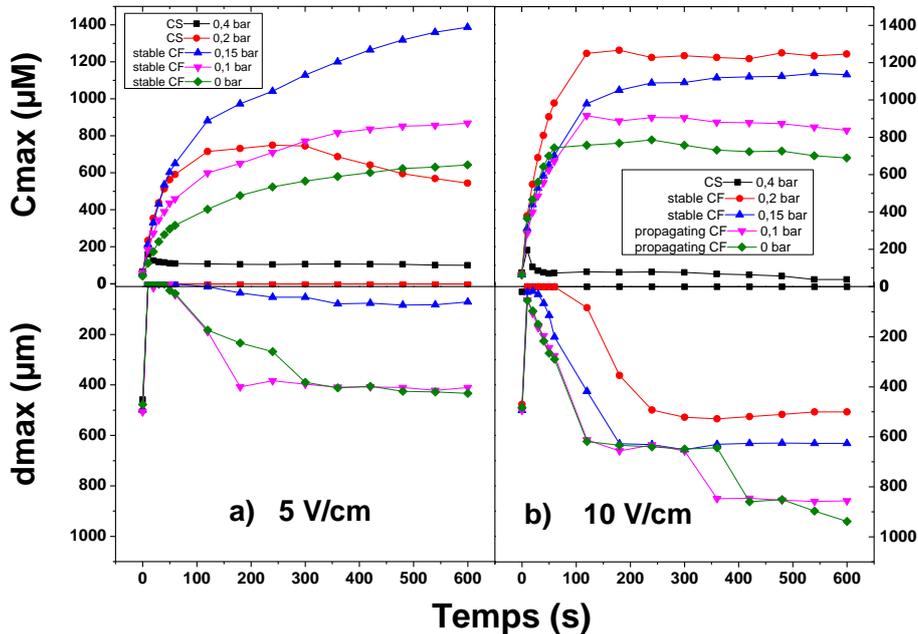


Figure 3.21: évolution en fonction du temps de la concentration C_{max} correspondante au maximum du pic de concentration et de la distance à la nanofente d_{max} de ce maximum sous a) 5V/cm et b) 10V/cm

Pour ces conditions optimales, le taux de concentration $\tau = C_{max}/C_0$ est largement supérieur aux valeurs obtenues pour les expériences menées dans KCl: $\tau = 130$ pour $E = 5\text{V/cm}$ et $P_{opt} = 0,15$ bar (courbe bleue sur la figure 3.21.a)) et $\tau = 120$ pour $E = 10\text{V/cm}$ et $P_{opt} = 0,2$ bar (courbe rouge sur la figure 3.21.b)).

Tous ces résultats confirment que la stabilisation du régime de propagation des CF est plus facile avec NaCl comme solution saline de fond.

IV.2 - Diagrammes « champ E/contre-pression P » :

A partir de tous ces résultats expérimentaux, il est intéressant de construire des diagrammes "champ électrique/pression", qui ont été obtenus de la façon suivante. Nous effectuons pour chaque expérience, un classement des différents types de régimes de préconcentrations obtenus, c'est-à-dire si on obtient un régime CF stable, ou un régime CF propageant, ou enfin un régime CS de stacking. Pour chaque profil obtenu, nous plaçons un point correspondant au régime obtenu dans notre diagramme aux valeurs de champ et de pression correspondantes. Ces diagrammes permettent d'observer les trois régions qui correspondent aux trois régimes de préconcentration, à savoir la propagation du CF (en bleu), le CF stable (en vert) et le CS (en rouge). Les diagrammes de la Figure 3.22.A) sont ceux obtenus pour les nanofentes longues $L_{\text{nanoslit}} = 500 \mu\text{m}$, et ceux de la Figure 3.22.B) aux nanofentes courtes $L_{\text{nanoslit}} = 100 \mu\text{m}$. Dans ces diagrammes, nous indiquons aussi la valeur du taux de préconcentration $\tau = C_{\text{max}} / C_0$ obtenu.

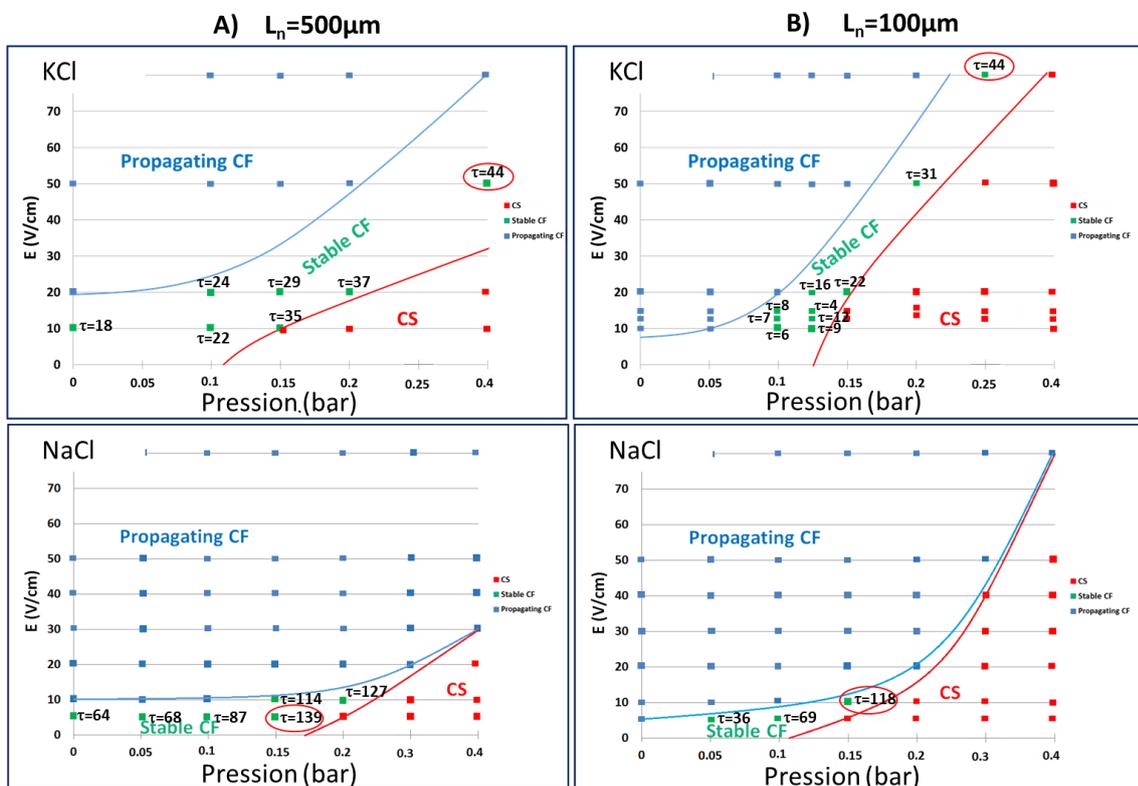


Figure 3.22: Diagrammes "champ électrique / pression" obtenus pour la fluorescéine pour deux longueurs de nanofente : A) $L=500\mu\text{m}$; B) $L=100\mu\text{m}$ et pour les deux solutions de fond NaCl (en haut) et KCl (en bas).

Quelque soit la nature du tampon, on observe que les fentes courtes $L= 100\mu\text{m}$ conduisent toujours à des régimes propageant lorsque l'on n'ajoute pas de contre-pression ($P=0$), c'est-à-dire lorsqu'on travaille en électropréconcentration classique. Par contre, avec les nanofentes longues $L= 500\mu\text{m}$, un régime CF stable peut être obtenu à $P=0$ et à bas champ (10V/cm pour KCl et 5V/cm pour NaCl). Ceci s'explique par le fait que l'effet CP est plus prononcé pour des fentes longues de $500\mu\text{m}$.

La comparaison entre les diagrammes établis pour KCl et pour NaCl montre que la zone d'observation du régime CF stable (en vert) est décalée vers les champs électriques faibles pour NaCl. Les taux de

préconcentration obtenus sont aussi plus grands qu'avec KCl, comme le montrent les valeurs entourées en rouge sur les 4 diagrammes. **Avec NaCl comme sel de fond, il est donc facile d'obtenir le régime CF stable à bas champ électrique (< ou = à 5V/cm) et à basse contre-pression (< ou = à 0,15 bars). Ce sont dans ces conditions que le taux de préconcentration est aussi maximal ($\tau \sim 140$).**

V – L'électropréconcentration assistée en pression : cas d'une protéine d'intérêt l'ovalbumine

L'ovalbumine de poulet est une protéine de 45 kD qui constitue la composante majeure du blanc d'œuf. L'ovalbumine fluorescente peut être utilisée comme traceurs endocytaires⁷² et pour estimer la taille des voies de transport des micro-vaisseaux.⁷³ Elle est aussi utilisée dans différents domaines de recherche comme : l'étude de la structure et des fonctionnalités des serpinines (l'ovalbumine n'inhibant pas les protéases, la comparaison de sa structure avec celle d'une serpine inhibitrice permet de déterminer les caractéristiques de structure nécessaire à cette inhibition), la protéomique (l'ovalbumine du jaune d'œuf est fréquemment utilisée comme marqueur moléculaire pour la calibration des gels d'électrophorèse) ou l'immunologie (fréquemment utilisée pour stimuler une réaction allergique sur des sujets de test).⁷⁴

Pour ces expériences réalisées avec des nanofentes longues, nous avons utilisé de l'ovalbumine d'une concentration de 10 μ M dans une solution tampon de 10 μ M marquée par le marqueur Texas Red, dont les longueurs d'ondes d'émission et d'absorption sont respectivement $\lambda = 615$ nm et 596nm. Comme discuté précédemment, l'ovalbumine se concentre dans le réservoir cathodique de manière similaire à la fluorescéine. Ici, la solution de fond choisie est un vrai tampon fréquemment utilisé en chimie analytique, le composé organique zwitterionique HEPES. Contrairement aux tampons phosphates et bicarbonates, cette solution tampon HEPES permet de maintenir la structure et la fonction d'enzymes à basse température. Les conditions en concentration sont toujours les mêmes : nous utilisons des solutions d'ovalbumine de concentration 10 μ M diluées dans l'HEPES à 10 μ M.

Par esprit de synthèse, nous ne reportons sur la Figure 3.23-A ci-dessous que les profils correspondants à un régime CF stable. Malgré la grande longueur de nanofente $L = 500\mu$ m, à $P = 0$, nous obtenons toujours des régimes propageant. Il faut appliquer des contre-pressions assez élevées, de 0,15 bars (avec $E = 5$ V/cm) à 0,4 bars (avec $E = 20$ V/cm) pour arriver à stabiliser le régime CF. Par contre, comme pour nos expériences précédentes avec NaCl comme sel de fond, il n'est pas nécessaire d'appliquer des champs électriques élevés, comme le montre le diagramme obtenu (Figure 3.23-B). **L'obtention du régime CF stable à bas champ électrique, pour une protéine d'intérêt comme l'ovalbumine, est très intéressant en termes d'applications. De plus, vu ces faibles champs, une miniaturisation du banc d'électrophorèse peut être envisagée.**

Ces expériences réalisées avec l'ovalbumine confirment l'intérêt de cette méthode assistée en pression pour obtenir rapidement des points focaux stables au cours du temps.

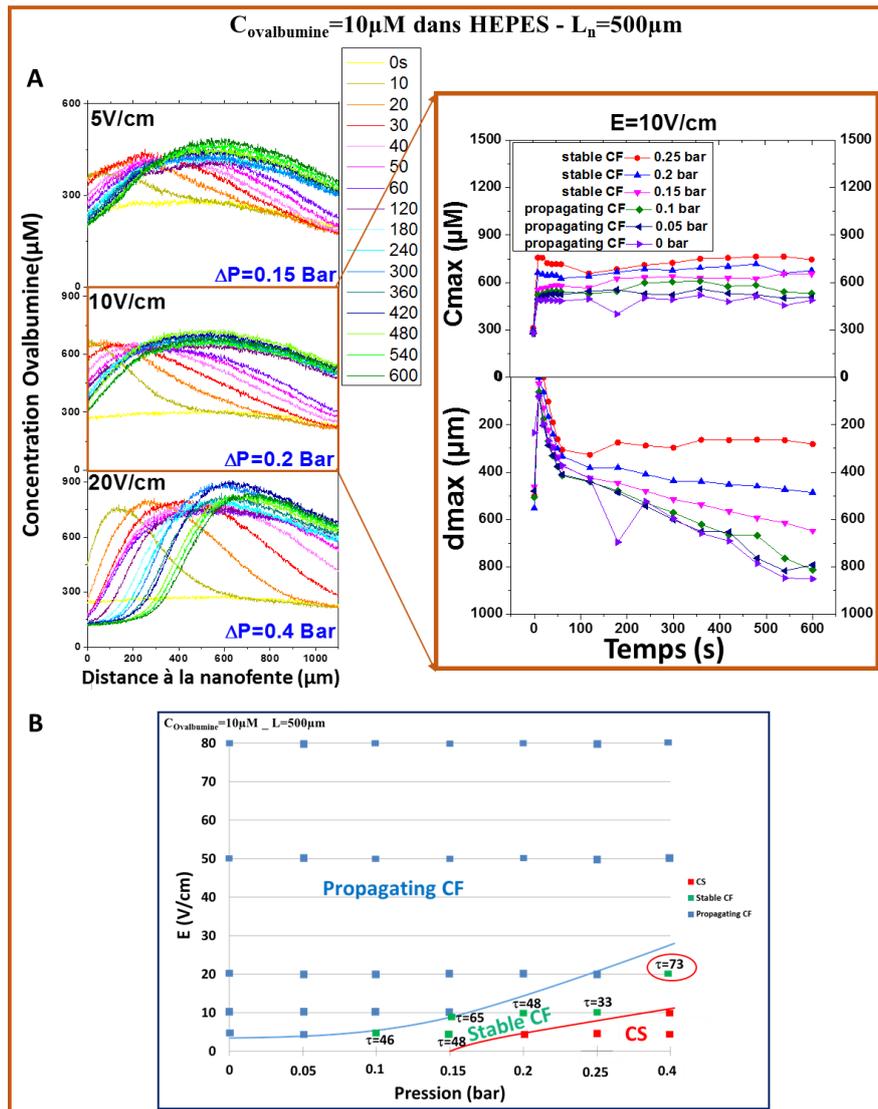


Figure 3.23 : A) Expérience d'électropréconcentration de l'ovalbumine $10\mu\text{M}$ dans du tampon HEPES $10\mu\text{M}$ et B) diagramme E/P de l'expérience décrit en 3.16.A.

En conclusion de cette partie du chapitre 3, au sein de puces intégrant une nanofente unique horizontale, j'ai étudié le rôle de la longueur de la nanofente L_n :

1/ sur l'observation des régimes d'électro-préconcentration du bi-anion fluorescéine dans deux sels de fond différentes, le KCl et le NaCl. J'ai montré que l'électro-préconcentration assistée avec une pression hydrodynamique additionnelle permet toujours de trouver des conditions où le point focal sera stable (régime CF stable).

2/ J'ai établi des diagrammes « E/P » qui permettent de visualiser rapidement les couples (E/P) optimaux d'un régime CF stable. Nous avons aussi montré comment ces diagrammes varient en fonction de la nature de la solution saline de fond (KCl et NaCl).

3/ Enfin, j'ai étudié l'électro-préconcentration de la protéine ovalbumine dans un tampon HEPES et le diagramme « E/P » obtenu montre bien que ce protocole fonctionne aussi pour d'autres molécules que la fluorescéine modèle.

« CELA SEMBLE TOUJOURS IMPOSSIBLE, JUSQU'À CE QU'ON LE FASSE. »

- Nelson. Mandela-

Révolutionnaire, Ancien Président de l'Afrique du Sud et philanthrope (1918 – 2013)

Chapitre 4 : le « code-barres » à nanofentes verticales

Ce chapitre présente une nouvelle géométrie de puce micro/nanofluidique qui intègre plusieurs préconcentrateurs en parallèle, chaque préconcentrateur intégrant une nanofente verticale. Le fait d'intégrer plusieurs nanofentes avec des largeurs différentes ou longueurs différentes permet d'obtenir un code-barres fluorescent, d'où le nom de puce à « code-barres ».

La première partie de ce chapitre introduit le concept du code-barres avec l'obtention d'une signature spatio-temporelle originale. La deuxième partie présente le procédé de nanofabrication des puces codes-barres, avec la mise au point de la lithographie électronique et des différentes étapes de gravure ionique réactive de la silice. La troisième partie rapporte les expériences de préconcentrations que j'ai effectuées avec ces puces innovantes.

I – Description de la puce « code-barres » intégrant des nanofentes verticales en parallèle :

L'objectif de cette thèse est la conception, l'étude et la caractérisation des puces micro/nanofluidiques pour le domaine très novateur de la bioanalyse. Ce dispositif « code-barres » a été imaginé pour pouvoir étudier **en une seule expérience** le rôle de la largeur et de la longueur de la nanofente sur la localisation du point focal, et comprendre comment l'effet CP gouverne l'électro-préconcentration.

La Figure 4.1-A ci-dessous présente un exemple de puce « code-barres » qui intègre plusieurs nanofentes verticales en parallèle, isolées des deux grands réservoirs anodiques et cathodiques par des réservoirs intermédiaires identiques, où seront observés les points focaux fluorescents (spots bleus dans la Figure 4.1-B).

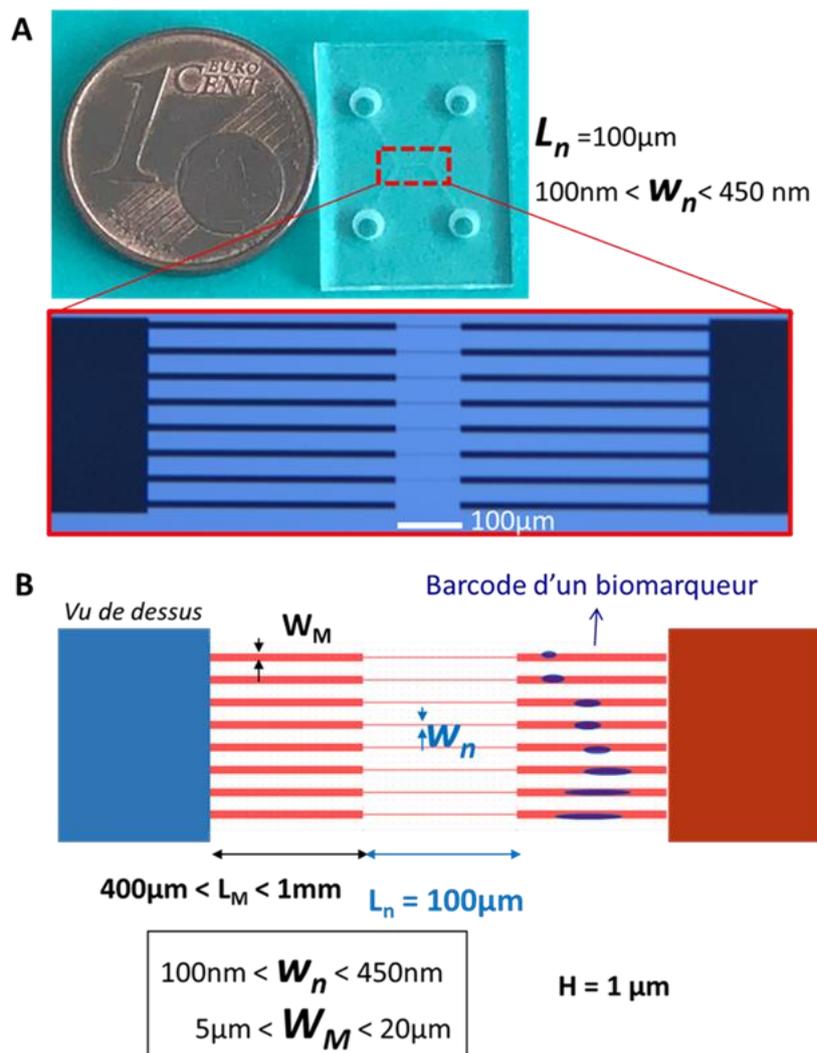


Figure 4.1: Géométries d'une puce code-barre intégrant 8 nanofentes de longueur identique ($L_n=100\mu\text{m}$) mais de largeurs différentes $100\text{nm} < W_n < 450\text{nm}$ avec A) une photo générale de la puce et un zoom obtenu en microscopie optique sur la partie centrale d'une puce et B) la réponse attendue schématisée pour un biomarqueur fluorescent (les spots bleus correspondent aux spots fluorescents attendus)

Les nanofentes longues de 100 microns mais ayant chacune une largeur nanométrique différente ($100 \text{ nm} < W_n < 450 \text{ nm}$) sont définies grâce à une nanolithographie électronique de haute résolution réalisée sur le masqueur électronique VISTEC à 100KeV, puis transférées dans la silice par gravure ionique profonde. La mise au point de ce procédé de nanostructuration sera décrite dans la deuxième partie de ce chapitre.

D'autres géométries ont aussi été proposées dont une où la largeur de la nanofente reste constante, mais sa longueur augmente de 100 microns à 500 microns (Figure 4.2 ci-dessus). On comprend bien ici que cette géométrie permettra d'obtenir les diagrammes "E-P" similaires à ceux obtenus dans la première partie du mémoire en une seule expérience.

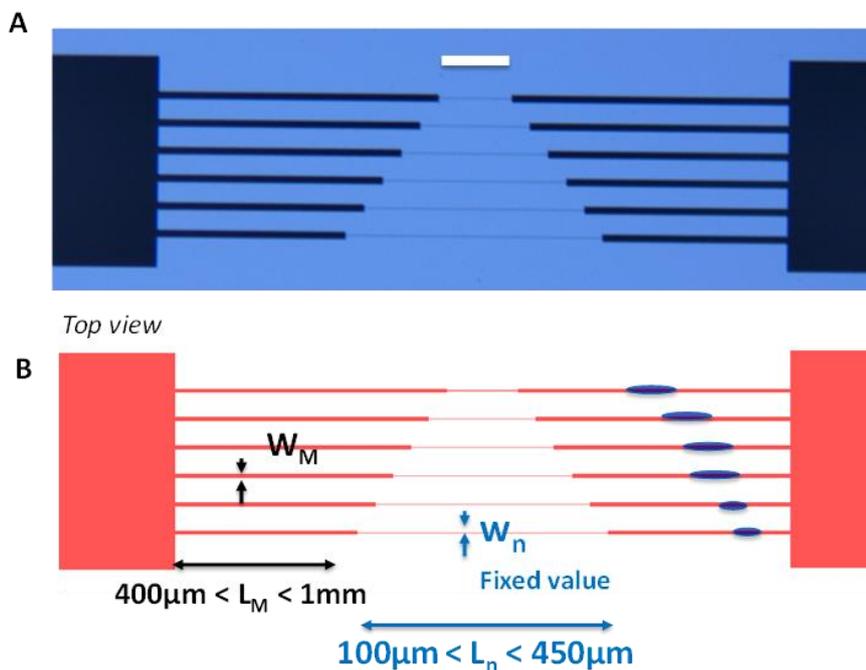


Figure 4.2 : Géométries d'une puce code-barre intégrant 6 nanofentes de largeur identique ($W_n=150 \text{ nm}$ par exemple) mais de longueurs différentes $100 \mu\text{m} < L_n < 450 \mu\text{m}$ avec A) un zoom obtenu en microscopie optique sur la partie centrale de la puce et B) la réponse attendue schématisée pour un biomarqueur fluorescent (les spots bleus correspondent aux spots fluorescents attendus).

Ce nouveau dispositif qui intègre plusieurs nanofentes avec des largeurs différentes ou longueurs différentes, comme montré sur les Figures 4.1 et 4.2, permet d'obtenir un "code-barres", qui est constitué des spots fluorescents correspondants aux points focaux stables (régime CF stable par exemple) d'électropréconcentration.

Il est important de souligner que ce code-barres donne une signature temporelle, en plus d'une signature spatiale (visible dans les Figures 4.1-B et Figure 4.2-B). En effet, si les paramètres E-P sont tels que le régime d'enrichissement est propageant, la vidéo du code-barres enregistrée pendant l'expérience montrera des spots fluorescents qui se décalent dans les réservoirs intermédiaires. Pour des applications réelles, nous chercherons bien sûr à stabiliser dans le temps, en quelques minutes, des régimes CF stables, qui produiront des codes-barres identiques au-delà du temps critique de stabilisation.

Enfin, notre objectif est d'étudier des mélanges de biomarqueurs. La Figure 4.3 ci-dessous illustre la réponse attendue du code-barres pour deux molécules de masses très différentes, avec un régime anodique stable pour la molécule de masse la plus élevée (en vert sur la Figure 4.3) et un régime cathodique type CF stable pour une petite protéine (en bleu sur la Figure 4.3).

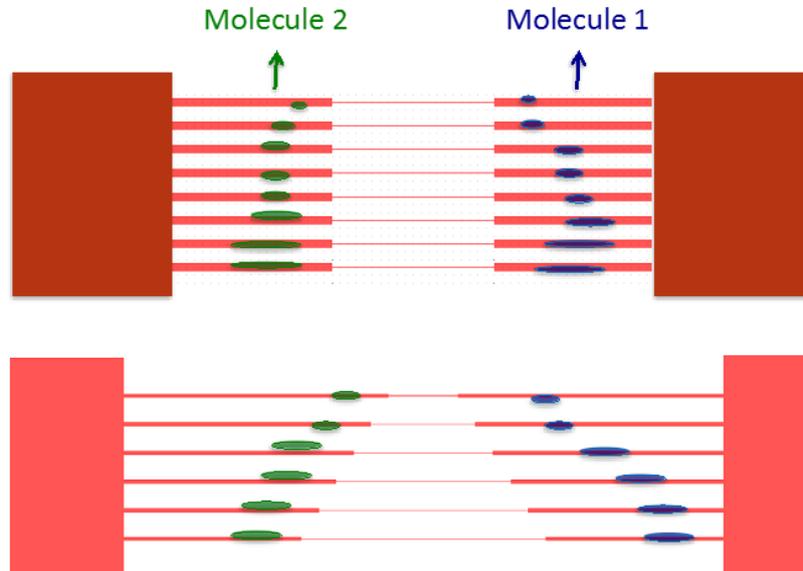


Figure 4.3: les réponses attendues schématisées pour deux biomarqueurs marqués avec des marqueurs fluorescents différents (les spots fluorescents attendus ont donc deux couleurs).

