

ECOLE CENTRALE DE LYON

THESE

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'ECOLE CENTRALE DE LYON

Discipline : Dispositifs de l'Electronique Intégrée
Spécialité : EEA

Par :

Julien VIEILLARD

**Développement et validation de nouveaux laboratoires
sur puce dédiés à la séparation de protéines**

Jury :

Professeur	E. AUDOUARD	<i>Examineur</i>
Professeur	D. BARBIER	<i>Président du Jury</i>
Professeur	P. BENECH	<i>Rapporteur</i>
Professeur	C. BRAMBILLA	<i>Directeur de thèse</i>
Professeur	P.L. DESBENE	<i>Rapporteur</i>
Dr	S. KRAWCZYK	<i>Directeur de thèse</i>

Laboratoire d'Electronique, Optoélectronique
et Microsystèmes UMR CNRS 5512



ECOLE CENTRALE DE LYON
DIRECTION DE LA RECHERCHE

liste des personnes Habilitées à Diriger des Recherches en poste à l'Ecole Centrale de Lyon

Nom-Prénom	Corps grade	Laboratoire ou à défaut département ECL	Etablissement
AURIOL Philippe	professeur	CEGELY	ECL
BEROUAL Abderrahmane	professeur	CEGELY	ECL
JAFFREZIC-RENAULT Nicole	directeur de recherche	CEGELY	CNRS/ECL
KRÄHENBÜHL Laurent	directeur de recherche	CEGELY	CNRS/ECL
MARTELET Claude	professeur	CEGELY	ECL
NICOLAS Alain	professeur	CEGELY	ECL
NICOLAS Laurent	directeur de recherche	CEGELY	CNRS/ECL
SIMONET Pascal	chargé de recherche	CEGELY	CNRS/ECL
THOMAS Gérard	professeur	CEGELY	ECL
VOLLAIRE Christian	maître de conférences	CEGELY	ECL

Nbre Cégely 10

HELLOUIN Yves	maître de conférences	DER EEA	ECL
LE HELLEY Michel	professeur	DER EEA	ECL

Nbre DER EEA 2

GUIRALDENQ Pierre	professeur émérite	DER STMS	ECL
VINCENT Léo	professeur	DER STMS	ECL

Nbre DER STMS 2

LOHEAC Jean-Pierre	maître de conférences	ICJ	ECL
MAITRE Jean-François	professeur émérite	ICJ	ECL
MARION Martine	professeur	ICJ	ECL
MOUSSAOUI Mohand	professeur	ICJ	ECL
MUSY François	maître de conférences	ICJ	ECL
ROUY MIRONESCU Elisabeth	professeur	ICJ	ECL
ZINE Abdel-Malek	maître de conférences	ICJ	ECL

Nbre ICJ 7

DAVID Bertrand	professeur	ICTT	ECL
----------------	------------	------	-----

Nbre ICTT 1

CLOAREC Jean-Pierre	maître de conférences	LEOM	ECL
GAFFIOT Frédéric	professeur	LEOM	ECL
GAGNAIRE Alain	maître de conférences	LEOM	ECL
GARRIGUES Michel	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
GENDRY Michel	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
GRENET Geneviève	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
HOLLINGER Guy	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
JOSEPH Jacques	professeur	LEOM	ECL
KRAWCZYK Stanislas	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
MARTIN Jean-René	professeur émérite	LEOM	ECL
O'CONNOR Ian	maître de conférences	LEOM	ECL

PHANER-GOUTORBE Magali	professeur	LEOM	ECL
ROBACH Yves	professeur	LEOM	ECL
SOUTEYRAND Eliane	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
TARDY Jacques	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
VIKTOROVITCH Pierre	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL

Nbre LEOM 16

CHEN Liming	professeur	LIRIS	ECL
-------------	------------	-------	-----

Nbre LIRIS 1

BAILLY Christophe	professeur	LMFA	ECL
BERTOGLIO Jean-Pierre	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
BLANC-BENON Philippe	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
CAMBON Claude	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
CARRIERE Philippe	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
CHAMPOUSSIN J-Claude	professeur émérite	LMFA	ECL
COMTE-BELLOT geneviève	professeur émérite	LMFA	ECL
FERRAND Pascal	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
GALLAND Marie-Annick	maître de conférences	LMFA	ECL
GODEFERD Fabien	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
HENRY Daniel	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
JEANDEL Denis	professeur	LMFA	ECL
JUVE Daniel	professeur	LMFA	ECL
LE RIBAUT Catherine	chargée de recherche	LMFA	CNRS/ECL
LEBOEUF Francis	professeur	LMFA	ECL
PERKINS Richard	professeur	LMFA	ECL
ROGER Michel	professeur	LMFA	ECL
SCOTT Julian	professeur	LMFA	ECL
SIMOENS Serge	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
TREBINJAC Isabelle	maître de conférences	LMFA	ECL

Nbre LMFA 20

BENAYOUN Stéphane	professeur	LTDS	ECL
CAMBOU Bernard	professeur	LTDS	ECL
COQUILLET Bernard	maître de conférences	LTDS	ECL
DANESCU Alexandre	maître de conférences	LTDS	ECL
FOUVRY Siegfried	chargé de recherche	LTDS	CNRS/ECL
GEORGES Jean-Marie	professeur émérite	LTDS	ECL
GUERRET Chrystelle	chargé de recherche	LTDS	CNRS/ECL
HERTZ Dominique	past	LTDS	ECL
ICHCHOU Mohamed	maître de conférences	LTDS	ECL
JEZEQUEL Louis	professeur	LTDS	ECL
JUVE Denyse	ingénieur de recherche	LTDS	ECL
KAPSA Philippe	directeur de recherche	LTDS	CNRS/ECL
LE BOT Alain	chargé de recherche	LTDS	CNRS/ECL
LOUBET Jean-Luc	directeur de recherche	LTDS	CNRS/ECL
MARTIN Jean-Michel	professeur	LTDS	ECL
MATHIA Thomas	directeur de recherche	LTDS	CNRS/ECL
MAZUYER Denis	professeur	LTDS	ECL
PERRET-LIAUDET Joël	maître de conférences	LTDS	ECL
SALVIA Michelle	maître de conférences	LTDS	ECL
SIDOROFF François	professeur	LTDS	ECL
STREMSDOERFER Guy	professeur	LTDS	ECL
THOUVEREZ Fabrice	professeur	LTDS	ECL
TREHEUX Daniel	professeur	LTDS	ECL
VANNES André-Bernard	professeur émérite	LTDS	ECL

Nbre LTDS 24

Total HdR ECL

91

Remerciements

Je dédie ce travail à Virginie, mon épouse, pour avoir accepté tant de sacrifices durant ces dernières années

Ces travaux de thèse ont été effectués au Laboratoire d'Electronique Optoélectronique et Microsystèmes (LEOM) de l'Ecole Centrale de Lyon. A ce titre je tiens à remercier Guy Hollinger pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir aidé dans certaines prises de décision.

Je remercie vivement le professeur Daniel Barbier (Laboratoire de Physique de la Matière), directeur de l'Ecole Doctorale EEA, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et d'avoir examiné la pertinence de mon travail. J'ai été ravi d'avoir pu collaborer avec son équipe et d'avoir ainsi pu profiter de leurs compétences en physique des matériaux. Je tiens à remercier tous les membres du jury pour leur collaboration durant l'examen de ce travail et leur participation à la soutenance.

J'adresse ma reconnaissance toute particulière aux professeurs Paul-Louis Desbène (Laboratoire d'Analyses des Systèmes Organiques Complexes) et Pierre Benech (Institut de Microélectronique Electromagnétisme et Photonique) pour leur difficile travail de rapporteur. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance pour leurs remarques avisées et leurs soutiens lors de nos nombreuses discussions.

J'exprime ma gratitude à monsieur Desbène pour m'avoir offert l'opportunité de rejoindre l'équipe de recherche qu'il dirige. J'espère être à la hauteur de ces attentes.

Je tiens également à remercier le professeur Eric Audouard (Laboratoire Traitement du Signal et Instrumentation) pour avoir accepté l'invitation tardive de participation à ce jury de thèse. Compte-tenu de la richesse des discussions que nous avons pu avoir à la suite de la soutenance je regrette de ne pas vous avoir rencontré plus tôt. Je pense que nous aurions pu réaliser une collaboration fructueuse et très intéressante.

J'associe à ces remerciements le professeur Christian Brambilla (Groupe de Recherche sur le Cancer du Poumon) qui malheureusement n'a pas pu assister à la soutenance, mais qui s'est montré très bon conseiller pour nous guider dans le choix des marqueurs cancéreux.

Je remercie toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail et tout particulièrement Aude Bouchard (IMEP) qui s'est toujours montrée disponible bien que je n'ai cessé de la harceler au téléphone. Je remercie toute l'équipe du LASOC et tout particulièrement le docteur Christophe Morin qui m'a aidé à comprendre les fondements de l'Electrophorèse Capillaire et à faire une soutenance de bonne qualité. J'adresse également mes remerciements à Emeline Mery (LPM) avec qui j'ai eu la chance de collaborer. Venant de deux univers différents, nos discussions nous ont permis de mieux comprendre nos problématiques communes et de réaliser des dispositifs intéressants.

J'adresse un remerciement ému à Radek Mazurczyk sans qui tout ce travail n'aurait pu être possible. Il a su être un encadrant en or et un technologue hors pair. Je n'oublierai jamais son soutien inconditionnel et les heures que nous avons essayées conjointement à la paillasse.

Je remercie le docteur Stanislas Krawczyk pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer ce travail sous sa direction. Il m'a permis d'effectuer une thèse à l'interface entre la biologie, l'optique, les matériaux et la chimie analytique et de participer au démarrage d'une nouvelle équipe de recherche. A son contact, j'ai ainsi appris à être autonome, patient et rigoureux dans mes travaux.

Je remercie également toute l'équipe Biopuce du LEOM qui m'a supporté pendant ces 3 dernières années. Je pense ici aux docteurs Yann Chevolut et Michel Cabrera qui se sont montrés de très bons conseils pour solutionner les embuches auxquelles j'étais confronté et pour me suggérer des voies de recherches innovantes. Je pense également aux docteurs Jean-Pierre Cloarec et Emmanuelle Laurenceau qui m'ont offert l'opportunité d'enseigner au sein de leurs départements. Je leur exprime toute ma gratitude pour m'avoir donné goût à l'enseignement et m'avoir fait profiter de leurs expériences. Je pense aussi à Benjamin Hannes qui a su optimiser le banc de caractérisation pour le rendre plus performant. Je lui souhaite bon courage pour surmonter les galères de sa dernière année.

Je remercie Pierre et Jean-Louis pour leurs disponibilités et leurs écoutes, ainsi que pour leurs conseils avisés en salle blanche.

Un bon labo ne tourne pas s'il n'y a pas une atmosphère conviviale et propice au travail, je remercie donc Pedro, Xavier, Christian, Michel Gendry, Ian, David et Fabien qui y contribue largement. Je pense aussi à Mr Michel Guarrigues, notre doyen, pour ces conseils en optique et pour ces remarques sévères sur mes présentations.

Merci également à Nicole et Geneviève pour m'avoir soutenu pendant cette thèse et m'avoir donné le courage d'aller au bout. Merci à Rozenn et Bernard pour leur aptitude à contourner les rouages de la bureaucratie.

Je remercie Philippe pour ces conseils « prudents » en termes de sécurité des équipements. Je m'excuse pour les quelques entorses aux règlements que j'ai probablement effectué au cours de cette thèse. Je remercie Claude et JB pour leurs conseils techniques et Dudu pour son Arak et sa bonne humeur quotidienne.

Je pense aussi à tous les thésards sans qui le labo ne tournerait pas aussi bien. J'ai une grande pensée pour les amis du matin, les docteurs Anne-Laure Deman et Jonathan Pradelles (dit Jon de ouf), qui ont toujours été fidèles à eux-mêmes et qui n'ont cessé de discourir pendant trois ans. J'espère qu'un jour ils arriveront à être d'accord et que je saurais là pour en témoigner.

Je pense aux collègues de bureau Karim, Mohsen et Marwan. Je les remercie pour cette cohabitation qui s'est avérée très enrichissante. Je leur souhaite tous mes vœux de bonheur pour leurs mariages à venir et je leur souhaite une belle réussite pour la suite.

Je pense également à la fine équipe du midi et du Médal : Mario, la star libanaise, Clément, le Chti nerveux, Caz le roi de la pelle, et David le dieu du cocktail.

J'associe à ces remerciements Badhise et Salim, les dieux de la photonique.

Je remercie tous mes amis pour tous les moments de détente électroniques que nous avons partagés. J'ai une pensée toute particulière pour Rono qui m'a accueilli chez lui pendant les premiers mois de cette thèse et qui m'a appris à combiner journée de travail et mix endiablé ; Nico et Elysée qui ont toujours été présents à chaque coup dur même si des milliers de kilomètres nous séparent.

Enfin, je remercie ma famille : mes parents, mes frères Pierre et Baptiste, mes grands parents et mes tantes et oncles pour leurs amours, leurs soutiens et leurs encouragements incessants.

Je terminerai en remerciant ma petite femme qui a vécu cette thèse avec moi : mes joies, mes sauts d'humeur, mes coups de colère, mes coups de déprime et qui pourtant est toujours là à mes côtés.

Merci mon amour.

Pour moi, cette année fut la plus belle car elle a permis de concrétiser à la fois un bonheur personnel et professionnel.

TABLE DES MATIERES

1	Introduction	1
2	Objectifs du travail de thèse	5
3	Les procédés de séparation	6
3.1	<i>Historique de l'électrophorèse capillaire</i>	6
3.2	<i>Théorie de l'électrophorèse capillaire</i>	7
3.2.1	Définition de la mobilité électrophorétique	7
3.2.2	Définition de la bicouche électrique	9
3.2.3	Le flux électroosmotique	13
3.2.4	Les paramètres analytiques	15
3.2.4.1	L'efficacité	16
3.2.4.2	La résolution	19
3.2.4.3	Les facteurs dispersifs	19
3.2.4.3.1	Le volume injecté (σ_{inj})	20
3.2.4.3.2	La diffusion moléculaire (σ_{diff}), l'électrodispersion (σ_{edisp})	21
3.2.4.3.3	L'influence thermique (σ_j)	23
3.2.4.3.4	La fenêtre de détection	23
3.2.4.3.5	L'adsorption (σ_{ads})	24
3.3	<i>Les différents modes d'électrophorèse capillaire</i>	25
3.3.1	L'électrophorèse capillaire de zone (CZE)	26
3.3.2	La focalisation isoélectrique en capillaire (IEF)	26
3.3.3	L'électrophorèse capillaire en gel (CGE)	27
3.3.4	Isotachophorèse (ITP)	28
3.3.5	Chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (MEKC)	28
3.3.6	Electrochromatographie capillaire (CEC)	29
3.3.7	Electrophorèse capillaire multidimensionnelle	30
4	Les microsystèmes sur puce	32
4.1	<i>Analyse à partir d'échantillon sanguin</i>	32
4.2	<i>Analyse à partir du sang ou du sérum</i>	33
4.2.1	La préconcentration protéique	33
4.2.1.1	Utilisation de phase stationnaire	33
4.2.1.2	Distribution de la force électrique	34
4.2.1.3	Par isotachophorèse	35
4.2.1.4	Les autres stratégies	35
4.2.2	Les modules de préparation à la détection	36
4.2.3	Les micromélangeurs	37

4.3	<i>Analyse cellulaire à partir du sang ou du plasma</i>	38
4.3.1	La culture de cellules sur puce	38
4.3.2	L'extraction de cellules	39
4.3.2.1	Le tri mécanique de cellules	39
4.3.2.2	La séparation électrique de cellules	41
4.3.3	La sélection des cellules (« cell sorting »)	42
4.3.4	La cytométrie en flux	43
4.3.5	La lyse cellulaire	44
4.3.6	L'extraction des molécules d'intérêt	45
4.3.7	L'amplification PCR	46
4.3.8	Le séquençage	48
4.4	<i>Les méthodes de détection</i>	49
4.4.1	La spectrométrie de masse	49
4.4.2	Les méthodes de détection optique	49
4.4.2.1	La détection en Ultra-violet (UV)	49
4.4.2.2	La détection par fluorescence	50
4.4.3	La détection électrochimique	53
4.4.4	Les méthodes moins conventionnelles	54
5	<i>Fabrication des laboratoires sur puce</i>	55
5.1	<i>La fabrication des guides optiques</i>	55
5.2	<i>La fabrication des structures microfluidiques</i>	59
5.2.1	La gravure ionique réactive	61
5.2.2	La gravure humide	63
5.2.3	Comparaison entre gravure humide et gravure ionique	67
5.3	<i>La fermeture du microsystème</i>	68
5.3.1	Le collage verre-verre	68
5.3.2	Le collage verre-polymère	69
6	<i>Banc de caractérisation des laboratoires sur puce</i>	71
6.1	<i>Le microscope à épifluorescence</i>	72
6.2	<i>L'excitation intégrée</i>	73
6.3	<i>La configuration toute intégrée</i>	74
6.4	<i>L'arrangement fibré</i>	75
7	<i>Caractérisations optiques des microsystèmes</i>	77
7.1	<i>Les propriétés de transmission des guides optiques</i>	77
7.2	<i>Les caractérisations par fluorescence</i>	78
7.3	<i>Les courbes d'étalonnage</i>	84
7.4	<i>Distribution de la lumière</i>	88

8	Caractérisations des mécanismes électrocinétiques ...	90
8.1	<i>La relation tension-intensité.....</i>	90
8.1.1	Influence de la force ionique.....	92
8.1.2	Influence de l'ajout de solvants organiques.....	93
8.2	<i>Etudes expérimentales du flux électroosmotique</i>	95
8.2.1	La vitesse électroosmotique.....	96
8.2.1.1	La méthode ampérométrique.....	97
8.2.1.2	Estimation de la vitesse électroosmotique par fluorescence indirecte.....	101
8.2.1.3	Evolution de la vitesse en fonction du champ électrique.....	102
8.2.2	Estimation de la mobilité électroosmotique.....	103
8.2.3	Estimation de la valeur du potentiel Zêta.....	104
8.2.4	Evolution du potentiel Zêta au cours du temps	105
8.3	<i>Influence d'additifs sur la mobilité électroosmotique</i>	106
8.3.1	Influence de l'ajout de SDS.....	107
8.3.2	Influence de l'ajout de glycérol.....	110
8.4	<i>Les injections électrocinétiques dans les Lab-on-a-Chip....</i>	112
8.5	<i>La méthode d'injection utilisée dans nos expériences</i>	113
9	Séparation des biomolécules	117
9.1	<i>Le marquage des protéines</i>	117
9.2	<i>Séparation de la Streptavidine et du Cy3 par CZE.....</i>	119
9.2.1	Injection de la Streptavidine seule.....	119
9.2.2	Injection du Cy3 seul.....	121
9.2.3	Injection du mélange	122
9.2.4	Comparaison avec un substrat commercial.....	124
9.3	<i>Séparation d'un mélange de protéines par CZE</i>	127
9.3.1	Expérience de référence sur un capillaire de silice.....	128
9.3.2	Dans un laboratoire sur puce verre/PDMS.....	130
9.4	<i>Séparation d'un mélange de protéines par CGE.....</i>	133
9.5	<i>Séparation d'un mélange anticorps-antigène</i>	135
10	Conclusions:	140
11	Références:.....	146
12	Liste de publications et communications.....	173

1 Introduction

Le concept de laboratoire sur puce est apparu dans les années 1990 pour répondre aux besoins d'analyses rapides, sensibles, à haut débit et à faible coût. Ces microsystèmes chimiques ou biologiques se sont développés grâce aux progrès de la microélectronique et de la microfluidique. Ces composants ont pour vocation d'incorporer sur une même puce des étapes de préparation, de transport, de séparation et de détection de biomolécules.

Bien que ces microsystèmes possèdent des potentialités intéressantes (coût, temps d'analyse), ils nécessitent toujours l'utilisation d'analyseurs (laser, systèmes de détection, générateur haute tension...) encombrants et onéreux. A cause de ces inconvénients, la portabilité de ces composants hors des laboratoires de recherche reste limitée.

Pour solutionner ce problème, nous proposons d'intégrer des composants optiques dans les laboratoires sur puce et de réaliser un analyseur miniaturisé dans le but de les exporter en milieu hospitalier voire dans les cabinets des médecins traitant. Avant de réaliser, ces systèmes d'analyses, il était indispensable de démontrer la fonctionnalité et les potentialités des laboratoires sur puce intégrant optique et microfluidique.

L'objectif de cette thèse est donc de développer et de caractériser au LEOM (Laboratoire d'Electronique, Optoélectronique et Microsystèmes) de nouvelles architectures de laboratoire sur puce. Nos microsystèmes incluent des canaux microfluidiques et des guides optiques fabriqués sur un substrat en verre recouvert d'une couche de polymère (PolyDiMethylSiloxane). Les guides optiques permettent d'exciter et de collecter la fluorescence émise par les molécules.

Dans un premier temps, nous avons mis au point les procédures de fabrication sur verre des composants d'optique intégrée. Puis, dans un deuxième temps, nous avons développé les procédures de fabrication des structures microfluidiques par gravure humide et sèche du verre. Parallèlement à ces travaux, nous avons assemblé un banc de caractérisation pour étudier les propriétés optiques et microfluidiques de nos laboratoires sur puce. Et enfin, nous avons mis en place les protocoles expérimentaux permettant de séparer des mélanges de protéines par électrophorèse capillaire sur puce.

Pour résumer ces travaux de recherche, ce mémoire de thèse s'articule autour de 7 chapitres.

Dans le premier chapitre, nous décrivons le principe de l'électrophorèse capillaire qui sera utilisé pour séparer des mélanges de protéines. Comme nous réalisons de nouvelles structures hybrides (composants optiques et microfluidiques sur verre et capot en polymère), il est indispensable de connaître les procédés électrocinétiques mis en jeu lors des analyses séparatives. La miniaturisation de l'électrophorèse capillaire connaît un intérêt grandissant depuis plusieurs années, il est donc important d'étudier les limites des microsystemes analytiques existants afin de proposer des laboratoires sur puce toujours plus performant.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons une étude bibliographique des principaux modules que l'on retrouve intégrés dans un laboratoire sur puce. Cette analyse nous permet de positionner l'originalité de notre travail par rapport au contexte international et de définir quels matériaux devront être utilisés.

Dans le troisième chapitre, nous décrivons les procédés technologiques développés pour fabriquer les laboratoires sur puce. En fait, nos microsystemes sont le fruit d'une étroite collaboration entre l'équipe du professeur P. Benech à l'IMEP-INPG (Institut de Microélectronique, Electromagnétisme et Photonique) et notre équipe au LEOM. L'équipe de P. Benech était responsable de la réalisation des guides optiques par échange d'ions. Bien que cette technique soit maîtrisée à L'IMEP-INPG, il leur a fallu optimiser leurs protocoles de fabrication afin de répondre aux exigences des laboratoires sur puce. Au LEOM, nous développons les méthodes de gravures chimiques des structures microfluidiques. Les problèmes rencontrés ainsi que les procédures d'optimisation sont également discutés. Dès lors que les premiers laboratoires sur puce furent fabriqués, il a fallu caractériser les composants optiques et microfluidiques.

Dans le quatrième chapitre, nous décrivons le banc de caractérisation que nous avons mis en place pour étudier les propriétés optiques et microfluidiques des laboratoires sur puce. Comme au début de cette thèse, le LEOM n'était pas équipé pour réaliser ces caractérisations, nous avons établi un cahier des charges des exigences optiques et électrocinétiques, et assemblé cette plateforme de mesure.

Dans le cinquième chapitre, nous présentons les différentes caractérisations des guides optiques qui ont été réalisées. Pour valider la qualité du guidage optique, des mesures de transmission de la lumière au travers des guides ont été analysées à l'IMEP-INPG. Après avoir sélectionné la taille des guides permettant un couplage efficace entre les guides d'ondes et les fibres optiques, nous avons effectué des analyses en fluorescence au LEOM. Ces mesures sont indispensables pour définir le choix de la configuration optique qui sera utilisée lors des séparations. Afin d'établir une relation entre la concentration des protéines séparées et l'intensité de la fluorescence des courbes d'étalonnage ont été réalisées. Pour augmenter le degré de complexité des laboratoires sur puce, l'IMEP-INPG a fabriqué des structures optiques de type jonctions Y ou tapers. L'utilisation de jonctions Y dans le but de distribuer la lumière laser au travers du substrat est également démontrée dans ce chapitre.

Dans le chapitre 6, nous décrivons les études microfluidiques qui ont été mises en œuvre pour caractériser le flux électroosmotique. Comme nous avons développé une architecture verre/polymère originale, il était indispensable d'étudier les propriétés électrocinétiques de nos laboratoires sur puce. Le flux électroosmotique a été caractérisé par deux méthodes indépendantes et les résultats expérimentaux sont comparés aux données de la littérature. Comme le flux électroosmotique peut influencer la résolution d'une séparation, nous avons étudié deux approches différentes pour moduler l'intensité de ce flux. Dans l'objectif de réduire l'adsorption des protéines et d'augmenter la vitesse des analyses, nous avons ajouté une solution de surfactant au tampon de séparation. A l'inverse, comme certaines séparations exigent que le flux électroosmotique soit très faible, nous avons modifié la viscosité de l'électrolyte de migration en y ajoutant une solution contenant du glycérol.

Dès lors, que les caractérisations optiques et microfluidiques furent terminées, nous avons développé des procédures d'injections pour contrôler électriquement le volume d'échantillon injecté dans le canal de séparation.

Dans le chapitre 7, nous présentons quelques analyses séparatives obtenues dans nos microsystèmes. Les conditions expérimentales utilisées lors des analyses séparatives ont été mises au point en collaboration avec l'équipe du professeur P.L. Desbène au LASOC (Laboratoire d'Analyses des Systèmes Organiques Complexes). Pour évaluer la pertinence de nos résultats, des analyses comparatives sur des microsystèmes commerciaux ont été effectuées. En collaboration avec le LASOC, des protéines ont pu être séparées dans des laboratoires sur puce et sur des appareils d'électrophorèse capillaire classique.

Afin de pouvoir analyser des protéines uniquement en fonction de leurs masses moléculaires, nous avons adapté les conditions expérimentales pour séparer des protéines par électrophorèse capillaire en gel. La faisabilité de cette séparation dans nos laboratoires sur puce est démontrée dans ce chapitre. Enfin, des séparations par électrophorèse capillaire ont été couplées dans les canaux microfluidiques à des réactions immunologiques. La mise en application d'un tel dispositif est testée et validée par l'analyse d'un modèle biologique d'infection du parodonte, induite par la bactérie *Porphyromonas Gingivalis*.

L'ensemble des résultats expérimentaux est résumé dans la conclusion de cette thèse.

2 Objectifs du travail de thèse

Cette thèse doctorale s'intègre dans le cadre d'un projet de recherche multidisciplinaire financé principalement par la Région Rhône-Alpes. Ce projet intitulé : « Création d'analyseurs Lab-on-a-Chip pour le diagnostic précoce et le suivi des cancers du poumon » a pour objectif le développement d'un nouvel outil de diagnostic du cancer. Cet appareil inclura des composants microfluidiques de type laboratoire sur puce ainsi qu'un analyseur miniaturisé. L'analyse reposera sur l'étude et le dosage d'espèces protéiques impliquées dans certains mécanismes cancéreux. Grâce à l'intégration d'étapes de prétraitement d'échantillon, dans les laboratoires sur puce, cette analyse pourra être effectuée à partir de prélèvements sanguins. Grâce à la flexibilité de ces microsystèmes, les analyses seront effectuées à partir de faibles volumes de sang. Le dosage immunologique s'effectuera par quantification de la fluorescence directement dans les laboratoires sur puce, par le biais de composants optiques intégrés, remplaçant ainsi la détection par microscopie confocale classiquement utilisée. La fluorescence étant, à ce jour, la méthode la plus sensible, elle devrait permettre de détecter de faibles concentrations de marqueurs cancéreux circulants. Comme ces derniers sont impliqués dans les premières étapes de cancérisation, le diagnostic précoce devient alors possible. L'utilisation de méthodes d'analyses hospitalières interviendra en complément des études dans les laboratoires sur puce.

Au sein de ce projet, cette thèse a pour objectifs de mettre au point des laboratoires sur puce permettant la séparation et la détection de marqueurs protéiques. Pour cela, l'IMEP-INPG va fabriquer, sur verre, des composants d'optique intégrée compatibles avec les exigences (sensibilité, dimensions) imposées par le cahier des charges du projet scientifique. Notre équipe aura en charge de développer les procédés de fabrication des structures microfluidiques par gravure humide et ionique réactive du verre. Il faudra également mettre en place, au LEOM, un banc de caractérisation pour étudier les microsystèmes réalisés. Il s'agira tout d'abord de caractériser, par transmission et par fluorescence, les guides optiques intégrés. Il faudra, ensuite, étudier le comportement électrocinétique des structures microfluidiques réalisées. Enfin, une fois que le microsystème complet sera opérationnel, des protocoles d'injection et de séparation de protéines devront être établis dans ces laboratoires sur puce. Les résultats séparatifs obtenus seront ensuite comparés avec des analyses réalisées dans des laboratoires sur puce commerciaux ou des systèmes d'électrophorèse capillaire classiques.

3 Les procédés de séparation

Etant donné que la majorité des travaux réalisés au cours de cette thèse concerne la mise en place de protocoles d'électrophorèse capillaire dans des laboratoires sur puce (LOC), nous débuterons ce chapitre par un bref historique et quelques rappels sur les mécanismes électrocinétiques induits lors des analyses en électrophorèse capillaire. Nous décrirons ensuite les modes d'électrophorèse capillaire qui peuvent être développés dans ces microsystemes.

3.1 Historique de l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse est définie comme la migration d'ions chargés sous un champ électrique. Ces ions peuvent être mobilisés soit par attraction, soit par répulsion. De manière pratique, la cathode et l'anode sont placées dans une solution électrolytique. Dès l'application du champ électrique, les cations (positifs) vont s'orienter vers la cathode tandis que les anions (négatifs) seront attirés par l'anode. Les molécules neutres, en revanche, ne seront attirées par aucune des électrodes.

Historiquement, C'est en 1909, que Michaelis introduira le terme d'électrophorèse au cours d'une expérience dans laquelle il cherchait à déterminer le point isoélectrique des invertases et des catalases¹. En 1948, Tiselius obtient le prix Nobel de chimie pour l'ensemble de ses travaux en électrophorèse des protéines et pour ses recherches sur la précipitation des colloïdes par électrophorèse. Bien que ce mode de séparation de molécules possède un très grand intérêt, il reste difficile à mettre en œuvre étant donné que les anions et les cations migrent dans des directions opposées.

Grâce aux travaux du physicien Reuss en 1809, il existe une solution à ce problème. En étudiant la migration de particules colloïdales, il mit en évidence le fait qu'un liquide adjacent à une surface chargée négativement se déplaçait vers la cathode sous l'influence d'un champ électrique externe². Ainsi au milieu des années 1960, Hjertén et ses collaborateurs développent un nouveau mode d'électrophorèse utilisant des capillaires en silice circulaires de 3 mm de diamètre. Ce système permet de séparer des molécules en combinant la force électrophorétique décrite précédemment et la force électroosmotique découverte par Reuss. Grâce à ce mode séparatif, Hjertén est parvenu à séparer divers composés tels que des virus, des ribosomes et des ions inorganiques en fonction

de leurs mobilités³. Virtanen a été l'un des premiers à réduire la taille des capillaires de 3 mm à 0,2 mm afin de résoudre des problèmes de convection⁴. Jorgenson et Lukacs ont poursuivi cette étude en travaillant avec des capillaires de 75 µm (1981⁵, 1983⁶). Grâce à sa rapidité, en comparaison aux analyses en électrophorèse sur gel, les domaines d'applications de l'électrophorèse capillaire sont très vastes. De nombreux articles dans les domaines pharmaceutiques^{7, 8, 9}, cliniques^{10, 11, 12}, biochimiques^{13, 14}, agroalimentaires^{15, 16} et environnementaux¹⁷ ont ainsi été publiés.

3.2 Théorie de l'électrophorèse capillaire

Si l'on tient compte, des recherches décrites précédemment, deux mécanismes électrocinétiques interviennent lors d'une électrophorèse. Le mécanisme principal est l'électromigration. Il s'applique directement aux molécules en solution afin de les orienter dans un champ électrique. Le deuxième mécanisme est l'électroosmose. Il mobilise, sous l'application d'un champ électrique, le tampon et l'ensemble des molécules qu'il contient dans une même direction. C'est la résultante de ces deux composantes qui va définir la vitesse des protéines en solution. Ainsi, si ces protéines possèdent des vitesses apparentes différentes, elles pourront être séparées.

Le but de cette partie est de décrire simplement la théorie de ces deux mécanismes tout en dégagant les principaux paramètres à prendre en compte lors des expériences de séparation.

3.2.1 Définition de la mobilité électrophorétique

Si nous considérons un cas simple dans lequel les groupements silanols associés à la surface sont neutralisés. Dans ce cas, les composés sont séparés uniquement selon leur mobilité électrophorétique, laquelle dépend de leurs ratios charge/taille. De façon théorique, on peut décrire la vitesse électrophorétique (V_{ep}) d'une molécule (x) grâce à la relation suivante :

$$V_{ep}(x) = \mu_{ep} \times E \quad (1)$$

L'équation (1) nous montre que cette vitesse (V_{ep}) augmentera avec le champ électrique appliqué (E). Le coefficient de proportionnalité intervenant dans cette égalité, est appelé la mobilité électrophorétique (μ_{ep}) d'une molécule (x). Cette relation reste valide tant que les paramètres restent uniformes au cours de l'analyse.

En transformant légèrement l'équation (1), il devient possible de déterminer expérimentalement la valeur de cette mobilité (2). Il suffit de connaître, le temps de migration (t), la tension appliquée (V) et les longueurs effective (l) et totale (L) du capillaire.

$$\mu_{ep} = \left(\frac{l}{t}\right) \times \left(\frac{L}{V}\right) \quad (2)$$

Cette équation nous confirme que pour des longueurs fixes, la durée de la migration diminue lorsque l'on augmente la tension générée aux bornes du capillaire.

La mobilité électrophorétique dépend aussi des forces de friction (F_f) et des forces électriques appliquées (F_e). Si l'on considère des molécules sphériques, les forces de frictions qu'elles subissent sont exprimées selon l'équation 3 :

$$F_f = 6 \times \pi \times \eta \times r \times v_{ep} \quad \text{ou} \quad F_f \approx \frac{\eta \times r^2}{\lambda_d} \quad (3)$$

En fait, la loi de Stokes (3), décrit que les forces de frottements dans un électrolyte dépendent de la viscosité du milieu (η), de la vitesse de la molécule (v) et du rayon de giration ou rayon de Stokes de la molécule (r). Cette équation fut initialement écrite pour décrire les forces de frictions appliquées à des particules de petites tailles (ions) en comparaison à la longueur de Debye (λ_d).

Cependant, dans les séparations que nous avons étudiées au cours de cette thèse, nous nous sommes plutôt intéressés à des molécules d'au moins 800 Da. Et, dans ce cas, les forces de frottement sont plutôt décrites par la seconde égalité (3).

Il est possible de transformer légèrement cette équation (3), en exprimant le rayon (r) en fonction de la masse molaire (M) et du volume spécifique d'un soluté solvaté ($\overline{V_s}$) (4).

$$F_f = 6 \times \pi \times \eta \times v_{ep} \times \left(\frac{3 \times M \times \overline{V_s}}{4 \times \pi \times N_a}\right)^{1/3} \quad (4)$$

Avec N_a , le nombre d'Avogadro.

Les forces électriques appliquées sont proportionnelles au champ électrique appliqué (5). Le coefficient de proportionnalité correspond à la charge électrophorétique nette (q) de la molécule à analyser.

$$F_e = q \times E \quad (5)$$

Ainsi, si l'on combine les équations (1) et (5), on obtient une expression des forces électriques en fonction de la mobilité électrophorétique (6) :

$$F_e = q \times \frac{V_{ep}}{\mu_{ep}} \quad (6)$$

Lors d'une migration électrophorétique, on se trouve dans une situation assimilable à un état stationnaire. Ce qui signifie qu'il y a un équilibre qui s'établit entre ces forces. Elles sont donc de valeurs égales mais de sens diamétralement opposés. Nous pouvons donc définir la mobilité électrophorétique par l'expression (7) :

$$\mu_{ep} = \alpha \times \frac{q}{M^{1/3}} \quad (7) \quad \text{avec} \quad \alpha = \frac{(4 \times \pi \times Na)^{1/3}}{6 \times \pi \times \eta \times (3 \times \bar{V}_s)^{1/3}}$$

D'après l'équation (7), il apparaît clairement que la mobilité électrophorétique dépend, pour un tampon de viscosité connue, du rapport entre la charge et la taille des molécules. Par conséquent, il sera difficile, en absence d'une matrice de tamisage (gel), de séparer par cette méthode deux molécules possédant des ratios charge/taille similaires (par exemple, deux fragments d'ADN).

En électrophorèse de zone, la vitesse des molécules ne dépend pas uniquement de la mobilité électrophorétique comme dans le cas des électrophorèses en gel où le phénomène d'électroendosmose est supprimé. Elle dépend également du phénomène d'électroosmose décrit ci-dessous.

3.2.2 Définition de la bicouche électrique

L'électroosmose est un mécanisme qui permet la mobilisation de l'ensemble du tampon. Il prend naissance au niveau de l'interface entre l'électrolyte de migration et la surface interne du capillaire. A l'aide de modèles théoriques, nous allons décrire le comportement des molécules chargées au voisinage de la surface.

Traditionnellement, on utilise des capillaires en silice fondue possédant des groupements silanols (SiOH) sur leur surface interne. Ces groupements chimiques se comportent comme des acides faibles avec un pKa de l'ordre de 5-6 et un point isoélectrique de 2,5. Par conséquent, ils sont protonés pour des pH < 2,5 ce qui résulte en une interface solide-liquide non chargée et à une absence de flux électroosmotique.

En revanche, pour des pHs supérieurs au point isoélectrique, les groupements silanols seront ionisés négativement. Généralement, les solutions utilisées en électrophorèse capillaire sont électriquement neutres. Pour des milieux neutres ou basiques, on aura donc des interactions électrostatiques entre la surface et les ions en solution. Un gradient de charge va alors se former au sein du tampon. La densité des cations de la solution sera plus importante au voisinage de la surface, afin d'en contrebalancer les charges. Les anions de la solution, quant à eux, seront repoussés. On appelle double couche électrique l'interface entre la surface chargée et la couche de liquide électriquement neutre.

Dès 1910, Gouy et Chapman ont proposé un modèle pour décrire cette double couche. Leur hypothèse de départ repose sur l'existence d'une couche dite diffuse à proximité d'une surface chargée. Dans cette couche diffuse, les ions sont distribués, d'une part, en fonction de leurs interactions électrostatiques avec la surface, mais également selon les mécanismes de diffusion liés à l'agitation thermique. Ces propriétés sont vraies tant que l'on se trouve à une distance de la surface inférieure à la longueur de Debye (λ_d). Cette longueur dépend principalement de la force ionique et des propriétés électriques du liquide. Selon le tampon de migration, elle peut varier de quelques nanomètres pour des solutions de force ionique élevée à quelques microns pour de l'eau pure. Au-delà, la double couche récupère les propriétés d'un réservoir électrolytique, à savoir un potentiel nul et des concentrations ioniques similaires à celles des réservoirs.

En 1924, Stern met au point un autre modèle qui décrit plus finement les mécanismes à proximité de la surface. En fait, il décompose l'interface solide-solution en deux parties. La première partie, située au voisinage de la surface est une couche dite compacte (couche de Stern) d'épaisseur (d). Cette couche matérialise la distance minimum d'approche des ions. Elle est immobile puisque les ions SiO^- sont fixes. Elle peut faire jusqu'à quelques angströms d'épaisseur. La deuxième partie de l'interface correspond à la couche diffuse décrite dans le modèle précédent. Elle contient les ions mobiles et elle est moins affectée par l'attraction électrostatique de la surface (figure 1a). Le plan séparant la couche compacte de la couche diffuse est noté plan de Stern.

Enfin, un dernier modèle, introduit en 1947, complète ces théories en subdivisant la couche de Stern en deux sous-parties. La première est située entre la surface et le plan interne de Helmholtz (PIH). Elle décrit la zone où seuls les ions présentant une interaction forte avec la surface peuvent se loger, tout en perdant une partie de leurs sphères d'hydratation. Le PIH est défini comme la zone de localisation du centre des ions. La seconde partie est comprise entre le PIH et le plan externe de Helmholtz (PEH), lequel est confondu avec le plan de Stern. Cette dernière partie, comme la couche de Stern d'ailleurs, prend en compte les ions hydratés retenus par les forces électrostatiques.

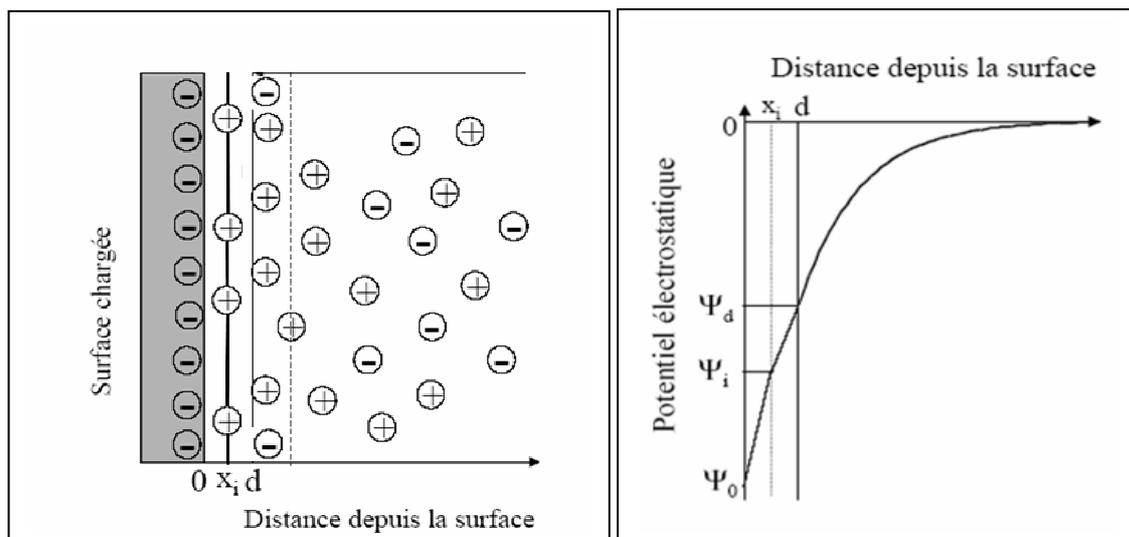


Figure 1 : Représentation de la double couche en fonction de la distance avec une surface chargée. a) Le plan de Stern est noté (d), le plan de cisaillement est représenté en pointillé, et le plan interne de Helmholtz est noté (x_i). b) Potentiel électrostatique en fonction de la distance depuis la surface.

Lorsqu'on applique un champ électrique tangential aux bornes d'une solution électrolytique, les particules acquièrent une certaine mobilité en fonction de leurs charges. Il existe alors au sein de la double couche un plan délimitant deux comportements ioniques différents. Les ions qui possèdent des interactions électrostatiques avec la surface seront immobiles tandis que ceux qui possèdent une affinité plus faible se déplaceront dans le sens du champ électrique vers la cathode. Ce plan est appelé plan de cisaillement ou « Shear plane ». Il représente la section où le mouvement hydrodynamique devient possible. Si l'on souhaite relier sa position aux modèles de la double couche, on pourrait le situer très proche du plan externe de Helmholtz.

Le potentiel au niveau de ce plan de cisaillement est noté potentiel Zêta (ζ). Il est nul au niveau de la solution, et prend une valeur mesurable au niveau du plan de cisaillement (figure 1b). Il est fonction de la concentration ionique, de la valence et du pH de la solution.

Afin de caractériser les canaux microfluidiques que nous réalisons, nous déterminerons expérimentalement ce potentiel Zêta par le biais de mesures électrocinétiques indirectes.

Le modèle de Gouy et Chapman est basé, principalement, sur l'équation de Poisson-Boltzmann qui nous permet d'accéder, aux profils du potentiel électrique dans la couche diffuse et aux concentrations ioniques au-delà de la surface chargée. Dans une première analyse, cette équation représente la balance entre l'électromigration et la diffusion des ions. Ainsi, pour une surface plane, la distribution des ions (i) d'un liquide se définit, selon Boltzmann, comme :

$$c(y) = c \times \exp\left(-\frac{z \times e \times \psi(y)}{k \times T}\right) \quad (8)$$

Où (c) représente la concentration des ions éloignés de la surface dans le liquide ; $\psi(y)$ correspond au potentiel électrostatique associé à la charge de la couche de Gouy-Chapman selon l'axe y ; Z est le nombre de valence associé à l'ion étudié, (T) est la température du liquide, (k) représente la constante de Boltzmann et (e) est la charge fondamentale d'un électron¹⁸. Il me paraît important de noter que cette équation est utilisable, si le système est en équilibre (électrolyte symétrique) et si il n'y a pas de mouvement macroscopique (c'est-à-dire ni convection, ni diffusion). Pour simplifier les formulations, nous supposons également que la surface est homogène¹⁹.

L'équation de Poisson permet d'établir une relation entre la densité de charge nette (ρ_E) et le potentiel électrostatique. Cette relation (9) fait intervenir la permittivité du vide (ϵ_0) et la constante diélectrique du tampon (ϵ).

$$\nabla^2 \psi = -\frac{\rho_E}{\epsilon \times \epsilon_0} \quad (9)$$

Ainsi, en combinant les théories décrites par les équations (8) et (9), nous obtenons l'équation simplifiée de Poisson-Boltzmann (10)²⁰.

$$\frac{d^2 \psi}{dy^2} = -\frac{2 \times z \times c \times e}{\epsilon \times \epsilon_0} \times \sinh\left(\frac{z \times e \times \psi(y)}{k \times T}\right) \quad (10)$$

Ainsi, par définition, nous pouvons extraire deux paramètres importants de cette équation 10 :

$$\text{Paramètre de Debye-Huckel : } k^2 = \frac{2 \times z^2 \times e^2 \times c}{\epsilon \times \epsilon_0 \times k \times T}$$

$$\text{Potentiel électrique de la bicouche: } \Psi = \frac{z \times e \times \psi}{k \times T}$$

Le potentiel électrique de la bicouche peut être déterminé expérimentalement, ce qui permet ainsi d'obtenir des informations sur la distribution de la densité de charge. Il est intéressant de remarquer que le paramètre de Debye-Huckel est indépendant des propriétés de surface mais qu'il dépend uniquement des propriétés du liquide. Ce paramètre apporte une information supplémentaire puisque il est relié aux propriétés de la couche mobile. En effet, on estime que l'épaisseur λ_d (longueur de Debye) de cette couche mobile vaut 3 à 5 fois le rapport $1/k$ ¹⁹. Comme, le rapport $1/k$ est inversement proportionnel à la concentration des ions en solution, il paraît clair que l'on aura intérêt à travailler avec des tampons dilués afin de se rapprocher du comportement de l'eau pure et de s'affranchir d'un effet d'écran électrostatique. A titre d'exemple, Li a calculé qu'une concentration de tampon de 10^{-6} M conduisait à un rapport $1/k$ de 304 nm comparé à 3 nm pour une concentration de 10^{-2} M¹⁹.

3.2.3 Le flux électroosmotique

Si on considère une surface chargée en contact avec une solution aqueuse et qu'on génère un champ électrique, les cations localisés dans la couche mobile se déplaceront vers la cathode par électroosmose. Comme les ions sont hydratés, leur mouvement entraîne les molécules en solution tractant l'ensemble du solvant.

La vitesse du transport de masse (v_{eof}) par électroosmose est décrite dans l'équation 11 :

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \times E \quad (11)$$

Il est intéressant de noter que la mobilité électroosmotique est dépendante des propriétés du tampon de migration et de la charge de surface. D'après l'équation de Smoluchowski (12), cette mobilité est également proportionnelle au potentiel Zêta (ζ) à une constante près donnée par le rapport entre la constante diélectrique (ϵ), la permittivité du vide (ϵ_0) et la viscosité (η) de la solution²¹ :

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \times \zeta}{4 \times \eta \times \pi} \text{ avec } \zeta = \frac{4 \times \pi \times e_s \times \lambda_d}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \quad (12)$$

Ici, e_s représente la densité de charge par unité de surface.

En présence d'un flux électroosmotique, la mobilité des molécules en solution est notée mobilité apparente (μ_a). Elle inclut les mobilités électroosmotiques et électrophorétiques. Expérimentalement, cette mobilité est mesurée à partir du temps de migration du soluté et de la longueur effective (14).

$$\mu_a = \mu_{EOF} + \mu_{EP} \quad (13) \quad \mu_a = \frac{l}{t \times E} \quad (14)$$

Donc, d'après l'équation 13, il apparaît que l'ensemble des molécules est mobilisé par la résultante des deux mécanismes électrocinétiques décrits précédemment. Ainsi, sous l'application d'un champ électrique, la mobilisation qui s'opère à proximité des parois va mettre en mouvement l'électrolyte de migration. Les anions et les cations vont s'orienter et se séparer dans le champ électrique.

Sous l'application de ce champ électrique aux bornes d'un capillaire de silice fondue contenant un électrolyte dont le $\text{pH} > 2,5$, les cations seront attirés par la cathode et leurs vitesses de migration seront exaltées par le flux électroosmotique.

En revanche, les anions sont naturellement attirés par l'anode. Cependant, ils pourront migrer vers la cathode sous l'influence du flux électroosmotique, à la condition que ce dernier soit suffisamment intense. Dans le cas contraire, si aucune pression n'est appliquée, les anions n'atteindront jamais la cellule de détection positionnée en amont de la cathode (figure 2). Les molécules neutres, quant à elles ne migreront que par le biais du flux électroosmotique.

Par conséquent, l'ordre d'apparition des molécules devant la cellule est le suivant (figure 2) : Les cations avec le plus grand rapport charge/taille migreront les premiers, suivis de ceux ayant un ratio plus faible. Les molécules neutres viendront ensuite suivis des anions. Les anions ayant le plus grand rapport charge/taille seront donc les plus lents.

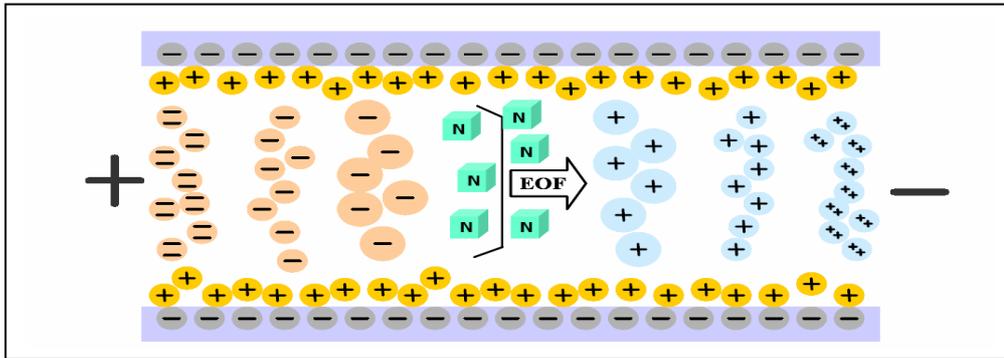


Figure 2 : Ordre de migration des différents composés en fonction de leurs rapports charge/masse sous l'influence d'un champ électrique tangentiel. Les molécules neutres seront plus lentes que les solutés chargés positivement mais plus rapides que les composés chargés négativement.

Etant donné que le flux électroosmotique résulte d'une distribution particulière des charges à la surface du capillaire, le front de migration possède un profil particulier. En effet, nous obtenons un front de migration plat par opposition au front parabolique (laminaire) obtenu lorsque l'on applique une pression hydrodynamique (comme en chromatographie liquide) (figure 3).

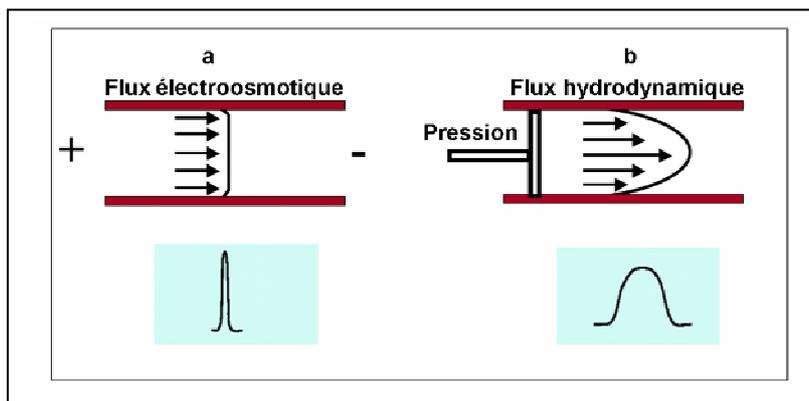


Figure 3 : Comparaison entre les profils de migration obtenus sous l'influence d'un flux électroosmotique (a) ou d'une pression extérieure (b). Une pression génère un front laminaire par opposition au front plat obtenu sous l'influence d'un champ électrique. Un front parabolique s'accompagne d'un élargissement des pics.

3.2.4 Les paramètres analytiques

Lors des paragraphes précédents, nous avons mis en avant les mécanismes responsables de la migration et de la séparation des protéines en solution. Lors de nos expériences, nous nous sommes aperçus qu'il n'était pas toujours possible de séparer les molécules contenues dans un mélange car les pics obtenus pour chaque soluté étaient trop larges. C'est pourquoi dans ce paragraphe, nous allons étudier d'une part, les méthodes disponibles pour estimer l'efficacité d'une séparation, et, d'autre part, les paramètres responsables de l'élargissement des pics et de la perte d'efficacité.

3.2.4.1 L'efficacité

En science séparative, la performance est définie par la hauteur équivalente à un plateau théorique (H). La déviation standard (σ) induite par l'ensemble des phénomènes dispersifs associés à un composé varie en fonction de cette hauteur et de la longueur effective de séparation (l).

$$H = \frac{\sigma^2}{l} \quad (15)$$

Pour qu'un système soit efficace, il faut que l'élargissement des pics, causé par ces phénomènes dispersifs, soit le plus faible possible pour permettre de distinguer des composés ayant des mobilités voisines. Par conséquent, les paramètres de séparation devront être optimisés pour limiter ces dispersions. Dans un cas idéal, les phénomènes dispersifs sont limités à la diffusion de sorte que les solutés se séparent uniquement en fonction de leurs différences de mobilités. En complément de la hauteur équivalente, Giddings exprime l'efficacité (N) en fonction de la longueur effective et de la déviation standard associés aux pics (16)²².

$$N = \frac{l}{H} = \frac{l^2}{\sigma^2} \quad (16)$$

Si on assimile un profil gaussien, aux pics de séparation obtenus sur un électrophérogramme, on peut déterminer le nombre de plateaux expérimentalement en effectuant la mesure au niveau de la ligne de base ou à mi-hauteur du pic détecté (17).

$$N = f \times \left(\frac{t}{w} \right)^2 \quad (17)$$

w représente la largeur du pic. La valeur de cette largeur dépend de la hauteur à laquelle on la mesure (figure 4). f représente un facteur de proportionnalité qui varie en fonction de la zone où w est estimé. Pour un calcul du nombre de plateaux théoriques au niveau de la ligne de base f vaudra 16, alors qu'il ne vaudra que 5,54 pour une estimation faite à mi-hauteur.

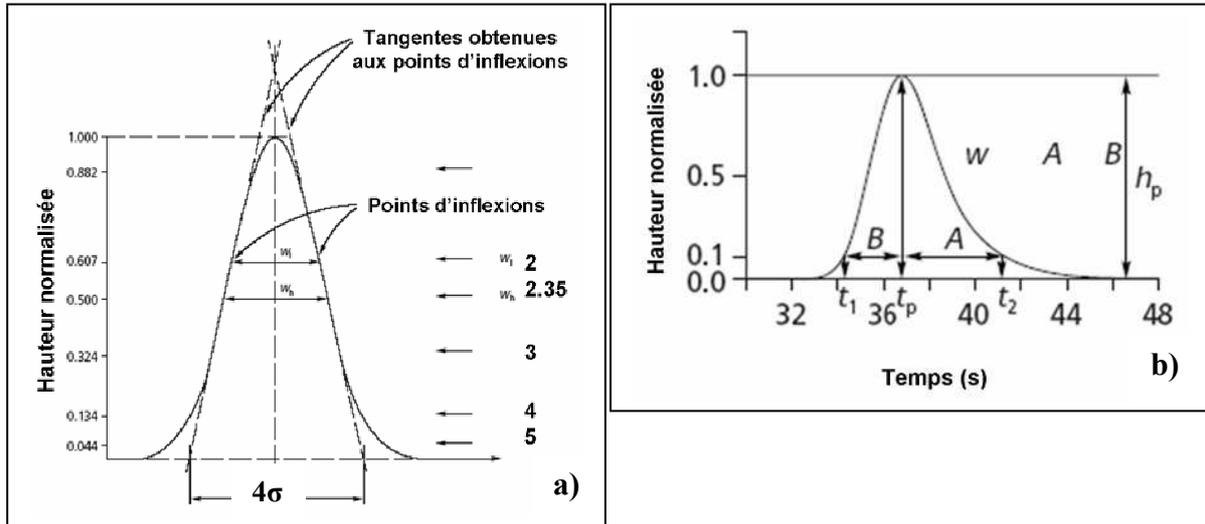


Figure 4 : a) Largeur d'un pic en fonction de sa hauteur. b) Illustration d'un pic asymétrique. A représente la largeur de la zone déformée et B la région normale.

Bien que généralement utilisée, cette définition gaussienne de l'aspect d'un pic ne tient pas compte des effets de traîne qui résultent des phénomènes d'électrodispersions observés en électrophorèse capillaire (figure 4b). D'autres modèles ont donc été développés pour définir plus précisément un pic de séparation tel que le modèle gaussien modifié exponentiellement (EMG) ou le modèle triangulaire. Le modèle EMG défini par Foley et Dorsey résulte d'une modélisation gaussienne combinée avec une décroissance exponentielle pour mieux représenter des perturbations thermiques secondaires ou des irrégularités lors du remplissage d'une colonne chromatographique²³.

La forme générale de ce modèle peut-être décrite dans l'équation (18)²⁴ :

$$C(t) = \frac{A}{\tau} \exp\left[\frac{\sigma^2}{2 \times \tau^2} - \frac{t - t_G}{\tau}\right] \times \int_{-\infty}^z \frac{\exp\left(\frac{-x^2}{2}\right)}{\sqrt{2\pi}} dx \quad \text{avec } z = \frac{t - t_G}{\sigma} - \frac{\sigma}{\tau} \quad (18)$$

Avec ici, A qui représente la surface du pic, t_G correspond au temps de migration moyen de la fonction gaussienne et enfin, τ , est la constante de temps de la décroissance exponentielle. Ces paramètres peuvent être décrits par des moments statistiques soit en échelle de temps, soit en distance. Ces moments statistiques sont simplement des fonctions classiques qui définissent le profil de concentration en fonction du temps de rétention en chromatographie liquide.

Ainsi, le moment zéro définit la surface A d'un pic (19) :

$$M_0 = \int C(t)dt \quad (19)$$

Le premier moment définit le temps de rétention moyen (20) :

$$M_1 = \int \frac{t \times C(t)dt}{M_0} \quad (20)$$

Le second moment définit la variance, et le troisième moment définit l'asymétrie du profil selon la formule générale (21):

$$M_n = \int \frac{(t - M_1)^n \times C(t)dt}{M_0} \quad (21)$$

Nous pouvons estimer l'efficacité directement à l'aide de ces moments statistiques, étant donné que le nombre de plateaux théoriques se définit par le rapport des moments M_1 et M_2 . Bien que cette définition des moments soit largement utilisée^{25, 26} pour décrire des profils séparatifs, elle présente des inconvénients majeurs. Elle nécessite un grand nombre de données et de moments statistiques calculés à chaque instant. De plus, elle est grandement influencée par le bruit de la mesure²⁷. Etant donné que la méthode EMG est relativement fiable sur un domaine de validité, des laboratoires ont développés une correspondance entre les paramètres du modèle EMG et les moments statistiques décrit ci-dessus en introduisant des « paramètres universels » a , b , c qui peuvent être déterminés expérimentalement à mi-hauteur ou à 10% de la hauteur du pic^{27, 28}.

Le modèle EMG définit le nombre de plateaux théoriques associés à un pic par l'équation²⁸ (22) :

$$N = \frac{41,7 \times \left(\frac{t}{W_{0,1}} \right)^2}{1,25 + \left(\frac{B}{A} \right)_{0,1}} \quad \text{ou} \quad N = \frac{1,83 \times \left(\frac{t}{W_{0,5}} \right)^2}{\left(\frac{B}{A} \right)_{0,5} - 0,7} \quad (22)$$

Dans l'équation (22), le symbole $W_{0,1}$ correspond à la largeur du pic mesuré à 10% de sa hauteur maximale, tandis que $W_{0,5}$ correspond à la largeur à mi-hauteur. Le rapport B/A définit le facteur d'asymétrie d'un pic avec B qui représente la largeur entre le milieu du pic et la traîne, tandis que A est la largeur entre le front du pic et son milieu. Plus le facteur d'asymétrie est proche de 1, et plus le pic est symétrique avec un profil gaussien. La loi de Foley-Dorsey est vérifiée tant que le facteur d'asymétrie reste compris entre 1,01 et 2,76²³. Du fait des limitations de ce modèle, d'autres plus complexes ont été développés

tels que les modèles polynomiaux, la fonction Haarhoff-Van der Linde ou la fonction gaussienne modifiée empiriquement. Une comparaison de l'efficacité et des limites de chacun de ces modèles est très bien décrite dans la littérature^{29,30}.

Tous les modèles précédemment cités sont bien adaptés aux méthodes chromatographiques et leur utilisation a été étendue aux méthodes électrophorétiques. Cependant, compte-tenu des profils des pics (triangulaires) observés en électrophorèse capillaire, Tamisier-Karolak et ses collaborateurs ont développé un modèle mieux adaptés. Ce modèle prend en compte la dispersion électrophorétique qui apparaît lors des électrophorèses capillaires de zone²⁸. Dans ce cas, l'efficacité est calculée à partir de la pente d'inflexion du pic à mi-hauteur.

3.2.4.2 La résolution

La résolution définit la capacité d'obtenir un résultat pour un soluté indépendamment des autres composés, tout en garantissant que l'intensité du signal attribué correspond au soluté d'intérêt²⁴. La résolution peut être déterminée au niveau de la ligne de base ou à mi-hauteur selon les équations (23) et (24) :

$$R_s = \frac{2 \times (t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \quad (23) \quad \text{et} \quad R_s = \frac{1,18 \times (t_2 - t_1)}{\delta_1 + \delta_2} \quad (24)$$

Dans une migration chromatographique ou électrophorétique, l'indice 2 correspond au pic possédant le plus grand temps de migration ; W représente la largeur du pic au niveau de la ligne de base et δ la largeur du pic à mi-hauteur. Une résolution d'une unité peut être considérée comme la résolution minimale requise pour séparer deux composés. Ces formules, bien que largement employées, ne sont pas tout à fait exact si les pics sont asymétriques²⁴. Si la résolution est insuffisante, certains paramètres analytiques peuvent être modulés pour améliorer la qualité de la séparation.

