

La microfluidique

Dans le domaine de la micro-électronique et de l'informatique s'est déroulée, ces dernières décennies, une révolution technologique qui tourne autour de la taille des dispositifs et de leur performance. En effet, la miniaturisation des dispositifs électroniques s'est accompagnée d'une multiplication exponentielle de leurs performances. Cette même révolution est en train de s'opérer dans le domaine des sciences expérimentales et porte un nom : la microfluidique. Elle est définie comme un domaine de la science et des technologies encadrant la fabrication d'objets de petite taille (de l'ordre du μm) destinés à la manipulation de très petites quantités de fluide (de l'ordre du μL). C'est un domaine pluridisciplinaire nécessitant des connaissances en microélectronique, science des matériaux, chimie, physique... Elle trouve des applications en biologie, chimie, physique. La chimie analytique est considérée comme l'un des premiers parents de la microfluidique et comme l'un de ses premiers bénéficiaires¹⁸. Manz et al., ont énoncé en 1990 le concept d'un système analytique miniaturisé (TAS : *Total Analysis chemical System*) intégrant l'ensemble des étapes d'une analyse chimique : de l'échantillonnage jusqu'à la détection¹⁹. Il faut dire que les promesses d'une analyse nécessitant beaucoup moins d'échantillon, de réactifs et de temps sont suffisantes pour que cette piste soit sérieusement explorée. Le terme microsystème en chimie analytique désigne les *micro-arrays* et les systèmes microfluidiques. Ces 2 systèmes diffèrent de par leur mode opérationnel qui est statique pour les premiers et dynamiques pour les systèmes microfluidiques. La microfluidique analogique ou conventionnelle est caractérisée par des canaux ou chambres de réactions remplies par une phase unique généralement aqueuse. Les canaux microfluidiques peuvent aussi être remplis par 2 phases liquides non miscibles (eau, huile) dont l'une est en émulsion dans l'autre : on parle ainsi microfluidique en gouttes.

Les techniques de fabrication utilisées en microfluidique sont adaptées de celles utilisées en microélectroniques. Cette adaptation s'articule autour du coût pour une grande accessibilité dans le monde académique mais aussi au niveau du choix des matériaux selon des critères comme la biocompatibilité et l'intégration de moyens de détection. Schématiquement, un système microfluidique doit comprendre, i) une entrée pour l'accès des substrats et réactifs et une sortie pour les produits. ii) un mode d'actuation : il peut être extérieur (seringue, pompe) ou interne à la micropuce (électro-osmose, capillarité). iii) des structures pour la manipulation du fluide (microcanal, chambre de réaction) et enfin iv) un mode de détection qui peut aussi être interne (détection électrique, optique...) ou extérieur (spectrométrie de masse, RMN...). Il faut noter que les moyens de détection intégrés ne permettent pas d'analyser les échantillons protéomiques complexes. En effet, la sensibilité et la gamme dynamique requises pour ce type d'échantillon sont loin d'être atteintes par les méthodes de détection intégrée. La plupart des dispositifs microfluidiques destinés à la protéomique sont couplés à la spectrométrie de masse qui est le mode de détection de référence en analyse des protéines.

3.1 Écoulement et mélange en microfluidique

En microfluidique, les fluides sont manipulés dans des structures dont les dimensions varient entre 1 et 100 μm environ. Le comportement d'un fluide dans un volume aussi restreint a un certain nombre de particularités. Ces changements de comportement concernent principalement les phénomènes d'écoulement et de mélange.

3.1.1 Écoulement

Le nombre de Reynolds permet de déterminer le régime d'écoulement en mécanique des fluides. Il permet de définir 3 états d'écoulement : laminaire caractérisé par un nombre de Reynolds faible, transitoire et turbulent pour des nombres de Reynolds plus élevés. Le nombre de Reynolds découle des équations de Navier-Stokes et représente un rapport entre les forces d'inertie et celles liées à la viscosité du fluide étudié. Il est appliqué à plusieurs domaines notamment dans l'étude de l'aérodynamisme d'un objet volant. Sa forme qui nous intéresse ici sera celle caractérisant l'écoulement d'un fluide dans un tuyau. Il est défini par l'équation suivante :

$$Re = \frac{VL}{\nu} = \frac{\rho VL}{\mu}$$

avec V = vitesse caractéristique du fluide ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); L = dimension caractéristique (m); ν = viscosité cinématique (μ/ρ) ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$); ρ masse volumique du fluide $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$; μ viscosité dynamique : $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)

L'écoulement est laminaire pour des valeurs du nombre de Reynolds très faibles (~ 1), transitoire si le nombre de Reynolds est entre 2000 et 3000 et enfin turbulent au-delà de 3000. Si on prend l'exemple d'une solution aqueuse s'écoulant dans un canal cylindrique d'1 mm de diamètre interne et de 10 cm de longueur, le nombre de Reynolds est de 0,76. Malgré des dimensions supérieures à celles d'un dispositif microfluidique, les conditions d'un écoulement laminaire sont remplies. Les écoulements dans les dispositifs microfluidiques sont caractérisés par des nombres de Reynolds très faible (inférieur à 1) donc un l'écoulement y est laminaire. Ce flux laminaire va avoir de grandes conséquences sur le mélange au sein des dispositifs microfluidiques.

Pour générer l'écoulement dans un dispositif microfluidique, il faut choisir un mode d'actuation. L'intérêt de la miniaturisation est de disposer d'un petit appareil amovible et disposant de toutes les fonctions intégrées (pompage, écoulement, détection). Cependant, l'intégration d'un mode d'actuation au dispositif microfluidique n'est pas toujours évidente. On trouve ainsi des modes de pompage internes et externes. L'écoulement dans les systèmes microfluidiques est généré principalement par application de pression PDF (*Pressure Driven Flow* ou flux par application de pression) ou par EOF (flux électroosmotique)³⁹.