En conclusion, les différentes géométries étudiées dans ce chapitre sont résumées dans la Figure 4.4 ci-dessous.

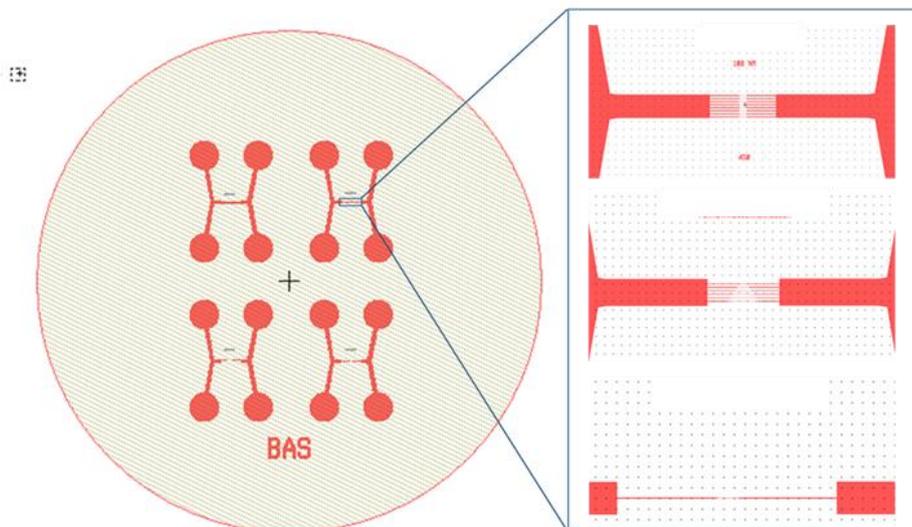


Figure 4.4 : Une vue générale de la lame de verre de 2 pouces qui permet la réalisation simultanée de 4 puces différentes, qu'il s'agisse de nanofentes verticales de largeur variable, de nanofentes verticales de longueur variable ou bien de nanofente verticale unique

II – Le procédé de micro/nanofabrication étape par étape :

Nous décrivons ici le procédé de micro/nanostructuration qui permet de générer, puis de graver des micro/nanomotifs dans une fine couche de silice déposée à la surface de la lame de verre. Cette description est tout d'abord synthétique. Les parties suivantes décrivent ensuite de façon détaillée la mise au point de la gravure profonde dans la silice aux échelles des nanofentes ($100\text{ nm} < W_n < 450\text{ nm}$) (voir l'étape 6 de la Figure 4.5), puis celle du collage verre-verre qui permet d'obtenir des puces parfaitement étanches (voir l'étape 7 de la Figure 4.5).

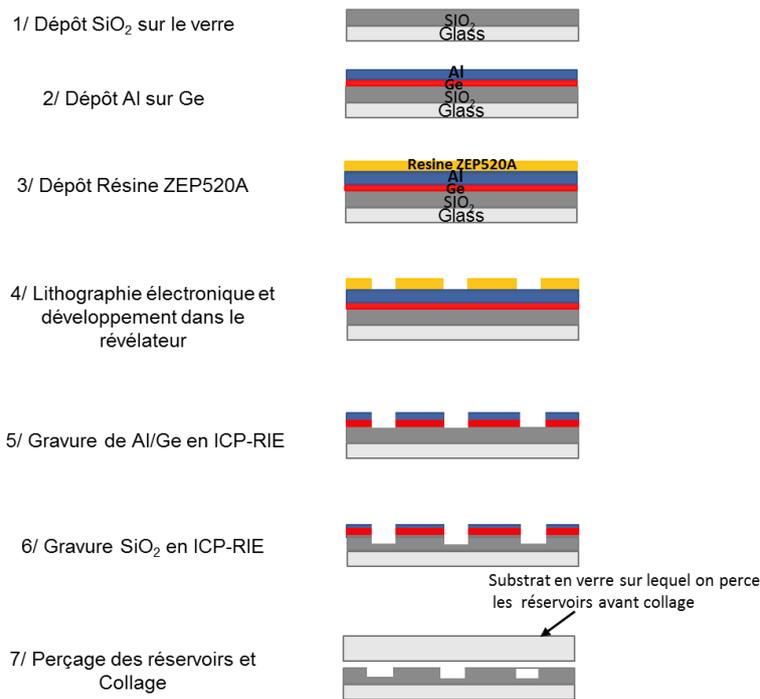


Figure 4.5: Description des 7 étapes principales du procédé de microfabrication

L'élaboration de ce processus de fabrication est né du fait que la lithographie électronique utilise des résines qui ont une faible sélectivité lorsqu'elles sont soumises aux recettes de gravure dans une machine de type ICP/RIE (et plus spécifiquement la Sentech SI500S). Aussi pour parvenir à graver des nanofentes dans de la silice il faut élaborer un masque « dur ». Un masque dur est avant tout un masque qui présente une forte sélectivité pour une recette de gravure par plasma donnée. Pour pouvoir obtenir des motifs de nanofentes l'étape de lithographie électronique utilise une résine dite « ZEP520A ». Pour pouvoir graver le verre nous utiliserons un masque double couche ZEP520A+Aluminium. Il y a donc environ 7 étapes de fabrication pour nos échantillons qui sont détaillées ci-après.

- **Etape 1/ dépôt de SiO_2 :**

La première étape consiste à déposer sur un substrat de verre Borosilicate ($500\mu\text{m}$) une couche de SiO_2 (silice) de $1\mu\text{m}$ d'épaisseur. C'est dans ce film de haute pureté, que seront structurés nos motifs. En effet, puisque le substrat de verre peut contenir des défauts et inclusions métalliques, l'utilité de cette étape est de pouvoir s'assurer de la présence d'une couche de silice de bonne pureté. Le dépôt s'effectue par PECVD (Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition) dans le réacteur ND200 de la salle blanche du C2N. Cette méthode permet d'obtenir des films minces sur un substrat à partir d'un plasma qui est créé à partir de différents gaz injectés dans le réacteur. Le plasma est obtenu par l'application

d'une décharge électrique qui est générée à partir de sources radiofréquences (13,56 MHz). Pour rappel, le plasma est un gaz ionisé, il est donc composé d'ions, des électrons, parfois des ions négatifs, et des espèces neutres moléculaires ou atomiques. Nous n'avons pas fait de mise au point spécifique et nous avons utilisé un procédé optimisé avec les paramètres suivants : T = 280°C, P = 100 Watt et p = 640 mTorr sous un flux d'He de 60 sccm (soit cm³/min), de N₂O de 35 sccm et de SiH₄ de 5sccm. Le silane se combine avec l'oxygène de N₂O pour former le SiO₂. Dans ces conditions, la vitesse de notre dépôt de SiO₂ est de 15.2nm/min. Un temps de dépôt de 65 minutes conduit donc à une épaisseur de 1µm.

- **Etape 2/ dépôt du masque métallique de gravure en Al :**

Après le dépôt de la silice, on effectue un dépôt de 200 nm d'aluminium sur 1nm de germanium qui permet de réduire la rugosité de la couche mince d'aluminium déposée. Les vitesses de dépôt sont respectivement de 1nm/s et de 0.01nm/s. Cette métallisation est réalisée par les ingénieurs de la salle blanche par la méthode d'évaporation assistée par canon à électrons, qui consiste à utiliser un faisceau d'électrons intense pour bombarder une charge d'aluminium située dans un creuset.

- **Etapes 3 et 4/ nanolithographie électronique de haute résolution :**

Après la métallisation, l'échantillon subit une étape très importante de nanolithographie électronique. C'est Edmond Cambril, qui a optimisé et réalisé cette étape de lithographie électronique, qui va permettre de préparer la nanostructuration du masque de gravure. La lithographie électronique est une technique qui utilise un faisceau d'électrons pour tracer des motifs dans une résine (polymère) sensible aux électrons. Par rapport à la photolithographie, l'avantage de cette technique est de permettre de repousser les limites de la diffraction de la lumière et de dessiner des motifs avec une résolution pouvant aller jusqu'au nanomètre. Nous avons choisi cette méthode pour nos nanofentes, car le masqueur électronique Raith 5000plus (100KeV) de la salle blanche permet d'atteindre des résolutions aussi petites que la dizaine de nanomètres sur de grandes surfaces.

Pour notre procédé, la résine positive, ZEP520A, d'une épaisseur de 500 nm est insolée à 100KeV. Rappelons qu'une résine positive est un polymère sensible au rayonnement, pour laquelle la partie exposée au faisceau devient soluble dans le révélateur, tandis que la partie de la résine non exposée reste insoluble. Le procédé optimisé de nanolithographie de la résine ZEP520A par E. Cambril ne pose pas de problème particulier pour descendre à des résolutions de l'ordre de 100nm avec des nanofentes très longues pouvant aller de 100µm à 500µm grâce à un contrôle précis des raccord des champs. Puisque je n'ai pas développé ce procédé de nanolithographie, je n'expliquerai pas tous les paramètres clés de la lithographie électronique. Toutefois, nous allons décrire brièvement la relation qui existe entre la dose d'insolation, le courant d'insolation et le pas du faisceau. Lors de l'insolation, une certaine quantité d'électrons va permettre de casser les chaînes de polymère en fragments, qui seront dissouts lors de l'étape de développement⁷⁵. Cette quantité d'électrons est appelée dose, elle est définie comme suit :

$$Dose = \frac{I * t}{s^2}$$

avec : I : le courant d'insolation.

t : le temps que l'on maintient le faisceau sur chaque point.

s : est le pas du faisceau ou la distance entre chaque point.

Le choix du pas du faisceau est primordial car un pas grand peut engendrer une rugosité de bord de motifs élevée, tandis qu'un pas de petite dimension va permettre de diminuer cette rugosité. Les paramètres qui contrôlent le pas du faisceau sont : la taille de la sonde électronique et la dimension du diaphragme utilisé. Notons que le courant du faisceau aussi joue sur la rugosité : s'il est petit, la rugosité sera faible (s'il est grand, la rugosité sera grande)⁷⁵.

La résine ZEP520A a été déposée par spin-coating à une vitesse de 2000 trs/mn avec une accélération de 5000 trs/mn pendant 45 secondes, ce qui produit un film d'épaisseur 500nm. Le film de résine subit ensuite un recuit de 30mn à 170°C dans une étuve. La résine ZEP520A est une résine positive de haute performance avec une résolution, une sensibilité et une bonne sélectivité lors des étapes de gravure par plasma à base de Cl₂⁷⁶. Le développement de la résine est effectué dans du ZED-N50 pendant 1min15s suivi d'un rinçage à l'Isopropanol d'une durée de 30s à 1min.

Afin d'appliquer la dose adéquate sur toute les zones à lithographier et d'éviter une déformation des motifs par des "effets de proximité" dus principalement aux électrons rétrodiffusés, il a été utilisé un programme de correction de ces effets de proximités (PEC) développé par la société Genisys (BEAMER). Ce programme va moduler la dose de base (dose minimale nécessaire pour insoler un motif) dans différentes régions des motifs de façon à ce que la dose réelle soit uniforme sur toute la surface des motifs.

D'autre part, afin d'optimiser la durée de la lithographie, il a été utilisé 2 courants. Un fort courant de 40nA pour les motifs micrométriques (la correction de dose maximale atteint un facteur 2 pour le bord de ces motifs) et un faible courant de 2nA pour les motifs nanométriques (le facteur de dose est de 2.33 sur l'ensemble des lignes de 100nm à 400nm).

Les paramètres utilisés pour nos motifs sont décrits sur le tableau 4.1 suivant :

Dose de base	PEC (correction des effets de proximité)		courant-d'insolation(I)
	Facteur de dose minimum	Facteur de dose maximum	
Dose de base pour les motifs supérieurs au micron : 240μC/cm ²	1 => 240mC/cm ² pour la majorité du motif	2 => 480mC/cm ² pour les bords des motifs	40nA
Dose de base pour les nanofentes : 240μC/cm ²	2,33 => 560mC/cm ² pour les nanofentes de 100nm à 400nm		2nA

Tableau 4.1 : Les paramètres de lithographie utilisés

- **Etapes 5 et 6/ gravures des nanomotifs :**

Après avoir généré les nanomotifs sur la résine ZEP, il faut être capable de les transférer en conservant la même largeur du motif avant et après gravure, et une bonne verticalité des profils (l'anisotropie contrôlée). Le transfert de ces nanomotifs a été effectué par gravure profonde appelée ICP-RIE. ICP signifie « Inductively Coupled Plasma » et RIE « Reactive Ions Etching ». La gravure ICP-RIE est une gravure physicochimique, qui met en jeu à la fois un bombardement ionique et des réactions chimiques entre le plasma et les surfaces exposées.

Le masque d'Aluminium a été choisi pour la gravure plasma, car ce matériau a peu d'affinité chimique avec les radicaux produit par un plasma de mélange gazeux SF₆/O₂. On observe une excellente sélectivité par rapport à SiO₂. De plus la recombinaison des radicaux F avec Al produit des

éléments non volatiles de type AlF en surface de la couche mince d'Al. Enfin la couche mince d'Al est facilement dissoute dans le NaOH qui a le bon goût de ne pas réagir avec le SiO₂.

Le protocole de gravure profonde de ces nanomotifs a été optimisé avec l'ingénieur de la centrale du C2N, responsable du bati ICP-RIE, S. Guilet. Il a proposé de combiner une première gravure ICP avec un gaz chloré Cl₂ avec une deuxième gravure utilisant un plasma avec un mélange de SF₆/CH₄/Ar/O₂.

Le travail d'optimisation de la gravure de ces nanomotifs est présenté plus en détail dans la troisième partie de ce chapitre.

- **Etape 7 / perçage des réservoirs et scellement de la puce par collage des deux lames de verre:**

Après avoir gravé nos motifs, nous procédons au perçage des 4 réservoirs avec un microbillage (micro-sableuse). La microbilleuse utilise du sable extrêmement fin que l'on projette sur notre plaque à percer. Les réservoirs sont percés dans une deuxième lame de verre borosilicate (et non sur le substrat avec les nanomotifs). Avant de percer les réservoirs, il faut protéger la surface de notre échantillon soit par une couche d'Al ou par de la résine. Pour la résine, on utilise l'AZ5214 et on effectue un recuit 125°C pendant 1min 30. Enfin, pendant le microsablage la lame de verre est protégée par un masque en acier intégrant les trous à percer. Pour éviter que la lame de verre bouge sous le masque d'acier, on utilise de la paraffine fondue, qui permet d'assurer un bon alignement et une rigidité des deux masques en contact.

Nous avons aussi effectué du micro-usinage par fraisage, dans ce cas la lame de verre est aussi protégée par un masque en acier intégrant les trous à percer. La fraiseuse est pilotée par un ordinateur qui fait descendre le foret lentement sur la plaque en jouant sur la vitesse et le nombre de tour par minute du foret. En comparant les deux méthodes, la micro-sableuse est la meilleure méthode en termes de l'état de la surface, c'est-à-dire que l'on obtient une surface beaucoup plus lisse par rapport à la microfraiseuse. Cependant elle est lente et fastidieuse alors qu'avec la microfraiseuse on peut automatiser le protocole qui rend le perçage très facile.

La dernière étape très délicate correspond à l'étape de collage des deux lames de verre (étape 7 de la Figure 4.5) : la lame nanostructurée contenant les motifs et la lame couvercle avec les 4 réservoirs.

Cette étape a été réalisée au moyen de la machine KarlSuss de la salle blanche. Comme pour l'étape de gravure, cette étape de collage a demandé une optimisation importante des paramètres. Je décrirai donc son optimisation.

III – Procédé ICP-RIE optimisé pour la gravure de SiO₂ :

Dans cette partie, j'introduis d'abord la gravure ionique réactive en décrivant les mécanismes physico-chimiques mis en œuvre. Ensuite, je décris les expériences pour optimiser l'étape importante de gravure de la couche de SiO₂ par gravure fluorée. Nous verrons que l'optimisation des paramètres permet d'obtenir un fond de gravure lisse et des flancs de gravure verticaux.

III.1 – La gravure ionique réactive : paramètres, mécanismes et plasma inductif

La miniaturisation est à l'origine d'un grand nombre de défis de micro/nanofabrication de dispositifs tels que la lithographie et la gravure. Aux échelles submicroniques et nanométriques, seule la gravure sèche par plasma née vers les années 70 peut être utilisée, comme nous allons l'expliquer maintenant en définissant les paramètres fondamentaux.

III.1.1 – les paramètres fondamentaux : sélectivité et anisotropie

Rappelons tout d'abord les définitions des deux paramètres importants de gravure plasma, qui sont l'anisotropie et la sélectivité

- La sélectivité (S) se définit comme le rapport entre les vitesses de gravure des deux matériaux par :

$$S = \frac{\text{Vitesse matériau à graver}}{\text{Vitesse matériau masque gravure}} \quad \text{Equation 4.1}$$

Une sélectivité élevée est nécessaire pour préserver le matériau à graver. Elle peut être contrôlée grâce à l'énergie des ions et de la nature du gaz.

- L'anisotropie de gravure (A) correspond à la différence de vitesse de gravure en fonction de la direction spatiale. Le plus souvent on la définit par le rapport des vitesses des gravures horizontale et verticale d'un même matériau par rapport à l'ouverture du motif du masque. Vertical c'est normal à la surface exposée et horizontale c'est parallèle à la surface exposée.

$$A = 1 - \frac{\text{Vitesse de gravure horizontale}}{\text{Vitesse de gravure verticale}} \quad \text{Equation 4.2}$$

Pour comprendre comment l'anisotropie va affecter les profils de gravure des nanomotifs, la Figure 4.6 ci-dessous montre quelques exemples de profils de motifs gravés qui conduisent à différentes valeurs d'anisotropie.

L'image A de la Figure 4.6 est un exemple de motif avant gravure. L'image B de la Figure 4.6 représente le cas idéal où la vitesse de gravure horizontale des deux matériaux (masque et matériau à graver) est nulle. On obtient une anisotropie parfaite avec des flancs verticaux (A=1) c'est à dire une gravure horizontale nulle. Si la gravure par plasma permet un contrôle de la vitesse de gravure verticale grâce à l'accélération des ions par le potentiel de polarisation du substrat, la vitesse de gravure horizontale peut être non nulle (Image B et C de la Figure 4.6). Cette variation d'anisotropie provient de la présence de radicaux neutre qui ont une distribution de vitesse isotrope dans la phase gazeuse du plasma. Les images B et D de la Figure 4.6 illustrent le cas où l'anisotropie n'est pas assurée. Augmenter l'anisotropie permet d'obtenir des flancs de motifs bien droits et ainsi de maintenir le contrôle dimensionnel en contrôlant finement les dimensions des structures gravées.

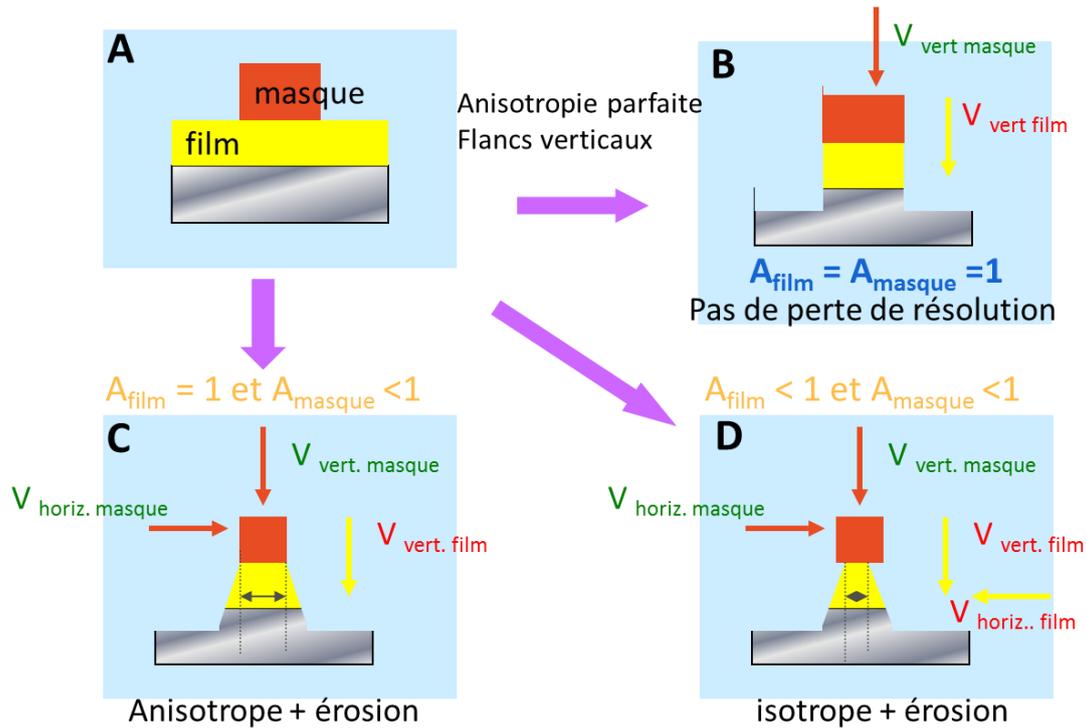


Figure 4.6: schémas montrant différents résultats en termes de profils de gravure pour différentes valeurs d'anisotropie.

Pour éviter ou réduire la gravure latérale, le 1^{er} critère est de choisir un matériau masque très résistant au plasma ($A=1$ Figure 4.6-B). Nous verrons plus loin que cela est possible. Ensuite, concernant le matériau à graver, il est possible de créer une couche protectrice, ou couche de passivation, sur les flancs des structures gravées de ce matériau. Cette couche permet d'isoler les flancs de motifs des espèces réactives du plasma et ainsi de bloquer la gravure latérale (voir plus loin Figure 4.7-B). La sélectivité sera un paramètre crucial pour réussir nos gravures et cela sera ajusté en jouant sur la composition du plasma et en choisissant le matériau du masque le mieux adapté.

A - Choix du masque de gravure : Al/Al₂O₃

Comme on l'a énoncé précédemment, la sélectivité du masque est un critère crucial pour obtenir un procédé de gravure exploitable pour construire un objet à l'échelle nanométrique. Nous avons choisi l'aluminium (Al) parce que ce métal est résistant à beaucoup de gravures chimiques à base de fluor comme le montre le Tableau 4.2 ci-dessous. Cette résistance à la gravure provient de la présence d'une très fine couche d'Alumine (Al₂O₃) native qui se crée en surface du métal.

Le Tableau 4.2 ci-dessous liste les matériaux masque fréquemment utilisés en énumérant leur pertinence pour un certain nombre de gaz. Un signe + dans ce tableau correspond à un taux de gravure faible et à une sélectivité élevée ; un signe - signifie une vitesse de gravure élevée et une faible sélectivité.

Matériau du masque	SF ₆	CHF ₃	CF ₃	O ₂
Si	-	-/+	-	+
SiO ₂	+/-	-	+/-	+
Si ₃ N ₄	+/-	-	+/-	+
Al/Al ₂ O ₃	+	+	+	+
W	-	-	-	+
Au	+	+	+	+
Ti	-	-	-	+
Résine	+/-	+/-	+/-	-

Tableau 4.2 : Matériaux typique de masque en gravure sèche et leur comportement par rapport aux plasma usués.⁷⁷

B – Choix des gaz réactifs en gravure RIE

Comme discuté précédemment, le choix des gaz conditionne le paramètre d'isotropie et d'anisotropie du procédé de gravure de type RIE. En effet les produits créés pendant la gravure plasma peuvent être plus ou moins ionisés et surtout peuvent être plus ou moins volatiles.

La gravure ionique réactive (RIE) est une gravure physico-chimique, qui met en jeu à la fois un bombardement ionique et des réactions chimiques entre le gaz ionisé et la surface de l'échantillon. Le plasma est créé par une antenne RF dont le champ électromagnétique excite les quelques électrons présent à température ambiante dans tous les gaz. Ces quelques électrons sont agités par ce champ RF et dans certaine condition de puissance transmise et de pression on obtient une décharge lorsque les électrons excités créent suffisamment d'ionisations par collision avec les molécules et/ou atomes du gaz. Une fois le plasma créé (en quelques millisecondes) on applique en plus une polarisation sur l'échantillon pour créer localement une autopolarisation négative par rapport au potentiel plasma pour accélérer les ions positifs vers la surface de l'échantillon.⁷⁸ Parmi les espèces créées par collision électronique dans le plasma, il y a des radicaux chimiques. Certains radicaux vont réagir avec les surfaces des échantillons pour former des espèces volatiles qui seront éliminées par diffusion à travers un système de pompage. Les ions positifs radicalaires ont l'avantage de pouvoir être contrôlés en trajectoire et en énergie à proximité de la surface de l'échantillon.

Les avantages de cette gravure chimique et physique et de l'effet combiné des radicaux neutres et des ions ont été démontré par les expériences de Coburn et Winters⁷⁹. Ces auteurs ont étudié la gravure chimique du silicium (Si) avec des radicaux XeF₂ en présence ou non d'un bombardement d'ions argon Ar⁺. Sans bombardement physique, la vitesse de gravure chimique spontanée du Si est inférieure à 10 Å/min, tandis qu'en présence du bombardement d'ions d'argon Ar⁺, la vitesse de gravure physico-chimique est multipliée par un facteur 100. De même, si le substrat de Si est juste soumis à la pulvérisation des ions Ar⁺, la vitesse de gravure est aussi inférieure à 10 Å/min. L'expérience met bien en évidence l'effet combiné des radicaux et des ions et démontre ainsi l'importance de la synergie

ions-neutre⁷⁹. La sélectivité et l'anisotropie sont dues à l'effet combiné des radicaux et des ions, sachant que le bombardement ionique favorise la rupture de liaisons à la surface du substrat, ce qui augmente l'adsorption de radicaux et aide à la création d'espèces volatiles, et donc à la désorption.