3.2.4.3 Les facteurs dispersifs

Un certain nombre de facteurs (injection, diffusion, détection, échauffement et adsorption) peuvent diminuer la qualité d'une séparation en provoquant un élargissement des pics. Si on note σ_{tot}^2 la dispersion totale de la courbe gaussienne correspondant à la somme des variances associées aux phénomènes dispersifs individuels (25), nous pouvons qualitativement décrire l'influence de chacun des facteurs contribuant à la baisse de la résolution.

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{diff}^2 + \sigma_{détect}^2 + \sigma_{joule}^2 + \sigma_{ads}^2 \quad (25)$$

3.2.4.3.1 Le volume injecté (σ_{inj})

Pour que la résolution soit optimale, il faut que la longueur de la zone injectée soit la plus petite possible. Dans tous les cas, cette longueur ne devra pas dépasser 5% de la longueur totale du capillaire³¹. La contribution de l'injection à la variance des pics est donnée par (26):

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{W_{inj}^2}{12} \quad \text{Avec } W_{inj}, \text{ la longueur de la zone injectée} \quad (26)$$

Ainsi, dans nos microsystèmes, le segment (plug) injecté ne doit pas dépasser 3 mm. C'est pourquoi, dans nos expériences, nous injectons un volume correspondant à une longueur de zone comprise entre 0,3 et 1 mm selon l'application. Ce qui conduit à $\sigma_{inj}^2 = 0,3$ mm pour une longueur de zone injectée de 1 mm.

Cette injection pourra être hydrodynamique ou électrocinétique.

Si les besoins de l'expérience nécessitent l'utilisation de solutions complexes (plasma, urine), il est préférable d'injecter hydrodynamiquement l'échantillon. Ce mode d'injection résulte de l'application d'une pression ou d'une aspiration aux extrémités du capillaire ce qui conduit à une différence de niveau. Cette injection peut être également obtenue par un siphonage résultant d'une différence de hauteur entre les réservoirs du capillaire. Lorsque l'on utilise cette méthode hydrodynamique, nous utilisons l'équation de Poiseuille pour déterminer le volume injecté³². Cette équation (tableau1) peut être simplifiée selon que le volume injecté possède un profil gaussien, cylindrique ou rectangulaire³³.

Mode d'injection	Expressions mathématiques correspondantes
Injection hydrodynamique	$L_{inj} = \frac{\Delta P \times r^2 \times t}{8 \times \eta \times L}$ (équation de poiseuille)
Injection électrocinétique sur capillaire	$L_{inj} = \frac{L \times E_{inj} \times t_{inj}}{E_{sep} \times t}$

Tableau 1 : détermination des longueurs d'injection. Lors d'une injection hydrodynamique, (ΔP) représente la variation de pression et (r) le rayon interne du capillaire. Lors d'injections électriques, L représente la longueur du canal de séparation, tandis que ; E_{inj} et E_{sep} , correspondent respectivement aux champs électriques appliqués lors de l'injection et de la séparation.

En général, l'injection hydrodynamique est robuste et précise car elle ne fluctue que si la viscosité est drastiquement modifiée. En revanche, elle est faiblement répétable lors d'injection de faibles volumes³⁴.

En comparaison, les injections électrocinétiques sont très avantageuses car elles ne nécessitent pas de pompe externe ; l'alimentation électrique utilisée lors des analyses séparatives étant suffisante. Elles sont réalisées simplement par modulation de la tension appliquée aux bornes des réservoirs présents aux extrémités des canaux microfluidiques (tableau 1).

En dépit du fait que cette méthode d'injection, est bien adaptée pour de faibles volumes, elle possède une faible précision³⁵ et une reproductibilité inférieure aux injections hydrodynamiques^{36, 37}. De plus, l'injection électrocinétique est inadaptée à l'analyse quantitative à cause d'une discrimination entre anions et cations lors des phases d'injection de l'échantillon. Le manque de précision peut provenir d'une variation de conductivité ou de force ionique mais aussi, des paramètres influençant les flux électroosmotiques et électrophorétiques. En outre, l'influence des champs électriques, au cours de l'injection, peut générer des produits parasites résultant de réactions électrochimiques. Malgré ces inconvénients, cette technique reste indispensable dans le cadre de séparation par électrochromatographie ou en présence d'un gel de séparation³⁴.

Dans le cadre des microsystèmes, nous utiliserons des injections électriques particulières afin de pouvoir contrôler précisément la quantité d'échantillon injectée à analyser^{38, 39, 40, 41, 42}.

3.2.4.3.2 La diffusion moléculaire (σ_{diff}), l'électrodispersion (σ_{edisp})

La diffusion moléculaire est une propriété intrinsèque des biomolécules. Elle peut-être longitudinale ou radiale mais compte-tenu des profils observés à l'injection cette dernière composante est souvent négligeable. La valeur du coefficient (σ_{diff}) liée à la diffusion moléculaire peut-être calculée d'après l'équation d'Einstein (27) :

$$\sigma_{DIFF}^2 = 2 \times D \times t \quad \text{soit} \quad \sigma_{DIFF} = \sqrt{\frac{2 \times D \times l}{\mu_{ep} \times E}} \quad (27)$$

Avec D le coefficient de diffusion. Ce coefficient peut être approximé mathématiquement, pour une molécule sphérique, par la relation de Fick (28) :

$$D = \frac{k_b \times T}{6 \times \pi \times \eta \times r} \quad (28)$$

Où k_B est la constante de Boltzmann, r le rayon de Stokes d'une molécule et T la température de l'expérience. Ce coefficient de diffusion peut être également déterminé expérimentalement à l'aide de la méthode développée par Walbroehl and Jorgenson⁴³. Il s'agit de suivre la migration d'un composé sous un champ électrique donné. Après une certaine durée, le flux est stoppé durant une période donnée, avant que l'alimentation haute tension ne soit réinitialisée pour terminer la migration. Ainsi en comparant l'élargissement des pics observés avant (σ_{continu}) et après (σ_{stop}) l'arrêt du flux, on détermine D (29).

$$D = \frac{\sigma_{\text{STOP}}^2 - \sigma_{\text{CONTINU}}^2}{2 \times \Delta t} \quad (29)$$

Ce coefficient est inversement proportionnel à la taille du soluté. Par conséquent, un fragment d'ADN ou une protéine diffuseront moins que des acides aminés ou des ions (tableau 2)⁴⁴.

Soluté	Coefficient de Diffusion D (x10 ⁻⁵ cm ² /sec)
HCl	3,05
NaCl	1,48
Glycine	1,06
Citrate	0,66
Cytochrome C	0,11
hémoglobine	0,069
Virus mosaïque de la plante du tabac	0,0046

Tableau 2 : Valeurs des coefficients de diffusion associés à différents types de molécules. Les particules sont triées en fonction de leurs tailles.

La perte de résolution par électrodispersion s'opère s'il y a une différence de conductivité entre le tampon de migration (k_m) et le tampon contenant l'échantillon (k_s). Ce phénomène provoque une asymétrie des pics de migration. Cependant, si elle est bien maîtrisée, l'électrodispersion peut-être utilisée pour compenser la dispersion induite par la diffusion moléculaire^{45, 46}. Bien que difficilement mesurable, son influence est exprimée au travers de la relation (30) :

$$\sigma_{\text{edisp}}^2 = \frac{(L)^2}{16} \times \left(\frac{k_s - k_m}{k_m} \right)^2 \quad (30)$$

Par conséquent, les concentrations du tampon de migration et du tampon de soluté devront être relativement proches afin de limiter la dispersion.

3.2.4.3.3 L'influence thermique (σ_j)

Lorsqu'un champ électrique est appliqué aux bornes d'un capillaire rempli d'un électrolyte, un échauffement thermique par effet joule apparaît le long du canal. Comme le système est clos, la chaleur dégagée ne peut pas être éliminée, ce qui conduit à la formation d'un gradient thermique au cours du temps. Préalablement, nous avons démontré dans l'équation 10 que la mobilité électroosmotique dépendait de la viscosité. Or, cette viscosité est sensible à la chaleur. Par conséquent, un gradient de température dans un capillaire conduira inévitablement à un gradient de mobilité qui sera préjudiciable à la résolution. D'après Wehr et ses collaborateurs, une élévation de la température d'un degré augmente la mobilité électroosmotique d'environ 2,5 %³¹. Les travaux de Ross et Locascio démontrent que si les conditions de température sont parfaitement maîtrisées, il est possible d'utiliser ce gradient comme un nouveau mode de séparation⁴⁷. La dispersion σ_j correspondant aux perturbations par effet joule est déterminée par l'équation (31) :

$$\sigma_j^2 = \frac{r^2 \times E^5 \times I^2 \times \theta^2 \times \mu_{ep} \times L}{1536 \times D \times k_T^2 \times \pi^2} \quad (31)$$

Avec θ , le coefficient de température de la mobilité électrophorétique estimée à 0.02 K⁻¹ ; I , l'intensité du courant ; L , la longueur totale du capillaire et k_T , la thermoconductivité spécifique du tampon (assimilable à celle de l'eau : $k_T(\text{H}_2\text{O})=0,006 \text{ W}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La dispersion thermique est relativement faible, elle est estimée être de l'ordre de 10⁻⁶ cm² pour un capillaire de 60 cm de long³².

3.2.4.3.4 La fenêtre de détection

Au niveau de la zone de détection, 3 paramètres doivent être optimisés pour limiter la perte de résolution : la durée du passage des molécules devant la fenêtre de détection, la taille de la fenêtre, la fréquence d'échantillonnage de la carte d'acquisition et le temps de réponse du détecteur à un changement d'intensité du signal. Pour des solutés se déplaçant rapidement, le signal correspondant à chaque molécule est rapide, haut en fréquence et très fin. Il faut donc que le temps de réponse soit court pour offrir une bonne résolution. Pour que les pertes d'efficacité causées par le détecteur soient minimales, il faut que le temps de réponse (t_{rep}) du détecteur soit de :

$$t_{rep} = \sqrt{\frac{0.2 \times D \times t^3}{l^2}} \quad (32)$$

En pratique, un temps de réponse d'une seconde peut-être choisie si l'on travaille avec un long capillaire.

En revanche, dans nos microsystèmes, compte-tenu des longueurs de séparation (5 cm), les temps de réponse devront être inférieurs à 0,034 secondes pour permettre la détection de protéines.

La taille de la fenêtre est aussi importante car elle peut participer aux pertes d'efficacité dues à la zone de détection. Par conséquent, pour qu'une séparation soit efficace, la fenêtre de détection doit avoir une taille maximale (l_{det}) donnée par l'équation (33) :

$$l_{det} = \sqrt{2,4 \times D \times t} \quad (33)$$

Par conséquent, la longueur de la zone de détection devra être inférieure à 100 μm . Dans la mesure, où l'excitation de la fluorescence dans nos laboratoires sur puce s'opère au travers d'un guide optique de 10 μm de largeur, nous sommes nettement en dessous de cette limite.

Enfin, la fréquence d'échantillonnage est cruciale pour ne pas manquer le passage de solutés qui posséderaient des mobilités apparentes très proches. Ainsi, une fréquence d'échantillonnage importante sera choisie pour permettre une bonne résolution spectrale. Le choix de la fréquence d'acquisition devra être réfléchi afin d'éviter la génération de fichiers trop volumineux et devra être adapté à l'ordinateur gérant la carte d'acquisition. En général, pour des analyses de courte durée (moins de 5 minutes), une fréquence d'échantillonnage comprise entre 15 et 20 Hz est un bon compromis.

3.2.4.3.5 L'adsorption (σ_{ads})

Comme les parois internes du canal en contact avec l'électrolyte sont chargées, les ions de charges opposées, ainsi que les molécules en solution vont interagir par des liaisons électrostatiques avec les parois. L'adsorption réversible des protéines provoque une baisse de la répétabilité des mesures résultant d'une modification du flux électroosmotique au cours de la migration. Ce phénomène est d'autant plus important que la cinétique d'échange adsorption/désorption avec le capillaire est lente en regard de la vitesse de migration des composés. Compte-tenu du rapport surface/volume des canaux microfluidiques, l'adsorption est l'une des principales causes de dispersion. En plus, comme nos laboratoires sur puce intègrent un capot en PDMS hydrophobe, les protéines interagiront également par liaisons hydrophobes avec cette surface.

Afin de solutionner ces problèmes d'adsorption, Hjertén propose en 1967, de neutraliser les capillaires en utilisant des polymères « enduits » sur les parois³. Depuis, des solutions alternatives ont été proposées. Par exemples, il est possible, de travailler à des pH extrêmes, de moduler ce pH pour avoir une répulsion électrostatique entre protéines et surface, ou de neutraliser dynamiquement les charges de surface en ajoutant des additifs dans l'électrolyte de migration^{31, 48}. Si ces traitements sont insuffisants ou inadaptés, il est toujours possible de varier la concentration d'un électrolyte ou de modifier son pouvoir tampon⁴⁹. Enfin, d'autres sources de dispersion peuvent être citées comme la géométrie des canaux^{50, 51}, leurs longueurs⁵², ou la rugosité^{53, 54}.

3.3 Les différents modes d'électrophorèse capillaire

Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe précédent, l'électrophorèse capillaire et la compréhension des mécanismes physiques et chimiques qui s'y déroulent mobilisent les scientifiques depuis plusieurs années. Conventionnellement, l'électrophorèse capillaire s'effectue sur un capillaire de silice monodimensionnel⁵⁵. Ces capillaires possèdent une longueur de séparation d'au moins 20 cm afin de séparer des molécules avec une bonne résolution.

Un des principaux avantages de l'électrophorèse capillaire concerne la multitude des modes de séparation disponible. En effet, un mélange de biomolécules peut-être analysé en fonction de la charge, de la taille, du point isoélectrique, de l'hydrophobicité ou de l'affinité biologique des constituants qui le composent. Et cela, en exploitant un seul dispositif expérimental. En revanche, un des inconvénients majeurs concerne les volumes d'échantillons qui sont consommés lors de ces analyses.

L'exploitation de réseaux de canaux microfluidiques bidimensionnels est une solution intéressante pour réduire les volumes injectés. En plus, les analyses effectuées dans ces canaux de petites tailles sont beaucoup plus rapides. Par exemple, l'optimisation des géométries de canaux et des champs électriques ont permis à Plenert et Shear de réaliser une séparation en moins de 25 microsecondes⁵⁶.

Etant donné que, dans cette thèse, nous étudions des séparations de protéines obtenues au sein de microsystèmes fluidiques, nous analyserons uniquement les modes d'électrophorèse capillaire qui ont été mis au point dans des microsystèmes⁵⁷.

3.3.1 L'électrophorèse capillaire de zone (CZE)

Dans ce mode séparatif, les réservoirs d'entrée et de sortie du capillaire sont remplis avec le même électrolyte. Sous l'influence d'un champ électrique appliqué en ces réservoirs, les solutés vont se séparer en fonction de leur rapport charge-taille selon le principe décrit précédemment⁵⁸. Ce mode de séparation a été appliqué sur puce pour des produits pharmaceutiques⁵⁹, des peptides⁶⁰ ou des protéines⁶¹. Il est fréquemment couplé avec l'intégration d'autres éléments.

Ce mode d'électrophorèse peut également être utilisé pour étudier une réaction enzymatique entre un récepteur et un ligand ou les interactions immunologiques entre un anticorps et un antigène (Affinity Capillary Electrophoresis, ACE)^{58, 62}. On distingue 3 modes différents d'électrophorèse d'affinité : le substrat biologique peut être initialement présent dans le mélange, ou dilué dans l'électrolyte de migration ou immobilisé à la surface du microcanal. Stettler et Schwarz ont caractérisé les avantages apportés par une ACE sur puce en comparaison à une méthode capillaire classique dans le cas où le ligand se trouve dans le tampon de migration⁶³. Tandis que, Wang et ses collaborateurs ont étudié la réaction entre un anticorps et un antigène en présence et en absence de compétition par électrophorèse de zone dans un canal microfluidique⁶⁴.

3.3.2 La focalisation isoélectrique en capillaire (IEF)

Un gradient de pH est formé le long du capillaire grâce à l'utilisation d'ampholytes de transport, d'une solution acide en entrée et d'une solution basique en sortie de capillaire. Dans ce mode, les protéines vont se déplacer au sein de ce gradient, puis, elles vont s'immobiliser et se focaliser dans la zone dont le pH correspond à leurs points isoélectriques. Ensuite, les molécules peuvent être mobilisées chimiquement, hydrodynamiquement, ou électrocinétiquement. Dans le cadre d'une mobilisation chimique, l'anolyte ou le catholyte sont respectivement remplacés par une base ou par un acide. L'ajout d'agents zwitterioniques à la place de l'anolyte et du catholyte a également été rapporté⁶⁵. Une mobilisation hydrodynamique peut être obtenue par application d'une faible pression ou d'une aspiration respectivement au niveau des réservoirs d'entrée ou de sortie du capillaire et cela tout en conservant le champ électrique appliqué. Cette méthode est avantageuse car elle garantit un flux de migration constant. Le dernier mode de mobilisation a été décrit par Mazzeo et ses collaborateurs afin de simplifier les procédures de séparation par focalisation isoélectrique⁶⁶. Dans ce cas, la mobilisation et la focalisation se font par électrosmose dans

des capillaires non traités⁶⁷. Un ajout de méthylcellulose dans le mélange ampholyte/analyte est également rapporté pour diminuer l'adsorption des molécules sur les parois du capillaire. Dans ce mode séparatif, on définit la résolution de la séparation selon l'équation (34)⁶⁸ :

$$\Delta(pI) = 3 \times \sqrt{\frac{D \times \left(\frac{dpH}{dx} \right)}{E \times \left(-\frac{d\mu}{dpH} \right)}} \quad (34)$$

Où (dpH/dx) représente le gradient de pH en fonction de la distance x et $(d\mu/dpH)$ symbolise la variation de la mobilité apparente en fonction de la force de ce gradient. Les paramètres qui affectent le rendement d'une séparation selon ce mode d'électrophorèse sont, principalement, la précipitation des protéines ou une concentration trop élevée en sel³¹.

3.3.3 L'électrophorèse capillaire en gel (CGE)

L'utilisation d'une matrice de tamisage est indispensable si les espèces possèdent les mêmes ratios charge/taille. Dans ce mode séparatif, les molécules migrent au travers des pores du gel et sont séparées en fonction de leurs tailles. Les molécules les plus grosses sont plus fortement ralenties par le gel que celles de petites tailles. Pour les peptides comme pour les protéines, les électrophorèses se font habituellement en présence de SDS et de gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)^{68, 69}. Le SDS étant un surfactant amphiphile, il va pouvoir se complexer avec les protéines solubles par interaction hydrophobe, de sorte qu'une molécule de SDS se lie à 2 résidus d'acides aminés. Ainsi, les complexes SDS-protéine auront tous le même ratio charge/taille indépendamment de la longueur de la chaîne polypeptidique³¹. Pour l'analyse de fragments d'ADN, on utilisera également des matrices de tamisage comme, par exemple, de l'hydroxyethylcellulose ou du poly(éthylène oxyde)⁷⁰. Ce mode d'électrophorèse capillaire est intéressant car il offre une bonne dissipation thermique et une diffusion limitée. En revanche, certaines difficultés techniques spécifiques aux microcanaux existent comme : la formation de bulle, une faible sensibilité de détection ou des analyses difficilement répétables à cause d'une contamination moléculaire de la matrice de séparation⁷¹.

3.3.4 Isotachophorèse (ITP)

Ce mode permet de séparer les molécules en fonction de leurs mobilités en s'affranchissant de la dispersion des molécules provoquée par la diffusion. Les protéines sont résolues sous la forme de zone contiguë. Il s'agit de mobiliser le mélange à séparer entre : en amont, un tampon dont la mobilité des ions est supérieure à celle des ions du tampon contenant l'échantillon, et en aval, un tampon de mobilité inférieure à la mobilité de l'électrolyte échantillon. Sous l'influence d'un champ électrique, les molécules se répartissent dans l'électrolyte échantillon en fonction de leurs mobilités. Ainsi, les composés possédant la mobilité la plus élevée seront détectés au niveau du front de tampon (juste après le tampon de tête), tandis que les moins mobiles seront distribués juste avant l'électrolyte de queue. Une fois équilibrée, les zones migrent avec la même vitesse et sont détectées au niveau de la zone de détection sous la forme de bandes dont la largeur est proportionnelle à la concentration de l'analyte. Dans les laboratoires sur puce, cette technique est davantage utilisée pour concentrer un échantillon^{72, 73, 74} plutôt que pour séparer des molécules⁷⁵.

3.3.5 Chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (MEKC)

Ce mode proposé par Terabe, permet de séparer des molécules neutres (de petites tailles) en fonction de leurs répartitions entre 2 phases⁷⁶. Ces séparations nécessitent l'ajout de tensioactif chargé dans le tampon de migration. La concentration du tensioactif doit être supérieure à la concentration micellaire critique du composé à analyser, de sorte qu'il y ait un équilibre entre les micelles et les monomères de tensioactif. Cette phase « pseudo-stationnaire » formée est similaire aux phases stationnaires observables en HPLC. Les molécules à séparer vont se distribuer entre la phase aqueuse du tampon et la phase micellaire, de sorte que les molécules hautement hydrophobes soient retenues dans les micelles, tandis que les molécules hydrophiles en seront exclues³¹. Habituellement, cette technique est utilisée en milieu alcalin avec des capillaires non traités, afin de maximiser le flux électroosmotique. L'utilisation de ce mode de séparation sur puce a été initiée par l'équipe de Ramsey dès 1997 pour séparer des dérivés de la coumarine en moins de 33 secondes⁷⁷. Depuis, quelques équipes seulement se sont focalisées sur ce mode d'électrophorèse pour séparer des mélanges de molécules et pour améliorer les performances analytiques des laboratoires sur puce⁷⁸.

3.3.6 Electrochromatographie capillaire (CEC)

Il s'agit d'une technique chromatographique complexée à un système d'électrophorèse capillaire. La séparation des molécules non chargées est assurée par interaction différentielle du soluté pour la phase mobile ou la phase stationnaire. Les espèces chargées sont séparées, d'une part, en fonction de leurs charges sous l'influence du champ électrique, mais également en fonction de l'affinité des molécules pour la phase stationnaire⁷⁹. Généralement, la phase stationnaire est composée de billes de silice poreuses dérivées avec un ligand hydrophobe (chaîne de 18 carbones)³¹. La phase mobile est similaire à celle utilisée en chromatographie liquide (HPLC) à polarité inverse : mélange de tampons aqueux et de composés organiques (acétonitrile). La migration de la phase mobile est assurée par les fonctions silanols ionisées présentes à la surface des billes de silice. Ces billes sont suffisamment abondantes pour générer un flux électroosmotique en présence d'un champ électrique. Compte tenu du front plat obtenu lors d'une migration électrocinétique, les séparations en CEC sont souvent plus efficaces qu'en HPLC où le flux est laminaire⁸⁰. Comme les systèmes microfluidiques présentent un grand nombre d'attrait (faible volume d'échantillon, courte distance de séparation), l'intégration de CEC sur puce se développe depuis quelques années. L'équipe dirigée par Ramsey fut la première à réaliser une électrochromatographie sur un microcanal ouvert⁸¹. Dans ces travaux, la surface interne du canal est modifiée chimiquement avec des chaînes C18 greffées de sorte à séparer en phase inverse le mélange de molécules.

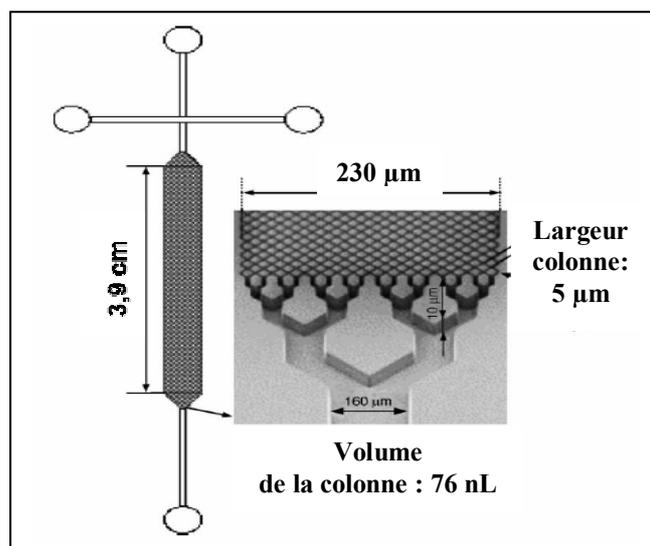


Figure 5 : Photo en microscopie électronique à balayage (MEB) d'un réseau de piliers microstructurés sur PDMS pour la séparation de molécules par électrochromatographie.

Regnier et ses collaborateurs présentent une alternative très élégante au réseau de billes compactées et aux modifications chimiques de surface. Ils furent les premiers à fabriquer une colonne chromatographique utilisant une phase stationnaire microstructurée dans un système microfluidique en quartz⁸², puis en PDMS⁸³ (figure 5). A la suite de ces travaux, d'autres phases microstructurées ont été mises au point pour maximiser les capacités offertes par l'électrochromatographie⁸⁴.

3.3.7 Electrophorèse capillaire multidimensionnelle

Bien que très efficace, l'électrophorèse capillaire monodimensionnelle ne suffit pas toujours pour séparer tous les constituants d'un mélange. Dans la mesure, où les scientifiques tentent de comprendre les mécanismes réactionnels à l'échelle du protéome, des outils toujours plus performants sont nécessaires pour résoudre des mélanges toujours plus complexes. Ainsi, si nous avons n molécules détectables dans une séparation à une dimension, nous pourrions détecter n^2 molécules en électrophorèse capillaire bidimensionnelle en combinant le pouvoir séparatif de deux techniques indépendantes. Les modes couplés doivent être choisis de sorte que les mécanismes de séparation employés soient orthogonaux et complémentaires. Habituellement très difficile à mettre en œuvre, en électrophorèse capillaire, à l'échelle macroscopique l'électrophorèse bidimensionnelle peut-être facilement développée sur puce par le biais de réseau de canaux microfluidiques interconnectés. Typiquement, au niveau macroscopique, l'électrophorèse bidimensionnelle combine les avantages d'une séparation par focalisation isoélectrique afin de focaliser les molécules dans un gradient de pH et ceux d'une séparation rapide en gel de polyacrylamide. Les structures microfluidiques permettant ce type d'électrophorèse bidimensionnelle ont été réalisées sur des puces en polyméthylmétacrylate (PMMA)⁸⁵ et en polydiméthylsiloxane (PDMS). La faisabilité de cette séparation a été évaluée sur un mélange de 5 protéines modèles en présence et en absence de gel de séparation⁸⁶. La modélisation et la validation expérimentale du comportement des protéines lors du transfert entre les deux dimensions ont également été discutées. Afin de limiter les problèmes lors de la transition de l'effluent vers le gel de séparation, Herr et ses collaborateurs privilégient une séparation bidimensionnelle dans des milieux identiques. Ils ont choisi de fabriquer leurs structures microfluidiques dans un substrat en acrylique et ils sont ainsi parvenus à focaliser et séparer un mélange de protéines par focalisation isoélectrique et par électrophorèse de zone⁸⁷.

D'autres modes séparatifs peuvent être couplés sur puce, tels qu'une chromatographie liquide (HPLC) en phase inverse avec un gradient d'éluion en première dimension et une électrophorèse capillaire de zone dans une seconde. Des peptides obtenus par digestion trypsique ont pu ainsi être séparés dans un laboratoire sur puce⁸⁸. Les microsystèmes 2D les plus avancés sont réalisés par le groupe de Ramsey. Ils sont parvenus à combiner une électrochromatographie dans un canal ouvert et une électrophorèse capillaire de zone. Le canal microfluidique utilisé en première dimension mesure 25 cm tandis que le second ne mesure que 1 cm. Après être séparés par électrochromatographie, les peptides sont injectés toutes les secondes dans le deuxième canal afin d'être séparés en fonction de leur rapport charge/taille. L'efficacité de ce microsystème a permis de séparer un mélange de peptides de la β -caséine⁸⁹. Par ailleurs, ils sont parvenus à coupler une séparation par MEKC avec une électrophorèse capillaire de zone pour séparer un mélange de peptides issus de la BSA et de l'ovalbumine⁹⁰. Cette combinaison MEKC-CZE, leur a permis d'atteindre une capacité de pics allant jusqu'à 4500 peptides détectés en 15 minutes⁷¹.

4 Les microsystèmes sur puce

Afin de développer des outils de diagnostics cliniques efficaces et rapides, les scientifiques ont utilisé les outils de la microélectronique pour réduire la taille et automatiser les systèmes d'électrophorèse capillaire. Le premier automate de séparation était un analyseur chromatographique d'air en phase gazeuse. Il fut fabriqué en 1979 par Terry et ses collaborateurs⁹¹. Manz et ses collaborateurs, en 1990, seront les premiers à introduire le concept de microsystèmes appliqués à la chimie « microsystèmes d'analyse totale » (μ -TAS) ou laboratoire sur puce « Lab-on-a-Chip » (LOC)⁹². Ce concept repose sur la réalisation de microsystèmes intégrant tous les modules analytiques, requis pour une analyse chimique ou biochimique, sur une puce de quelques cm^2 ^{93, 94}. Ces étapes incluent le prétraitement d'un échantillon, la séparation des constituants qui le compose et leur détection.

Comme au LEOM, notre objectif est de développer un appareil de diagnostic capable d'analyser des protéines (ou des gènes) extraits à partir du sang, du sérum ou de cellules extraites du plasma, nous décrirons, dans ce chapitre, quelques composants analytiques intégrés sur puce.

4.1 Analyse à partir d'échantillon sanguin

Le sang est une cible privilégiée pour rechercher de nouveaux marqueurs cancéreux. En effet, les méthodes de prélèvements des échantillons de sang sont peu invasives. En comparaison aux échantillons de salives ou d'urines, le sang possède également l'avantage d'être relativement homogène. Cependant, il possède deux inconvénients majeurs : la très grande population de protéines (plus de 490)⁹⁵ et de cellules présentes, rend les analyses séparatives directes très difficiles. De plus, parmi ces protéines, certaines sont très abondantes (l'albumine représente 60% des protéines du sang)⁹⁶ ce qui risque de masquer le signal correspondant à la présence de marqueurs cancéreux très faiblement exprimés. C'est pourquoi, il est indispensable d'ajouter un module de préconcentration ou de purification des protéines d'intérêt en amont du module de séparation, si l'on souhaite travailler directement avec des échantillons sanguins. Pour limiter ces problèmes, les laboratoires d'analyses subdivisent le sang en sérum et plasma. La principale différence entre ces deux composantes est l'absence dans le sérum de la fibrine et d'une partie des protéines impliquées dans le processus de coagulation⁹⁷.

4.2 Analyse à partir du sang ou du sérum

En laboratoire, le sérum est extrait du sang par coagulation, puis par centrifugation. La concentration des protéines présentes dans le sérum est légèrement inférieure à celle des protéines dans le plasma⁹⁷. En revanche, on retrouve 14 fois plus d'ADN circulant dans le sérum que dans le plasma⁹⁸.

La Nasa a développé un microsystème (Proseptor commercialisé par la société DBCD) permettant la préparation du sérum à partir de 20 μ L à 4 mL de sang⁹⁹. Ce dispositif exploite un filtre dont les pores font moins de 3 μ m. Ainsi, les cellules intactes s'agglutinent sur le filtre tandis que la fraction non cellulaire le traverse.

Comme les marqueurs cancéreux sont présents en très faible quantité dans le sang ou dans le sérum, il est nécessaire d'augmenter leur concentration ou de trier les protéines présentes afin de les détecter. Ces modules de purification permettent la reconnaissance sélective des protéines d'intérêt ou l'élimination de celles qui sont trop abondantes.

4.2.1 La préconcentration protéique

Lorsque les composés d'intérêt sont présents seulement sous la forme de trace, l'utilisation de très faibles volumes rend leur détection impossible. Les modules de préconcentration permettent de résoudre ce problème. Dans les laboratoires sur puce, ces méthodes sont souvent combinées avec des techniques séparatives.

4.2.1.1 Utilisation de phase stationnaire

Dans ce procédé, la solution contenant les composés d'intérêt est constamment percolée au travers d'une phase stationnaire. Une fois que la concentration des solutés est suffisante, le pourcentage en sels ou solvants de la phase d'élution est augmenté pour assurer le désencrage des protéines immobilisées. Les molécules sont alors collectées dans un plus petit volume et donc plus concentrées. Kütter et ses collaborateurs ont mis au point un microcanal fonctionnalisé avec des chaînes hydrocarbonées de type C18, dans le but d'enrichir 80 fois de la coumarine 460 en moins de 4 minutes¹⁰⁰. En 2003, l'équipe de Ramsey a optimisé l'efficacité de la phase stationnaire en obtenant un facteur d'enrichissement de 400. Dans ce laboratoire sur puce, le module de préconcentration est couplé à une séparation électrochromatographique¹⁰¹.

L'utilisation de membrane poreuse peut également permettre de préconcentrer des protéines. Par exemple, l'équipe de Kirby a fabriqué, par ablation laser, une membrane nanoporeuse au milieu d'une jonction de canaux microfluidiques. Le flux électroosmotique est orienté dans une direction, de sorte que les protéines s'accumulent sur une face de la membrane. Lorsque l'enrichissement est suffisant, les potentiels électriques sont commutés et les protéines sont éluées en aval dans un canal adjacent. Par ce biais, la concentration des protéines, a été augmentée par 4 ordres de grandeur¹⁰².

Afin de gagner en spécificité, la phase solide peut être fonctionnalisée pour reconnaître des molécules par affinité. Par exemple, Dodge et ses collaborateurs ont immobilisé la protéine A sur les parois d'un microcanal, et ils sont ainsi parvenus à augmenter sélectivement la concentration d'anticorps en solution d'un facteur 30, et cela, en seulement 200 secondes¹⁰³.

4.2.1.2 Distribution de la force électrique

Le principe de cette technique de préconcentration consiste à mobiliser spatialement des molécules recherchées, tout en ralentissant les molécules migrant en tête, et en accélérant la vitesse des plus lentes. Cette méthode de concentration par focalisation (Field Amplification Stacking (FAS)) revient à préparer et injecter le mélange dans une zone où le tampon échantillon est moins concentré que l'électrolyte de migration (figure 6). Sous l'application d'un champ électrique, les molécules se concentrent au niveau des interfaces entre tampon dilué et électrolyte de migration. Les anions migreront rapidement vers l'arrière de la zone échantillon, tandis que les cations se déplacent vers l'avant de cette même zone. Ainsi, Lichtenberg et ses co-auteurs décrivent un enrichissement d'un facteur 95¹⁰⁴. Ce mode de préconcentration peut également être adapté lors de l'injection d'un mélange (Field amplified injection (FAI)). Dans ce cas, c'est le canal d'injection qui contient le tampon dilué, le reste des canaux étant rempli de l'électrolyte concentré (figure 6). Sous l'influence d'un champ électrique, les ions de l'échantillon se mobilisent jusqu'à l'interface où ils s'accumulent. Dès lors que la concentration est suffisante, les potentiels électriques sont commutés afin de conduire l'échantillon dans le canal de séparation¹⁰⁴.

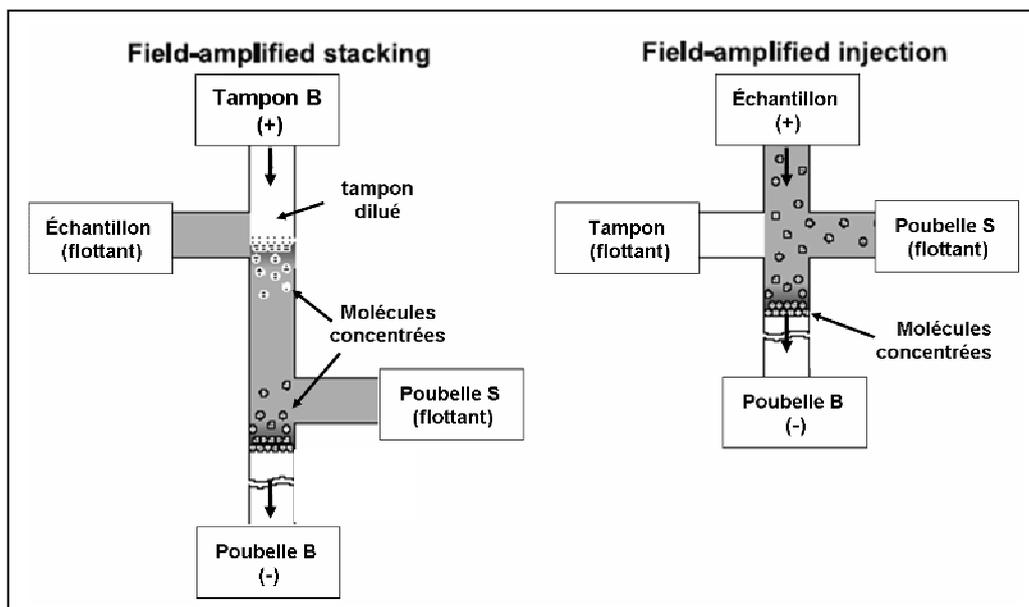


Figure 6 : Schématisation d'une préconcentration par distribution des champs électriques dans un canal microfluidique. Le mode FAS décrit à gauche permet d'amplifier simultanément 2 espèces, tandis que le mode FAI ne permet l'amplification que d'une seule espèce.

4.2.1.3 Par isotachophorèse

Le principe de séparation par isotachophorèse (ITP) précédemment décrit est également applicable à la préconcentration de molécules. Dans ce cas, l'électrolyte de front doit posséder une concentration supérieure au tampon de la zone, tandis que l'électrolyte de queue doit être plus dilué. Sous l'application d'un champ électrique, les potentiels se distribuent en fonction des conductivités afin de minimiser la diffusion. La concentration maximale de la zone est déterminée par l'électrolyte de tête. Comme ce mode de focalisation est simple à coupler avec d'autres outils microfluidiques, beaucoup de microsystèmes intègrent cette méthode de préconcentration en amont d'une électrophorèse capillaire. Par exemple, Huang et ses collaborateurs ont développé un microsystème dans lequel ils enrichissent 40 fois un mélange de protéines par ITP avant de le séparer sur un gel d'électrophorèse capillaire^{57, 74}.

4.2.1.4 Les autres stratégies

Dans une approche similaire, l'équipe de Terabe exploite des stratégies de focalisation par modulation de pH. Ce mode de préconcentration est très similaire au mode d'électrophorèse par focalisation isoélectrique préalablement décrit. Ici, nous utilisons un processus de titrage et non plus des ampholytes de migration. Par exemple, si l'échantillon est acide, il sera injecté dans un électrolyte de migration basique, de sorte que sous un champ électrique, le pH du front de migration augmente très rapidement par interaction entre les ions

OH^- et H^+ des électrolytes. Les composés cationiques migreront au-delà de cette interface et deviendront alors des anions de mobilité beaucoup plus faible provoquant ainsi la focalisation de l'échantillon dans une fine zone de faible conductivité. Cette technique a permis d'améliorer la limite de détection de composés d'un facteur 120^{105} .

Une méthode appelée « sweeping » a été développée pour permettre l'amplification de molécules neutres. L'échantillon se trouvant dans un tampon dépourvu de SDS est injecté dans un canal microfluidique contenant une phase semi-stationnaire micellaire. Etant donné que sous condition basique (ou neutre), les micelles de SDS ont une mobilité apparente plus faible que les molécules neutres, ils peuvent donc être focalisés. Comme ces molécules migrent par électrosmose, la zone frontale possède une mobilité plus faible que la zone échantillon. Les molécules neutres et hydrophobes vont alors être incorporées dans les micelles présentes à l'interface. Au cours de la migration, la diffusion des micelles dans la zone est de plus en plus importante, ce qui conduit à un accroissement des interactions micelles-molécules neutres. Etant donné que les molécules piégées dans les micelles migrent à la même vitesse que ces dernières, l'échantillon est focalisé au niveau de l'interface entre les phases liquide et semi-stationnaire. Cette technique a permis à l'équipe de Terabe d'enrichir 450 fois une solution de Rhodamine B injectée dans un canal microfluidique¹⁰⁶.

Des travaux originaux développés par Ross et Locascio, utilisent un gradient de température comme source de focalisation et de séparation⁴⁷. Comme la vitesse électrophorétique est dépendante de la température, l'application d'un gradient thermique va générer des gradients électriques localisés qui permettront de focaliser l'échantillon dans la zone de vitesse nulle. Cette approche a permis aux auteurs, d'enrichir 100 fois une solution en une minute⁴⁷.

4.2.2 Les modules de préparation à la détection

En général les étapes de traitement post-séparatives sont moins développées dans les laboratoires sur puce que les modules de préparation ou de séparation. Cependant, on distingue tout de même 4 modules distincts intégrable en aval d'une séparation protéique : la digestion enzymatique¹⁰⁷, la connexion avec une zone d'électronébulisation nécessaire à un couplage en spectrométrie de masse¹⁰⁸, le marquage fluorescent d'une solution¹⁰⁹ ou la cristallisation¹¹⁰.

Puisque la spectrométrie de masse est une méthode de choix en protéomique, des microsystèmes intégrant des étapes de séparation et/ou de digestion protéique ont été couplés avec des modules d'électronébulisation (nanospray)¹⁰⁸. La première digestion enzymatique couplée à un nanospray fut caractérisée par Xu et ses collaborateurs^{111, 112}. Depuis, l'efficacité du couplage de ces techniques a été validée par l'analyse de protéines^{111, 113}, de composés pharmaceutiques¹¹⁴ et de peptides¹¹¹. Le rendement d'une digestion enzymatique peut-être grandement améliorée (jusqu'à 1000 fois) si elle a lieu dans une chambre poreuse¹¹² ou sur une surface fonctionnalisée¹¹⁵.

Pour permettre la détection de protéines en fluorescence ou en électrochimie, il est indispensable de les modifier en greffant covalamment des molécules organiques fluorescentes (fluorophores) ou des enzymes^{116, 117}. Ce type de marquage protéique fut intégré en aval^{109, 116} d'une électrophorèse sur puce ou dynamiquement lors d'une séparation^{107, 118, 119}.

4.2.3 Les micromélangeurs

Ces composants sont très importants dans les modules de marquage et de digestion enzymatique. En effet, cet outil permet un mélange rapide et homogène de deux solutions. Nous pouvons distinguer deux types de micromélangeurs : Les composés passifs qui exploitent les phénomènes de diffusion comme moyen de transport et les composés actifs qui nécessitent l'apport d'une énergie extérieure pour induire une turbulence⁹³. La revue écrite par Auroux présente une vue d'ensemble des nombreux procédés de mélange disponibles dans les laboratoires sur puce⁵⁷.

Par exemple, le flux laminaire peut provoquer des perturbations passivement si le microsystème possède une géométrie serpentine ou en T^{120, 121}. Des structures plus complexes, exploitant des réseaux de canaux interconnectés ont été également dessinées⁹³. Certaines études modifient la chimie de surface des parois des canaux pour aboutir au mélange¹¹³.

Les micromélangeurs actifs sont plus fréquemment intégrés sur puce car ils garantissent un mélange plus rapide et plus efficace. Ainsi, des modules exploitant des impulsions ultrasoniques, des oscillations électriques¹²² ou des turbulences hydrodynamiques ou magnétiques ont été caractérisés^{57, 120}.

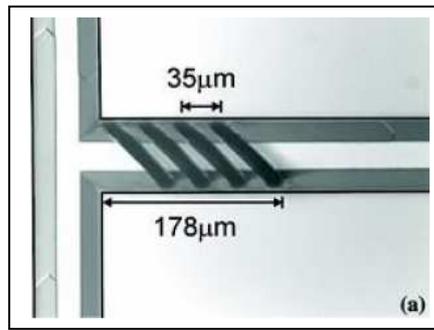


Figure 7 : Micromélangeur passif fabriqué en polycarbonat. Les puits sont séparés de $35\ \mu\text{m}$ et sont fabriqués sur une longueur de $178\ \mu\text{m}$ par ablation laser. C'est la géométrie qui induit la turbulence.

4.3 Analyse cellulaire à partir du sang ou du plasma

En chimie clinique, on s'intéresse à certains types cellulaires spécifiques impliqués (cellules cancéreuses ou globules blancs) dans des processus de cancérisation particuliers. En fait, on cherche, plus particulièrement, à caractériser les cascades réactionnelles et les acteurs impliqués dans ces processus. Traditionnellement, ces études sont réalisées à partir de cellules extraites du sang. Le plasma peut être préparé dans un tube anticoagulé (présence d'héparine ou d'EDTA), par gradient de densité¹²³, par centrifugation¹²³, par microfiltration^{99, 124} ou par effet « Zweifach-Fung » (loi de la bifurcation)¹²⁵

Pour étudier l'expression des protéines ou des gènes contenues dans les cellules, il est souvent nécessaire de les compter avant de les lyser. Comme les marqueurs cancéreux protéiques sont faiblement exprimés, il est souvent nécessaire de les préconcentrer, à l'aide des techniques décrites dans le paragraphe précédent, avant de les analyser. Les gènes, quant à eux, seront amplifiés par des méthodes PCR (polymerase chain reaction). Les amplicons seront ensuite séparés par électrophorèse avant d'être identifiés par séquençage.

4.3.1 La culture de cellules sur puce

Des travaux récents ont démontré que la microfluidique était une solution intéressante pour cultiver des cellules hépatocytaires, des embryons ou des bactéries¹²⁶⁻¹²⁸. Grâce à la perméabilité du polymère PDMS (PolyDiMethylSiloxane) utilisé et à l'apport hydrodynamique de glucose, les scientifiques obtiennent une densité cellulaire équivalente à celle des boîtes de Pétri (10^7 cellules/cm³)¹²⁹. La société IBIDI commercialise de tels composants microfluidiques¹³⁰.

4.3.2 L'extraction de cellules

Les cellules sont isolables soit par le biais de processus mécanique de type filtration ou centrifugation, soit au travers de processus électriques tels que la diélectrophorèse.

4.3.2.1 Le tri mécanique de cellules.

Afin de ne pas obstruer les canaux microfluidiques lors de la manipulation de fluides biologiques complexes (sang), des procédés de centrifugation ou de filtration sur puce ont été mis au point.

La centrifugation permet de séparer des types cellulaires en fonction de leurs vitesses spécifiques de sédimentation. Basé sur ce principe, Ujiiie et son équipe ont développé une microcentrifugeuse sur puce, dédiée à l'extraction de globules rouges à partir de faibles volumes de sang¹³¹. Le problème majeur de cette approche résulte de la forte accélération qu'il faut fournir pour séparer les cellules. Ces grandes vitesses de rotation peuvent limiter la portabilité d'un microsystème.

A l'échelle microscopique, le comportement et la dynamique des fluides sont différents de ce que l'on peut observer à l'échelle macroscopique. En effet, la mise en présence de deux fluides miscibles dans des canaux microfluidiques ne permet pas un mélange instantané mais un écoulement laminaire des fluides côte à côte. Les « filtres-H » qui possèdent une géométrie des canaux microfluidiques en forme de « H » exploitent ces flux laminaires. Ce composant peut-être décomposé en 3 parties : 2 canaux d'entrée pour l'injection de 2 fluides distincts (un mélange A, de différents composés, et un solvant B) ; une zone de filtration dans laquelle les fluides se déplacent conjointement et 2 canaux dans lesquels ils sont évacués (figure 8a)¹³². Les composés de petites tailles possèdent des coefficients de diffusion très inférieurs à ceux des macromolécules. Ils vont donc diffuser du liquide A vers le solvant B. En revanche, les molécules les plus grosses resteront dans le flux A. L'efficacité de ce type de filtration dépend principalement de la longueur de la zone de filtration, de la vitesse du flux, et de la complexité du mélange¹³³.

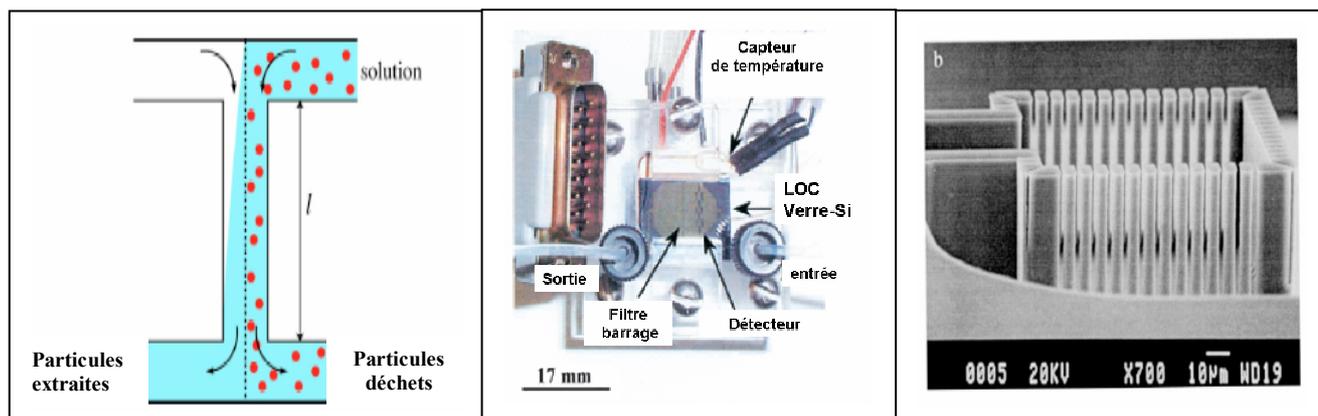


Figure 8 : a) Principe de filtration par diffusion utilisé dans les filtres H. b) Microsystème réalisé en plexiglas utilisant une filtration de type barrage (weir-filter). c) Photo MEB de filtre composé d'un réseau de piliers.

Des géométries complexes ont été réalisées sur silicium par gravure sèche ou humide afin de filtrer des globules rouges à partir du sang (figure 8b, 8c)^{134, 135}. Dans ce cas, la filtration est induite par la complexité de la géométrie du réseau structuré qui joue le rôle de filtre¹³⁶. L'équipe de Wilding intègre ces modules de filtration dans un microsystème associant des filtres de type « barrage » et une chambre d'amplification PCR. Le filtre permet de retenir et donc de séparer spécifiquement les globules blancs, des globules rouges à partir d'un échantillon sanguin. Cette purification permet d'éliminer l'hémoglobine contenue dans les globules rouges afin d'éviter qu'elle inhibe la réaction de PCR¹³⁷.

Très récemment, des architectures de type « barrage » exploitant une géométrie différente ont été réalisées sur verre. Dans ces travaux, les structures microfluidiques possèdent des profondeurs variables (de 6 μm à 37 μm). Les cellules sont alors piégées par étranglement. Cette technique a été validée sur des cellules carcinomateuses humaines qui ont été immobilisées, puis lysées dans un laboratoire sur puce¹³⁸. D'autres architectures de filtre, utilisant un maillage, un peignage, un cisaillement ou une percolation latérale ont également été décrit^{124, 139}.

A cause des problèmes d'obturation rapides des filtres à sélection de taille, des microstructures circulaires (disques compacts) utilisant la combinaison des forces centrifuges et capillaires ont été fabriquées¹⁴⁰. Bien que très efficace, le coût élevé de fabrication de ces structures limite leur potentiel.

Une des technologies les plus performantes à ce jour exploite une géométrie courbe des canaux microfluidiques. Dans cette technique, basée sur la force centrifuge et l'écumage du plasma (plasma-skimming), les cellules sont séparées en fonction de leurs densités et triées en aval dans différents canaux microfluidiques. Avec ce système, Blatter et ses collaborateurs ont extrait des cellules du sang avec un rendement de 95%^{141, 142}.

4.3.2.2 La séparation électrique de cellules

Plus simple à mettre en œuvre à l'échelle microscopique, le tri électrique exploite deux principes : l'électrophorèse de cellules chargées sous un champ électrique continu ou sous un champ alternatif. Cependant, beaucoup de cellules présentent des mobilités électrophorétiques voisines ce qui les rend difficilement différenciable sous un champ électrique continu. La diélectrophorèse utilise les propriétés diélectriques des cellules en présence d'un champ électrique alternatif (figure 9)¹⁴³. Ainsi, en sélectionnant correctement la fréquence d'échantillonnage, des bactéries¹⁴⁴, des cellules souches¹⁴⁵ ou des cellules cancéreuses^{146, 147} ont été séparées. Le composant Cytocon de chez *Evotec* est un exemple de microsystème commercial dédié à la manipulation de cellules par diélectrophorèse¹⁴⁸.

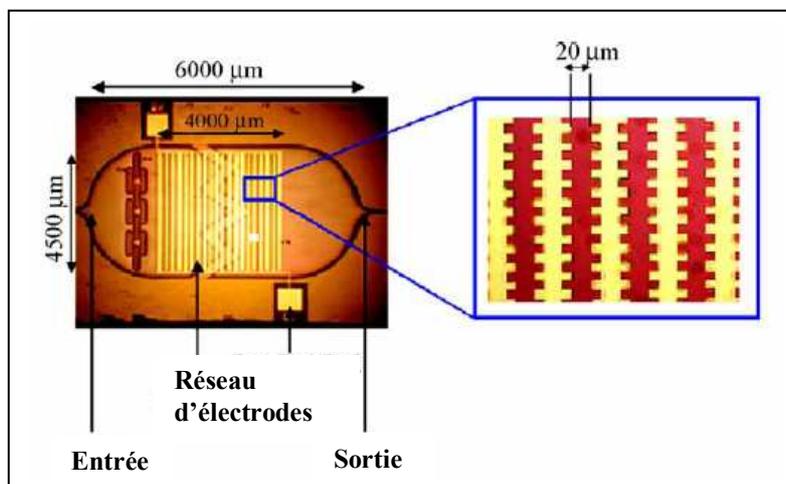


Figure 9 : Dispositif de diélectrophorèse en silicium avec un agrandissement de l'organisation des électrodes.

4.3.3 La sélection des cellules (« cell sorting »)

Dès lors que les cellules sont extraites, elles sont isolées sélectivement avant que leurs contenus ne soient étudiés. Cette sélection est facilitée au niveau microscopique par les géométries interconnectées des structures microfluidiques réalisées par photolithographie UV et gravure sèche ou humide. Cet arrangement permet un adressage spécifique de certaines cellules d'un canal principal vers un canal secondaire (figure 10).

Le guidage des cellules entre les canaux étant assuré soit par une pression hydrodynamique, soit par un flux laminaire ou électroosmotique ou électrophorétique, soit par diélectrophorèse¹²⁷. Cette méthode de sélection est souvent combinée avec un cytomètre en flux (dont le procédé est décrit dans le paragraphe suivant). L'équipe dirigée par Quake a ainsi fabriqué un système microfluidique de tri de cellules activées par fluorescence (μ FACS (figure 11b)). Ce dispositif leur a permis de sélectionner des cellules d'*Escherichia Coli* exprimant la GFP (green fluorescent protein)¹⁴⁹. Cette approche est d'autant plus intéressante que les bactéries ont été remises en culture avec succès. Afin d'obtenir un taux de survie cellulaire important, ce μ FACS a été amélioré afin d'être pilotable par des microvannes et des micropompes péristaltiques¹⁵⁰. Cette optimisation a permis de sélectionner des cellules de mammifères¹⁵¹.

Comme les commutations électriques sont quasi-instantanées, les cellules mobilisées par flux électroosmotique seront adressées plus rapidement que celles mobilisées par pression. Cependant, en fonction des structures ou des matériaux utilisés, l'application de champs électriques élevés génère des perturbations au niveau des interconnexions qui sont pénalisantes sur l'efficacité du tri. Dittrich et Schwille ont récemment développé un μ FACS combinant ces deux modes de triage. Les cellules sont mobilisées par pression hydrodynamique, tandis que la commutation entre les canaux de sortie est assurée électrocinétiquement par le biais d'un flux perpendiculaire¹⁵².

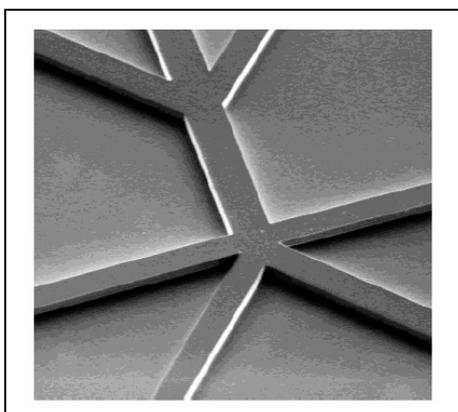


Figure 10 : Photo en microscopie électronique à balayage d'un réseau de canaux microfluidiques utilisés comme μ FACS.

Les dimensions des canaux sont : largeur : 25 μ m et profondeur : 7,6 μ m.

4.3.4 La cytométrie en flux

Cette technique évalue les caractéristiques physicochimiques des cellules en solution. Généralement, les cellules sont marquées avec des sondes fluorescentes afin d'être détectable. Dans les laboratoires sur puce, les cellules sont mobilisées et focalisées par flux électrophorétique¹⁵³, hydrodynamique¹⁵⁴, ou par l'air¹⁵⁵ et la fluorescence est excitée et collectée au niveau de la zone de détection. Le cytomètre mesure simultanément la fluorescence émise ainsi que la diffraction de la lumière pour chaque cellule (figure 11a)¹⁵⁶. Après avoir été caractérisées, les cellules sont sélectionnées par les méthodes décrites précédemment.

Différents laboratoires sur puce intégrant des cytomètres couplés avec des modules préparatifs ont été fabriqués (diélectrophorèse)^{154, 157}. Pour accroître la miniaturisation et la portabilité des cytomètres, il faut parvenir à simplifier les outils optiques utilisés. Lin a participé à plusieurs études dans lesquelles, il intégrait des composants optiques simples (fibres^{158, 159} ou guides optiques^{160, 161}) pour exciter et/ou collecter, la fluorescence ou les diffractions. Grâce à l'intégration optique, il devient facile de multiplier le nombre de sources d'excitation laser et de photodiodes focalisées sur une même zone de détection¹⁶².

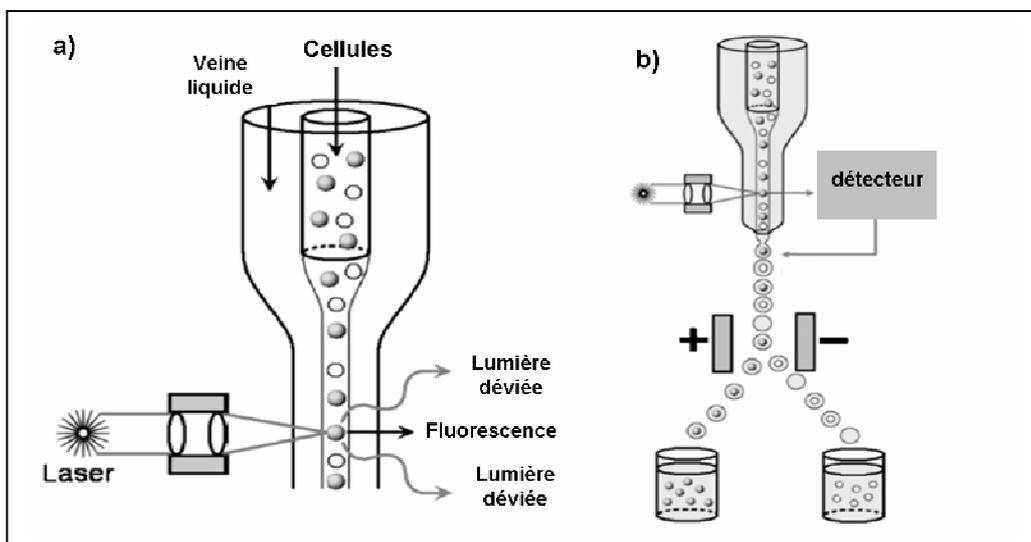


Figure 11 : Schéma d'un cytomètre en flux (a) et d'un FACS (b). a) Après avoir été confinées dans une zone étroite, les cellules marquées sont excitées individuellement par un laser focalisé sur la zone de détection. b) Après cette zone, les cellules sont triées électriquement dans des capillaires secondaires (échelle microscopique) ou encapsulées dans des gouttes vers des collecteurs (échelle macroscopique).

4.3.5 La lyse cellulaire

Une fois que les cellules désirées sont isolées, elles doivent être lysées pour qu'elles libèrent leurs constituants. Ces derniers doivent être ensuite séparés des débris membranaires résultant afin de garantir un bon rendement lors des analyses d'amplifications (ADN) ou de séparations sous-jacentes. Quatre différentes approches de lyses cellulaires sur puce ont été décrites : Des lyses chimiques, thermiques¹²⁷, électriques (électroporation) ou mécaniques (ultrasons, microstructures).

Conventionnellement, la bicouche lipidique des cellules est lysée chimiquement par le biais d'agents lytiques (SDS)^{163, 164}, ou d'enzymes (figure 12b). Cependant, cette technique est difficile à exploiter au niveau microfluidique, car elle provoque la dissolution membranaire des organelles. De plus, la présence résiduelle de surfactant dans le tampon de migration est préjudiciable à l'efficacité des analyses complémentaires qui pourraient être couplées¹⁶⁵. L'équipe de Yager a combiné le principe de diffusion décrit pour les filtres H avec une hydrolyse enzymatique¹³². Ainsi, ils ont extrait la β -galactosidase et validé leur technique de lyse avec un test enzymatique¹⁶⁶.

La lyse thermique a été testée sur puce par l'équipe de Grodzinski. Cependant, son utilisation reste limitée à l'extraction d'acides nucléiques, étant donné, que les protéines sont dénaturées lors de l'échauffement¹⁶⁷.

L'électroporation est une technique qui permet de perforer la membrane cellulaire afin de libérer des fragments d'ADN ou des petites molécules pharmaceutiques sous l'impulsion d'un champ électrique élevé (10 kV/cm). Le potentiel de cette méthode de lyse a été démontré dans des laboratoires sur puce fabriqués en silicium¹⁶⁸ ou en pyrex^{165, 169}. La lyse la plus rapide ayant été achevée en 33 ms par l'équipe de Ramsey (figure 12a)¹⁷⁰. Ce module de lyse fut ensuite intégré dans des microsystèmes couplant lyse cellulaire et électrophorèse capillaire combinées à une détection fluorescente induite par irradiation laser (LIF)¹⁷¹. D'autres laboratoires sur puce complexes intègrent un module de lyse par perforation et un module de diélectrophorèse¹⁷².