Modes de pompage internes : les modes d'actuation ou de pompage internes présentent l'avantage de rendre le dispositif microfluidique autonome avec l'intégration

de la fonction de pompage. On peut citer dans cette catégorie les modes de pompage électroosmotique, thermique, piezoélectrique⁴⁰, par capillarité⁴⁰. Le mode de pompage interne le plus utilisé est sans doute le pompage électroosmotique. Dans ce cas de figure, l'écoulement est généré par application d'un champ électrique. L'application d'une tension électrique entre l'entrée et la sortie d'un canal microfluidique dont les parois sont chargées négativement (groupement SiO⁻ verre, silice) entraîne l'accumulation de cations sur les parois. Une couche de contre-ions fixes se forme sur les parois tandis que les contre-ions les plus éloignés de la surface vont se mettre en mouvement et générer un flux électroosmotique(EOF)⁴¹.

Le flux électroosmotique dépend fortement de la chimie de surface des matériaux utilisés et n'est pas applicable aux liquides non polaires⁴². Par ailleurs, l'application d'un champ électrique non adapté entraîne l'apparition de bulles de gaz ou de gradient de pH. Il est généralement impossible de contrôler le débit dans un pompage électroosmotique. Le couplage d'un dispositif microfluidique intégrant un pompage électroosmotique à la MS est généralement plus complexe du fait de la nécessité de séparer la tension du flux électroosmotique de celle de la source ESI.

Modes de pompage externe : l'utilisation d'un pompage externe est généralement plus simple. Il se résume à la connexion de la puce microfluidique à une pompe externe ou une pousse-seringue pour générer un flux par application de pression (PDF : *Pressure Driven Flow*). C'est l'approche la plus utilisée car elle est indépendante de la chimie de surface et de la polarité du liquide. Récemment, des pompes ont été développés spécialement pour les puces microfluidiques, offrant la possibilité de contrôler la pression et le débit. Le flux généré par PDF est par ailleurs caractérisé par un profil parabolique, ce qui n'est pas très adapté aux dispositifs destinés à la séparation.

La force centrifuge peut aussi être utilisée pour le transport des liquides dans un dispositif microfluidique. En effet, la rotation d'un dispositif microfluidique en forme de disque a permis de transporter le fluide dans les canaux microfluidiques grâce à la force centrifuge⁴³.

3.1.2 Mélange

Le caractère laminaire de l'écoulement dans les dispositifs microfluidiques a plusieurs avantages dont la possibilité de travailler avec 2 phases non miscibles : la microfluidique en gouttes. Cependant, la lenteur du mélange dans un canal microfluidique représente un inconvénient pour bon nombre d'applications en chimie organique ou en chimie analytique. Des structures appelées mixeurs ont donc été pensées et intégrées dans les puces microfluidiques afin d'accélérer le mélange. Le mélange est dû à 2 phénomènes : la convection et la diffusion. L'importance relative de ces 2 phénomènes peut être déterminée en calculant le nombre de Peclet. Le nombre de Peclet est sans dimension et est défini par l'équation suivante :

$$Pe = \frac{lu}{D}$$

avec l = longueur caractéristique; u vitesse de l'écoulement; D : Coefficient de diffusion

Si $Pe \gg 1$ la diffusion peut être négligée et si $Pe \ll 1$ c'est la convection qui devient négligeable⁴⁴. Cependant, la valeur numérique du nombre de Peclet peut être trompeuse quand il s'agit de dispositif microfluidique si on ne prend pas en compte le caractère laminaire de l'écoulement. En effet, l'écoulement laminaire dans les canaux microfluidique fait que la diffusion est largement dominante et la convection est même négligeable. Ce mélange lent est un inconvénient pour les dispositifs destinés aux réactions chimiques basées sur le mélange de 2 réactifs. Il peut aussi être mis à profit pour la mise en place d'un gradient de concentration⁴⁵. Des mixeurs microfluidiques ont été développés pour accélérer le mélange. Ils peuvent être caractérisés selon le mécanisme physique en focalisation hydrodynamique, injection alternée, effet géométrique, méthode électrokinétique, fusion de gouttes et agitation particulaire⁴⁶.

3.1.3 Avantages et inconvénients des systèmes microfluidiques

Il faut considérer les performances analytiques de la miniaturisation pour évaluer si elles peuvent dépasser celles des appareils de paillasse. En effet, les nombres sans dimension (comme le nombre de Peclet, le nombre de Fourier, le nombre de Bodenstein) permettent de décrire les microsystèmes et comparer leurs performances aux systèmes classiques. La diffusion des molécules est beaucoup plus importante dans les systèmes miniaturisés car elle est proportionnelle à la dimension caractéristique du système⁴⁷. En pratique ceci signifie que la diminution à 1/10 du diamètre interne d'une colonne de séparation entraîne une réduction non négligeable du temps d'analyse. La miniaturisation permet d'utiliser une plus faible quantité de réactifs et d'échantillon. Cette diminution ne se fait pas généralement au détriment de la qualité des résultats. Elle permet par ailleurs d'amoinrir le coût d'une expérience ainsi que son impact sur l'environnement. La miniaturisation présente donc des avantages financiers et écologiques.

3.2 La microfabrication

La microfabrication est un ensemble de procédés permettant d'usiner des objets dont les dimensions sont comprises entre le micromètre et le millimètre. Elle vient en partie du secteur de l'électronique, notamment de la fabrication des semi-conducteurs pour les circuits intégrés. Les objets microfabriqués peuvent inclure des structures mobiles ou statiques⁴⁸. Comme structures mobiles, on peut citer les valves et comme structures statiques, les canaux microfluidiques, les chambres de réaction... L'utilisation de ces objets a ouvert un nouveau champ expérimental appelé microfluidique. Elle est définie comme étant un domaine de sciences et technologies permettant de manipuler de très faibles quantités de fluide en utilisant des canaux de l'ordre du micromètre⁴⁹. La microfabrication est basée sur les principaux procédés que sont la photolithographie, le dépôt sur couche mince, la gravure chimique et physique, l'usinage laser, les méthodes de moulage... Pour la fabrication d'une puce, on peut avoir recours à un ou une combinaison de ces procédés. Les premiers dispositifs étaient fabriqués en silicium ou en verre qui sont les principaux matériaux utilisés dans l'industrie électronique. Le premier dispositif microfluidique

développé par Manz *et al.*, était en verre et silicium fabriqué avec les méthodes conventionnelles de l'industrie micro-électronique comme la photolithographie et la gravure⁵⁰. Ces méthodes sont précises, mais très coûteuses, sont peu flexibles et pas adaptées à un travail de recherche. En biologie (culture cellulaire par exemple), les matériaux comme le silicium ont vite été remplacés par des matériaux moins coûteux et plus adaptés aux applications biologiques comme le PDMS. Etant donné la taille micrométrique des objets fabriqués, la microfabrication est réalisée dans un environnement propre avec un minimum de particules par mètre cube. Les techniques de microfabrication sont en général sensibles à l'humidité et à la température d'où la nécessité de contrôler ces paramètres dans l'environnement de travail.