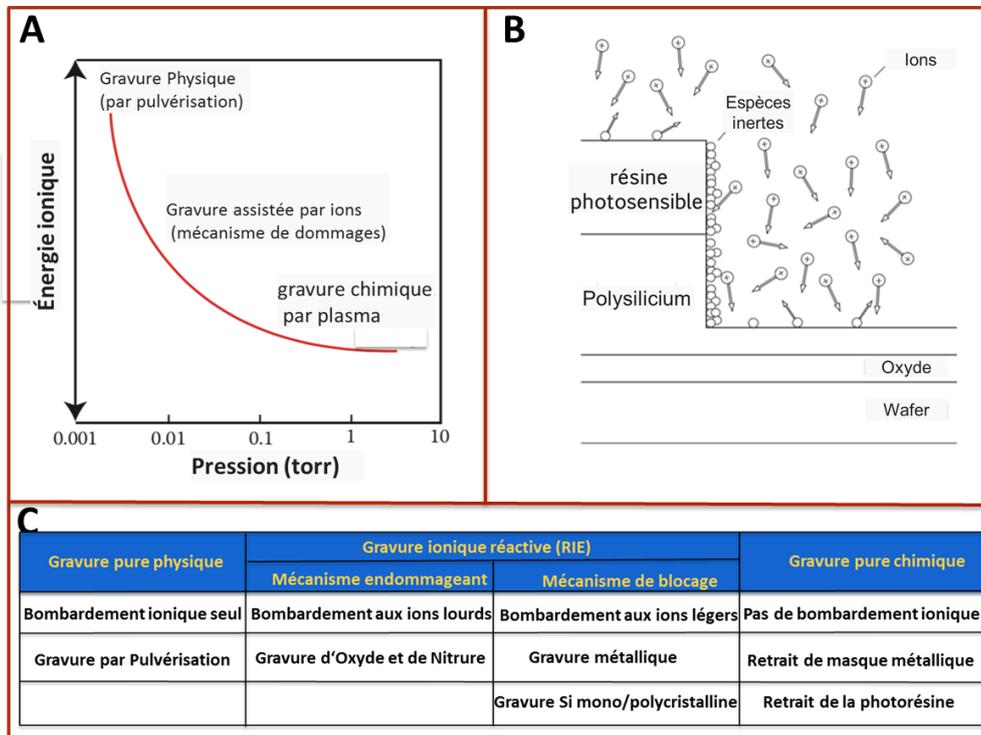


Figure 4.7 : A) Evolution de l'énergie des ions avec la pression dans un plasma. B) Anisotropie ou mécanisme de blocage induit par les inhibiteurs. C) Mécanisme de gravure à sec et son application. (Extrait et adapté du livre de Marc J. Madou *Manufacturing Techniques for Microfabrication and nanotechnologies*.⁷⁷)

En résumé, trois facteurs contrôlent la vitesse de gravure physico-chimique dans un plasma : 1) la concentration en atomes neutres et en radicaux libres, 2) la concentration en ions et 3) l'énergie des ions. Les concentrations d'ions et de radicaux contrôlent la vitesse de réaction, tandis que l'énergie des ions fournit l'activation nécessaire et contrôle le degré d'anisotropie. La contribution respective à l'action chimique et physique du plasma peut être manipulée en faisant varier la tension et la pression du gaz.

La Figure 4.7-A ci-dessus illustre la relation qui existe entre l'énergie des ions (contrôlée par l'autopolarisation négative par rapport au potentiel des ions dans le plasma) et la pression dans le plasma. La pulvérisation cathodique sous gaz neutre (par exemple avec des ions Ar^+) et la gravure chimique sèche avec des espèces réactives, mais avec une autopolarisation nulle, représentent les deux cas extrêmes. Le tableau de la Figure 4.7-C met en évidence les caractéristiques de différentes techniques de gravure : la gravure ionique (purement physique), la gravure plasma (essentiellement chimique) et le cas intermédiaire la gravure ionique réactive. La gravure ionique réactive utilisée dans mes expériences se situe à des énergies intermédiaires autour de 100 à 150V tout en travaillant sous des faibles pressions de l'ordre de 3mtorr. Nous verrons plus loin qu'il est possible d'obtenir une telle gravure physico-chimique à faible pression en modulant l'énergie des ions (qui polarise notre substrat) grâce au système ICP RIE (voir partie III.1.2 Plasma inductif).

L'image B de la Figure 4.7-C permet de visualiser le mécanisme de passivation des flancs pendant la gravure appelé aussi « blocking mechanism » ou « blocking effect »⁷⁷. Ce blocking effect est

l'anisotropie induite par les inhibiteurs : le bombardement ionique étant majoritairement normal à la surface de l'échantillon polarisé, la couche d'inhibiteur est pulvérisée de la surface horizontale (les flancs restent passivés) et la réaction avec les neutres ne se produit que sur ces surfaces non passivées. Le film protecteur peut provenir de produits de gravure qui se redéposent ou de précurseurs filmogènes s'adsorbant sur les surfaces exposées au plasma au cours du processus de gravure. Les gaz passivant, tels que le CHF_3 , sont des sources d'espèces formant des inhibiteurs. Un autre exemple : Si on pulvérise du Si (porte substrat par exemple) dans un processus de gravure et que l'on injecte un peu d'oxygène dans le plasma alors on peut provoquer la formation de SiO_x qui sont des espèces non volatiles et qui peuvent se redéposer notamment sur les flancs de gravure pour former une couche passivant.

C – Description des réacteurs : CCP-RIE versus ICP-RIE

Le plus simple des réacteurs de gravure ionique réactive RIE est un réacteur plasma à couplage capacitif, dit CCP, qui comporte deux électrodes en vis à vis: on applique le champ électrique à la fréquence $f=13.56\text{MHz}$ sur la première électrode connectée à l'alimentation tandis que l'autre électrode est mise à la masse (Figure 4.8-A). Ce réacteur a une configuration de condensateur plan, d'où le nom de plasma à couplage capacitif. Le principe consiste à générer un champ électrique entre les deux électrodes, les atomes sont ionisés et libèrent des électrons. Les électrons dans le gaz sont accélérés par le champ RF et peuvent ioniser le gaz directement ou indirectement par collision, produisant des électrons secondaires. Les atomes du gaz réagissent avec les atomes de l'échantillon pour former une nouvelle espèce volatile qui sera évacuée par pompage.

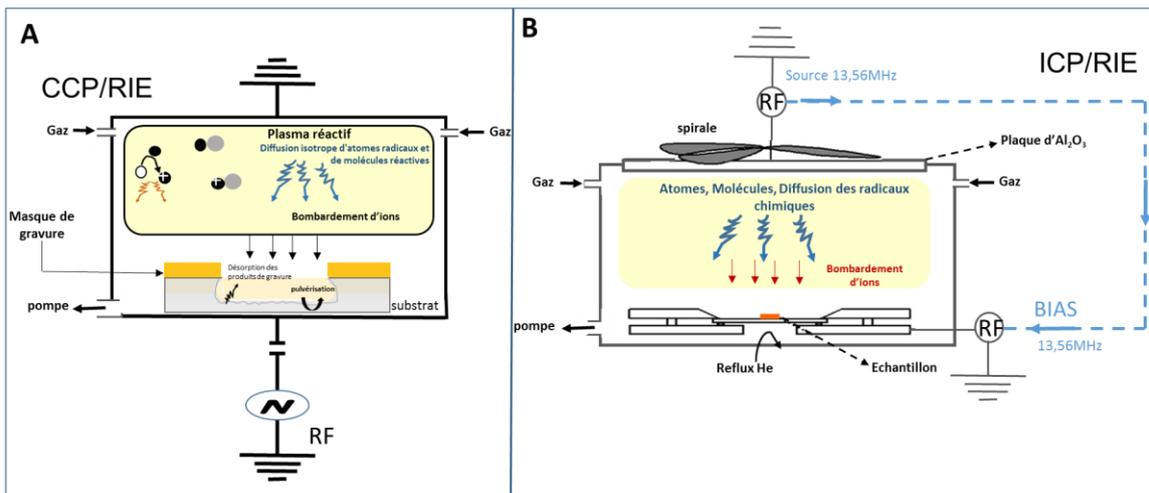


Figure 4.8 : Schéma d'un réacteur de gravure A) CCP-RIE et en B) ICP-RIE

Une variante de ce réacteur de gravure est un réacteur dit ICP (Figure 4.8-B), qui est aussi composé de deux antennes radio-fréquence (RF à 13,56 MHz) dont une sous l'échantillon. La géométrie de ce réacteur permet de contrôler séparément et indépendamment la densité du plasma (le flux d'ions) et l'énergie des ions. Dans ce plasma de forte densité ionique et électronique, la puissance injectée dans le plasma et la puissance de polarisation du substrat sont toutes deux délivrées par les deux électrodes séparément (Figure 4.8-B). Une antenne circulaire (ou spirale) sur la partie haute du réacteur se couple avec le plasma par induction électromagnétique à travers un matériau diélectrique, souvent Al_2O_3 ou SiO_2 . Il se crée ainsi un courant électronique dans le plasma. En effet, quand on polarise l'antenne RF

du haut, il se crée un courant RF dans cette antenne qui va générer un flux magnétique qui va induire un champ électrique azimuthal dans le plasma. Ce champ électrique permet de transférer de l'énergie aux électrons du plasma.

Le second générateur, généralement appelé générateur de « biais », est utilisé pour autopolariser le substrat négativement par rapport au plasma, et contrôler ainsi l'énergie des ions positifs qui vont bombarder le substrat. Dans notre montage expérimental, le porte substrat est thermiquement couplé à l'électrode par un fin film de He et la température de l'électrode est régulée par chauffage résistif et refroidissement par une circulation d'un liquide thermo régulé.

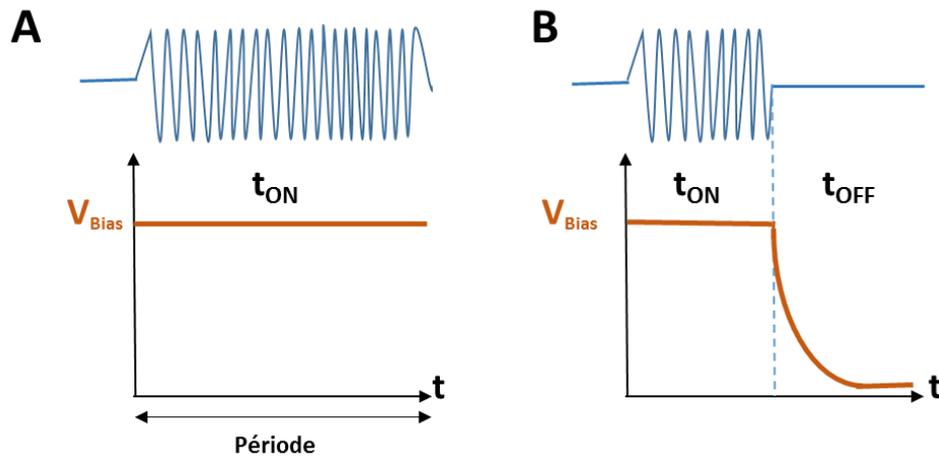


Figure 4.9 : Principe A) Mode normal ; B) du mode pulsé.

Il est possible, également de "pulser" le plasma c'est-à-dire d'allumer et d'éteindre l'un ou l'autre ou les deux générateurs. La puissance est allumée et éteinte successivement (Figure 4.9) à la fréquence $f = \frac{1}{t_{ON} + t_{OFF}}$. Le rapport cyclique DC (Duty Cycle) correspond au rapport entre le temps où la puissance est allumée sur la période totale $DC = \frac{t_{ON}}{t_{ON} + t_{OFF}}$. Le mode pulsé sur le générateur du porte substrat permet de diminuer le temps de bombardement des espèces sur la surface de l'échantillon. Ce mode "pulsé" permet ainsi de réduire les dommages qui peuvent être induits par le bombardement ionique lors de la gravure. Lorsque l'on accélère un flux d'ions sur une surface avec des motifs, il se produit des collisions dans les fentes de ces motifs, ce qui empêche une partie des espèces volatiles de s'échapper. Ceci est d'autant plus critique que les ouvertures du masque sont petites (inférieures à 500nm typiquement. Dans notre cas, nous avons utilisé ce mode pulsé sur l'électrode porte-substrat pour pouvoir obtenir une vitesse de gravure comparable dans les grands réservoirs (300µm) que dans les nanofentes de 100nm de large. C'est en partie pour pouvoir pulser l'énergie des ions tout en maintenant le plasma que nous avons utilisé l'ICP-RIE plutôt qu'une machine CCP-RIE.

En résumé :

Pour la fabrication de nos dispositifs, nous avons choisi d'utiliser un tel réacteur ICP-RIE, pour pouvoir optimiser finement les paramètres de gravure en le combinant au mode pulsé.

III.1.2 – Mécanismes : réactions chimiques

Pour mieux comprendre nos choix sur la mélange gazeux, prenons un exemple classique de gravure du Si réalisé dans un mélange fluoré (SF_6/O_2) et regardons comment l'ajout d'un 3^{ème} gaz CHF_3 permet de contrôler la passivation des flancs (blocking effect) (Figure 4.10A).

Sur la Figure 4.10-A, les réactions chimiques qui se produisent en gravant une surface de Silicium avec un plasma de $SF_6/CHF_3/O_2$ sont présentées. Typiquement dans ce type de plasma une des réactions possible avec une molécule de SF_6 est :



Le SF_6 , très connu pour la gravure du silicium, produit des radicaux $F \cdot$ qui réagissent chimiquement avec le Si et forment le produit volatil SiF_4 (par exemple). Pour obtenir une bonne anisotropie, on ajoute l'oxygène qui, par l'intermédiaire des radicaux $O \cdot$, permet la passivation de la surface de Si (couche $Si_xO_yF_z$ sur les flancs).

Si un plasma SF_6/O_2 produit normalement des surfaces de gravure assez rugueuses, l'addition de CHF_3 au plasma SF_6/O_2 permet de réduire la rugosité de surface et on peut observer des surfaces lisses^{80,81}. La figure 4.10-B présente une sélection des profils de parois latérales, qui ont été obtenus avec les recettes de gravure décrits Figure 4.10-C⁸¹. Ces travaux montrent clairement qu'il est difficile d'obtenir une définition simple de l'anisotropie, et qu'il faut jouer sur beaucoup de paramètres pour garder en même temps une bonne anisotropie et un fond de gravure lisse. Selon les conditions de gravure et le choix des gaz permettent de varier les profils des motifs gravés. Dans le cas de nos échantillons pour lesquels nous souhaitons graver SiO_2 avec un masque en Al, la gravure se fait en deux étapes : la gravure de Al se fera avec un plasma de Cl_2 et la gravure de SiO_2 qui peut être gravé par des gaz tels que : SF_6 , CF_4 , CHF_3 , C_2F_6 etc ... (Voir Tableau 4.2 et Tableau 4.3).

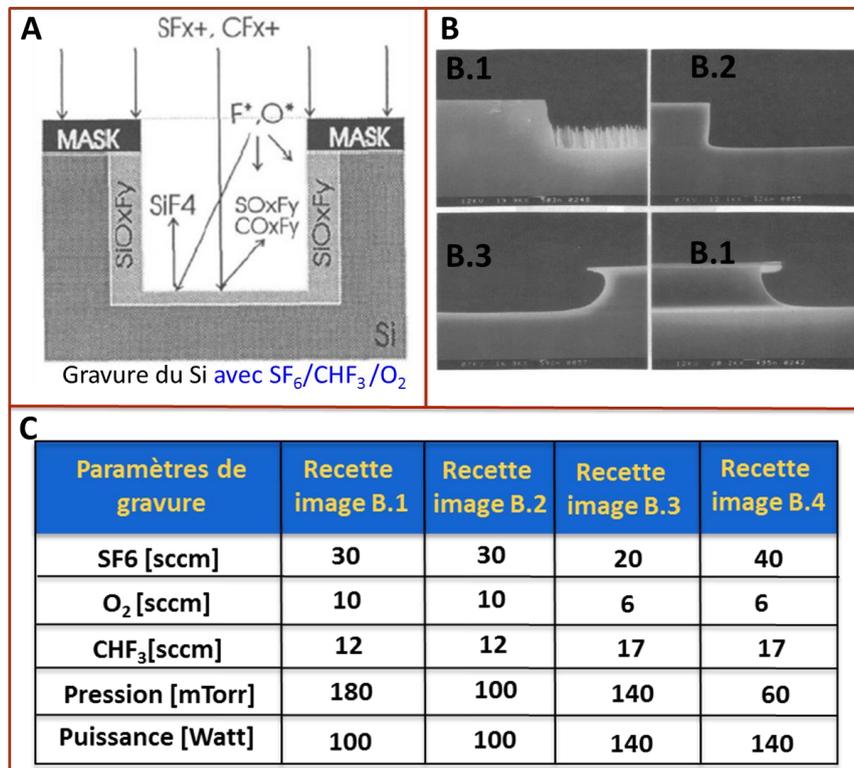


Figure 4.10 : A) la gravure du Si avec le mélange $SF_6/CHF_3/O_2$ B) quelques profils obtenus C) Paramètres de gravures utilisées pour les gravures de la Figure 4.10B⁸¹

Matériau	Gaz de gravure courants *	Espèces Dominantes réactives	Produits	Commentaires	La pression de Vapeur (Torr) à 25 ° C
Aluminium	À base de chlore	Cl, Cl ₂	AlCl ₃	Gaz toxique et gaz corrosifs	7 × 10 ⁻⁵
Cuivre	Le chlore forme des composés à basse pression	Cl, Cl ₂	CuCl ₂	Gaz toxique et gaz corrosifs	5 × 10 ⁻²
Molybdène	À base de fluor	F	MoF ₆		530
Polymères de carbone, photoresists (PMMA et polystyrène)	Oxygène	O	H ₂ O, CO, CO ₂	Danger d'explosion	H ₂ O = 26 CO, CO ₂ > 1 atm
Composants III-V et II-VI	Alcanes			Gaz inflammable	
Silicium	Fluor ou à base de fluor	F, Cl, Cl ₂	SiF ₄ , SiCl ₄	Gaz toxique	SiF ₄ > 1 atm SiCl ₄ = 240
SiO ₂	CF ₄ , CHF ₃ , C ₂ F ₆ , C ₃ F ₆	CF _x	SiF ₄ , CO, CO ₂		SiF ₄ > 1 atm CO, CO ₂ > 1 atm
Tantale	A base de fluor	F	TaF ₅		3
Titane	Fluor ou à base de fluor	F, Cl, Cl ₂	TiF ₄ , TiF ₃ , TiCl ₄		TiF ₄ = 2.104 TiCl ₄ = 16
Tungstène	Contenant du fluor	F	WF ₆		1000

Tableau 4.3 : Gravure au plasma pour matériaux microélectroniques

Pour la gravure de SiO₂, nous avons utilisé deux protocoles basées sur les mélanges de gaz SF₆/Ar/O₂ (recette 1) et SF₆/CH₄/Ar/O₂ (recette 2).

Décrivons maintenant les deux recettes utilisées : **protocole 1** pour l'utilisation de mélange de gaz SF₆/Ar/O₂ et **protocole 2** pour le mélange SF₆/CH₄/Ar/O₂. Il s'agit ici de faire une présentation simple des mécanismes principaux de gravure mis en jeu dans le cas de ces mélanges gazeux.

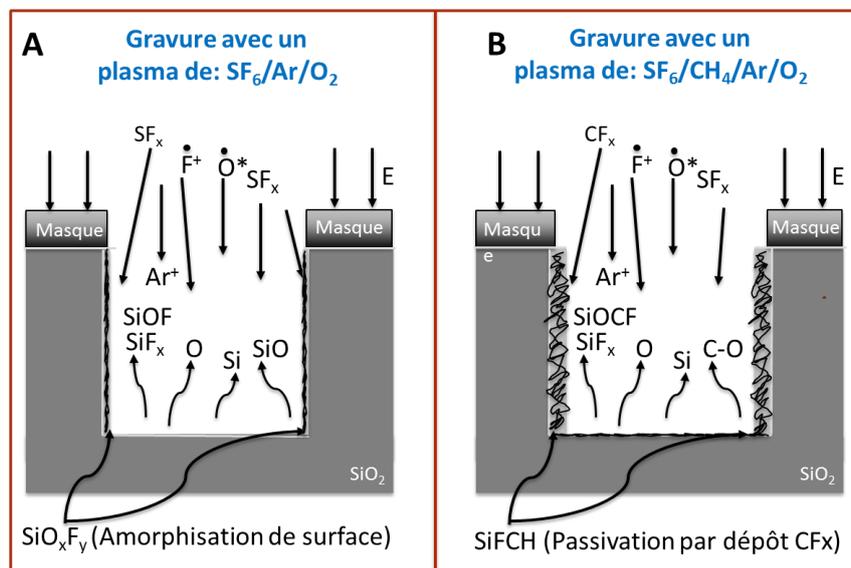


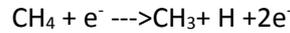
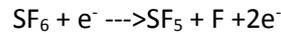
Figure 4.11: les réactions attendues pendant la gravure d'un motif avec un plasma de A) SF₆/Ar/O₂ et B) SF₆/CH₄/Ar/O₂

- SF₆/Ar/O₂ (protocole 1 – Figure 4.11-A)

Le SF₆ fait partie des gaz les plus utilisés pour la gravure du silicium en couche mince. Dans notre cas, nous l'utilisons pour la gravure du SiO₂. Il génère des radicaux tels que le SF_x. Il interviendra aussi pour l'amorphisation des flancs de gravure grâce à la production de SiO_xF_y. L'oxygène oxyde l'Al ce qui

augmente la sélectivité de ce masque car la couche mince d'AlO_x formée est peu sensible à l'attaque chimique des radicaux F. L'Ar quant à lui pulvérise ou bombarde la surface. Il est utilisé pour la gravure « chimique » à assistance ionique. Il améliore l'anisotropie. La caractéristique atomique de l'Ar est aussi utilisée pour stabiliser le plasma et en particulier avec l'utilisation d'un mode pulsé.

Exemples de réactions :



- SF₆/Ar/CH₄/O₂ (protocole 2 – Figure 4.11-B)

Le rôle des gaz dans cette recette est presque la même par rapport à la recette 1, sauf que nous avons ajouté un nouveau gaz: le CH₄. Le CH₄ génère les radicaux tels que : CH, C, Il sert à enlever l'oxygène de la couche du SiO₂, intervient dans la passivation des parois pour éviter l'isotropie et décape en même temps le fond de gravure. En effet, l'oxygène réagit avec les CF_x à sa surface en produisant des composés volatiles le CO, CO₂ ou COF₂. En effet ce film protecteur très important sur le masque sert à le protéger de cette attaque ionique et obtenir une bonne sélectivité parce que la gravure du SiO₂ nécessite un bombardement ionique important. Ces couches de passivation qui se forment sur les flancs des motifs sont très importantes car elles protègent les flancs de la gravure par les espèces neutres⁸².

L'oxygène utilisé ici joue deux rôles : Il oxyde l'Al ce qui augmente la sélectivité mais aussi évite un re-dépôt trop important du Carbone tout en oxydant l'aluminium.

III.2 – La gravure ICP-RIE traditionnelle (protocole 1):

Nous avons effectué nos premières gravures en utilisant le mélange des trois gaz SF₆, Ar et O₂, procédé qui a été décrit précédemment (Figure 4.11-A).

III.2.1 – La gravure du film de SiO₂ avec le mélange SF₆/O₂/Ar (protocole 1) :

Les premières gravures avant optimisation ont été effectuées avec un plasma **SF₆/Ar/O₂**. Ces résultats ont été obtenus sur substrat en verre (borosilicate recouvert d'un dépôt CVD de SiO₂) avec les paramètres de gravures suivants:

Recette de base: SF₆/Ar/O₂ en mode pulse (**protocole 1**)

Process	Mode	Puissance Source injectée	Puissance de polarisation	Blais	Pression	Vitesse de gravure
Ar=7.0 sccm; SF ₆ =60.0 sccm; O ₂ =3.0 sccm	Mode Pulse: 250ms On et 500ms period	300W	30W	-100V	3mTorr	47,5nm/min

Tableau 4.5: Paramètres de gravure du SiO₂ avec un plasma de SF₆/Ar/O₂ : protocole 1

Les premiers échantillons gravés avec le protocole 1 sont illustrés sur la Figure 4.12. Les figures 4.12-A et 4.12-B présentent des images prises au microscope électronique à balayage (MEB) des fonds de motifs de gravure. On observe ici un micro-masquage du fond de gravure très rugueux, avec la présence de plots et de motifs comme de l'herbe.