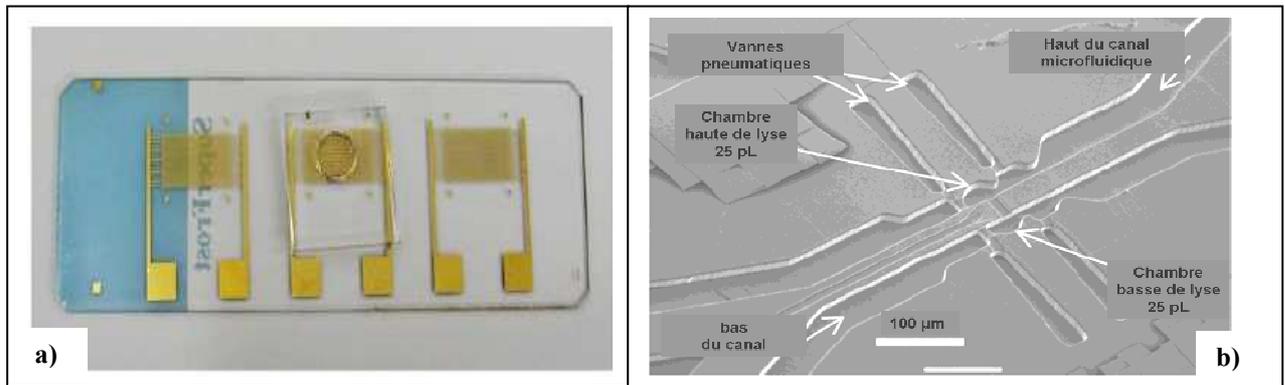


Figure 12 : a) Module de lyse par électroporation. b) Module de lyse chimique en PDMS intégrant des pompes pneumatiques.

La filtration mécanique est la dernière méthode de lyse intégrée dans les laboratoires sur puce. Elle est assurée par un réseau de micro-couteaux usinés par gravure sèche. Cette technique fut intégrée sur un microsystème capable de sélectionner et de lyser des cellules *HL60*, de purifier l'ARN messager (Acide RiboNucléique) extrait par chromatographie d'affinité, de le transcrire en ADN complémentaire, de l'amplifier par PCR avant de séparer les fragments amplifiés par électrophorèse capillaire en gel¹⁷³.

Des procédés de lyse utilisant des microsonicateurs intégrés dans des systèmes microfluidiques ont également été caractérisés^{57, 127}. Bien que cette approche possède une bonne efficacité, elle présente l'inconvénient de ne pas discriminer les organelles en vue d'analyses complémentaires.

4.3.6 L'extraction des molécules d'intérêt

Compte tenu du grand nombre de molécules contenues dans les cellules, il est nécessaire de les purifier afin d'extraire les molécules d'intérêt. Cette purification peut être effectuée via des membranes de dialyse sélectives en taille utilisées individuellement ou combinées (insérées entre 3 puces)¹⁷⁴.

Conventionnellement, l'extraction se fait plutôt entre deux phases liquides (une solution aqueuse et un solvant) en fonction de la miscibilité des composés. L'équipe de Kitamori fut la première à miniaturiser cette méthode d'extraction¹⁷⁵. Depuis, différentes approches ont permis d'améliorer la stabilité de l'interface liquide-liquide¹⁷⁶.

Des travaux récents exploitent une méthode d'extraction basée sur l'utilisation de particules magnétiques fonctionnalisées avec des sondes biotinylées. Cette approche leur a permis de reconnaître sélectivement des fragments d'ADN génomiques complémentaires à partir d'un lysat d'*Escherichia Coli*¹⁷⁷.

Les phases stationnaires utilisées en chromatographie ne sont pas dédiées exclusivement à la séparation de biomolécules, elles sont également utilisables lors d'étapes de purification. L'extraction en phase solide fonctionne par des interactions électrostatiques¹⁷⁸, des liaisons hydrogènes ou simplement par adsorption sur la silice¹⁷⁹. Tian et ses collaborateurs privilégient l'utilisation de billes de silice exploitant des interactions par adsorption. Ils ont démontré la qualité de leur purification en détectant, après amplification, des fragments des gènes BRCA1, BRCA2 et β -globine extraits à partir de globules blancs ou de culture cellulaire¹⁷⁹. En variant les types d'interactions, il est possible d'ajouter des étapes de lavage, avant de décrocher les composés purifiés de la phase stationnaire, de sorte à améliorer la pureté du produit recherché¹⁸⁰.

4.3.7 L'amplification PCR

Cette méthode est la plus fiable pour augmenter sélectivement la quantité de gènes disponibles. Elle permet l'amplification exponentielle des gènes à partir de deux amorces grâce à une série de réactions itératives. Ces réactions de dénaturation, hybridation et élongation ont lieu à 3 températures distinctes. Bien qu'intéressante, cette méthode possède certaines limites au niveau macroscopique (transfert de température lent entre tubes et échantillons, grand volume consommé, durée d'analyse) qui peuvent être considérablement réduites à l'échelle des laboratoires sur puce. Le premier système PCR intégré a été développé en 1993 par Northrup et ses collaborateurs sur une puce d'un mm^2 ¹⁸¹. Le chauffage était assuré par un «régulateur thermique» (thermocycler) en polysilicium fabriqué par gravure anisotropique. Cette structure était chauffée à 15°C par seconde et le temps des cycles était d'environ 1 minute (4 fois plus rapide qu'une amplification traditionnelle)¹⁸². Depuis des efforts considérables ont été mis en œuvre pour améliorer ces modules^{57, 110, 183, 184}. Il est ainsi possible de trouver des composants PCR fabriqués sur un grand nombre de matériaux : silicium¹⁸⁵, polycarbonate¹⁸⁶, PMMA (PolyMethylMethAcrylate)¹⁸⁷, Poly(cyclolefin)¹⁸⁸, PDMS¹⁸⁹, verre-PDMS¹⁹⁰, substrat flexible (verre-polyester)¹⁹¹, verre¹⁹² ou verre-silicium¹⁹³.

En général, les microsystèmes PCR sont dissociés en deux catégories selon le processus d'amplification utilisé. Si ce procédé est stationnaire, la réaction a lieu dans un microréacteur avec un «régulateur thermique» (figure 13a). Si la réaction a lieu en mouvement, l'échantillon à amplifier est pompé de manière répétée entre trois zones de température fixe correspondant aux différentes étapes du processus d'amplification (figure 13b)¹⁹⁴.

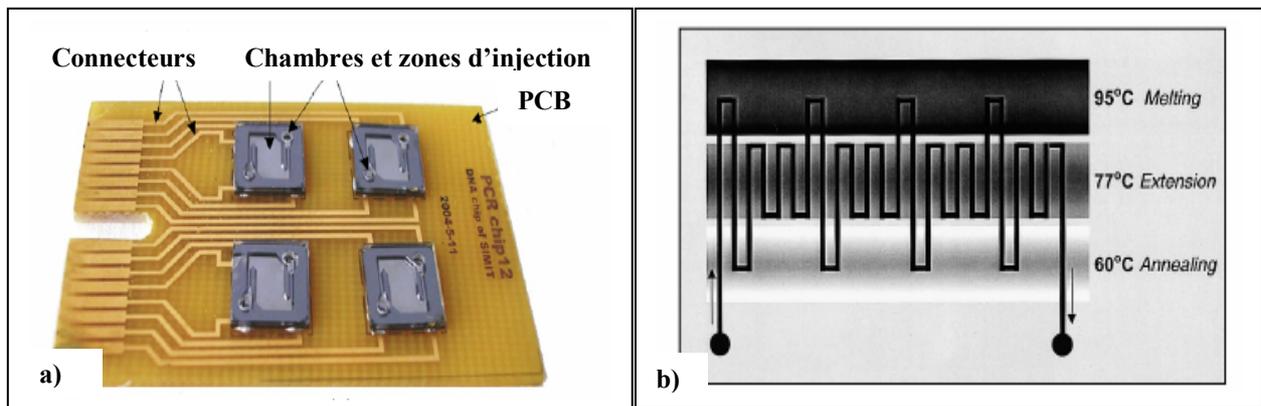


Figure 13 : a) Module PCR fabriqué en verre-Silicium avec un régulateur thermique fixe. b) Illustration d'un système PCR en flux. Les 3 zones de couleurs différentes correspondent aux 3 zones de température.

Les modules d'amplification PCR sont fréquemment retrouvés au sein de microsystèmes complexes. Ils peuvent être intégrés avec des étapes analytiques de préparation^{187, 192, 195} ou de séparation d'échantillon^{186-188, 192}. Des modules microfluidiques^{188, 192, 195} ou des composants optiques¹⁹³ ont été également complexés avec cet type de module analytique. L'équipe de Zia a développé un analyseur complet combinant le microsystème, ainsi que le système portable de lecture¹⁸⁵.

A ma connaissance, les laboratoires sur puce commerciaux les plus achevés ont été mis au point par Affymetrix, dans le cadre d'une recherche menée par Anderson et ses collaborateurs (figure 14a)¹⁹⁶. Ces microsystèmes dédiés à l'analyse du virus HIV intègrent l'extraction de l'ARN, la transcription inverse en ADN complémentaire, l'amplification PCR, la fragmentation et la déphosphorylation enzymatique, le marquage des amplicons et leurs dilutions et l'hybridation, ainsi que la coloration à la phycoérythrine accompagnée des étapes de lavage associées. Ce laboratoire sur puce combine ainsi 60 opérations séquentielles. Au niveau des laboratoires académiques, Burns et ses co-auteurs présentent dans la revue Science, un microsystème intégrant des injecteurs, un micromélangeur et des vannes de contrôle de fluide, une chambre de réaction PCR à température variable couplée à un système de séparation par électrophorèse capillaire en gel et un photodétecteur à fluorescence (figure 14b)¹⁹⁷.

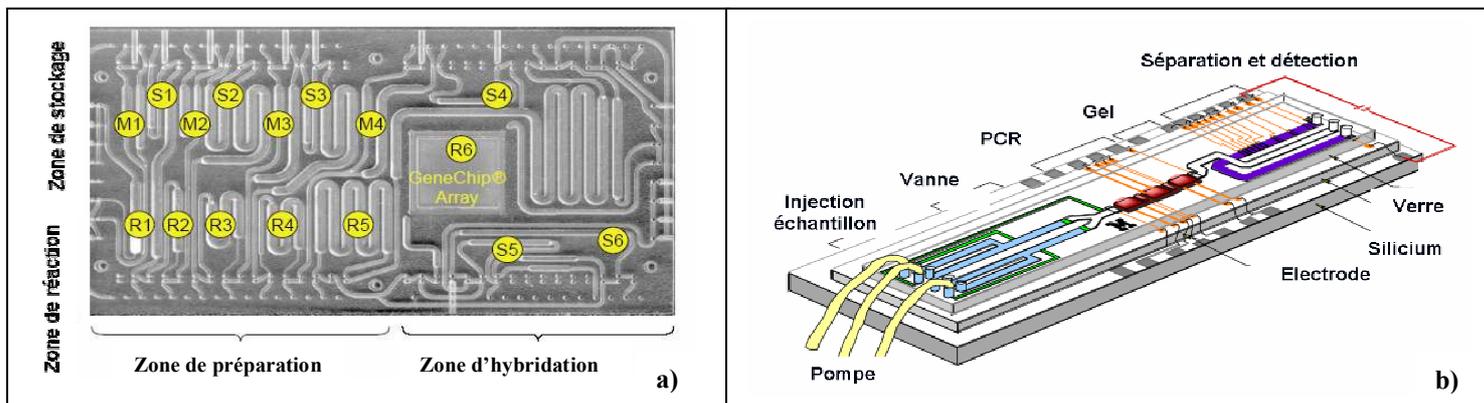


Figure 14 : a) Microsystème de dosage HIV mis au point par Affymetrix. Les modules M1-4 représentent les chambres de stockage intermédiaire. R1-6 sont les chambres de réactions et S1-6 sont les chambres de stockage des réactifs. b) Microsystème développé par Motorola.

4.3.8 Le séquençage

Le séquençage permet de décoder les acides nucléiques composant une séquence génétique. Cette étape intervient fréquemment en aval d'une séparation d'amplicons par électrophorèse afin d'identifier ou de confirmer la séquence nucléotidique d'un gène recherché. Depuis le projet de séquençage du génome humain, des besoins en décryptage rapide et hautement résolutif de séquences sont apparus. Plusieurs travaux de séquençage sur puce sont décrits dans la littérature^{57, 198}. Une grande variété de polymère de séquençage (polymère d'acrylamide, polyéthylène oxyde, dérivé de cellulose...) a été caractérisée¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Le meilleur rendement de séquençage fut obtenu en 9,2 minutes pour 500 paires de base²⁰¹. Tandis que le plus haut degré d'intégration était de 96 capillaires en parallèle permettant de séquencer 1200 bases par heure et par canal²⁰².

4.4 Les méthodes de détection

4.4.1 La spectrométrie de masse

On distingue deux types de spectromètres de masse couplés à des microsystèmes : les ESI-MS (Electrospray ionization mass spectrometry)²⁰³ fonctionnant avec un nanospray intégré sur la puce ou les systèmes MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry)^{115, 204-206}. En MALDI-MS, l'énergie transmise par une irradiation laser (UV ou IR), provoque la relaxation en phase gaz de la matrice supportant les molécules échantillons, les entraînant dans un nuage gazeux. Dans cette phase, les ions formés migrent sous l'implication d'un champ électrostatique vers le détecteur. En général, les spectromètres de type MALDI-MS sont couplés avec des analyseurs en temps de vol (TOF). Les analyses avec les spectromètres ESI-MS permettent un plus haut degré d'intégration que les couplages en MALDI-MS, du fait que les nanosprays peuvent être fabriqués directement en sortie des canaux microfluidiques. Cependant, bien que la réalisation d'interfaces entre des microsystèmes et des spectromètres aient été démontrée sur différents matériaux, ces composants doivent être améliorés afin que le nanospray soit suffisamment stable pour permettre des analyses de routine.

4.4.2 Les méthodes de détection optique

4.4.2.1 La détection en Ultra-violet (UV)

Bien que la détection UV soit fréquemment utilisée en électrophorèse capillaire macroscopique pour détecter des protéines, des ions, des produits pharmaceutiques ou des gènes, son application est beaucoup plus rare dans les laboratoires sur puce²⁰⁷. En effet, bien qu'étant versatile et facile à utiliser, elle possède le désavantage, de fournir des limites de détection relativement faible à cause des dimensions des canaux²⁰⁸. De plus, toutes les molécules (ions, carbohydrates) ne possèdent pas les liaisons π nécessaire à l'absorption de la lumière aux longueurs d'onde ultraviolettes (254 nm, 488 nm)²⁰⁹. Malgré ces limites, la détection UV est utilisée selon deux approches dans les LOC : soit au travers d'un système de microscopie couplée à une excitation laser^{164, 210} ou à une lampe au deutérium^{211, 212}, soit par le biais de composants optiques intégrés.

Ces composants peuvent être d'une part, des guides d'onde fabriqués en polymère (PDMS, résine SU-8)²¹³ ou silice sur silicium²¹⁴ ou d'autre part, des fibres optiques en quartz

insérées dans le substrat^{215, 216}. Tandis que les guides d'onde croisent perpendiculairement les canaux microfluidiques dans le plan, les fibres optiques sont plutôt positionnées à la verticale du substrat. Compte tenu des faibles concentrations détectables par absorption, de nouveaux outils ont été développés pour améliorer la sensibilité de cette méthode. Ainsi, Salimi-Moosavi et ses collaborateurs ont réalisé une cellule de multi-réflexion en piégeant un canal microfluidique entre deux miroirs en aluminium²¹⁷. D'autres laboratoires ont conçus une fente optique sur un microsystème en quartz pour optimiser le rapport signal sur bruit. Cette fente fabriquée par dépôt de SiO₂/Si bloque 70 % des rayons incidents non utilisés permettant ainsi d'amoinrir l'éblouissement provenant de la source d'excitation²¹⁸.

4.4.2.2 La détection par fluorescence

La fluorescence induite par irradiation laser (LIF) résulte de l'émission optique de molécules excitées à des hauts niveaux d'énergie par absorption de photons. Lors de cette transition, les molécules absorbent l'énergie apportée par les photons afin de permettre aux doublets électroniques de passer dans un état excité. En général, cet état excité est relativement court (quelques nanosecondes) et peut s'accompagner de changements de conformation moléculaire. Afin de pouvoir retourner à l'état basal, la molécule excitée réémet un photon. Suite à des déperditions thermiques ou des transferts intermoléculaires pendant la période de transition, une partie de l'énergie acquise est dissipée. Le photon réémis possède donc une énergie plus faible que le photon exciteur. Ce qui correspond, par conséquent, à une émission à des longueurs d'onde plus élevées. Du fait de sa sensibilité, de sa sélectivité et de sa simplicité d'utilisation, la détection par fluorescence induite par une source laser reste la méthode de prédilection en électrophorèse capillaire²¹⁹. Grâce aux dimensions des capillaires ou des canaux microfluidiques, aux faibles volumes injectés et à la capacité de focaliser une source laser sur une petite zone, des concentrations molaires de l'ordre de la centaine de fM ont pu être détectées^{220, 221}.

Traditionnellement, dans les laboratoires sur puce, la mise en œuvre de la détection par fluorescence se fait par microscopie confocale²²². Cette microscopie confocale possède une meilleure résolution que la microscopie à fluorescence conventionnelle. En effet, elle s'affranchit des pertes de résolution induites par une émission de fluorescence défocalisée en n'enregistrant l'image de la fluorescence émise seulement selon un plan. Les rayons excitateurs réfléchis ainsi que les signaux fluorescents provenant d'autres plans

sont donc éliminés ce qui permet d'améliorer considérablement le rapport entre l'intensité du signal fluorescent et le bruit.

Dans les microscopes confocaux, l'excitation lumineuse (laser ou lampe à vapeur de mercure) est rendue divergente par une lentille. Elle est ensuite orientée par un miroir dichroïque, au travers d'un objectif de microscope, sur le substrat. L'objectif de microscope jouant le rôle d'une lentille convergente. Les rayons incidents vont donc exciter l'échantillon selon différents plans. La fluorescence émise, ainsi que la source excitatrice réfléchiée sont collectées, verticalement, par une seconde voie, au travers du même objectif.

De ces rayons lumineux, seuls ceux provenant du plan focal pourront traverser le diaphragme confocal présent en amont du photodétecteur. Enfin, un filtre optique est placé entre ces composants afin d'éliminer spécifiquement les longueurs d'ondes d'excitation (λ_{exc}) (figure 15).

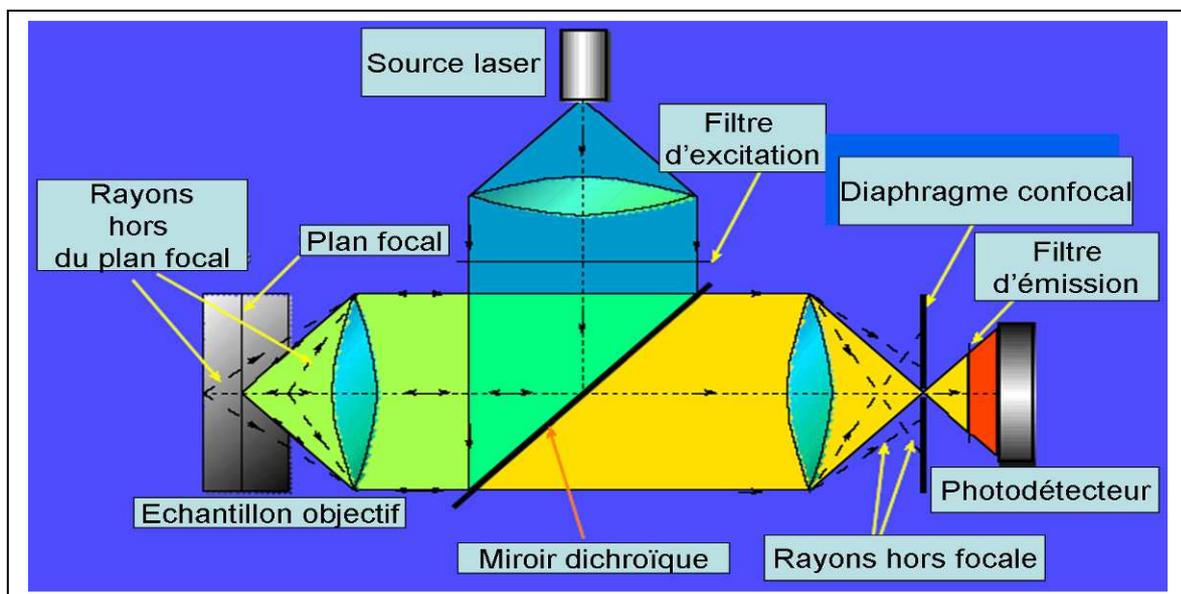


Figure 15 : Représentation schématique et simplifiée d'un microscope confocal. Le faisceau vert correspond au rayon laser incident. Les rayons orange représentent la fluorescence et les réflexions lasers. La fluorescence filtrée est visualisée en rouge après le filtre d'émission.

Bien que très efficace, la microscopie confocale n'en n'est pas pour autant triviale. En effet, comme le font remarquer Johnson et Landers, un tel système est difficile à assembler si l'on n'est pas expert en optique ou en mécanique²²⁰. Par ailleurs, en dépit du nombre d'articles utilisant cette méthode, Il est difficile de trouver tous les détails permettant un assemblage complet de ce dispositif²²⁰. Dans le but de solutionner ce problème, de réduire les coûts engendrés par un tel dispositif optique et d'améliorer la portabilité, des approches alternatives ont été mises au point. Grâce au développement des technologies de la microélectronique, un certain nombre de composants optiques ont pu être intégrés sur

puce et couplés avec des canaux microfluidiques. Ainsi, l'utilisation de guides d'onde ou de fibres optiques a été rapportée pour propager la lumière laser ou collecter la fluorescence émise.

Au travers des guides optiques, l'excitation laser peut être propagée perpendiculairement^{160, 214, 223-226}, colinéairement ou dans le canal microfluidique²²⁷. Dans le cadre d'une illumination colinéaire, l'excitation de la fluorescence s'opère soit directement par un faisceau laser incident²²⁸ soit par les pertes évanescentes issues d'un mode guidé^{229, 230}. Pour que le guidage puisse avoir lieu dans le canal, le capillaire est fabriqué dans un matériau dont l'indice de réfraction de la lumière est inférieur à celui du liquide en solution²²⁷. Il est intéressant de remarquer que ces guides optiques sont plus fréquemment utilisés pour collecter la fluorescence émise. Dans ce cas, l'excitation lumineuse est acheminée par microscopie confocale²²³ ou verticalement (par rapport au substrat) par un laser fibré²³¹. Seulement quelques travaux ont expérimenté en simultanément le guidage de la source d'excitation et la collection de la fluorescence^{160, 224, 232, 233}. La plupart intègre une seule des deux voies optiques.

Etant donné que l'utilisation des guides d'onde peut nécessiter des systèmes d'alignements micrométriques pour coupler guides optiques et laser fibré, plusieurs chercheurs proposent d'insérer directement les fibres optiques dans le substrat^{159, 162, 193, 234-241}. Afin d'améliorer d'une part, la qualité du couplage entre les lasers fibrés et les guides optiques et, d'autre part, la qualité de la détection en fluorescence, des V-grooves²²⁵, des guides à jonction conique (Tapers)²²⁴ et des microlentilles ont été fabriqués dans les laboratoires sur puce^{161, 242-245}.

Pour permettre d'assurer une distribution de la lumière laser localisée en différent point du substrat des jonctions Y^{224, 246, 247} ou des prismes ont également été caractérisés^{239, 248}. A l'inverse, si l'on souhaite collecter dans un seul guide, la lumière issue de 2 guides optiques adjacents, des coupleurs ont été mis au point²³⁹. Enfin, la miniaturisation des composants optiques dans les laboratoires sur puce, peut-être étendue en remplaçant les lasers par des diodes lasers microfluidiques^{232, 249, 250}, organiques²⁵¹ ou à semi-conducteurs^{203, 240, 252, 253}, et les photodétecteurs par des photodiodes semi-conductrices^{193, 254}, à avalanche^{240, 255} ou organiques²⁵⁶. Bien que très avantageuse, cette méthode de détection par fluorescence nécessite des conditions expérimentales particulières.

Naturellement, beaucoup de composés ne sont pas fluorescents, il faut donc les modifier chimiquement avec un fluorophore organique pour les rendre détectable. Cette étape de marquage est contraignante car le choix du fluorophore impose les longueurs d'onde d'excitation et de détection à utiliser, et par conséquent le choix du laser et des filtres optiques. De plus, le marquage en Cy3 risque de générer plusieurs sous-produits possédant des quantités variables de fluorophores par protéine.

4.4.3 La détection électrochimique

Pour éviter d'avoir à modifier les molécules à analyser d'autres méthodes de détection ont été intégrées dans les laboratoires sur puce.

Les méthodes électrochimiques offrent plusieurs avantages en comparaison à la détection fluorescente. Tout d'abord, elles possèdent une bonne sensibilité et cela sans avoir à modifier les molécules. Ensuite, la taille, le type et la position des électrodes peuvent être contrôlés précisément grâce aux technologies de la microélectronique^{257, 258}. Enfin, le coût de l'instrumentation nécessaire aux techniques électrochimiques est nettement inférieur à celui des autres méthodes de détection.

On distingue trois modes électrochimiques : l'ampérométrie, la conductimétrie et la potentiométrie.

L'ampérométrie consiste à mesurer une variation d'intensité en fonction du temps sous l'application d'un potentiel constant au niveau d'une électrode de travail. Il est ainsi possible de suivre l'oxydation ou la réduction d'un composé au cours du temps²⁵⁹. L'intensité détectée en sortie étant proportionnelle à la concentration des espèces en présence.

La conductimétrie, quant à elle, revient à mesurer une différence de potentiels électriques lors du contact direct ou indirect d'un composé avec une électrode de travail²⁶⁰. Cette méthode est bien adaptée pour détecter des ions de petites tailles.

En potentiométrie, la différence de potentiel électrique est mesurée au niveau d'une membrane semi-perméable aux ions en comparaison à une électrode de référence. Cette méthode bien que peu sensible, reste cependant intéressante pour étudier des ions difficilement détectables avec les autres méthodes.

4.4.4 Les méthodes moins conventionnelles

Hormis les méthodes de détection préalablement citées, d'autres outils ont été caractérisés pour exciter et/ou détecter des molécules séparées. Ces différentes méthodes sont résumées dans la revue de Viskari et Landers publiées récemment²⁶¹. Comme chaque liaison chimique possède une fréquence de vibration et de rotation propre, des mesures en spectroscopie infrarouge ou en spectroscopie Raman ont été couplées à des méthodes de détection quantitatives. Ainsi, des informations chimiques, structurales, ou réactionnelles peuvent être obtenues en complément d'un électrophérogramme^{252, 261}.

Récemment, un microsystème couplé avec une détection en spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) a été fabriqué pour identifier des composés de structures moléculaires inconnues. Sous l'influence d'un champ électromagnétique oscillant externe, les noyaux des atomes émettent et absorbent des radiations en fonction de leur environnement. Ils génèrent ainsi des informations chimiques, électroniques et physiques spécifiques. Bien qu'avantageuse, cette méthode de détection est l'une des moins sensible.

Comme la résonance plasmonique de surface est une méthode de choix pour étudier les interactions moléculaires en temps réel, des scientifiques ont miniaturisé ce processus de détection pour simplifier les analyses de puces à ADN ou à protéines²⁶¹.

Enfin, une méthode de détection innovante connaît un intérêt croissant depuis quelques années²⁵². Cette méthode, appelée « Thermal Lens Microscopy » (TLM), utilise l'absorption de la source d'excitation par des molécules présentes en solution²⁶². Précédemment, nous avons vu que lorsque les molécules sont excitées, elles perdent de l'énergie sous forme thermique ce qui conduit à une élévation localisée de la température. Cet échauffement s'accompagne d'une modification locale de l'indice de réfraction du liquide provoquant une focalisation optique. Ce phénomène est appelé « Thermal lens effect »²⁶¹. L'équipe de Kitamori a pu ainsi réaliser une sélection chirale à l'aide de dispositif TLM. Pour permettre cette étude, ils ont couplé les sources excitatrices de leur microscope avec un modulateur de phase de manière à sélectionner les molécules par dichroïsme circulaire²⁶³.

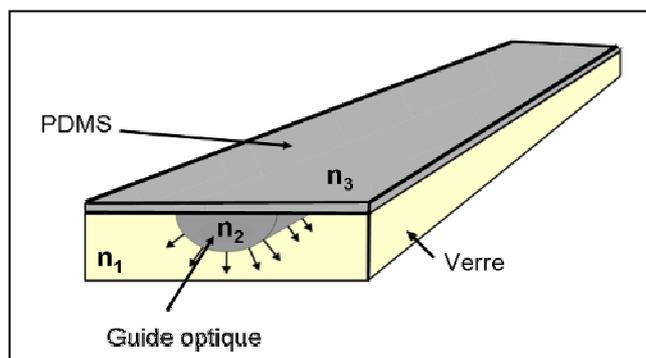
5 Fabrication des laboratoires sur puce

Les laboratoires sur puce que nous réalisons, au LEOM, intègrent d'une part des guides optiques pour exciter et collecter la fluorescence émise ; et, d'autre part, des canaux microfluidiques. Dans ce chapitre, nous décrirons les méthodes de fabrication que nous avons utilisées pour concevoir les microsystèmes séparatifs, tant au niveau de l'optique intégrée, qu'au niveau des structures microfluidiques.

5.1 La fabrication des guides optiques

Les guides d'onde sont des conduits optiques qui permettent l'acheminement de la lumière dans une zone où elle ne peut pas être directement implantée. Le confinement de la lumière est assuré par réflexion totale à l'intérieur du composant (figure 16). Pour permettre ce guidage, il est nécessaire que l'indice de réfraction de la lumière (n_2) à l'intérieur du guide soit supérieur aux indices environnants (n_1 , n_3). Différentes approches ont été décrites dans la littérature pour garantir une modification de l'indice de réfraction utilisable dans différentes zones spectrales (ultra-violet²⁶⁴, visible^{224, 226, 247} ou infrarouge^{265, 266}). Les guides optiques couplés aux canaux microfluidiques peuvent être fabriqués sur des substrats en silicium, verre^{224, 264, 267} ou polymère^{226, 227, 265, 268} soit par échange d'ions^{266, 269}, par dépôt en phase vapeur (CVD)²⁶⁷, par dépôt en hydrolyse à la flamme (FHD)²²⁴, par dépôt en pulvérisation cathodique assistée par plasma (PECVD)²⁴⁷, par gravure laser à ultra-courte interaction (femtosecond SLW)²⁷⁰, soit par gravure par projection de proton (Beam Proton Writing)²⁶¹. Une dernière approche intéressante, décrite par Lee et Mogensen, propose de réaliser le guidage optique pas dépôt rotationnel (Spin-On-Glass) d'un polymère organique (SU-8)^{160, 264}.

Figure 16 : Schématisation d'un guide optique. Pour que le guidage fonctionne en réflexion totale, il faut que l'indice de réfraction du guide (n_2) soit supérieur aux indices de réfractifs environnants (n_1 , n_3).



En comparaison avec les autres méthodes de fabrication, l'échange d'ions apporte deux avantages. D'une part, les sections, ainsi fabriquées, sont semi-circulaires ce qui facilite le couplage avec des fibres optiques. Et d'autre part, il assure une transition douce de l'indice de réfraction, entre le guide et le substrat, ce qui diminue les pertes lors du guidage.

Au LEOM, les laboratoires sur puce que nous développons intègrent des guides d'ondes réalisés par A. Bouchard à l'institut de Microélectronique, Electromagnétisme et Photonique (IMEP-INPG), dans le cadre d'une collaboration. Ces composants optiques sont réalisés par, échange d'ions, sur des substrats en verre sodocalcique (riche en sodium). L'ensemble des étapes de fabrication de ces guides optiques est résumé dans la figure 17.

Les substrats en verre sont tout d'abord dégraissés dans un bain d'acétone sous agitation ultrasonique, les contaminants organiques résiduels sont ensuite détruits par un traitement chimique de type piranha (H_2O_2/H_2SO_4 1/3). Ce traitement permet également d'activer la surface des canaux en formant des groupements silanols. Si ces traitements sont jugés insuffisants, quelques couches atomiques peuvent être éliminées de la surface par le biais d'un plasma à oxygène. Après le nettoyage du substrat, une couche protectrice d'aluminium de 400 nm est déposée par évaporation, puis, un film additionnel de résine photosensible est étalé par rotation (tournette). La résine est ensuite insolée par photolithographie UV au travers d'un masque pour ouvrir une fenêtre de 10 μm de largeur correspondant à la taille initiale du guide optique. Après le développement de la résine, l'aluminium est gravé chimiquement afin de définir la géométrie des guides. L'échange d'ions s'opère à 380 C dans un four à diffusion. Le substrat est alors immergé dans un bain contenant des sels fondus (nitrate de potassium) sur une durée pouvant aller de 4 à 192 heures selon la profondeur souhaitée. Un échange entre les ions potassium du bain et les ions sodium du verre s'effectue alors à la surface par équilibre électrochimique modifiant localement l'indice de réfraction de la lumière. L'aluminium résiduel est ensuite éliminé et les extrémités du verre sont polies pour permettre un couplage efficace des guides avec des fibres optiques.

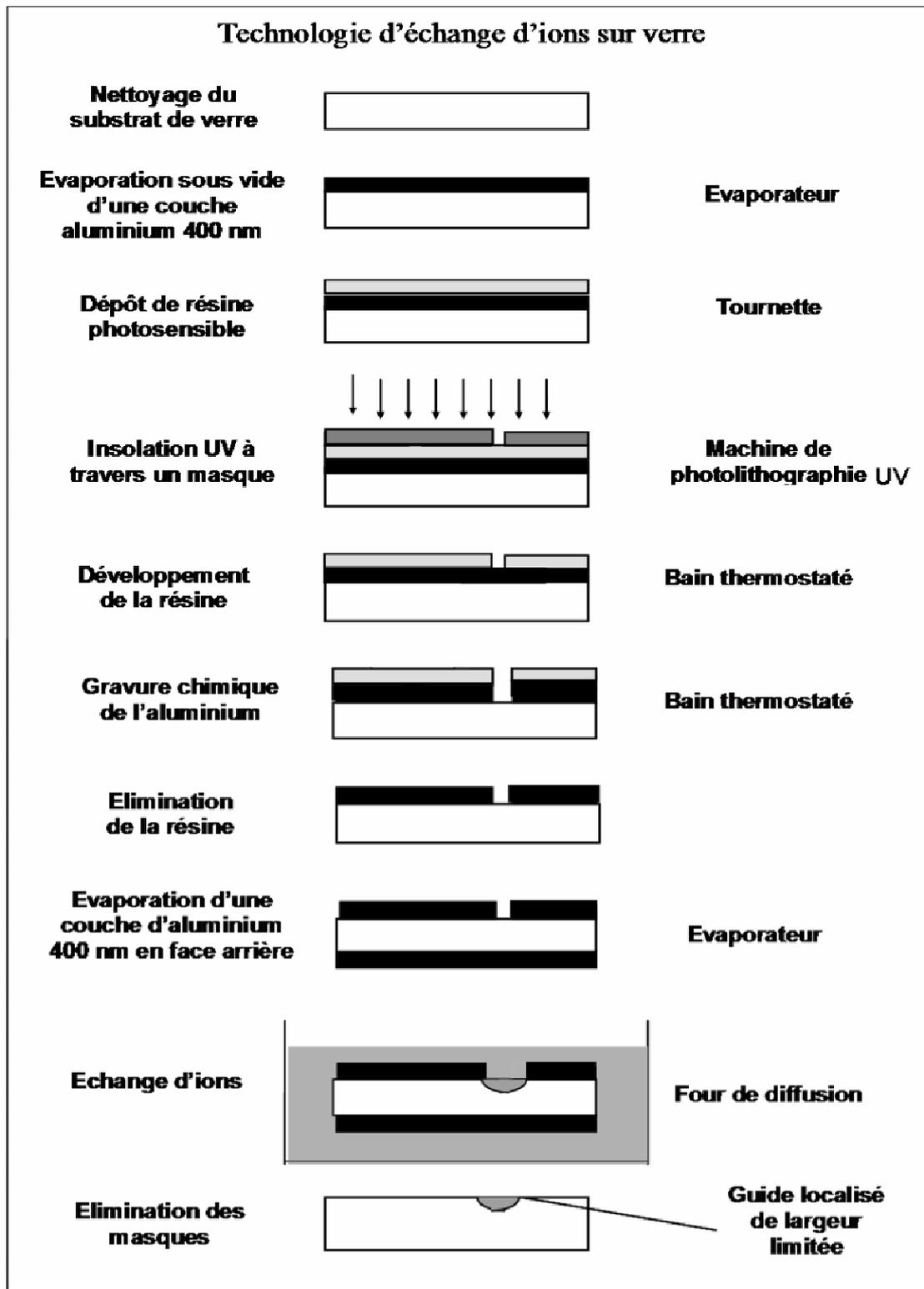


Figure 17 : Description détaillée des étapes utilisées au cours de la réalisation des guides optiques par échange entre les ions sodium du verre et les ions potassium du bain en présence.

Cette technique de fabrication est intéressante car elle est simple à mettre en œuvre et peu onéreuse. Ainsi, nous avons intégré des composants optiques simples allant de $2\ \mu\text{m}$ à $40\ \mu\text{m}$ de diamètre (figure 18a), mais également des structures optiques plus complexes.

Dans le but d'améliorer la qualité du couplage entre les fibres optiques d'excitation et les guides de lumière, nous avons demandé à l'IMEP-INPG de réaliser des guides possédant des extrémités profilées coniques (tapers) (figure 18b). Ce composant peut également être utilisé en contact avec le canal microfluidique afin d'augmenter la quantité de fluorescence collectée.

Pour permettre la distribution de la lumière laser dans nos microsystèmes, afin d'exciter différentes régions ou différents canaux simultanément, l'IMEP-INPG a également conçu des guides possédant une jonction en Y (figure 18c).

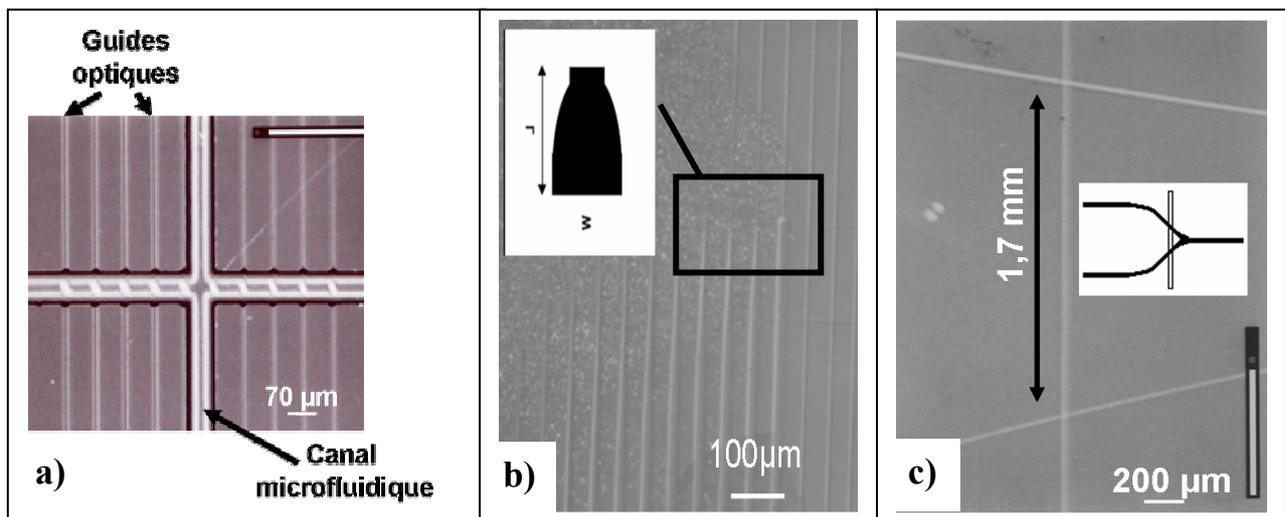


Figure 18 : a) Série de guides simples perpendiculaires au canal de séparation. b) Guides possédant des « tapers ». c) Guide intégrant une jonction Y.

Dans le cadre d'une collaboration avec le groupement d'Electromagnétisme Expérimental et d'Optoélectronique (GeeO), un autre type d'échange d'ions a été proposé. Cet échange fait intervenir, sous l'application d'un champ électrique, des ions argent présents dans un substrat en verre particulier et des ions sodium présents dans le bain de sels fondus. Cette diffusion des ions provoque l'enterrage des guides dans le substrat au lieu de les conserver en surface (figure 19). Le guidage, ainsi obtenu est de meilleure qualité. Cependant, le coût des substrats est plus élevé et la durée du processus est plus longue ce qui rend l'intérêt de cette approche limitée.

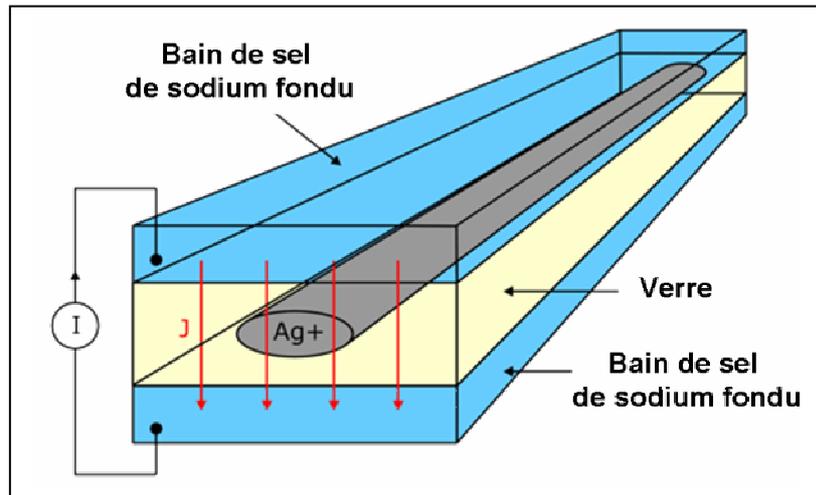


Figure 19 : Fabrication d'un guide optique enterré par échange entre les ions Na^+ de la solution et les ions Ag^+ du verre.

Après que les guides de lumière aient été fabriqués à l'IMEP, les substrats sont envoyés au LEOM afin que les structures microfluidiques soient usinées.

5.2 La fabrication des structures microfluidiques

Comme nous pouvons le constater au travers des différents modules décrits précédemment, les circuits microfluidiques peuvent être fabriqués en silicium, verre ou polymère. Le choix du matériau étant régi par l'application visée⁹³. Par exemple, le silicium est un matériau dont les méthodes d'usinage sont très bien maîtrisées. Mais, il possède quelques inconvénients majeurs. Il est opaque à la lumière visible, il ne permet pas le transport de solutions alcalines et il manque d'isolation électrique, ce qui rend son exploitation en électrophorèse capillaire couplée à une détection par fluorescence impossible²³⁴.

Le verre, quant à lui, est un conducteur ionique à très faible conduction, il est transparent dans l'UV et le visible, et il est très résistant aux agressions chimiques^{271, 272}. Malheureusement, cette résistance impose l'usage de composés chimiques très agressifs (acide fluorhydrique) pour graver les canaux microfluidiques²⁷¹. Etant donné qu'il existe, un grand nombre de procédures de gravure humide (mélange réactionnel, type de verre, taux d'impuretés, température...), il est difficile de comparer les résultats que nous obtenons avec la littérature^{234, 273}.

Parallèlement à ces deux matériaux, les polymères connaissent un intérêt grandissant depuis plusieurs années. En effet, ils sont simples à fabriquer, et peu coûteux. Certains polymères comme le PDMS ou le PMMA sont biocompatibles, imperméables aux solutions

liquides et transparents dans l'UV et le visible. De plus, le PDMS possède de très bonnes résistances aux agressions chimiques ou mécaniques²⁷⁴.

Les microsystèmes en polymères sont principalement fabriqués par moulage à chaud (le moule possédant la géométrie inverse à la structure que l'on souhaite réaliser)^{93, 275, 276}, par injection ou par ablation laser^{277, 278}.

Le verre et le silicium, quant à eux, utilisent les mêmes outils de fabrication^{93, 276}. Ces technologies d'usinage reposent sur le dépôt d'une résine photosensible sur le substrat et sur l'utilisation d'un masque possédant la géométrie voulue^{58, 274}. L'insolation de cette résine, par photolithographie UV, permet de transférer le motif présent sur le masque vers la résine. La géométrie est ensuite transférée sur le substrat par gravure ionique^{279, 280, 281}, ou chimique^{272, 273}, par ablation laser²⁷⁹, par sablage (powder blasting)^{282, 283} ou par sciage diamanté^{284, 285}. Le sablage est une technique d'élimination mécanique des particules de substrat. Des particules d'un matériau dur sont projetées, sous pression au travers d'une aiguille, directement sur le substrat à usiner.

Compte tenu des procédés utilisés, ces technologies de gravure du silicium et du verre sont peu flexibles, étant donné que la géométrie des canaux est imposée par le dessin du masque. Or, ces masques sont chers et le nombre de leurs utilisations est limité⁵⁸.

Des méthodes alternatives ingénieuses ont été décrites pour remplacer les masques en verre. Par exemple, si l'on souhaite réaliser un canal microfluidique dans un substrat en verre, il suffit d'utiliser un moule en PDMS possédant un canal gravé comme masque. La surface du canal en PDMS est collée sur le substrat à usiner. Comme le PDMS est résistant aux solutions modérées de gravure du verre, il est possible de faire circuler cette solution dans le canal en PDMS. Ainsi, le verre en contact sera gravé selon la géométrie du moule²⁷³.

Une méthode de fabrication hors salle blanche exploitant les propriétés du micro-tamponnage a été mise au point par Hannes et Cabrerra au LEOM. Cette technologie, compatible avec plusieurs matériaux, utilise un tampon en PDMS possédant le motif que l'on souhaite transférer. Ce tampon est ensuite recouvert d'une solution de thiols que l'on va venir déposer (ou tamponner) à la surface de l'échantillon. Comme ces fonctions thiols résistent aux solutions de gravure, les zones non recouvertes sont gravées chimiquement. Les thiols ainsi déposés interviennent en remplacement de la résine photosensible, éliminant l'étape de photolithographie UV.

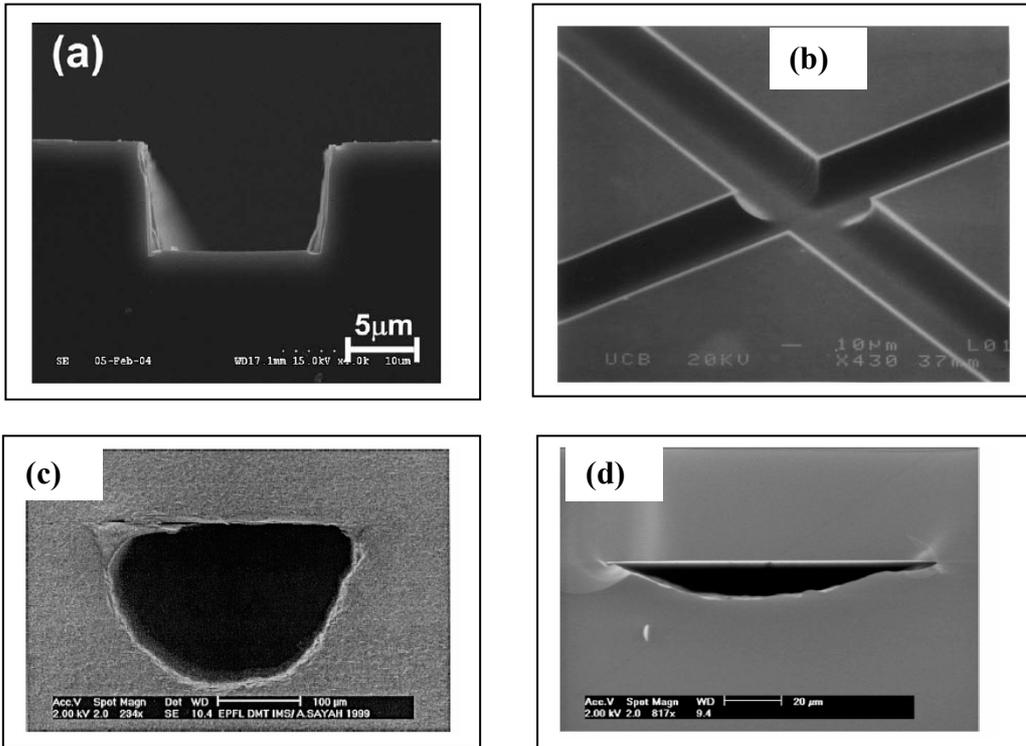


Figure 20: Photos MEB des canaux microfluidiques fabriqués en verre par gravure ionique (a), ou chimique (b), par sciage (c) et par sablage (d).

Au LEOM, nous fabriquons les structures microfluidiques par gravure ionique et humide.

5.2.1 La gravure ionique réactive

Dans le cas d'une gravure ionique réactive anisotrope par plasma (RIE), on fait intervenir à la fois, les effets d'un bombardement ionique et ceux d'une réaction chimique. Un plasma d'espèces dissociées en électrons et radicaux ionisés est généré dans le réacteur. Comme le verre que nous utilisons est composé principalement de silice (SiO_2), les plasmas employés sont à base de fluor (SF_6 , CF_4 ou CHF_3). Bien que la gravure en RIE soit majoritairement anisotrope, il existe un phénomène de sur-gravure qui peut être minimisé en ajoutant des espèces chimiquement neutres (Argon, par exemple)²⁸¹. Pour assurer une gravure verticale, ces ions argons sont accélérés en appliquant un champ électrique⁹³.

Compte tenu des profondeurs de plusieurs micromètres que nous souhaitons graver, il est nécessaire de métalliser le verre avec une épaisse couche protectrice de chrome²⁸⁶ ou de nickel, en plus de la résine^{273, 281, 287, 288}.

Dès que les substrats intégrant les guides optiques sont reçus, ils sont lavés dans une solution piranha et séchés sous un flux d'azote (Figure 21a). Une étape de métallisation est ensuite effectuée sous vide par pulvérisation cathodique (Sputtersphère 824, Material Reasearch Corporation). La couche de 2 μm de chrome ainsi déposée permet d'une part d'améliorer l'adhésion de la résine et d'autre part, de limiter les phénomènes de sur-gravure (Figure 21b). Une couche de résine (AZ 5214) photosensible positive de 1.5 μm est étalée à la tournette. Le motif des structures microfluidiques présent sur un masque est ensuite transféré par photolithographie UV (photomasqueur MJB3, Karl-Suss) sur la résine. Après qu'une fenêtre de 30 μm de large ait été ouverte dans le chrome par gravure chimique (Chromium Etchant, Merck) (Figure 21c), le substrat est placé dans le réacteur de gravure ionique réactive (NE 110, Nextral). Un mélange des gaz SF₆/Ar est utilisé pour générer le plasma (Figure 21d).

L'ensemble des paramètres de la gravure étant résumé ci-dessous :

- Gaz SF₆/Ar, vitesse du flux: 32,6 sccm/25 sccm
- Pression appliquée: 15 mTorr
- Puissance: 200 W
- Champ électrique appliqué: 300 V
- Durée de la gravure ionique réactive: 40 min

En dépit du fait que nous ayons utilisé une combinaison de gaz lors du procédé de gravure, nous n'avons pas pu bloquer complètement la sur-gravure. En effet, les mesures en profilométrie estiment la largeur du canal au niveau de la surface à $39 \pm 1 \mu\text{m}$ par rapport à $35 \pm 1 \mu\text{m}$ au fond du canal (profondeur : $4,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$). Bien que ces conditions ne semblent pas optimales, il est tout de même intéressant de comparer les vitesses de gravure obtenues avec les données de la littérature. Ainsi, nous gravons $113 \pm 5 \text{ nm/minute}$ ce qui correspond à une amélioration d'un ordre de grandeur par rapport aux 5 à 10 nm par minute décrits pour des verres sodocalciques^{286, 289}. Comme ce type de verre possède un grand nombre d'oxydes dans sa composition (CaO, MgO, Al₂O₃)²⁹⁰, des composés non-volatiles sont générés lors de la gravure, ce qui ralentit la vitesse de ce procédé. C'est pourquoi, nos vitesses de gravure (sur verre sodocalcique) sont nettement inférieures aux vitesses décrites pour le pyrex ($0,6 \mu\text{m/min}$)²⁸⁷ ou pour le verre borosilicaté ($0,8-1,2 \mu\text{m/min}$)^{280, 281}.

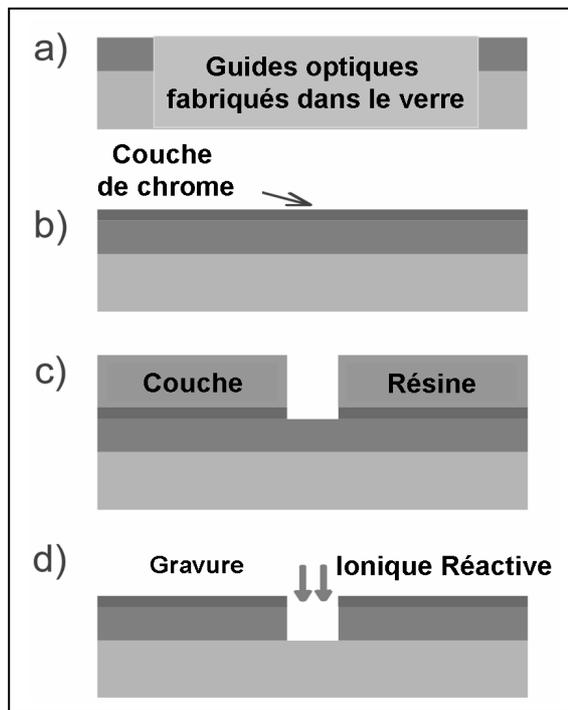


Figure 21 : Illustration du procédé de gravure ionique par plasma utilisé au LEOM

5.2.2 La gravure humide

Dans le cas d'une gravure chimique isotrope du verre, on obtient une géométrie arrondie. L'agent d'usinage classiquement utilisé est l'acide fluorhydrique (HF). Comme dans le cas de la gravure ionique, les additifs présents dans les verres sodocalciques sont problématiques puisqu'ils conduisent à la formation de composés non solubles^{290, 291}. Ces dépôts vont limiter l'efficacité du mélange lors de la gravure provoquant une certaine rugosité. Au LEOM, ce problème a été résolu en ajoutant de l'acide chlorhydrique dans la solution de gravure humide²⁹¹ (figure 22).

Du fait, de la forte agression produite par la solution de gravure, il est indispensable d'améliorer l'adhésion de la résine étalée^{272, 292}. Comme en gravure ionique réactive, nous avons opté pour l'utilisation d'une couche de chrome en tant que couche d'adhésion. Malheureusement, le manque d'homogénéité de cette couche a été décrit comme étant une source potentiel de défaut de gravure^{272, 292, 293}.

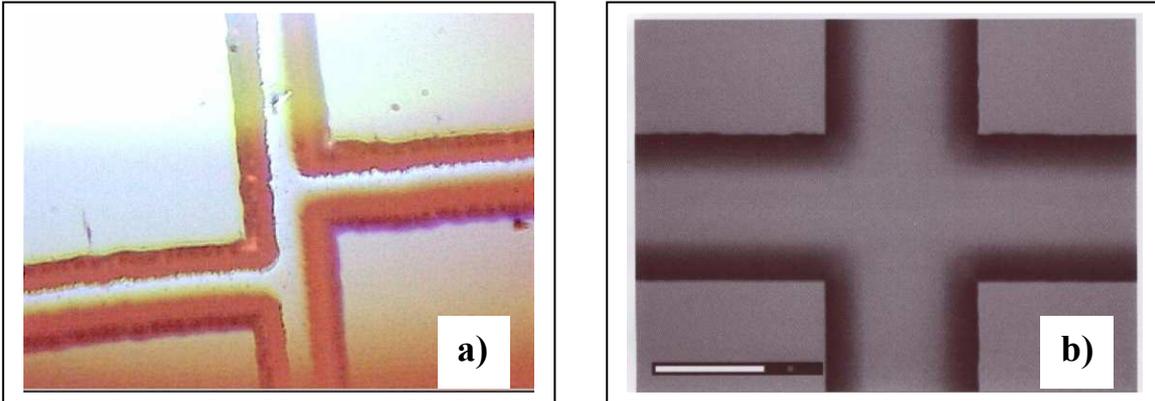


Figure 22 : a) Intersection de canaux croisés en double T non protégés par une couche de chrome et gravés par une solution de BOE (Buffered oxide etchant 7/1) sans HCl. b) Canaux simplement croisés, protégés par une couche de chrome et gravés par une solution de BOE/HCl (37%).

Le concept que nous utilisons consiste donc à déposer conjointement, de chaque côté du substrat en verre, une couche de chrome et une couche de résine (figure 23).

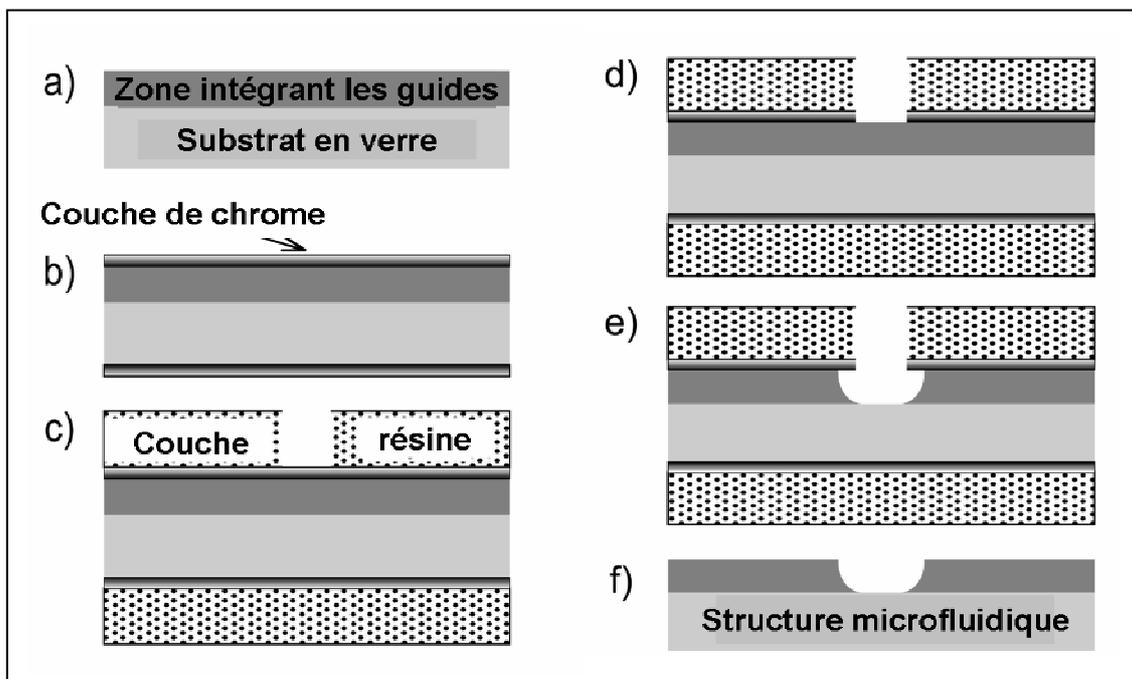


Figure 23 : Illustration du procédé de gravure chimique.

Le procédé de fabrication que nous avons mis au point se présente donc comme suit :

Après avoir été nettoyés avec une solution piranha, les substrats intégrant les guides d'ondes sont métallisés avec une couche de chrome de 150 nm déposée par pulvérisation cathodique (figure 23b). Ensuite, une étape de photolithographie UV est effectuée sur une résine photosensible positive (AZ 5214) de 1,5 μm d'épaisseur (figure 23c). Puis, la fenêtre définie est ouverte chimiquement dans le chrome (figure 23d).

Finalement, le verre est gravé par un mélange de BOE (Buffered oxide etchant 7/1, Merck) et d'acide chlorhydrique à 37% (figure 23e). La profondeur des canaux, la température et l'agitation sont contrôlées régulièrement au cours de l'expérience, respectivement, à l'aide d'un profilomètre (Alphastep 500, Tencor), et d'un mélangeur thermostaté (Eppendorf). Dès lors que la profondeur voulue est atteinte, les couches de chrome et de résine résiduelles sont éliminées (figure 23f).

Afin d'obtenir une faible rugosité, sans pénaliser la cinétique de la gravure humide, nous avons testé deux mélanges chimiques : 1 volume de BOE, 2 volumes de HCl, 2 volumes d'eau et 1 volume de BOE, 2 volumes de HCl, 4 volumes d'eau sur une gamme de température allant de 20°C à 35°C (figure 24).

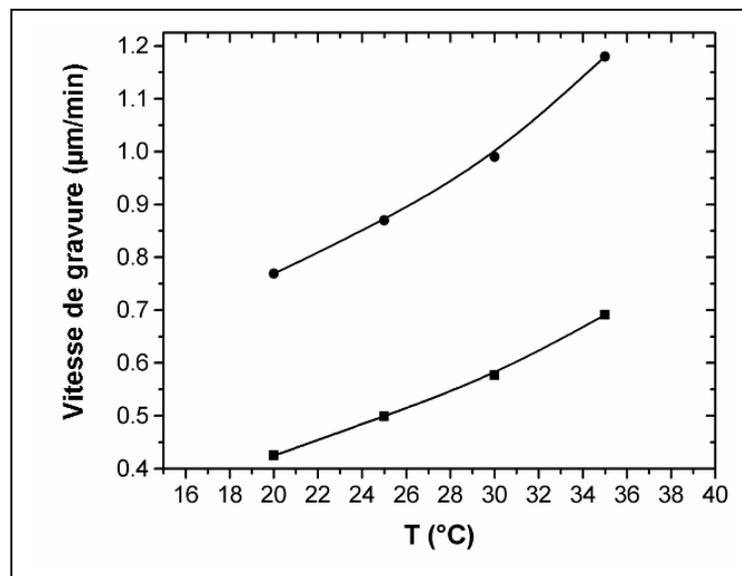


Figure 24: Influence de la température et de la composition du mélange sur la vitesse de gravure. Les carrés représentent le mélange : 1 vol. BOE : 2 vol. HCl : 4 vol. H₂O, et les triangles correspondent au mélange : 1 vol. BOE : 2 vol. HCl : 2 vol. H₂O.

Les conditions nous fournissant le meilleur compromis rugosité/vitesse de gravure sont : 1 volume de BOE, 2 volumes de HCl, 2 volumes d'eau à 35°C.

Sous ces conditions, nous estimons la vitesse de la gravure humide à 1,2 µm/min.

Par cette méthode, nous avons fabriqué des microsystemes intégrant deux canaux microfluidiques de 80 µm de largeur et de 20 µm de profondeur en moins de 20 minutes.

Le canal court de 1 cm de long est utilisé pour l'injection des molécules mélangées. Le canal de 6 cm de long quant à lui, est dédié à la séparation et à la détection des molécules. La jonction nous permet de définir le volume de mélange à séparer (figure 25).