3.2.1 L'environnement

La fabrication de microstructures dont la taille est de l'ordre du micromètre nécessite un environnement propre et contrôlé pour assurer le bon déroulement des procédés de microfabrication et amoindrir le risque de défaut de fabrication. La première exigence pour la microfabrication concerne le nombre de particules dans l'air qui doit être maintenu à un niveau le plus faible possible. Un échantillon typique d'air intérieur peut contenir entre 500 000 et 1 million de particules par mètre cube⁵¹. Ces particules sont de taille micrométrique et ont tendance à s'adsorber sur les surfaces. Le dépôt de ces particules sur les surfaces destinées aux microstructures conduit directement à un défaut de fabrication. Les produits utilisés (résine photosensible, polymères, solvants, eau ultra pure) doivent aussi être préservés de ces particules. Il est donc nécessaire de travailler et de stocker ces produits en atmosphère contrôlée ou "salle propre" (Clean room). Une "salle propre" est définie comme étant un environnement au sein duquel le nombre de particules (poussière, insecte, aérosols) est maintenu à un faible niveau. Par ailleurs, la température est contrôlée (environ 20°C) ainsi que l'humidité (environ 25%) et l'air filtré en permanence.

Les particules sont de différentes tailles, de différents types et différentes origines. Elles peuvent provenir des cheveux humains (en moyenne entre 50 et 70 microns), des pollens (entre 30 et 50 microns), des bactéries (entre 2 et 10 microns) et enfin d'autres particules de plus petite taille aux origines et nature diverses. L'air extérieur (trafic automobile, végétation, vent..) et l'opérateur représentent les principales sources de particules.

Des dispositions sont prises pour forcer la circulation de l'air dans un unique sens : de l'intérieur vers l'extérieur de la salle (avec ou sans recirculation). Le passage de l'air entrant est forcé à travers des filtres capables de retenir des particules aussi petites que 0,5 microns. Malgré cette filtration de l'air, les "salles propres" contiennent quand même des particules. Elles sont donc classées selon le nombre et la taille des particules présentes dans l'air. Cette classification est définie par l'Organisation Internationale des standardisations (ISO, Tableau 3).

ISO 14644-1 Cleanroom Standards

Class	maximum particles/m ³						FED STD 209E equivalent
	≥0.1 μm	≥0.2 μm	≥0.3 μm	≥0.5 μm	≥1 μm	≥5 μm	
ISO 1	10	2.37	1.02	0.35	0.083	0.0029	
ISO 2	100	23.7	10.2	3.5	0.83	0.029	
ISO 3	1,000	237	102	35	8.3	0.29	Class 1
ISO 4	10,000	2,370	1,020	352	83	2.9	Class 10
ISO 5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29	Class 100
ISO 6	1.0×10 ⁶	237,000	102,000	35,200	8,320	293	Class 1,000
ISO 7	1.0×10 ⁷	2.37×10 ⁶	1,020,000	352,000	83,200	2,930	Class 10,000
ISO 8	1.0×10 ⁸	2.37×10 ⁷	1.02×10 ⁷	3,520,000	832,000	29,300	Class 100,000
ISO 9	1.0×10 ⁹	2.37×10 ⁸	1.02×10 ⁸	35,200,000	8,320,000	293,000	Room air

La précision et la technologie de fabrication déterminent le niveau de la salle propre à choisir. La photolithographie douce est la technique de fabrication utilisée durant cette thèse. Une salle lithographie de niveau ISO 7 (T=21°C, H=45%) a été utilisée pour la fabrication des moules ou *master*. Ensuite la réplique par moulage a été effectuée dans une salle grise, salle de niveau ISO 8. Tous les dispositifs microfluidiques ont été fabriqués au sein de la plateforme technologique de l'Institut Pierre Gilles de Gennes pour la microfluidique (IPGG). L'opérateur est une source non négligeable de particules qui peuvent être émises de ses cheveux, peau, barbe, chaussures et vêtements. Il est donc nécessaire, lors d'un procédé de microfabrication, que l'opérateur soit muni de blouse, couvre-chaussure, charlotte, gants et lunettes pour préserver la qualité de l'air. La température et l'hygrométrie sont aussi des paramètres à contrôler pour assurer le bon déroulement des procédés de microfabrication.

3.2.2 Les matériaux utilisés

Silicium : le silicium est l'un des premiers matériaux testés du fait de son utilisation dans le domaine des circuits intégrés. Il possède des propriétés intéressantes : bonnes résistances mécaniques, chimiques et thermiques. Ce sont des propriétés intéressantes pour les applications en chimie, car elles offrent la possibilité de travailler dans des conditions extrêmes. Il est aussi possible de modifier la surface du silicium pour diverses applications. Cependant, pour les applications biologiques ou médicales, le silicium n'est pas le matériau le plus adapté. En effet, il n'est pas transparent, ce qui le rend inutilisable pour les approches en chimie analytiques utilisant des modes de détection optique. Par ailleurs, il est aussi impossible d'observer une culture cellulaire au microscope avec ce type de matériau. Enfin, son coût élevé limite son utilisation, il est peu utilisé en milieu académique et en recherche et développement.

Verre : contrairement au silicium, le verre a l'avantage d'être transparent et presque chimiquement inerte. Il est biocompatible et ses propriétés de surface sont modulables. Le verre et le silicium ont des propriétés de surface assez intéressantes. En effet, leur surface est chargée négativement, charges qui est à l'origine des flux électroosmotiques. Le verre

s'est révélé très utile dans la séparation et le séquençage ADN¹²². Par ailleurs, le verre est associé à certaines contraintes liées à son micro-usinage. En effet, la précision et la forme des motifs obtenus par gravure sont de faible qualité. A cela s'ajoutent les difficultés liées au collage du verre qui nécessite parfois l'utilisation d'adhésif polymère qui peut être une source de contamination pour les analyses moléculaires comme la spectrométrie de masse.