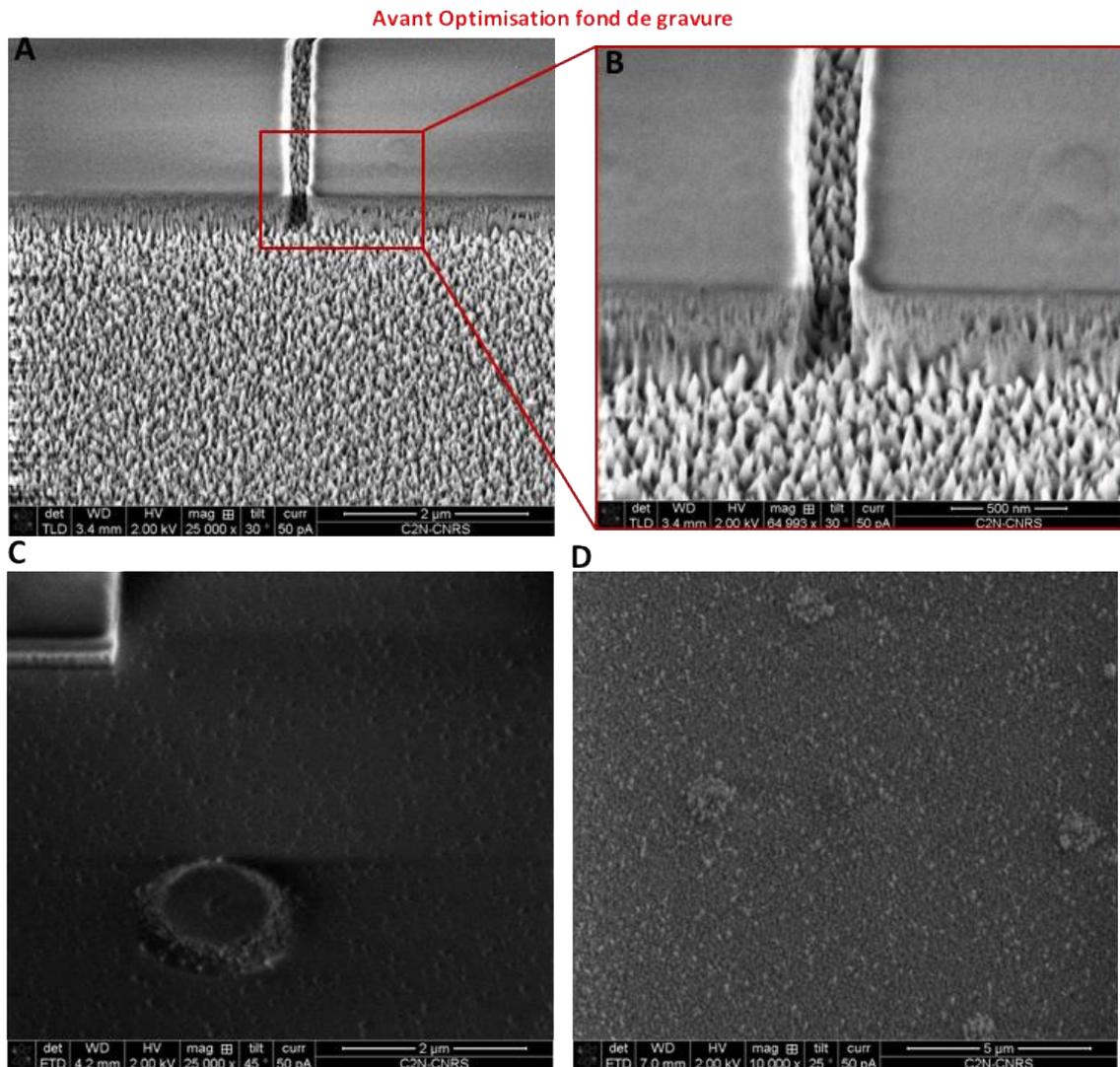


Figure 4.12: Mise en évidence du fond de gravure par imagerie MEB d'une puce (A) et (B) : avec le protocole de base (Tableau 4.5) ; Image MEB d'une puce C/ Après gravure de l'Al, D/ Après gravure SiO_2 .

La présence de cette rugosité en fond de motif pourrait être due à une sur gravure de SiO_2 , car le verre borosilicate contient des impuretés qui pourraient conduire à une gravure non-homogène. Un contrôle de l'épaisseur gravée nous permet d'affirmer que la gravure n'a pas atteint le substrat de verre et qu'elle s'est arrêtée avant l'interface SiO_2 /verre. De plus, nous avons essayé de diminuer le temps de gravure par deux, et les résultats ont montré toujours la présence de cette rugosité (Figures 4.13-A et 4.13-B). Cette rugosité n'est donc pas liée à une sur gravure.

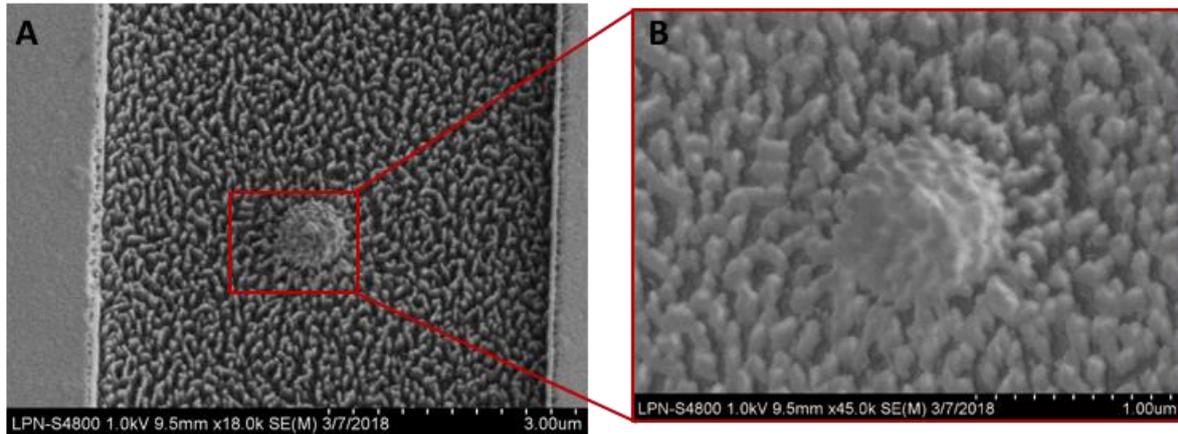


Figure 4.13: Image MEB d'une puce gravée (A) avec la recette de base (tableau 4.5) sur un substrat SiO_2 en diminuant le temps de gravure de moitié (en ICP-RIE).

Une 2^{ème} raison pourrait provenir d'une gravure du masque d'Al qui était non homogène en épaisseur, ce qui expliquerait l'observation du micro-masquage et donc de la rugosité⁸³. Nous avons donc mené des observations au MEB pour vérifier l'état du fond de gravure juste après la gravure de l'Al (Image C de la Figure 4.12). La Figure 4.12-C montre bien qu'il existe toujours des défauts épais non gravés, qui pourraient s'expliquer par une épaisseur fortement inhomogène de la couche d'Al (présence de cluster Al épais dans le film mince d'Al). On remarquera sur la Figure 4.12-D que ces défauts existent toujours après la gravure du SiO_2 . En conclusion, nous pensons donc que la présence de ces défauts et de cette rugosité est liée à l'existence de défauts dans la couche de métal (ou à un re-dépôt de l'Al pendant la gravure par pulvérisation du masque).

III.2.3 -Etude de l'ajout de CHF_3 dans le mélange $\text{SF}_6/\text{Ar}/\text{O}_2$ (protocole1) :

Nous avons donc testé l'ajout du gaz CHF_3 comme gaz passivant. Cette étude a été menée dans un bâti de géométrie cylindrique de type CCP-RIE où une ligne de gaz CHF_3 existait. Nos tests ont été menés sur substrat de silicium dans un souci de rapidité et de faciliter l'observation au MEB. Les paramètres de gravure utilisés sont résumés dans le Tableau 4.6 ci-dessous.

Paramètres de gravure utilisées sur un substrat de Silicium en RIE classique: CHF_3/SF_6

Process	Mode	Puissance Source injectée	Biais	Vitesse de gravure
$\text{CHF}_3 = 20\text{sccm};$ $\text{SF}_6 = 8\text{sccm};$	Pas de mode Pulse	15W	-200V	34,7nm/min

Tableau 4.6: Recette de gravure d'un substrat de Silicium en RIE classique avec un plasma de CHF_3/SF_6

Le résultat observable sur l'image MEB de la Figure 4.15 ci-dessous montre que la surface des fonds de motifs est beaucoup moins rugueuse.

Le ratio de CHF_3 est très important et permet d'injecter des radicaux C et H qui sont favorables à une recombinaison avec les atomes d'oxygène de la surface. Nous avons aussi fortement réduit la proportion de SF_6 qui provoque une gravure sélective du Si par rapport à l'O. La réduction forte de la vitesse de gravure est favorable à réduire la rugosité de surface en favorisant une vitesse de gravure uniforme de tous les atomes de la surface.

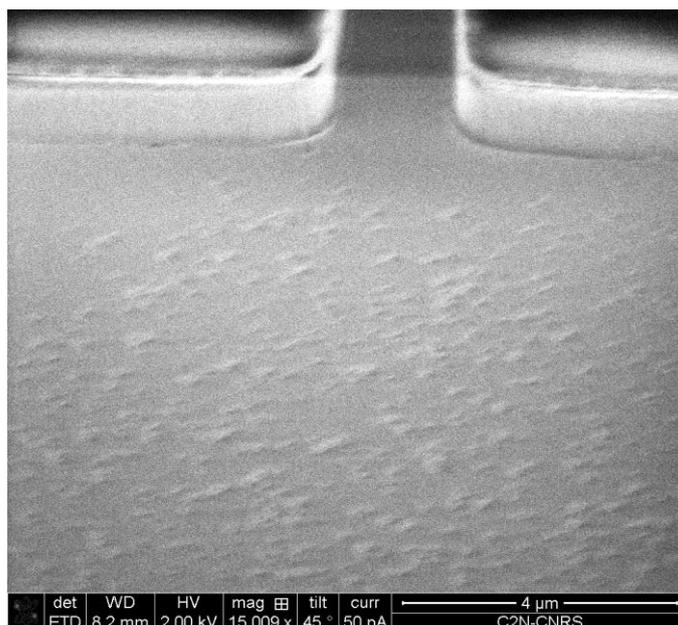


Figure 4.14: Image MEB d'une puce gravée en CCP/RIE avec un plasma de CHF_3/SF_6

A la vue de ces résultats très encourageants j'ai donc par la suite optimisé le protocole 2 dans le bâti ICP-RIE en mode pulsé.

III.2.3 –La gravure du film de SiO_2 avec le mélange $\text{SF}_6/\text{CH}_4/\text{Ar}/\text{O}_2$:

A – Choix des gaz réactifs : le CH_4

Puisque la gravure au $\text{SF}_6/\text{Ar}/\text{O}_2$ conduisait toujours à une rugosité de fonds de motifs trop importante, et que l'utilisation du plasma CHF_3/SF_6 a amélioré le fond de gravure, nous avons donc transféré la recette utilisée en RIE classique dans le réacteur ICP. La recette originale a été copiée en conservant le ratio C/F qui est le paramètre principal pour contrôler la passivation des parois pendant la gravure continue (injection continue dans le temps, d'un même débit de gaz dans le plasma).

Paramètres de gravures utilisées avec un plasma de : $\text{SF}_6/\text{Ar}/\text{O}_2/\text{CH}_4$ (protocole 2)

Process	Mode Pulsé	Puissance Source injectée	Puissance de polarisation	Biais	Pression	Temps de gravure
$\text{SF}_6=26.0$ sccm; $\text{CH}_4=29$ sccm; $\text{Ar}=7.0$ sccm; $\text{O}_2=3.0$ sccm	NON	300W	30W	-100V	3mTorr	7 min

Tableau 4.7: Paramètres de gravure d'un substrat de Silicium en ICP-RIE avec un plasma de $\text{SF}_6/\text{Ar}/\text{O}_2/\text{CH}_4$ en mode non pulsé.

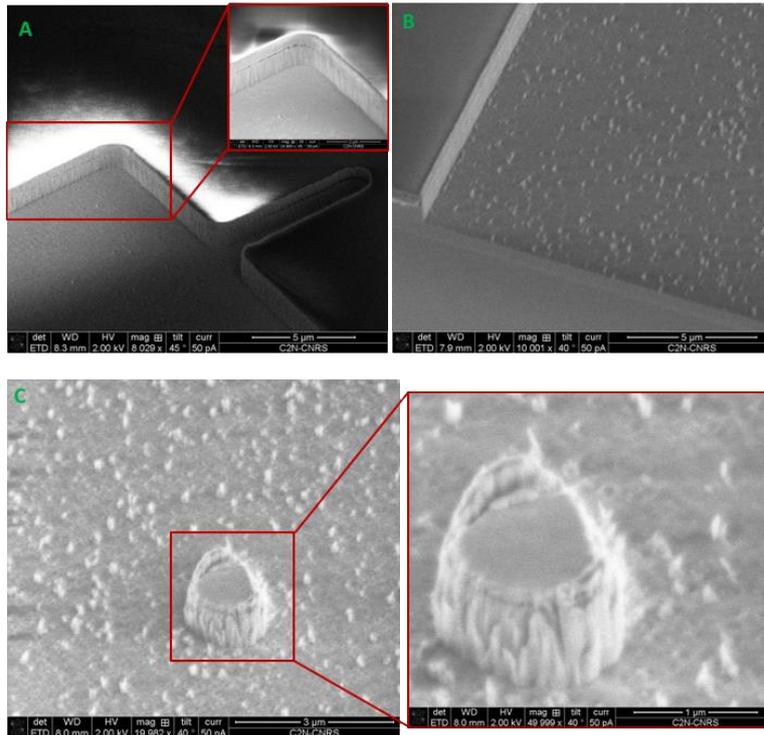


Figure 4.15: Image MEB d'une puce gravée avec la recette 2 (Tableau 4.7) sur un substrat Si en ICP-RIE (A), (B) et (C)

Plusieurs tests ont été effectués notamment pour vérifier la reproductibilité. La Figure 4.16 montre des exemples obtenus en utilisant le plasma de $\text{SF}_6/\text{Ar}/\text{O}_2/\text{CH}_4$. On observe une baisse importante de la rugosité du fond de gravure par rapport à ceux qu'on avait avec le protocole 1. Nous avons étudié l'image A de la Figure 4.16 à l'AFM, les résultats sont donnés dans la figure ci-après :

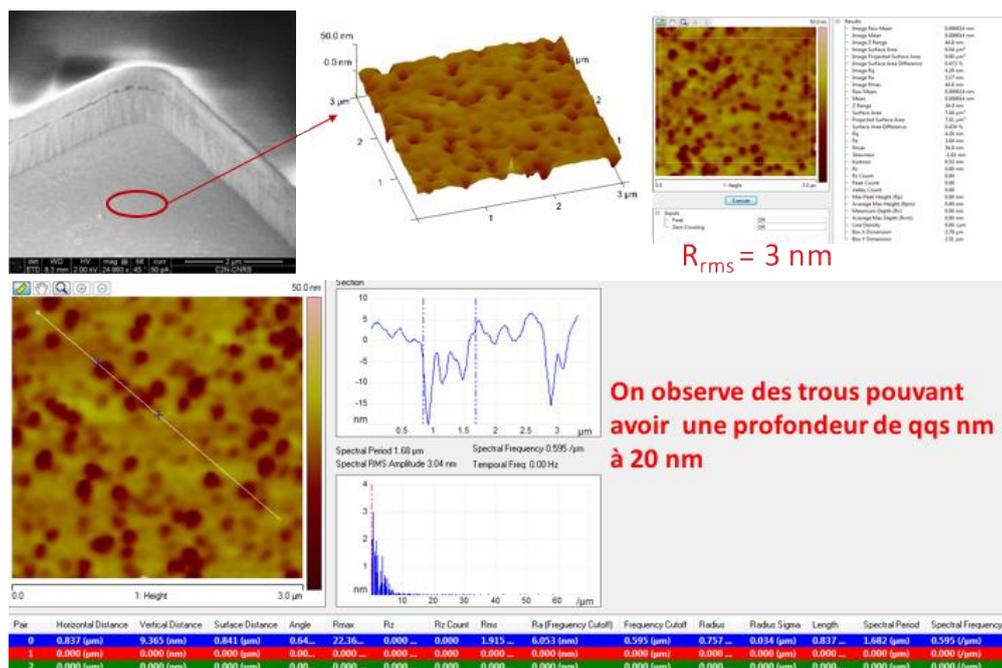


Figure 4.16 : Mesure d'AFM de l'image A de la Figure 4.15 gravée avec le protocole 2 (Tableau 4.7) sur un substrat Si en ICP-RIE.

Nous observons grâce à l'utilisation du CH₄ une diminution de la rugosité du fond de gravure avec une rugosité moyenne $R_{RMS} \approx 3\text{nm}$. La rugosité RMS (root-mean-square) est une moyenne quadratique de toutes les ordonnées à l'intérieur de la longueur de base. Elle est calculée sur la surface des points hauts et bas (c'est-à-dire la moyenne quadratique de la variation des irrégularités de la surface).

$$R_{RMS} = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l Z^2(x) dx}$$

Cette forte amélioration du fond de gravure est liée au fait que Le CH₄ permet de générer du carbone, qui à son tour pourra former un composé volatile avec l'oxygène de la surface à graver, Les radicaux provenant du CH₄ en recombinaison avec les radicaux fluors du plasma (qui proviennent du SF₆) sont capable de passiver ainsi les parois en formant sur les flancs de gravure une couche mince fluoro-carbonnée. Cette passivation est un frein à la gravure latérale et est assez stable chimiquement. Elle subit à la marge la pulvérisation par les ions incidents et par les espèces secondaires issues de la pulvérisation du fond de gravure. Par contre elles empêchent les radicaux neutres de réagir avec les surfaces qu'elle protège. On contribue ainsi à intensifier l'anisotropie.

Il existe bien entendu un autre paramètre sur lequel nous pouvons agir et c'est l'énergie des ions incidents qui peut être ajustée à travers la puissance RF appliquée à l'échantillon et qui régule l'autopolarisation (potentiel négatif par rapport au plasma).

B -Polarisation du substrat et rôle du mode pulsé

Dans tout ce qui suit, nous avons décidé de fixer la puissance source injectée à 400W (au lieu de 300W), car nous avons observé que cela réduisait la présence de plots et de trous tout en augmentant la vitesse de gravure. Cette puissance, connue sous le nom de "puissance source injectée dans le plasma", permet de contrôler la densité ionique. Nous pouvons ainsi contrôler le flux d'ions et de radicaux.

La puissance de polarisation quant à elle détermine l'énergie des ions, et donc, en modifiant cette dernière, nous réduisons les risques des dommages de la surface de notre échantillon. Elle permet aussi un contrôle de la gravure verticale grâce à l'accélération des ions par le potentiel de polarisation. Les images MEB de la Figure 4.17.A correspondent à un échantillon gravé avec une polarisation de -100V. On constate une diminution de la rugosité bien qu'elle reste toujours présente.

Les images B correspondant à un échantillon gravé avec une polarisation plus élevée de -140V (accélération plus importante). On constate que le fond de gravure est très lisse mais qu'il présente toutefois des flancs de gravure très érodés. Cet effet s'explique par le fait que certains des ions arrivent avec un petit angle et viennent taper le bord du masque en l'érodant, d'où la présence de crevasses visibles sur les flancs du motif.

Les images C de la Figure 4.17 montrent une gravure effectuée sous une polarisation intermédiaire de -110 V. On remarque l'absence de l'effet « scratch » et une baisse importante de la rugosité de surface.

En adaptant donc la valeur de la polarisation à -110V, nous avons obtenu une recette de gravure qui conduit à des flancs assez droits avec un fond gravure lisse. De plus, cette recette de gravure en mode pulsé permet d'obtenir une vitesse de gravure similaire dans les grands réservoirs (300µm) et dans les nanofentes de 100nm de large.

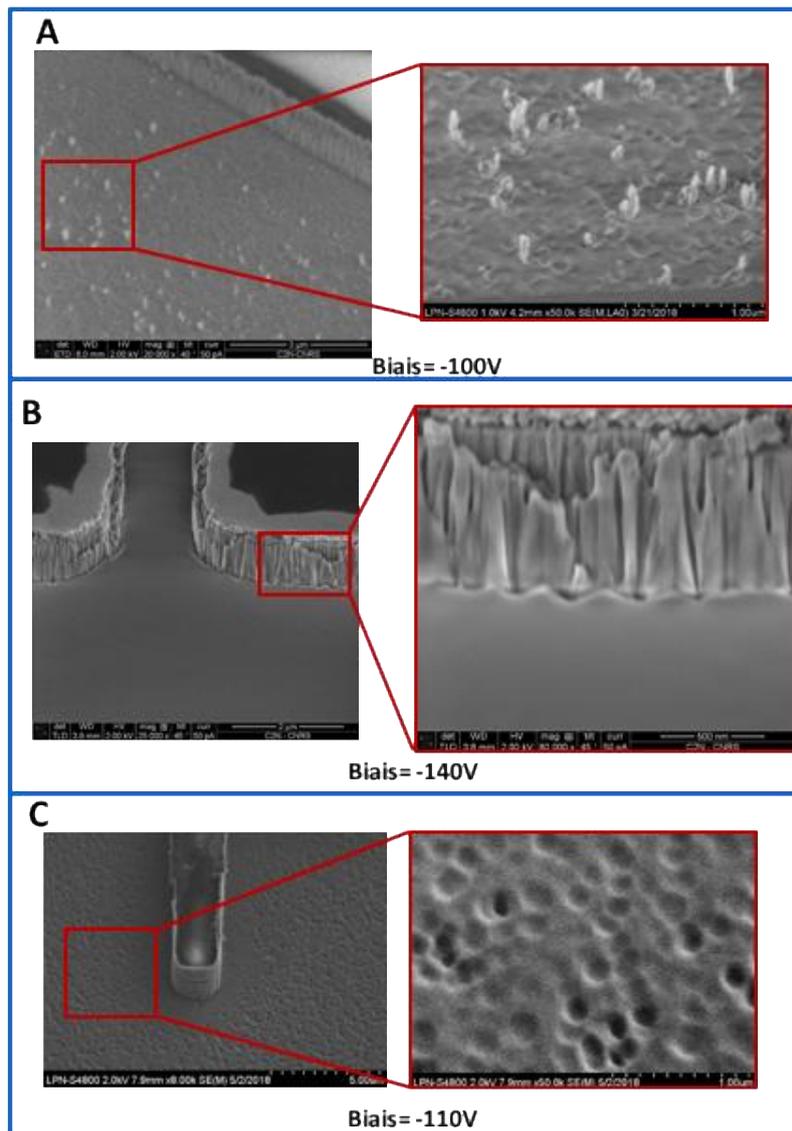


Figure 4.17: Evolution du fond de gravure pour une puissance polarisation de plasma de A) 30W_B) 60W et en C) 45W.

Avec une puissance de polarisation de 45W, en mode pulsé, et avec une polarisation sur le substrat de -110V, on obtient un fond de gravure suffisamment lisse pour atteindre notre objectif final.

L'image A de la Figure 4.18 montre un fond de gravure obtenu avec ces paramètres optimisés. **L'image B** montre l'étude en AFM de l'image A qui conduit à une valeur de rugosité moyenne $R_{RMS} \approx 0,45$ nm, soit environ 7 fois plus faible que la valeur R_{RMS} de 3nm obtenue précédemment pour protocole 2.

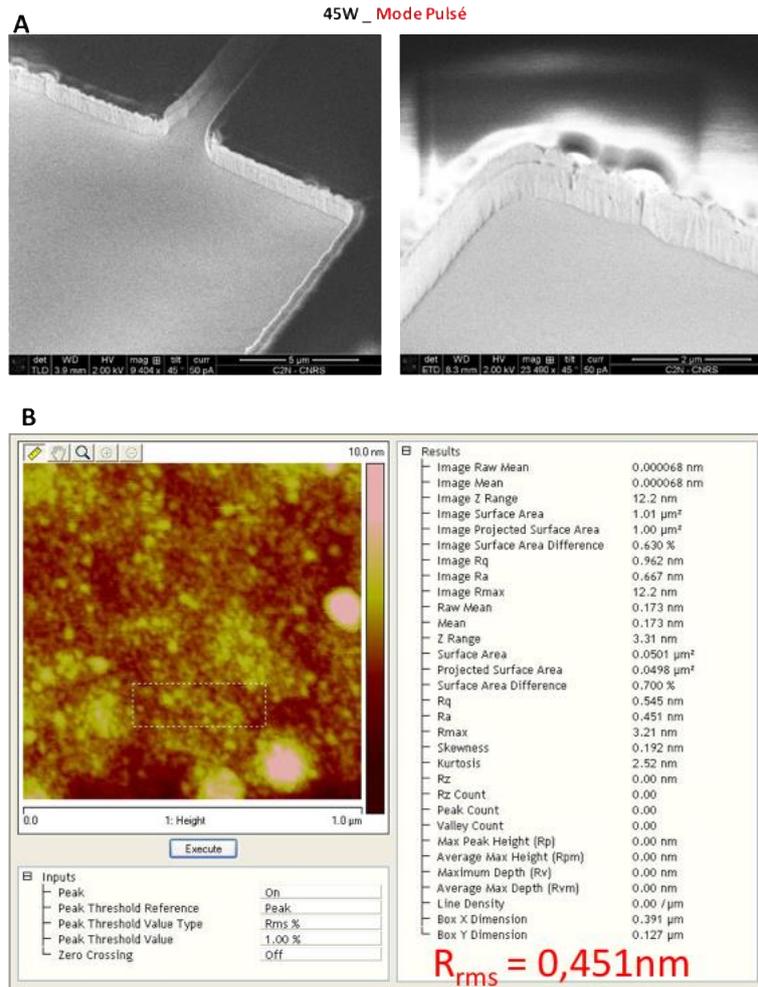


Figure 4.18: A) Exemple du fond de gravure obtenu avec la recette finale d'une puissance plasma de 45W en mode pulsé. B/Mesure d'AFM du fond de gravure.

Rappelons que le mode pulsé est très important puisqu'il permet de stopper le flux des espèces ioniques et évite ainsi une surchauffe de l'échantillon (réduction de la température électronique et la densité électronique en moyenne dans le temps) tout en facilitant l'évacuation des espèces issues de la gravure des petites ouvertures. Il permet donc de minimiser les dommages qui peuvent être induits par le bombardement ionique lors de la gravure. Avec le mode pulsé, on observe une vitesse de gravure similaire dans les nanofentes (de largeur $\approx 100\text{nm}$) que dans les grands réservoirs de largeur $300\mu\text{m}$.

Au cours de l'optimisation, nous avons été confrontés à une non-uniformité de la gravure sur la surface de deux pouces de notre échantillon. Comme le montrent les images A et C de la Figure 4.19 observées sur un même échantillon mais en deux points différents, la présence de défauts dans le fond de gravure n'est pas identique. On remarque une forte présence de plots pour l'image A tandis que la surface est à peu près lisse sur le reste de l'échantillon. Ceci peut être dû à une inhomogénéité en température d'un bout à l'autre de l'échantillon. Ceci est en particulier critique pour la gravure du masque d'aluminium par plasma de Cl_2 . Le contact thermique est assuré par de la graisse à vide entre la face arrière de l'échantillon et le porte substrat qui est une plaque de saphir. Trouver d'autres méthodes de fixation de l'échantillon pour le futur est une perspective à envisager.