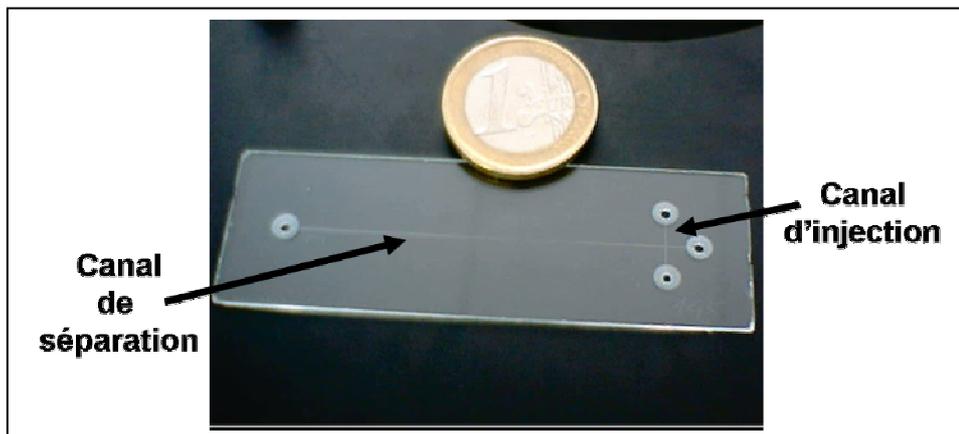


Figure 25 : Laboratoire sur puce simple intégrant un canal d'injection et un canal de séparation. Les réservoirs sont forés dans le verre.

Afin de pouvoir réaliser des analyses plus performantes dans les laboratoires sur puce, nous avons dessiné des masques intégrant des réseaux de canaux microfluidiques. Ces microsystèmes possèdent deux colonnes de séparation interconnectées (figure 26). Cette géométrie nous permettra de réaliser des analyses parallèles ou bidimensionnelles.

Grâce à la mise en parallèle, il devient possible de comparer les résultats obtenus dans deux canaux de séparation distincts. Nous envisageons, par exemple, de fonctionnaliser l'une des colonnes de séparation avec un anticorps greffé à sa surface. Cette molécule reconnaissant spécifiquement un antigène présent dans le mélange à séparer. Ainsi, la colonne dépourvue d'anticorps fournira un électrophérogramme de référence, tandis que le canal fonctionnalisé fournira un profil dépourvu de l'antigène. Par soustraction des profils de séparation obtenus, il sera alors possible d'identifier et de doser le signal correspondant à l'antigène.

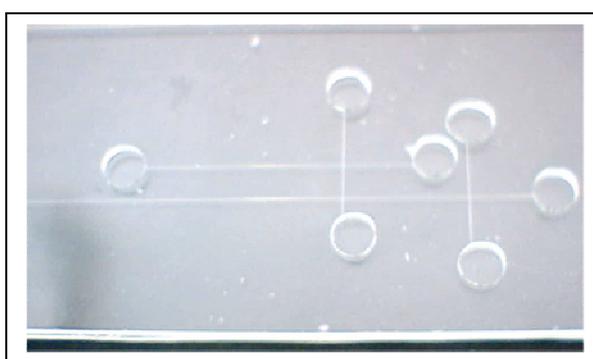


Figure 26 : Laboratoire sur puce intégrant des canaux microfluidiques interconnectés. Longueur des colonnes de séparation : canal court : 5 cm ; canal long : 7 cm.

Comme les colonnes de séparation sont interconnectées, nous souhaitons également tester des séparations bidimensionnelles afin de multiplier le nombre de pics de séparation. Par exemple, les molécules pourraient être concentrées et séparées, par focalisation

isoélectrique, au sein d'un premier canal microfluidique. La deuxième séparation par électrophorèse de zone, se déroulant dans la deuxième colonne.

5.2.3 Comparaison entre gravure humide et gravure ionique

Après avoir mis au point, ces deux procédés de gravure du verre, nous avons étudié l'influence de chacune de ces méthodes sur les analyses microfluidiques et optiques à venir.

Tout d'abord, il est important de constater que la méthode chimique permet de graver des structures plus profondes que la gravure ionique. En effet, nous n'avons pas réussi, par la méthode RIE à fabriquer des canaux ayant une profondeur de plus de 5 μm en comparaison au 20 μm obtenue par la méthode humide.

De plus, cette dernière méthode assure une vitesse de gravure de 1,2 $\mu\text{m}/\text{min}$, ce qui est nettement supérieur aux résultats obtenus avec la technique RIE (0,11 $\mu\text{m}/\text{min}$). Par ailleurs, les canaux gravés chimiquement sont de très bonne qualité. En effet, la rugosité de ces canaux est de 5 nm, ce qui est 10 fois plus faible que les résultats obtenus en RIE (figures 27a et 27b). Une rugosité des canaux trop importante peut ralentir, ou même stopper le flux migratoire des molécules en solution.

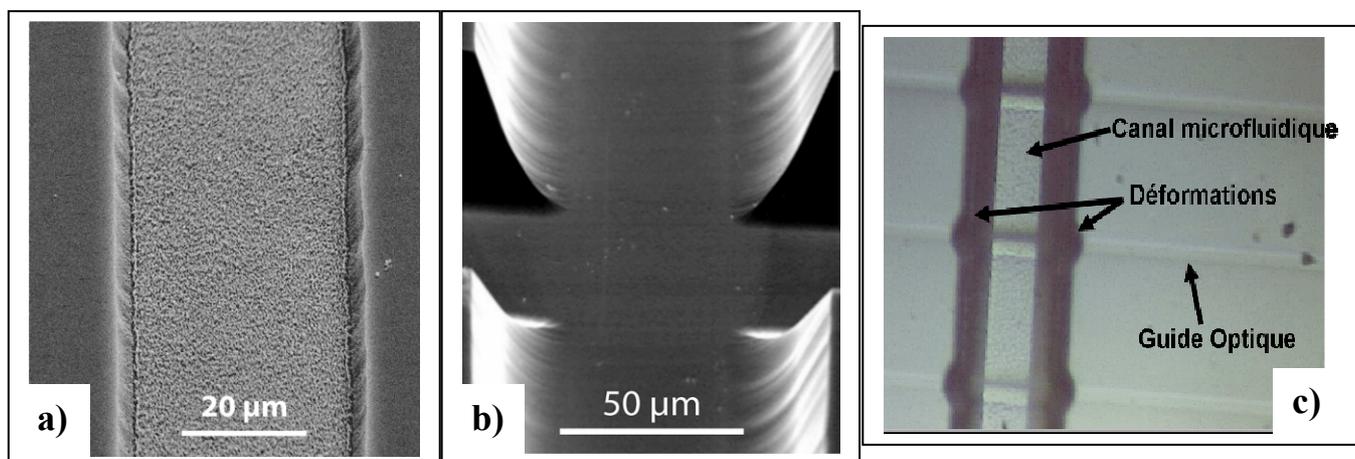


Figure 27 : a) Canal gravé par RIE (profondeur : 4,5 μm). b) Canal gravé chimiquement (profondeur : 20 μm). c) Déformations à l'intersection entre un canal gravé chimiquement et un guide optique.

Comme on peut le constater sur la figure 27c, la gravure humide provoque une déformation locale au niveau de l'intersection entre les parois du canal et les guides optiques. Nous pensons que cette altération provient des modifications, de la composition chimique du verre, générées par l'échange d'ions. Ces déformations observables uniquement en gravure humide sont gênantes car elles peuvent perturber le comportement électroosmotique du tampon, ainsi que la migration électrophorétique des protéines.

5.3 La fermeture du microsystème

Dès lors que les structures optiques et microfluidiques sont réalisées, il faut couvrir le canal pour assurer l'étanchéité lors des écoulements de fluide. La fermeture des microsystèmes peut être obtenue par collage (« bonding »), soit avec une deuxième lame de verre²⁷⁶, soit avec une couche de polymère²⁷⁶.

5.3.1 Le collage verre-verre

Etant donné que notre objectif est de réaliser des microsystèmes dédiés à l'électrophorèse capillaire, il est préférable que le « bonding » ait lieu entre deux lames de verre afin que toutes les surfaces du canal soient homogènes. Il existe 3 méthodes pour sceller deux substrats en verre : le « bonding » par fusion thermique, le collage anodique et le collage par adhésion⁹³.

Le « bonding » par fusion thermique est la méthode la plus populaire. Il utilise les propriétés d'hydratation du verre, sous les conditions atmosphériques.

Lors d'un chauffage, l'eau présente à l'interface entre les lames, est évaporée de telle sorte que deux groupes silanols forment un pont siloxane covalent entre ces substrats^{93, 276}. Ensuite, l'élévation de la température doit suivre lentement une rampe allant jusqu'à la température de transition du verre (entre 500 et 600°C)²⁷⁶. Cependant, cette méthode n'est pas utilisable avec nos microsystèmes, compte tenu des hautes températures qui doivent être appliquées.

Comme l'échange d'ions utilisé dans la fabrication des guides de lumière se déroule à 380°C, un chauffage au-dessus de 500°C provoquerait une destruction du guidage optique. Le collage peut être réalisé à basse température si l'on augmente la pression appliquée²⁸⁴.

Plusieurs travaux montrent que la planarité, le séchage et la qualité du nettoyage sont des étapes cruciales lors du « bonding »^{93, 294, 295}. Par exemple, Harrison et son équipe sont parvenus, grâce à un nettoyage parfait, à sceller deux lames de verre à température ambiante²⁹⁵.

Le collage anodique est une technique de fermeture thermique assistée par un champ électrique. Cette méthode combine la formation de ponts siloxanes et la création d'interactions électrostatiques. Habituellement, elle est exploitée lors du collage direct d'un substrat silicium avec une lame de verre. Si l'on souhaite utiliser cette technique pour coller deux lames de verre entre elles, il faut ajouter une couche interfaciale de polysilicium⁹³.

Le collage par adhésion utilise également une couche intermédiaire pour sceller deux substrats²⁹⁶. Cette fine couche peut-être une colle ou un dérivé polymérique, répandu sur l'un des substrats avant qu'ils ne soient mis en contact par pression^{284, 297}. L'adhésion est alors

assurée au travers de réactions de polymérisation inductibles de différentes manières (chauffage, irradiation UV...) ²⁹⁷. Bien qu'avantageuse, car réalisable à température ambiante, l'utilisation de couches intermédiaires est préjudiciable car elles risquent d'obstruer les canaux microfluidiques.

5.3.2 Le collage verre-polymère

Lors de la réalisation de nos premiers microsystèmes, nous avons observé que les substrats usinés n'étaient pas plats mais légèrement concaves. Il est certain que les ions Na^+ de la surface arrière soient également remplacés par les ions K^+ lors de l'échange d'ions. Comme ces ions sont beaucoup plus gros que les ions initialement présents dans le verre, un stress physique est généré sur le substrat. Nous pensons que la déformation observée résulte de ce stress.

De ce fait, nos microsystèmes ne peuvent être pas clos par une seconde lame de verre. Ce problème a été résolu en vaporisant, lors de la fabrication des guides optiques, une couche protectrice d'aluminium complémentaire de 400 nm sur la face arrière du substrat. En attendant cette solution, nous avons travaillé avec des substrats hybrides dans lesquels les modules analytiques étaient fabriqués dans le verre et le capotage était assuré par une couche de polymère PDMS solide.

Ce PDMS est un polymère flexible et transparent qui réfléchit faiblement la lumière. Il consiste en une série de groupements $-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-$ dont les fonctions méthyles (CH_3) sont apolaires ²⁷⁸.

Le collage du PDMS sur le verre peut être réversible ou permanent. Lorsqu'il est réversible, il exploite des interactions de type Van der Waals formées entre deux surfaces simplement mises en contact ²⁷⁸.

En revanche, si l'on recherche un collage irréversible, il faut préalablement traiter les surfaces à mettre en contact par un plasma oxygène. Cette oxydation modifie les propriétés hydrophobes du PDMS, en remplaçant les fonctions méthyles (CH_3) par des fonctions polaires de type alcool (OH). Les groupements silanols ainsi formés, vont permettre de sceller covalamment le PDMS et le verre au travers de ponts siloxanes (Si-O-Si) ²⁹⁸.

Bien que le collage permanent fournisse une surface hydrophile, et une forte adhésion (pression supportée supérieure à 345 kPa), nous avons privilégié l'utilisation d'un collage réversible. En fait, nous avons vu dans le chapitre 3.2.4., que les protéines pouvaient, lors d'une séparation, s'adsorber sur les parois et plus particulièrement sur le polymère.

Or, la présence résiduelle de protéines adsorbées risque d'entraîner une contamination des canaux ce qui risque de polluer les expériences de séparation effectuées sur un même dispositif²⁹⁹. Ainsi, le collage réversible, nous permet de remplacer uniquement la couche de PDMS souillée au lieu de changer complètement de microsystème. Cependant, cette approche reste problématique, puisque l'hydrophobicité du PDMS est susceptible de créer des bulles dans le canal microfluidique. De plus, le microsystème ainsi préparé ne permet pas l'usage de pression supérieure à 34 kPa. De la même façon, l'application d'un vide par aspiration à l'une des extrémités du canal microfluidique risque de provoquer des fuites de liquide à l'interface verre-PDMS²⁹⁹.

Le PDMS est préparé à partir d'une base de pré-polymère liquide (Sylgard 184, Dow Corning) mélangée à un agent de réticulation selon un rapport volumique de 10/1. Le mélange des solutions est effectué vigoureusement pendant 5 minutes afin d'obtenir une préparation homogène. Après être étalé, manuellement ou à la tournette, sur un support de verre propre, le polymère repose pendant une heure, le temps d'éliminer les bulles formées lors du mélange. Ce dégazage peut être accéléré en plaçant, avant étalement, la préparation dans un bain à ultrasons pendant 5 minutes. Une fois que cette fine couche de polymère (entre 50 μm et 2 mm) est dégazée, la préparation est chauffée à 110 °C pendant une heure. Après avoir refroidit, les capots en PDMS sont découpés sur le support et déposés sur le verre usiné. Les réservoirs dans lesquels sont appliqués les solutions et les électrodes peuvent être réalisés dans le verre ou dans le polymère selon l'application. Cependant, comme les forets diamantés, nécessaires au perçage du verre, sont fragiles et coûteux, on privilégiera l'utilisation d'entretoises pour perforer les réservoirs dans le capot en polymère.

6 Banc de caractérisation des laboratoires sur puce

Le banc de caractérisation que nous avons assemblé doit nous permettre de détecter, par fluorescence, des composés organiques contenus dans une solution électrolytique.

Comme les protéines étudiées ne sont pas naturellement fluorescentes dans le visible, elles ont été modifiées avec des fluorophores organiques. Ces derniers possèdent des longueurs d'onde d'absorption et d'émission de la lumière qui leur sont spécifiques. Ils devront donc être choisis avec soin, afin d'être compatible avec l'ensemble des composants optiques du banc de caractérisation. Bien qu'il existe un grand nombre de molécules excitables à 488 nm (laser argon), le coût imposé par l'achat de composants optiques adaptés à ces longueurs d'onde est rédhibitoire. Nous avons donc privilégié l'utilisation d'une excitation laser à 532 nm (laser Nd-Yag doublé de 100 mW).

Le banc de caractérisation que nous avons assemblé possède l'avantage d'autoriser plusieurs arrangements optiques (figure 28). Nous pourrions ainsi comparer leurs avantages et leurs inconvénients dans le cadre de la détection de molécules fluorescentes.

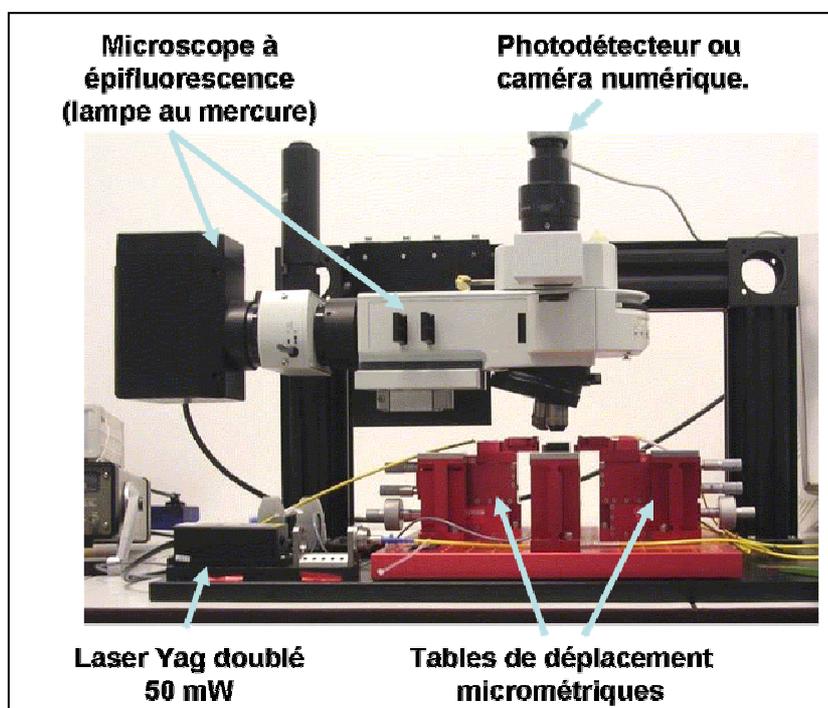


Figure 28 : Dispositif de caractérisation après assemblage. La lumière peut être émise par un laser ou par une lampe à vapeur de mercure. La fluorescence est collectée au travers de filtre par un photodétecteur ou par une caméra numérique.

6.1 Le microscope à épifluorescence

Ce dispositif est basé sur l'utilisation d'un microscope droit à épifluorescence (BXFM, Olympus). La lumière excitatrice est émise dans le tube du microscope par une lampe à vapeur de mercure de 100 W. Cette lumière passe au travers d'un filtre excitateur (dont le spectre est représenté en bleu sur la figure 29), afin de réduire la largeur de la bande spectrale excitatrice autour de la longueur d'onde d'absorption propre aux fluorophores (entre 500 et 550 nm). Elle est ensuite focalisée au travers d'un objectif de microscope présent à la verticale de la zone de détection du microsysteme. La fluorescence émise par les molécules ainsi que les réflexions de la lumière excitatrice sont collectées au travers du même objectif grossissant 10 fois. Dans le but de différencier la fluorescence émise, de ces réflexions, un filtre optique (dont le spectre est représenté en rouge sur la figure 29) est ajouté en amont du photodétecteur (2151M, New Focus, USA).

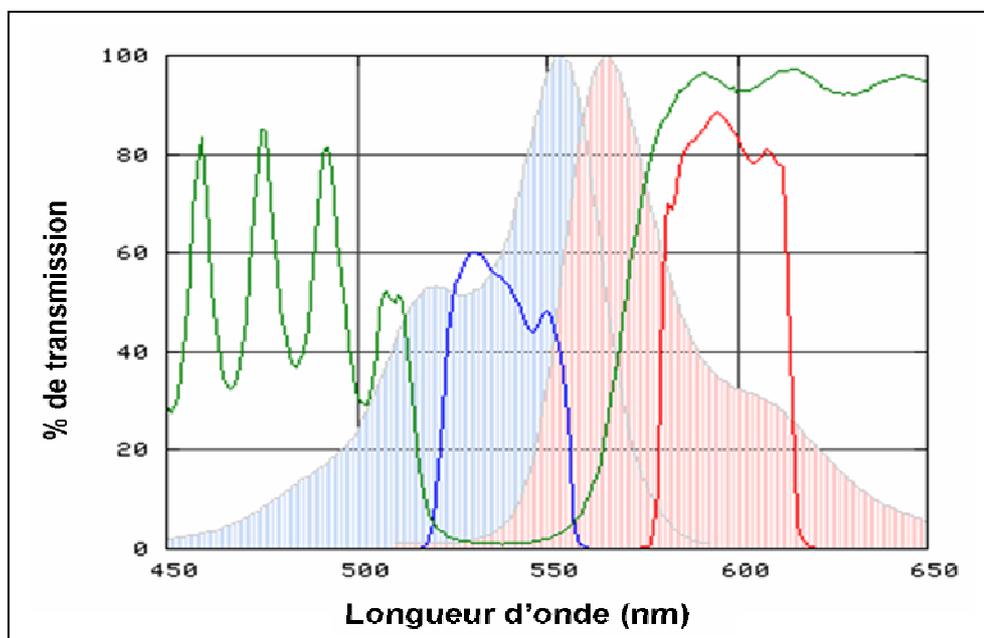


Figure 29 : Représentation du pourcentage de transmission des filtres optiques utilisés en fonction de la longueur d'onde. Les courbes spectrales correspondant aux filtres : dichroïque, excitateur et collecteur sont respectivement représentées en vert, bleu marine, et rouge foncé sur la figure. Les courbes bleu et rouge en arrière-plan correspondent respectivement au spectre d'absorption et d'émission du fluorophore Cy3 utilisé dans les étapes de marquage protéique.

Etant donné que nous souhaitons travailler avec des protéines faiblement concentrées, nous avons choisi un photodétecteur capable de mesurer une puissance optique minimale de 0,5 nW. Ce capteur à photodiode silicium convertit l'énergie lumineuse reçue en signal électrique, puis amplifie ce signal. Après cette conversion, le signal est transmis à un ordinateur via un oscilloscope numérique (Handyscope HS3) ou un système d'acquisition (Ulys).

6.2 L'excitation intégrée

Pour exciter les fluorophores, il est préférable d'exploiter une source de radiation plus stable et plus puissante qu'une lampe à vapeur de mercure. Comme les lasers possèdent des largeurs de bandes spectrales très étroites et qu'ils génèrent un faisceau de radiations très intense, notre banc optique est équipé d'un laser Yag doublé de 50 mW (DPGL-2050, Suwtech) fonctionnant à 532 nm.

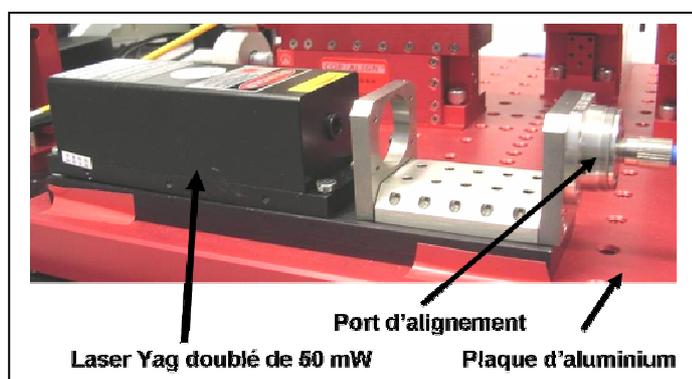
Ce laser possède un faisceau stable de faible diamètre ($1,0 \pm 0,2$ mm) et de faible divergence ($1,0 \pm 0,2$ mrad). Comme ce laser est utilisé pour des analyses comparatives, il est important que sa puissance varie peu (5 % de variation en deux heures de mesure). Afin de garantir un dispositif de caractérisation stable, les composants optiques sont fixés sur une plaque d'aluminium de chez Luminos Industries.

Cette source laser pourra être couplée avec un guide de lumière grâce à l'utilisation d'une fibre optique. Le diamètre du cœur de cette fibre doit être inférieur à la taille du guide de 10 μm pour garantir un couplage efficace. De plus, comme le faisceau laser est presque monochromatique, la fibre choisie est monomode. Ce qui signifie, que son cœur est suffisamment petit (3,5 μm) pour que la lumière ne se propage que dans un mode axial.

Pour permettre la fixation avec d'autres composants optiques, ces fibres possèdent des connecteurs FC/APC à l'une des extrémités.

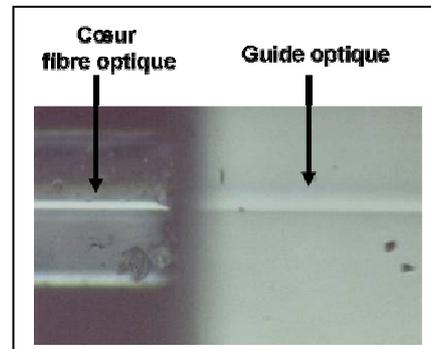
Comme le diamètre du cœur des fibres monomodes est très inférieur au diamètre du faisceau laser, il est indispensable que les rayons soient focalisés. Le focalisateur transforme le faisceau de rayons parallèles en un faisceau de rayons convergents. L'ouverture numérique de la lentille doit être inférieure à celle de la fibre de sorte que les rayons y soient réfléchis. Cette lentille est intégrée dans un port d'alignement de fibres (PAF) (OFR, USA) réglable selon 5 degrés de liberté (figure 30). La qualité du couplage dans la fibre est contrôlée avec un photodétecteur.

Figure 30 : Photo du système de couplage entre un laser et une fibre optique.



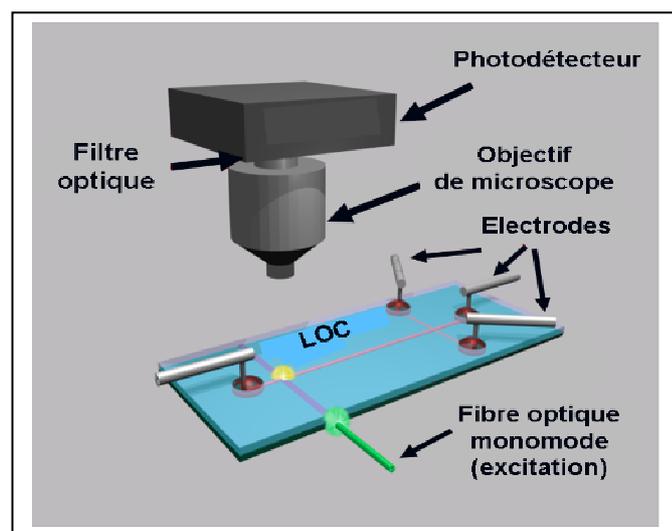
L'alignement entre fibre optique et guide de lumière se fait au niveau de la tranche du substrat en verre grâce à des tables de déplacements micrométriques (Luminos Industries, Canada). Dans un premier temps, l'approche approximative de la fibre est suivie optiquement via l'objectif de microscope (figure 31). L'alignement optimal étant ensuite estimé avec un photodétecteur.

Figure 31 : Alignement entre une fibre de $3,5 \mu\text{m}$ de cœur et un guide optique de $10 \mu\text{m}$.



Dans cette configuration optique, la fluorescence émise est collectée verticalement au travers d'un objectif de microscope (figure 32).

Figure 32 :
Illustration de l'arrangement optique où seule l'injection est intégrée.
Le faisceau laser est aligné avec le guide optique, tandis que la fluorescence est collectée via l'objectif de microscope.



6.3 La configuration toute intégrée

Dans cet arrangement, la lumière excitatrice est acheminée jusqu'au canal microfluidique par un guide optique d'excitation aligné avec une fibre optique (de $3,5 \mu\text{m}$ de cœur), connectée au laser. La fluorescence ainsi que les réflexions de la source d'excitation sont collectées au travers d'un guide optique de collection colinéaire au guide d'excitation. Ce guide de collection est ensuite aligné avec une fibre multimode ($125 \mu\text{m}$ de cœur) connectée au photodétecteur. La fluorescence est filtrée des réflexions parasites en amont

du photodétecteur (figure 33). Comme toute l'optique est intégrée dans cette approche, l'utilisation du microscope à épifluorescence devient obsolète.

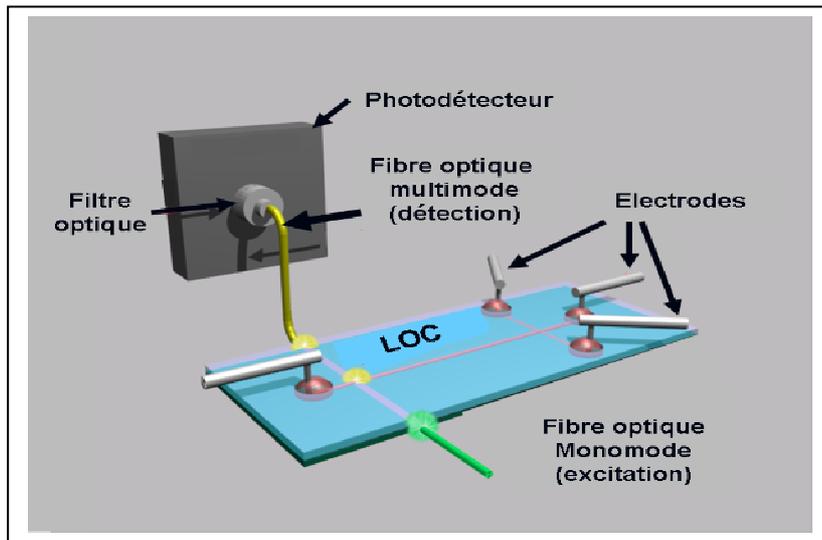


Figure 33 : Configuration optique tout intégrée. L'excitation laser et la détection fluorescente se font au travers de guides optiques colinéaires.

6.4 L'arrangement fibré

Enfin, nous avons expérimenté une solution toute intégrée dans laquelle nous remplaçons la voie de détection utilisée précédemment. La solution alternative que nous proposons permet une détection à la verticale de la zone de détection tout en éliminant la microscopie. Dans ce cas, la fluorescence est collectée directement au travers d'une fibre optique multimode connectée au photodétecteur (figure 34).

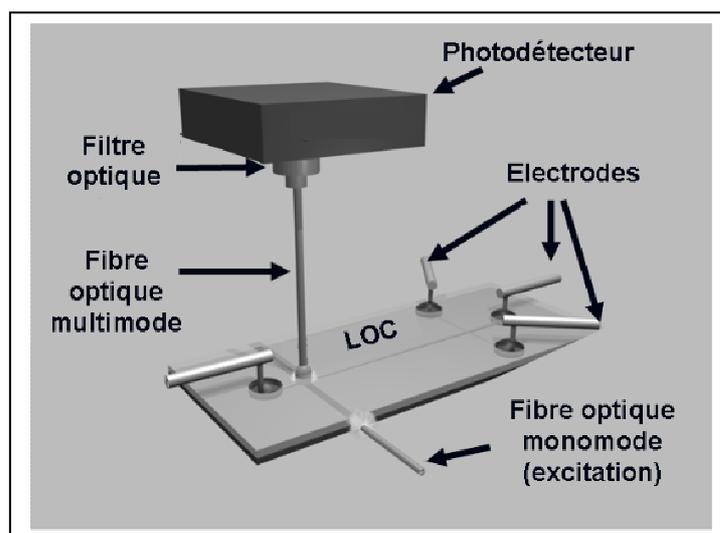


Figure 34 : Représentation d'une configuration optique dite « fibrée ». L'excitation laser s'opère au travers d'un guide optique et la fluorescence est collectée verticalement via une fibre optique multimode.

L'utilisation d'une fibre optique nous permet d'être quasiment en contact avec la zone de détection. Pour ce faire, le mélange de pré-polymère et de catalyseur est étalé à la tournette afin de réaliser une fine couche de PDMS de 50 μm d'épaisseur. Après cuisson, la couche de PDMS ainsi formée est déposée sur le substrat microstructuré (figure 35.1b). Un volume d'éthanol est déposé à l'interface verre-PDMS afin de pouvoir positionner la couche de PDMS sans pliure. L'éthanol est ensuite évaporé sous flux d'azote. Afin de solidifier la connexion entre la fibre et le microsystème, un tube en plastique est immobilisé par une épaisse couche de polymère à la verticale de la zone de détection (figure 35.1c). La fibre optique (diamètre du cœur 125 μm) est ensuite approchée avec une table de déplacement micrométrique afin d'être alignée perpendiculairement au canal et aux guides optiques.

Cet alignement est rendu possible grâce à l'utilisation d'un microscope inversé. En effet, nous pouvons ainsi visualiser l'extrémité de la fibre optique en contact avec la fine couche de PDMS au travers du substrat (figure 35.2). Dès que la position optimale semble avoir été trouvée, la fibre est immobilisée avec une couche de PDMS non polymérisée. Enfin, l'assemblage est renforcé avec une colle époxy (figure 35.1d). Grâce à ce montage, ni la fibre optique, ni le PDMS ne subissent de stress mécanique.

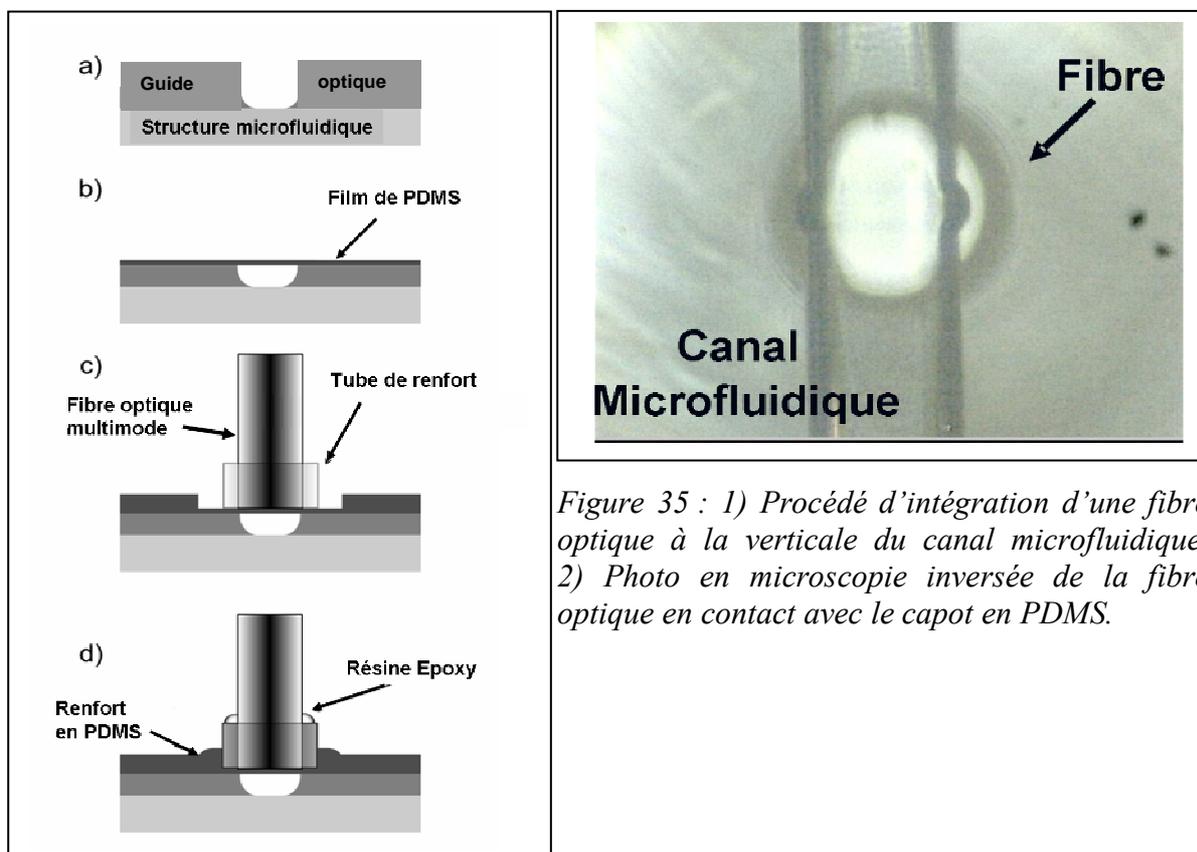


Figure 35 : 1) Procédé d'intégration d'une fibre optique à la verticale du canal microfluidique. 2) Photo en microscopie inversée de la fibre optique en contact avec le capot en PDMS.

7 Caractérisations optiques des microsystèmes

Après avoir caractérisé les propriétés de transmission des guides optiques, nous étudierons le comportement de la lumière à l'intersection entre ces guides et le canal microfluidique perpendiculaire. Etant donné que nous souhaitons doser des marqueurs cancéreux, nous analyserons les limites de détection pouvant être obtenues dans les différentes configurations optiques décrites dans le paragraphe précédent. Enfin, nous présenterons le potentiel, en termes d'intégration, d'autres composants optiques.

7.1 Les propriétés de transmission des guides optiques

Les caractéristiques de l'indice de réfraction, ainsi que l'épaisseur du guide sont estimées, à l'IMEP-INPG, par des mesures en champ proche ou par la méthode M-lines à la longueur d'onde de 632,8 nm^{300,301}.

La méthode en champ proche permet d'estimer approximativement la largeur et la profondeur d'un guide optique à partir des dimensions du faisceau lumineux sortant du guide au niveau de la tranche du substrat.

Dans la méthode M-lines, un faisceau laser He-Ne est focalisé dans un prisme à fort indice ($n=1,73$) positionné à la verticale du substrat. Comme la lumière est focalisée, elle attaque le guide selon plusieurs angles d'incidence. La lumière issue du prisme est ensuite visualisée sur un écran. On collecte, la lumière non guidée réfléchi par le guide, et une fraction de la lumière guidée recouplée avec le prisme. On observe une tâche lumineuse (faisceau laser réfléchi) striée de lignes appelées M-lines. Ces lignes permettent de caractériser les modes qui se sont propagés dans le guide. A partir de ces données, il est possible de remonter à l'indice effectif des modes transverses électrique (TE) et magnétique (TM). Par exemple, pour un échange de deux jours, la différence entre l'indice de réfraction maximum du guide de 10 μm (largeur du guide sur le masque) et l'indice du substrat est estimé respectivement à $8,3 \times 10^{-3}$ et $9,6 \times 10^{-3}$ pour les polarisations TE et TM (figure 36). Comme ces deux indices sont relativement proches, ils évolueront de manière similaire en comparaison à l'indice de réfraction du verre, ce qui limitera les pertes d'énergies lors du guidage optique. A partir des valeurs de ces modes, il est possible d'estimer que la profondeur de ce guide était de 21 μm . Pour le même guide, la méthode en champ proche estime

la largeur du guide à 33 μm et la profondeur à 20 μm . Ces deux méthodes semblent donc fournir des estimations de profondeur comparables.

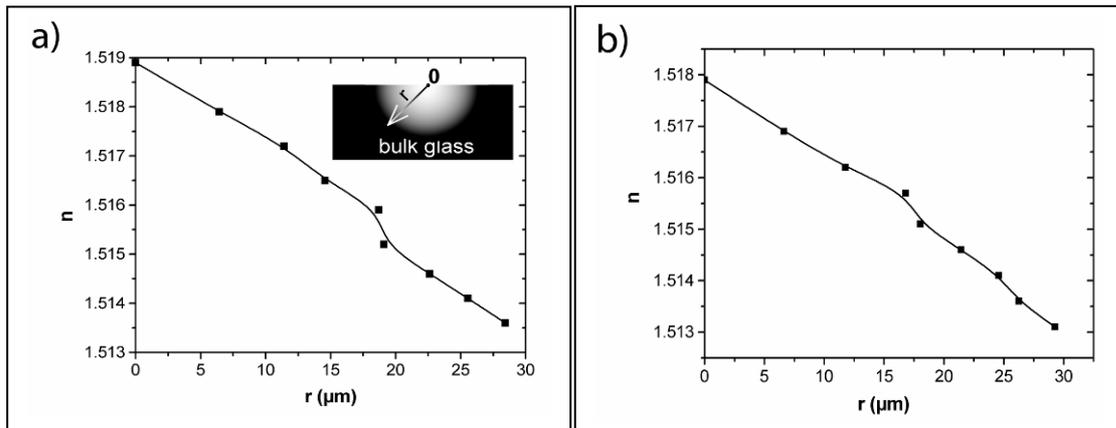


Figure 36 : a) Caractérisation de l'indice de réfraction pour TM. Insert : Distribution selon une symétrie radiale de l'indice de réfraction et b) Evolution de l'indice de réfraction pour TE.

7.2 Les caractérisations par fluorescence

Afin de démontrer l'intérêt des guides optiques et du banc de caractérisation, nous avons aligné le laser fibré avec un guide optique de 9 μm de diamètre et mesuré le rendement de transmission optique. Sur la figure 37a, on visualise le cheminement du faisceau laser guidé au travers d'un laboratoire sur puce. En fait, le couplage entre la fibre et le guide optique est choisi de manière à ce que les pertes évanescentes soient visibles à la verticale du substrat. Ainsi, nous validons que le procédé d'échange d'ions fournit un guidage efficace à la longueur d'onde d'excitation (532 nm).

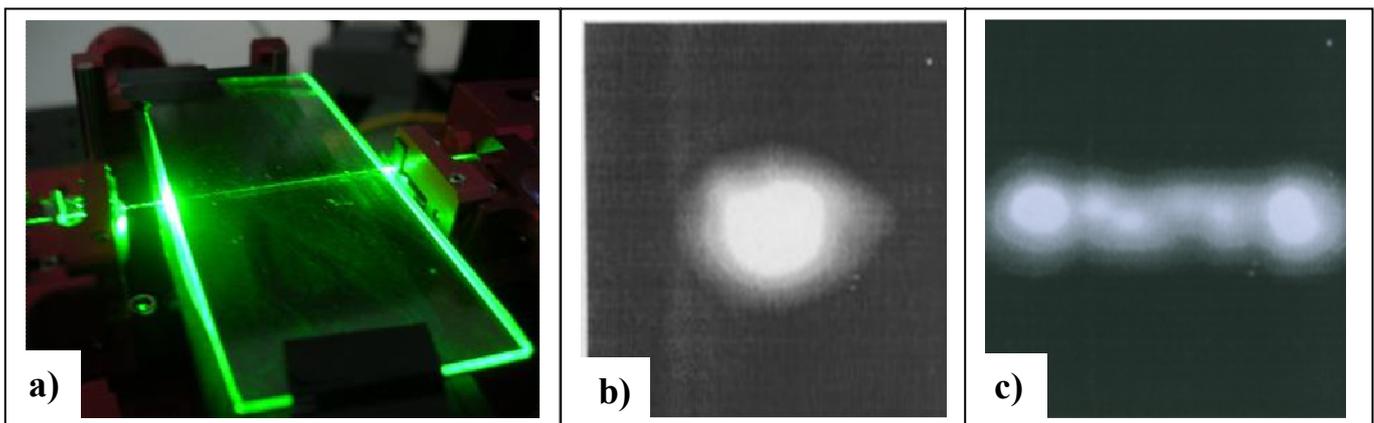


Figure 37 : a) Cheminement laser au travers d'un guide optique. b) Profil du faisceau exciteur en sortie d'un guide optique de 9 μm . c) Profil en champ proche d'un faisceau sortant d'un guide de 40 μm .

Dans le but de faciliter le couplage guide et fibre optique, nous avons testé des guides dont les largeurs variaient de 2 μm à 40 μm (tableau 3).

Taille du guide (en μm)	5	8	9	10	15	20	30	40
Puissance lumineuse mesurée (en μW)	248	318	403	395	350	275	123	170

Tableau 3 : Valeur de la puissance lumineuse en fonction de la taille du guide optique utilisé. La puissance lumineuse mesurée en sortie de fibre optique étant de 900 μW .

Bien que l'utilisation de guide large permette un alignement simple avec une fibre optique monomode, il apparaît dans le tableau 3 qu'une largeur de guide trop grande ($> 15 \mu\text{m}$) conduit à des pertes importantes. Il semble que cette baisse d'intensité provienne d'une injection de la lumière excitatrice selon plusieurs modes (figure 37c). A l'inverse, si le guide est trop petit ($< 8 \mu\text{m}$), l'alignement manuel fibre-guide devient très difficile ce qui se traduit par une baisse de l'intensité lumineuse mesurée. En fait, pour exciter un maximum de fluorophores au niveau de la zone de détection, il faut que le guide optique possède une profondeur comparable à celle des canaux microfluidiques. Comme nos canaux gravés chimiquement possèdent des profondeurs d'environ 20 μm , nous avons donc opté pour des guides optiques droit dont la largeur de la fenêtre est de 10 μm . Cette largeur correspond à une profondeur de guide comprise entre 12 μm et 20 μm selon la durée de l'échange d'ions. Ce choix nous semble être un bon compromis entre facilité de couplage (sortie de guide quasiment circulaire) et sensibilité de détection.

Une photo en champ proche présentant la sortie d'un guide de 9 μm est présentée dans la figure 37b.

Du fait de la méthode de fabrication des guides optiques utilisé, la transition d'indice est relativement douce, ce qui limite les pertes lors du guidage. L'IMEP-INPG a mesuré que des guides de 10 μm ne perdaient, dans les meilleures conditions, que 3,6 dB pour 4 cm soit 0,9 dB/cm. A titre de comparaison, les guides optiques fabriqués en verre par dépôt d'une résine SU-8 possèdent une atténuation de 3,5 dB/cm²²³, tandis que les guides liquides perdent 1,5 dB/cm²⁷².

Ensuite, nous avons étudié l'influence de la rugosité du canal microfluidique sur les pertes par diffraction. La société Gamberini SARL nous a fourni des microsystèmes dont les canaux sont réalisés par sciage. Comme ils sont très rugueux (plusieurs micromètres),

des diffractions à l'interface guide-canal apparaissent (figure 38a). Cependant, ces pertes peuvent être minimisées en remplissant le canal avec un liquide.

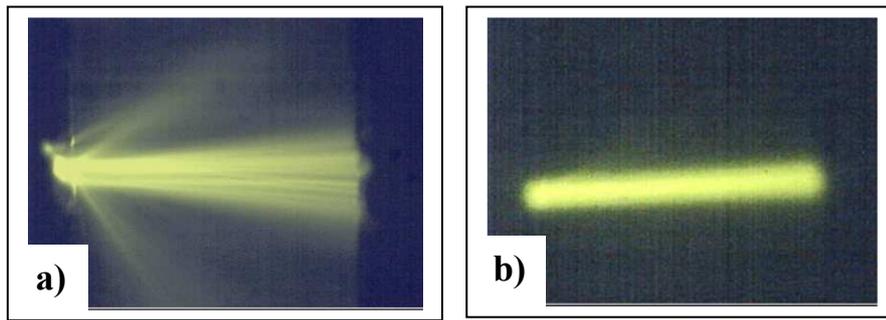


Figure 38 : a) Fluorescence émise dans un canal scié après une excitation guidée. Les défauts de la rugosité provoquent des pertes par diffraction. b) Emission de fluorescence dans un canal gravé chimiquement après excitation laser via un guide optique.

En collaboration avec l'IMEP-INPG, nous avons fait circuler 3 solutions, dans le canal scié, possédant des indices de réfraction allant de 1,33 à 1,51. Nous avons remarqué que les pertes de transmission augmentaient avec la discontinuité des indices de réfraction des guides et du liquide. Ainsi, alors qu'un liquide ayant un indice de 1,51, ne perd que 9 dB, un liquide dont l'indice de réfraction est de 1,33, perdra 18,5 dB. Comme la rugosité des canaux fabriqués au LEOM est nettement inférieure à celle des canaux sciés, les pertes de transmission en présence d'eau désionisée n'étaient que de 6 dB (figure 38b).

Comme nous souhaitons détecter de faibles concentrations de marqueurs cancéreux, il est important d'estimer le rendement de l'alignement optique. Cette caractéristique nous permet d'identifier quelles sont les zones d'alignement les plus sensibles aux pertes. La valeur de la puissance excitatrice est évaluée à l'aide d'un « wattmètre » en différentes régions de l'alignement dans le cadre d'une configuration toute intégrée (tableau 4). Dans cet arrangement, les guides optiques sont utilisés pour acheminer d'une part, la lumière excitatrice de la fibre de 3,5 μm de cœur jusqu'au canal microfluidique (90 μm de largeur) et, d'autre part, du canal vers la fibre de 125 μm de cœur connectée au photodétecteur. Le canal microfluidique est rempli d'une solution tampon pour limiter les pertes.

Nous allons, donc comparer :

- 1) la puissance fournie par le laser (P_{laser}) avec la puissance mesurée en aval de la fibre optique ($P_{\text{fibre } 3,5}$) connectée au PAF.
- 2) Ainsi que P_{laser} avec la puissance mesurée en aval de fibre de 125 μm de cœur.

	Puissance mesurée (en μW)	Rendement calculé Par rapport à P_{laser}	Rendement calculé Par rapport à $P_{\text{fibre } 3,5}$
P_{laser}	440		
$P_{\text{fibre } 3,5}$	224	51 %	
Puissance en sortie de la fibre de 125 μm de cœur	123	28 %	55 %

Tableau 4 : Mesure de la puissance de la lumière excitatrice dans la configuration toute intégrée. Estimation du rendement de l'alignement optique.

Ainsi, dans cette configuration toute intégrée, nous obtenons un rendement total de 28 %. Ce résultat signifie qu'une grande partie de la puissance excitatrice est perdue au cours de l'alignement. Si l'on tient compte des faibles pertes, propres aux guides optiques, décrites dans le paragraphe précédent, il apparaît clairement que la majorité de ces pertes sont produites tant au niveau du système d'alignement laser-fibre qu'au niveau du couplage entre les fibres optiques et les guides de lumière. Malheureusement, il est très difficile d'obtenir un meilleur couplage manuel entre le laser et la fibre optique monomode, que les 50 % que nous avons obtenus. D'après le tableau 4, nous pouvons estimer que seulement 8 % des pertes évaluées dans cette configuration proviennent de l'alignement entre le guide optique et la fibre de 125 μm de cœur.

Parallèlement à cette étude, nous avons souhaité estimer la puissance de la lumière excitatrice disponible, au niveau du canal microfluidique, pour exciter les fluorophores. Cette estimation a été faite à partir d'une configuration où seule l'excitation est intégrée. C'est-à-dire que la lumière excitatrice fournie par le laser est couplée avec une fibre de 3,5 μm de cœur. Ensuite, cette fibre est alignée avec un guide optique pour acheminer la lumière laser jusqu'au niveau du canal microfluidique. La puissance excitatrice est ensuite évaluée verticalement au travers d'un objectif de microscope par un « wattmètre ».

	Puissance mesurée (en μW)	Rendement calculé Par rapport à P_{laser}	Rendement calculé Par rapport à $P_{\text{fibre } 3,5}$
P_{laser}	440		
$P_{\text{fibre } 3,5}$	224	51 %	
Puissance collectée à la verticale du canal microfluidique	143	33 %	63 %

Tableau 5 : Estimation de la puissance excitatrice disponible après guidage au niveau du canal microfluidique. Estimation du rendement de cet alignement.

D'après le tableau 5, nous évaluons que seulement 33 % de la lumière excitatrice atteint le canal microfluidique. Or, la puissance initialement fournie par le laser est estimée à 100 mW par le wattmètre. Nous pouvons donc conclure que 33 mW de la puissance initiale est disponible pour exciter les molécules fluorescentes présentes dans le canal de séparation.

L'étape suivante consiste à confirmer que cette intensité laser est suffisante pour exciter les fluorophores organiques (rhodamine 6G) présents dans le canal microfluidique. Nous avons préparé 200 $\mu\text{mol/L}$ de rhodamine 6G dans 20 mmol/L de tampon borate. Cette solution est ensuite déposée dans l'un des réservoirs et mobilisée électrocinétiquement jusqu'à la zone de détection où les molécules sont excitées par une lumière excitatrice guidée. La fluorescence est imagée à la verticale du substrat.

Comme on peut le voir sur la figure 39a, nous obtenons une émission de fluorescence localisée au niveau de l'intersection entre le guide optique et le canal. Cependant, comme nous cherchions à visualiser simultanément les guides optiques, le canal microfluidique et la fluorescence émise, nous détectons également les réflexions parasites de la source laser sur les parois et le fond du canal.

Sur la figure 39b, nous avons ajouté des filtres optiques pour supprimer les longueurs d'ondes inférieures à 550 nm. Dans ce cas, toutes les réflexions provenant de la lumière excitatrice sont bloquées par le filtre optique. Ainsi, nous observons une forte diminution du bruit environnant, ce qui confirme que la lumière excitatrice provient du guide optique et non pas de la lumière blanche environnante. Comme l'alignement entre le guide optique et la fibre de 3,5 μm de cœur est de bonne qualité, il n'y a pas de lumière excitatrice acheminée au travers des guides adjacents. La fluorescence émise est localisée précisément dans le canal microfluidique.

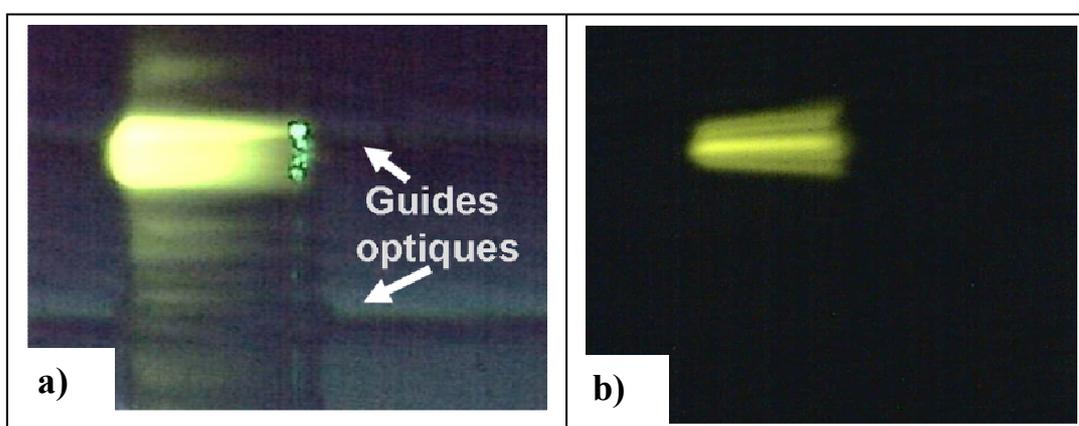


Figure 39 : a) Emission de fluorescence non filtrée, à l'intersection entre un canal et un guide optique. b) Emission de fluorescence après filtration optique.

Dans le but d'améliorer la sensibilité de notre dispositif, nous avons testé deux approches. Dans un premier temps, nous avons préparé une solution de rhodamine 6G dans un mélange composé d'un volume de tampon borate et d'un volume d'éthanol.

Nous avons observé que l'ajout d'éthanol permettait d'amplifier le signal de fluorescence de la rhodamine. En fait, nous observons une baisse des ondes non radiatives couplée à une élévation des ondes radiatives, ce qui amène à une amélioration de la durée de vie du fluorophore³⁰². Cependant, l'éthanol s'évapore très rapidement ce qui conduit à un signal de fluorescence instable. Pour solutionner ce problème de stabilité, nous pouvons envisager d'utiliser des tensioactifs non ioniques au dessus de leur concentration micellaire critique. En effet, la présence de micelle a été décrite comme permettant de stabiliser la fluorescence en augmentant la durée de vie du fluorophore utilisé.

Dans un deuxième temps, nous avons équipé notre banc de caractérisation d'une lame de verre sur laquelle nous avons préalablement déposé une fine couche d'or. Comme l'or réfléchit 90 % des rayonnements émis à 560 nm, elle joue le rôle de miroir pour exalter le signal de fluorescence émis. Ce miroir est positionné et immobilisé sur le porte-échantillon par un système d'aspiration sous vide. Les figures 40a et 40b illustrent le gain d'intensité induit par la présence du miroir métallisé. Bien que le signal de fluorescence sature le détecteur, nous estimons que l'intensité de la fluorescence émise est au moins 4 fois plus importante en présence de miroir plutôt qu'en son absence.

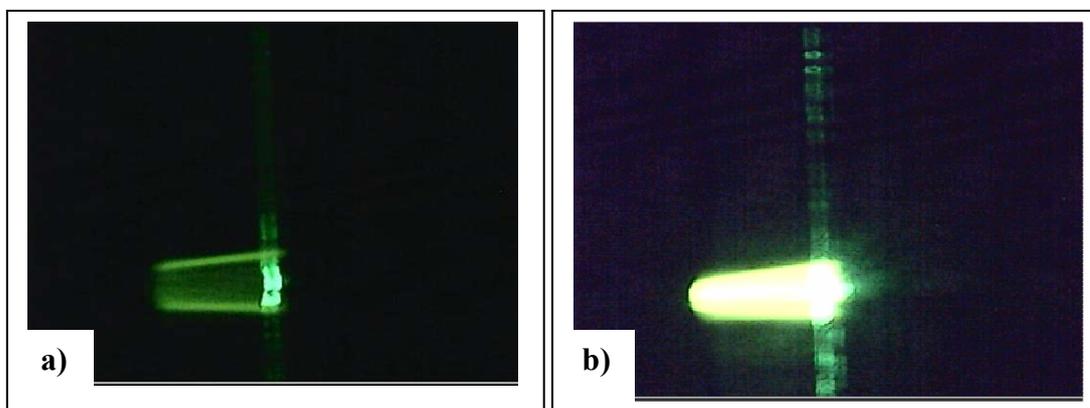


Figure 40. Influence d'un miroir en or sous le substrat après excitation guidée de $27 \mu\text{M}$ de rhodamine 6G. a) Fluorescence collectée sans miroir. b) Fluorescence collectée avec un miroir en or.

7.3 Les courbes d'étalonnage

Un des objectifs de ce projet est de pouvoir détecter et quantifier de faibles quantités de marqueurs cancéreux. Or, nous savons qu'à une longueur d'onde donnée les photons sont absorbés selon la loi d'absorption de Beer-Lambert. Après absorption des photons, les fluorophores sont dans un état excité S_1^* . On définit alors le rendement quantique de fluorescence (Φ_{fluo}), qui est constant, comme le rapport entre le nombre de photons émis (I_F) à une longueur d'onde donnée et le nombre de photons absorbés (I_A) par la molécule (35).

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A} \quad (35)$$

En appliquant ce rapport à la loi d'absorption de Beer-Lambert, on obtient l'équation 36, simplifiée au cas d'une solution diluée.

$$I_F = \Phi_F \times I_0 \times \varepsilon \times \text{larg} \times c \quad (36)$$

Avec (c) la concentration de l'échantillon, (ε) le coefficient d'extinction molaire et (larg) la largeur du canal de séparation mesurée l'intersection avec les guides optiques.

D'après l'équation 36, il apparaît que pour une lumière incidente donnée, l'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à la concentration des molécules en solution.

Afin d'établir des courbes d'étalonnage de notre système, nous avons testé différentes concentrations de rhodamine 6G (diluée dans un tampon borate 10 mmol/L, pH=9,2) et mesuré l'intensité de la fluorescence émise. Ces mesures ont été réalisées avec les arrangements optiques : « tout intégré », « excitation intégrée » et « fibré » présentés préalablement.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans la figure 41.

Dans les 3 configurations optiques, nous obtenons une relation linéaire entre l'intensité de la fluorescence et la concentration des molécules en solution. Ces courbes possèdent toutes, des coefficients de corrélation supérieurs à 0,99 ce qui montre que les études sont faites dans le domaine de validité de la loi de Beer-Lambert. Par conséquent, il est possible de quantifier la concentration de marqueurs cancéreux en fonction de l'intensité de la fluorescence acquise.

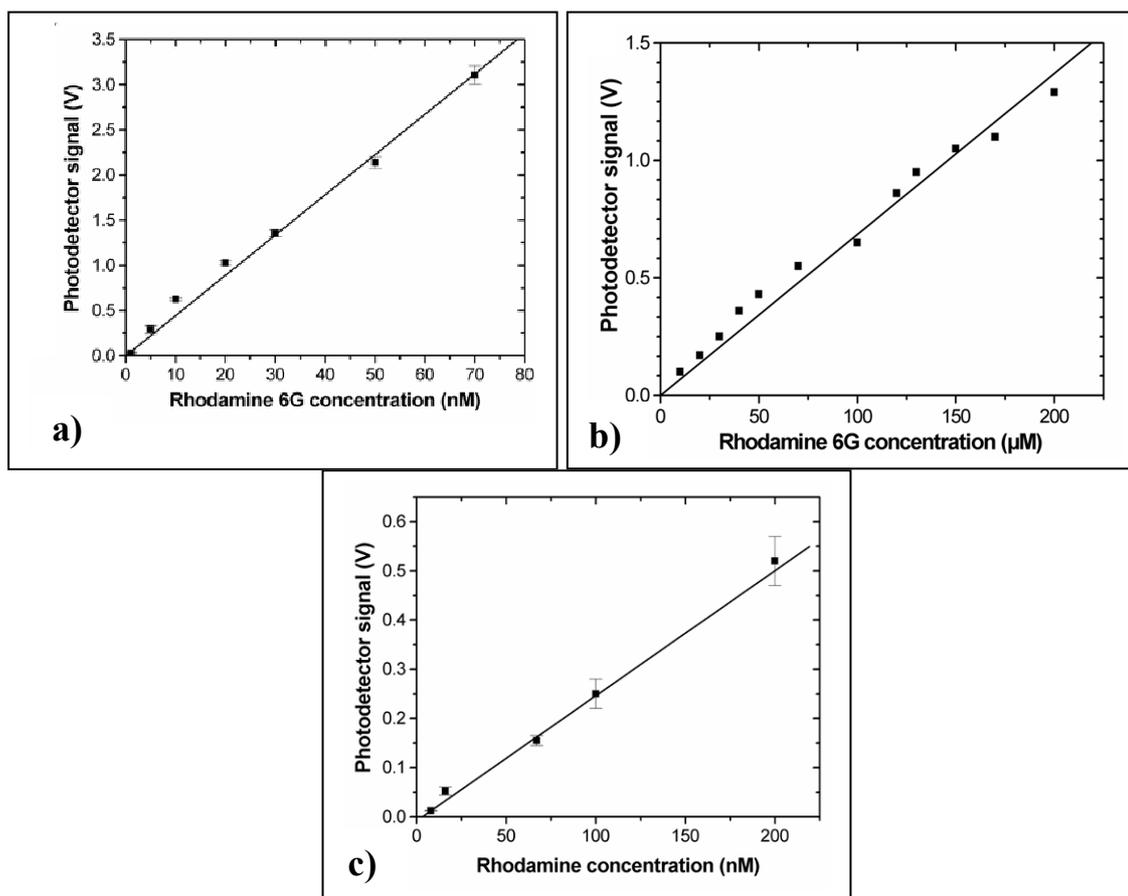


Figure 41 : Courbes d'étalonnage obtenues selon différents arrangements optiques. a) Configuration « excitation intégrée », b) Configuration « toute intégrée », c) Configuration « fibrée ».

Parallèlement à ces caractérisations, nous avons également étudié les limites de détection et de quantification de notre système.

Traditionnellement, la limite de détection mesurée est définie comme étant la plus petite quantité observable d'un analyte. La concentration de cet analyte doit être différente du signal généré par le solvant seul, ainsi que des oscillations statistiques. En général, cette limite correspond à un rapport signal/bruit supérieur à 3. Ce qui équivaut à dire qu'il y a un risque de 0,13 % de conclure à la présence de la substance recherchée alors qu'elle est absente³⁰³.

Rousseau définit la limite de détection théorique comme étant le signal pour lequel l'indice de confiance est d'au moins 0,05 %³⁰⁴. Ainsi nous estimons que, sur notre banc de caractérisation, les limites de détection théoriques avoisineraient les 0,19 nmol/L de rhodamine 6G.

La limite de quantification se définit comme étant la plus petite concentration ou teneur d'analyte pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable. Elle correspond à

un rapport signal/bruit supérieur à 10. Ce rapport équivaut à un risque de 0,5 pour 1000 de conclure de manière erronée que la substance recherchée est présente³⁰³.