Polymères : Le silicium et le verre ont rapidement été abandonnés et remplacés par les polymères. Cette évolution vers les polymères s'explique par leur coût moins élevé que celui du verre et du silicium. Par ailleurs, les méthodes de fabrication associées aux polymères sont aussi moins coûteuses et ne nécessitent pas toujours de salle blanche. Cependant, les micropuces en polymère présentent certains désavantages : leurs propriétés de surface sont à surveiller contrairement pour le verre et le silicium. Ils ne sont pas toujours compatibles avec les hautes températures, les solvants et solutés organiques de faible poids moléculaire⁵². PMMA (polyméthylmétacrylate), PC (polycarbonate), PET (polyéthylène téréphtalate), PVC (polyvinylchlorure) sont des polymères utilisés pour la fabrication de dispositifs microfluidiques. Les dispositifs microfluidiques en polymère sont généralement fabriqués par ablation laser, moulage par injection, moulage à chaud et moulage par réplication⁵³. Mais le polymère le plus utilisé est de loin le PDMS¹¹³. C'est un polymère connu aussi sous le nom de diméthylpolysiloxane ou diméthicone, il fait partie du groupe des polymères organominéraux (organosiliconés) communément appelés silicones. Les dispositifs en PDMS sont généralement fabriqués par moulage par réplication. Le moule peut être obtenu par différentes techniques dont la plus utilisée est la photolithographie douce. Le dispositif microfluidique développé durant cette thèse a été fabriqué en PDMS par photolithographie et réplication par moulage. Ces techniques de fabrication seront détaillées plus loin (3.3 Fabrication d'un dispositif microfluidique en PDMS).

D'autres matériaux comme la céramique peuvent aussi être utilisés pour la fabrication de dispositifs microfluidiques. Ce sont des matériaux peu chers, adaptés à un flux électroosmotique et leur manufacture ne nécessite pas une salle blanche. Ils offrent cependant peu de flexibilité, sont opaques et nécessitent de l'adhésif pour le collage.

3.2.3 Les techniques de fabrication

Le choix d'un procédé de fabrication dépend de la nature du matériau choisi, du coût ainsi que de la précision nécessaire pour réaliser les motifs souhaités. La gravure, la lithographie et le dépôt en couches minces sont appelés "*méthodes dures*" car les matériaux utilisés pour ces approches : verre, silicium sont dits "*durs*". L'ablation laser et les méthodes de moulage sont appelées "*méthodes douces ou plastiques*" car elles sont associées à des matériaux du type plastique (PMMA) ou élastomère (PDMS).

La lithographie renvoie à un ensemble de techniques de microfabrication incluant la photolithographie, le micro-usinage, écriture par faisceau d'électron... La photolithographie est la méthode la plus utilisée. Elle consiste à transférer des motifs sur

une couche de résine photosensible (appelé *photoresist*). Le photoresist est étalé uniformément sur un support lisse appelé *Wafer* et puis exposée à la lumière à travers un masque optique. Le masque optique est un support transparent sur lequel les motifs sont imprimés en opaque (oxyde de Fer ou de Chrome). L'utilisation du masque a pour objectif de protéger une partie de la couche du photoresist des rayonnements incidents. Des rayons X, un faisceau d'électrons ou de photons sont différentes sources de rayonnement utilisées en photolithographie. Une fois exposée à la source d'énergie, la polymérisation de la résine photosensible est activée ou inhibée (résine négative ou positive). La suppression des parties non polymérisées est la dernière étape du transfert des motifs sur le support solide. L'utilisation de longueur d'onde courte permet d'améliorer la précision de la technique. La photolithographie est la forme la plus utilisée avec des longueurs d'onde comprises entre 300 et 450 nm. La précision en photolithographie peut atteindre le submicromètre.

La gravure est une méthode de microfabrication utilisée pour des matériaux comme le verre ou le silicium. Elle peut être physique ou chimique. La gravure chimique consiste à attaquer l'objet à graver avec un agent chimique en phase liquide, on l'appelle aussi gravure humide. La gravure peut se faire de manière isotropique (vitesse de gravure équivalente dans les 3 directions) ou anisotropique (suivant une direction préférentielle). La gravure chimique du silicium peut être réalisée avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) et de l'acide fluorhydrique pour le verre. Dans ce type d'approche, la largeur des canaux microfluidiques est déterminée par la surface de contact entre le matériau et l'agent chimique. Le temps de contact, qui dépend de la vitesse de gravure de l'agent utilisé, détermine la profondeur des canaux microfluidiques. La gravure physique ou sèche consiste à attaquer la surface de l'objet à graver avec des radicaux générés dans un plasma ou un gaz. Les méthodes de gravure permettent de fabriquer des structures dont la taille est comprise entre 0,2 et 500 μm .

L'utilisation croissante des polymères organiques a permis le développement des méthodes de réplique. Ces méthodes sont très adaptées à une fabrication en masse. Les moulages par réplique, par estampage et par microinjection sont les principales méthodes de réplique. i) Le moulage par réplique se fait par dépôt d'un polymère thermoréticulant (PDMS) sur le moule. Après réticulation, la structure solide constituée par le polymère va reproduire le négatif du moule ii) L'estampage consiste à presser le moule contre un matériau chauffé et déformable qui va épouser les reliefs du moule et donner après séparation, le négatif de ce dernier. iii) Pour la microinjection, du plastique chauffé, à l'état liquide, est injecté dans une enceinte fermée dans laquelle est placé le moule. Un moule est fabriqué au préalable par des approches classiques comme la photolithographie. La réplique par moulage est sans doute la plus simple des méthodes de réplique. Elle ne nécessite que le polymère thermoréticulant, le moule, du papier aluminium et une cloche à dégazer. Le facteur limitant est la fabrication du moule, nécessitant au moins une "*salle propre*" de niveau ISO 7 et des équipements spéciaux comme un *spin-coater* et un aligneur de masque. Une fois que la fabrication du moule est terminée, la réplique par moulage en utilisant du PDMS peut se faire dans un

environnement moins exigeant ISO 8, le plus important étant le contrôle de la température et de l'hygrométrie. La fabrication d'un moule par photolithographie suivie de la réplication par moulage est désignée par le terme photolithographie douce. Durant cette thèse, les dispositifs microfluidiques ont été fabriqués par réplication par moulage à partir d'un moule obtenu par photolithographie. Les différentes étapes de fabrication seront détaillées dans le paragraphe suivant.