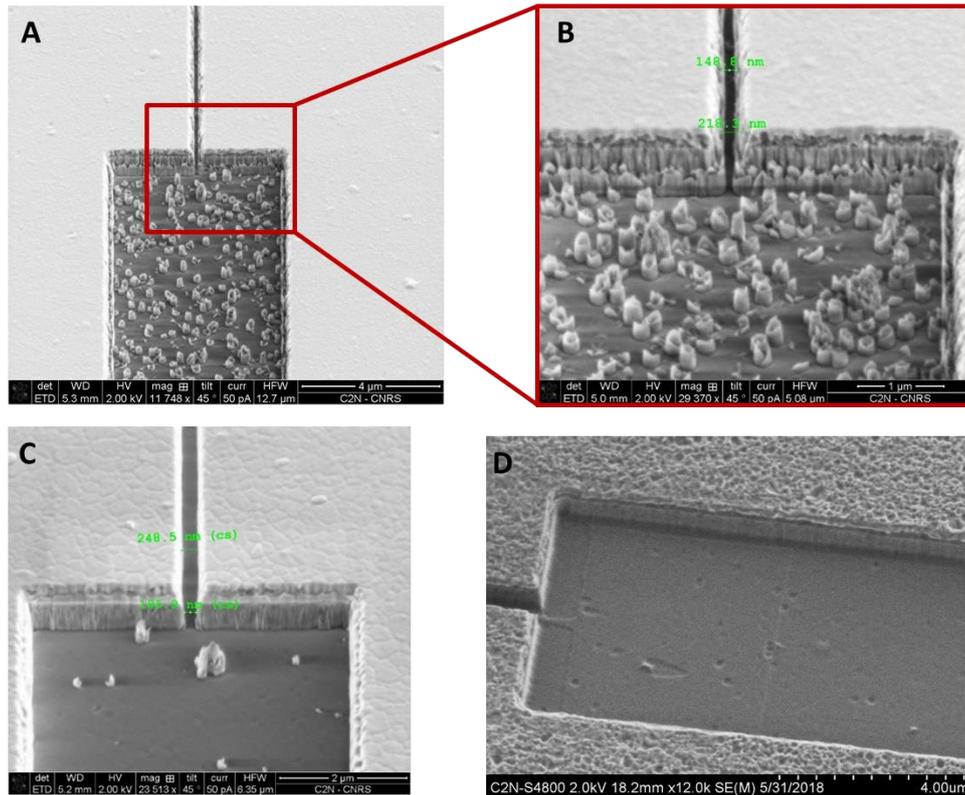


Figure 4.19: A) B) C) Mise en évidence de la non-uniformisation de la surface de gravure sur un même wafer –D) Etat de ce wafer après utilisation du bain d'acide pour enlever les plots

Pour retirer cette rugosité parasite, nous avons testé l'immersion de l'échantillon dans un bain acide contenant du HF (à 40% - 100ml), du HCL (37% - 30ml) et de l'eau ultra-pure (200ml). Cette solution grave à la vitesse de 2 microns par minute. Avec cette recette, nous avons pu enlever complètement les plots de l'image A, le résultat est montré sur l'image D de la Figure 4.19 où l'on observe un élargissement de la nanofente

III.2.4 -Le protocole de gravure ICP-RIE optimisé :

En conclusion de cette partie, les paramètres du procédé de gravure ICP-RIE optimisé sont résumés dans le tableau 4.10 ci-dessous.

Protocole final de gravure des puces code-barres

Etape 1:	Process	Puissance source	Biais	Pression	Temps de gravure		
	Cl ₂ = 20.0 sccm	300W	-100V	2mTorr	80s		
Etape 2:	"gravure humide de 15 secondes dans NaOH dilué à 10g/litre"						
Etape 3:	Process	Mode	Puissance Source Injectée	Puissance de polarisation	Biais	Pression	Temps de gravure
	SF ₆ =60.0 sccm; CH ₄ =29sccm; Ar=7.0 sccm; O ₂ =3.0 sccm	Mode Pulse:250ms On et 500ms period	400W	45W	-110V	3mTorr	11min

Tableau 4.10: Protocole finale optimisée pour la gravure de SiO₂.

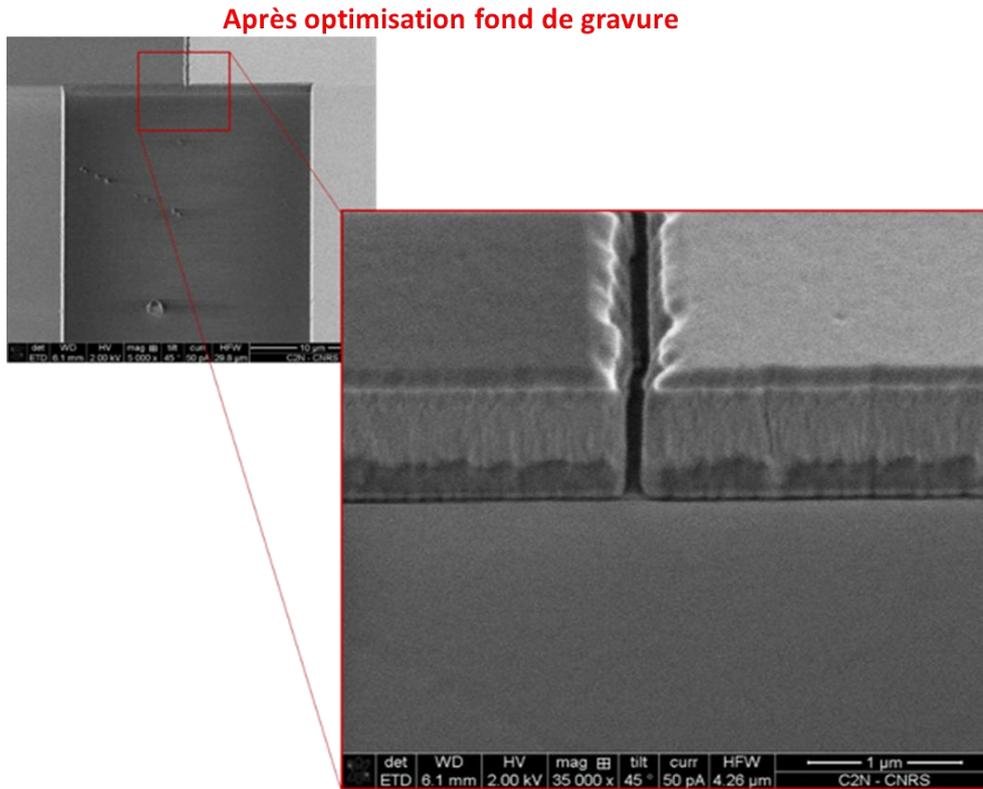


Figure 4.20: Images MEB d'un échantillon obtenu avec la recette finale optimisée.

Pour remédier aux défauts d'épaisseur non-homogène d'Al discutés en III.2.1, nous avons rajouté une étape supplémentaire de gravure humide pour éliminer tout plot parasite d'Al avant la gravure de SiO₂. L'échantillon est plongé 15 secondes dans une solution de soude diluée à 10g/l. **Avec cette petite étape de décapage (étape 2 – tableau 4.10) avant gravure, nous obtenons une gravure lisse avec des flancs de gravure très droits et majoritairement sans défauts (avec 90% de reproductibilité).**

IV –Optimisation du collage SiO₂-SiO₂:

La dernière étape très délicate correspond à l'étape de collage des deux lames de verre (la lame nanostructurée contenant les motifs et la lame couvercle avec les 4 réservoirs) en utilisant le bonder KarlSuss SB6 du laboratoire. Rappelons que le collage (ou "Bonding" en anglais) est une technique qui permet de mettre en contact deux matériaux et de les sceller.

Il existe trois principales méthodes de collage : la première regroupe les techniques de collage ne nécessitant pas de couche intermédiaire (le collage anodique^{84,85,86} et le collage direct^{87,88}), la seconde, le collage grâce à une couche métallique, et, enfin, les techniques de collage nécessitant une couche intermédiaire. Nous avons utilisé un collage ne sans couche intermédiaire, c'est-à-dire le collage direct. On effectue un collage direct⁸⁹ qui est basé sur la mise en contact directe de deux surfaces sans l'utilisation d'un quelconque matériau comme une colle, une cire ou une résine par exemple. Ce collage est basé sur la mise en contact de deux surfaces de SiO₂ qui présentent des groupements silanols Si-OH grâce à un traitement chimique de surface. Il s'agit donc de nettoyer parfaitement la surface pour éviter toute poussière ou tout résidu organique, puis de traiter cette surface propre pour obtenir des liaisons Si-OH pendantes cette activation de surface peut se faire chimiquement ou par un

traitement plasma d'oxygène ou d'ozone. Dans notre cas nous avons activé la surface une la méthode dit de RCA (RCA pour « Radio Company of America ») mise au point en 1960 par Kern et Puotinen⁹⁰. Le mélange RCA que l'on a utilisé est composé d'ammoniac, de l'eau oxygéné et de l'eau dés ionisée. Il permet d'éliminer les particules et active aussi la surface en produisant des groupements –OH. L'adhésion entre les deux plaques se fait par l'intermédiaire de liaisons moléculaires (forces de Van der Waals ou liaisons hydrogène). Dans notre cas se sont les liaisons hydrogènes qui sont mises en jeu. Ces liaisons sont plus énergétiques que les forces de Van der Waals, ce qui explique la grande différence d'énergie de collage. La liaison hydrogène, impliquant des molécules polarisées, est créée par interaction d'un atome d'hydrogène a un atome fortement électronégatif tel que le fluor, l'oxygène ou encore l'azote. Pour un collage irréversible, les liaisons à faibles énergies sont remplacées par des liaisons covalentes de forte énergie grâce à des traitements thermiques⁹¹.

La Figure 4.22 met en évidence l'évolution de l'énergie de surface en fonction de la température pour un collage hydrophile⁹² (exemple : SiO₂-SiO₂) et hydrophobe (exemple : Si-Si⁹³). On voit que l'énergie de collage ne se comporte pas de la même manière en fonction du type de collage. On constate une évolution de l'interface de collage en fonction de la température de recuit. Après un recuit à haute température (1100°C), les valeurs d'énergie sont équivalentes pour les collages hydrophiles et hydrophobes. Les deux matériaux sont en contact sur toute leur surface, et l'interface de collage est parfaitement homogène⁹¹.

La réaction mise en jeu au cours du collage de nos deux lames de verre est :



Un bon collage nécessite : une bonne propreté de la surface à coller, une bonne planéité, et une bonne maîtrise de la microrugosité. Les lames de SiO₂ que nous utilisons ont une planéité supérieure à 2microns (la courbure de la lame est inférieure à cette valeur) grâce à l'étape de polissage qu'elles ont subi. La propreté des deux lames est aussi essentielle pour assurer un bon collage, puisqu'une simple petite poussière peut empêcher le collage.

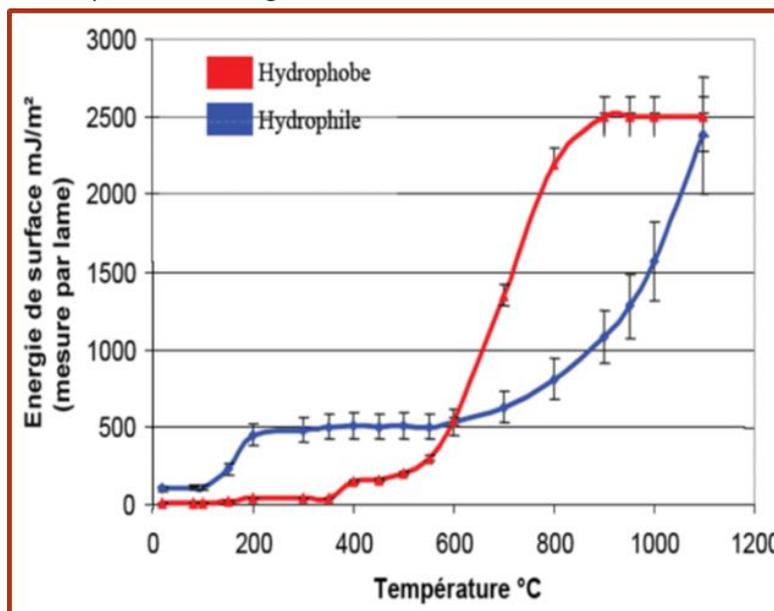


Figure 4.21 : Comparaison entre l'énergie de collage mesurée dans le cas d'un collage hydrophile et hydrophobe pour le silicium.⁹⁵

Je résume ci-dessous les différentes étapes de nettoyage qui doivent être soigneusement menées avant collage sur les deux substrats et après retrait dans NaOH du masque métallique de gravure :

- ✓ Nettoyer à l'acétone, au trichloréthylène chaud (80-90°C), à l'isopropanol et à l'eau DI puis mettre la plaque dans du « NaOH » pour retirer le métal et tous les résidus. Ensuite, nous utilisons un petit plasma d'oxygène qui enlève les résidus de résine (uniquement pour la plaque avec les nanomotifs).
- ✓ Puis, un nouveau protocole de rinçage : l'acétone et isopropanol
- ✓ Puis un Piranha 1:3 (acide sulfurique 95% et eau oxygénée) de 3-5 minutes avant de mettre les échantillons dans le mélange RCA (15min). Ce dernier permet d'obtenir des groupements -OH en surface. Le mélange RCA sert à activer les surfaces de notre échantillon pour qu'ils réagissent bien au collage. Il est composé de : 150 ml d'eau, 30 ml d'ammoniac à 28% et 20 ml d'eau oxygénée à 30%. Le mélange est chauffé à 80°C et les échantillons sont mis dans le mélange.
- ✓ Bien sécher les deux plaques, les mettre en contact et passer au collage.

Décrivons maintenant les tests réalisés pour obtenir un collage optimal assurant une bonne étanchéité des puces nanofluidiques.

La figure 4.22 présente le bonder KarlSuss SB6 qui a été utilisé pour effectuer le collage et l'appareil qui m'a servi à mesurer les épaisseurs des lames de verre. En effet, pour minimiser les risques de casse de nos puces nous avons besoin d'être précis sur l'épaisseur totale de notre échantillon.

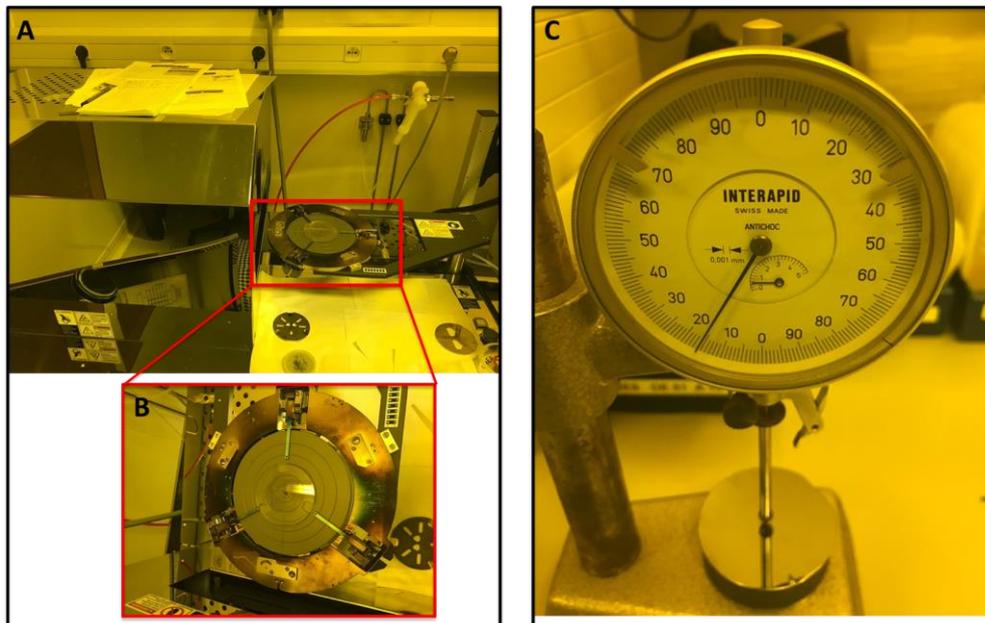


Figure 4.22: le bonder KarlSuss SB6 utilisé pour effectuer le collage A) et B). C) Appareil de mesure de l'épaisseur

Les premiers tests de collage ont été effectués avec une pression de 500mbar et une température de 550°C sur des substrats de 2 pouces. Il s'est avéré que l'on n'arrivait pas à avoir un collage uniforme sur toute la surface, comme montré sur la Figure 4.23.

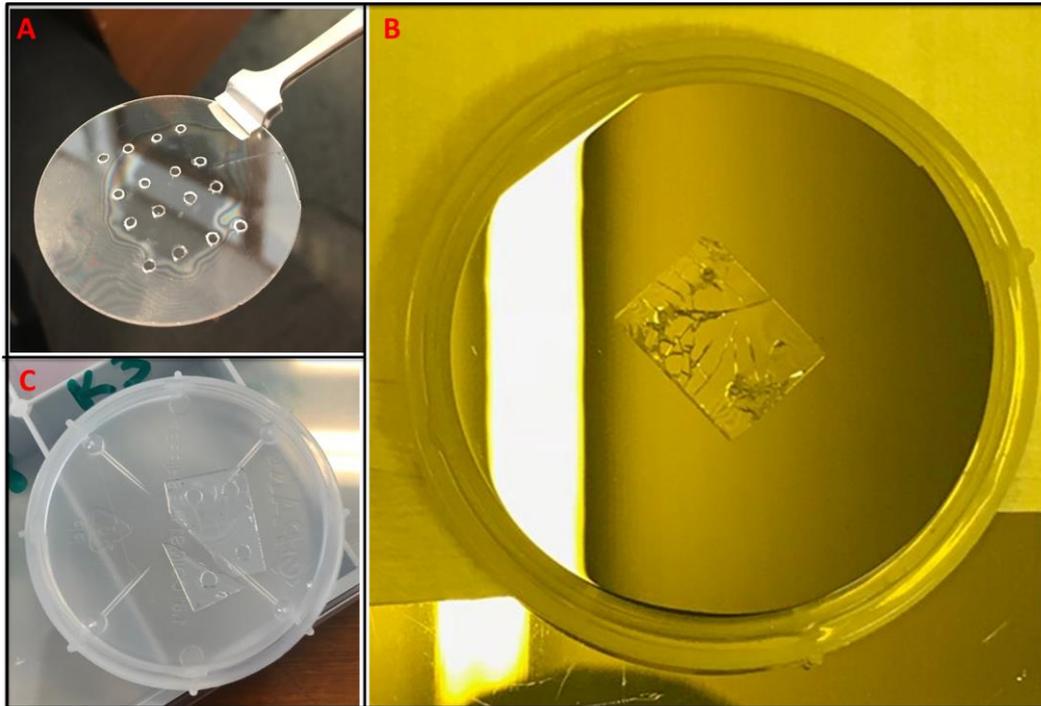


Figure 4.23: Exemple de puces dont le collage n'a pas fonctionné.

Nous avons donc poursuivi notre optimisation avec des surfaces $< \frac{1}{4}$ de deux pouces (Figures 4.24.B et C) en appliquant des pressions allant de 300mbar à 550mbar (tout en maintenant constante la température à 550°C).

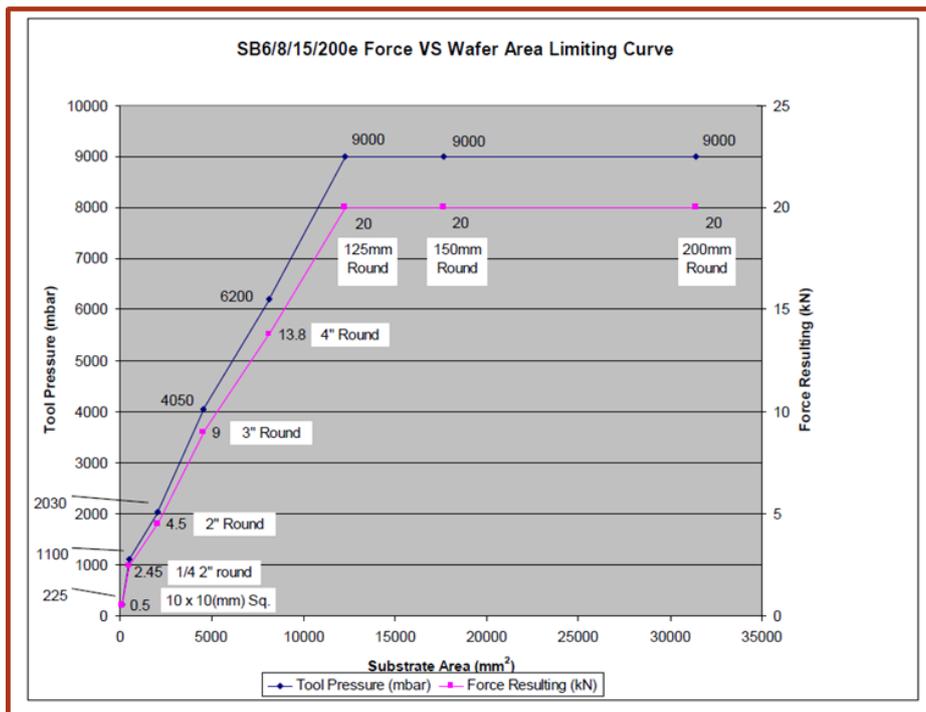


Figure 4.24: Courbe de correspondance entre la pression appliquée (et donc de la force résulté) en fonction de la surface du substrat

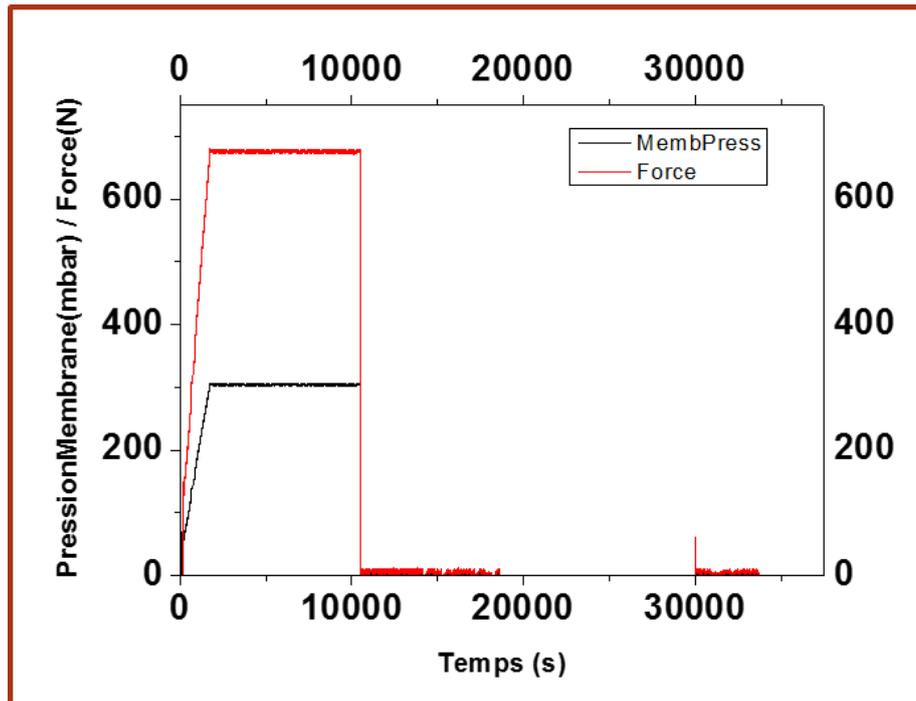


Figure 4.25: Les paramètres (Pression et force) de collages optimisés.

L'optimisation de ce collage verre n'a pas été facile, puisque nous avons effectué plus de 50 tests avant d'obtenir un procédé fonctionnel avec un taux de réussite d'environ 70%. Les principaux paramètres de ce procédé sont listés sur le tableau 4.11 ci-dessous. Le protocole de collage verre-verre après optimisation utilisait les paramètres suivants: **T=550°C** et **P=300 à 350mbars**.

Process	Température (°C)	Pression (mbar)	Force (N)	Temps de mise en contact (h)
Recette optimisée	550	300	675	2

Tableau 4.11: protocole de collage optimisé.

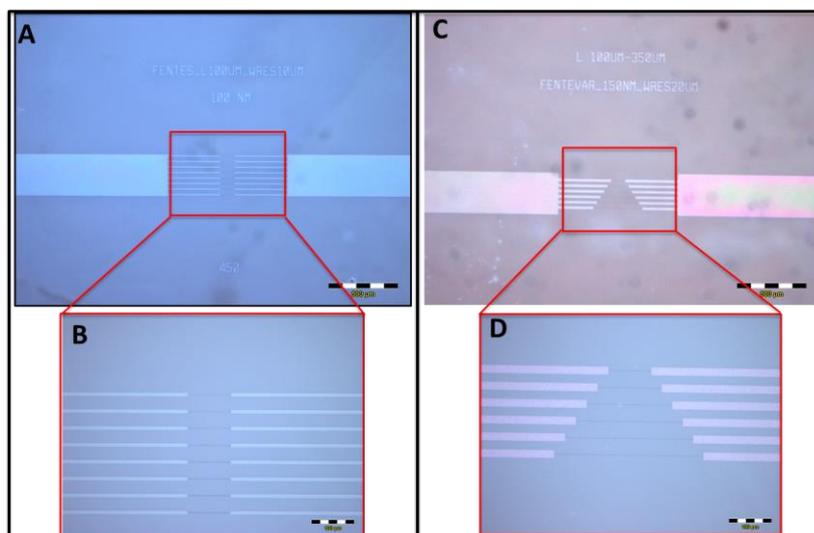


Figure 4.26: exemple de puces dont le collage a fonctionné.

V.1 – Electropréconcentration assistée en pression de la fluorescéine

Nous décrivons ici les différents résultats obtenus lors d'une même expérience avec le code-barres. J'ai analysé le front de concentration obtenu dans chaque réservoir cathodique pour chacune des 8 nanofentes.

Par souci de concision, je ne rapporte que pour certaines nanofentes, soit $w_n = 100\text{nm}$, $w_n = 300\text{nm}$ et $w_n = 450\text{nm}$

➤ $w_n = 100\text{nm}$

Nous avons utilisé les mêmes conditions en termes d'analyte que celles du chapitre 3 précédent : la fluorescéine a été diluée à $C = 10\mu\text{M}$ dans du NaCl à $10\mu\text{M}$ ($\text{pH} = 7$) puisque ce sel de fond semble plus intéressant comme nous l'avons montré dans le chapitre 3. La Figure 4.28 présente les profils obtenus dans le réservoir cathodique pour une électropréconcentration classique (encadré en rouge) et pour l'électropréconcentration assistée en pression (encadré bleu pour une pression de 0.2bar et violet pour une pression de 0.4bar) pour des champs électriques 5V/cm, 10V/cm et 20V/cm.