Les limites de détection et de quantification qui ont été obtenues de manière reproductible (analyses refaites trois fois) sont regroupées dans le tableau 6.

Configuration	Limite de détection mesurée ($\mu\text{mol/L}$)	Limite de quantification ($\mu\text{mol/L}$)
excitation intégrée (canal gravé chimiquement)	5×10^{-4}	2×10^{-3}
Toute intégrée	1	5
Fibrée	10^{-3}	5×10^{-2}
Excitation intégrée (canal gravé en RIE)	0,1	0,4

Tableau 6 : Limites de détection et de quantification mesurées selon différents arrangements optiques

C'est la configuration où seule l'excitation est intégrée qui nous a fourni la meilleure limite de détection. Ainsi, nous sommes parvenus à détecter 0,5 nmol/L de rhodamine 6G. A partir de ce résultat et d'un calcul simple, il est possible d'approximer le nombre de molécules détectées. En effet, si l'on considère que la largeur du champ d'excitation est de 20 μm , et que les canaux font 20 μm de profondeur pour 80 μm de large, nous pouvons estimer le volume présent dans la zone de détection à 32 pL. Comme le canal de séparation est rempli d'une solution de rhodamine à 0,5 nmol/L, nous calculons qu'il y a environ $1,60 \times 10^{-20}$ moles de rhodamine 6G dans cette zone. Par conséquent, il apparaît que dans cette configuration nous détectons 9635 molécules de rhodamine 6G au niveau de la zone de détection.

Pour de faibles concentrations, nous avons remarqué que dans cet arrangement optique, le profil d'émission de la fluorescence était particulier. Au lieu de visualiser un faisceau fluorescent présent sur la largeur de la colonne, nous ne détectons plus qu'une émission localisée au niveau des déformations présentes à l'interface guide optique-canal (figure 42). Nous pensons que ces défauts sont assimilables à des miroirs concaves, ce qui augmente localement l'intensité de l'excitation lumineuse.

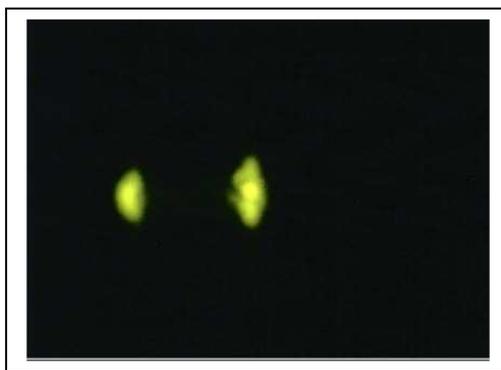


Figure 42 : Emission de fluorescence après excitation de 2,7 nmol/L de rhodamine 6G

Bien que nous n'utilisons qu'un photodétecteur silicium, ce résultat est comparable aux limites de détection obtenues, par d'autres scientifiques, avec un photomultiplicateur³⁰⁵. Lorsque la concentration des fluorophores devient très faible (quelques nmol/L), il est nécessaire d'utiliser le maximum de la puissance de la source excitatrice (50 mW). Cependant, il a été démontré qu'une irradiation laser trop intense, provoquait une photo-dégradation (ou photobleaching) des fluorophores³⁰⁶.

En fait, le cycle d'absorption-émission de la fluorescence est répété jusqu'à ce que la molécule ne soit plus capable d'absorber d'énergie à la longueur d'onde du laser utilisé. A cause de cette destruction des molécules, l'intensité de la fluorescence n'est pas stable mais décroît rapidement au cours du temps (figure 43).

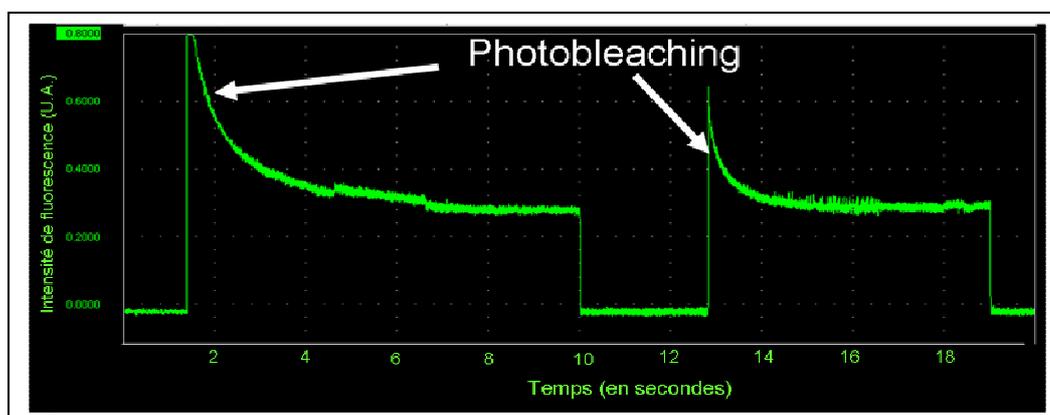


Figure 43 : Démonstration du phénomène de « photobleaching » en fonction du temps. Excitation de 2 nmol/L de rhodamine 6G par un laser Nd-Yag doublé de 100 mW.

La pente de cette courbe est d'autant plus importante que les concentrations analysées sont proches des limites de détection du système. Nous pensons donc que la limite de détection obtenue pourrait être encore améliorée en utilisant un photomultiplicateur ou un photodétecteur dont le temps de réponse est plus court. En outre, les propriétés optiques et physiques des fluorophores varient en fonction de la composition chimique.

Ainsi, la fluorescence de certaines molécules aura une durée de vie plus grande, ou une meilleure moyenne de photo-dégradation²²⁰.

En revanche, La configuration toute intégrée apparaît beaucoup moins sensible avec des limites de détection de 1 $\mu\text{mol/L}$. Il apparaît clair que dans cet arrangement, il est beaucoup plus difficile de s'affranchir du signal de la source d'excitation, ce qui conduit à un signal plus important pour le solvant.

Enfin, la configuration fibrée possède un potentiel intéressant car elle combine les avantages des deux arrangements précédents. Tout d'abord, la fibre est en contact avec le PDMS, elle est donc très proche de la zone de détection en comparaison à la hauteur d'un objectif de microscope. En outre, elle est positionnée à la verticale de cette zone ce qui réduit l'éblouissement provenant de la lumière laser. Ainsi, la limite de détection avec cette configuration est évaluée à 1 nmol/L .

7.4 Distribution de la lumière

La distribution de la source laser dans les laboratoires sur puce, nous permet d'exciter différentes régions du microsystème ou différents canaux simultanément. Pour assurer cette distribution, l'IMEP-INPG a conçu des guides possédant une jonction en Y (Fig. 18). Ce pied du Y est aligné avec une fibre optique (reliée à un laser) au niveau de la tranche du substrat. Le pied se divise ensuite en deux branches. Au niveau du canal de séparation, ces branches sont distantes de 1,7 mm. La faisabilité d'une excitation de fluorophores au travers d'un tel composant est illustrée dans la figure 44b dans laquelle on visualise deux émissions de fluorescence localisées aux interfaces entre les bras de la jonction Y et le canal.

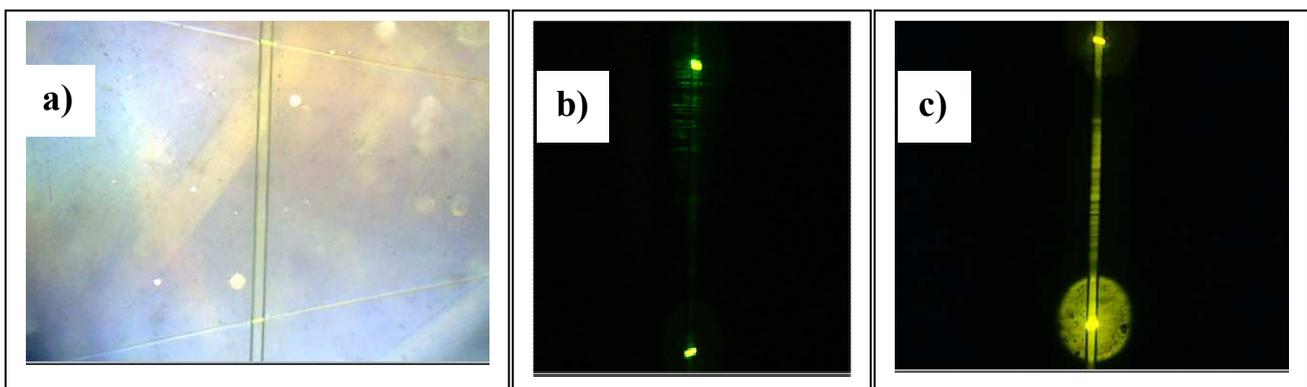


Figure 44 : a) Intersection entre un canal microfluidique et les deux branches d'une jonction Y. b) Emission de fluorescence localisée en différentes régions du canal microfluidique. c) Emission de fluorescence privilégiée dans l'une des zones de détection.

Les premiers résultats montrent que des pertes importantes sont générées lors de la division d'un guide en deux branches. Ce sont ces pertes qui provoquent l'excitation des fluorophores présents dans la région du canal comprise entre les deux intersections canal-branches de la jonction Y (figure 44c).

Nous pensons que ces pertes sont causées par des défauts de fabrication lors des étapes de photolithographie. Il en résulte, que la jonction Y réalisée est très sensible à l'angle d'incidence donné à la lumière excitatrice lors de l'alignement entre le guide et la fibre optique. Ce couplage nécessite donc un contrôle très précis.

Nous avons constaté que cette sensibilité pouvait être avantageuse. En effet, nous avons observé qu'en modifiant l'angle de cet alignement, nous pouvions moduler l'intensité de la lumière excitatrice dans les branches. Il devient alors possible d'augmenter l'intensité de cette lumière dans l'une des branches afin d'exciter préférentiellement une zone du canal microfluidique, contenant des molécules plus faiblement exprimées (figure 44c).

Des travaux récents, effectués en collaboration avec Benjamin Hannes, ont été entrepris afin de fonctionnaliser la région du canal présente entre les bras de la jonction Y. Nous envisageons de tamponner un anticorps dans cette zone préalablement silanisée. L'objectif de cette immobilisation d'anticorps est de pouvoir retenir spécifiquement un antigène présent dans un mélange de molécules. Nous espérons ainsi pouvoir comparer les électrophérogrammes obtenus en amont et en aval de cette zone. De sorte que nous observions en aval de cette zone, la diminution ou la disparition d'un pic, si l'antigène est spécifiquement retenu par l'anticorps.

8 Caractérisations des mécanismes électrocinétiques

Le but de ce chapitre est de pouvoir déterminer les conditions expérimentales qui seront utilisées lors des séparations de biomolécules dans les laboratoires sur puce. Dans un premier temps, nous devons déterminer quels sont les champs électriques qui pourront être appliqués lors des analyses. Ensuite, nous devons caractériser la valeur du flux électroosmotique et du flux électrophorétique afin de prévoir l'ordre d'apparition des solutés devant la cellule de détection. Enfin, nous présenterons les méthodes d'injection électrocinétiques utilisées dans les laboratoires sur puce pour garantir des séparations de bonne qualité. Etant donné que très peu de microsystèmes hybrides, combinant une surface usinée en verre et un capot en PDMS, sont décrits dans la littérature, les caractérisations électrocinétiques de notre dispositif sont indispensables.

8.1 La relation tension-intensité

Tout d'abord, nous devons définir quels sont les champs électriques appliqués lors des séparations de molécules. On détermine la tension maximale applicable en étudiant la relation qui existe entre la tension et l'intensité électrique. Pour cette analyse, les canaux microfluidiques et les réservoirs sont remplis d'une solution contenant 10 mmol/L de tampon borax (tétraborate de sodium) à pH 9,2. Nous avons choisit de travailler avec ce tampon car il possède une très faible conductivité. Il devrait donc nous permettre d'exploiter des champs électriques importants sans provoquer des échauffements thermiques trop élevés³⁰⁷.

Les tensions générées par une alimentation haute tension (HVS448-3000D, Labsmith, USA) sont appliquées dans les réservoirs par le biais d'électrodes en platine. Ces électrodes sont placées au centre des réservoirs grâce à des micro-positionneurs aimantés. Ensuite, l'intensité électrique est mesurée aux bornes d'une résistance additionnelle R1 de 1 M Ω selon le schéma de la figure 45. Les mesures sont enregistrées par un ampèremètre (modèle 2400, Keithley) sur une gamme allant de 0 à 3000 V avec un pas de mesure de 50 V. Avant l'enregistrement de chaque mesure, le système est équilibré pendant 5 secondes.

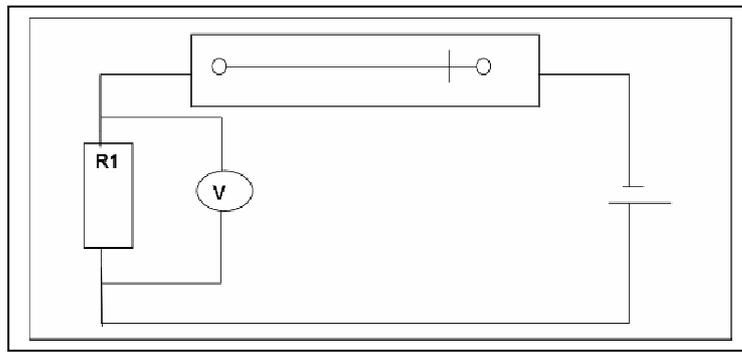


Figure 45 : Schéma du montage utilisé lors de l'établissement de la loi d'Ohm

Comme on peut le voir sur la figure 46, on obtient une réponse proportionnelle entre la tension générée et l'intensité électrique mesurée. Cette relation vérifie que notre système obéit à la loi d'Ohm sur la gamme de tension testée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Spehar et ses collaborateurs pour des microsystèmes PDMS/PDMS et hybrides PDMS/verre (canal en PDMS). Ils ont montré que l'intensité électrique évoluait linéairement jusqu'à 800 V/cm en présence de 20 mmol/L de tampon phosphate³⁰⁸.

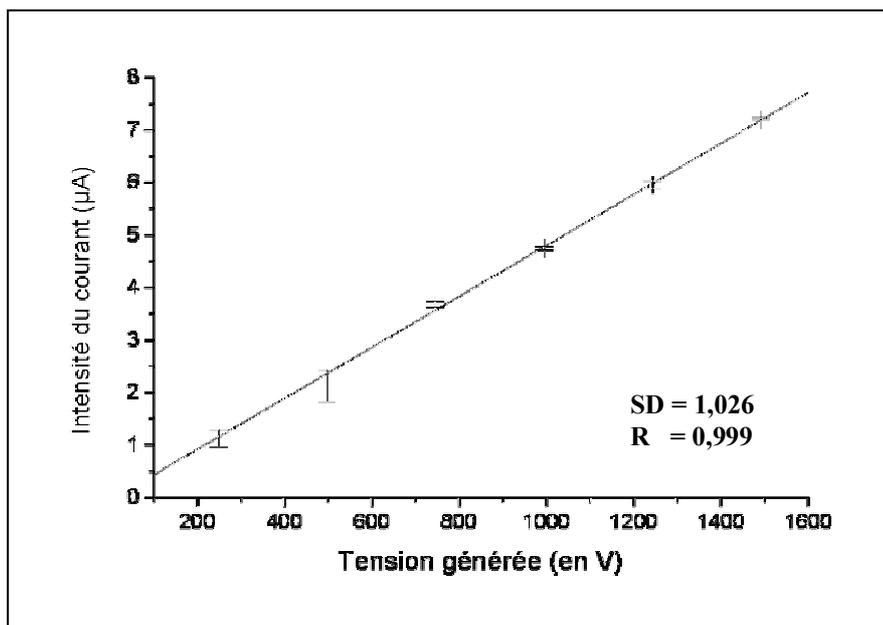


Figure 46 : Relation entre l'intensité électrique mesurée et la tension fournie. Le canal de 5 cm de long contient un tampon borax de 10 mmol/L. SD représente la déviation standard et R le coefficient de corrélation.

Nous estimons la résistance du tampon dans le canal microfluidique à $206 \pm 1,5 \text{ M}\Omega$.

Cette relation entre l'intensité et la tension nous informe également sur la dispersion des échauffements thermiques. Comme l'intensité électrique évolue linéairement en fonction de la tension appliquée, nous pouvons estimer que la chaleur est correctement dissipée sur la gamme de tension testée. La dispersion par effet joule décrite dans le paragraphe 3.2.4 est

donc faible jusqu'à 1500 V lorsque le capillaire est rempli d'un tampon borax de 10 mmol/L. Pour que les conditions de séparation soient optimales, il ne faut pas que la puissance générée dans le canal excède 1 W/m^{309} . Dans notre cas, compte tenu de la longueur totale du canal (5 cm), nous estimons que la valeur de cette puissance vaut environ 0,01 W. Il apparaît donc que l'utilisation de canaux de petite taille nous permet d'appliquer des champs électriques allant jusqu'à 300 V/cm avec une dispersion thermique suffisante³⁰⁸. A titre de comparaison, l'application d'un champ électrique de 300 V/cm dans un capillaire de 30 cm de long et de 50 μm de diamètre provoque, en absence de régulation thermique, l'ébullition du tampon de migration³¹⁰.

8.1.1 Influence de la force ionique

Il a été décrit dans la littérature, que la force ionique ou la concentration de l'électrolyte en solution peut réduire l'adsorption des protéines⁴⁴. En effet, un tampon possédant une force ionique élevée limitera davantage les interactions électrostatiques, qu'un électrolyte possédant une force ionique plus faible. D'après l'équation 10 décrite dans le chapitre 3.2.2, nous savons qu'une élévation de la force ionique compresse la double couche électrique. Cette compression, s'accompagne d'une diminution de la valeur du potentiel Zêta, et, par conséquent, d'une baisse de la mobilité électroosmotique (équation 12, chapitre 3.2.2). Ainsi, en augmentant la force ionique de l'électrolyte de migration, nous augmentons aussi le temps de résidence des molécules ce qui améliore la résolution d'une séparation⁴⁹.

Cependant, il a été rapporté que l'utilisation d'électrolyte concentré pouvait provoquer une élévation significative de l'intensité électrique³¹¹. Or, d'après l'équation 31 décrite dans le chapitre 3.2.4.3, nous savons qu'une augmentation de l'intensité du courant s'accompagne d'une élévation de la température et d'un élargissement des pics à cause des échauffements par effet Joule.

Nous avons choisit de travailler principalement avec des tampons Borate et Borax car ils possèdent de faibles conductivités. Ainsi, l'utilisation de solutions concentrées ne devrait pas provoquer d'augmentation trop rapide de l'intensité électrique.

Afin de déterminer quelles étaient les concentrations de tampon borax utilisables lors des séparations, nous avons mesuré la valeur de l'intensité électrique en fonction de la tension appliquée sur une gamme de concentrations allant de 5 mmol/L à 100 mmol/L de tampon

Borax. Si un échauffement thermique prend place pour une concentration donnée, nous observons une perte de linéarité de la courbe $I=f(U)$ (figure 47).

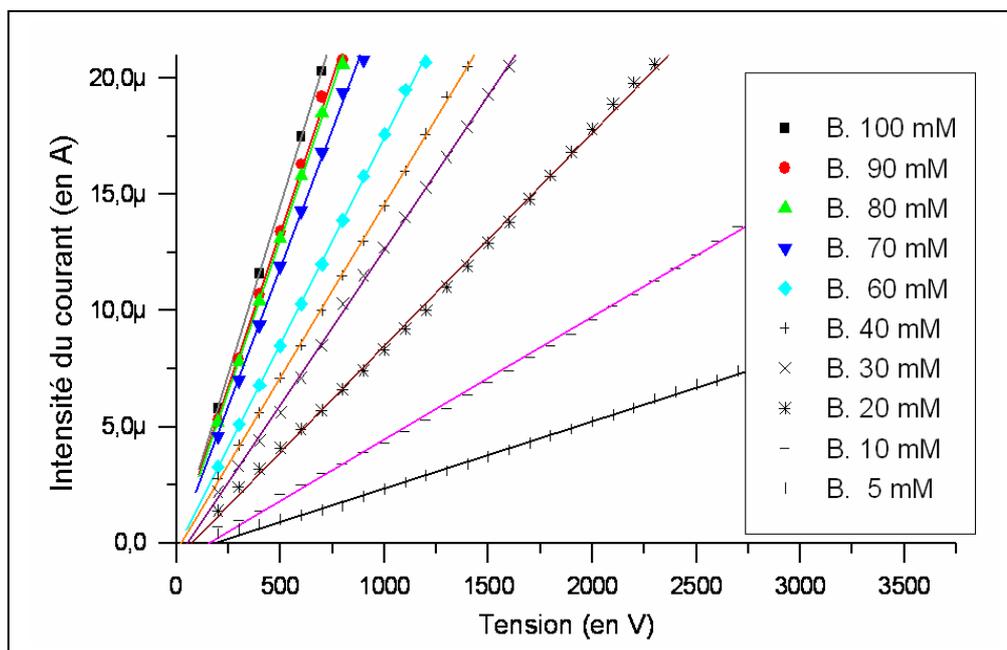


Figure 47 : $I=f(U)$ pour différentes concentrations de tampon tétraborate de sodium.

En général, dans les laboratoires sur puce, il est préférable de travailler avec des intensités de courant inférieures ou égales à $20 \mu\text{A}$. D'après la figure 47, nous n'avons pas observé de perte de linéarité des courbes $I=f(U)$ pour les différentes concentrations testées. Il apparaît clairement, que la résistance mesurée aux bornes du capillaire diminue très rapidement lorsque l'on augmente la concentration du tampon.

Les expériences de séparation seront mises en œuvre en présence de champs électriques allant jusqu'à 300 V/cm . Comme les canaux de séparation mesurent 6 cm , cela correspond à des tensions générées de l'ordre de 2000 V . Donc, d'après les résultats décrits dans la figure 47, des concentrations de tampon borax comprises entre 5 mmol/L et 20 mmol/L semblent bien adaptées à nos expériences.

8.1.2 Influence de l'ajout de solvants organiques

Si les besoins de l'expérience nécessitent de travailler avec des concentrations de tampon supérieures à 20 mmol/L , il est tout de même possible d'utiliser de telles concentrations en prenant quelques précautions. Par exemple, les appareils d'électrophorèse capillaire P/ACE commercialisés par Beckman-Coulter, intègrent un module de refroidissement du capillaire pour limiter les échauffements. Dans notre cas, nous n'avons pas réussi à intégrer un tel module au banc de caractérisation. Par conséquent, nous avons

testé une approche un peu différente, dans laquelle on ajoutait des additifs chimiques au tampon de migration. Il a été décrit dans la littérature, que l'ajout de solvants organiques dans l'électrolyte de séparation pouvait améliorer la résolution d'une séparation³¹²⁻³¹⁴. Cet ajout modifie la viscosité et la constante diélectrique de l'électrolyte de migration, ce qui a une influence directe sur la mobilité électrophorétique, la mobilité électroosmotique et l'échauffement thermique^{31, 315}.

Dans le cadre de cette expérience, nous avons ajouté différentes quantités d'éthanol, de propan-1-ol et d'acétonitrile (données non présentées) aux 15 mmol/L du tampon borax. La figure 48 illustre l'influence de ces additifs sur les mesures d'intensité électrique obtenues pour différentes tensions appliquées.

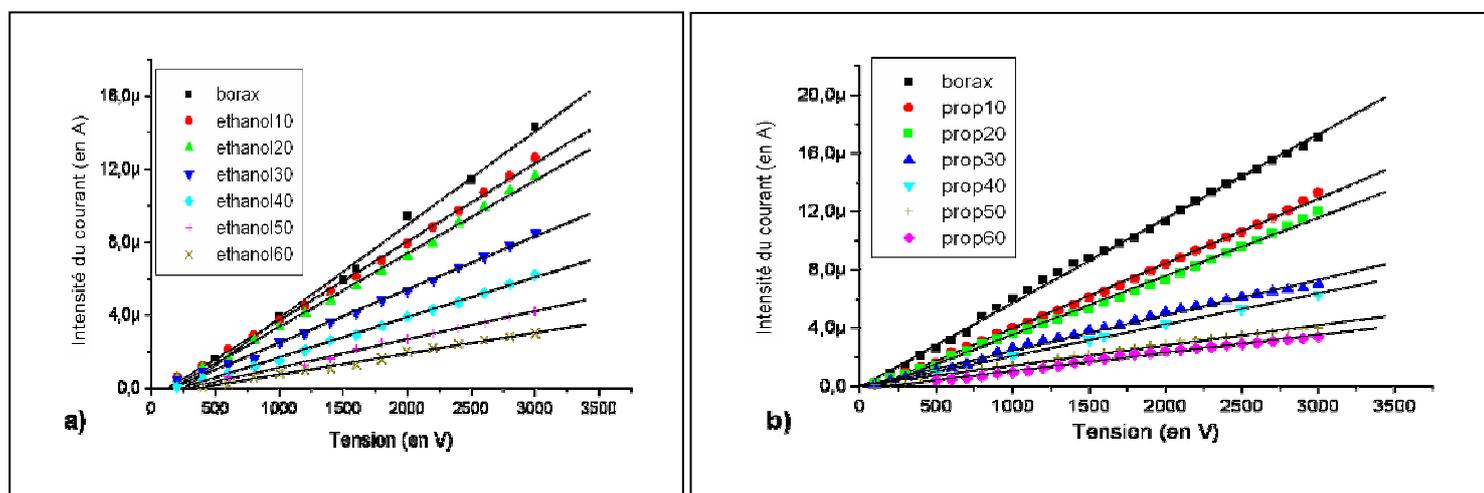


Figure 48 : Intensité électrique mesurée en fonction de la tension appliquée, mesures faites en présence de solvant organique dans le tampon de migration. Le pourcentage de solvant ajouté au tampon borax est précisé dans les inserts des figures. a) Influence de l'ajout d'éthanol, b) Influence de l'ajout de propan-1-ol.

En regard des résultats obtenus, nous confirmons que la présence d'éthanol et de propan-1-ol dans le tampon de migration conduit à une diminution de l'intensité mesurée. Ces résultats montrent également que l'intensité évolue linéairement avec la tension fournie, et cela quelque soit le pourcentage de solvant présent en solution.

Grâce à ces additifs, nous pourrions, si c'est nécessaire, travailler avec des tensions allant jusqu'à 3000 V.

Dans ces expériences, nous n'avons pas étudié le comportement de l'intensité du courant pour des quantités de solvants organiques supérieures à 60 %. Car, il a été décrit que la mobilité électroosmotique devenait instable en présence de concentrations élevées de solvant³¹⁴.

Par ailleurs, comme les laboratoires sur puce que nous développons sont dédiés à l'analyse de protéines, il est important que la quantité de solvants organiques présente dans le tampon soit relativement faible, à cause d'une forte affinité des solvants pour les régions hydrophobes des protéines. Si leur concentration est trop forte, la solubilité des molécules va fortement décroître conduisant à une précipitation et à une dénaturation des protéines en solution.

Compte tenu des résultats obtenus, nous pouvons envisager, lors des expériences d'électrophorèse de protéines, d'ajouter 10 % d'éthanol ou d'isopropanol dans le tampon de migration afin d'accroître la force des champs électriques appliqués.

8.2 Etudes expérimentales du flux électroosmotique

Comme on a pu le voir dans les chapitres précédents, le déplacement de l'électrolyte par électroosmose est très utilisé lors des séparations dans les laboratoires sur puce. En effet, cette méthode de pompage n'exige pas de volume mort et ne nécessite pas d'éléments mécaniques externes. Comme nous souhaitons exploiter ce système de pompage lors de nos séparations, il est important de caractériser la vitesse de ce flux. Les laboratoires sur puce que nous réalisons sont composés d'un canal microfluidique usiné dans le verre et d'un capot en PDMS natif. Grâce aux travaux de Van Wagenen, d'une part, et de Ocvirik, d'autre part, nous savons que le PDMS natif possède des charges négatives à sa surface en milieu neutre ou basique³¹⁶. Ses charges sont présentes en quantité suffisante pour permettre la mobilisation électroosmotique d'un tampon dans un canal fabriqué en PDMS natif³¹⁷.

Etant donné que 75 % de la surface des parois des canaux microfluidiques est composé de verre, pour 25 % de PDMS, nous pensons que ce sont les charges négatives des fonctions silanols du verre qui seront essentiellement responsable du mouvement. Nous prévoyons donc que le flux électroosmotique sera cathodique. A ma connaissance, la combinaison d'un canal en verre et d'un capot en PDMS n'a pas encore été rapportée dans la littérature. Il est donc essentiel de déterminer expérimentalement la valeur de la mobilité électroosmotique dans nos microsystèmes.

8.2.1 La vitesse électroosmotique

Le flux électroosmotique peut-être caractérisée par plusieurs méthodes.

Dans un premier temps, la vitesse peut-être estimée directement en imageant le déplacement de molécules ou de particules fluorescentes sur une période donnée (micro PIV (Particle Image Velocimetry))^{318, 319}. En micro PIV, le fluorophore utilisé doit être neutre de sorte que le mouvement observé ne soit imputable qu'au flux électroosmotique. Cette méthode requiert la présence de fluorophores activables par une intense irradiation UV. En fait, ces fluorophores sont modifiés chimiquement avec des dérivés nitrobenzéniques, de sorte qu'ils ne soient pas fluorescents. La « photo-injection », localisée de ces molécules fluorescentes libres, s'opère lorsque la solution est exposée à une excitation UV. Cette irradiation UV provoque la cassure des cages, formées par les dérivés nitrobenzéniques, et libère les fluorophores. L'ensemble de la solution est ensuite excité. Nous visualisons ainsi le déplacement d'une petite zone fluorescente correspondant aux fluorophores libres migrant dans le canal microfluidique. La vitesse de l'électroosmose est calculée à partir des images de cette zone transportée. La fiabilité de cette technique directe de visualisation est limitée par le phénomène de diffusion, qui génère un front de migration difficile à estimer précisément¹⁹. De plus, les molécules fluorescentes modifiées chimiquement avec ces dérivés d'emprisonnements sont chères.

D'autres techniques d'imagerie indirectes existent pour déterminer le flux électroosmotique. Par exemple, il est possible d'évaluer ce flux en remplissant le canal de séparation d'une solution fluorescente et en mesurant la vitesse d'une micro-bulle d'air injectée³²⁰. Cette bulle est opaque, elle va donc former une zone obscure dans l'électrolyte fluorescent de migration. De plus, cette bulle d'air possède un indice de réfraction de la lumière différent de celui du liquide. Nous aurons donc formation d'une micro-lentille au niveau de l'interface air-liquide. La fluorescence du liquide sera donc plus intense à proximité de l'interface qu'ailleurs dans le canal. La vitesse électroosmotique, sous un champ électrique, est ensuite estimée à partir des images de déplacement de cette zone d'intense fluorescence.

Cette approche d'extinction localisée de la fluorescence a également été utilisée par Pittman et ses collaborateurs³²¹. Dans ces travaux, la fluorescence est éteinte par une intense irradiation laser localisée sur une région du canal. Ainsi, les fluorophores présents sont détruits de telle sorte qu'ils ne puissent plus être excités. Dans ce cas, c'est le mouvement de cette zone non fluorescente qui est étudié.

Une dernière méthode appelée détection par fluorescence indirecte, plus simple à mettre en œuvre que les deux précédentes, est fréquemment employée pour déterminer le flux électroosmotique³²²⁻³²⁴. Dans cette technique, le canal microfluidique est rempli d'un électrolyte contenant un fluorophore organique. La zone non fluorescente est obtenue en injectant électriquement ou par pression, un volume d'eau ou de solvant (acétone, éthanol) dépourvu de fluorophores. Ainsi, sous l'application d'un champ électrique, cette zone est déplacée uniquement par électrosmose.

Cependant, par ces méthodes, la vitesse du flux électroosmotique est difficile à évaluer compte tenu des dimensions des canaux microfluidiques (largeur de 80 μm) et des faibles débits générés.

D'autres approches, moins directes ont été mises en œuvre pour déterminer expérimentalement le flux électroosmotique. La méthode indirecte la plus utilisée pour caractériser ce flux est la méthode ampérométrique développée par l'équipe de Zare en 1988³²⁵. Elle nécessite de préparer deux électrolytes possédant des forces ioniques voisines^{317, 326}. Le canal microfluidique est tout d'abord rempli avec une solution de concentration donnée. Puis, on mesure les variations de l'intensité électrique lors du pompage électroosmotique d'une deuxième solution en remplacement de la première initialement présente.

Afin de pouvoir distinguer plus précisément cette différence de concentration, une méthode d'ampérométrie indirecte a été développée. Dans cette technique, on détecte par électrochimie, les variations de potentiel de l'oxygène dissout qui s'opèrent lors du changement de la concentration de la solution³²⁷.

8.2.1.1 La méthode ampérométrique

Plusieurs publications ont démontré l'intérêt de la méthode ampérométrique pour déterminer la mobilité électroosmotique. Cette méthode a été mise en œuvre dans des canaux fabriqués en verre^{317, 322}, en PDMS^{317, 322, 328}, en matériaux composites^{329, 330}, ou pour des colonnes hybrides PDMS/verre^{308, 309}.

En fait, cette méthode est basée uniquement sur une différence de conductivité.

Les canaux et le réservoir B sont remplis d'un tampon borax de 20 mmol/L par capillarité. Le réservoir A quant à lui contient une solution légèrement diluée de tampon borax à 15 mmol/L. Il est important que les volumes présents dans les réservoirs soient égaux pour éviter un phénomène de siphonage. Les concentrations doivent être relativement proches

pour que l'on puisse approximer que le potentiel ζ est constant. Les électrodes sont positionnées dans les réservoirs et les potentiels électriques sont appliqués de sorte que l'électrolyte se déplace du réservoir A vers le réservoir B (figure 49).

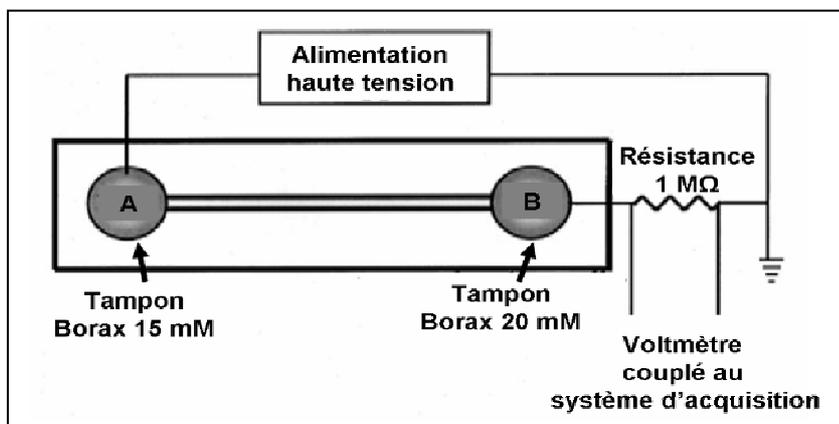


Figure 49 : Schéma du montage utilisé lors des mesures ampérométriques. Le tampon A dilué va remplacer le tampon B déjà présent dans le canal. La tension est mesurée aux bornes d'une résistance additionnelle R_1 de $1\text{ M}\Omega$.

Le champ électrique est ensuite appliqué à 154 V/cm afin de mobiliser la solution la plus diluée dans le canal de séparation. Au cours de l'analyse, les variations de l'intensité électrique sont enregistrées en fonction du temps aux bornes d'une résistance additionnelle de $1\text{ M}\Omega$ branchée en série. Le remplacement de l'électrolyte initialement présent par un électrolyte s'accompagne d'une modification de la résistance totale dans le capillaire, ce qui se traduit par une variation de l'intensité. Lorsque le tampon de faible force ionique migre dans le canal microfluidique en remplacement du tampon de 20 mmol/L initialement présent, l'intensité du courant diminue jusqu'à ce que le tampon atteigne le réservoir B, puis elle se stabilise et devient constante. Nous observons alors la formation d'une asymptote sur la figure 50. Après stabilisation, les réservoirs sont reconditionnés avec de nouvelles concentrations d'électrolyte de sorte que l'on enregistre également le remplacement de la solution diluée de 15 mmol/L par une solution concentrée de 20 mmol/L . Dans ce cas, l'intensité augmente, sous l'application d'un champ électrique, durant la migration de l'électrolyte introduit avant de se stabiliser.

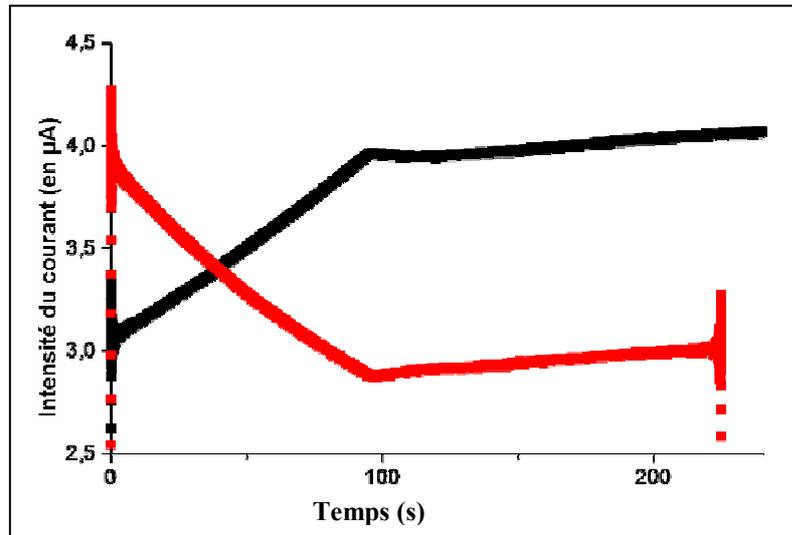


Figure 50 : Etude ampérométrique du flux électroosmotique. La courbe rouge correspond au remplacement d'une solution concentrée par une solution plus diluée. La courbe noire représente la substitution d'une solution diluée par une solution plus concentrée.

A partir de ces courbes, il est possible de déterminer le flux électroosmotique selon l'équation 37.

$$V_{eof} = \frac{L}{\Delta_t} \quad (37)$$

Où Δ_t , représente la durée requise pour obtenir une valeur stable de l'intensité. L représente la longueur totale du canal de séparation. Cette expérience a été reproduite trois fois sur le même dispositif et nous avons estimé que sous l'influence d'un champ électrique de 200 V/cm, la vitesse de l'électroosmose était de $0,094 \pm 0,002 \text{ cm.s}^{-1}$. Comme nous utilisons un tampon borax à un pH de 9,2, le nombre de groupements silanols ionisés à la surface du verre est maximum, ce qui conduit à une vitesse électroosmotique importante³¹.

En comparaison, un laboratoire sur puce commercial (tout en verre) fournit par Micronit (X3530, The Enschede, Hollande) génère un flux électroosmotique de $0,145 \text{ cm.s}^{-1}$ pour un champ électrique de 300 V/cm. Nous pouvons donc supposer que la couche de polymère PDMS utilisé comme capot dans notre architecture hybride ralentit le flux électroosmotique.

Ces données comparatives sont résumées dans le tableau 7.

	Tampon de migration	Champ électrique (V/cm)	Vitesse électroosmotique (cm/s)
Verre/verre (Micronit)	Borax 10 mM pH=9,2	300	0,145
PDMS/verre (canal en verre)	Borax 10 mM pH=9,2	200	0,094

Tableau 7 : comparaison des flux électroosmotiques obtenus avec des microsystèmes en verre, en PDMS ou hybrides.

Bien qu'étant relativement simple cette méthode de calcul reste difficile à appliquer expérimentalement. En effet, il n'est pas toujours évident de définir exactement le moment où la phase de transition prend fin. A cause des fluctuations d'intensité observées lors des mesures, une erreur significative peut être introduite sur l'estimation de la durée d'échange.

C'est pour cette raison que nous avons évalué une autre méthode de calcul, décrite par Ren et ses collaborateurs, pour estimer la vitesse électroosmotique moyenne dans un microcanal³³¹. Cette méthode estime ce flux en fonction de la pente de la droite intensité en fonction du temps, enregistrée lors de l'échange d'une solution A par une solution B. Cette approche ne peut être utilisée que si les concentrations des solutions sont peu différentes. En effet, cette méthode de calcul par la pente utilise le postulat selon lequel des solutions de concentrations proches possèdent un potentiel Zêta constant lors du remplacement des électrolytes. Par conséquent, le flux électroosmotique est considéré également constant. Ce résultat traduit également que la résistance électrique du liquide dans le capillaire évolue de façon linéaire. Ainsi, la pente de la courbe intensité en fonction du temps reste constante au cours de l'échange (38).

$$pente = \frac{\Delta I}{\Delta t} = v_{eof} \times \frac{E \times A \times (\lambda_A - \lambda_B)}{L} \quad (38)$$

Avec v_{eof} , la vitesse moyenne de l'électroosmose, A , la surface du capillaire et λ_A la conductivité du tampon A.

D'après la définition de la résistance spécifique du canal, la conductivité peut s'exprimer selon l'équation 39.

$$\lambda_A = \frac{L}{R_A \times A} \quad (39)$$

Ainsi en combinant les équations 38 et 39, on obtient l'expression de la vitesse électroosmotique en fonction de la variation d'intensité et de la résistance des tampons en présence (40).

$$\overline{v_{eof}} = \frac{pente}{E} \times \frac{1}{\left(\frac{1}{R_A} - \frac{1}{R_B} \right)} \quad (40)$$

Les résistances R_B et R_A des tampons B et A sont estimées expérimentalement à partir des variations de l'intensité obtenue pour une tension donnée. Ainsi, R_A est approximée à 268 M Ω et R_B à 215 M Ω . Par cette méthode de calcul, nous obtenons une vitesse électroosmotique de 0,093 cm/s ce qui est tout à fait comparable au 0,094 cm/s obtenu par la méthode des asymptotes décrite préalablement.

8.2.1.2 Estimation de la vitesse électroosmotique par fluorescence indirecte

La fluorescence indirecte est une méthode alternative et indépendante permettant d'estimer le flux électroosmotique dans un canal microfluidique. Cette technique nécessite d'introduire une solution fluorescente (2 $\mu\text{mol/L}$ de rhodamine 6G) diluée dans un électrolyte de migration (Borax 15 mmol/L, pH=9,2). Une solution neutre contenant un mélange d'eau et d'éthanol est également préparée. A l'état initial, le microcanal est rempli de la solution de rhodamine par capillarité. Une fois le canal rempli, une solution non fluorescente (eau/éthanol) est injectée et mobilisée électriquement jusqu'à la zone de détection.

Si la solution introduite dans le canal de séparation est une solution aqueuse, cet échantillon neutre est détecté sous la forme d'une baisse de l'intensité de fluorescence détectée³²⁴. En revanche, si l'échantillon neutre injecté est une solution organique, comme c'est notre cas, il sera détecté sous la forme d'une augmentation de l'intensité de la fluorescence émise à cause de l'exaltation de la fluorescence en milieu organique. Etant donné que cet échantillon est neutre, il migre uniquement par électroosmose. Ainsi, la vitesse électroosmotique peut être facilement calculée à partir du temps de migration (t_{eof}) de ce mélange neutre (41).

$$v_{eof} = \frac{l}{t_{eof}} \quad (41)$$

Comme précédemment les mesures sont reproduites 3 fois.

Par cette technique, nous avons mesuré, sous l'application d'un champ électrique de 310 V/cm, une vitesse électroosmotique de $0,145 \pm 0,005$ cm/s. Sous un champ électrique équivalent, la méthode ampérométrique permettait d'estimer la vitesse électroosmotique à $0,145 \pm 0,003$ cm/s. Ces deux méthodes indépendantes nous fournissent donc des résultats tout à fait concordants. Grâce à cette estimation de la vitesse électroosmotique, il nous est possible, à présent, de calculer la mobilité électroosmotique, la valeur du potentiel électrocinétique Zêta et, enfin, d'estimer la mobilité électrophorétique de certaines protéines.

8.2.1.3 Evolution de la vitesse en fonction du champ électrique

Les variations de vitesse de l'électroosmose en fonction du champ électrique sont également un indicateur de la qualité de la dissipation thermique le long d'un canal microfluidique.

D'après les résultats obtenus dans la figure 51, il apparaît que la vitesse électroosmotique évolue linéairement en fonction du champ électrique appliqué jusqu'à 250 V/cm conformément aux résultats décrits dans le paragraphe 8.1. En revanche, il semble que dans cette expérience, une perte de linéarité apparaisse pour des champs électriques supérieurs à 300 V/cm. Cette perte de linéarité met en lumière un manque de dissipation thermique pouvant résulter d'un échauffement par effet Joule.

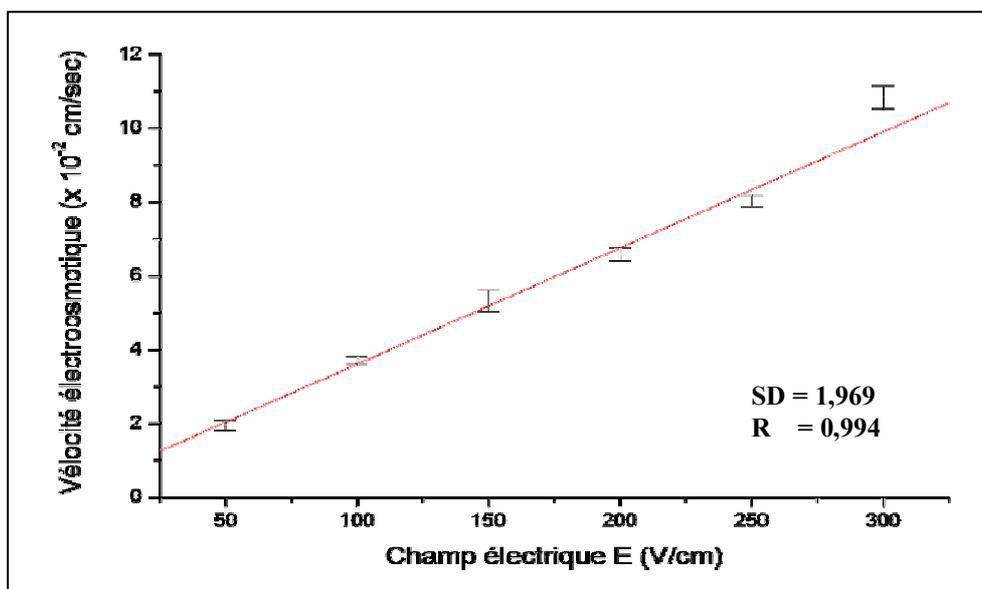


Figure 51 : Evolution du flux électroosmotique en fonction du champ électrique dans un tampon borax de 15 mmol/L. La vitesse est estimée expérimentalement selon l'équation 37.

Compte tenu que cette modification de la température s'accompagne d'une modification de la viscosité du tampon, il est donc préférable que les champs électriques générés lors des séparations ne dépassent pas 280 V/cm en présence d'un tampon Borax de 15 mmol/L, (pH=9,2) comme c'était le cas ici. Si nous souhaitons effectuer des analyses plus rapides sous l'application de champs électriques plus importants, de faibles pourcentages de solvants organiques pourront être ajoutés à l'électrolyte de séparation.

8.2.2 Estimation de la mobilité électroosmotique

A partir des données du flux électroosmotique, il est possible de calculer la mobilité électroosmotique. En combinant les équations 11 et 41, on obtient une estimation de la mobilité électroosmotique (42).

$$\mu_{eof} = \frac{L}{t \times E} \quad (42)$$

Dans le cadre de la méthode ampérométrique, t correspond à la durée de l'échange entre les deux solutions. Tandis, qu'en fluorescence indirecte, t représente le temps de migration du composé neutre et non fluorescent. Les résultats obtenus par ces deux techniques sont résumés et comparés aux données de la littérature obtenues sur d'autres microsystèmes, dans le tableau 8.

Type de substrat	Mobilité électroosmotique (μ_{eof}) (* $10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
PDMS/verre (Ampérométrie LEOM)	$4,73 \pm 0,05$
PDMS/verre (Fluorescence Indirecte LEOM)	$4,7 \pm 0,1$
Verre/Verre ²³⁶	4,75
PDMS/PDMS oxydé ³²²	$5,7 \pm 0,4$
Verre/PDMS (canal en PDMS) ^{308, 317, 332}	$3,7 < \mu_{eof} < 4,0$
PDMS/PDMS natif ³¹⁷	3,28

Tableau 8 : Comparaison des mobilités électroosmotiques calculées avec les données de la littérature avec le même pH et une force ionique comparable.

Il apparaît donc que les deux techniques utilisées nous fournissent des mobilités électroosmotiques voisines. Grâce aux données de la littérature, nous pouvons facilement comparer la mobilité électroosmotique associée à nos laboratoires sur puce hybrides avec celles d'autres microsystèmes fabriqués dans des matériaux différents.

Ainsi, la présence d'un capot en PDMS conduit à une mobilité électroosmotique dans nos laboratoires sur puce comparable à ce qui a été décrit pour des laboratoires sur puce tout en verre. En revanche, cette combinaison hybride nous fournit une mobilité électroosmotique beaucoup plus importante que des substrats fabriqués en PDMS natif.

Pour limiter l'adsorption des protéines sur la surface, et s'affranchir de collage irréversible du PDMS sur le verre sous l'application d'un traitement par un plasma à oxygène, nous avons préféré garder le PDMS sous sa forme native³²⁸. Comme notre capot n'est pas traité avec un plasma à oxygène, le nombre de groupements silanols disponibles dans nos systèmes hétérogènes est inférieur au nombre trouvé dans les substrats PDMS/PDMS oxydé. Il n'en reste pas moins que 75 % du canal microfluidique est recouvert de verre, nous obtenons donc une mobilité électroosmotique plus importante dans nos microsystèmes que dans les laboratoires sur puce où le canal est réalisé en PDMS et le capot en verre (75 % PDMS, 25 % verre).

8.2.3 Estimation de la valeur du potentiel Zêta

Le potentiel Zêta est l'un des paramètres importants à caractériser lorsque l'on étudie les propriétés électrocinétiques de l'interface entre une solution et la surface du capillaire. Il représente, comme on la vu dans le paragraphe 3.2.2, le potentiel électrostatique de la double couche associée à l'interface solide-liquide de nos canaux microfluidiques.

Ce potentiel Zêta (ζ) peut être déterminé expérimentalement à partir des mesures obtenues par la technique ampérométrique (43)³³³.

$$\zeta = \frac{4 \times \pi \times \eta \times \text{pente}}{\epsilon_r \times E^2} \times \frac{1}{\left(\frac{1}{R_A} - \frac{1}{R_B} \right)} \quad (43)$$

Le potentiel Zêta peut également être exprimé en fonction de la mobilité électroosmotique ou de la vitesse électroosmotique en combinant les équations 11, 40, et 43³⁰⁹.

$$\zeta = \frac{4 \times \pi \times \eta \times \mu_{eof}}{\epsilon_r} \quad (44).$$

La viscosité du tampon borate est estimée à 10^{-3} N.s.m⁻², tandis que sa constante diélectrique vaut 80^{236, 334}. Comme les laboratoires sur puce que nous utilisons sont fabriqués par assemblage de verre et de PDMS, le flux électroosmotique est cathodique.

Ainsi, à partir des résultats expérimentaux, nous pouvons estimer la valeur du potentiel Zêta à $\zeta = -83 \pm 1$ mV en présence d'un tampon Borax à 15 mmol/L à pH=9,2.

Une petite comparaison entre la valeur du potentiel Zêta obtenu avec nos microsystèmes et les données de la littérature sont résumées dans le tableau 9.

Dispositif testé	Potentiel Zêta mesuré (en mV)
Verre/PDMS fabriqué au LEOM	- 83 ± 1
Verre/verre (verre sodocalcique) ²³⁶	- 71,9
PDMS/PDMS oxydé ³²⁸	- 80
PDMS/PDMS natif ³³⁵	- 40 < ζ < - 30

Tableau 9 : Comparaison entre les valeurs du potentiel Zêta obtenues et les données de la littérature dans les mêmes conditions expérimentales.

Il apparaît clairement que la présence du PDMS natif n'interfère que peu sur la valeur du potentiel Zêta. Les potentiels électrostatiques mesurés sont comparable aux valeurs décrites pour des microsystèmes fabriqués en verre sodocalcique²³⁶. Ce potentiel Zêta dépend du nombre de groupements silanols ionisés disponibles, il va donc être sensible au pH. Toutes ces caractérisations électrocinétiques confirment qu'il existe un flux électroosmotique important dans nos canaux microfluidiques. Et, que l'utilisation d'un capot en PDMS ne modifie pas de manière préjudiciable les propriétés électriques de notre microsystème.

8.2.4 Evolution du potentiel Zêta au cours du temps

Lors de ces caractérisations électrocinétiques, nous nous sommes rendu compte que la préparation de l'échantillon était une étape cruciale. Les microsystèmes doivent être utilisés directement après avoir été conditionnés en hydroxyde de sodium (soude) 1 mol/L. En effet, le potentiel électrostatique diminue rapidement (30 minutes) après un prétraitement à la soude. Cette baisse du potentiel Zêta peut-être ralentie si le canal microfluidique est conservée rempli d'une solution d'eau désionisée au lieu d'être conservée à l'air. Dans ce cas, la décroissance de la valeur du potentiel Zêta n'apparaît que 2h30 après le prétraitement (figure 52).

Cette diminution du potentiel Zêta s'accompagne d'une chute de la mobilité électroosmotique au cours du temps. Ainsi, un canal utilisé 2h30 après avoir été conditionné aura une mobilité électroosmotique de $3,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ au lieu de $4,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans le cas où il est utilisé immédiatement. C'est pour cette raison, que lors des analyses séparatives, les expériences ne devront pas être reproduites dans le même laboratoire sur puce sans que les canaux ne soient reconditionnés. Le fait de retraiter le dispositif avec une solution de soude permet de régénérer les groupements silanols présents à la surface afin de conserver une mobilité électroosmotique constante.

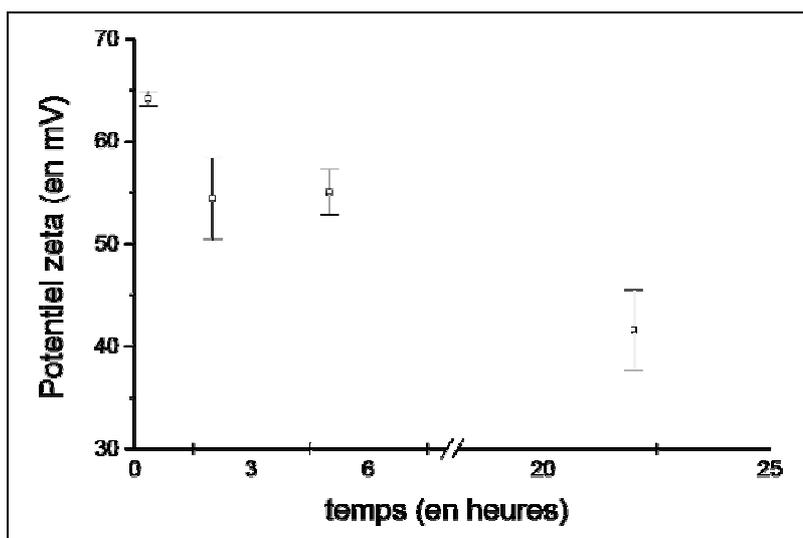


Figure 52 : Evolution du potentiel Zêta en fonction du temps dans un tampon Borax 10 mmol/L pH=9,2.

8.3 Influence d'additifs sur la mobilité électroosmotique

Pour obtenir une séparation rapide et efficace en électrophorèse de zone, il est essentiel de contrôler l'adsorption des protéines (ou de l'ADN)³³⁶, ainsi que le flux électroosmotique³³⁷. Les protéines peuvent s'adsorber sur le polymère par interactions hydrophobes, mais elles peuvent également interagir, si elles sont chargées, avec la surface du canal de séparation par interactions électrostatiques. Cette adsorption protéique provoque une modification de l'état de surface ce qui conduit à un élargissement des pics de séparation, à une perte de reproductibilité, voir à une perte du composé au cours de sa migration³⁰⁹. Cette adsorption peut-être limitée en recouvrant (coating) les parois des microcanaux ce qui entraîne une modulation de l'amplitude et/ou de la direction du flux électroosmotique³³⁸.

Les canaux peuvent être fonctionnalisés chimiquement par addition de petites molécules (greffées ou dynamiquement adsorbées) à leur surface ou par un « coating » polymérique covalent, ou physiquement adsorbé³³⁹⁻³⁴¹.

Bien que l'utilisation d'un coating avec une matrice liquide ou un gel polymérisé soit des méthodes intéressantes, elles sont difficiles à intégrer dans les microcanaux. En effet, il peut-être difficile d'obtenir un recouvrement uniforme des parois. De plus, une matrice liquide risque de diffuser dans des canaux interconnectés au canal de séparation perturbant ainsi l'analyse.

La fréquente génération de bulles d'air est également un problème récurrent lorsque l'on utilise des matrices de séparation polymériques^{68, 323}.

Dans notre travail, nous avons étudié deux méthodes de coating dynamique pour moduler l'amplitude du flux électroosmotique.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'augmenter le nombre de charges négatives présentes à la surface du canal de séparation, de sorte à diminuer l'adsorption des protéines chargées négativement en induisant une répulsion électrostatique des protéines en milieu basique. Pour ce faire, nous avons étudié l'influence de l'ajout de 2 % de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) au tampon de migration.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à augmenter la viscosité du tampon de migration de sorte à améliorer la résolution des séparations en réduisant le flux électroosmotique. L'ajout de 2 % de glycérol à l'électrolyte de migration a été testé dans ce sens.

8.3.1 Influence de l'ajout de SDS

Les laboratoires sur puce fabriqués en polymère possèdent plusieurs désavantages tels qu'une surface hydrophobe responsable d'une adsorption rapide des composés organiques, et un flux électroosmotique faible et instable³⁴². Pour résoudre ce problème, plusieurs équipes ont développé des méthodes de coating dynamique afin de modifier la surface polymérique du canal de séparation³⁴². Le SDS est un tensioactif anionique. C'est une molécule amphiphile qui possède une tête polaire chargée négativement (SO_4^-) et une queue apolaire composée d'une chaîne alkyle de 12 carbones. Il possède plusieurs avantages :

Dans un premier temps, il peut-être utilisé comme phase pseudo-stationnaire en formant des micelles avec les protéines présentes dans le tampon de migration³⁴³. Grâce à ses propriétés chimiques, le SDS est l'un des tensioactifs les plus utilisés en chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC)³¹⁴. Les micelles sont obtenues par interactions hydrophobes des chaînes apolaires du SDS avec les protéines.

Ainsi, si la concentration en SDS est supérieure à la concentration micellaire critique de ce tensioactif, les charges des protéines seront masquées par les molécules de SDS, de sorte que les complexes SDS-protéines formés, exhibent uniquement des charges négatives en surface. Les molécules à séparer sont distribuées entre la phase aqueuse et la phase micellaire en fonction de leurs caractères hydrophobes. Les molécules hydrophiles neutres n'ayant pas d'affinité pour les micelles sont dans la phase aqueuse et sont mobilisées par un flux électroosmotique vers le photodétecteur situé en amont de la cathode. Les espèces neutres hydrophobes sont présentes dans la phase micellaire et sont ralenties par interactions hydrophobes avec les micelles se déplaçant vers l'anode. Les protéines chargées auront une mobilité apparente plus difficile à prévoir à cause de la mobilité électrophorétique des molécules, des interactions électrostatiques avec les micelles et de la répartition selon l'hydrophobicité³¹.

Dans un deuxième temps, l'utilisation de SDS dans les laboratoires sur puce en polymère contribue également à la formation d'une double couche électrique stable à la surface du PDMS, du polyester ou du PMMA^{309, 343}. Cette bicouche permet de réduire l'hydrophobicité du polymère en réduisant la tension de surface.

L'ajout de SDS facilite également l'écoulement des fluides dans des structures hydrophobes et permet l'application de champs électriques importants en limitant les échauffements par effet Joule^{309, 344}.

Enfin, le SDS peut-être ajouté pour éliminer des protéines adsorbées sur un polymère ou pour prévenir cette adsorption³³⁹.

Notre hypothèse de travail est que la présence d'un tensioactif ionique réduit l'adsorption des protéines ainsi que l'hydrophobicité du PDMS. C'est pourquoi, nous avons évalué l'influence de l'ajout de SDS dans l'électrolyte de migration. Plus précisément, nous avons mesuré la valeur de la mobilité électroosmotique (par ampérométrie) en présence de 2 % de SDS ajouté au tampon borax (15 mmol/L, pH=9,2) par rapport à un échantillon contrôle sans SDS. Grâce à la contribution du SDS, nous avons pu améliorer la linéarité de la loi d'Ohm jusqu'à 300 V/cm pour nos dispositifs. Les mesures sont donc réalisées en présence d'un champ électrique de 300 V/cm et reproduites 3 fois sur 2 substrats indépendants. Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 53.

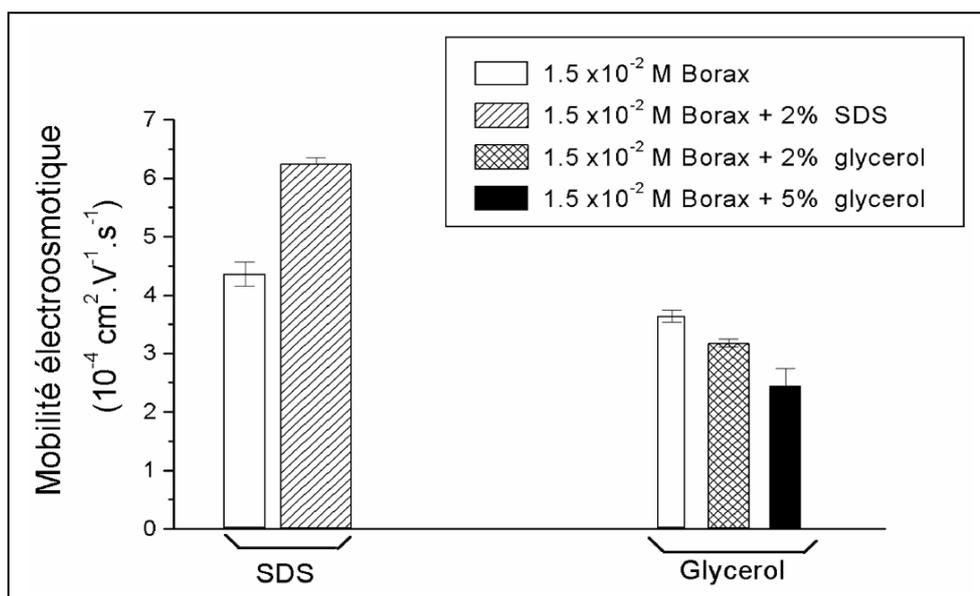


Figure 53 : Influence de l'ajout d'additif (SDS ou glycérol) sur la mobilité électroosmotique

En présence de SDS, la mobilité électroosmotique varie de $4,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,1$) pour un microsystème hybride non traité à $6,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,1$) pour un microcanal rempli d'un électrolyte contenant 2 % SDS. Il semble que le SDS recouvre la surface du PDMS provoquant une élévation de la mobilité électroosmotique de près de 40 %.