3.3 Fabrication d'un dispositif microfluidique en PDMS

3.3.1 Photolithographie

La fabrication d'un dispositif microfluidique en PDMS se fait généralement par photolithographie et réplication par moulage. Ce procédé appelé photolithographie douce a été introduit par Whitesides *et al.*,⁵⁴. Elle passe dans un premier temps par la fabrication d'un moule suivi par une étape de réplication par moulage en utilisant du PDMS. Cette partie va consister en la description des différentes étapes de fabrication d'un moule en utilisant une résine photosensible négative SU-8 et une plaque de silice (*wafer*) comme support.

i) Dessin des motifs : la première étape de ce procédé consiste à dessiner les motifs du dispositif microfluidique à l'aide d'un logiciel de design (*Computational Assisted Design*) comme AutoCAD. Durant ce projet, c'est un logiciel gratuit du nom de CleWin (CleWin5) qui a été utilisé pour l'élaboration et le design de notre dispositif microfluidique.

ii) Fabrication du masque optique arrive après le dessin des motifs. La fabrication du masque optique consiste en l'impression des motifs dessinés sur un papier transparent. Il existe diverses techniques d'impression et différents supports. Les motifs peuvent être imprimés sur des supports en verre ou en quartz recouverts d'un film de chrome et de résine photosensible et imprimé par le moyen d'un laser ou d'un faisceau d'électron. Pour un design dont le plus petit motif est supérieur à 50 μm , comme c'est le cas de tous les designs imprimés durant cette thèse, l'impression peut simplement se faire sur une feuille transparente grâce à une imprimante à haute résolution.

Les motifs présentés à la Figure 6 sont ceux de l'une des chambres de réactions du dispositif microfluidique fabriqué durant cette thèse. Il est constitué de 2 chambres de réaction fabriquées indépendamment en PDMS (Polydimethylsiloxane). Les piliers de support présents dans la chambre de réaction servent à supporter la membrane de filtration moléculaire. Enfin, les marques d'alignement sont utilisés dans le but d'aligner les deux chambres de réaction lors de leur superposition. Ce dispositif sera présenté plus en détail au chapitre 5.

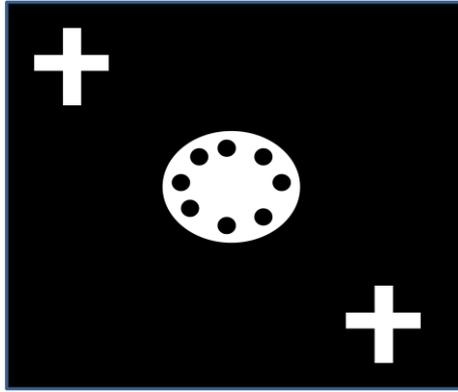


Figure 6 : Masque optique imprimé sur un film photosensible avec des marques d'alignement (haut gauche et bas droite) et une chambre de réaction et des piliers de support au milieu

iii) Photolithographie est la troisième étape du procédé. L'objectif est de transférer les motifs imprimés (sur un support plan en deux dimensions) sur un support solide en 3D.

Ces opérations se déroulent en salle lithographie (ISO 7)

Matériels :

- *Spin-Coater*
- Plaque en Silice (Wafer)
- Photoresist SU-8 (Résine photosensible)
- Masque
- Plaque chauffante
- Source UV

iii.1) *Spin-Coating* : le wafer est une plaque en silice avec une surface lisse destinée à recevoir la résine photosensible. Avant le dépôt de la résine, cette surface est précautionneusement lavée pour enlever toutes les matières particulaires. Le wafer est ensuite chauffé pour enlever toute trace d'humidité et puis placé sur le *spin-coater*. La résine photosensible est contenue dans une solution composée de solvant et d'additifs destinés à contrôler la cinétique de la résine photosensible. Le photoresist est ensuite déposé sur le wafer et réparti uniformément sur toute sa surface par *spin-coating* (dispersion par rotation, Figure 7). Selon la résine utilisée et l'épaisseur désirée, le catalogue associé permet de choisir la vitesse angulaire adaptée. Les vitesses de rotation appliquées sont comprises entre 1000 et 10 000 tours/minute. Dans le cas d'une double couche de résine, un coefficient de correction est appliqué à la vitesse indiquée pour prendre en compte la différence de rugosité entre la surface lisse du wafer et celle de la première couche de résine.

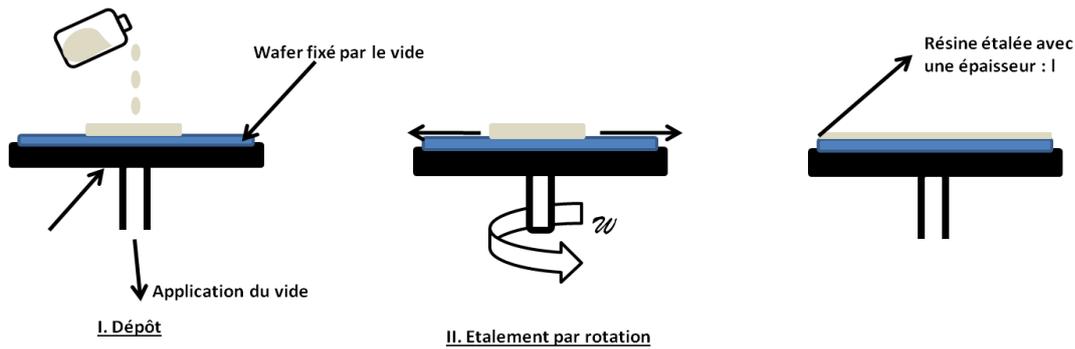


Figure 7 : Etalement de la résine photosensible sur le wafer (*Spin-Coating*)