Comme le montre la Figure 4.28a pour l'électropréconcentration conventionnelle (en l'absence d'une pression hydrodynamique, $J_p = 0$), un profil de CF stable est observé à des champs électriques faibles (5 V/cm), alors qu'un régime CF propageant est observé à des champs plus élevés. : 10 V/cm et 30 V/cm. Nous observons ici le même phénomène qu'avec les puces à nanofentes uniques : plus le champ E est élevé, plus le profil se propage à l'intérieur du réservoir cathodique. L'application de la contre-pression cathodique ΔP permet de stabiliser le profil de concentration comme on le voit sur l'image 4.28.b à 5V/cm avec une contre-pression aussi petite que 0.2 Bar.

Ce qui diffère dans ces résultats, si on les compare avec ceux d'une nanofente horizontale, c'est tout d'abord l'observation d'un front stable à $P = 0$ pour la plus faible longueur $L_n = 100\mu\text{m}$. Rappelons que nous n'observons cela qu'avec de longues nanofentes horizontales $L_n = 500\mu\text{m}$ (voir diagrammes du bas de la Figure 3.15). De plus, ici, les valeurs de champ appliqué sont plus faibles et le taux de préconcentration est plus élevé. **En effet, nous obtenons un front stable pour le couple champ/pression (5V/cm, 0) avec un fort taux de préconcentration de l'ordre de $\tau = 150$.** Pour obtenir ce même front stable dans les puces à nanofentes horizontales, la longueur de la nanofente L_n devait être $500\mu\text{m}$ et nous devons appliquer un couple champ/pression (10V/cm, 0,15 bars) et obtenions un taux d'environ $\tau = 118$ (voir figures 3.13 et 3.14).

Une première conclusion pour les puces à nanofentes verticales en géométrie de code-barres est l'observation plus aisée d'un régime CF stable à bas champ associé à un fort taux de préconcentration.

L'application d'une contre-pression ne semble pas nécessaire puisque le front décroît en intensité, comme observé sur les figures 4.28b et c. L'analyse de l'évolution au cours du temps de C_{max} et d_{max} montre qu'avec une largeur de nanofente de 100nm, l'application d'une pression n'est pas nécessaire pour obtenir des points focaux stables (Figure 4.29A).

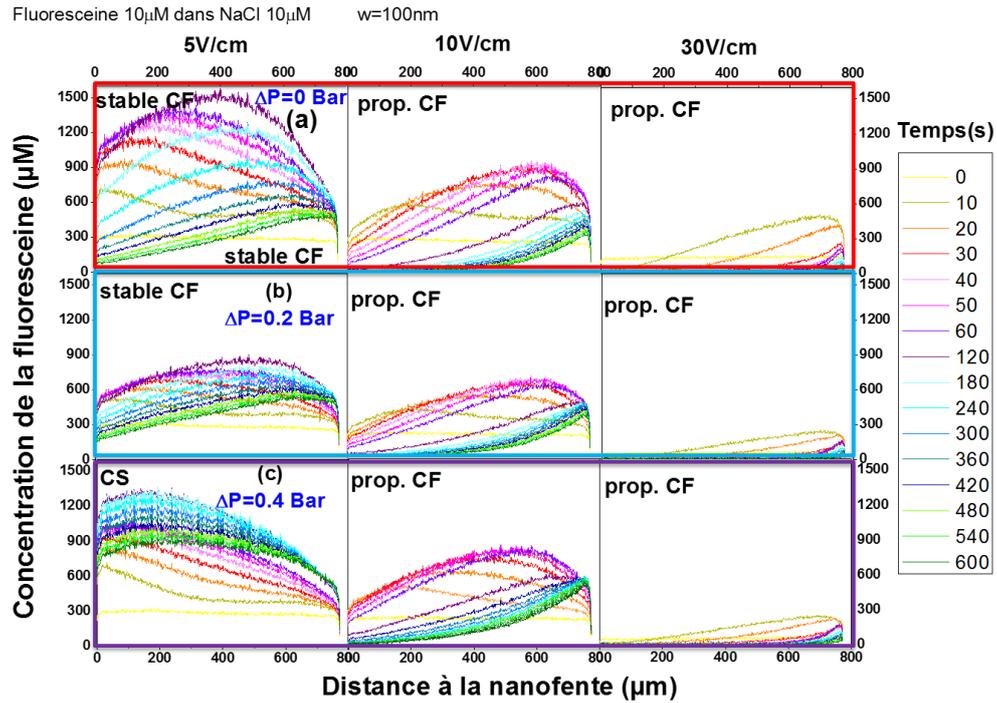


Figure 4.28: Électropréconcentration de la Fluoresceine dans une solution tampon de NaCl pour différents tensions et pressions appliquées

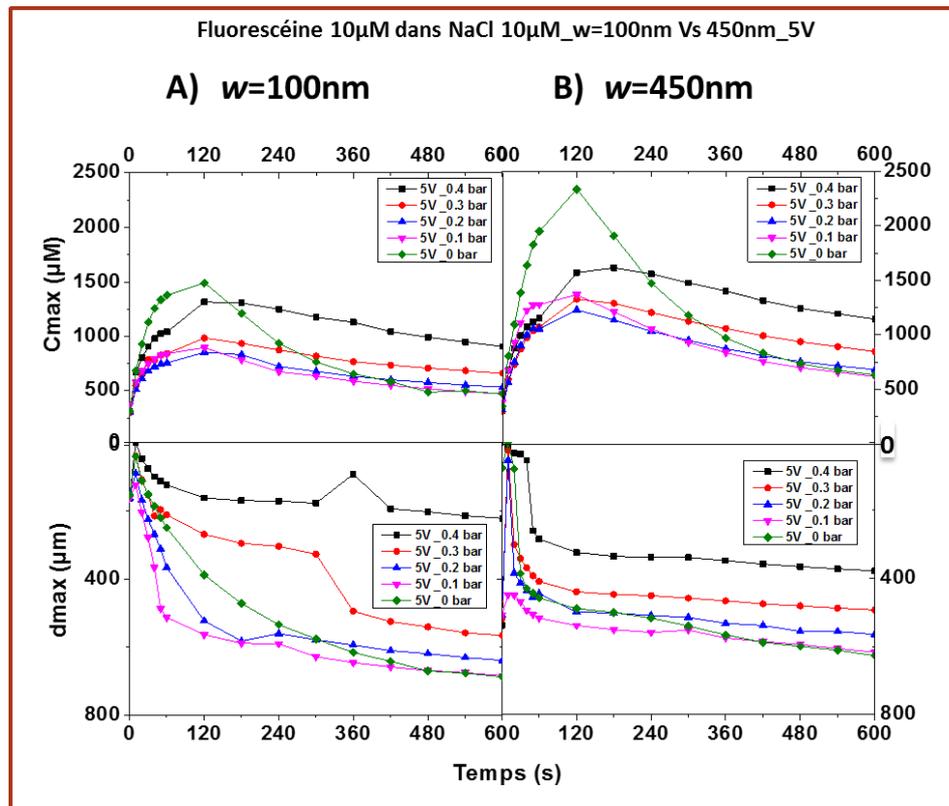


Figure 4.29: Evolution :A) de la concentration maximale (C_{max}) et B) de l'emplacement du pic de preconcentration (d_{max}) en fonction du temps.

➤ $w_n=450\text{nm}$

Pour $w_n = 450\text{nm}$, avec l'électropréconcentration conventionnelle à seulement 5 V/cm , on obtient un CF stable pendant les 120 premières secondes, qui redevient propageant aux temps plus longs (voir la Figure 4.31(a)). Comme on l'a déjà observé avec une largeur de nanofente de 100nm , ici aussi on observe un CF propageant à des champs plus élevés : 10 V/cm et 30 V/cm . L'application de la contre-pression cathodique ΔP permet de stabiliser le profil de concentration en fluorescéine comme on le voit sur l'image 4.30.b à 5V/cm avec une contre-pression de seulement 0.2 Bar . De plus, nous observons un très fort taux de préconcentration de l'ordre de $\tau \approx 300$.

Enfin, L'image B de la Figure 4.29 précédente montre l'évolution de la concentration maximale et de l'emplacement du pic de concentration en fonction du temps. Nous observons environ le même comportement que pour une largeur de nanofente de 100nm . Cependant le taux de préconcentration est un peu plus élevé ici : il est de l'ordre de $\tau_{\text{max}} \approx 300$ alors que, pour $w_n = 100\text{nm}$, $\tau_{\text{max}} \approx 150$.

Enfin, pour conclure sur le rôle de la largeur w_n de la nanofente, il est intéressant de visualiser de visualiser directement les résultats obtenus pour trois largeurs de nanofentes simultanément. La Figure 4.31 présente ce résumé pour les trois largeurs de nanofentes : 100nm , 300nm et 450nm . **On y observe un comportement assez similaire. Il est assez étonnant d'observer des taux plus élevés pour les nanofentes les plus larges (300nm et 450nm).** Le rôle de cette géométrie verticale confinée devra donc être approfondi. **Par contre, le fait que nous observions des profils CF stables à faible champ électrique appliqué (5V/cm) et sans contre-pression est un point intéressant pour les applications futures.**

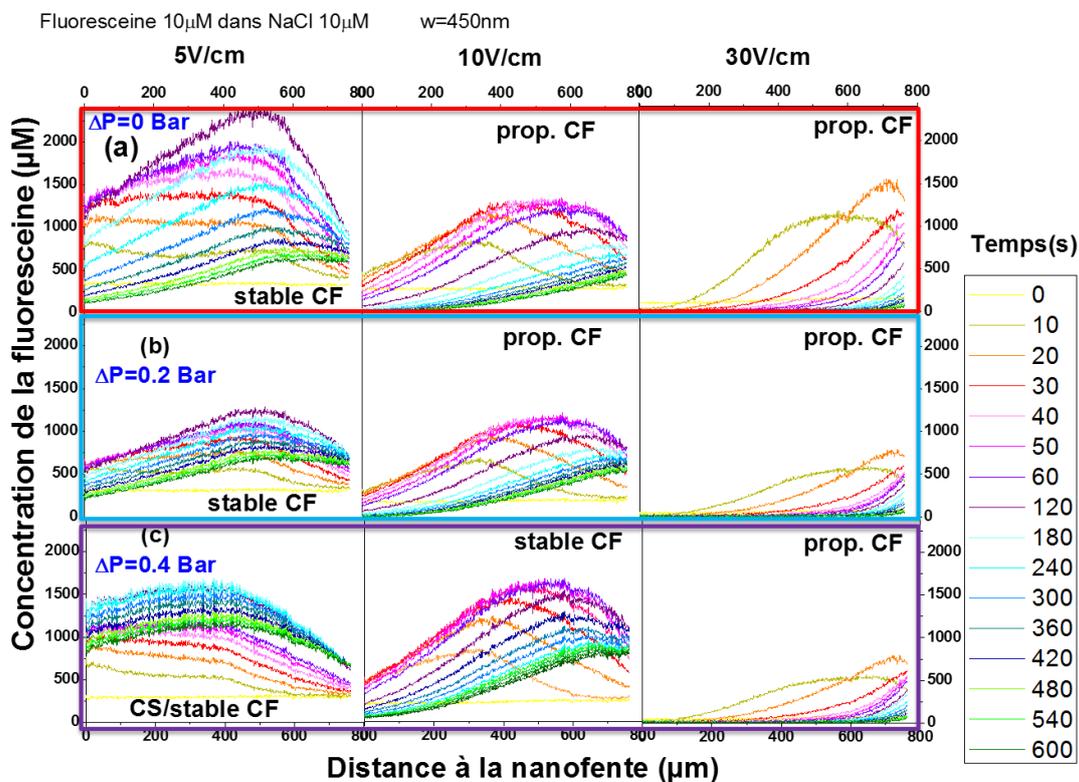


Figure 4.30: Électropréconcentration de la Fluorescéine dans une solution tampon de NaCl pour différents tensions et pressions appliquées

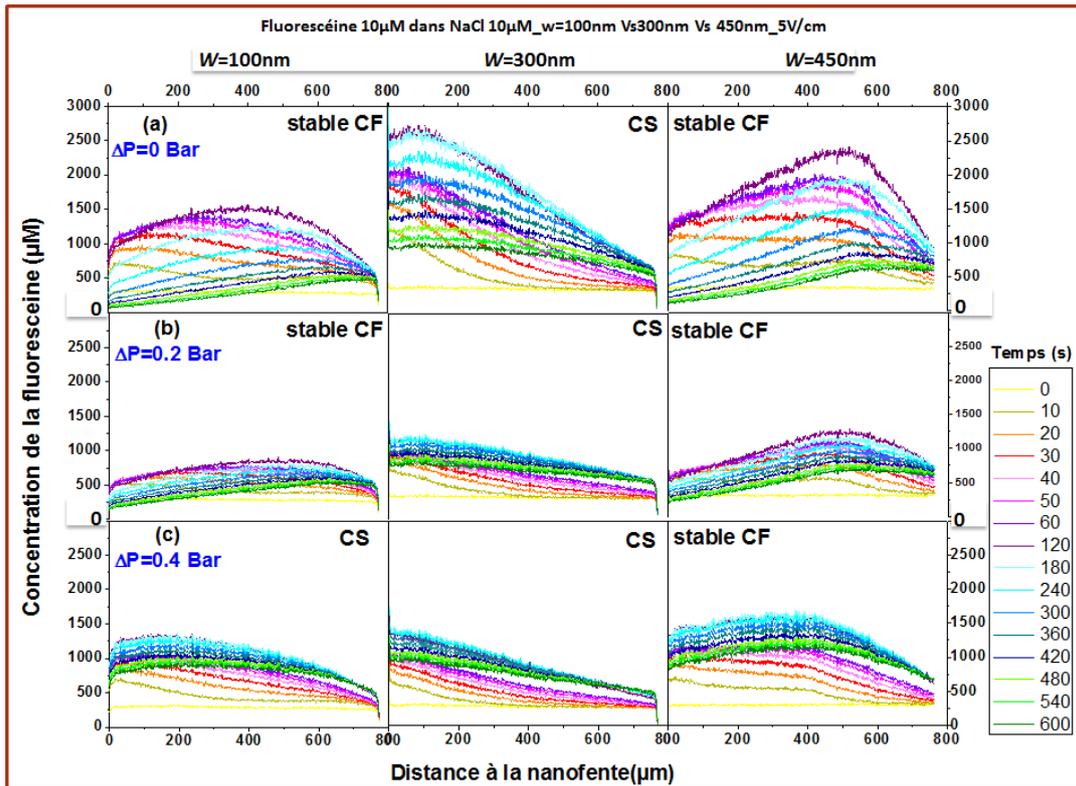


Figure 4.31: Électropréconcentration de la Fluorescéine dans une solution tampon de NaCl pour différents tensions et pressions appliquées : W=100nm=300nm=450nm

V.2 -Électropréconcentration assistée en pression de l'ovalbumine

Ces expériences ont été effectuées sur des puces à nanofentes verticales similaires, comme décrit sur la Figure 4.27. L'ovalbumine a été diluée dans du NaCl à 10 µM ($pH_{NaCl} = 5.57-6.07$). Nous l'avons marquée au Texas Red, dont les longueurs d'onde d'émission et d'absorption sont : $\lambda=615nm$ et 596nm.

La Figure 4.32-A présente des images en fluorescence du code-barres enregistré au cours des l'expérience d'électro-préconcentration de l'ovalbumine, pour l'électropréconcentration classique ($P=0$ bar) et l'électropréconcentration assisté en pression ($P=0.3bar$) à différents temps 0 et 600s, et à très faible champ électrique $E=1V/cm$. La Figure 4.32-B montre les profils correspondants obtenus à $P=0$ (a) et en électropréconcentration assistée en pression (Figures 4.32b et 4.32c).

A $P=0$, nous observons très peu d'intensité en fluorescence. A $P= 0.3$ bar, nous obtenons des points focaux propageant, mais dont l'intensité augmente au cours du temps.

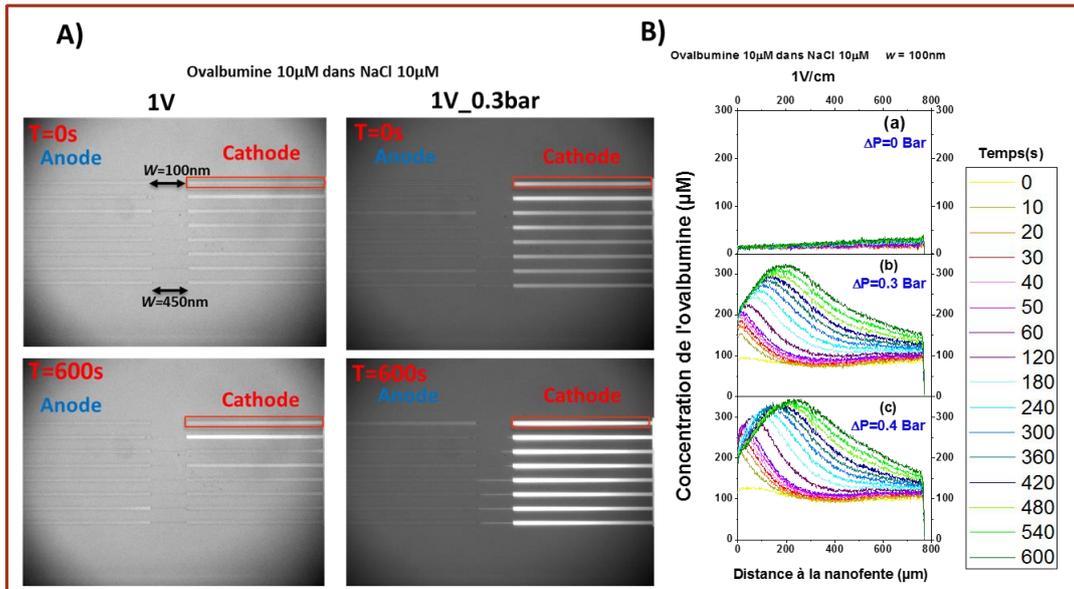


Figure 4.32: A) Illustration de l'électroreconcentration de l'ovalbumine pour l'électroreconcentration classique et l'électroreconcentration assistée en pression à $T=0s$ et $600s$. B) Electroreconcentration de l'ovalbumine dans une solution tampon de NaCl pour une tension de 1V et différents pressions appliquées.

Les résultats obtenus ici sont d'une grande importance, parce que nous avons prouvé qu'il n'est plus nécessaire d'appliquer de très forts champs électriques pour détecter certains analytes. Comme la montre la Figure 4.32b avec seulement un champ électrique de 1V/cm et une pression de 0.3bar on parvient à préconcentrer l'ovalbumine qui est une grosse molécule (taille voisine de 45kdalton).

Les Figures 4.33 et 4.34 ci-dessous présentent respectivement les expériences d'électroreconcentration de l'ovalbumine pour les champs électriques de 3V/cm et 5V/m. Pour ces deux figures, nous avons effectué la comparaison de deux largeurs de nanofentes : $w_n = 250nm$ et $400nm$.

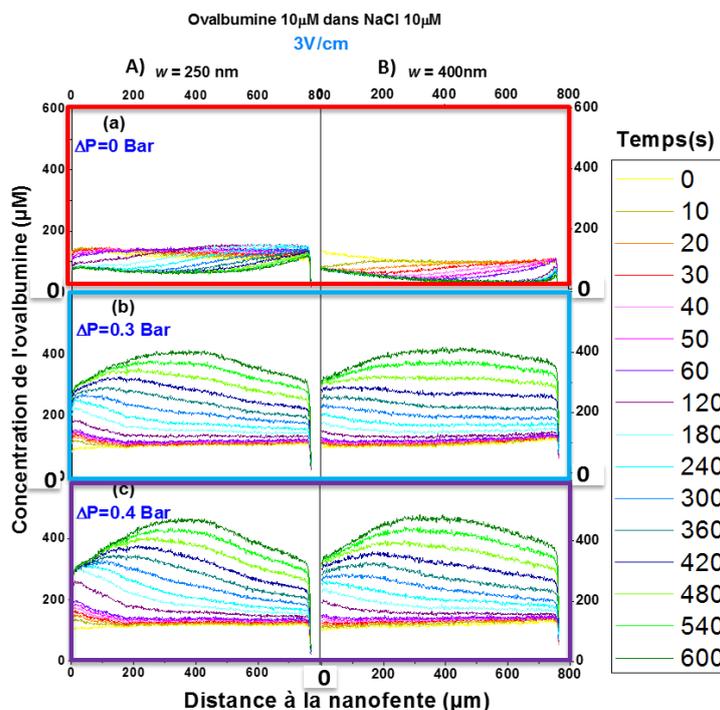


Figure 4.33: Électroreconcentration de l'ovalbumine dans une solution tampon de NaCl pour une tension de 3V et à des pressions appliquées de 0.3 et 0.4 bar : A) pour $W_n=250nm$ et B) $400nm$

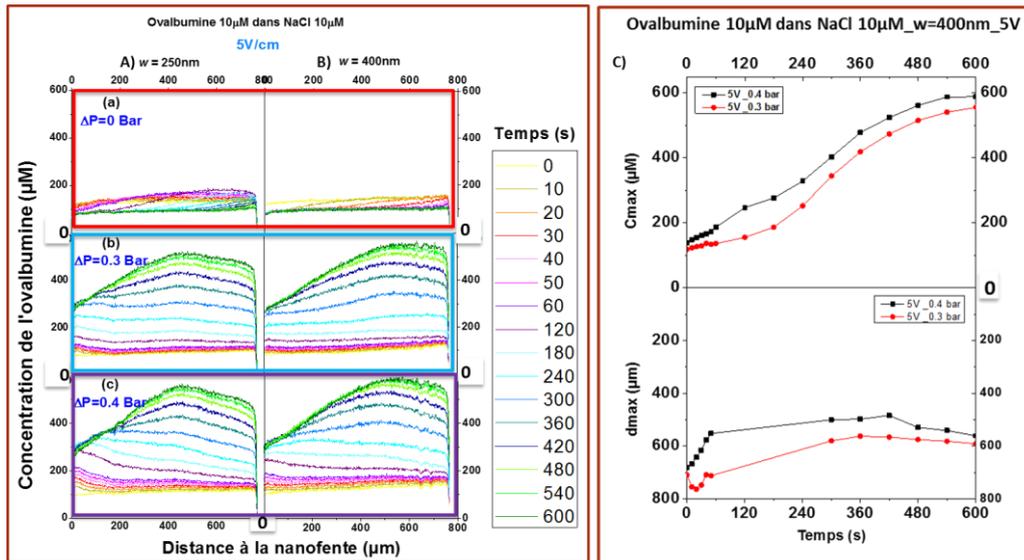


Figure 4.34: Electropreconcentration de l'ovalbumine dans une solution tampon de NaCl pour une tension de 5V et à des pressions appliquées de 0.3 et 0.4 bar : A) $w_n=250\text{nm}$ et $w_n) 400\text{nm}$. C) Evolution de la concentration maximale (C_{max}) et de l'emplacement du pic de preconcentration en fonction du temps pour la largeur de nanofente de 400nm.

Nous remarquons que le choix de la largeur de la nanofente entre 200nm et 400nm n'influence pas la preconcentration de l'ovalbumine. Nous observons le même comportement pour ces deux largeurs : pour une electropreconcentration classique, on n'observe aucune preconcentration avec une intensité quasiment nulle; en appliquant des pressions de 0.3 et 0.4 bar, nous parvenons à obtenir des CF propageant. L'étude de l'évolution de la concentration maximale en fonction du temps montre que plus on augmente la pression plus τ augmente.

Ces expériences nous permettent de confirmer que la largeur de la nanofente qu'elle soit égale à 100nm ou 450nm n'influence pas la localisation et le comportement du front de preconcentration dans ces puces à nanofentes verticales

En conclusion de ce chapitre 4:

1/ j'ai développé et mis en place un nouveau procédé pour la fabrication de ces puces à codes-barres où les nanofentes verticales sont obtenues par nanolithographie électronique couplée à de la gravure ICP/RIE en mode pulsé. Nous avons mis en place un nouveau protocole de gravure pour l'optimisation du fond de gravure basé sur un plasma de $SF_6/Ar/CH_4/O_2$ de la silice. Ce protocole permet d'obtenir des nanotranchées verticales avec un fond de gravure très lisse.

2/j'ai aussi optimisé un protocole de collage moléculaire sous haute pression et sous haute température.

3/ J'ai effectué dans ces puces des expériences d'électro-préconcentration du bi-anion fluorescéine et l'ovalbumine dans un sel de NaCl en étudiant le rôle de la largeur de la nanofente. Nous avons constaté que ce dernier ne change pas le front de préconcentration. Ces premières expériences restent un succès car nous obtenons des régimes stables à très champs électriques faibles et faibles pressions.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif du travail de thèse présenté dans ce manuscrit était de développer des puces nanofluidiques permettant simultanément de concentrer et détecter des biomolécules modèles faiblement concentrées. Nous cherchions aussi à mieux comprendre les mécanismes physico-chimiques qui gouvernent la perméabilité sélective de la nanofente pour tenter de proposer de nouvelles géométries comme celle du code-barres où les effets de confinement de la solution seraient bénéfiques.

Expérimentalement, nous avons commencé par l'étude des puces intégrant de larges nanofentes horizontales en essayant de comprendre le rôle de la longueur L_n sur les effets physiques observés.

Grâce à la mise au point d'un banc de mesure de conductance de l'électrolyte (NaCl) dans des structures MNM par voltamétrie cyclique, j'ai pu mettre en évidence un modèle complet qui prend en compte les effets surfacique et volumique qu'imposent une variation de la longueur de la partie nanométrique (L_n) dans la structure. En effet, contrairement aux modèles simplifiés présentés dans la littérature ces effets géométriques doivent prendre en compte l'ensemble de la structure et pas que la partie nanofente.