Dans ces expériences, nous n'avons pas observé de bulles d'air, ni d'obturation des canaux microfluidiques³⁴³. Ces résultats confirment que l'ajout de SDS conduit à une réduction de la tension de surface du PDMS, ce qui provoque une augmentation de l'amplitude du potentiel Zêta qui se traduit par un accroissement de la densité de charge à la surface et par une augmentation de la mobilité électroosmotique^{309, 317, 343, 345}.

Deux modèles d'interactions du SDS avec les parois du polymère sont envisageables.

Dans un premier mécanisme, la chaîne hydrocarbonée du SDS interagit directement avec la surface par interactions hydrophobes. Les têtes hydrophiles anioniques du SDS sont donc orientées vers le centre du canal exhibant une paroi recouverte de charges négatives^{309,314}.

Le deuxième mécanisme fait intervenir la formation d'une bicouche de SDS au niveau de l'interface solide-liquide. Ce modèle suppose une adsorption par interactions électrostatiques des monomères de SDS. La première couche est formée par interactions entre les groupements sulfates du SDS et la surface. Dans ce cas, les chaînes alkyles hydrophobes sont orientées vers l'électrolyte de migration. Si la concentration en SDS est suffisante, une deuxième couche va se former par interactions hydrophobes entre les monomères de SDS

libres et les molécules de SDS adsorbées. Ainsi, cette bicouche présente au tampon une surface négative formée par les têtes polaires des monomères de SDS adsorbées³¹⁴.

Grâce à l'adsorption du SDS à la surface des parois du canal, il est possible de générer un flux électroosmotique insensible au pH.

Compte tenu des données de la littérature sur le PDMS^{309, 346}, nous pensons que le premier mécanisme d'interaction correspond mieux à notre microsysteme.

En conclusion, l'ajout d'un tensioactif ionique, tel que le SDS, dans le tampon de migration, est une solution intéressante car elle permet de résoudre un grand nombre de problèmes induits par la présence du PDMS. En effet, le SDS stabilise le flux électroosmotique rendant les analyses plus reproductibles. Il provoque également une chute de la tension de surface à l'interface verre/polymère au niveau des réservoirs. Enfin, il limite la génération de bulles, tout en proposant une phase pseudo-stationnaire de séparation.

8.3.2 Influence de l'ajout de glycérol

Bien qu'apportant une phase stationnaire supplémentaire, l'ajout de SDS peut être inefficace pour améliorer la résolution d'une séparation. Comme nous avons pu l'observer, la présence de SDS provoque une importante mobilité électroosmotique, ce qui risque de limiter le pouvoir séparatif de l'expérience. C'est pourquoi, nous avons expérimenté une méthode alternative, dans laquelle nous cherchons à diminuer la mobilité électroosmotique. En effet, deux molécules possédant des rapports charges/tailles similaires pourraient être difficilement séparables en absence de traitement des canaux. Comme nous l'avons décrit dans les chapitres précédents, la résolution d'une séparation peut-être améliorée en modifiant les propriétés (viscosité, concentration...) de l'électrolyte de migration utilisé.

Au cours de notre travail, nous avons donc tenté de ralentir la vitesse du flux électroosmotique en modifiant la viscosité du tampon. Le glycérol ($C_3H_8O_3$) est un polyalcool très visqueux et transparent. Il possède l'avantage, lorsque il est ajouté à une solution, de réduire le flux électroosmotique améliorant ainsi la résolution des séparations^{347, 348}.

De plus, il permet de réduire l'adsorption des molécules sur les parois du canal de séparation^{31, 349}. Enfin, il a également été rapporté que la présence de 10 % de glycérol dans une solution aqueuse réduisait l'intensité électrique mesurée et par conséquent les problèmes de convection³⁵⁰.

Pour permettre cette modification chimique, nous avons évalué l'ajout de différentes quantités de glycérol à l'électrolyte de migration. Etant donné que la mobilité électroosmotique dépend directement de la viscosité (équation 12), nous n'avons pas souhaité analyser des concentrations en glycérol supérieures à 5 % pour conserver des analyses rapides. De plus, des concentrations de glycérol supérieures à 20 % risquent de provoquer un élargissement des pics de séparation³⁵¹. Il a également été rapporté que l'ajout de 10 % de glycérol dans une solution modifiait l'indice de réfraction du tampon de migration ce qui peut perturber la détection par fluorescence³⁵².

L'influence de 2 % et de 5 % de glycérol sur la mobilité électroosmotique a été mesurée en présence d'un champ électrique de 300 V/cm. Les mesures sont reproduites 3 fois sur deux microsystèmes hybrides distincts. Les résultats sont résumés dans la figure 53.

Dans cette étude, nous observons que la présence de 2 % (en volume) de glycérol, réduit la mobilité électroosmotique de 13 % par rapport à un échantillon contrôle (15 mmol/L borax, pH=9,2 sans glycérol). En comparaison, l'ajout de 5 % de glycérol réduit la mobilité électroosmotique de près de 33 %. A titre de comparaison, l'effet mesuré est beaucoup plus prononcé que ce qui a été décrit par Busnel et ses collaborateurs³⁴⁷. Dans leurs travaux, ils décrivent une diminution de 30 % de la mobilité électroosmotique pour des solutions tampons contenant 10 % de glycérol. Cependant, ces analyses sont décrites pour un capillaire de silice de 26 cm. Nous pensons que la différence entre ces résultats résulte de l'inhomogénéité de la surface de nos canaux par rapport à des capillaires de silice fondue. Nous considérons, que les effets de l'hydrophobicité du PDMS et de la viscosité du glycérol se cumulent provoquant une forte décroissance de la mobilité électroosmotique même en présence d'une faible quantité de glycérol.

En résumé, le glycérol se présente comme un candidat intéressant pour modifier la viscosité de l'électrolyte de migration. Du fait de sa présence, la viscosité augmente, la constante diélectrique de l'électrolyte de migration baisse et le potentiel Zêta généré est faible. Cependant, il semble que le glycérol ne permette pas d'améliorer la résolution de toutes les séparations en électrophorèse de zone^{349, 351}. L'intérêt du glycérol en séparation a tout de même été mis en avant par l'équipe de G. Peltre où ils sont parvenus à utiliser un mélange glycérol/eau en remplacement d'un coating polymérique pour séparer un mélange de protéines par focalisation isoélectrique³⁴⁷.

En conclusion, nous avons caractérisé la valeur des principaux paramètres électrocinétiques mis en jeu dans nos laboratoires sur puce. Nous avons pu mettre en place les conditions opératoires dans lesquelles les séparations de molécules prendront place et nous avons démontré que nous pouvions moduler la valeur de la mobilité électroosmotique au travers d'un coating dynamique des canaux microfluidiques.

8.4 Les injections électrocinétiques dans les Lab-on-a-Chip

Dans le chapitre 3.2.4.3.1, nous présentions l'influence de la méthode d'injection utilisée sur les performances d'une séparation. Bien que les injections hydrodynamiques apportent des avantages en termes de reproductibilité, les injections électrocinétiques restent privilégiées dans les laboratoires sur puce³⁷. Grâce à la fabrication de structures microfluidiques interconnectées, il est possible de contrôler précisément le volume d'échantillon injecté dans le canal de séparation. La géométrie de l'intersection des canaux permet de classer les systèmes d'injections électrocinétiques selon que l'architecture est croisée³⁵³, en simple T³⁹, en double T³⁵⁴, ou en triple T³⁹.

La jonction en simple T (figure 54b) fut l'une des premières méthodes d'injection électrocinétique utilisée sur puce. Elle peut également fonctionner en tant que micromélangeur.

La géométrie en double T (figure 54c) se présente comme une solution simple pour résoudre les problèmes de reproductibilité provenant des injections électriques.

Dans cette géométrie, le volume à injecter est constamment défini par la distance entre les deux branches du T. Les laboratoires sur puce commerciaux, utilisés lors des analyses séparatives, possèdent une jonction en double T avec une longueur de 100 μm entre les branches.

Les structures en triple T (figure 54d) ont été réalisées pour permettre des injections en volumes variables.

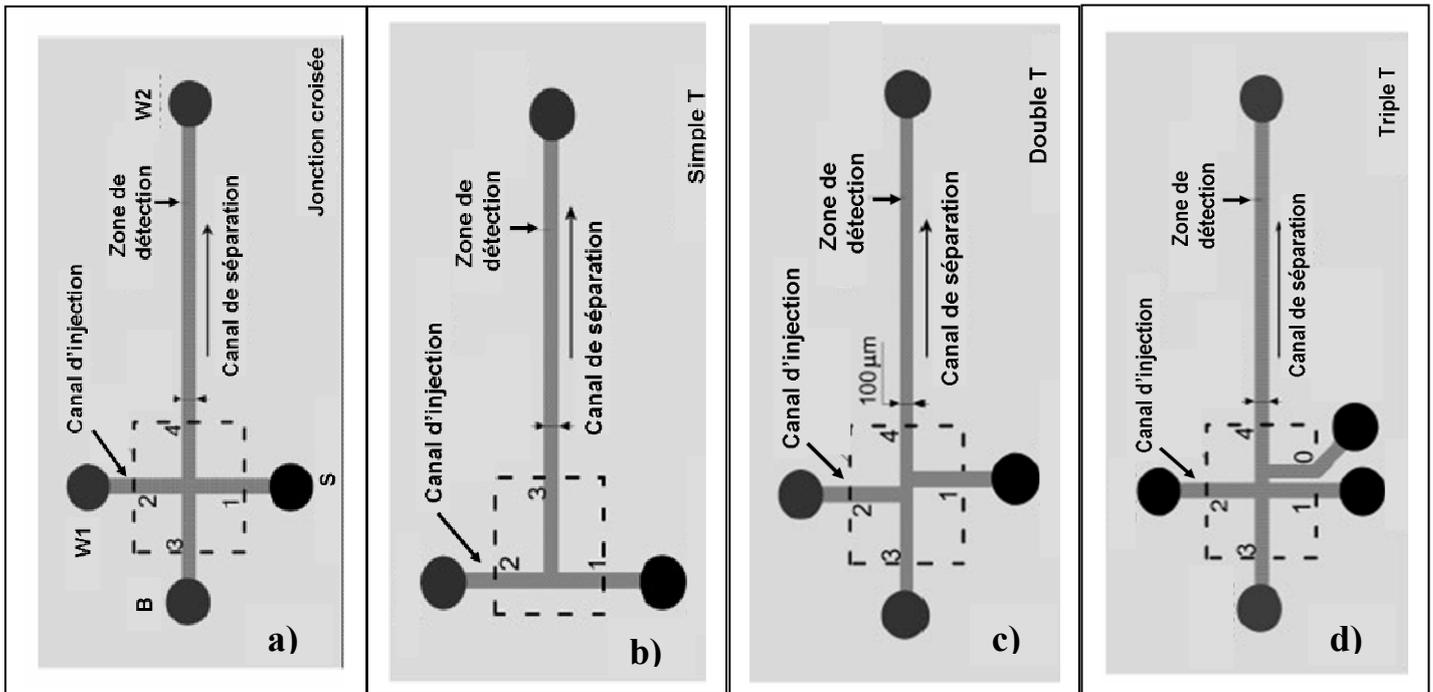


Figure 54 : Description des différentes géométries utilisées lors des injections électrocinétiques. a) Jonction croisée, b) Jonction en simple T, c) Jonction en double T, d) Jonction en triple T. S représente le réservoir où l'échantillon est déposé et B le réservoir contenant l'électrolyte de migration. Les réservoirs annotés W1 et W2 sont les réservoirs poubelles.

Tous ces types d'injection ont été mis en œuvre afin de contrôler le volume injecté dans le canal de séparation tout en limitant les écoulements d'échantillons du canal d'injection vers le canal de séparation.

Actuellement, les laboratoires sur puce fabriqués au LEOM intègrent des jonctions croisées.

8.5 La méthode d'injection utilisée dans nos expériences

Classiquement, au LEOM, les injections d'échantillon dans le canal de séparation s'opèrent en 3 étapes.

Après avoir été déposé dans le réservoir S (électrode positive), le mélange à analyser est mobilisé le long du canal d'injection sous un champ électrique de 100 V/cm (figure 55a). Cette étape doit être suffisamment longue pour que la concentration au niveau de la jonction corresponde à celle du réservoir initial S. Cependant, la durée de cette étape doit être contrôlée avec soin pour éviter que les protéines du mélange ne commencent à se séparer ou qu'elles ne diffusent dans le canal de séparation.

Les potentiels électriques appliqués aux bornes du canal d'injection sont ensuite commutés aux bornes du canal de séparation pour mobiliser les protéines vers la cellule de détection (figure 55b).

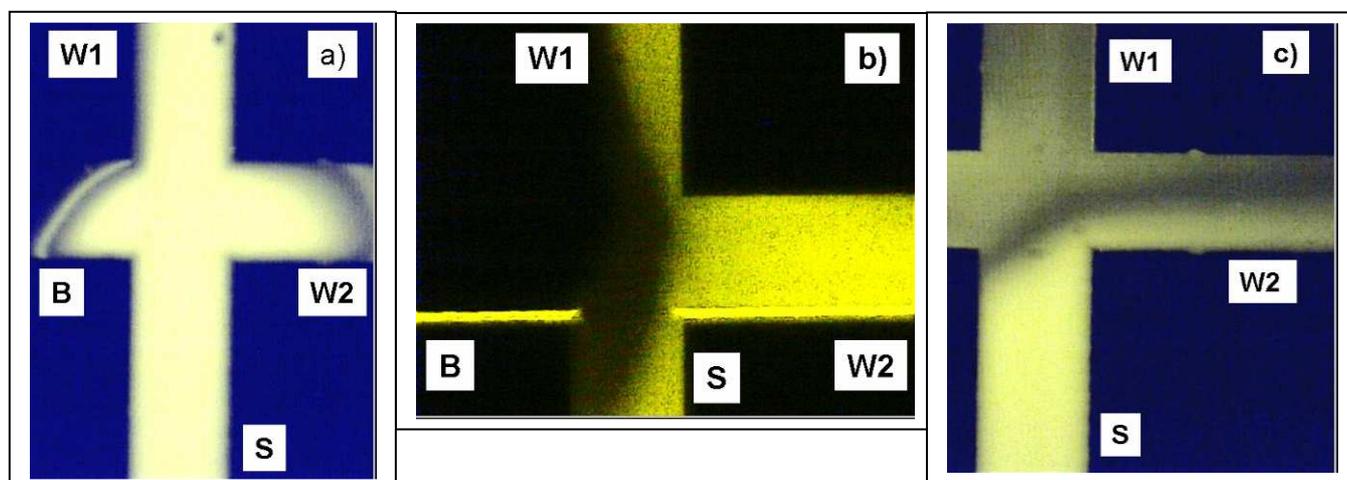


Figure 55 : Processus d'injection à partir d'une jonction croisée. a) Migration du mélange à séparer dans le canal d'injection. b) Injection dans le canal de séparation. c) Illustration des fuites résiduelles d'échantillon du canal d'injection vers le canal de séparation. Distance entre B, S, W1 et la jonction : 5 mm. Distance entre W2 et la jonction 4,5 cm.

L'arrangement des potentiels électriques décrit dans le tableau 10 est appelé « flottant ». C'est-à-dire qu'il n'y a pas de potentiels électriques appliqués aux bornes du canal de séparation lors de l'étape 1, ce qui provoque une diffusion de l'échantillon dans le canal de séparation. De la même manière, si la migration dans l'étape 2 contient des potentiels flottants, des fuites d'échantillons, allant jusqu'à 35 % de la largeur des canaux, s'opèrent du canal d'injection vers le canal de séparation³⁹ (figure 55c).

	Etape 1	Etape 2
S	90 V	Flottant
W1	-10 V	Flottant
B	Flottant	0 V
W2	Flottant	-1500 V

Tableau 10 : Potentiels électriques appliqués lors des étapes de migration dans le canal d'injection et dans le canal de séparation. Cet arrangement est dit flottant car il n'y a pas de contrôle des canaux latéraux.

Lors des expériences d'électrophorèse capillaire en gel, nous avons opté pour ce mode d'injection à cause de la présence de la matrice de tamisage dans le canal de séparation. Grâce à la haute viscosité de ce gel, peu de fuites du mélange de protéines du canal d'injection vers le canal de séparation ont été enregistrées³⁵⁵. Lors de cette expérience de

CGE, l'étape 1 était réalisée à 200 V/cm pendant 30 secondes, tandis que la séparation s'effectuait à 300 V/cm.

Afin de mieux contrôler le volume injecté dans le canal de séparation, nous nous sommes inspirés de la géométrie en double T. Dans le but de garantir l'injection d'un volume répétable d'échantillon, nous avons modifié l'étape 1 de la séquence électrique décrite dans le tableau 10. Cette méthode d'injection dite « pincée » consiste à moduler électrocinétiquement la largeur du volume injecté en appliquant une différence de potentiel électrique aux bornes du canal de séparation (au lieu qu'elle ne soit contrôlée par la géométrie du double T).

Dans ce cas, le choix des potentiels latéraux appliqués aux bornes du canal de séparation est crucial. En effet, il ne faut pas qu'ils soient trop importants sinon la quantité d'échantillon injectée dans le canal de séparation est trop faible et indétectable. De même, ils ne doivent pas être trop faibles pour éviter de générer des pics trop larges. Enfin, il faut que la zone définie à l'intersection des canaux soit symétrique (figure 56).

Ainsi, en appliquant des potentiels électriques aux extrémités B et W2 du canal de séparation, nous sommes parvenus à injecter 15 fois le même volume d'échantillon dans le canal de séparation avec des fuites représentant moins de 7% de la largeur des canaux³⁹.

En analysant les images 56a et 56b, il est possible de déterminer le volume injecté dans le canal de séparation. Ainsi, nous estimons que l'application d'un champ électrique latéral de 50 V/cm génère la formation d'une zone d'environ 19 nL (figure 56a).

Si l'efficacité de la séparation est insuffisante à cause de pics trop larges, il est possible d'augmenter les potentiels électriques latéraux tout en conservant un signal de fluorescence détectable. C'est ainsi que dans la figure 56b, nous n'injectons que 80 pL sous l'application d'un champ électrique latéral de 250 V/cm.

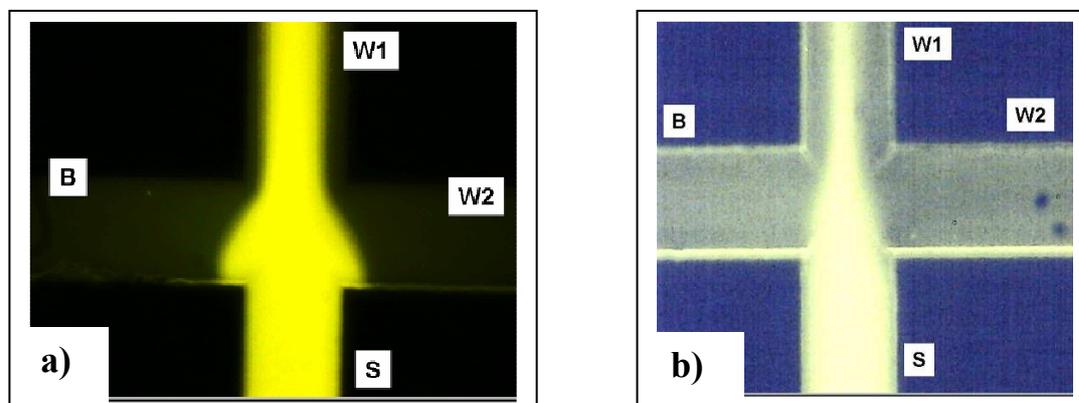


Figure 56 : Illustration de l'étape de « pinching » permettant de contrôler électrocinétiquement le volume à injecter dans le canal de séparation. a) Le champ électrique latéral est de 50 V/cm, tandis qu'il vaut 250 V/cm en b).

Enfin, nous avons ajouté une dernière étape dans la séquence électrique afin de limiter les fuites d'échantillon du canal d'injection vers le canal de séparation (figure 55c). Cette troisième étape dite de rétrocontrôle permet d'expulser électrocinétiquement l'excès d'échantillon présent dans le canal d'injection vers les réservoirs S et W1^{39,356}.

Grâce à cette succession de séquences électriques, nous parvenons à injecter de manière reproductible une zone d'échantillon bien définie avec des fuites d'échantillons estimées à 2%³⁹.

Cette séquence en 3 étapes a été optimisée lors des analyses en électrophorèse de zone réalisées dans nos laboratoires sur puce selon les recommandations du paragraphe 3.2.4.3.1. A titre d'exemple, nous présentons dans le tableau 11, la séquence électrique utilisée lors des séparations du Cy3 et de la Streptavidine.

Electrodes	Etape 1 : pinching step	Etape 2 : séparation	Etape 3 : rétrocontrôle
S	50 V	100 V	-100 V
W1	30 V	0 V	50 V
B	-100 V	-50 V	-1000 V
W2	100 V	-1000 V	-1500 V

Tableau 11 : Séquence électrique utilisée lors des séparations du Cy3 et de la Streptavidine. L'étape 1 dure 60 secondes, tandis que l'étape 2 ne dure que 5 secondes.

9 Séparation des biomolécules

Dans les chapitres précédents nous avons caractérisé d'une part, les paramètres électrocinétiques importants pour les analyses séparatives et, d'autre part, les conditions d'injection requises pour obtenir un électrophérogramme correctement résolu.

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé avec différents mélanges de molécules à séparer. Pour démontrer la faisabilité des séparations dans les canaux microfluidiques fabriqués en verre/polymère, nous avons tout d'abord tenté de séparer un agent de marquage fluorescent (Cy3) et une protéine (Streptavidine).

Afin de vérifier si l'adsorption des protéines sur le polymère est problématique, nous avons cherché à séparer un mélange de deux protéines par électrophorèse de zone.

Parallèlement à ces analyses, nous avons modifié nos canaux microfluidiques pour permettre la séparation de protéines en fonction de leurs tailles à l'aide d'une matrice de séparation.

Enfin, nous avons illustré le potentiel de nos laboratoires sur puce en étudiant la réaction immunologique entre un antigène bactérien et un anticorps monoclonal.

Toutes ces analyses ont été réalisées dans une configuration optique où l'excitation de la fluorescence se fait au travers d'un guide optique de 10 μm de large, tandis que la détection s'opère à la verticale du substrat au travers d'un objectif de microscope grossissant 10 fois.

9.1 Le marquage des protéines

Afin de s'affranchir de la fluorescence endogène de certaines molécules, nous travaillons à des longueurs d'onde supérieures à 500 nm. Pour permettre la détection de molécules dans cette région du domaine spectrale, il est indispensable de modifier chimiquement les protéines avec un fluorophore. A la longueur d'onde d'excitation de notre laser (532 nm), il existe plusieurs fluorophores excitables (Cy3 (Amersham), Alexa 532 (Molecular Probes), rhodamine 6G...). Pour nos analyses séparatives, nous avons choisi de travailler avec les fluorophores de la classe des cyanines (Cy3) disponible au laboratoire. Le Cy3 présente un coefficient d'extinction molaire de bonne qualité ($\epsilon = 150000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et un rendement de fluorescence supérieure à 0,67. De plus, il est hautement soluble dans l'eau et stable en pH basique.

Lors des expériences de marquage, il est préférable que les interactions protéines-fluorophores se fassent via un groupement amine fonctionnel de la protéine. Ces fonctions amines sont accessibles en N terminal des acides aminés et sur la chaîne latérale de la lysine. Pour éviter toutes réactions parasites, les protéines sont diluées avant marquage à 1 mg/mL en présence d'un tampon borate ou phosphate. Si les protéines à modifier sont commercialisées en tampon Tris (contenant des ions aminés), il faut désaler les solutions à l'aide de colonne contenant un gel de Dextran polymérisé D-salt (Pierce, Rockford, USA).

Ces colonnes peuvent être utilisées pour séparer des molécules en fonction de leurs tailles. Les molécules possédant des masses molaires inférieures à 5000 Da seront éluées hors de la colonne, tandis que les molécules de tailles supérieures y resteront piégées. Dans notre cas, le Cy3 (masse molaire : 766 Da) non lié aux protéines sera élué tandis que les protéines marquées resteront immobilisées sur la colonne.

En bref, il faut tout d'abord équilibrer la colonne chromatographique avec le tampon désiré (tampon borate ou phosphate). Un volume de protéine (1 mg/mL) correspondant à 10 % du volume de la colonne est ensuite ajouté. Enfin, la protéine est éluée par un rinçage avec le tampon d'intérêt. La présence de la protéine est contrôlée en mesurant l'absorbance à 280 nm de chaque fraction collectée par spectrophotométrie UV (spectrophotomètre UV-mc², Safas ; mesures faites au laboratoire de Développement de Techniques et Analyse Moléculaire de la Biodiversité à l'Université de Lyon).

A la suite de ce désalage, les protéines sont dérivées avec le Cy3 selon le protocole fourni par la société GE Healthcare. Brièvement, les protéines sont préparées à 1 mg/mL avant d'être mélangées à la solution de couplage et aux fluorophores libres. Après avoir été agité, la solution repose 30 minutes, avant d'être filtrée sur une colonne de filtration en gel. Le nombre de Cy3 greffés par protéine peut-être estimé en spectrophotométrie UV (280 nm) et visible (552 nm). Selon les composés, les quantités de Cy3 par protéine varient entre 2 et 11 Cy3/protéine. L'inconvénient majeur de cette technique de marquage, c'est que nous ne contrôlons pas le nombre de sous-produits formés. Il est donc tout à fait possible que la solution finale contienne un mélange de protéines modifiées par différentes quantités de Cy3 et non pas, une protéine avec un nombre de Cy3 donné. Il pourrait être très profitable, à l'avenir, d'analyser la solution protéique récoltée par chromatographie en phase liquide (HPLC) pour contrôler la pureté de l'échantillon.

9.2 Séparation de la Streptavidine et du Cy3 par CZE

Le premier mélange que nous avons testé contient une solution de Cy3 libre (GE Healthcare) et une solution commerciale de Streptavidine dérivée au Cy3 (GE Healthcare). La Streptavidine, purifiée à partir de *Streptomyces avidinii*, est une protéine tétramérique extracellulaire. Sa masse moléculaire (MM) est estimée à 60 kDa dans sa forme native non glycosylée. Elle est fréquemment utilisée en biologie pour sa forte interaction chimique avec la biotine (vitamine). Chaque molécule de Streptavidine peut lier 4 biotines, c'est pourquoi cette interaction est fréquemment utilisée pour étudier des liaisons indirectes impliquant des molécules radio-marquées ou des anticorps.

Afin d'identifier les composés présents dans ce mélange, il est important de connaître le temps de migration de chaque soluté. Nous avons injecté individuellement chaque molécule et mesuré leurs temps de migration avant de travailler avec le mélange.

9.2.1 Injection de la Streptavidine seule

Avant chaque analyse, les laboratoires sur puce sont traités sous agitation avec de la soude à 1 mol.L^{-1} pendant 5 minutes, puis rincés avec de l'eau désionisée. Une couche de polymère est ensuite ajoutée et les réservoirs sont fabriqués par forage aux extrémités des canaux microfluidiques. Le tampon borax est fraîchement préparé à 1 mM à pH=9,2 et dégazé pendant 5 minutes avant chaque expérience. Les canaux sont équilibrés avec le tampon de migration selon une séquence d'injection de type pincée décrite précédemment. La Streptavidine est diluée à $1 \text{ }\mu\text{mol/L}$ avant d'être déposée au niveau du réservoir échantillon (S) du canal d'injection. Après avoir été injecté pendant 5 secondes à 220 V/cm , l'échantillon migre dans le canal de séparation sous l'application d'un champ électrique de 344 V/cm . Le pic de fluorescence est détecté après un temps de migration de $27 \pm 1,1$ secondes (6 réplicats) pour une longueur efficace de séparation de 2,7 cm (figure 57). L'électrophérogramme obtenu nous informe donc sur la pureté de la solution commerciale, compte tenu qu'un seul groupe de molécules est détecté.

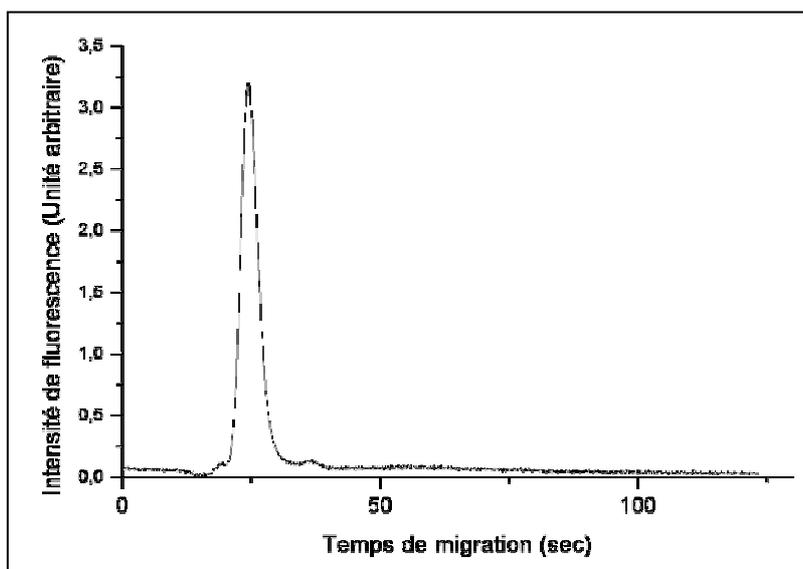


Figure 57 : Electrophérogramme obtenu après injection de Streptavidine dérivée au Cy3 dans un tampon borax de 1 mmol/L. $E = 344 \text{ V/cm}$ pour une longueur utile de séparation de 2,7 cm.

A partir de ces données, il est possible de déterminer la mobilité apparente de cette protéine, selon l'équation 14, à $\mu_{\text{app}} = 4,85 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Connaissant la valeur de la mobilité électroosmotique déterminée expérimentalement dans le paragraphe 8.2.2 ($4,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), nous pouvons calculer la mobilité électrophorétique selon l'équation 13. Ainsi, nous estimons que la Streptavidine possède une mobilité électrophorétique $\mu_{\text{ep}} = 0,15 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Si la mobilité apparente est supérieure à la mobilité électroosmotique, cela signifie que le sens de migration de la Streptavidine est donné conjointement par les flux électrophorétique et électroosmotique. La Streptavidine marquée au Cy3 présente donc une densité de charge à sa surface majoritairement positive.

Comme la largeur à mi-hauteur du pic détecté est de 3,6 secondes, il nous est possible d'évaluer l'efficacité de ce pic de séparation selon l'équation 22. Après calcul, on estime que l'efficacité vaut $N=12703$ plateaux théoriques par mètre ce qui est faible en comparaison à l'efficacité théorique (1850000 plateaux théoriques par mètre) que l'on s'attend à obtenir pour un système d'électrophorèse capillaire⁵⁵. Nous pensons que cette faible efficacité résulte d'une forte adsorption des molécules sur le PDMS non traité, d'une mauvaise dispersion de l'échauffement ou d'une concentration de molécules trop importante. En effet, l'intensité de fluorescence, ainsi que la largeur du pic observé laissent supposer qu'une quantité trop importante de molécules est détectée. Compte-tenu des limites de détection mesurées dans le chapitre 7.3, notre dispositif est tout à fait capable de détecter des concentrations beaucoup plus faibles.

9.2.2 Injection du Cy3 seul

De manière comparable aux expériences réalisées avec la streptavidine, nous avons préparé 10 $\mu\text{mol/L}$ de Cy3 (MM : 766 Da) dans 1 mmol/L de tampon borax. Le Cy3 est ensuite déposé à l'entrée d'un canal de séparation de 4,5 cm de longueur totale (figure 58). Il est intéressant de remarquer qu'en dépit du fait que le Cy3 soit plus concentré que la streptavidine, nous détectons un signal de fluorescence plus intense avec la streptavidine. Il doit donc y avoir plusieurs molécules de Cy3 greffées par protéine. Sur l'électrophérogramme de la figure 58, on visualise deux pics correspondant à la séparation de deux espèces de mobilités électrophorétiques distinctes présentes dans l'échantillon initial. D'après la littérature, il semble que le Cy3 soit fréquemment détecté sous la forme de plusieurs pics en électrophorèse de zone. Le pic 2 correspond, en fait, à une forme hydrolysée du Cy3³⁵⁷⁻³⁵⁹.

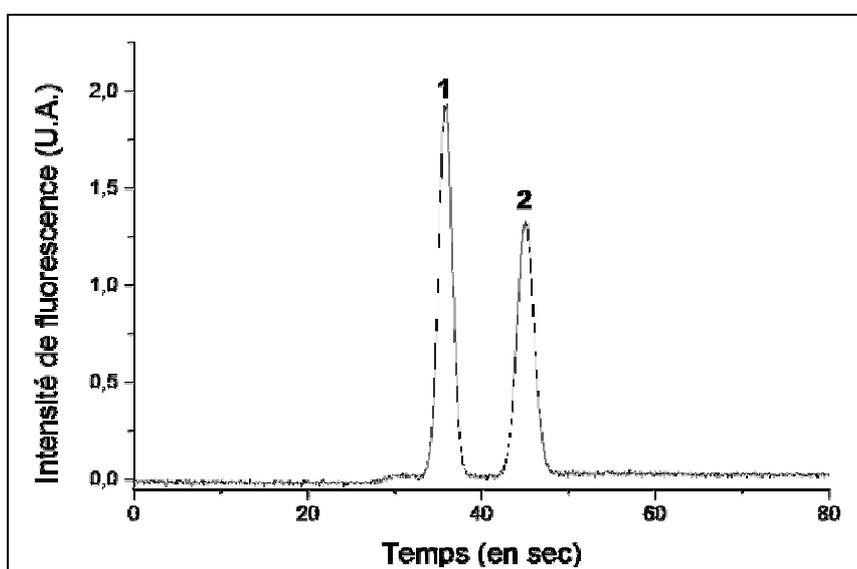


Figure 58 : Electrophérogramme présentant la séparation obtenue entre le Cy3 natif (pic 1) et le Cy3 hydrolysé (pic2) après une migration sur une longueur de 2,7 cm dans un tampon Borax 1 mmol/L et sous un champ électrique 344 V/cm.

A titre de vérification, 100 $\mu\text{mol/L}$ de Cy3 ont été injecté hydrodynamiquement pendant 3 minutes à 7500 V dans un capillaire de silice fondue de 27 cm de long (diamètre interne : 75 μm , diamètre externe : 375 μm , longueur efficace : 20 cm). La séparation s'opère sur un système d'électrophorèse capillaire P/ACE 2100 de chez Beckman-Coulter dans un tampon borax de 50 mmol/L. Nous obtenons le même électrophérogramme que dans le cas précédent, avec deux pics détectés.

A partir des résultats de la figure 58, nous calculons la mobilité apparente de chacun des composés afin de déterminer leurs mobilités électrophorétiques. Ainsi, le Cy3 natif migre en 36 ± 2 sec (6 réplicats) ce qui correspond à une mobilité apparente $\mu_{app} = 3,64 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et à une mobilité électrophorétique $\mu_{ep} = -1,06 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Comme le Cy3 hydrolysé ($t = 45,15$ sec) apparaît après le Cy3 natif, il possède une mobilité apparente inférieure ($\mu_{app} = 2,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Par conséquent, l'hydrolysate de Cy3 doit posséder une plus grande densité de charge négative en surface que le Cy3 non hydrolysé ($\mu_{ep} = -1,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ainsi, en absence de flux électroosmotique, ces molécules migreraient vers l'anode et n'atteindraient jamais la zone de détection située en amont de la cathode.

Cette expérience valide le fait que nos microsystèmes hybrides peuvent être utilisés pour séparer des molécules biologiques. Grâce aux formules 22 et 24, il est possible d'évaluer la qualité de cette séparation en calculant l'efficacité et la résolution. Ainsi, nous obtenons une efficacité variant entre 82703 (pic 2) et 103111 plateaux théoriques par mètre (pic 1) et une résolution (R_s) de 1,87 ou 2,71 selon que l'on mesure la largeur des pics au niveau de la ligne de base ou à mi-hauteur à des pics. Si l'on compare l'efficacité de nos microsystèmes avec la littérature, nous obtenons des résultats comparables aux données obtenues sur d'autres laboratoires sur puce^{234, 309}.

9.2.3 Injection du mélange

A la suite des injections de chacun des composés, ces solutés ont été mélangés à volume équivalent, puis injectés à l'entrée du canal de séparation. Compte tenu des différences de mobilités apparentes entre chacune des espèces présentes dans le mélange, nous devrions obtenir une séparation de ces composés en électrophorèse capillaire de zone (figure 59). Lors de cette expérience, les molécules sont acheminées au niveau de la jonction des canaux microfluidiques à 220 V/cm, avant d'être séparé à 344 V/cm.

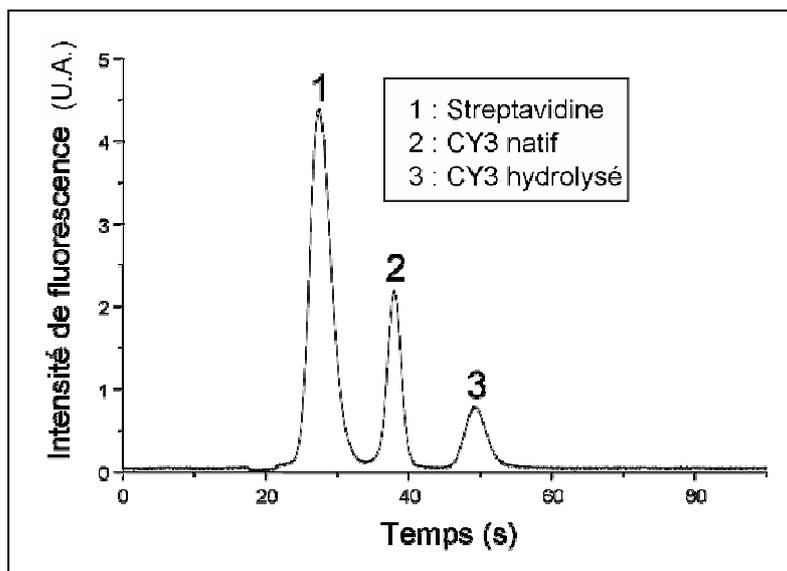


Figure 59 : Séparation du Cy3 et de la Streptavidine sous un champ électrique de 344 V/cm dans un microsystème verre/PDMS. Tampon de migration : Borax 1 mM, pH=9,2. Longueur effective : 2,7 cm.

La séparation des molécules est obtenue en moins d'une minute d'expérience. Les pics détectés apparaissent avec des temps de migration comparables aux résultats obtenus lorsque les molécules sont injectées individuellement. Ainsi, les pics sont identifiés en fonction de leurs mobilités apparentes. Ainsi, le premier pic correspondant à la Streptavidine possède une efficacité $N=16518$ plateaux théoriques par mètre, tandis que les pics 2 et 3 sont attribués respectivement au Cy3 natif ($N=78037$ plateaux théoriques) et au Cy3 hydrolysé ($N=45592$ plateaux théoriques). Grâce à l'équation 24, nous avons calculé que la séparation entre la Streptavidine et le Cy3 natif était bien résolue ($R_s=1,56$).

A cause de la forte adsorption de la Streptavidine sur la surface du PDMS, l'intensité de la fluorescence du pic 1 évolue constamment lorsque l'expérience est répétée. Lorsque la surface du polymère est saturée par la Streptavidine, l'intensité de la fluorescence mesurée, au niveau de la zone de détection, se stabilise à une valeur correspondant à 1 $\mu\text{mol/L}$ de Streptavidine injectée (figure 60).

A l'avenir, cette adsorption devra être résorbée ou tout au moins contrôlée, de manière à pouvoir effectuer des analyses quantitatives. Néanmoins, le temps de migration de chacun des pics est répétable avec une déviation de l'ordre de 2 %.

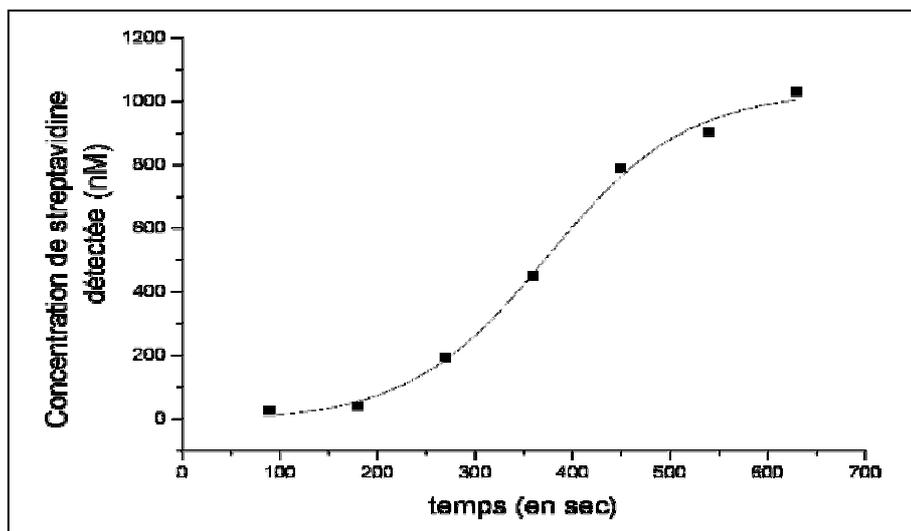


Figure 60 : Evolution de la quantité de Streptavidine détectée au cours du temps

Nous pensons que cette variation résulte d'un contrôle insuffisant de la température. Après avoir optimisé les étapes de reconditionnement des canaux microfluidiques en salle blanche et de changement de polymère, les analyses sont reproduites pendant 3 jours. Dans ce cas, nous mesurons une très faible déviation du temps de migration de l'ordre de 1,5 %. Ces résultats confirment l'observation faite dans le chapitre 8.2.4. selon laquelle la préparation de l'échantillon est une étape cruciale dans les expériences séparatives.

9.2.4 Comparaison avec un substrat commercial

Dans le but d'évaluer la pertinence de nos résultats et de comparer les performances de nos microsystèmes hybrides, nous avons acheté des laboratoires sur puce commerciaux chez Micronit (Enschede, Hollande). Nous avons opté pour des microsystèmes en verre borosilicaté X3530 dont les dimensions sont résumées dans le tableau 12.

Microsystèmes	Profondeur (en μm)	Largeur (en μm)	Longueur du canal d'injection (en mm)	Longueur totale du canal de séparation (en mm)	Distance utile pour la séparation (en mm)
Verre/verre Micronit	20	50	10	40	30
PDMS/verre	20	80	10	50	27

Tableau 12 : Comparaison des dimensions des microcanaux entre un laboratoire sur puce commercial et un microsystème fabriqué au LEOM.

Les microcanaux des dispositifs commerciaux se croisent selon une jonction en double T, le volume injecté dans le canal de séparation est donc défini par la distance entre les branches (100 μm). Comme ces microsystèmes commerciaux n'intègrent pas de composants optiques, l'excitation et la collection de la fluorescence se font à la verticale du substrat par le microscope à épifluorescence. Etant donné que ces microsystèmes sont réalisés tout en verre, la puissance générée est mieux dissipée, il est donc possible d'appliquer des tensions plus élevées que dans les laboratoires sur puce hétérogènes.

Sous l'application d'un champ électrique de 400 V/cm, les molécules se séparent selon l'électrophérogramme de la figure 61. Afin d'être comparable avec les résultats obtenus sur nos microsystèmes, la zone de détection est positionnée à 3 cm de la jonction des canaux microfluidiques. Nous obtenons le même profil de séparation avec le substrat en verre borosilicaté qu'avec un laboratoire sur puce hybride. Ainsi, le profil de séparation obtenu précédemment est confirmé par l'électrophérogramme de la figure 61.

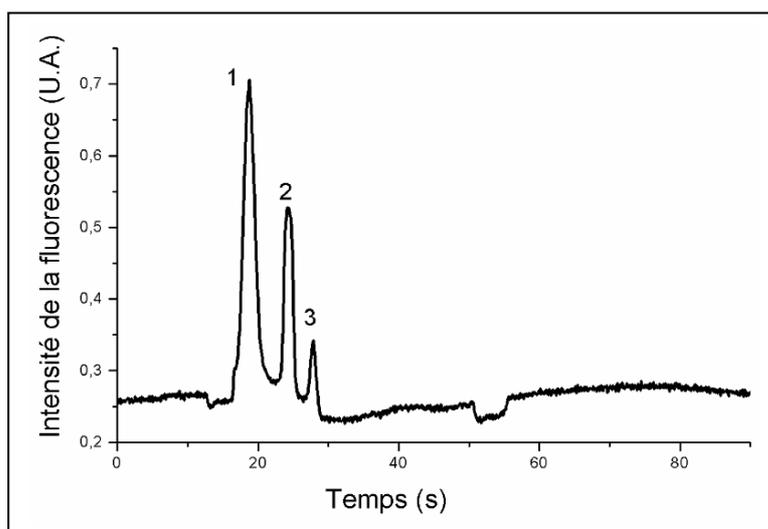


Figure 61 : Séparation de la Streptavidine et du Cy3 dans un laboratoire sur puce commercial à 400 V/cm dans un tampon Borax 1 mmol/L.

La numérotation des pics est redondante avec celle des expériences précédentes.

Il est intéressant de noter que la lampe à vapeur de mercure utilisée dans cette expérience génère une émission de fluorescence beaucoup plus faible que ce qui a été obtenu avec l'injection intégrée (chapitre 9.2.1). C'est pour cette raison que nous avons été contraints de travailler avec des concentrations de molécules relativement importantes en regard des limites de détection de notre dispositif. Malgré cela, nous détectons une distribution de l'intensité de la fluorescence émise comparable entre les deux électrophérogrammes des figures 59 et 61.

Il est à noter que les pics sont moins bien définis au niveau de la ligne de base dans la figure 61 que dans la figure 59. Nous avons évalué la résolution obtenue entre la Streptavidine et le Cy3 à 1,22. Afin de comparer la qualité des séparations obtenues dans ces deux laboratoires sur puce, il est nécessaire de rapporter la résolution calculée en fonction de la longueur efficace. Dans ce cas, la résolution avec le dispositif verre/PDMS est de $R_s/2,7 \text{ cm} = 0,58$, tandis qu'elle ne vaut que $R_s/3 \text{ cm} = 0,41$ pour le laboratoire sur puce développé par Micronit. Il est donc clair, que la séparation obtenue est nettement mieux résolue avec les microsystemes hybrides. Bien qu'il soit tentant de penser que notre laboratoire sur puce soit le plus performant, une autre raison peut justifier la différence de résolution. En effet, les champs électriques appliqués sont plus importants aux bornes du dispositif commercial (400 V/cm) qu'aux bornes du laboratoire sur puce hybride (344 V/cm). Il est donc possible que la perte de résolution soit imputable à la tension appliquée^{355, 360}.

Cette analyse séparative fut reproduite pendant 3 jours et nous obtenons une déviation relative du temps de migration (RSD= 2,6 %) plus importante que ce qui fut obtenu avec nos microsystemes. Nous estimons que la faible reproductibilité obtenue avec le microsysteme commercial résulte d'un problème d'alignement optique. Lorsque nous utilisons un guide optique pour acheminer la lumière excitatrice, la zone de détection est toujours positionnée exactement au même endroit, seul l'efficacité du couplage peut varier d'une expérience à l'autre. Nous obtenons ainsi une très bonne reproductibilité des temps de migration mesurés. En revanche, lorsque l'on utilise une excitation et une collection de la fluorescence au travers d'un objectif de microscope, l'alignement est plus aléatoire. Comme le faisceau lumineux est plus large que le faisceau guidé, le positionnement de la zone de détection est plus délicat ce qui provoque une déviation plus importante des temps de migration mesurés.

Nous avons également mesuré l'efficacité des pics détectés à partir de la figure 61. Il apparaît ainsi que l'efficacité est de 27500 plateaux théoriques par mètre pour la Streptavidine et de 164800 plateaux théoriques pour la forme hydrolysée du Cy3. Ces résultats sont nettement supérieurs aux valeurs calculées pour les microsystemes en verre/PDMS. Cependant, il est décrit dans la littérature que le nombre de plateaux théoriques augmentent avec le champ électrique appliqué³⁶⁰⁻³⁶². Il était donc prévisible que les analyses effectuées avec les substrats commerciaux soient plus efficaces que les laboratoires sur puce que nous fabriquons.

En résumé, nous avons démontré que les laboratoires sur puce développés au LEOM permettaient de séparer un mélange de biomolécules en moins d'une minute avec des performances comparables à ce que l'on attend d'un laboratoire sur puce commercial.

9.3 Séparation d'un mélange de protéines par CZE

A la suite de ces expériences, nous avons choisi de tester un mélange plus complexe contenant des protéines. L'objectif de cette approche est double. Tout d'abord, nous voulions nous rapprocher d'un contexte biologique en manipulant des protéines purifiées. Et, ensuite, nous souhaitons tester les capacités de notre système séparatif. Lors du paragraphe 9.2.3., nous mettions en avant les problèmes liés à l'adsorption des protéines. En testant, un mélange de protéines, nous souhaitons évaluer l'impact de cette adsorption sur la séparation du mélange injecté. Par conséquent, notre expérience se présente davantage comme une manipulation de faisabilité, que comme une démonstration « de force ».

Nous avons travaillé avec deux protéines qui sont fréquemment utilisées en électrophorèse capillaire. Elles possèdent l'avantage d'être bien décrites (masse moléculaire, séquences d'acides aminés et points isoélectriques connus) dans la littérature et de représenter un coût d'achat modéré. La première présente dans le mélange est l'une des protéines majoritaires du lait, la β -lactoglobuline A (Lac A). Elle est commercialisée par Beckman-Coulter et possède une masse moléculaire de 18,28 kDa et un point isoélectrique de 5,1. Son rôle biologique n'est pas encore complètement élucidé. La deuxième protéine de ce mélange simple est l'Anhydrase carbonique II (CA II). Cette enzyme est commercialisée par Beckman-Coulter et possède une masse moléculaire de 29 kDa et un point isoélectrique de 5,9. Elle permet de catalyser la réaction de formation ou d'élimination du bicarbonate dans l'organisme à partir du dioxyde de carbone et de l'eau.

9.3.1 Expérience de référence sur un capillaire de silice

Comme nous ne possédions que le mélange de protéines, il ne nous a pas été possible de procéder avec le même schéma expérimental que celui décrit précédemment. C'est pourquoi, nous avons mis en place une collaboration avec le laboratoire d'Analyse des Systèmes Organiques Complexes (LASOC, UPRES EA 3233 SMS) pour établir un profil électrophorétique de référence à l'aide d'un système de séparation d'électrophorèse capillaire.

Les expériences de séparation ont été réalisées sur un système P/ACE 2100 de chez Beckman-Coulter au sein d'un capillaire de silice fondue (Thermo Electron) de 27 cm non traité (diamètre interne : 50 μm et diamètre externe : 375 μm). La longueur efficace de ce capillaire est de 20 cm. Avant d'injecter l'échantillon à analyser, le capillaire est rincé 10 minutes en eau distillée, conditionné 40 minutes en hydroxyde de sodium 1 mol/L, puis, rincé 10 min en eau désionisée.

Afin d'être détectable en fluorescence dans nos laboratoires sur puce, ce mélange de protéines a été préalablement marqué en Cy3 avant d'être injecté hydrodynamiquement à l'entrée du capillaire de silice. Les conditions expérimentales (champ électrique appliqué, mode et durée de l'injection, choix de l'électrolyte...) ont été mises au point en étroite collaboration avec l'équipe du professeur P.L. Desbène et plus particulièrement le docteur C. Morin. Les conditions expérimentales sont donc : une injection hydrodynamique de 3 secondes à 0,5 psi (3,4 kPa) dans un tampon borax de 10 mmol/L (pH=9,2) et une séparation sous l'application d'un champ électrique de 278 V/cm. La température (25 °C) et l'intensité électrique sont soigneusement contrôlées au cours de l'analyse.

Nous obtenons l'électrophérogramme de la figure 62. Bien que nous n'ayons injecté que 2 protéines, nous détectons 6 pics séparés. Comme nous ne possédons pas les molécules individuelles, il nous est impossible d'identifier directement ces pics à partir de leurs mobilités.

Il a été décrit dans la littérature que le marquage d'une protéine par le Cy3, peut conduire à un multi-marquage correspondant à différentes quantités de Cy3 greffés par protéine³⁶³. Cette hypothèse semble en accord avec le profil de séparation que nous obtenons. En effet, les deux pics annotés sous le chiffre 3 (ou les 2 pics annotés sous le chiffre 4) possèdent des mobilités apparentes très voisines ce qui correspond à des rapports charge/taille très proches. Cette petite différence peut donc être imputée à une quantité variable de Cy3 greffés par protéine.

En outre, nous avons soupçonné que la colonne de filtration utilisée en fin du procédé de dérivation (chapitre 9.1) n'avait pas été suffisamment efficace pour éliminer toutes les molécules de Cy3 non liées. Pour vérifier cette hypothèse, un volume de Cy3 libre a été injecté à l'entrée du capillaire de silice et cela dans les mêmes conditions expérimentales que le mélange.

Nous obtenons une mobilité électrophorétique comparable à celle du pic annoté 1. Compte tenu de la forme du pic 1, nous pensons que les deux formes du Cy3 sont détectées mais mal séparées. Cette explication peut justifier que le pic 1 soit beaucoup plus large que les autres pics détectés. Ce résultat semble donc confirmé que les pics annotés 3 et 4 correspondent aux protéines d'intérêt.

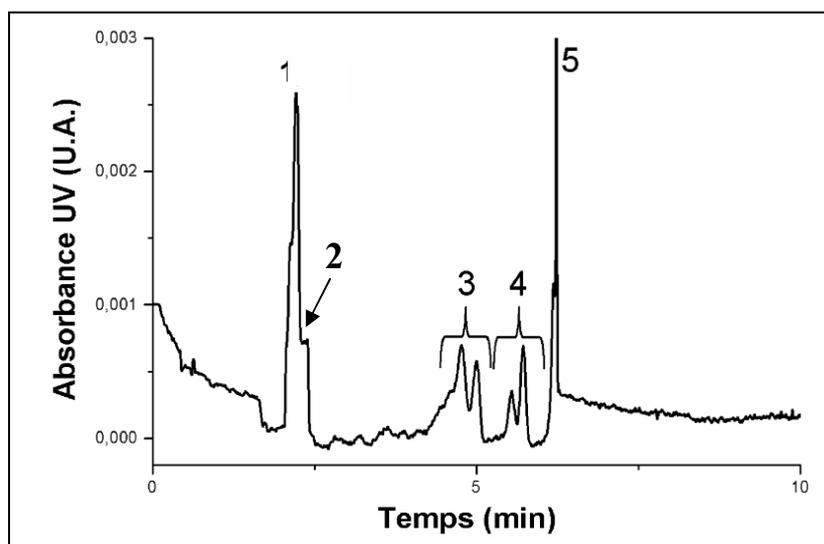


Figure 62 : Séparation de la β -lactoglobuline A et de l'Anhydrase carbonique II en électrophorèse capillaire de zone. La séparation est obtenue à 278 V/cm sur un capillaire de silice non traité de 27 cm de long. Les pics numérotés 1 et 2 correspondent au Cy3, le pic 3 à l'Anhydrase carbonique II, le pic 4 à la β -lactoglobuline A et le pic 5 à un artefact électrique.

Les séquences d'acides aminés de ces deux protéines sont référencées sur le site d'EXPASY (<http://expasy.org>). A partir de ces séquences, il est possible de spéculer sur la charge nette potentielle de chacune de ces protéines à un pH de 9,2.

D'après notre estimation, la β -lactoglobuline A (MM = 18 kDa) possède une charge nette de -15, tandis que l'Anhydrase carbonique (MM = 29 kDa) possède une charge nette de -0,5. Il est important de noter que cette approximation suppose que le nombre de Cy3 greffés par protéine est comparable entre ces deux protéines. Selon la figure 2, nous savons que les protéines négatives et de petites tailles possèdent des mobilités apparentes plus faibles que les protéines de grandes tailles faiblement chargées. Par conséquent, en accord avec

leurs rapports charges/tailles, nous attribuons les pics annotés 3 à l'Anhydrase carbonique et les pics annotés 4 à la β -lactoglobuline A.

Cet ordre d'apparition des protéines est confirmé par des séparations en électrophorèse de zone décrites dans la littérature³⁶³.

D'autres raisons ont été envisagées pour justifier la détection de 2 pics pour ces protéines^{68,364}. Par exemple, il a été décrit que la β -lactoglobuline A pouvait être observée sous la forme d'un dimère lorsque l'expérience s'opérait dans des conditions non dénaturantes (comme c'est notre cas ici)^{363,364}.

Grâce à l'expérience de l'équipe du LASOC, nous avons estimé que le pic numéro 5 correspondait à un artefact électrique. Pour confirmer cette attribution, nous avons déterminé l'efficacité de chacun des pics détectés. Ainsi, nous obtenons 862510 plateaux théoriques par mètre pour le pic 5. Tandis que l'efficacité des autres pics est comprise entre 23100 (Cy3) et 84960 (Lac A) plateaux théoriques par mètre. Compte tenu de l'écart entre ces valeurs, et du manque de reproductibilité de ce pic 5, nous confirmons qu'il s'agit bien d'un artefact électrique (« spike »).

Nous avons également calculé la résolution de cette séparation en fonction de la longueur efficace afin de comparer ces résultats sur capillaire avec ceux obtenus dans nos laboratoires sur puce. Ainsi, la résolution entre les deux protéines est de $R_s = 3,54$ ($R_s/\text{cm} = 0,18$) et de $R_s = 9,6$ ($R_s/\text{cm} = 0,48$) entre la β -lactoglobuline et le Cy3.

9.3.2 Dans un laboratoire sur puce verre/PDMS

Dès lors que le profil de séparation de référence fut établi, nous avons reproduit l'analyse précédente dans nos laboratoires sur puce. Les microsystèmes utilisés possèdent une longueur efficace de 3,5 cm par rapport à une longueur totale de 5 cm.

Comme dans les expériences précédentes, le tampon borax (10 mmol/L, pH=9,2) est fraîchement préparé et dégazé avant l'analyse. L'injection hydrodynamique étant inadaptée à nos microsystèmes, nous avons modulé les potentiels électriques de sorte à contrôler l'injection électrocinétique. Dans cette analyse, l'injection du mélange dans le canal de séparation n'est pas réalisée en 3 étapes comme précédemment mais en « floating step ». C'est-à-dire qu'un potentiel flottant est appliqué aux bornes du canal de séparation lorsque l'électrolyte de migration est mobilisé le long du canal d'injection. Ainsi, on laisse un certain

volume d'échantillon diffusé pendant 20 secondes dans le canal de séparation. Un champ électrique de 320 V/cm est ensuite appliqué aux bornes du canal de séparation pour mobiliser le volume diffusé vers la zone de détection. La séquence de rétrocontrôle est conservée pour limiter les fuites de soluté du canal d'injection au canal de séparation.

On obtient l'électrophérogramme décrit dans la figure 63.

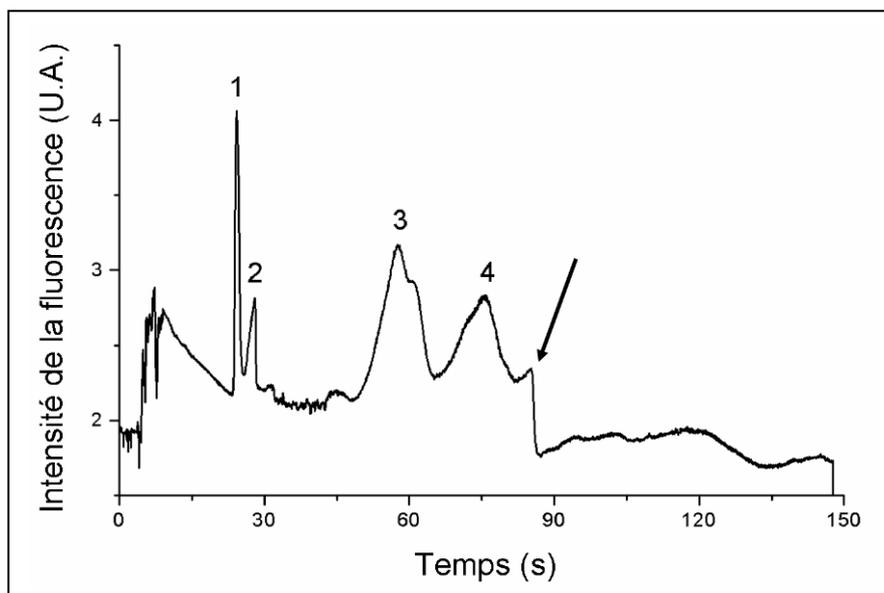


Figure 63 : Séparation de l'Anhydrase carbonique II et de la β -lactoglobuline A dans un laboratoire sur puce verre/PDMS. La séparation s'opère à 320 V/cm dans un tampon borax à 10 mmol/L (pH=9,2). Les pics 1 et 2 sont attribués aux formes natives et hydrolysées du Cy3. Le pic 3 correspond à l'Anhydrase carbonique et le pic 4 à la β -lactoglobuline A. La flèche pointe un pic potentiel pouvant être attribué à une isoforme de la β -lactoglobuline A ou à des impuretés fluorescentes générées lors du marquage.

En dépit du fait que la ligne de base soit instable, nous observons un profil de séparation comparable aux résultats obtenus avec le capillaire de silice. Les pics détectés sont attribués en fonction des remarques faites avec le capillaire de référence. Ainsi, les pics annotés 1 et 2 correspondent aux différentes formes (natives et hydrolysées) du Cy3, le pic 3 correspond à l'Anhydrase carbonique II et le pic 4 à la β -lactoglobuline A. Il est à noter, que les pics 1 et 2 sont beaucoup mieux séparés dans nos laboratoires sur puce que lors des analyses en capillaire. A cause d'une forte adsorption des protéines sur les parois des canaux, il semble que nous ne soyons pas en mesure de séparer les différentes populations de Cy3 greffés par protéine contrairement aux analyses en capillaire.

Cependant, si l'on déconvolue le pic 3, il est possible d'attribuer l'épaule observé sur la figure 63 à une isoforme d'Anhydrase carbonique dérivée au Cy3. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à identifier le pic fléché de la figure 63. Nous ne savons pas s'il s'agit

d'une isoforme, possédant une quantité différente de Cy3, bien séparée de la β -lactoglobuline A ou bien si c'est le résultat d'un effet de traîne causé par l'adsorption d'un groupe de molécules sur la surface.

Pour estimer et comparer l'efficacité et la résolution de cette séparation dans nos laboratoires sur puce et dans un capillaire, nous avons regroupé les résultats obtenus dans le tableau 13.

Tous les résultats sont rapportés en fonction de la longueur efficace de séparation.