Le *spin-coating* est suivi du *soft-baking*. Une fois la résine photosensible déposée à l'épaisseur souhaitée, le wafer et la couche de résine subissent un protocole de chauffage destiné à faire évaporer les solvants présents dans la résine et faire adhérer cette dernière à la surface du wafer. Ce chauffage se fait généralement par paliers afin d'éviter un stress thermique. Ce chauffage est effectué à 65°C puis à 95°C à des durées dépendant de la résine.

iii.2) Exposition : elle consiste à exposer la couche de photoresist à la lumière UV à travers le masque optique (Figure 8). Plus le contact entre le masque optique et la couche de photoresist est fort, plus le transfert de motif est précis. Le masque est alors étalé sur une plaque en quartz. L'ensemble est ensuite plaqué contre la couche de photoresist sur le wafer : ce qui assure un fort contact entre la résine photosensible et le masque optique. Selon le type de photoresist choisi (SU-8 2000 par exemple), l'énergie d'exposition est donnée en fonction de l'épaisseur de la couche. La puissance de la lampe UV et l'énergie d'exposition déterminent la durée d'exposition.

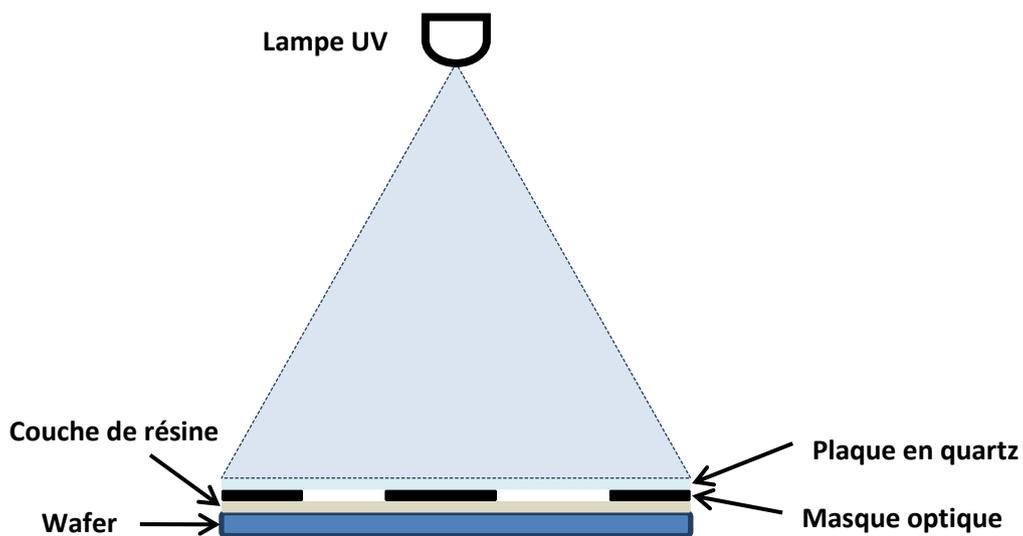


Figure 8 : Exposition de la résine photosensible à la lumière UV à travers le masque optique

iii.3) Développement : avant le développement, un traitement thermique est effectué dans le but de polymériser le photoresist. Le traitement thermique est effectué

par 2 paliers à 65°C, puis à 95°C. Il existe 2 types de résines photosensibles : négative et positive. Pour les résines positives, les parties exposées ne polymérisent pas et sont solubles dans la solution de développement. Par contre, c'est la partie exposée à la lumière UV qui polymérise chez les résines négatives. La suppression des parties non polymérisées dans la solution de développement est la dernière étape du transfert des motifs sur le moule (Figure 9).

Le développement consiste à solubiliser les parties de la couche de résine non polymérisée dans la solution de développement fournie avec le photoresist. Le wafer est placé dans un bécher contenant la solution développeur le tout placé sur un agitateur pour une durée dépendant de l'épaisseur de la couche de photoresist. Le wafer est ensuite retiré et rincé avec la solution de développement, puis avec de l'isopropanol et enfin avec de l'eau. La dernière étape du protocole de photolithographie consiste à chauffer la résine restée sur le wafer, à l'image des motifs du masque optique. Cette dernière étape permet de compléter la polymérisation et la fixation de la résine sur le wafer. Le moule est enfin prêt avec tous les motifs transférés à la surface du wafer. Ces motifs peuvent être reproduits de manière simple et rapide grâce à la réplique par moulage pour fabriquer des dispositifs microfluidiques en PDMS.

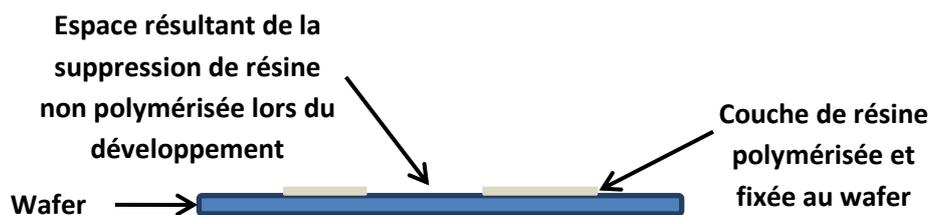


Figure 9 : Wafer et couche de résine après développement

3.3.2 Réplication par moulage

La réplique par moulage, utilisée pour la fabrication de notre dispositif microfluidique, consiste à utiliser le moule fabriqué par photolithographie pour faire des puces en PDMS. Le PDMS est un polymère thermo-réticulant dont le plus utilisé est le Sylgard 184 de *Dow chemical*. La base (oligomère) et l'agent réticulant sont fournis séparément. Ils sont mélangés généralement à une proportion de 10 masses de base pour une masse d'agent réticulant (rapport base/agent réticulant de 10:1). Le mélange est ensuite versé sur le wafer au-dessus des motifs. Le tout est placé à 70°C pendant 1h pour la polymérisation du PDMS. En durcissant le polymère va reproduire les motifs avec une précision de l'ordre du μm sans se lier au moule, ce qui permet ensuite un décollage simple. Il en résulte un polymère solide, transparent et légèrement élastique contenant à sa surface le négatif du moule (Figure 10).