D'ailleurs, comme pour ce qui est déjà admis pour les nanofentes, nous avons aussi observé des effets de polarisation de charges dans les parties ou branches (micro-canaux) adjacentes et externes pour des concentrations ioniques faibles. La conductance au travers de ces micro-canaux peu profond (1,5 μm) suit également celle de la solution à concentration élevée alors qu'à faible concentration, la conductance du micro-canal devient indépendante de la concentration en « bulk » de la solution. Cette dernière est aussi régie par la charge de surface du microcanal et des mobilités des ions. Contrairement aux autres équipes qui ont effectué des modélisations en se basant sur des modèles simplifiés, nous avons démontré qu'il est indispensable de prendre en charge tous ces effets géométriques aux interfaces micro/ nano pour une modélisation globale de l'influence des microcanaux sur les valeurs de conductance mesurées dans la nanofente.

En effet, **nous avons mis en évidence que la capacité géométrique de la nanofente est davantage modulé pour les fentes les plus longues affectant ainsi la conductance dans les réservoirs adjacents et déplaçant ainsi la fenêtre où plage de concentration de transition (C_t) entre les comportements « bulk et surfacique » où a lieu principalement les phénomènes pré-concentrations.**

Les effets mentionnés ci-dessus sur l'influence de la longueur ont été prouvés expérimentalement sur le banc d'expériences d'électropréconcentration. Nous avons étudié principalement une méthode d'électropréconcentration « assistée en pression » pour deux analytes modèles, la fluorescéine et l'ovalbumine. Pour les expériences avec la fluorescéine, **nous avons confirmé que l'ajout d'une contre-pression cathodique lors de la préconcentration de la fluorescéine permet la stabilisation du front de préconcentration (régime CF stable)**. Pour le sel de fond KCl, cette stabilisation est plus facile et nécessite des contre-pressions plus faibles si la nanofente est très longue ($L_n = 500$ microns). Une contre-pression optimale $P_{opt} = 0,2$ bar associé à un champ de 50V produit le

régime CF le plus stable avec une concentration qui augmente avec le temps avec un taux de préconcentration qui vaut $\tau=45$. Nous avons aussi étudié comment la nature de l'électrolyte de fond modifie les conditions "champ/pression" optimales. **Nous avons démontré que la stabilisation du régime CF est plus facile avec NaCl comme solution saline de fond. Nous avons proposé pour la 1^{ère} fois un diagramme "champ électrique / pression" dont l'intérêt est de permettre d'observer rapidement les trois régions correspondant aux trois régimes de préconcentration différents pour un analyte donné.** Ce type de diagramme est très utile pour choisir rapidement les paramètres "E/P" optimaux. Enfin, nous avons aussi démontré la capacité de ce protocole à préconcentrer l'ovalbumine avec cette technique dans le canal cathodique.

Dans le dernier chapitre de mon mémoire, nous avons proposé une nouvelle géométrie de "code-barres" où la puce intègre des séries de nanofentes verticales de largeur w_n ou de longueur L_n variable. Ces nouvelles puces permettent d'étudier en une même expérience comment ces deux paramètres géométriques influent sur la localisation de front de concentration.

Nous avons développé et mis en place un nouveau procédé pour la fabrication de ces puces à codes-barres où les nanofentes verticales sont obtenues par nanolithographie électronique couplée à de la gravure ICP/RIE en mode pulsé. **Nous avons mis en place un nouveau protocole de gravure basé sur un plasma de SF₆/Ar/CH₄/O₂ de la silice.** Sachant que la gravure de SiO₂ nécessite un bombardement ionique important, la combinaison du CH₄ avec le SF₆ permet de créer des couches de passivation sur les flancs des motifs gravés, par les espèces neutres, qui servent à le protéger de l'attaque ionique et permettent d'obtenir une bonne sélectivité. Ce protocole permet d'obtenir des nanotranchées verticales avec un fond de gravure très lisse. **Grâce à un deuxième protocole de collage moléculaire sous haute pression et sous haute température, nous avons obtenu de manière reproductible plusieurs séries de puces utilisables** pour les manipulations d'électropréconcentration.

Les premières expériences menées dans ces puces à code-barres sont très prometteuses. Nous obtenons un fort taux de préconcentration par comparaison avec les expériences réalisées avec les puces à nanofente unique horizontale. **Le rôle de la largeur w_n des nanofentes sur la préconcentration a aussi été étudié, et il s'avère qu'elle ne change pas le comportement du front de préconcentration pour des largeurs comprises entre 100nm et 450 nm. Un autre résultat majeur est l'obtention des régimes CF stables à très bas champ (5V pour la fluorescéine) et basse pression (le plus souvent P=0).** Ces résultats sont importants car ils permettent d'envisager une miniaturisation du banc expérimental d'électro-préconcentration.

Perspectives

A cause du déménagement du laboratoire, nous n'avons pas pu mettre en place toutes les expériences d'électro-préconcentration prévues. En particulier, je n'ai pas eu le temps de tester les puces à nanofentes verticales ayant des longueurs L_n variables, ce qui m'aurait permis d'analyser le rôle important de L_n sur la localisation du front de préconcentration.

De plus, j'ai testé des solutions contenant un seul analyte. Il aurait été intéressant de compléter ces mesures en effectuant des mélanges de deux molécules. Ceci permettrait de vérifier si le pouvoir séparatif de notre système est suffisant.

Nous avons observé des points focaux localisés quasiment au même endroit dans le réservoir cathodique pour la fluorescéine et l'ovalbumine. J'aurai aimé tester d'autres molécules comme des brins d'oligonucléotides (ADN simple brin) et tester un mélange avec l'ADN de l'hépatite C (GAT-ACT-TCT-ATC-ACC marqué FITC). En effet, nous souhaiterions reprendre une expérience similaire à celle de Han et coll⁹⁶ qui a montré la possibilité de réaliser un capteur ultra-sensible (au pM) à ADN dans une puce microfluidique intégrant des pièges à ions (en Nafion).

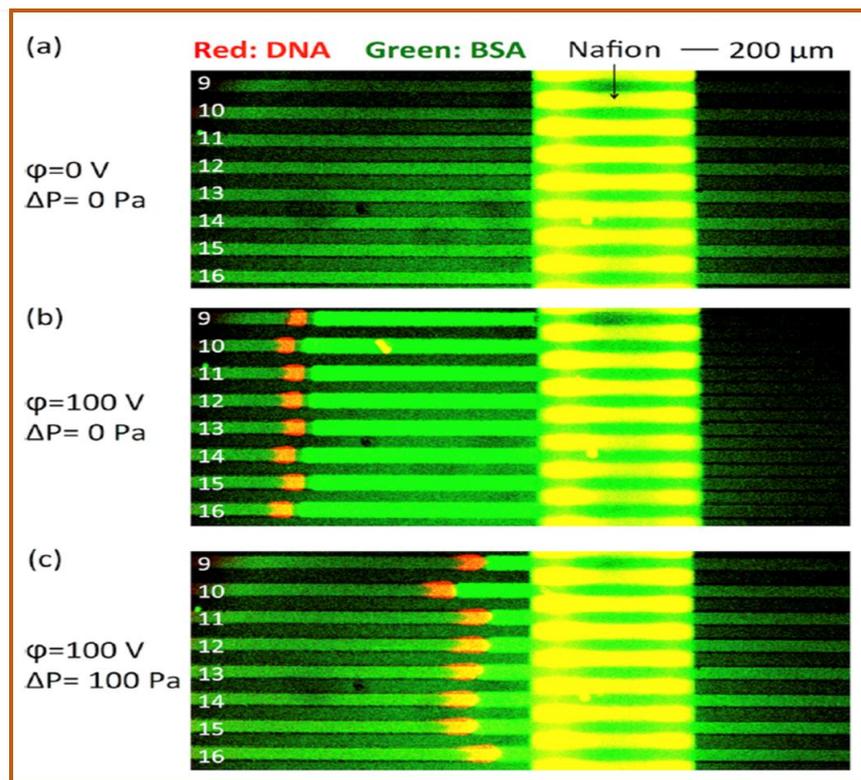


Figure 1: Electro-concentration d'ADN et de BSA avec et sans pression hydrostatique. L'ADN marqué par fluorescence était imagé à une longueur d'onde d'excitation de ~ 647 nm. La fluorescence intrinsèque de la BSA a été imagée à une longueur d'onde d'excitation de 488nm. Le temps d'exposition était de 1000 ms. a) Etat initial du dispositif (à 0 V). (b) ADN et BSA co-concentrés près du Nafion à une pression hydrostatique de zéro, entraînant l'épuisement de la BSA en aval. L'image a été capturée à $t = 30$ s. (c) ADN effectivement concentré sous 100 Pa, avec une fuite importante de BSA en aval indiqué par le fait que la fluorescence BSA en aval était aussi forte que celui en amont. L'image a été capturée à $t = 30$ s. ⁹⁶

Conclusion générale et perspectives :

Il serait très intéressant dans un premier temps d'effectuer une concentration d'un brin d'ADN de l'hépatite C (GAT-ACT-TCT-ATC-ACC marqué FITC) dans un tampon identique au sérum humain contenant des protéines; puis d'effectuer une deuxième expérience avec l'ADN non marqué en présence de son brin complémentaire marqué porteur d'un marqueur qui fluorescera après hybridation des deux brins. L'objectif ici sera de démontrer que le procédé d'enrichissement permettrait une détection beaucoup plus sensible à des concentrations en ADN cible inférieures au pico-molaire.

Sur la partie nanofabrication des puces, dans le but d'obtenir un procédé technologique à bas coût tout en évitant la dernière étape de collage très délicate, nous aimerions mettre en place deux nouveaux protocoles de fabrication plus simples à mettre en œuvre:

1. Procédé par moulage permettant d'obtenir des puces en PDMS:

L'objectif ici est d'obtenir un procédé à bas coût et de se passer de l'étape collage très délicate verre-verre. Dans un premier temps nous utiliserons nos puces code-barre comme moule dans lesquels on spin-coate d'abord quelques microns de HardPDMS et 1 à 2 mm de PDMS. Dans un deuxième temps on effectue un deuxième moule complètement en PDMS, on obtient ainsi une puce complètement en PDMS avec les motifs. Sur un autre wafer en verre contenant les réservoirs on effectue un spin-coating d'une fine couche de membrane PDMS/hexane. Après cela nous procéderons à traitement de la surface par plasma et de procéder au collage juste après les avoir sorti du plasma.

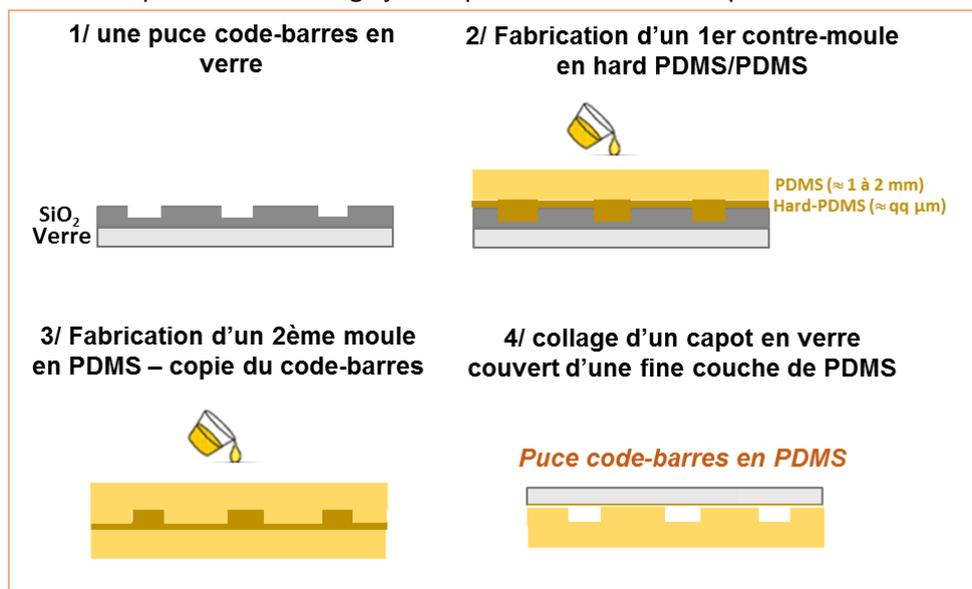


Figure 2: Procédé de fabrication d'une puce code-barre en PDMS collé sur PDMS/verre.

- Procédé basé sur la nanoimpression pour l'obtention des nanofentes: L'idée est de transférer le protocole technologique de nanolithographie électronique des puces code-barres vers la méthode de nanoimpression maîtrisée depuis une dizaine d'années au C2N (D. Decanini).⁹⁷ L'étape de nano-impression sera testée soit avec des moules en verre gravé, soit avec des moules bi-couches en hPDMS/PDMS pour lesquels nous avons démontré⁹⁷ de grandes performances en terme d'homogénéité aux échelles de la centaine de nanomètres sur des surfaces de plusieurs cm².^{97,98} Nous chercherons à obtenir un facteur de forme de 1,5 dans la résine tout en minimisant l'épaisseur d'Al/Ge du masque de gravure. Après le retrait de l'épaisseur résiduelle de résine, le protocole de gravure pourra être utilisé tel quel.

Références bibliographiques

- (1) Richard Feynman, « There's Plenty of Room at the Bottom », *Engineering and Science*, Vol. 23-5, Caltech, Février 1960, p. 22-36. [Archive]..Pdf.
- (2) Gervais, L.; Rooij, N. De; Delamarche, E. Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnosics. **2011**. <https://doi.org/10.1002/adma.201100464>.
- (3) Martin, B. Y. A. J. P.; Synge, A. D. R. L. M. ISI . A NEW FORM OF CHROMATOGRAM EMPLOYING TWO LIQUID PHASES 2 . APPLICATION TO THE MICRO-DETERMINATION OF THE HIGHER MONOAMINO-ACIDS IN PROTEINS. **1941**.
- (4) Kunkel, B. Y. H. G.; Tiselius, A. *The Journal of General Physiology*. **1951**, No. 2, 89–118.
- (5) Whitesides, G. M. The Origins and the Future of Microfluidics. **2006**, 442 (July). <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- (6) Jerman, H. A Gas Chromatograph Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer. **2014**, No. January 1980. <https://doi.org/10.1109/T-ED.1979.19791>.
- (7) Mariet, C.; Dalmazzone, C.; Marsiglia, M.; Vio, L.; Vansteene, A. Laboratoires Sur Puce Dédiés à La Chimie - Principes et Caractéristiques Laboratoires Sur Puce Dédiés à La Chimie Principes et Caractéristiques. **2019**, 33 (0).
- (8) Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. M. Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: A Novel Concept for Chemical Sensing. *Sensors Actuators B Chem*. **1990**, 1 (1–6), 244–248. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(90\)80209-I](https://doi.org/10.1016/0925-4005(90)80209-I).
- (9) Huckle, D. Point-of-Care Diagnostics : An Advancing Sector with Nontechnical Issues. **2008**, 679–688.
- (10) Sciences, F.; Hadjira, B. Cours Méthodes d' Analyses Chromatographiques.
- (11) Ref Chromato Sur Gel Permeable https://fr.wikipedia.org/wiki/Chromatographie_d%27exclusion_st%C3%A9rique. 27.
- (12) 22/08/2019 14h55. **2019**, 2019.
- (13) F. Reuss, “Sur un nouvel effet de l'électricité galvanique,” *Mémoires de la Société Impériale de Naturalistes de Moscou*, vol. 2, pp. 327–336, **1809**.
- (14) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. Free-Zone Electrophoresis in GlassCapillaries. **1981**, 27 (9), 1551–1553.
- (15) Jorgenson, J. W.; Lukács, K. D. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries. **1990**, 1302 (6), 1298–1302. <https://doi.org/10.1021/ac00231a037>.
- (16) N, E. D. Charges à l' Interface Liquide / Solide : Caractérisation Par Courants d' Écoulement et

- Application à La Préconcentration de Molécules Biologiques Dans Un Système Micro / Nanofluidique Xichen Yuan To Cite This Version : HAL Id : Tel-01422096 Charges à L. **2016**.
- (17) Jacob N. Israelachvili. In *Intermolecular and Surface Forces* ; Cambridge University Press: Cambridge, 2011 ; Vol. 1, p. 706. **2011**, 1, 2011.
- (18) Kirby, B. J.; Jr, E. F. H. Review Zeta Potential of Microfluidic Substrates : 1 . Theory , Experimental Techniques , and Effects. **2004**, 187–202.
<https://doi.org/10.1002/elps.200305754>.
- (19) Behrens, S. H.; Grier, D. G. The Charge of Glass and Silica Surfaces. **2018**, 60637.
- (20) Schoch, R. B.; Han, J.; Renaud, P. Transport Phenomena in Nanofluidics. *Rev. Mod. Phys.* **2008**, 80 (3), 839–883. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.80.839>.
- (21) Livre : **1981**, 1981.
- (22) Zangle, T. A.; Mani, A.; Santiago, J. G. Theory and Experiments of Concentration Polarization and Ion Focusing at Microchannel and Nanochannel Interfaces. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (3), 1014–1035. <https://doi.org/10.1039/b902074h>.
- (23) Virk, H. S.; Kaur, S. A.; Randhawa, G. S. Role of Ion Track Filters in Environmental Surveillance. **2001**, 27, 359–362.
- (24) Quinn, J. A.; Anderson, J. L.; Ho, W. S.; Petzny, W. J. THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION. *Biophys. J.* 12 (8), 990–1007. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(72\)86139-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(72)86139-3).
- (25) Wang, Y.; Choi, M. H.; Han, J. Two-Dimensional Protein Separation with Advanced Sample and Buffer Isolation Using Microfluidic Valves. **2004**, 76 (15), 4426–4431.
<https://doi.org/10.1021/ac0497499>.
- (26) Riaz, A.; Chung, D. S. Transient Isotachopheresis of Highly Saline Trace Metals under Strong Electroosmotic Flow Conditions. **2005**, 668–673. <https://doi.org/10.1002/elps.200406151>.
- (27) . _Propagating Concentration Polarization and Ionic Current Rectification in a Nanochannel Nanofunnel Device.Pdf.
- (28) Pu, Q.; Yun, J.; Temkin, H.; Liu, S. Of Nanochannel Structures. *Nano Lett.* **2004**, 4 (6), 1099–1103. <https://doi.org/10.1021/nl0494811>.
- (29) Plecis, A.; Nanteuil, C.; Haghiri-Gosnet, A. M.; Chen, Y. Electropreconcentration with Charge-Selective Nanochannels. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (24), 9542–9550.
<https://doi.org/10.1021/ac8017907>.
- (30) Shin, I. H.; Kim, K. J.; Kim, J.; Kim, H. C.; Chun, H. Cation-Selective Electropreconcentration. *Lab Chip* **2014**, 14 (11), 1811–1815. <https://doi.org/10.1039/c4lc00024b>.
- (31) Kwak, R.; Kim, S. J.; Han, J. Continuous-Flow Biomolecule and Cell Concentrator by Ion

- Concentration Polarization. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (19), 7348–7355.
<https://doi.org/10.1021/ac2012619>.
- (32) Kim, S. J.; Song, Y. A.; Han, J. Nanofluidic Concentration Devices for Biomolecules Utilizing Ion Concentration Polarization: Theory, Fabrication, and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (3), 912–922. <https://doi.org/10.1039/b822556g>.
- (33) Jung, B.; Bharadwaj, R.; Santiago, J. G. Thousandfold Signal Increase Using Field-Amplified Sample Stacking for on-Chip Electrophoresis. **2003**, 3476–3483.
<https://doi.org/10.1002/elps.200305611>.
- (34) Bharadwaj, R.; Jg, S. Dynamics of Field-Amplified Sample Stacking. **2005**, *543*, 57–92.
<https://doi.org/10.1017/S0022112005005975>.
- (35) You, A.; Be, M. A. Y.; In, I. Field-Amplified Sample Stacking and Focusing in Nanofluidic Channels. **2017**, *112003* (September 2010). <https://doi.org/10.1063/1.3496498>.
- (36) Goldys, E. M.; Inglis, D. W. Lab on a Chip a Silica Nanofluidic Channel with a Non-Uniform. **2014**, 3539–3549. <https://doi.org/10.1039/c4lc00504j>.
- (37) Herr, A. E.; Molho, J. I.; Drouvalakis, K. A.; Mikkelsen, J. C.; Utz, P. J.; Santiago, J. G.; Kenny, T. W. On-Chip Coupling of Isoelectric Focusing and Free Solution Electrophoresis for Multidimensional Separations the Total IEF Channel Length Was Completed in Less Than. **2003**, *75* (5), 1180–1187. <https://doi.org/10.1021/ac026239a>.
- (38) Startsev, M. A.; Inglis, D. W.; Baker, M. S.; Goldys, E. M. Nanochannel PH Gradient Electrofocusing of Proteins. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (15), 7133–7138.
<https://doi.org/10.1021/ac4014447>.
- (39) Hsu, W.; Inglis, D. W.; Startsev, M. A.; Goldys, E. M.; Davidson, M. R.; Harvie, D. J. E. Isoelectric Focusing in a Silica Nanofluidic Channel: Effects of Electromigration and Electroosmosis. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (17), 8711–8718. <https://doi.org/10.1021/ac501875u>.
- (40) Ross, D.; Locascio, L. E. Microfluidic Temperature Gradient Focusing. **2002**, *74* (11), 2556–2564. <https://doi.org/10.1021/ac025528w>.
- (41) Kim, S. M.; Sommer, G. J.; Burns, M. A.; Hasselbrink, E. F. Low-Power Concentration and Separation Using Temperature Gradient Focusing via Joule Heating. **2006**, *78* (23), 8028–8035.
<https://doi.org/10.1021/ac061194p>.
- (42) Lee, J. H.; Song, Y.; Han, J. Multiplexed Proteomic Sample Preconcentration Device Using Surface-Patterned Ion-Selective Membrane †‡. **2008**, 596–601.
<https://doi.org/10.1039/b717900f>.
- (43) Kim, S. J.; Han, J. Self-Sealed Vertical Polymeric Nanoporous-Junctions for High-Throughput Nanofluidic Applications. **2008**, *80* (9), 3507–3511. <https://doi.org/10.1021/ac800157q>.

- (44) Chun, H.; Chung, T. D.; Ramsey, J. M. High Yield Sample Preconcentration Using a Highly Ion-Conductive Charge-Selective Polymer. **2010**, *82* (14), 6287–6292.
- (45) Hatch, A. V; Herr, A. E.; Throckmorton, D. J.; Brennan, J. S.; Singh, A. K. Integrated Preconcentration SDS - PAGE of Proteins in Microchips Using Photopatterned Cross-Linked Polyacrylamide Gels. **2006**, No. 2, 4976–4984. <https://doi.org/10.1021/ac0600454>.
- (46) Pennathur, S.; Baldessari, F.; Santiago, J. G.; Kattah, M. G.; Steinman, J. B.; Utz, P. J. Free-Solution Oligonucleotide Separation in Nanoscale Channels. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (21), 8316–8322. <https://doi.org/10.1021/ac0710580>.
- (47) Kim, S. J.; Wang, Y. C.; Lee, J. H.; Jang, H.; Han, J. Concentration Polarization and Nonlinear Electrokinetic Flow near a Nanofluidic Channel. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99* (4), 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.044501>.
- (48) Chang, C. C.; Yeh, C. P.; Yang, R. J. Ion Concentration Polarization near Microchannel-Nanochannel Interfaces: Effect of PH Value. *Electrophoresis* **2012**, *33* (5), 758–764. <https://doi.org/10.1002/elps.201100501>.
- (49) Sandermann, H.; Langebartels, C.; Heller, W. Ozonstre?? Bei Pflanzen - Fr??He Und “Memory”-Effekte von Ozon Bei Nadelb??Umen. *Umweltwissenschaften und Schadstoffforsch.* **1990**, *2* (1), 14–15. <https://doi.org/10.1007/BF03039317>.
- (50) Louër, A. C.; Plecis, A.; Pallandre, A.; Galas, J. C.; Estevez-Torres, A.; Haghiri-Gosnet, A. M. Pressure-Assisted Selective Preconcentration in a Straight Nanochannel. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (16), 7948–7956. <https://doi.org/10.1021/ac4016159>.
- (51) Plecis, A.; Schoch, R. B.; Renaud, P. Ion Transport in Nanochannels: Experimental and Theoretical Study of the Exclusion-Enrichment Effect on a Chip. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1147–1155.
- (52) Mani, A.; Zangle, T. A.; Santiago, J. G. On the Propagation of Concentration Polarization from Microchannel - Nanochannel Interfaces Part I: Analytical Model and Characteristic Analysis. *Langmuir* **2009**, *25* (6), 3898–3908. <https://doi.org/10.1021/la803317p>.
- (53) Wang, Y. C.; Stevens, A. L.; Han, J. Million-Fold Preconcentration of Proteins and Peptides by Nanofluidic Filter. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (14), 4293–4299. <https://doi.org/10.1021/ac050321z>.
- (54) Gamby, J.; Delapierre, F. D.; Pallandre, A.; Tribollet, B.; Deslouis, C.; Haghiri-Gosnet, A. M. Dielectric Properties of a Single Nanochannel Investigated by High-Frequency Impedance Spectroscopy. *Electrochem. commun.* **2016**, *66*, 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2016.02.011>.
- (55) Zangle, T. A.; Mani, A.; Santiago, J. G. On the Propagation of Concentration Polarization from Microchannel - Nanochannel Interfaces Part II: Numerical and Experimental Study. *Langmuir*