Dispositif	Nombre de plateaux théoriques calculés par m				Résolution par cm	
	Cy3 natif	Cy3 hydrolysé (équation 45)	CA	Lac A	Résolution CA-Lac A	Résolution CA-Cy3
LOC verre/PDMS	98667	120000	29300	30900	0,40	1,28
Capillaire de silice	23100	10900 (déconvolué)	31500/49800	85000/ 80800	0,18	0,48

Tableau 13 : Comparaison de l'efficacité et de la résolution obtenue avec un capillaire de silice non traité et un laboratoire sur puce hétérogène. Les longueurs efficaces sont respectivement de 20 cm et de 2,7 cm. Dans les deux cas, l'électrolyte de migration est un tampon borax à 10 mmol/L.

Dans les laboratoires sur puce, nous obtenons un pic asymétrique pour le Cy3 hydrolysé, c'est pourquoi le nombre de plateaux théoriques est calculé à partir de l'équation des moments :

$$N = \frac{9 \times \left(t - \frac{2}{3} \times w_{0,5} \right)^2}{2 \times w_{0,5}^2} = \frac{M_1}{M_2} \quad (45)$$

La comparaison des résolutions montre clairement que, pour cette expérience, les pics sont mieux résolus dans les laboratoires sur puce que dans le capillaire de silice.

Les conditions expérimentales choisies sont donc plus adaptées à une séparation sur puce qu'à une analyse en capillaire. En revanche, l'efficacité calculée pour les protéines est plus importante avec le capillaire. Il est intéressant de remarquer que malgré la faible efficacité des pics associés aux protéines, les pics correspondant aux différentes formes du Cy3 présentent des quantités de plateaux théoriques élevées dans les laboratoires sur puce. Compte-tenu de la bonne résolution ($R_s = 3,46$) entre le Cy3 et l'Anhydrase carbonique,

nous pouvons envisager d'utiliser nos microsystemes pour purifier un mélange de protéines d'un excès de fluorophores.

Grâce aux petites longueurs de séparations utilisées dans les laboratoires sur puce, l'analyse ne dure que 90 secondes en comparaison aux 420 secondes nécessaires à une séparation dans un capillaire de silice. Ces durées ne tiennent, évidemment pas compte, des 60 minutes exigées pour conditionner le capillaire de silice.

En conclusion, nous avons démontré au travers de ces analyses, que nos microsystemes permettaient de séparer rapidement un mélange de biomolécules avec une bonne résolution. Pour démontrer que les problèmes d'adsorption n'étaient pas complètement rédhibitoires lors des séparations, nous sommes parvenus à séparer un mélange de protéines. Pour ces analyses, les performances de nos laboratoires sur puce ont été comparées d'une part avec des microsystemes commerciaux tout en verre, mais également avec des capillaires de silice non traités. En regard des résolutions obtenues lors des séparations, nous pouvons envisager de travailler avec des mélanges de protéines plus complexes afin de tester les limites de notre dispositif.

9.4 Séparation d'un mélange de protéines par CGE

Dans les paragraphes précédents, nous avons prouvé qu'il était possible d'utiliser nos laboratoires sur puce pour séparer des protéines. Cependant, il semble impossible par cette méthode de séparer des protéines possédant des rapports charges/tailles similaires. Nous avons donc mis au point un autre mode de séparation par électrophorèse capillaire.

Dans le chapitre 3.3.3., nous avons décrit qu'il était possible de séparer des molécules uniquement en fonction de leurs tailles par électrophorèse capillaire en gel (CGE). Nous avons donc cherché à insérer une matrice de séparation dans nos microcanaux. Par simplicité, nous avons choisi de travailler avec une gel de haute viscosité fournit par Beckman-Coulter (ecap SDS 14-200 gel). Il s'agit d'une formulation particulière d'oxyde de polyéthylène optimisée pour séparer des protéines présentes dans la gamme 14-200 kDa. Cette matrice a été choisie car elle est transparente dans le visible. Pour neutraliser les charges de surface des protéines, une solution de SDS est ajoutée à l'électrolyte de migration. Ainsi, les protéines possèdent, des rapports charges-tailles similaires et migrent uniquement en fonction de leurs tailles. Avant que les analyses n'aient lieu, les canaux microfluidiques

sont traités pendant 5 min avec de la soude 1 mol/L, rincés avec de l'eau désionisée, puis conditionnés en présence d'acide chlorhydrique à 1 mol/L.

Ensuite, 15 μ L de gel ecap SDS 14-200 sont déposés à l'entrée des réservoirs (S et W1) du canal d'injection et de l'entrée du canal de séparation (B). Puis, la matrice est mobilisée le long du canal de séparation en appliquant une aspiration au niveau du réservoir de sortie (W2). Le remplissage des canaux est contrôlé avec le microscope optique, pour s'assurer qu'aucune bulle d'air n'ait été générée. Enfin, le gel est retiré des réservoirs (S) et (W1) afin d'être remplacé par une solution commerciale de tampon Tris-HCl (avec 0,1 % de SDS, pH=6,6). Avant d'être injecté, le mélange à tester est dilué avec un volume équivalent d'électrolyte de migration, puis chauffé à 90°C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines. Eventuellement, il est possible d'ajouter du β -mercaptoéthanol pour rompre les ponts disulfures.

Pour démontrer la faisabilité de notre approche, nous avons tenté de séparer le mélange β -lactoglobuline A et Anhydrase carbonique II par électrophorèse capillaire en gel.

Ces expériences ont été réalisées en absence de β -mercaptoéthanol. Pendant l'étape de dénaturation thermique, les canaux sont équilibrés avec l'électrolyte de migration. L'injection « flottante » des molécules dans le canal de séparation dure 30 secondes à 200 V/cm avant que les protéines ne migrent le long du canal de séparation à 300 V/cm³⁵⁵. L'électrophérogramme obtenu est décrit dans la figure 64.

Sur cet électrophérogramme, les pics sont attribués en fonction des masses moléculaires des protéines. Ainsi, le premier pic correspond à la β -lactoglobuline A (MM : 18 kDa) et le second à l'Anhydrase carbonique II (MM : 29 kDa). Cette analyse a été répétée sur 6 expériences successives et nous avons obtenu une variation relativement faible du temps de migration (1,3 %).

En dépit du fait, que les résolutions en CGE devraient être meilleures que celles obtenues en CZE, la résolution à mi-hauteur des pics vaut 0,7 ce qui signifie que la séparation est de très mauvaise qualité. Le traitement de l'échantillon et les conditions d'injection ont été évalués mais aucun de ces paramètres n'a permis d'améliorer la résolution obtenue. 3 raisons peuvent être envisagées pour justifier ces résultats.

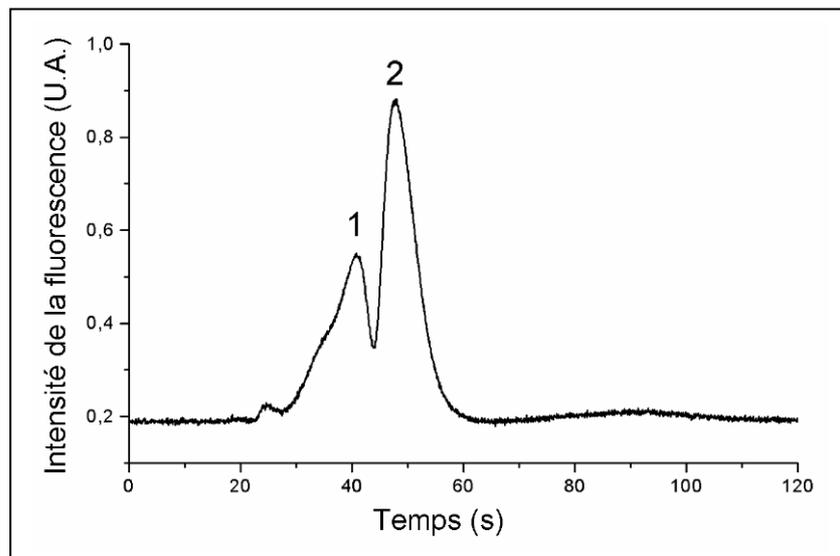


Figure 64 : Séparation dans un laboratoire sur puce de la β -lactoglobuline A et de l'Anhydrase carbonique II par électrophorèse capillaire en gel. Les protéines migrent au travers d'une matrice (ecap SDS 14-200 gel) à 300 V/cm.

A ce jour, nous n'avons pas trouvé de travaux utilisant cette matrice dans un microsystème en PDMS. Il est donc probable qu'un flux électroosmotique persiste dans le microcanal, à cause d'un mauvais recouvrement des parois internes du canal par le gel^{68, 365}.

Il est possible, que les canaux microfluidiques que nous réalisons soient trop étroits, ce qui conduirait à leur obturation, ou à la présence de microbulles d'air³⁵⁵. Des travaux publiés recommandent ainsi de privilégier l'utilisation de canaux possédant une profondeur de 40 μm et une largeur de 100 μm ³⁶⁶.

Enfin, il est tout à fait envisageable que la matrice choisie ne possède pas un tamisage (sieving) suffisant pour séparer convenablement ce mélange de protéines dans le cadre de notre structure hétérogène. L'utilisation d'un polymère solide (polyacrylamide, polydextran...) plutôt qu'une matrice liquide pourrait solutionner ce problème^{68, 365}.

9.5 Séparation d'un mélange anticorps-antigène

Afin de nous rapprocher du contexte du projet de recherche, nous avons mis en place une collaboration avec le laboratoire de J. Potempa aux Etats-Unis.

Il s'agit d'utiliser nos laboratoires sur puce pour détecter la présence d'un antigène particulier dans un mélange réactionnel. Notre hypothèse de travail étant que cet antigène peut être reconnu par un anticorps monoclonal. Ainsi, si cet antigène est présent dans le mélange à séparer, un complexe anticorps-antigène sera formé au cours de la migration.

Comme le rapport charge/taille de ce complexe est différent du ratio correspondant à l'anticorps seul ou à l'antigène seul, nous devrions pouvoir séparer ces 3 composés par électrophorèse de zone. En revanche, si l'antigène est absent du mélange, il n'y aura pas de pics correspondant au complexe et à l'antigène.

Le modèle biologique que nous avons choisi d'étudier concerne un antigène produit par la bactérie *Porphyromonas Gingivalis*. Cette bactérie gram négative est impliquée dans les infections des gencives et du parodonte et plus particulièrement dans les infections de l'os alvéolaire^{367, 368}. Une de ses voies d'infection exploite les antigènes HrgpA et RgpB. HrgpA est une protéine de 95 kDa complexant un domaine catalytique (partiellement reconnu par l'anticorps monoclonal) et des domaines d'adhésion hémagglutiniques (hemagglutinin-adhesion domain). L'antigène RgpB est une protéinase de 50 kDa composée d'une seule chaîne protéique.

Afin de reconnaître spécifiquement ces molécules, l'équipe de J. Potempa a infecté une souris avec de faibles quantités de ces protéinases. En réponse, le système immunitaire de la souris a produit des cellules lymphocytaires qui ont générées des anticorps dirigés spécifiquement contre les protéines d'intérêt. Ces lymphocytes sont ensuite extraits de la souris avant d'être fusionnés avec des cellules tumorales myélomateuses. L'hybridome ainsi formé possède l'avantage de se multiplier rapidement et de produire indéfiniment des anticorps spécifiques. Ces cellules hybridomes sont cultivées in vivo (dans les parois stomacales de souris) afin de produire une quantité suffisante d'anticorps monoclonaux. A la suite de ces travaux, ces anticorps sont envoyés au LEOM pour être étudiés dans les laboratoires sur puce.

Pour démontrer la faisabilité d'un test immunologique couplé à une séparation microfluidique dans nos laboratoires sur puce, nous n'avons travaillé qu'avec la protéinase RgpB et l'anticorps. En effet, nous devons déjà contrôler que nos microsystèmes étaient suffisamment performants pour distinguer la formation d'un complexe immunologique. Avant d'être injectées, ces protéines purifiées ont été désalées d'un tampon Tris vers un tampon phosphate (1x, pH = 7,2), puis modifiées en Cy3. Le dosage des molécules à 280 nm et à 553 nm a permis d'estimer qu'il y a en moyenne 2 molécules de Cy3 par anticorps, tandis qu'il y a 12 molécules de Cy3 par antigène. Compte tenu de ces remarques, il est indispensable de diluer 5 fois la solution de RgpB-Cy3, pour éviter que la fluorescence émise par l'antigène marqué ne masque le signal émis par l'anticorps-Cy3.

Dans le but d'identifier les pics de migration correspondant à chaque composé, les protéines ont été injectées individuellement avant d'être mélangées. Ces molécules sont injectées électrocinétiquement (tableau 14) au sein d'un canal microfluidique fabriqué par microtamponnage par B. Hannes. Ce canal possède une longueur de séparation de 4,2 cm, une profondeur de 20 μm et une largeur de 80 μm . Les fluorophores sont excités au travers d'un objectif de microscope grossissant 10 fois.

Electrodes	Etape 1 : floating step	Etape 2 : séparation	Etape 3 : rétrocontrôle	Electrodes
S	100 V	100 V	200 V	S
W1	-100 V	Flottant	200 V	W1
B	-10 V	Flottant	500 V	B
W2	Flottant	-500 V	-550 V	W2

Tableau 14 : Séquence d'injection utilisée lors de la séparation du mélange anticorps et antigène. L'étape 1 dure 1 minute tandis que l'étape 2 ne dure que 3 secondes.

Si l'on tient compte des différences de tailles des 2 protéines, ainsi que des charges apportées par le Cy3, nous pouvons prévoir l'ordre d'apparition des composés.

En effet, la molécule RgpB est petite (MM : 50 kDa) et possède un grand nombre de charges négatives à cause de la présence des molécules de Cy3. L'anticorps, en revanche possède une masse moléculaire plus grande et une quantité plus faible de fluorophore par molécule. Par conséquent, il est probable que la protéase RgpB possède un rapport charge/taille plus important que l'anticorps. L'anticorps doit donc apparaître avant l'antigène.

Expérimentalement, nous observons que l'anticorps monoclonal est détecté après un temps de migration de 100 ± 2 secondes (figure 65), tandis que l'antigène n'apparaît qu'après une migration de 140 ± 4 secondes (figure 66). Ces résultats, reproduits 3 fois, confirment les suppositions qui avaient été faites.

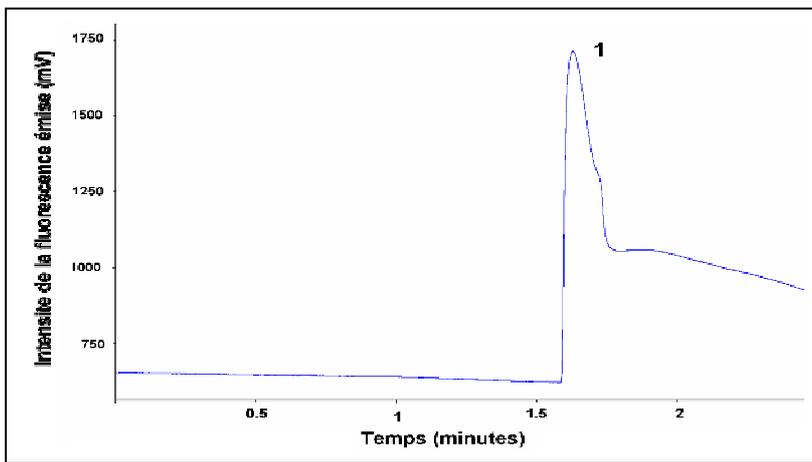


Figure 65 : Electrophérogramme de l'anticorps monoclonal dérivé au Cy3 injecté dans un microcanal fabriqué par microtamponnage. L'électrolyte de migration est un tampon borax de 10 mmol/L, et le champ électrique appliqué est de 250 V/cm.

Au cours des analyses, nous avons remarqué que l'anticorps avait tendance à flocculer si les expériences duraient plus de 10 minutes. Pour le moment, nous n'avons pas trouvé d'explications dans la littérature pour justifier ce comportement, nous ignorons s'il s'agit d'une agglomération des molécules d'anticorps ou du résultat d'une dénaturation thermique dans les canaux microfluidiques.

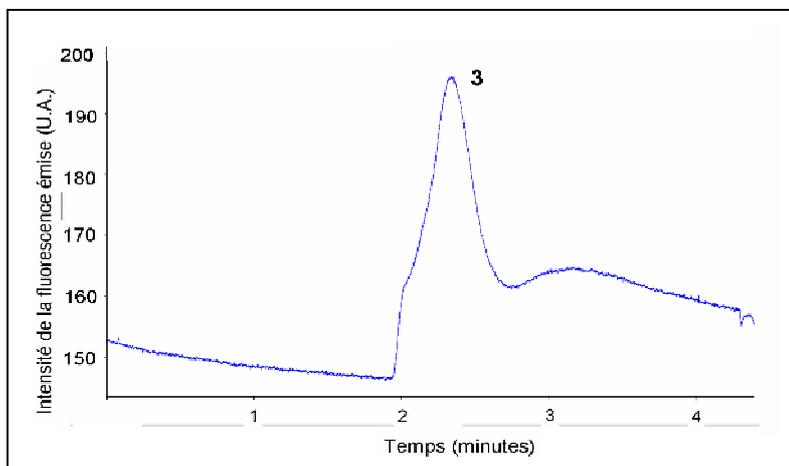


Figure 66 : Electrophérogramme obtenu après injection de l'antigène RgpB-Cy3 dans un canal microtamponné. L'électrolyte de migration est un tampon borax de 10 mmol/L, et le champ électrique appliqué vaut 250 V/cm.

Comme l'anticorps et l'antigène possèdent des temps de migration très différents, nous devrions pouvoir les séparer. Nous les avons donc mélangés puis injectés au sein de nos laboratoires sur puce.

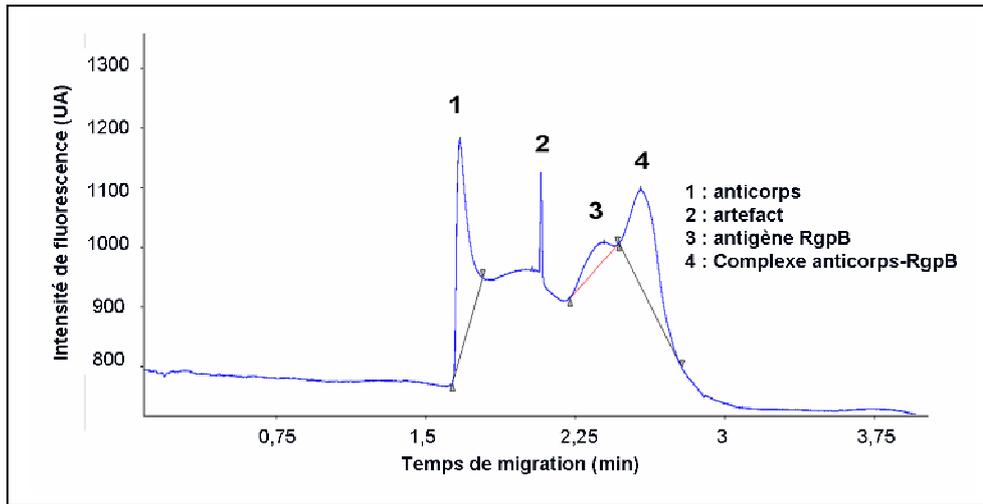


Figure 67 : Séparation d'un mélange anticorps et antigène dans un laboratoire sur puce. L'électrolyte de migration est un tampon Borax à 10 mmol/L et le champ électrique appliqué est de 250 V/cm. Le pic 1 correspond à l'anticorps monoclonal. Le pic 2 est identifié comme un artefact expérimental. Le pic 3 est associé à l'antigène RgpB, tandis que le pic 4 représente le complexe anticorps-antigène formé.

Comme nous le visualisons sur la figure 67, l'antigène (pic 3) et l'anticorps (pic 1) sont bien séparés. Comme le pic 2 possède une très grande efficacité ($N=120000$ plateaux théoriques par mètre) et qu'il n'apparaît pas de manière reproductible, nous pensons qu'il s'agit d'un artefact expérimental.

Enfin, un dernier pic est détecté. Ce pic 4 est identifié comme étant le complexe anticorps-antigène que nous recherchions. Les conditions expérimentales ne sont pas encore optimales car les pics 3 et 4 sont chevauchants. Cette séparation pourra être améliorée en utilisant des solutions moins concentrées ou en modifiant l'amplitude du flux électroosmotique.

Au travers de cette expérience nous venons de démontrer qu'il est possible de suivre, en quelques minutes, une réaction immunologique lors d'une séparation au sein d'un microcanal. Ces résultats, bien que préliminaires, sont encourageants. Des expériences complémentaires doivent être testées pour vérifier la pertinence de ces analyses. Par exemple, nous envisageons d'injecter différentes quantités d'anticorps dans le mélange initial.

Ainsi, nous devrions moduler l'intensité des pics 1 et 4. De la même manière, il pourrait être intéressant d'étudier la cinétique de formation du complexe en modulant les tensions électriques appliquées.

10 Conclusions:

Cette thèse est dédiée au développement de laboratoires sur puce innovants intégrant des structures microfluidiques et optiques. Au cours de cette première thèse effectuée dans l'équipe Lab-on-a-Chip du LEOM, nous avons effectué une étude complète allant de la fabrication jusqu'à la caractérisation et la séparation de protéines dans des laboratoires sur puce originaux.

Nos microsystèmes incluent des structures optiques et microfluidiques. L'équipe du professeur P. Benech à l'IMEP-INPG était responsable de la réalisation des guides optiques planaires et des jonctions Y par une méthode d'échange d'ions. Au LEOM, nous réalisons les structures microfluidiques et développons un environnement de caractérisation permettant des analyses optiques, microfluidiques et séparatives.

Pour répondre aux exigences des laboratoires sur puce, l'IMEP-INPG a dû adapter ces procédés technologiques d'échange d'ions Na^+/K^+ . Le saut d'indice, ainsi obtenu permet de confiner la lumière au sein des guides optiques. Grâce à la maîtrise des procédés de fabrication, nous pouvons sélectionner la taille et la forme de ces guides.

Les mesures en transmission et en fluorescence ont démontré que les guides optiques fabriqués par échange d'ions étaient bien adaptés à la détection des protéines présentes dans les canaux microfluidiques. En comparaison à d'autres méthodes de fabrication de guides optiques décrites dans la littérature, l'échange d'ions fournit de très faibles pertes.

Grâce aux guides optiques, nous sommes parvenus à acheminer la lumière excitatrice jusqu'à la zone de détection du canal microfluidique. La fluorescence émise par les fluorophores est ensuite collectée au travers d'un guide optique colinéaire afin d'acheminer la fluorescence jusqu'au photodétecteur. Ainsi, l'intégration optique a permis de s'affranchir de la microscopie à fluorescence conventionnellement utilisée. Il est donc envisageable d'insérer cette technologie dans un analyseur miniaturisé.

Les mesures de sensibilité démontrent que nous sommes capables de détecter jusqu'à 0,5 nmol/L de fluorophores en milieu aqueux. Ces limites de détection sont en accord avec les exigences des expériences biologiques requises lors d'un diagnostic médical.

A l'aide des courbes d'étalonnage qui ont été établis, il est possible de doser quantitativement des protéines présentes dans un canal microfluidique.

Une nouvelle approche intégrant, dans un microsystème, des canaux microfluidiques et une jonction Y fabriquée par échange d'ions a été expérimentée. Avec ce dispositif, nous sommes parvenus, pour la première fois, à distribuer la lumière excitatrice au travers d'un substrat contenant des canaux microfluidiques. En effet, cette jonction Y nous a permis d'exciter simultanément la fluorescence de plusieurs molécules localisées dans différentes zones du canal de séparation.

L'implémentation des guides optiques par échange d'ions se présente donc comme une solution simple, efficace, et peu coûteuse pour acheminer la lumière excitatrice ou fluorescente jusqu'à la zone de détection.

Différentes méthodes de fabrication des structures microfluidiques ont été mises au point et évaluées au LEOM. Après optimisation des méthodes de gravure humide et gravure ionique réactive du verre, nous avons optés pour la gravure humide qui s'avère être la technologie la plus fiable pour fabriquer rapidement des canaux microfluidique possédant une très faible rugosité. La gravure sèche, quant à elle, se présente comme une alternative intéressante, si les analyses chimiques ou biologiques nécessitent des canaux possédant des parois verticales.

Dans l'architecture originale que nous avons développé, les canaux microfluidiques sont fabriqués en verre et une couche polymérique de type PDMS est utilisée pour assurer l'étanchéité des canaux d'injection et de séparation. Comme il s'agit d'une nouvelle structure de canaux microfluidiques, nous avons développé des procédures pour évaluer la vitesse et la mobilité électroosmotique. Nous avons utilisé des méthodes d'analyse ampérométrique et de fluorescence indirecte pour estimer ces valeurs.

Pour caractériser les conditions expérimentales à utiliser lors des séparations, nous avons étudié l'évolution de l'intensité du courant en fonction de la tension électrique appliquée. Ainsi, les séparations ont été effectuées sur la gamme de champs électriques 150-300 V/cm.

Si les séparations nécessitent des champs électriques plus importants, nous avons démontré que la présence de cosolvant, dans l'électrolyte de migration, permettait d'appliquer des champs électriques plus élevés, tout en limitant l'élévation de l'intensité du courant dans le canal microfluidique.

Afin d'améliorer la qualité des séparations obtenues ou de réduire l'adsorption des protéines, nous avons étudié l'influence de différents additifs chimiques sur la mobilité électroosmotique.

Pour améliorer la cinétique des séparations, il est possible d'augmenter le flux électroosmotique. Nous avons démontré que l'ajout de surfactant (SDS) à l'électrolyte de migration permettait d'améliorer l'hydrophilicité de la couche polymérique par un coating dynamique de la surface interne du canal de séparation. De plus, l'adsorption de ce détergent sur la surface interne des canaux, réduit l'adsorption des protéines par répulsion électrostatique entre les charges négatives de la surface modifiée et celles des protéines.

A l'inverse, certaines séparations nécessitent un flux électroosmotique faible, c'est pourquoi nous avons mis en place un traitement chimique permettant de réduire le flux électroosmotique. Ainsi, l'ajout de glycérol à l'électrolyte de migration, nous a permis d'augmenter la viscosité du tampon de migration et de réduire l'adsorption des protéines sur la surface via un coating dynamique.

Après avoir caractérisé les conditions expérimentales requises pour les analyses séparatives en électrophorèse capillaire sur puce, nous avons développé des procédures d'injection de molécules. Après optimisation, nous pouvons contrôler précisément les potentiels électriques appliqués de sorte à injecter efficacement un volume défini d'échantillon dans le canal de séparation.

Pour démontrer le pouvoir séparatif de nos laboratoires sur puce, nous avons étudié différents mélanges de molécules et de protéines.

Dans un premier temps, nous avons séparé un mélange simple composé de Cy3 et de Streptavidine. Les performances de nos microsystèmes nous permettent même de séparer le Cy3 natif de ses produits de dégradation. Afin de confirmer le profil de séparation obtenu et d'évaluer les performances de nos laboratoires sur puce, ce mélange de molécules a été analysé sur un microsystème commercial (Micronit). Les électrophérogrammes obtenus sont tout à fait comparables. Il est intéressant de noter que, dans les mêmes conditions, les séparations sont mieux résolues dans nos microsystèmes

que dans les laboratoires sur puce commerciaux. Au travers de cette expérience, nous avons démontré que les laboratoires sur puce fabriqués au LEOM pouvaient être utilisés à des fins séparatives.

Pour évaluer les performances séparatives de nos laboratoires sur puce, nous avons analysé un mélange plus complexe composé de β -Lactoglobuline A et d'Anhydrase carbonique II. A titre de référence, ce mélange fut tout d'abord injecté sur un appareil d'électrophorèse capillaire de type P/ACE 2100 au LASOC sous la direction du professeur P.L. Desbène. Les conditions expérimentales ont été mises au point sur un capillaire de silice fondue avant d'être appliquées aux laboratoires sur puce. Les profils de séparation obtenus dans les laboratoires sur puce sont comparables aux résultats décrits en électrophorèse capillaire classique. Grâce à ces travaux, nous avons démontré que nos microsystèmes permettaient d'étudier des mélanges protéiques.

Afin d'augmenter la polyvalence de nos microsystèmes, nous avons adapté les procédures d'injection dans les laboratoires sur puce, dans le but de séparer des protéines en électrophorèse capillaire en gel. Des solutions techniques ont été trouvées pour insérer la matrice de tamisage commerciale (oxyde de polyéthylène) dans les canaux de séparation. La faisabilité de cette approche est validée par la séparation d'un mélange de protéines modèles (β -Lactoglobuline A et Anhydrase Carbonique II) en fonction de leurs masses moléculaires.

Enfin, nous avons mis en place une procédure originale pour coupler dans un canal microfluidique une séparation en électrophorèse de zone avec une réaction immunologique. L'expérience a été réalisée avec succès sur un modèle biologique d'infection du parodonte. La réaction immunologique fait intervenir l'antigène (RgpB) produit par la bactérie *Porphyromonas Gingivalis* et un anticorps monoclonal spécifique.

Au cours de ces expériences, nous sommes parvenus non seulement, à séparer ces deux protéines dans un laboratoire sur puce, mais également à détecter la présence du complexe anticorps-antigène formé au cours de l'analyse. Cette combinaison entre une séparation en électrophorèse de zone et une réaction immunologique dans un laboratoire sur puce est tout à fait innovante. Nous démontrons ainsi qu'il est possible d'étudier les interactions entre un anticorps et un antigène dans un canal microfluidique de séparation. Grâce à l'intégration optique, il est possible de quantifier par analyse de la fluorescence, la quantité des espèces séparées.

Les perspectives de ce travail de thèse sont multiples.

Dans un premier temps, je pense qu'il faut continuer d'optimiser le couplage entre les guides optiques et le canal microfluidique. Des études théoriques par modélisation permettraient d'améliorer la géométrie de l'interface entre les guides optiques et le canal de séparation afin de maximiser la collection de la fluorescence émise tout en minimisant l'éblouissement provenant de la source excitatrice. Nous devrions ainsi améliorer les limites de détection de notre dispositif.

Pour un système miniaturisé, une automatisation de la procédure d'alignement entre les fibres et les guides optiques permettrait d'éliminer les systèmes micrométriques d'alignement tout en garantissant des couplages optiques plus reproductibles. Cette automatisation permettrait également de réduire la taille de l'analyseur portable développé par B. Hannes au sein de notre équipe.

Dans un deuxième temps, il faut optimiser les résultats obtenus dans les analyses séparatives et tester des mélanges réactionnels plus complexes. Bien que nous ayons démontré la faisabilité de fabriquer des canaux microfluidiques interconnectés, il faut poursuivre ces travaux en effectuant des analyses en série ou en parallèle. Les structures microfluidiques couplées en parallèle permettraient d'effectuer des analyses comparatives entre des canaux fonctionnalisés et des canaux de référence. Les canaux interconnectés en série, permettraient, quant à eux, d'intégrer une étape de purification, de pré-concentration ou de marquage de protéines dans un canal microfluidique présent en amont du canal de séparation.

Enfin, les expériences séparatives faisant intervenir une réaction immunologique doivent être approfondies. Par exemple, nous envisageons de tester cette même interaction en ayant préalablement immobilisé l'anticorps au fond du canal.

Des expériences préliminaires dans ce sens ont déjà été réalisées en collaboration avec B. Hannes. Grâce au microtamponnage, nous sommes parvenus à immobiliser localement l'anticorps au fond d'un canal microfluidique. Nous avons prouvé la reconnaissance entre l'anticorps et l'antigène en injectant ce dernier à l'entrée des canaux et en visualisant localement l'interaction obtenue. A présent, il faut tester la spécificité de la reconnaissance en injectant des mélanges complexes de protéines.

A terme, nous souhaiterions étendre les analyses effectuées dans des laboratoires sur puce au traitement de marqueurs cancéreux présents dans des échantillons sanguins. L'analyseur miniaturisé, en cours de développement au LEOM, permettra d'effectuer ce diagnostic médical hors des laboratoires d'analyses, voire dans les cabinets des médecins traitants.

11 Références:

1. L. Michaelis, "Elektrische Überführung von Fermenten", *Biochemische Zeitschrift*, 16, 81-86 (1909).
2. R.F. Probstein, "Physicochemical Hydrodynamics: An Introduction", Vol. 1, Edn. 2. (John Wiley & Sons Inc., New York; 1994).
3. S. Hjertén, "Free Zone Electrophoresis", *Chromatographic Review*, 9, 122-219 (1967).
4. R. Virtanen, "Zone Electrophoresis in a Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection. Theoretical and Experimental Study", *Acta Polytechnica Scandinavica*, 123, 1-67 (1974).
5. J.W. Jorgenson & K.D. Lukacs, "Free Zone Electrophoresis in Glass Capillaries", *Clinical Chemistry*, 27, 1551-1553 (1981).
6. J.W. Jorgenson & K.D. Lukacs, "Capillary Zone Electrophoresis", *Science*, 22, 266-272 (1983).
7. M.W. Malone, P.L. Weber, M.R. Smyth & S.M. Lunte, "Reductive Electrochemical Detection for Capillary Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, 66, 3782-3787 (1994).
8. A. Wang & Y. Fang, "Applications of Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection in Pharmaceutical and Biomedical Analyses", *Electrophoresis*, 21, 1281-1290 (2000).
9. H. Fonge, E. Kaale, C. Govaerts, K. Desmet, A. Van Schepdael & J. Hoogmartens, "Bioanalysis of Tobramycin for Therapeutic Drug Monitoring by Solid-Phase Extraction and Capillary Zone Electrophoresis", *Journal of Chromatography B*, 810, 313-318 (2004).
10. M.A. Jenkins & M.D. Guerin, "Capillary Electrophoresis as a Clinical Tool", *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 682, 23-34 (1996).
11. D. Perrett, "Capillary electrophoresis in clinical chemistry", *Annals of Clinical Biochemistry*, 36, 133-150 (1999).
12. R. Clark, J.A. Katzmann, E. Wiegert, C. Namyst-Goldberg, L. Sanders, R.P. Oda, R.A. Kyle & J.P. Landers, "Rapid Capillary Electrophoretic Analysis of Human Serum Proteins: Qualitative Comparison with High-Throughput Agarose Gel Electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, 744, 205-213 (1996).
13. D.K. Lloyd, S. Li & P. Ryan, "Protein Chiral Selectors in Free-Solution Capillary Electrophoresis and Packed-Capillary Electrochromatography", *Journal of Chromatography A*, 694, 285-296 (1995).
14. F. Kilár & S. Hjertén, "Unfolding of Human Serum Transferrin in Urea Studied by High-Performance Capillary Electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, 638, 269-276 (1993).

15. I. Recio & C. Olieman, "Determination of Denatured Serum Proteins in the Casein Fraction of Heat-Treated Milk by Capillary Zone Electrophoresis", *Electrophoresis*, 17, 1228-1233 (1996).
16. G.L. Lookhart & S.R. Bean, "Separation and Characterization of Wheat Protein Fractions by High-Performance Capillary Electrophoresis", *Cereal Chemistry*, 72, 527-532 (1995).
17. G.M. McLaughlin, A. Weston & K.D. Hauffe, "Capillary Electrophoresis Methods Development and Sensitivity Enhancement Strategies for the Separation of Industrial and Environmental Chemicals", *Journal of Chromatography A*, 744, 123-134 (1996).
18. H. Lianguang, J.D. Harisson & J.H. Masliyah, "Numerical Model of Electrokinetic Flow for Capillary Electrophoresis", *Journal of Colloid and Interface Science*, 215, 300-312 (1999).
19. D. Li, "Electrokinetics in Microfluidics", Vol. 2, Edn. 1. (Elsevier Academic Press, 2004).
20. B.J. Kirby & E.F. Hasselbrink Jr., "Zeta Potential of Microfluidic Substrates: 1. Theory, Experimental Techniques, and Effects on Separations", *Electrophoresis*, 25, 187-202 (2004).
21. M.J. Kim, H.J. Kim & K.D. Kihm, "Micro-Scale PIV for Electroosmotic Flow Measurements", The Third Pacific Symposium on Flow Visualization and Image Processing, Honolulu, 2001.
22. G.C. Giddings, "Generation of Variance, Theoretical Plates Resolution and Peak Capacity in Electrophoresis and Sedimentation", *Journal of Separation Science*, 4, 181-189 (1969).
23. J.P. Foley & J.G. Dorsey, "Equations for Calculation of Chromatographic Figures of Merit for Ideal and Skewed Peaks", *Analytical Chemistry*, 55, 730-737 (1983).
24. S.L. Tamisier-Karolak, M. Tod, P. Bonnardel, M. Czok & P. Cardot, "Daily Validation Procedure of Chromatographic Assay Using GaussoExponential Modelling", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13, 959-970 (1995).
25. V.L. McGuffin, "Stochastic Simulation of Laminar and Electroosmotic Convection in Capillary Electrophoresis and Electrochromatography", *Electrophoresis*, 22, 3709-3719 (2001).
26. C.I.D. Newman & V.L. McGuffin, "Stochastic Simulation of Reactive Separations in Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis*, 26, 537-547 (2005).
27. S.B. Howerton, C. Lee & V.L. McGuffin, "Additivity of Statistical Moments in the Exponentially Modified Gaussian Model of Chromatography", *Analytica Chimica Acta*, 478, 99-110 (2003).
28. S.L. Tamisier-Karolak, I. Le Potier, O. Barlet & M. Czok, "Analysis of Anions in Aqueous Samples by Ion Chromatography and Capillary Electrophoresis. A Comparative Study of Peak Modeling and Validation Criteria", *Journal of Chromatography A*, 852, 487-498 (1999).

29. J. Li, "Comparison of the Capability of Peak Functions in Describing Real Chromatographic Peaks", *Journal of Chromatography A*, 952, 63-70 (2002).
30. G.L. Erny, E.T. Bergstrom, D.M. Goodall & S. Grieb, "Predicting Peak Shape in Capillary Zone Electrophoresis: a Generic Approach to Parametrizing Peaks Using the Haarhoff-Van der Linde (HVL) Function", *Analytical Chemistry*, 73, 4862-4872 (2001).
31. T. Wehr, R. Rodriguez-Diaz & M. Zhu, "Capillary Electrophoresis of Protein", Vol. 80. (New York; 1999).
32. S.R. Radko, G.H. Weiss & A. Chrambach, "Protein Band Spreading in Capillary Zone Electrophoresis. Effects of Sample Zone Length and Presence of Polymer", *Journal of Chromatography A*, 781, 277-286 (1997).
33. H. Zhang, X. Song, Z. Shi, G. Yang & Z. Hu, "Capillary Zone Electrophoresis for the Determination of Average Hydrodynamic Velocity and Diffusion Coefficient", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 365, 499-503 (1999).
34. B.X. Mayer, "How to Increase Precision in Capillary Electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, 907, 21-37 (2001).
35. S.V. Ermakov, M.Y. Zhukov, L. Capelli & P.G. Righetti, "Quantitative Studies of Different Injection Systems in Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis*, 15, 1158-1166 (1994).
36. D.J. Rose & J.W. Jorgenson, "Characterization and Automation of Sample Introduction Methods for Capillary Zone Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, 60, 642-648 (1988).
37. C.C. Lin, C.C. Chen, C.E. Lin & S.H. Chen, "Microchip Electrophoresis with Hydrodynamic Injection and Waste-Removing Function for Quantitative Analysis", *Journal of Chromatography A*, 1051, 69-74 (2004).
38. D. Sinton, L. Ren & D. Li, "A Dynamic Loading Method for Controlling On-Chip Microfluidic Sample Injection", *Journal of Colloid and Interface Science*, 266, 448-456 (2003).
39. C.H. Tsai, R.J. Yang, C.H. Tai & L.M. Fu, "Numerical Simulation of Electrokinetic Injection Techniques in Capillary Electrophoresis Microchips", *Electrophoresis*, 26, 674-686 (2005).
40. L.M. Fu, R.J. Yang & G.B. Lee, "Electrokinetic Focusing Injection Methods on Microfluidic Devices", *Analytical Chemistry*, 75, 1905-1910 (2003).
41. J.P. Alarie, S.C. Jacobson & J.M. Ramsey, "Electrophoretic Injection Bias in a Microchip Valving Scheme", *Electrophoresis*, 22, 312-217 (2001).
42. Y.C. Lin, W.M. Wu & C.S. Fan, "Design and Simulation of Sample Pinching Utilizing Microelectrodes in Capillary Electrophoresis Microchips", *Lab on a Chip*, 4, 60-64 (2004).

43. Y. Walbroehl & J.W. Jorgenson, "Capillary Zone Electrophoresis for the Determination of Electrophoretic Mobilities and Diffusion Coefficients of Proteins", *Journal of Microcolumn Separations*, 1, 41-45 (1989).
44. D. Heiger, "High Performance Capillary Electrophoresis: An Introduction", <http://www.chem.agilent.com/scripts/literaturepdf.asp?iWHID=15703>, 2003
45. S. Hjertén, S. Mohabbati & D. Westerlund, "Influence of Ignored and Well-Known Zone Distortions on the Separation Performance of Proteins in Capillary Free Zone Electrophoresis with Special Reference to Analysis in Polyacrylamide-Coated Fused Silica Capillaries in Various Buffers: I. Theoretical Studies", *Journal of Chromatography A*, 1053, 181-199 (2004).
46. R. Bharadwaj & J.G. Santiago, "Dynamics of Field Amplified Sample Stacking ", International Mechanical Engineering Congress and Exposition (ASME), New York, 2001.
47. D. Ross & L.E. Locascio, "Microfluidic Temperature Gradient Focusing", *Analytical Chemistry*, 74, 2556-2564 (2002).
48. B. Verzola, C. Gelfi & P.G. Righetti, "Protein Adsorption to the Bare Silica Wall in Capillary Electrophoresis Quantitative Study on the CHEMICAL Composition of the Background Electrolyte for Minimising the Phenomenon", *Journal of Chromatography A*, 868, 85-99 (2000).
49. V. Virtanen, G. Bordin & A.R. Rodriguez, "Separation of Metallothionein Isoforms with Capillary Zone Electrophoresis using an Uncoated Capillary Column: Effects of pH, Temperature, Voltage, Buffer Concentration and Buffer Composition", *Journal of Chromatography A*, 734, 391-400 (1996).
50. L.M. Fu, R.J. Yang & G.B. Lee, "Analysis of Geometry Effects on Band Spreading of Microchip Electrophoresis", *Electrophoresis*, 23, 602-612 (2002).
51. J.I. Molho, A.E. Herr, B.P. Mosier, J.G. Santiago, T.W. Kenny, R.A. Brennen, G.B. Gordon & B. Mohammadi, "Optimization of Turn Geometries for Microchip Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, 73, 1350-1360 (2001).
52. Y. Tachibana, K. Otsuka, S. Terabe, A. Arai, K. Suzuki & S. Nakamura, "Effects of the Length and Modification of the Separation Channel on Microchip Electrophoresis–Mass Spectrometry for Analysis of Bioactive Compounds", *Journal of Chromatography A*, 1025, 287-296 (2004).
53. Y. Hu, C. Werner & D. Li, "Influence of the Three-Dimensional Heterogeneous Roughness on Electrokinetic Transport in Microchannels", *Journal of Colloid and Interface Science*, 280, 527-536 (2004).
54. B.H. Weiller, L. Ceriotti, T. Shibata, D. Rein, M.A. Roberts, J. Lichtenberg, J.B. German, N.F. de Rooij & E. Verpoorte, "Analysis of Lipoproteins by Capillary Zone Electrophoresis in Microfluidic Devices: Assay Development and Surface Roughness Measurements", *Analytical Chemistry*, 74, 1702-1711 (2002).
55. Y. Xu, "Tutorial: Capillary Electrophoresis", Vol. 1. (Springer Verlag, New York; 1996).

56. M.L. Plenert & J.B. Shear, "Microsecond Electrophoresis", *Proceedings of National Academic of Sciences of the United States of America*, 100, 3853-3857 (2003).
57. P.A. Auroux, D. Iossifidis, D.R. Reyes & A. Manz, "Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications", *Analytical Chemistry*, 74, 2637-2652 (2002).
58. N. Lion, T.C. Rohner, L. Dayon, I.L. Arnaud, E. Damoc, N. Youhnovski, Z.Y. Wu, C. Roussel, J. Jossierand, H. Jensen, J.S. Rossier, M. Przybylski & H.H. Girault, "Microfluidic Systems in Proteomics", *Electrophoresis*, 24, 3533-3562 (2003).
59. N.A. Lacher, K.E. Garrison, R.S. Martin & S.M. Lunte, "Microchip Capillary Electrophoresis/Electrochemistry", *Electrophoresis*, 22, 2526-2536 (2001).
60. V. Kasicka, "Recent Developments in Capillary Electrophoresis and Capillary Electrochromatography of Peptides", *Electrophoresis*, 27, 142-175 (2005).
61. C.L. Colyer, S.D. Mangru & D.J. Harrison, "Microchip-Based Capillary Electrophoresis of Human Serum Proteins", *Journal of Chromatography A*, 781, 271-276 (1997).
62. E. Verpoorte, "Microfluidic Chips for Clinical and Forensic Analysis", *Electrophoresis*, 23, 677-712 (2002).
63. A.R. Stettler & M.A. Schwarz, "Affinity Capillary Electrophoresis on Microchips", *Journal of Chromatography A*, 1063, 217-225 (2005).
64. J. Wang, A. Ibáñez & M.P. Chatrathi, "Microchip-Based Amperometric Immunoassays using Redox Tracers", *Electrophoresis*, 23, 3744-3749 (2002).
65. F. Kilár & S. Hjertén, "Fast and High Resolution Analysis of Human Serum Transferrin by High Performance Isoelectric Focusing in Capillaries", *Electrophoresis*, 10, 23-29 (1989).
66. J.R. Mazzeo, J.A. Martineau & I.S. Krull, "Peptide Mapping Using EOF-Driven Capillary Isoelectric Focusing", *Analytical Biochemistry*, 208, 323-329 (1993).
67. O. Hofmann, D. Che, K.A. Cruickshank & U.R. Muller, "Adaptation of Capillary Isoelectric Focusing to Microchannels on a Glass Chip", *Analytical Chemistry*, 678-686 (1999).
68. J. Han & A.K. Singh, "Rapid Protein Separations in Ultra-Short Microchannels: Microchip Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing", *Journal of Chromatography A*, 1049, 205-209 (2004).
69. A.E. Herr & A.K. Singh, "Photopolymerized Cross-Linked Polyacrylamide Gels for On-Chip Protein Sizing", *Analytical Chemistry*, 76, 4727-4733 (2004).
70. S. Liu & A. Guttman, "Electrophoresis Microchips for DNA Analysis", *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 422-431 (2004).
71. V. Dolnik & S. Liu, "Applications of Capillary Electrophoresis on Microchip", *Journal of Separation Science*, 28, 1994–2009 (2005).

72. B. Jung, R. Bharadwaj & J.G. Santiago, "On-Chip Millionfold Sample Stacking Using Transient Isotachopheresis", *Analytical Chemistry*, 78, 2319-2327 (2006).
73. L.H.H. Silvertand, E. Machtejevas, R. Hendriks, K.K. Unger, W.P. Van Bennekoma & G.J. de Jong, "Selective Protein Removal and Desalting using Microchip CE", *Journal of Chromatography B*, 839, 68-73 (2006).
74. H. Huang, F. Xu, Z. Dai & B. Lin, "On-line Isotachopheretic Preconcentration and Gel Electrophoretic Separation of Sodium Dodecyl Sulfate-Proteins on a Microchip", *Electrophoresis*, 26, 2254-2260 (2005).
75. P.A. Walker, M.D. Morris, M.A. Burns & B.N. Johnson, "Isotachopheretic Separations on a Microchip. Normal Raman Spectroscopy Detection", *Analytical Chemistry*, 70, 3766-3769 (1998).
76. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya & T. Ando, "Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries", *Analytical Chemistry*, 56, 111-113 (1984).
77. J.P. Kütter, S.C. Jacobson & J.M. Ramsey, "Integrated Microchip Device with Electrokinetically Controlled Solvent Mixing for Isocratic and Gradient Elution in Micellar Electrokinetic Chromatography", *Analytical Chemistry*, 69, 5165-5171 (1997).
78. S.R. Wallenborg & C.G. Bailey, "Separation and Detection of Explosives on a Microchip Using Micellar Electrokinetic Chromatography and Indirect Laser-Induced Fluorescence", *Analytical Chemistry*, 72, 1872-1878 (2000).
79. L.A. Colón, G. Burgos, T.D. Maloney, J.M. Cintrón & R.L. Rodríguez, "Recent Progress in Capillary Electrochromatography", *Electrophoresis*, 21, 3965-3993 (2000).
80. N. Smith, "Capillary Electrochromatography", Vol. 1. (Beckman Coulter, 1999).
81. S.C. Jacobson, L.B. Koutny, R. Hergenroeder, A.W. Moore Jr. & J.M. Ramsey, "Microchip Capillary Electrophoresis with an Integrated Postcolumn Reactor", *Analytical Chemistry*, 66, 3472-3476 (1994).
82. B. He, J. Ji & F.E. Regnier, "Capillary Electrochromatography of Peptides in a Microfabricated System", *Journal of Chromatography A*, 853, 257-262 (1999).
83. B.E. Slentz, N.A. Penner & F.E. Regnier, "Protein Proteolysis and the Multi-Dimensional Electrochromatographic Separation of Histidine-Containing Peptide Fragments on a Chip", *Journal of Chromatography A*, 984, 97-107 (2003).
84. T.B. Stachowiak, F. Svec & J.M.J. Fréchet, "Chip Electrochromatography", *Journal of Chromatography A*, 1044, 97-111 (2004).
85. A. Griebel, S. Rund, F. Schönfeld, W. Dörner, R. Konrad & S. Hardt, "Integrated Polymer Chip for Two-Dimensional Capillary Gel Electrophoresis", *Lab on a Chip*, 4, 18-23 (2004).
86. Y. Li, J.S. Buch, F. Rosenberger, D.L. De Voe & C.S. Lee, "Integration of Isoelectric Focusing with Parallel Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis for

- Multidimensional Protein Separations in a Plastic Microfluidic Network", *Analytical Chemistry*, 76, 742-748 (2004).
87. A.E. Herr, J.I. Molho, K.A. Drouvalakis, J.C. Mikkelsen, P.J. Utz, J.G. Santiago & T.W. Kenny, "On-Chip Coupling of Isoelectric Focusing and Free Solution Electrophoresis for Multidimensional Separations", *Analytical Chemistry*, 75, 1180-1187 (2003).
 88. X. Yang, X. Zhang, A. Li, S. Zhu & Y. Huang, "Comprehensive Two-Dimensional Separations Based on Capillary High-Performance Liquid Chromatography and Microchip Electrophoresis", *Electrophoresis*, 24, 1451-1457 (2003).
 89. N. Gottschlich, S.C. Jacobson, C.T. Culbertson & J.M. Ramsey, "Two-Dimensional Electrochromatography/Capillary Electrophoresis on a Microchip", *Analytical Chemistry*, 73, 2669-2674 (2001).
 90. J.D. Ramsey, S.C. Jacobson, C.T. Culbertson & J.M. Ramsey, "High-Efficiency, Two-Dimensional Separations of Protein Digests on Microfluidic Devices", *Analytical Chemistry*, 75, 3758-3764 (2003).
 91. S.C. Terry, J.H. Jerman & J.B. Angell, "A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer", *IEEE Transactions on Electron Devices*, 26, 1880-1886 (1979).
 92. A. Manz, N. Graber & H.M. Widmer, "Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: A Novel Concept for Chemical Sensing", *Sensors and Actuators B*, 1, 244-248 (1990).
 93. O. Geschke, H. Klank & P. Tellemann, "Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices", Vol. 1, Edn. 1. (Wiley-VCH verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2004).
 94. A.R. Kopf-Sill, "Successes and Challenges of Lab-on-a-Chip", *Lab on a Chip*, 2, 42N-47N (2002).
 95. J.N. Adkins, S.M. Varnum, K.J. Auberry, R.J. Moore, N.H. Angell, R.D. Smith, D.L. Springer & J.G. Pounds, "Toward a Human Blood Serum Proteome: Analysis by Multidimensional Separation Coupled with Mass Spectrometry", *Molecular & Cellular Proteomics*, 1, 947-955 (2002).
 96. F.N. Lamari & N.K. Karamanos, "Methodological Challenges of Protein Analysis in Blood Serum and Cerebrospinal Fluid by Capillary Electrophoresis", *Chromatographia*, 58, 349-356 (2003).
 97. R.L. Lundblad, "Considerations for the Use of Blood Plasma and Serum for Proteomic Analysis", *The Internet Journal of Gastroenterology*, 1, 1-11 (2005).
 98. T. Lee, L. Montalvo, V. Chrebtow & M.P. Busch, "Quantification of Genomic DNA in Plasma and Serum Samples: Higher Concentrations of Genomic DNA Found in Serum than Plasma", *Transfusion*, 41, 276-282 (2001).
 99. Nasa, "Blood Collection with Proseptor device", <http://www.sti.nasa.gov/tto/spinoff1999/hm1.htm>, 1999

100. J.P. Kütter, S.C. Jacobson & J.M. Ramsey, "Solid Phase Extraction on Microfluidic Devices", *Journal of Microcolumn Separations*, 12, 93-97 (2000).
101. B.S. Broyles, S.C. Jacobson & J.M. Ramsey, "Sample Filtration, Concentration, and Separation Integrated on Microfluidic Devices", *Analytical Chemistry*, 75, 2761-2767 (2003).
102. S. Song, A.K. Singh & B.J. Kirby, "Electrophoretic Concentration of Proteins at Laser-Patterned Nanoporous Membranes in Microchips", *Analytical Chemistry*, 76, 4589-4592 (2004).
103. A. Dodge, K. Fluri, E. Verpoorte & N.F. de Rooij, "Electrokinetically Driven Microfluidic Chips with Surface-Modified Chambers for Heterogeneous Immunoassays", *Analytical Chemistry*, 73, 3400-3409 (2001).
104. J. Lichtenberg, N.F. de Rooij & E. Verpoorte, "Sample Pretreatment on Microfabricated Devices", *Talanta*, 56, 233-266 (2002).
105. M. Rowena, N. Monton, K. Imami, M. Nakanishi, J.B. Kim & S. Terabe, "Dynamic pH Junction Technique for On-line Preconcentration of Peptides in Capillary Electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, 1079, 266-273 (2005).
106. Y. Sera, N. Matsubara, K. Otsuka & S. Terabe, "Sweeping on a Microchip: Concentration Profiles of the Focused Zone in Micellar Electrokinetic Chromatography", *Electrophoresis*, 22, 3509-3513 (2001).
107. N. Gottschlich, C.T. Culbertson, T.E. McKnight, S.C. Jacobson & J.M. Ramsey, "Integrated Microchip-Device for the Digestion, Separation and Postcolumn Labeling of Proteins and Peptides", *Journal of Chromatography B*, 745, 243-249 (2000).
108. I.M. Lazar, R.S. Ramsey, S. Sundberg & J.M. Ramsey, "Subattomole-Sensitivity Microchip Nanoelectrospray Source with Time-of-Flight Mass Spectrometry Detection", *Analytical Chemistry*, 71, 3627-3631 (1999).
109. M. Ye, S. Hu, R.M. Schoenherr & N.J. Dovichi, "On-Line Protein Digestion and Peptide Mapping by Capillary Electrophoresis with Post-Column Labeling for Laser-Induced Fluorescence Detection", *Electrophoresis*, 25, 1319-1326 (2004).
110. D. Erickson & D. Li, "Integrated Microfluidic Devices", *Analytica Chimica Acta*, 507, 11-26 (2004).
111. J. Gao, J. Xu, L.E. Locascio & C.S. Lee, "Integrated Microfluidic System Enabling Protein Digestion, Peptide Separation, and Protein Identification", *Analytical Chemistry*, 73, 2648-2655 (2001).
112. D. Figeys & D. Pinto, "Proteomics on a Chip: Promising Developments", *Electrophoresis*, 22, 208-216 (2001).
113. E. Biddiss, D. Erickson & D. Li, "Heterogeneous Surface Charge Enhanced Micromixing for Electrokinetic Flows", *Analytical Chemistry*, 76, 3208-3213 (2004).
114. Y. Deng, H. Zhang & J. Henion, "Chip-Based Quantitative Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry Determination of Drugs in Human Plasma", *Analytical Chemistry*, 73, 1432-1439 (2001).

115. Y. Huang, W. Shan, B. Liu, Y. Liu, Y. Zhang, Y. Zhao, H. Lu, Y. Tang & P. Yang, "Zeolite Nanoparticle Modified Microchip Reactor for Efficient Protein Digestion", *Lab on a Chip*, 6, 534-539 (2006).
116. J. Wang, A. Ibanez & M.P. Chatrathi, "On-Chip Integration of Enzyme and Immunoassays: Simultaneous Measurements of Insulin and Glucose", *Journal of American Chemical Society*, 125, 8444-8445 (2003).
117. A. Rios, A. Escarpa, M.C. Gonzalez & A.G. Crevillen, "Challenges of Analytical Microsystems", *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 467-479 (2006).
118. L. Jin, B.C. Giordano & J.P. Landers, "Dynamic Labeling during Capillary or Microchip Electrophoresis for Laser-Induced Fluorescence Detection of Protein-SDS Complexes without Pre or Postcolumn Labeling", *Analytical Chemistry*, 73, 4994-4999 (2001).
119. B.C. Giordano, L. Jin, A.J. Couch, J.P. Ferrance & J.P. Landers, "Microchip Laser-Induced Fluorescence Detection of Proteins at Submicrogram per Milliliter Levels Mediated by Dynamic Labeling under Pseudonative Conditions", *Analytical Chemistry*, 76, 4705-4714 (2004).
120. S.H. Wong, M.C.L. Ward & C.W. Wharton, "Micro T-Mixer as a Rapid Mixing Micromixer", *Sensors and Actuators B*, 100, 359-379 (2004).
121. T.J. Johnson, D. Ross & L.E. Locascio, "Rapid Microfluidic Mixing", *Analytical Chemistry*, 74, 45-51 (2002).
122. S.C. Wang, Y.W. La, Y. Ben & H.C. Chang, "Microfluidic Mixing by DC and AC Nonlinear Electrokinetic Vortex Flows", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43, 2902-2911 (2004).
123. R.W.K. Chiu, L.L.M. Poon, T.K. Lau, T.N. Leung, E.M.C. Wong & Y.M.D. Lo, "Effects of Blood-Processing Protocols on Fetal and Total DNA Quantification in Maternal Plasma", *Clinical Chemistry*, 47, 1607-1613 (2001).
124. T.A. Crowley & V. Pizziconi, "Isolation of Plasma from Whole Blood using Planar Microfilters for Lab-on-a-Chip Applications", *Lab on a Chip*, 5, 922-929 (2005).
125. S. Yang, A. Ündar & J.D. Zahn, "A microfluidic Device for Continuous, Real Time Blood Plasma Separation", *Lab on a Chip*, 6, 871-880 (2006).
126. T. Vilknær, D. Janásek & A. Manz, "Micro Total Analysis Systems. Recent Developments", *Analytical Chemistry*, 76, 3373-3386 (2004).
127. H. Andersson & A. Van den Berg, "Microfluidic Devices for Cellomics: a Review", *Sensors and Actuators B*, 92, 315-325 (2003).
128. A. Grodrian, J. Metze, T. Henkel, K. Martin, M. Roth & J.M. Köhler, "Segmented Flow Generation by Chip Reactors for Highly Parallelized Cell Cultivation", *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 1421-1428 (2004).
129. E. Leclerc, Y. Sakai & T. Fujii, "Microfluidic PDMS (Polydimethylsiloxane) Bioreactor for Large-Scale Culture of Hepatocytes", *Biotechnology Progress*, 20, 750-755 (2004).

130. R. Zantl, "Disposable Cell Culture Biochips for High End Microscopy", *Nanobiotechnology* 3, Nice, 2005.
131. T. Ujiie, A. Yamazaki, M. Watanabe, T. Okuda, T. Ichiki & Y. Horiike, "Microfabricated Separator and Manipulator of Blood Cells for Health Care Devices", The International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Tokyo, Japan, 2000.
132. B.H. Weigl & P. Yager, "Microfluidic Diffusion-Based Separation and Detection", *Science*, 283, 346-347 (1999).
133. T.M. Squires & S.R. Quake, "Microfluidics: Fluid Physics at the Nanoliter Scale", *Reviews of Modern Physics*, 77, 977-1026 (2005).
134. P. Wilding, J. Pfahler, H.H. Bau, J.N. Zemel & L.J. Kricka, "Manipulation and Flow of Biological Fluids in Straight Channels Micromachined in Silicon", *Clinical Chemistry*, 40, 43-47 (1994).
135. H. Andersson, W. Van der Wijngaart, P. Enoksson & G. Stemme, "Micromachined Flow-Through Filter-Chamber for Chemical Reactions on Beads", *Sensors and Actuators B*, 67, 203-208 (2000).
136. H. Andersson, W. Van der Wijngaart & G. Stemme, "Micromachined Filter-Chamber Array with Passive Valves for Biochemical Assays on Beads", *Electrophoresis*, 22, 249-257 (2001).
137. P. Wilding, L.J. Kricka, J. Cheng, G. Hvichia, M.A. Shoffner & P. Fortina, "Integrated Cell Isolation and Polymerase Chain Reaction Analysis using Silicon Microfilter Chambers", *Analytical Biochemistry*, 257, 95-100 (1998).
138. S. Yue & X.F. Yin, "Novel Multi-Depth Microfluidic Chip for Single Cell Analysis", *Journal of Chromatography A*, 1117, 228-233 (2006).
139. P.K. Yuen, L.J. Kricka, P. Fortina, N.J. Panaro, T. Sakazume & P. Wilding, "Microchip Module for Blood Sample Preparation and Nucleic Acid Amplification Reactions", *Genome Research*, 11, 405-412 (2001).
140. M.J. Madou, L.J. Lee, S. Daunert, S. Lai & C.H. Shih, "Design and Fabrication of CD-like Microfluidic Platforms for Diagnostics: Microfluidic Functions", *Biomedical Microdevices*, 3, 245-254 (2001).
141. C. Blattert, R. Jurischka, A. Schoth, P. Kerth & W. Menz, "Separation of Blood Cells and Plasma in Microchannel Bend Structures", *Proceedings of SPIE: International Society for Optical Engineering*, 5591, 143-151 (2004).
142. C. Blattert, R. Jurischka, I. Tahhan, A. Schoth, P. Kerth & W. Menz, "Effect of Channel Geometry on Blood/Plasma Separation in Microchannel Bend Structures", Ninth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Boston, USA, 2005.
143. M.P. Hughes, "AC electrokinetics: Applications for Nanotechnology", *Nanotechnology*, 11, 124-132 (2000).