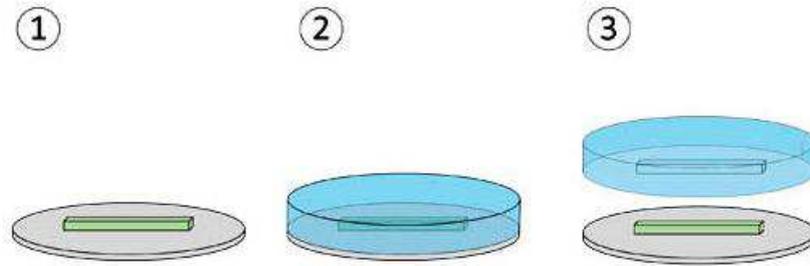


Figure 10 : Schéma de la réplcation par moulage
1) Moule 2) Dépôt du PDMS liquide 3) Séparation après réticulation⁵⁵

2.3.3 Collage ou scellage

Après le décollage, le PDMS forme à sa surface des canaux et chambres de réactions microfluidiques ouverts. Le collage vient compléter et donnera des canaux et chambres de réaction fermés. Le collage peut se faire de manière réversible ou irréversible. Une méthode de scellage réversible consiste uniquement à mettre en contact le PDMS à une surface plane (verre, PDMS). En effet des liaisons de Van der Waals vont se former et établir un contact étanche. C'est une méthode collage simple qui ne nécessite pas de traitement de la surface et se fait à température ambiante.

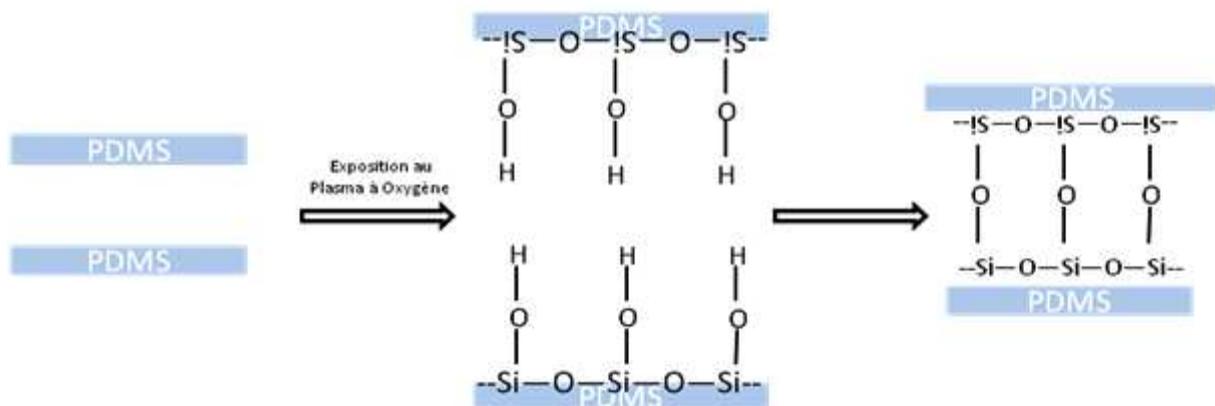


Figure 11 : Scellage irréversible de 2 morceaux de PDMS après exposition au plasma à oxygène

Pour un contact irréversible, le PDMS (ou le verre) doivent être exposé au plasma à oxygène au préalable. La surface du PDMS, une fois traitée au plasma d'oxygène, peut se lier de manière irréversible à un autre morceau de PDMS, de verre, de silicone ou de polyéthylène si ces derniers sont aussi traités au plasma d'oxygène (Figure 11).

3.3.4 Avantages et inconvénients du PDMS

Le premier avantage du PDMS est sa capacité à reproduire les motifs d'un moule à une précision de l'ordre du micron. Il reste liquide à température ambiante et ne nécessite pas une très haute température pour sa polymérisation. La polymérisation se fait à 70°C pendant une heure, ce qui donne un polymère solide transparent et facilement séparable du moule. La réplcation par moulage en utilisant le PDMS se fait donc rapidement et ne nécessite pas de lourdes installations. Le PDMS présente beaucoup

d'avantages du point de vue de la fabrication et de ses propriétés. Cependant, les caractéristiques de sa surface peuvent poser un certain nombre de problèmes vis-à-vis de certaines applications comme l'analyse des protéines (Tableau 4).

Les propriétés uniques du PDMS viennent de la combinaison d'une ossature en siloxane inorganique et de groupes organiques méthyl liés au silicium. La formule chimique du PDMS est : $\text{CH}_3[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, n étant le nombre de répétition du monomère. Il est utilisé dans l'industrie agro-alimentaire, cosmétique et biomédicale. Pour les applications microfluidiques, il est vendu en kit composé de la base qui est du PDMS liquide (n faible) et de l'agent réticulant qui est un mélange de complexe de platine et copolymère de methylhydrosiloxane et dimethylsiloxane. Une fois ces composants mélangés et chauffés à 70°C pendant une heure, le mélange liquide de départ devient solide. La polymérisation se fait suite à la réaction entre les groupes vinyle ($\text{SiCH}=\text{CH}_2$) et hydrosilane (RRR-SiH). Lors de sa réticulation, le PDMS épouse les motifs d'une surface plane ou non plane ayant des structures complexes. Sa faible densité d'énergie surfacique est un avantage car elle facilite la séparation du PDMS du moule après la réticulation.

Tableau 4 : Avantages et inconvénients de l'utilisation du PDMS (PolyDimethylSiloxane)

Etapes	Avantages	Inconvénients
Fabrication	<ul style="list-style-type: none"> Bas coût Elasticité Faible densité surfacique d'énergie Stabilité chimique (ne réagit pas avec le moule) Non hygroscopique (pas de gonflement dû à l'humidité) Stabilité thermique (>186°C) Faible conductivité thermique Collage avec le verre ou du PDMS (Scellage des canaux et chambres microfluidiques) 	<ul style="list-style-type: none"> Matière molle (ratio H/L limité 0.2–20, 0.5–200, and 0.5–200 μm,) Précision (Elasticité et expansion thermique empêche d'atteindre une plus grande précision du type nanofabrication)
Application	<ul style="list-style-type: none"> Perméabilité aux gaz Transparent en dessous de 300 nm (Intégration méthode de détection optique) Modifications des propriétés de surface Elasticité 	<ul style="list-style-type: none"> Hydrophobicité de la surface Non compatibilité avec certains solvants non polaires Faible conductivité thermique

3.3.5 Traitement de surface

Le PDMS est aujourd'hui le polymère le plus utilisé notamment pour les applications biologiques. La biocompatibilité, la transparence et la perméabilité aux gaz du PDMS en ont fait un matériau de choix pour les applications en biologie cellulaire et moléculaire⁵³. Cependant, la surface du PDMS est hydrophobe par défaut. Ce qui entraîne des rétentions par interaction hydrophobe d'un certain nombre de biomolécules comme les protéines. Il est donc important de réaliser un traitement de surface de manière à atténuer la rétention hydrophobe qui peut être importante vu le rapport surface/volume des dispositifs microfluidiques. Les techniques de modification de surface du PDMS peuvent être divisées en 2 catégories : les modifications physiques consistant à saturer la surface du PDMS avec une molécule par interaction hydrophobe ou électrostatique et les modifications covalentes.