- 2009**, 25 (6), 3909–3916. <https://doi.org/10.1021/la803318e>.
- (56) Hlushkou, D.; Dhopeswarkar, R.; Crooks, M.; Tallarek, U. The Influence of Membrane Ion-Permeability on Electrokinetic Concentration Enrichment in Membrane-Based Preconcentration Units †. **2008**, 1153–1162. <https://doi.org/10.1039/b800549d>.
- (57) Doctorat, T. D. E. Préconcentration Sélective Immunologique En Nanofluidique : Vers l' Identification Rapide d' Agents Du Risque Biologique . **2013**.
- (58) Schoch, R. B.; Han, J. Transport Phenomena in Nanofluidics. **2008**, 80 (September). <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.80.839>.
- (59) Schoch, R. B.; Renaud, P.; Schoch, R. B.; Renaud, P. Ion Transport through Nanoslits Dominated by the Effective Surface Charge Ion Transport through Nanoslits Dominated by the Effective Surface Charge. **2011**, 253111 (2005), 10–13. <https://doi.org/10.1063/1.1954899>.
- (60) Gamby, J.; Delapierre, F. D.; Pallandre, A.; Tribollet, B.; Deslouis, C.; Haghiri-Gosnet, A. M. Dielectric Properties of a Single Nanochannel Investigated by High-Frequency Impedance Spectroscopy. *Electrochem. commun.* **2016**, 66, 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2016.02.011>.
- (61) Abgrall, P.; Nguyen, N. T. Nanofluidic Devices and Their Applications. **2008**, 80 (7), 2326–2341. <https://doi.org/10.1021/ac702296u>.
- (62) Mei, L.; Yeh, L.; Qian, S. Electrochemistry Communications Buffer Effect on the Ionic Conductance in a PH-Regulated Nanochannel. *Electrochem. commun.* **2015**, 51, 129–132. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.12.020>.
- (63) Gao, H.; Zhang, H.; Li, C.; Xia, X. Electrochimica Acta Confinement Effect of Protonation / Deprotonation of Carboxylic Group Modified in Nanochannel. *Electrochim. Acta* **2013**, 110, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.12.080>.
- (64) Yuan, Z.; Garcia, A. L.; Lopez, G. P.; Petsev, D. N. Electrokinetic Transport and Separations in Fluidic Nanochannels. *Electrophoresis* **2007**, 28 (4), 595–610. <https://doi.org/10.1002/elps.200600612>.
- (65) Stein, D.; Kruithof, M.; Dekker, C. Surface-Charge-Governed Ion Transport in Nanofluidic Channels. **2004**, No. JULY, 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.035901>.
- (66) Schoch, R. B.; Lintel, H. Van; Renaud, P. Effect of the Surface Charge on Ion Transport through Nanoslits. **2013**, 100604 (2005). <https://doi.org/10.1063/1.1896936>.
- (67) Online, V. A.; Xue, S.; Hsu, S.; Yeh, L.; Qian, S.; Tan, H. Programmable Ionic Conductance in a PH-Regulated Gated Nanochannel †. **2014**, 20138–20146. <https://doi.org/10.1039/C4cp02349h>.
- (68) Li, S. X.; Guan, W.; Weiner, B.; Reed, M. A. Direct Observation of Charge Inversion in Divalent

- Nano Fluidic Devices. **2015**. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b01115>.
- (69) Green, Y.; Eshel, R.; Park, S.; Yossifon, G. Interplay between Nanochannel and Microchannel Resistances. **2016**. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b00429>.
- (70) Li, S. X.; Guan, W.; Weiner, B.; Reed, M. A. Direct Observation of Charge Inversion in Divalent Nanofluidic Devices. *Nano Lett.* **2015**, *15* (8), 5046–5051. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b01115>.
- (71) Milanova, D.; Chambers, R. D.; Bahga, S. S.; Santiago, J. G. Electrophoretic Mobility Measurements of Fluorescent Dyes Using On-Chip Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* **2011**, *32* (22), 3286–3294. <https://doi.org/10.1002/elps.201100210>.
- (72) 1. *Infect Immun* *64*, 2585 (1996); 2. *J Neurosci Res* *40*, 694 (1995);.Pdf.
- (73) *Mi Cro Cir Cu La Tion* *5*, 275 (1998)..Pdf.
- (74) <https://fr.wikipedia.org/wiki/Ovalbumine>.Pdf.
- (75) Salut, R. RESOLUTION POUR LA FABRICATION DE RESONATEURS A ONDES ELASTIQUES DE SURFACE : APPLICATION AUX SOURCES To Cite This Version : **2012**.
- (76) Report, T. Technical Report. **2003**.
- (77) Raton, B.; New, L.; Group, F. *No Title*.
- (78) Rax, J. Cours et Applications PHYSIQUE.
- (79) Blanc, R. Gravure Des Espaceurs Si3N4 Pour Les Technologies To Cite This Version : HAL Id : Tel-01292748 Développement et Caractérisation de Procédés de Gravure Des Espaceurs Si 3 N 4. **2016**.
- (80) Mellhaoui, X.; Mellhaoui, X. Mécanismes Physico-Chimiques Dans Le Procédé de Gravure Plasma Du Silicium To Cite This Version : HAL Id : Tel-00080722 Discipline : Physique Des Plasmas Mécanismes Physico-Chimiques Dans Le Procédé de Gravure Plasma Du Silicium. **2006**.
- (81) Legtenberg, R.; Jansen, H.; Boer, M. De; Elwenspoek, M. Anisotropic Reactive Ion Etching of Silicon Using SF₆ / O₂ / CHF₃ Gas Mixtures. **2020**, *142* (6).
- (82) Schaepkens, M.; Standaert, T. E. F. M.; Rueger, N. R.; Sebel, P. G. M.; Oehrlein, G. S.; Cook, J. M.; Schaepkens, M.; Standaert, T. E. F. M.; Rueger, N. R.; Sebel, P. G. M. Study of the SiO₂ -to-Si₃N₄ Etch Selectivity Mechanism in Inductively Coupled Fluorocarbon Plasmas and a Comparison with the SiO₂ -to-Si Mechanism Study of the SiO₂ -to-Si₃N₄ Etch Selectivity Mechanism in Inductively Coupled Fluorocarbon Plasmas and a Comparison with the SiO₂ -to-Si Mechanism. **2003**, *26* (1999). <https://doi.org/10.1116/1.582108>.
- (83) Gouil, A. Le. Étude et Développement de Procédés de Gravure Plasma Pour l'Élaboration Des Grilles Métalliques Pour Les Filières Technologiques CMOS : Cas de l'Empilement Si / TiN /

- HfO₂ To Cite This Version : HAL Id : Tel-00146376 Étude et Développement de Procédés de Gravure Plasma Pour l'Élaboration Des Grilles Métalliques Pour Les Filières Technologiques CMOS : Cas de l'Empilement Si / TiN / HfO₂. **2007**.
- (84) You, A.; Be, M. A. Y.; In, I. Bonding of Silicon Wafers for Silicon-on-Insulator. **2013**, 4943 (April 1988). <https://doi.org/10.1063/1.342443>.
- (85) Tudryn, C. D.; Hopkins, R.; Hobbs, L.; Parks, D. SUBMITTED TO THE DEPARTMENTS OF MECHANICAL ENGINEERING AND Certified by Certified By. **2004**.
- (86) Si, G. Al. Fractal Pattern Formation in Anodic Bonding of Pyrex. **2008**, 9 (4), 315–322.
- (87) Takagi, H.; Maeda, R.; Ryong, T.; Suga, T. Low-Temperature Direct Bonding of Silicon and Silicon Dioxide by the Surface Activation Method. **1998**, 70, 164–170.
- (88) LowXtemp.XwaferXdirectXbonding-Tong.Pdf.
- (89) Surfaces, T. A. V.; Kopperschmidt, P.; Care, F. M.; Scholz, R.; Lee, B. Fundamental Issues in Wafer Bonding. **1999**, No. August 2016. <https://doi.org/10.1116/1.581788>.
- (90) Kern, W. This Week's Citation Classic. **1983**, 1983.
- (91) Rauer, C. Collage de Silicium et d'Oxyde de Silicium : Mécanismes Mis En Jeu To Cite This Version : HAL Id : Tel-01304195 Collage de Silicium et d'Oxyde de Silicium : Mécanismes Mis En Jeu. **2016**.
- (92) Id, H. A. L. Etude Des Collages Directs Hydrophiles Mettant En Jeu Des Couches Diélectriques Elodie Bêche To Cite This Version : HAL Id : Tel-01755507 Etude Des Collages Directs Hydrophiles Mettant En Jeu Des Couches Diélectriques. **2018**.
- (93) Gosele, U. Wafer Bonding for Microsystems Technologies. **1999**, 161–168.
- (94) Argoud, M. Mécanismes de Collage et de Transfert de Films Monocristallins Dans Des Structures à Couches de Polymères To Cite This Version : HAL Id : Tel-00848111 Mécanismes de Collage et de Transfert de Films Monocristallins Dans Des Structures à Couches de Polymères. **2013**.
- (95) Feilleux, R. Mécanismes de Collage Direct de Films de Silicium Polycristallin Mécanismes de Collage Direct de Films de Silicium Polycristallin . **2011**.
- (96) Ouyang, W.; Li, Z.; Han, J. Pressure-Modulated Selective Electrokinetic Trapping for Direct Enrichment, Purification, and Detection of Nucleic Acids in Human Serum. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 11366–11375. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02330>.
- (97) Cattoni, A.; Ghenuche, P.; Decanini, D.; Chen, J.; Pelouard, J. Nanoimprint Lithography. **2011**, 3557–3563.
- (98) Access, O. We Are IntechOpen , the World's Leading Publisher of Open Access Books Built by Scientists , for Scientists TOP 1 %.

Références bibliographiques :

- (99) Darnon, M.; Vallier, L.; Pargon, E.; Cunge, G.; Fouchier, M.; Bodart, P. Etching Mechanisms of Thin SiO₂ Exposed to Cl₂ Plasma Etching Mechanisms of Thin SiO₂ Exposed to Cl₂ Plasma. **2011**, No. September. <https://doi.org/10.1116/1.3622311>.
- (100) Hsu, C.; Hoang, J.; Le, V.; Chang, J. P.; Hsu, C.; Hoang, J.; Le, V.; Chang, J. P. Feature Profile Evolution during Shallow Trench Isolation Etch in Chlorine-Based Plasmas . II . Coupling Reactor and Feature Scale Models Feature Profile Evolution during Shallow Trench Isolation Etch in Chlorine-Based Plasmas . II . Coupling Reactor and Feature Scale Models. **2013**, *1919* (2008). <https://doi.org/10.1116/1.2998759>.

Annexes

Annexe 1 – Mise au point de la gravure du masque d'Aluminium

A –Montage de l'échantillon et suivi en temps réel

Pour effectuer la gravure de notre échantillon, on le colle tout d'abord sur une plaque d'Alumine (Figure 1A) en s'assurant que la colle soit bien uniforme sur toute la surface. Pour mener à bien la gravure, on a à notre disposition deux écrans qui nous permettent de suivre en temps réel la gravure de notre surface. Sur le premier écran (Figures 1B et 1C), on parvient à suivre la gravure de l'Aluminium grâce au changement de réflectivité qui apparaît après gravure. En effet, l'Al se comporte comme un miroir de haute réflectivité. Dès que la gravure du film d'Al est complète, la surface perd complètement sa réflectivité et le signal réfléchi devient très faible.

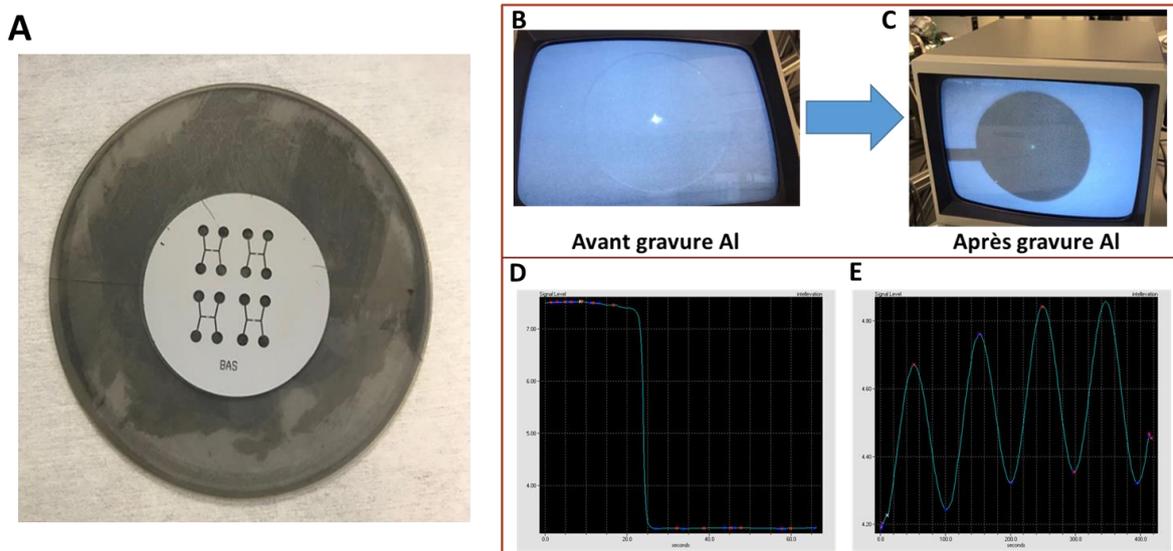


Figure 1 : A) A gauche une image de la lame de 2 pouces porteuse des motifs sur le film d'aluminium collée sur le support en Al₂O₃ et, à droite, suivi en temps réel de la gravure par réflectométrie : B), C) et D) Suivi en temps réel de la gravure du film d'Al et E/ du film de SiO₂

Les figures 1.D et 1.E correspondent à la variation de l'intensité du signal réfléchi en fonction du temps: sur la Figure 4.12-D, on observe la décroissance brutale de la réflectivité quelques secondes après la gravure de l'Al; sur la Figure 4.12-E, on observe des interférences pendant la gravure de SiO₂ qui résultent de la superposition de 2 ondes lumineuses (correspondant aux deux interfaces):

- La 1^{ère} correspond à la surface de SiO₂ (interface air/SiO₂).
- La 2^{ème} correspond à l'interface entre la couche mince SiO₂ et le substrat.

Le signal varie en fonction du temps donc l'épaisseur (e) de notre couche varie aussi en fonction du temps, avec e pour une période défini comme suit :

- $e = \frac{\lambda}{2n}$ avec : n : indice optique du matériau (dans notre cas c'est le SiO₂, n=1.45)

λ : Longueur d'onde du faisceau ($\approx 650-670\text{nm}$)

e : épaisseur gravée, qui varie dans le temps

Pour la gravure du SiO_2 , on se limite par exemple à 4 oscillations qui correspond à 800 à 900nm de profondeur puisque $e \approx 230\text{nm}$ pour une période. Cette méthode nous permet d'avoir une bonne maîtrise de la profondeur de gravure.

B - La gravure chlorée du masque Al :

Le transfert des nanomotifs de nanolithographie électronique dans le film d'Al s'effectue au moyen d'une gravure chlorée, de manière très classique et similaire à ce qui est effectué pour la gravure du Si^{99,100}. Les études de gravure effectuées sur certains métaux tels que TiN ont montré que la vitesse de gravure avec un plasma de Cl_2 sont plus grandes qu'avec un plasma de HBr ⁸³. Comme discuté dans la partie III.11 précédente, l'Al est un métal résistant à beaucoup de gravures chimiques comme les plasmas d'oxygène ou les plasmas fluorés mais le chlore en analogie avec le HCl est un réactif violent avec l'aluminium et forme assez facilement des chlorures d'aluminium.

Nous avons choisi les paramètres de gravure décrits dans le tableau 4.4 suivant, qui conduisent à un transfert satisfaisant des motifs. L'énergie des ions est supérieure à 100eV car il se forme nativement un oxyde d'aluminium (forme stable Al_2O_3) en surface et que cet oxyde doit être pulvérisé avant de pouvoir attaquer chimiquement l'aluminium métallique par action des radicaux Cl et Cl^+ .

Le masque d'aluminium est gravé avec le procédé suivant :

Process	Puissance source	Biais	Pression	Temps de gravure
$\text{Cl}_2 = 20.0 \text{ sccm}$	300W	-100V	2mTorr	80s

Tableau 1: Paramètres de gravure de l'Aluminium avec un plasma de Cl_2

Annexe 2 – Synthèse des puces fabriquées

La figure ci-dessous représente la synthèse des puces fabriquées lors de l’optimisation du fond de gravure et mets en évidence le passage d’un fond de gravure extrêmement rugueux à un fond lisse.

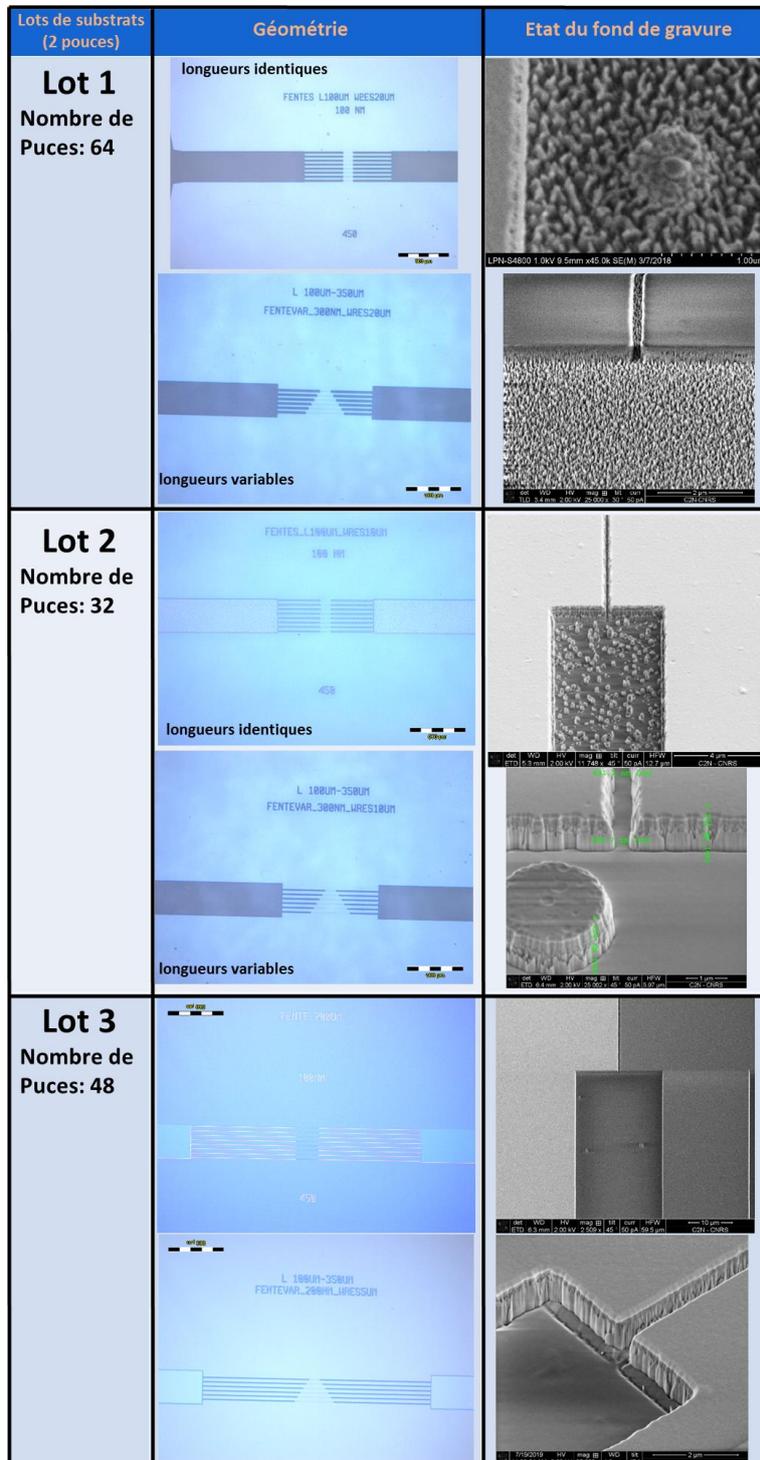


Figure 2 : Synthèse des différents lots de puces fabriquées pendant l’optimisation du fond de gravure.

Sur la figure suivante, il vous est montré certains cas de décollement de puce auquel nous avons été confrontés pendant les expériences d'électroconcentration.

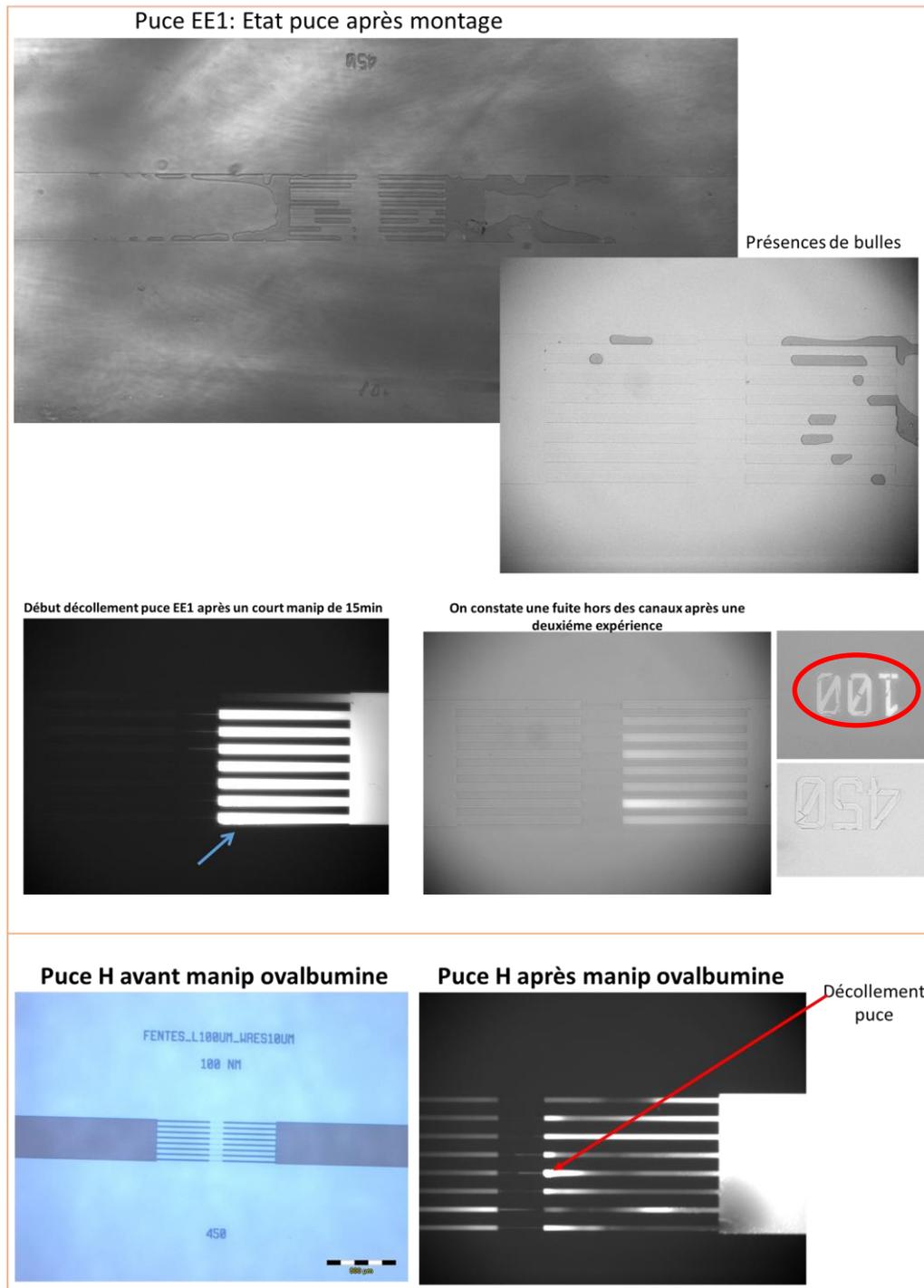


Figure 3 : Décollement de certaines puces lors/ou après une expérience

Titre : Dispositifs nanofluidiques à électro-préconcentration sélective

Mots clés : Nanofluidique, Nanofabrication, Electrophorèse sur puce, Chimie analytique

Résumé : Détecter des biomolécules à l'état de traces reste l'un des enjeux actuels des biopuces. Les dispositifs nanofluidiques apparaissent aujourd'hui comme une voie prometteuse pour simultanément concentrer et détecter des biomolécules. Cette électro-préconcentration est possible grâce au caractère de perméabilité sélective de la nanofente (ou du nanocanal), qui se comporte sous champ électrique comme un «super-filtre» moléculaire à perméabilité sélective. Ce nanofiltre permet de piéger les analytes en amont ou en aval de la fente, dans l'un ou l'autre des réservoirs (anodique ou cathodique).

Au cours de ce doctorat, j'ai développé et étudié des dispositifs nanofluidiques sur la base de deux géométries différentes : des nanofentes horizontales uniques et des réseaux de nanocanaux verticaux, dans une géométrie de code-barres.

Pour les nanofentes horizontales, j'ai étudié l'évolution de la conductance en fonction de la force ionique et de la géométrie de la nanofente. Sur la base d'un protocole d'électro-préconcentration assistée en pression, j'ai établi des diagrammes « champ électrique/pression » qui permettent de prédire l'obtention d'un point focal stable où les analytes vont se concentrer. J'ai étudié le rôle de la longueur de la nanofente sur l'observation de ce point focal pour deux molécules modèles, la fluorescéine et l'ovalbumine.

Pour les dispositifs à code-barres, j'ai mis au point un procédé de nanostructuration par lithographie électronique couplée à de la gravure profonde et un protocole de collage verre-verre. Les profils d'électropréconcentration obtenus pour différentes nanofentes au sein des codes-barres dynamiques permettent de discuter du rôle de la géométrie sur l'observation du point focal.

Title: Nanofluidics devices for selective electro-preconcentration

Keywords: nanofluidics, nanofabrication, on-chip electrophoresis, chemical analysis

Abstract: Detecting trace biomolecules remains one of the current challenges for biochips. Nanofluidic devices appear today as a promising way to simultaneously concentrate and detect biomolecules. This electropreconcentration is possible thanks to the selective permeability of the fluidic nanoslit, which behaves under electric field as a molecular selective "super-filter". This nanofilter makes it possible to trap the analytes upstream or downstream of the slot, in one or the other of the reservoirs (anodic or cathodic). During this Ph.D., I developed and studied nanofluidic devices based on two different geometries: single horizontal nanoslits and vertical nanochannel arrays, in a barcode geometry.

For horizontal nanoslits, I studied the evolution of the conductance as a function of the ionic strength and the nanoslit geometry. Based on a pressure-assisted electro-preconcentration protocol, I have established "electric field/pressure" diagrams allowing predicting stabilization of a focal point where the analytes will concentrate. I have studied the role of the nanoslit length for two model molecules, fluorescein and ovalbumin.

For barcode devices, I developed both a nanostructuration process by electron beam nanolithography coupled with deep etching and a glass-glass bonding protocol. The electroconcentration profiles obtained for different nanofentes is discussed based on different dynamic barcodes.