144. S.C. Jakeway, A.J. de Mello & E.L. Russell, "Miniaturized Total Analysis Systems for Biological Analysis", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366, 525-539 (2000).
145. Y. Huang, J. Yang, X.B. Wang, F.F. Becker & P.R.C. Gascoyne, "The Removal of Human Breast Cancer Cells from Hematopoietic CD34+ Stem Cells by Dielectrophoretic Field-Flow-Fractionation", *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 8, 481-490 (1999).
146. F.F. Becker, X.B. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal & P.R.C. Gascoyne, "Separation of Human Breast Cancer Cells from Blood by Differential Dielectric Affinity", *Proceedings of National Academic of Sciences of the United States of America*, 92, 860-864 (1995).
147. X. Hu, P.H. Bessette, J. Qian, C.D. Meinhart, P.S. Daugherty & H.T. Soh, "Marker-Specific Sorting of Rare Cells using Dielectrophoresis", *Proceedings of National Academic of Sciences of the United States of America*, 102, 15757-15761 (2005).
148. Evotec & Cytoman, "Touch-Free Cell Manipulation", http://www.evotec-technologies.com/opencms/export/et/products/instruments_systems/cell_handling_devices/cytocon_applications.html, 2004
149. A.Y. Fu, C. Spence, A. Scherer, F.H. Arnold & S.R. Quake, "A Microfabricated Fluorescence-Activated Cell Sorter", *Nature Biotechnology*, 17, 1109-1111 (1999).
150. A.Y. Fu, H.P. Chou, C. Spence, F.H. Arnold & S.R. Quake, "An Integrated Microfabricated Cell Sorter", *Analytical Chemistry*, 74, 2451-2457 (2002).
151. V. Studer, R. Jameson, E. Pellereau, A. Pépin & Y. Chen, "A Microfluidic Mammalian Cell Sorter Based on Fluorescence Detection", *Microelectronic Engineering*, 73-74, 852-857 (2004).
152. P.S. Dittrich & P. Schuille, "An Integrated Microfluidic System for Reaction, High-Sensitivity Detection, and Sorting of Fluorescent Cells and Particles", *Analytical Chemistry*, 75, 5767-5774 (2003).
153. M.A. McClain, C.T. Culbertson, S.C. Jacobson & J.M. Ramsey, "Flow Cytometry of Escherichia coli on Microfluidic Devices", *Analytical Chemistry*, 73, 5334-5338 (2001).
154. C.H. Lin, G.B. Lee & B.H. Hwei, "A Novel Micro Flow Cytometer with 3-Dimensional Focusing utilizing Dielectrophoretic and Hydrodynamic Forces", The Sixteenth Annual International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Kyoto, 2003.
155. D. Huh, Y.C. Tung, H.H. Wei, J.B. Grotberg, S.J. Skerlos, K. Kurabayashi & S. Takayama, "Use of Air-Liquid Two-Phase Flow in Hydrophobic Microfluidic Channels for Disposable Flow Cytometers", *Biomedical Microdevices*, 4, 141-149 (2002).
156. D. Huh, W. Gu, Y. Kamotani, J.B. Grotberg & S. Takayama, "Microfluidics for Flow Cytometric Analysis of Cells and Particles", *Physiological Measurement*, 26, R73-R98 (2005).

157. J. Voldman, M.L. Gray, M. Toner & M.A. Schmidt, "A Microfabrication-Based Dynamic Array Cytometer", *Analytical Chemistry*, 74, 3984-3990 (2002).
158. C.H. Lin & G.B. Lee, "Micromachined Flow Cytometers with Embedded Etched Optic Fibers for Optical Detection", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 13, 447-453 (2003).
159. L.M. Fu, R.J. Yang, C.H. Lin, Y.J. Pan & G.B. Lee, "Electrokinetically Driven Micro Flow Cytometers with Integrated Fiber Optics for On-line Cell/ Particulate Detection", *Analytica Chimica Acta*, 507, 163-169 (2004).
160. G.B. Lee, C.H. Lin & G.L. Chang, "Micro Flow Cytometers with Buried SU-8/SOG Optical Waveguides", *Sensors and Actuators A*, 103, 165-170 (2003).
161. Z. Wang, J. El-Ali, M. Engelund, T. Gotsæd, I.R. Perch-Nielsen, K.B. Mogensen, D. Snakenborg, J.P. Kütter & A. Wolff, "Measurements of Scattered Light on a Microchip Flow Cytometer with Integrated Polymer Based Optical Elements", *Lab on a Chip*, 4, 372-377 (2004).
162. Y.C. Tung, M. Zhang, C.T. Lin, K. Kurabayashi & S.J. Skerlos, "PDMS-Based Opto-Fluidic Micro Flow Cytometer with Two-Color, Multi-Angle Fluorescence Detection Capability using PIN Photodiodes", *Sensors and Actuators B*, 98, 356-367 (2004).
163. D. Irimia, R.G. Tompkins & M.Toner, "Single-Cell Chemical Lysis in Picoliter-Scale Closed Volumes Using a Microfabricated Device", *Analytical Chemistry*, 76, 6137-6143 (2004).
164. W. Hellmich, C. Pelargus, K. Leffhalm, A. Ros & D. Anselmetti, "Single Cell Manipulation, Analytics, and Label-Free Protein Detection in Microfluidic Devices for Systems Nanobiology", *Electrophoresis*, 26, 3689-3696 (2005).
165. H. Lu, M.A. Schmidt & K.F. Jensen, "A Microfluidic Electroporation Device for Cell Lysis", *Lab on a Chip*, 5, 23-29 (2005).
166. E.A. Schilling, A.E. Kamholz & P. Yager, "Cell Lysis and Protein Extraction in a Microfluidic Device with Detection by a Fluorogenic Enzyme Assay", *Analytical Chemistry*, 74, 1798-1804 (2002).
167. H. Yu, P. Sethu, T. Chan, N. Kroutchinina, J. Blackwell, C.H. Mastrangelo & P. Grodzinski, "A Miniaturized and Integrated Plastic Thermal Chemical Reactor for Genetic Analysis", Micro Total Analysis Systems, Enschede, Netherlands, 2000.
168. S.W. Lee & Y.C. Tai, "A Micro Cell Lysis Device", *Sensors and Actuators A*, 73, 74-79 (1999).
169. Y.C. Lin, M. Li, C.S. Fan & L.W. Wu, "A Microchip for Electroporation of Primary Endothelial Cells", *Sensors and Actuators A*, 108, 12-19 (2003).
170. M.A. McClain, C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, N.L. Allbritton, C.E. Sims & J. M. Ramsey, "Microfluidic Devices for the High-Throughput Chemical Analysis of Cells", *Analytical Chemistry*, 75, 5646-5655 (2003).

171. J. Gao, X.F. Yin & Z.L. Fang, "Integration of Single Cell Injection, Cell Lysis, Separation and Detection of Intracellular Constituents on a Microfluidic Chip", *Lab on a Chip*, 4, 47-52 (2004).
172. Q. Ramadana, V. Samper, D. Poenar, Z. Liang, C. Yu & T.M. Lim, "Simultaneous Cell Lysis and Bead Trapping in a Continuous Flow Microfluidic Device", *Sensors and Actuators B*, 113, 944-955 (2006).
173. D. Di Carlo & L.P. Lee, "Mechanical Cell Lysis Results of A Sample Preparation Module for Functional Genomics", Second Annual International Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology, Madison, Wisconsin, USA, 2002.
174. S. Song, A.K. Singh, T.J. Shepodd & B.J. Kirby, "Microchip Dialysis of Proteins Using in Situ Photopatterned Nanoporous Polymer Membranes", *Analytical Chemistry*, 76, 2367-2373 (2004).
175. M. Tokeshi, T. Minagawa & T. Kitamori, "Integration of a Microextraction System Solvent Extraction of a Co-2-nitroso-5-dimethylaminophenol Complex on a Microchip", *Journal of Chromatography A*, 894, 19-23 (2000).
176. Z.X. Cai, Q. Fang, H.W. Chen & Z.L. Fang, "A Microfluidic Chip Based Liquid-Liquid Extraction System with Microporous Membrane", *Analytica Chimica Acta*, 556, 151-156 (2006).
177. S.W. Yeung & I.M. Hsing, "Manipulation and Extraction of Genomic DNA from Cell Lysate by Functionalized Magnetic Particles for Lab on a Chip Applications", *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 989-997 (2006).
178. T. Nakagawa, T. Tanaka, D. Niwa, T. Osaka, H. Takeyama & T. Matsunaga, "Fabrication of Amino Silane-Coated Microchip for DNA Extraction from Whole Blood", *Journal of Biotechnology*, 116, 105-111 (2005).
179. H. Tian, A.F.R. Huhmer & J.P. Landers, "Evaluation of Silica Resins for Direct and Efficient Extraction of DNA from Complex Biological Matrices in a Miniaturized Format", *Analytical Biochemistry*, 283, 175-191 (2000).
180. K.A. Wolfe, M.C. Breadmore, J.P. Ferrance, M.E. Power, J.F. Conroy, P.M. Norris & J.P. Landers, "Toward a Microchip-Based Solid-Phase Extraction Method for Isolation of Nucleic Acids", *Electrophoresis*, 23, 727-733 (2002).
181. M.A. Northrup, M.T. Ching, R.M. White & R.T. Watson, "DNA Amplification with a Microfabricated Reaction Chamber", Transducers '93, IEEE International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Yokohama, Japan, 1993.
182. C.H. Mastrangelo, M.A. Burns & D.T. Burke, "Integrated Microfabricated Devices for Genetic Assays", Microprocesses and Nanotechnology Conference, Yokohama, Japan, 1999.
183. S.J. Lee & S.Y. Lee, "Micro Total Analysis System (μ -TAS) in Biotechnology", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 289-299 (2004).
184. C. Zhang, J. Xu, W. Ma & W. Zheng, "PCR Microfluidic Devices for DNA Amplification", *Biotechnology Advances*, 24, 243-284 (2006).

185. Z. Zhao, Z. Cui, D. Cui & S. Xia, "Monolithically Integrated PCR Biochip for DNA Amplification", *Sensors and Actuators A*, 108, 162-167 (2003).
186. J. Chen, M. Wabuyele, H. Chen, D. Patterson, M. Hupert, H. Shadpour, D. Nikitopoulos & S.A. Soper, "Electrokinetically Synchronized Polymerase Chain Reaction Microchip Fabricated in Polycarbonate", *Analytical Chemistry*, 77, 658-666 (2005).
187. K.C. Young, H.M. Lien, C.C. Lin, T.T. Chang, G.B. Lee & S.H. Chen, "Microchip and Capillary Electrophoresis for Quantitative Analysis of Hepatitis C Virus based on RT-competitive PCR", *Talanta*, 56, 323-330 (2002).
188. C.G. Koh, W. Tan, M.Q. Zhao, A.J. Ricco & Z.H. Fan, "Integrating Polymerase Chain Reaction, Valving, and Electrophoresis in a Plastic Device for Bacterial Detection", *Analytical Chemistry*, 75, 4591-4598 (2003).
189. Y.S. Shin, K. Cho, S.H. Lim, S. Chung, S.J. Park, C. Chung, D.C. Han & J.K. Chang, "PDMS-based Micro PCR Chip with Parylene Coating", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 13, 768-774 (2003).
190. J.A. Kim, J.Y. Lee, S. Seong, S.H. Cha, S.H. Lee, J.J. Kim & T.H. Park, "Fabrication and Characterization of a PDMS-Glass Hybrid Continuous-Flow PCR Chip", *Biochemical Engineering Journal*, 29, 91-97 (2006).
191. K. Shen, X. Chen, M. Guo & J. Cheng, "A Microchip-based PCR Device using Flexible Printed Circuit Technology", *Sensors and Actuators B*, 105, 251-258 (2005).
192. E.T. Lagally, C.A. Emrich & R.A. Mathies, "Fully Integrated PCR-Capillary Electrophoresis Microsystem for DNA Analysis", *Lab on a Chip*, 1, 102-107 (2001).
193. C.G.J. Schabmueller, J.R. Pollard, A.G.R. Evans, J.S. Wilkinson, G. Ensell & A. Brunnschweiler, "Integrated Diode Detector and Optical Fibres for in Situ Detection Within Micromachined Polymerase Chain Reaction Chips", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 11, 329-333 (2001).
194. M.U. Kopp, A.J. de Mello & A. Manz, "Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR on a Chip ", *Science*, 280, 1046-1048 (1998).
195. R.H. Liu, J. Yang, R. Lenigk, J. Bonanno & P. Grodzinski, "Self-Contained, Fully Integrated Biochip for Sample Preparation, Polymerase Chain Reaction Amplification, and DNA Microarray Detection", *Analytical Chemistry*, 76, 1824-1831 (2004).
196. R.C. Anderson, X. Su, G.J. Bogdan & J. Fenton, "A Miniature Integrated Device for Automated Multistep Genetic Assays", *Nucleic Acid Research*, 28, e60 (2000).
197. M.A. Burns, B.N. Johnson, S.N. Brahmasandra, K. Handique, J.R. Webster, M. Krishnan, T.S. Sammarco, F.P. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C.H. Mastrangelo & D.T. Burke, "An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device", *Science*, 282, 484-487 (1998).
198. P.G. Righetti, C. Gelfi & M.R. D'Acunto, "Recent Progress in DNA Analysis by Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis*, 23, 1361-1374 (2002).

199. C. Heller, "Separation of Double-Stranded and Single-Stranded DNA in Polymer Solutions: 2. Separation, Peak Width and Resolution", *Electrophoresis*, 20, 1978-1986 (1999).
200. C. Heller, "Influence of Electric Field Strength and Capillary Dimensions on the Separation of DNA", *Electrophoresis*, 21, 593-602 (2000).
201. T. Sakai, T. Sonehara, C. Goda, Y. Kohara & T. Anazawa, "High-Speed DNA Sequencing by Tube-Based Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis*, 25, 3378-3386 (2004).
202. J. Khandurina & A. Guttman, "Bioanalysis in Microfluidic Devices", *Journal of Chromatography A*, 943, 159-183 (2002).
203. K.B. Mogensen, H. Klank & J.P. Kütter, "Recent Developments in Detection for Microfluidic Systems", *Electrophoresis*, 25, 3498-3512 (2004).
204. J. Astorga-Wells, H. Jörnvall & T. Bergman, "A Microfluidic Electrocapture Device in Sample Preparation for Protein Analysis by MALDI Mass Spectrometry", *Analytical Chemistry*, 75, 5213-5219 (2003).
205. T. Laurell, G. Marko-Varga, S. Ekstrom, M. Bengtsson & J. Nilsson, "Microfluidic Components for Protein Characterization", *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82, 161-175 (2001).
206. M. Fujita, W. Hattori, T. Sano, M. Baba, H. Someya, K. Miyazaki, K. Kamijo, K. Takahashi & H. Kawaura, "High-Throughput and High-Resolution Two Dimensional Mapping of pI and m/Z using a Microchip in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometer", *Journal of Chromatography A*, 1111, 200-205 (2006).
207. Á. Végvári & S. Hjertén, "Hybrid Microdevice Electrophoresis of Peptides, Proteins, DNA, Viruses, and Bacteria in Various Separation Media, using UV-Detection", *Electrophoresis*, 24, 3815-3820 (2003).
208. X. Paez & L. Hernandez, "Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection", *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 22, 273-289 (2001).
209. K. Swinney & D.J. Bornhop, "Detection in Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis*, 21, 1239-1250 (2000).
210. P. Schulze, M. Ludwig, F. Kohler & D. Belder, "Deep UV Laser-Induced Fluorescence Detection of Unlabeled Drugs and Proteins in Microchip Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, 77, 1325-1329 (2005).
211. E. Guihen & J.D. Glennon, "Rapid Separation of Antimicrobial Metabolites by Microchip Electrophoresis with UV Linear Imaging Detection", *Journal of Chromatography A*, 1071, 223-228 (2005).
212. M. Ludwig, F. Kohler & D. Belder, "High-Speed Chiral Separations on a Microchip with UV Detection", *Electrophoresis*, 24, 3233-3238 (2003).

213. B.G. Splawn & F.E. Lytle, "On-Chip Absorption Measurements using an Integrated Waveguide", *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 373, 519-525 (2002).
214. K.B. Mogensen, F. Eriksson, O. Gustafsson, R.P.H. Nikolajsen & J.P. Kütter, "Pure-Silica Optical Waveguides, Fiber Couplers, and High-Aspect Ratio Submicrometer Channels for Electrokinetic Separation Devices", *Electrophoresis*, 25, 3788-3795 (2004).
215. R. Jindal & S.M. Cramer, "On-Chip Electrochromatography using Sol-Gel Immobilized Stationary Phase with UV Absorbance Detection", *Journal of Chromatography A*, 1044, 277-285 (2004).
216. N. Malcik, J.P. Ferrance, J.P. Landers & P. Caglar, "The Performance of a Microchip-Based Fiber Optic Detection Technique for the Determination of Ca²⁺ Ions in Urine", *Sensors and Actuators B*, 107, 24-31 (2005).
217. H. Salimi-Moosavi, Y. Jiang, L. Lester, G. McKinnon & D.J. Harrison, "A Multireflection Cell for Enhanced Absorbance Detection in Microchip-Based Capillary Electrophoresis Devices", *Electrophoresis*, 21, 1291-1299 (2000).
218. H. Nakanishi, T. Nishimoto, A. Arai, H. Abe, M. Kanai, Y. Fujiyama & T. Yoshida, "Fabrication of Quartz Microchips with Optical Slit and Development of a Linear Imaging UV Detector for Microchip Electrophoresis Systems", *Electrophoresis*, 22, 230-234 (2001).
219. Y.W. Lin, T.C. Chiu & H.T. Chang, "Laser-Induced Fluorescence Technique for DNA and Proteins Separated by Capillary Electrophoresis", *Journal of Chromatography B*, 793, 37-48 (2003).
220. M.E. Johnson & J.P. Landers, "Fundamentals and Practice for Ultrasensitive Laser-Induced Fluorescence Detection in Microanalytical Systems", *Electrophoresis*, 25, 3513-3527 (2004).
221. C. Yang, O. Shimelis, X. Zhou, G. Li, C. Bayle, M. Nertz, H. Lee, L. Streckowski, G. Patonay, F. Couderc & R.W. Giese, "Handling and Detection of 0.8 amol of a Near-Infrared Cyanine Dye by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection", *Journal of Chromatography A*, 979, 307-314 (2002).
222. G. Jiang, S. Attiya, G. Ocvirk, W.E. Lee & D.J. Harrison, "Red Diode Laser Induced Fluorescence Detection with a Confocal Microscope on a Microchip for Capillary Electrophoresis", *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 861-869 (2000).
223. C.H. Lin, G.B. Lee, S.H. Chen & G.L. Chang, "Micro Capillary Electrophoresis Chips Integrated with Buried SU-8/SOG Optical Waveguides for Bio-Analytical Applications", *Sensors and Actuators A*, 107, 125-131 (2003).
224. J.M. Ruano, A. Glidle, A. Cleary, A. Walmsley, J.S. Aitchison & J.M. Cooper, "Design and Fabrication of a Silica on Silicon Integrated Optical Biochip as a Fluorescence Microarray Platform", *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 175-184 (2003).
225. J.M. Ruano-Lopez, M. Aguirregabiria, M. Tijero, M.T. Arroyo, J. Elizalde, J. Berganzo, I. Aranburu, F.J. Blanco & K. Mayora, "A New SU-8 Process to Integrate

- Buried Waveguides and Sealed Microchannels for a Lab-on-a-Chip", *Sensors and Actuators B*, 114, 542-551 (2006).
226. M. Fleger & A. Neyer, "PDMS Microfluidic Chip with Integrated Waveguides for Optical Detection", *Microelectronic Engineering*, 83, 1291-1293 (2006).
 227. V. Kostal, M. Zeisbergerova, K. Slais & V. Kahle, "Fluorescence Detection System for Capillary Separations Utilizing a Liquid Core Waveguide with an Optical Fibre-Coupled Compact Spectrometer", *Journal of Chromatography A*, 1081, 36-41 (2005).
 228. A.R. Leeds, E.R. Van Keuren, M.E. Durst, T.W. Schneider, J.F. Currie & M. Paranjape, "Integration of Microfluidic and Microoptical Elements using a Single-Mask Photolithographic Step", *Sensors and Actuators A*, 115, 571-580 (2004).
 229. E. Thrush, O. Levi, W. Ha, K. Wang, S.J. Smith & J.S. Harris Jr, "Integrated Bio-Fluorescence Sensor", *Journal of Chromatography A*, 1013, 103-110 (2003).
 230. H.M. Grandin, B. Städler, M. Textor & J. Vörös, "Waveguide Excitation Fluorescence Microscopy: A New Tool for Sensing and Imaging the Biointerface", *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1476-1482 (2006).
 231. J.A. Olivares, P.C. Stark & P. Jackson, "Liquid Core Waveguide for Full Imaging of Electrophoretic Separations", *Analytical Chemistry*, 74, 2008-2013 (2002).
 232. S. Balslev, A.M. Jorgensen, B. Bilenberg, K.B. Mogensen, D. Snakenborg, O. Geschke, J.P. Kütter & A. Kristensen, "Lab-on-a-Chip with Integrated Optical Transducers", *Lab on a Chip*, 6, 213-217 (2006).
 233. B. Foley, J. Sawyer & C.G. Briscoe, Vol. US 6592733 6 (Motorola Incorporation, Illinois, USA; 2003).
 234. L. Renaud in Laboratoire d'Electronique Nanotechnologies Capteurs, Vol. Phd 224 (Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon; 2004).
 235. M.H. Wu, H. Cai, X. Xu, J.P.G. Urban, Z.F. Cui & Z. Cui, "A SU-8/PDMS Hybrid Microfluidic Device with Integrated Optical Fibers for Online Monitoring of Lactate", *Biomedical Microdevices*, 7, 323-329 (2005).
 236. C.H. Lin, G.B. Lee, L.M. Fu & S.H. Chen, "Integrated Optical-Fiber Capillary Electrophoresis Microchips with Novel Spin-On-Glass Surface Modification", *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 83-90 (2004).
 237. S.K. Hsiung, C.H. Lin & G.B. Lee, "A Microfabricated Capillary Electrophoresis Chip with Multiple Buried Optical Fibers and Microfocusing Lens for Multiwavelength Detection", *Electrophoresis*, 26, 1122-1129 (2005).
 238. D. Stadnik & A. Dybko, "An Intrinsic Fibre Optic Chemical Sensor Based on Light Coupling Phenomenon", *Sensors and Actuators B*, 107, 184-187 (2005).
 239. Q. Kou, I. Yesilyurt, V. Studer, M. Belotti, E. Cambriil & Y. Chen, "On-Chip Optical Components and Microfluidic Systems", *Microelectronic Engineering*, 73-74, 876-880 (2004).

240. M.L. Chabinyc, D.T. Chiu, J.C. McDonald, A.D. Stroock, J.F. Christian, A.M. Karger & G.M. Whitesides, "An Integrated Fluorescence Detection System in Poly(dimethylsiloxane) for Microfluidic Applications", *Analytical Chemistry*, 73, 4491-4498 (2001).
241. H.F. Li, Z.W. Cai & J.M. Lin, "Separation of Catecholamines by Microchip Electrophoresis with a Simple Integrated Laser-Induced Fluorescence Detector", *Analytica Chimica Acta*, 565, 183-189 (2006).
242. P. Nussbaum, R. Völkel, H.P. Herzig, M. Eisner & S. Haselbeck, "Design, Fabrication and Testing of Microlens Arrays for Sensors and Microsystems", *Pure Applied Optics*, 6, 617-636 (1997).
243. J. Seo & L.P. Lee, "Disposable Integrated Microfluidics with Self-Aligned Planar Microlenses", *Sensors and Actuators B*, 99, 615-622 (2004).
244. H.J.H. Chen, T.F. Chen, S.R.S. Huang, J. Gong, J.C. Li, W.C. Chen, T.H. Hseu & I.C. Hsu, "A Novel Micro-Well Array Chip for Liquid Phase Biomaterial Processing and Detection", *Sensors and Actuators A*, 108, 193-200 (2003).
245. J.C. Roulet, R. Völkel, H.P. Herzig, E. Verpoorte, N.F. de Rooij & R. Dändliker, "Performance of an Integrated Microoptical System for Fluorescence Detection in Microfluidic Systems", *Analytical Chemistry*, 74, 3400-3407 (2002).
246. P. Hua, J.P. Hole, J.S. Wilkinson, G. Proll, J. Tschmelak, G. Gauglitz, M.A. Jackson, R. Nudd, H.M.T. Griffith, R.A. Abuknesha, J. Kaiser & P. Kraemmer, "Integrated Optical Fluorescence Multisensor for Water Pollution", *Optics Express*, 13, 1124-1130 (2005).
247. K.B. Mogensen, Y.C. Kwok, J.C.T. Eijkel, N.J. Petersen, A. Manz & J.P. Kütter, "A Microfluidic Device with an Integrated Waveguide Beam Splitter for Velocity Measurements of Flowing Particles by Fourier Transformation", *Analytical Chemistry*, 75, 4931-4936 (2003).
248. A. Llobera, R. Wilke & S. Büttgenbach, "Optimization of Poly(DiMethylSiloxane) Hollow Prisms for Optical Sensing", *Lab on a Chip*, 5, 506-511 (2005).
249. B. Helbo, S. Kragh, B.G. Kjeldsen, J.L. Reimers & A. Kristensen, "Investigation of the Dye Concentration Influence on the Lasing Wavelength and Threshold for a Microfluidic Dye Laser", *Sensors and Actuators A*, 111, 21-25 (2004).
250. D.V. Vezenov, B.T. Mayers, R.S. Conroy, G.M. Whitesides, P.T. Snee, Y. Chan, D.G. Nocera & M.G. Bawendi, "A Low-Threshold, High-Efficiency Microfluidic Waveguide Laser", *Journal of American Chemical Society*, 127, 8952-8953 (2005).
251. J.B. Edel, N.P. Beard, O. Hofmann, J.C. de Mello, D.D.C. Bradley & A.J. de Mello, "Thin-Film Polymer Light Emitting Diodes as Integrated Excitation Sources for Microscale Capillary Electrophoresis", *Lab on a Chip*, 4, 136-140 (2004).
252. T. de Beer, N.H. Velthorst, U.A.T. Brinkman & C. Gooijer, "Laser-Based Non-Fluorescence Detection Techniques for Liquid Separation Systems", *Journal of Chromatography A*, 971, 1-35 (2002).

253. S. Zhao, H. Yuan & D. Xiao, "Optical Fiber Light-Emitting Diode-Induced Fluorescence Detection for Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis*, 27, 461-467 (2006).
254. T. Kamei, B.M. Paegel, J.R. Scherer, A.M. Skelley, R.A. Street & R.A. Mathies, "Integrated Hydrogenated Amorphous Si Photodiode Detector for Microfluidic Bioanalytical Devices", *Analytical Chemistry*, 75, 5300-5305 (2003).
255. I. Rech, A. Restelli, S. Cova, M. Ghioni, M. Chiari & M. Cretich, "Microelectronic Photosensors for Genetic Diagnostic Microsystems", *Sensors and Actuators B*, 100, 158-162 (2004).
256. O. Hofmann, P. Miller, P. Sullivan, T.S. Jones, J.C. de Mello, D.D.C. Bradley & A.J. de Mello, "Thin-Film Organic Photodiodes as Integrated Detectors for Microscale Chemiluminescence Assays", *Sensors and Actuators B*, 106, 878-884 (2005).
257. J.H. Kim, C.J. Kang & Y.S. Kim, "Development of a Microfabricated Disposable Microchip with a Capillary Electrophoresis and Integrated Three-Electrode Electrochemical Detection", *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2314-2317 (2005).
258. D.J. Jackson, J.F. Naber, T.J. Roussel Jr., M.M. Crain, K.M. Walsh, R.S. Keynton & R.P. Baldwin, "Portable High-Voltage Power Supply and Electrochemical Detection Circuits for Microchip Capillary Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, 75, 3643-3649 (2003).
259. M.A. Schwarz & P.C. Hauser, "Recent Developments in Detection Methods for Microfabricated Analytical Devices", *Lab on a Chip*, 1, 1-6 (2001).
260. W.R. Vandaveer IV, S.A. Pisas-Farmer, D.J. Fischer, C.N. Frankenfeld & S.M. Lunte, "Recent Developments in Electrochemical Detection for Microchip Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis*, 25, 3528-3549 (2004).
261. P.J. Viskari & J.P. Landers, "Unconventional Detection Methods for Microfluidic Devices", *Electrophoresis*, 27, 1797-1810 (2006).
262. M. Tokeshi, J. Yamaguchi, A. Hattori & T. Kitamori, "Thermal Lens Micro Optical Systems", *Analytical Chemistry*, 77, 626-630 (2005).
263. M. Yamauchi, K. Mawatari, A. Hibara, M. Tokeshi & T. Kitamori, "Circular Dichroism Thermal Lens Microscope for Sensitive Chiral Analysis on Microchip", *Analytical Chemistry*, 78, 2646-2650 (2006).
264. K.B. Mogensen, J. El-Ali, A. Wolff & J.P. Kütter, "Integration of Polymer Waveguides for Optical Detection in Microfabricated Chemical Analysis Systems", *Applied Optics*, 42, 4072-4078 (2003).
265. B. Bilenberg, T. Nielsen, B. Clausen & A. Kristensen, "PMMA to SU-8 Bonding for Polymer Based Lab-on-a-Chip Systems with Integrated Optics", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14, 814-818 (2004).
266. F. Malbet, P. Kern, I. Schanen-Duport, J.P. Berger, K. Rousselet-Perraut & P. Benech, "Integrated Optics for Astronomical Interferometry. I. Concept and Astronomical Applications", *Astronomy & Astrophysics Supplement Series*, 138, 135-145 (1999).

267. S. Krawczyk, "Discussion on Optical Integration in Lab-on-a-Chip Microsystems for Medical Diagnostics", *Physica Status Solidi*, 0, 998-1012 (2003).
268. A.A. Bettiol, S.V. Rao, T.C. Sum, J.A. van Kan & F. Watt, "Fabrication of Optical Waveguides using Proton Beam Writing", *Journal of Crystal Growth*, 288, 209-212 (2006).
269. J. Spirkova, P. Tresnakova-Nebolova & M. Mika, "Optical Waveguides Fabricated by Transition Element Ions Exchange in some Commercial and Special Optical Glasses", *Optical Materials*, 25, 101-107 (2004).
270. S.K. Pani, Y. Quiling, C.C. Wong, D.K.Y. Low, X. Zhang & M.K. Iyer, "Fabrication of Buried Hybrid Sol-Gel Optical Waveguides by Femtosecond Laser Direct Writing", *Thin Solid Films*, 504, 336-340 (2006).
271. C.H. Lin, G.B. Lee, Y.H. Lin & G.L. Chang, "A Fast Prototyping Process for Fabrication of Microfluidic Systems on Soda-Lime Glass", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 11, 726-732 (2001).
272. A. Grosse, M. Grewe & H. Fouckhardt, "Deep Wet Etching of Fused Silica Glass for Hollow Capillary Optical Leaky Waveguides in Microfluidic Devices", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 11, 257-262 (2001).
273. I. Rodriguez, P. Spicar-Mihalic, C.L. Kuyper, G.S. Fiorini & D.T. Chiu, "Rapid Prototyping of Glass Microchannels", *Analytica Chimica Acta*, 496, 205-215 (2003).
274. R. Mazurczyk, J. Vieillard, A. Bouchard, B. Hannes & S. Krawczyk, "A Novel Concept of the Integrated Fluorescence Detection System and its Application in a Lab-on-a-Chip Microdevice", *Sensors and Actuators B*, 118, 11-19 (2006).
275. O. Rötting, W. Röpke, H. Becker & C. Gärtner, "Polymer Microfabrication Technologies", *Microsystem Technologies*, 8, 32-36 (2002).
276. L. Székely & A. Guttman, "New Advances in Microchip Fabrication for Electrochromatography", *Electrophoresis*, 26, 4590-4604 (2005).
277. H. Becker & C. Gärtner, "Polymer Microfabrication Methods for Microfluidic Analytical Applications", *Electrophoresis*, 21, 12-26 (2000).
278. J.M.K. Ng, I. Gitlin, A.D. Stroock & G.M. Whitesides, "Components for Integrated Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Systems", *Electrophoresis*, 23, 3461-3473 (2002).
279. A.P. Mello, M.A. Bari & P.J. Prendergast, "A Comparison of Excimer Laser Etching and Dry Etching Process for Surface Fabrication of Biomaterials", *Journal of Materials Processing Technology*, 124, 284-292 (2002).
280. T. Ichiki, Y. Sugiyama, R. Taura, T. Koidesawa & Y. Horiike, "Plasma Applications for Biochip Technology", *Thin Solid Films*, 435, 62-68 (2003).
281. J.H. Park, N.E. Lee, J. Lee, J.S. Park & H.D. Park, "Deep Dry Etching of Borosilicate Glass using SF₆ and SF₆/Ar Inductively Coupled Plasmas", *Microelectronic Engineering*, 82, 119-128 (2005).

282. D. Solignac, A. Sayah, S. Constantin, R. Freitag & M.A.M. Gijs, "Powder Blasting for the Realisation of Microchips for Bioanalytic Applications", *Sensors and Actuators A*, 92, 388-393 (2001).
283. Q.S. Pu, R. Lutge, H.J.G.E. Gardeniers & A. van den Berg, "Comparison of Capillary Zone Electrophoresis Performance of Powder-Blasted and Hydrogen Fluoride-Etched Microchannels in Glass", *Electrophoresis*, 24, 162-171 (2003).
284. A. Sayah, D. Solignac, T. Cueni & M.A.M. Gijs, "Development of Novel Low Temperature Bonding Technologies for Microchip Chemical Analysis Applications", *Sensors and Actuators A*, 84, 103-108 (2000).
285. L. Székely & R. Freitag, "Fabrication of a Versatile Microanalytical System without Need for Clean Room Conditions", *Analytica Chimica Acta*, 512, 39-47 (2004).
286. P.W. Leech, "Reactive ion etching of quartz and silica-based glasses in CF₄/CHF₃ plasmas", *Vacuum*, 55, 191-196 (1999).
287. X. Li, T. Abe & M. Esashi, "Deep Reactive Ion Etching of Pyrex Glass using SF₆ Plasma", *Sensors and Actuators A*, 87, 139-145 (2001).
288. L. Ceriotti, K. Weible, N.F. De Rooij & E. Verpoorte, "Rectangular Channels for Lab-on-a-Chip Applications", *Microelectronic Engineering*, 67-68, 865-871 (2003).
289. S. Ronggui & G.C. Righini, "Characterization of Reactive Ion Etching of Glass and its Applications in Integrated Optics", *Journal of Vacuum Science and Technology A*, 9, 2709-2712 (1991).
290. M. Stjernström & J. Roeraade, "Method for Fabrication of Microfluidic Systems in Glass", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 8, 33-38 (1998).
291. C. Iliescu, J. Jing, F.E.H. Tay, J. Miao & T. Sun, "Characterization of Masking Layers for Deep Wet Etching of Glass in an Improved HF/HCl Solution", *Surface & Coatings Technology*, 198, 314-318 (2005).
292. T. Corman, P. Enoksson & G. Stemme, "Deep Wet Etching of Borosilicate Glass using an Anodically Bonded Silicon Substrate as Mask", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 8, 84-87 (1998).
293. C. Iliescu, J. Miao & F.E.H. Tay, "Stress Control in Masking Layers for Deep Wet Micromachining of Pyrex Glass", *Sensors and Actuators A*, 117, 286-292 (2005).
294. Z.J. Jia, Q. Fang & Z.L. Fang, "Bonding of Glass Microfluidic Chips at Room Temperatures", *Analytical Chemistry*, 76, 5597-5602 (2004).
295. N. Chiem, L. Lockyear-Shultz, P. Andersson, C. Skinner & D.J. Harrison, "Room Temperature Bonding of Micromachined Glass Devices for Capillary Electrophoresis", *Sensors and Actuators B*, 63, 147-152 (2000).
296. H.Y. Wang, R.S. Foote, S.C. Jacobson, J.H. Schneibel & J.M. Ramsey, "Low Temperature Bonding for Microfabrication of Chemical Analysis Devices", *Sensors and Actuators B*, 45, 199-207 (1997).

297. Z. Huang, J.C. Sanders, C. Dunsmor, H. Ahmadzadeh & J.P. Landers, "A Method for UV-Bonding in the Fabrication of Glass Electrophoretic Microchips", *Electrophoresis*, 22, 3924–3929 (2001).
298. Y. Berdichevsky, J. Khandurina, A. Guttman & Y.H. Lo, "UV/Ozone Modification of Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Channels", *Sensors and Actuators B*, 97, 402–408 (2004).
299. J.C. McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H. Wu, O.J.A. Schueller & G.M. Whitesides, "Fabrication of Microfluidic System in Polydimethylsiloxane", *Electrophoresis*, 21, 27-40 (2000).
300. P.K. Tien, R. Ulrich & R.J. Martin, "Modes of Propagating Light Waves in Thin Deposited Semiconductor Films", *Applied Physics Letters*, 14, 291-294 (1969).
301. S. Monneret, P. Huguet-Chantôme & F. Flory, "M-lines Technique: Prism Coupling Measurement and Discussion of Accuracy for Homogeneous Waveguides", *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 2, 188–195 (2000).
302. D. Madge, R. Wong & P.G. Seybold, "Fluorescence Quantum Yields and their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields." *Photochemistry and Photobiology*, 75, 327-334 (2002).
303. http://news.reseau-concept.net/images/oiv/client/Resolution_Oeno_FR_2000_07.pdf,
304. R.M. Rousseau, "Detection Limit and Estimate of Uncertainty of Analytical XRF Results", *The Rigaku Journal*, 18, 33-47 (2001).
305. J. Hübner, K.B. Mogensen, A.M. Jorgensen, P. Friis, P. Telleman & J.P. Kütter, "Integrated Optical Measurement System for Fluorescence Spectroscopy in Microfluidic Channels", *Review of Scientific Instruments*, 72, 229-233 (2001).
306. N.A. George, B. Aneeshkumar, P. Radhakrishnan & C.P.G. Vallabhan, "Photoacoustic Study on Photobleaching of Rhodamine 6G Doped in Poly(methyl methacrylate)", *Journal of Physics D: Applied Physics*, 32, 1745-1749 (1999).
307. H. Schwartz & T. Pritchett, "Separation of Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis: Application to Analytical Biotechnology", Vol. 5. (2002).
308. A.M. Spehar, S. Koster, V. Linder, S. Kulmala, N.F. de Rooij, E. Verpoorte, H. Sigrist & W. Thormann, "Electrokinetic Characterization of Poly(dimethylsiloxane) Microchannels", *Electrophoresis*, 24, 3674–3678 (2003).
309. Y. Mourzina, A. Steffen, D. Kalyagin, R. Carius & A. Offenhäuser, "Capillary Zone Electrophoresis of Amino Acids on a Hybrid Poly(dimethylsiloxane)-Glass Chip", *Electrophoresis*, 26, 1849–1860 (2005).
310. N.J. Petersen, R.P.H. Nikolajsen, K.B. Mogensen & J.P. Kütter, "Effect of Joule Heating on Efficiency and Performance for Microchip-based and Capillary-based Electrophoretic Separation Systems: A Closer Look", *Electrophoresis*, 25, 253-269 (2004).

311. J. Gaudioso & H.G. Craighead, "Characterizing Electroosmotic Flow in Microfluidic Devices", *Journal of Chromatography A*, 971, 249-253 (2002).
312. S.P. Porras & E. Kenndler, "Are the Asserted Advantages of Organic Solvents in Capillary Electrophoresis Real? A Critical Discussion", *Electrophoresis*, 26, 3203-3220 (2005).
313. G.L. Lookhart & S.R. Bean, "Improvements in Cereal Protein Separations by Capillary Electrophoresis: Resolution and Reproducibility", *Cereal Chemistry*, 73, 81-87 (1996).
314. B. Pranaityte & A. Padarauskas, "Characterization of the SDS-Induced Electroosmotic Flow in Micellar Electrokinetic Chromatography with Cationic Polyelectrolyte-Coated Capillaries", *Electrophoresis*, 27, 1915-1921 (2006).
315. K.D. Bartle & P. Myers, "Theory of capillary electrochromatography", *Journal of Chromatography A*, 916, 3-23 (2001).
316. R.A. Van Wagenen, D.L. Coleman, R.N. King, P. Triolo, L. Brostrom, L.M. Smith, D.E. Gregonis & J.D. Andrade, "Streaming Potential Investigations: Polymer Thin Films", *Journal of Colloid and Interface Science*, 84, 155-162 (1981).
317. G. Ocvirk, M. Munroe, T. Tang, R. Oleschuk, K. Westra & D.J. Harrison, "Electrokinetic Control of Fluid Flow in Native Poly(dimethylsiloxane) Capillary Electrophoresis Devices", *Electrophoresis*, 21, 107-115 (2000).
318. D. Sinton, C. Escobedo-Canseco, L. Ren & D. Li, "Direct and Indirect Electroosmotic Flow Velocity Measurements in Microchannels", *Journal of Colloid and Interface Science*, 254, 184-189 (2002).
319. M.J. Kim & K.D. Kihm, "Microscopic PIV Measurements for Electroosmotic Flows in PDMS Microchannels", *Journal of Visualization*, 7, 111-118 (2004).
320. D. Sinton, D. Erickson & D. Li, "Microbubble Lensing-Induced Photobleaching (μ -BLIP) with Application to Microflow Visualization", *Experiments in Fluids*, 35, 178-187 (2003).
321. J.L. Pittman, K.F. Schrumb & S.D. Gilman, "On-Line Monitoring of Electroosmotic Flow for Capillary Electrophoretic Separations", *The Analyst*, 126, 1240-1247 (2001).
322. M.S. Kim, S.I. Cho, K.N. Lee & Y.K. Kim, "Fabrication of Microchip Electrophoresis Devices and Effects of Channel Surface Properties on Separation Efficiency", *Sensors and Actuators B*, 107, 818-824 (2005).
323. M.Y. Badal, M. Wong, N. Chiem, H. Salimi-Moosavi & D.J. Harrison, "Protein Separation and Surfactant Control of Electroosmotic Flow in Poly(dimethylsiloxane)-Coated Capillaries and Microchips", *Journal of Chromatography A*, 947, 277-286 (2002).
324. R. Chen, H. Guo, Y. Shen, Y. Hu & Y. Sun, "Determination of EOF of PMMA Microfluidic Chip by Indirect Laser-Induced Fluorescence Detection", *Sensors and Actuators B*, 114, 1100-1107 (2006).

325. X. Huang, M.J. Gordon & R.N. Zare, "Current-Monitoring Method for Measuring the Electroosmotic Flow Rate in Capillary Zone Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, 60, 1837-1838 (1988).
326. J.L. Pittman, C.S. Henry & S.D. Gilman, "Experimental Studies of Electroosmotic Flow Dynamics in Microfabricated Devices during Current Monitoring Experiments", *Analytical Chemistry*, 75, 361-370 (2003).
327. N. Bao, J.J. Xu, Q. Zhang, J.L. Hang & H.Y. Chen, "Electroosmotic Flow in Poly(dimethylsiloxane) Microchannels", *Journal of Chromatography A*, 1099, 203-206 (2005).
328. G.B. Lee, C.H. Lin, K.H. Lee & Y.F. Lin, "On the Surface Modification of Microchannels for Microcapillary Electrophoresis Chips ", *Electrophoresis*, 26, 4616-4624 (2005).
329. L.E. Locascio, C.E. Perso & C.S. Lee, "Measurement of Electroosmotic Flow in Plastic Imprinted Microfluid Devices and the Effect of Protein Adsorption on Flow Rate", *Journal of Chromatography A*, 857, 275-284 (1999).
330. U. Bilitewski, M. Genrich, S. Kadow & G. Mersal, "Biochemical Analysis with Microfluidic Systems", *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 377, 556-569 (2003).
331. L. Ren, C. Escebedo-Canseco & D. Li, "A new Method of Evaluating the Average Electro-osmotic Velocity in Microchannels", *Journal of Colloid and Interface Science*, 250, 238-242 (2002).
332. N.A. Lacher, N.F. de Rooij, E. Verpoorte & S.M. Lunte, "Comparison of the Performance Characteristics of Poly(dimethylsiloxane) and Pyrex Microchip Electrophoresis Devices for Peptide Separations", *Journal of Chromatography A*, 1004, 225-235 (2003).
333. A. Sze, D. Erickson, L. Ren & D. Li, "Zeta-Potential Measurement using the Smoluchowski Equation and the Slope of the Current-Time Relationship in Electroosmotic Flow", *Journal of Colloid and Interface Science*, 261, 402-410 (2003).
334. Y. Gu & D. Li, "The Zeta Potential of Glass Surface in Contact with Aqueous Solutions", *Journal of Colloid and Interface Science*, 226, 328-339 (2000).
335. B.J. Kirby & E.F. Hasselbrink Jr., "Zeta Potential of Microfluidic Substrate: 2. Data for Polymers", *Electrophoresis*, 25, 203-213 (2004).
336. X. Liu, D. Erickson, D. Li & U.J. Krull, "Cationic Polymer Coatings for Design of Electroosmotic Flow and Control of DNA Adsorption", *Analytica Chimica Acta*, 507, 55-62 (2004).
337. D. Belder & M. Ludwig, "Surface Modification in Microchip Electrophoresis", *Electrophoresis*, 24, 3595-3606 (2003).
338. C. Wang & C.A. Lucy, "Mixed Cationic/Anionic Surfactants for Semipermanent Wall Coatings in Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis*, 25, 825-832 (2004).

339. E.A.S. Doherty, R.J. Meagher, M.N. Albarghouthi & A.E. Barron, "Microchannel Wall Coatings for Protein Separations by Capillary and Chip Electrophoresis", *Electrophoresis*, 24, 34–54 (2003).
340. Y. Wang & P.L. Dubin, "Capillary Modification by Noncovalent Polycation Adsorption: Effects of Polymer Molecular Weight and Adsorption Ionic Strength", *Analytical Chemistry*, 71, 3463-3468 (1999).
341. H. Makamba, J.H. Kim, K. Lim, N. Park & J.H. Hahn, "Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) Microchannels", *Electrophoresis*, 24, 3607-3619 (2003).
342. L. Chen, J. Ren, R. Bi & D. Chen, "Ultraviolet Sealing and Poly(dimethylacrylamide) Modification for Poly(dimethylsiloxane)/Glass Microchips", *Electrophoresis*, 25, 914–921 (2004).
343. G.T. Roman, K. McDaniel & C.T. Culbertson, "High Efficiency Micellar Electrokinetic Chromatography of Hydrophobic Analytes on Poly(dimethylsiloxane) Microchips", *The Analyst*, 131, 194-201 (2006).
344. W. Xu, K. Uchiyama, T. Shimosaka & T. Hobo, "Fabrication of Polyester Microchannels and their Applications to Capillary Electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, 907, 279-289 (2001).
345. H. Nagata, M. Tabuchi, K. Hirano & Y. Baba, "Microchip Electrophoretic Protein Separation using Electroosmotic Flow Induced by Dynamic Sodium Dodecyl Sulfate-Coating of Uncoated Plastic Chips", *Electrophoresis*, 26, 2247–2253 (2005).
346. R.W. Hompesch, C.D. Garcia, D.J. Weiss, J.M. Vivanco & C.S. Henry, "Analysis of Natural Flavonoids by Microchip-Micellar Electrokinetic Chromatography with Pulsed Amperometric Detection", *The Analyst*, 130, 694–700 (2005).
347. J.M. Busnel, A. Varenne, S. Descroix, G. Peltre, Y. Gohon & P. Gareil, "Evaluation of Capillary Isoelectric Focusing in Glycerol-Water Media with a View to Hydrophobic Protein Applications", *Electrophoresis*, 26, 3369-3379 (2005).
348. J. Khandurina, N.A. Olson, A.A. Anderson, K.A. Gray & A. Guttman, "Large-Scale Carbohydrate Analysis by Capillary Array Electrophoresis: Part 1. Separation and Scale-up", *Electrophoresis*, 25, 3117-3121 (2004).
349. W. Vayaboury, D. Kirby, O. Giani & H. Cottet, "Noncovalent Coatings for the Separation of Synthetic Polypeptides by Nonaqueous Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis*, 26, 2187-2197 (2005).
350. C.M. Mangin, D.M. Goodall & M.A. Roberts, "Separation of ι -, χ and λ -Carageenans by Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis*, 22, 1460-1467 (2001).
351. M.M. Hsieh & H.T. Chang, "Discontinuous Electrolyte Systems for Improved Detection of Biologically Active Amines and Acids by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Native Fluorescence Detection", *Electrophoresis*, 26, 187-195 (2005).
352. N.S.K. Sze, T. Huang & J. Pawliszyn, "Laser Induced Fluorescence Detection of Non Covalently Labeled Protein in Capillary Isoelectric Focusing." *Journal of Separation Science*, 25, 1119-1122 (2002).

353. L. Ren, D. Sinton & D. Li, "Numerical Simulation of Microfluidic Injection Processes in Crossing Microchannels", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 13, 739-747 (2003).
354. C.H. Lin, R.J. Yang, C.H. Tai, C.Y. Lee & L.M. Fu, "Double-L Injection Technique for High Performance Capillary Electrophoresis Detection in Microfluidic Chips", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14, 639-646 (2004).
355. S. Yao, D.S. Anex, W.B. Caldwell, D.W. Arnold, K.B. Smith & P.G. Schultz, "SDS Capillary Gel Electrophoresis of Proteins in Microfabricated Channels", *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 5372-5377 (1999).
356. L.M. Fu & C.H. Lin, "Numerical Analysis and Experimental Estimation of a Low-Leakage Injection Technique for Capillary Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, 75, 5790-5796 (2003).
357. L.M. Fu & C.H. Lin, "High Resolution DNA Separation in Microcapillary Electrophoresis Chips Utilizing Double-L Injection Techniques", *Electrophoresis*, 25, 3652-3659 (2004).
358. Y.H. Lin, G.B. Lee, C.W. Li, G.R. Huang & S.H. Chen, "Flow-Through Sampling for Electrophoresis-based Microfluidic Chips using Hydrodynamic Pumping", *Journal of Chromatography A*, 937, 115-125 (2001).
359. G.B. Lee, L.M. Fu, C.H. Lin, C.Y. Lee & R.J. Yang, "Dispersion Control in Microfluidic Chips by Localized Zeta Potential Variation using the Field Effect", *Electrophoresis*, 25, 1879-1887 (2004).
360. N.P. Beard & A.J. de Mello, "A Polydimethylsiloxane/Glass Capillary Electrophoresis Microchip for the Analysis of Biogenic Amines using Indirect Fluorescence Detection", *Electrophoresis*, 23, 1722-1730 (2002).
361. A. Manz & J.C.T. Eijkel, "Miniaturization and Chip Technology. What Can we expect?" *Pure Applied Chemistry*, 73, 1555-1561 (2001).
362. A.J. Wang, J.J. Xu & H.Y. Chen, "Non Ionic Surfactant Dynamic Coating of Poly(dimethylsiloxane) Channel Surface for Microchip Electrophoresis of Amino Acids", *Analytica Chimica Acta*, 569, 188-194 (2006).
363. Y. Liu, R.S. Foote, C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, R.S. Ramsey & J.M. Ramsey, "Electrophoretic Separation of Proteins on Microchips", *Journal of Microcolumn Separations*, 12, 407-411 (2000).
364. N.M. Kinghorn, C.S. Norris, G.R. Paterson & D.E. Otter, "Comparison of Capillary Electrophoresis with Traditional Methods to Analyze Bovine Whey Proteins", *Journal of Chromatography A*, 700, 111-123 (1995).
365. J.A. Fruetel, R.F. Renzi, J. Stamps, B.A. Horn, J.A.A. West, S. Ferko, R. Crocker, C.G. Bailey, D. Arnold, B. Wiedenman, W.Y. Choi, D. Yee, I. Shokair, E. Hasselbrink, P. Paul, D. Rakestraw & D. Padgen, "Microchip Separations of Protein Biotoxins using an Integrated Hand-Held Device", *Electrophoresis*, 26, 1144-1154 (2005).

366. Z. Wang, K. Swinney & D.J. Bornhop, "Attomole Sensitivity for Unlabelled Proteins and Polypeptides with On-Chip Capillary Electrophoresis and Universal Detection by Interferometric Backscatter", *Electrophoresis*, 24, 865-873 (2003).
367. V. Goulet, B. Britigan, K. Nakayama & D. Grenier, "Cleavage of Human Transferrin by *Porphyromonas Gingivalis* Gingipains Promotes Growth and Formation of Hydroxyl Radicals." *Infection Immunology*, 72, 4351-4356 (2004).
368. S. Akiyama, A. Amano, T. Kato, Y. Takada, K.R. Kimura & I. Morisaki, "Relationship of Periodontal Bacteria and *Porphyromonas Gingivalis* fimA Variations with Phenytoin-Induced Gingival Overgrowth." *Oral Disease*, 12, 51-56 (2006).

12 Liste de publications et communications

➤ Publications dans des revues scientifiques à comité de lecture international :

- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, C.Morin, B.Hannes, Y.Chevolot, P.L.Desbène, S.Krawczyk, « Application of microfluidic chip with integrated optics for electrophoretic separations of proteins », *Journal of Chromatography B*, 2006, (Accepté, sous presse).
- S.Krawczyk, R.Mazurczyk, A.Bouchard, **J.Vieillard**, « Towards medical diagnostic chips with monolithically integrated optics in glass substrates », *Phys. Status Solidi C*, 2006 (Accepté, sous presse).
- R.Mazurczyk, **J.Vieillard**, A.Bouchard, B.Hannes, S.Krawczyk, « A novel concept of the integrated fluorescence detection system and its application in a Lab-on-a-Chip microdevice », *Sensors and Actuators B*, Chemical, Volume 118, Issues 1-2, 25 October 2006, Pages 11-19.

➤ Publication dans des revues scientifiques à comité de lecture national :

J.Vieillard, « Des laboratoires sur puce pour un diagnostic précoce du cancer du poumon », *Sur Mesure*, Volume 28, Février 2006, Page 4.

➤ Conférence avec comité de lecture international et proceedings :

- S.Krawczyk, **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, A.Bouchard, « Towards monitoring of cancer markers in point-of-care conditions using Lab-on-a-Chip devices with integrated optics », *Clinical Proteomics in Oncology*, 4 et 5 juillet 2006, Dijon.
- R.Mazurczyk, **J.Vieillard**, L.L.Boum, A.Bouchard, Y.Chevolot, P.Cremillieu, B.Hannes, S.Krawczyk, « Integrated microfluidic-microoptical detection systems fabricated by dry etching of soda-lime glass », *Fourth International Conference on Nanochannels, Microchannels and Minichannels (ASME)*, 19-21 juin 2006, Stokes Research Institute, Limerick (Ireland).
- S.Krawczyk, R. Mazurczyk, A.Bouchard, **J.Vieillard** and B.Hannes, « Towards medical diagnostic chips with monolithically integrated optics in glass substrates », *EXMATEC 2006: 8th Expert Evaluation & Control of Compounds Semiconductor Materials & Technologies*, 14-17 mai 2006, Cadiz (Espagne).
- B.Hannes, **J.Vieillard**, J.Potempa, E.Bou-Chakra, S.Krawczyk, M.Cabrera, « Selective grafting of biomolecules by microcontact printing inside microfluidic channels with optical integration. Application to the detection of cystein proteinases from porphyromonas gingivalis », *Biosensors 2006: The 9th World Congress on Biosensors*, 10-12 mai 2006, Toronto (Canada).
- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, B.Hannes, A.Bouchard, Y.Chevolot, E.Laurenceau, S.Krawczyk, « A novel capillary electrophoresis microchip with integrated optical system to separate biomolecules », *SBCN 2006: 10th International Symposium on Biochromatography*, 26-28 Avril 2006, Lille.
- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, A.Bouchard, B.Hannes, S.Krawczyk, « A novel capillary electrophoresis microchip with an integrated fluorescence detection system », *MSB'2006: 20th International Symposium on Micro-Scale Bioseparations*, 22-26 janvier 2006, Amsterdam (Netherlands).
- R.Mazurczyk, **J.Vieillard**, A.Bouchard, B.Hannes, S.Krawczyk, « A novel concept of the integrated fluorescence detection system and its application in a Lab-on-a-Chip microdevices », *Euroensors XIX*, 11-14 Septembre 2005, Barcelone (Espagne).
- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, A.Bouchard, B.Hannes, S.Krawczyk, « The studies on the performance of the lab-on-a-chip devices featuring integrated optical detection system », *Nanobiotechnology 3*, 7-8 juin 2005, Nice.

- B.Hannes, **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, S.Krawczyk, « A novel concept of the fabrication of Lab-on-a-Chip devices featuring integrated detection optics », Nanobiotechnology 3, 7-8 juin 2005, Nice.

➤ **Conférence avec comité de lecture national:**

- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, C.Morin, B.Hannes, Y.Chevolot, P.L.Desbène, S.Krawczyk, « Application of microfluidic chip with integrated optics for electrophoretic separations of proteins », 12e Journée Scientifique de l'Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides (IFRMP 23), 9 juin 2006, Rouen.
- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, C.Morin, B.Hannes, A.Bouchard, P.L.Desbene, S.Krawczyk, « Développement d'un microsystème permettant la séparation et la détection rapide de protéines », Forum Labo & Forum BIOTECH, 28-31 mars 2006, Paris.
- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, A.Bouchard, B.Hannes, S.Krawczyk, « Caractérisation du flux électroosmotique dans les laboratoires sur puce », ARATEM'2006 : Destination innovation, 9 février 2006, Saint Etienne.
- S.Krawczyk, R.Mazurczyk, **J.Vieillard**, C.Malhaire, D.Barbier, V.Lysenko, E.Méry, P.L.Desbène, A.Desbène, C.Morin, Etude des propriétés du silicium poreux et de son intégration dans les canaux microfluidiques des Lab-on-a-Chip pour la séparation de biomolécules, Journée "Microfluidique", 30 janvier 2006, Paris
- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, A.Bouchard, S.Krawczyk, « Fabrication et caractérisation d'un laboratoire sur puce innovant intégrant l'optique et la microfluidique », Journées des Nanosciences-Nanotechnologies en Rhône-Alpes, 24-25 Novembre 2005, Lyon.
- B.Hannes, **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, S.Krawczyk, « Les Lab-on-a-chip : développement d'un système de diagnostic du cancer miniaturisé, de la fabrication à la caractérisation », MAJECSTIC, 16-18 novembre 2005, Rennes.
- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, B.Hannes, S.Krawczyk, « Etude des performances des Lab-on-a-Chip à optique intégrée pour la détection de biomolécules », Colloque de la Recherche de l'Intergroupe des Écoles Centrales, 11-13 mai 2005, Lille.
- B.Hannes, R.Mazurczyk, **J.Vieillard**, S.Krawczyk, « Fabrication et caractérisation des Lab-on-a-Chip pour le diagnostic précoce des cancers du poumon », Colloque de la Recherche de l'Intergroupe des Écoles Centrales, 11-13 mai 2005, Lille.
- S.Krawczyk, C.Malhaire, P.L.Desbène, **J.Vieillard**, « Etude des propriétés du silicium poreux et son intégration dans les canaux microfluidiques des Lab-on-a-Chip pour la séparation des biomolécules », 2eme Congrès français de microfluidique - μ FLU, 14-16 décembre 2004, Toulouse.
- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, S.Krawczyk, « Caractérisation optique et microfluidique des Lab-on-a-Chip pour le diagnostic des cancers du poumon », Colloque EEA & Santé, 21-22 octobre 2004, Lyon
- **J.Vieillard**, R.Mazurczyk, S.Krawczyk, « Fabrication et intégration optique dans des Lab-on-a-Chip pour le diagnostic des cancers du poumon », Colloques de la Recherche de l'Intergroupe des Écoles Centrales, 30 juin-2 juillet 2004, Ecully.

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 25 avril 2002,

Vu la demande du Directeur de Thèse

Monsieur S. KRAWCZYK

et les rapports de

Monsieur P. BENECH

Professeur - IMEP, UMR CNRS - INPG - UJF n 5130 - ENSERG/MINATEC Bât. BCai - 7 Parvis Louis Néel Polygon Scientifique - 38016 GRENOBLE

et de

Monsieur P-L. DESBENE

Professeur - Laboratoire d'analyse des Systèmes Organiques Complexes (LASOC) - UPRESA n 2659 - Université de Rouen - 27000 EVREUX

Monsieur VIEILLARD Julien

est autorisé à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE (EEA)

Fait à Ecully, le 17 novembre 2006

P/Le Directeur de l'E.C.L.
Le Directeur des Etudes



Résumé

Les systèmes de type "Laboratoire sur puce" (LOC) ont pour ambition de transposer des instrumentations complètes de laboratoire analytique sur les quelques centimètres carrés d'une puce microfluidique. Avec de tels dispositifs, l'objectif est de réduire au minimum le temps, la complexité et le coût associés aux analyses chimiques ou biologiques.

Bien qu'ils montrent des potentialités intéressantes, les LOC présentent aujourd'hui une portabilité limitée. En effet, la mise en œuvre des LOC nécessite encore une unité de contrôle complexe, encombrante et onéreuse.

Pour contourner ce problème, nous avons développé des LOC intégrant une excitation et une détection de la fluorescence. La méthode de fabrication que nous avons mise au point permet de réaliser facilement et à faible coût des microsystèmes intégrant optique et microfluidique sur des substrats en verre. Les composants d'optique intégrée sont fabriqués par échange d'ions, tandis que les structures microfluidiques sont réalisées par gravure humide. L'étanchéité des LOC étant assurée par une membrane en polydiméthylesiloxane.

Au moyen de ces procédés de fabrication, nous avons pu intégrer différents types de composants optiques tels que des guides d'onde planaires, des jonctions Y et des tapers. Les guides de lumière nous permettent, d'une part, d'acheminer la lumière excitatrice jusqu'aux canaux microfluidiques, et d'autre part, de collecter la fluorescence émise. Les jonctions Y, quant à elles, assurent une distribution de la lumière excitatrice sur la puce, permettant ainsi la détection simultanée des molécules en différentes régions des canaux microfluidiques.

Afin d'étudier les propriétés optiques et microfluidiques de ces microsystèmes, nous avons mis en place un banc de caractérisation. Les analyses en transmission nous ont permis de valider les composants d'optique intégrée. Tandis que, les études en fluorescence démontrent que ces composants pourront être utilisés pour doser quantitativement de très faible quantité de protéines (<1nmol/L).

Dans ce contexte, nous avons développé des laboratoires sur puce capable d'injecter, de séparer et de détecter des protéines par trois méthodes différentes fondées sur l'électrophorèse capillaire. Pour optimiser ces méthodes, nous avons réalisé d'abord une caractérisation détaillée des paramètres électrocinétiques, associés à nos canaux microfluidiques. Les performances obtenues, en comparaison à des microsystèmes commerciaux ou à des systèmes d'électrophorèse capillaire classiques, démontrent un excellent pouvoir séparatif de nos laboratoires sur puce.

De plus, nous sommes parvenus, pour la première fois, à coupler une réaction immunologique, impliquée dans un processus infectieux, avec une séparation en électrophorèse de zone dans un LOC.

L'ensemble des résultats obtenus démontre la polyvalence des analyses qui peuvent être réalisées dans nos laboratoires sur puce et les potentialités de ces microsystèmes.

Mots-Clés : Laboratoires sur puce, séparation, électrophorèse capillaire, guides optiques