Le traitement de surface par adsorption physique est très utilisé dans le domaine de l'électrophorèse capillaire notamment pour la suppression du flux électroosmotique ou pour atténuer l'adsorption des protéines sur les parois des micro-canaux. L'exemple le plus répandu est la saturation des parois hydrophobes avec la BSA (Albumine de sérum bovin) du fait de la simplicité du protocole. D'autres protéines comme l'avidine peuvent aussi être utilisées pour rendre les parois hydrophiles⁵⁶. Cependant, cette approche n'est pas très adaptée pour les dispositifs microfluidiques destinés à l'analyse des échantillons protéiques complexes avec la spectrométrie de masse comme méthode de détection. Ces protéines n'étant pas irréversiblement liées de façon covalente, la protéine utilisée pourrait être libérée durant l'analyse. Elle pourrait alors saturer l'échantillon et masquer les protéines d'intérêt au niveau de la détection par spectrométrie de masse. Pour éviter cela, des polymères ou des tensioactifs peuvent être utilisés à la place des protéines. Les tensioactifs sont des molécules possédant une extrémité hydrophobe (ou apolaire) et une extrémité hydrophile (ou polaire). Elles sont retenues par interaction hydrophobe sur la paroi tandis que l'extrémité hydrophile permet ensuite de réduire les interactions hydrophobes avec les protéines. Les surfactants choisis devront être compatibles avec la spectrométrie de masse. Le DDM (n-dodecyl- β -D-maltoside) a été utilisé pour traiter la surface du PDMS pour le rendre hydrophile et réduire considérablement la rétention du BSA et de l'avidine incubé pendant 5 minutes dans un canal microfluidique⁵⁷. Le Tween 20 et certains poloxamères fluorés F68 et F127 (Pluronic) permettent de réduire la rétention non spécifique des protéines jusqu'à 80% après une adsorption à 20°C pendant 24h⁵⁸.

Il est possible d'activer la surface du PDMS par exposition au plasma d'oxygène, UV/ozone ou à une décharge corona. Le plasma d'oxygène est l'une des approches les plus utilisées. Il contient des espèces chimiques de très haute énergie comme des électrons, des ions et des radicaux qui vont fortement oxyder les espèces organiques (groupe méthyl) de la surface. Exposer la surface du PDMS à un plasma d'oxygène permet de la rendre hydrophile ($\text{SiMe} \Rightarrow \text{SiOH}$) du fait de la présence de groupe silanol $\text{SiOH} \Rightarrow \text{SiO}^- + \text{H}^+$. Cependant, la surface du PDMS traité uniquement par exposition à un plasma d'oxygène ne reste pas longtemps hydrophile ; au bout de 30 minutes elle recouvre 50% environ de son hydrophobicité. Maintenir la surface du PDMS traité en contact avec de

l'eau milli-Q permettrait de la garder hydrophile plus longtemps⁵². Il est aussi possible de profiter de la réactivité des silanols générés par le plasma pour fonctionnaliser la surface du PDMS. Cette étape d'activation appelée aussi oxydation est préalable à la mise en place de couches auto-assemblées (*Self assembled monolayer*). La surface du PDMS traitée avec du plasma peut être maintenue hydrophile par exposition au PEG (polyEthylène Glycol) silane pendant 2h⁵⁹. Le traitement de surface du PDMS peut aussi se faire après le collage (fermeture des canaux). Passer une solution acidifiée d'eau oxygénée dans les canaux microfluidiques fermés permet de les oxyder et d'activer la surface du PDMS hydrophile. Elle peut ensuite être fonctionnalisée par salinisation puis recouvert avec le PEG⁶⁰.

3.4 Couplage à la spectrométrie de masse

Il est aussi possible d'ajouter un tip à la puce pour son couplage à la MS⁶¹. Cette approche est très adaptée aux puces fabriquées en PDMS. Le couplage le plus simple reste par ailleurs le fait d'utiliser le prolongement du micro-canal comme une source ESI en prenant le soin d'intégrer une microélectrode dans la puce pour l'application du voltage⁶².

Les plateformes microfluidiques destinés à la protéomique intègrent rarement des moyens de détection directs. Ceci s'explique par la complexité des échantillons protéiques qui ne peuvent être analysés par les moyens de détection intégrés classiques. Un échantillon complexe comme un extrait protéique total de cellule de levure est caractérisé par un grand nombre de protéine de taille et de concentration très variables. Par ailleurs, contrairement à l'ADN, il n'existe pas encore de technique d'amplification des protéines. Une grande sensibilité de détection est donc nécessaire pour analyser les protéines de faible abondance⁶³. L'option de couplage du dispositif microfluidique à un spectromètre de masse est en général celle qui est retenue afin de pouvoir bénéficier d'une sensibilité de détection ainsi qu'une grande gamme dynamique pour la détection et la quantification du plus grand nombre de protéine. Des approches ont ainsi été développées pour coupler les puces microfluidiques directement à la MS⁶¹. Ce couplage direct permet d'éviter une manipulation manuelle des peptides ou protéines issus d'un protocole miniaturisé avant leur analyse en MS. Des méthodes ont été développées pour coupler les puces microfluidiques aussi à une source ESI qu'à une source MALDI.

3.4.1 Couplage à une source MALDI

Les plateformes microfluidiques peuvent être couplés aux sources ESI et MALDI. Le couplage avec une source MALDI ne se fait qu'en mode *off-line* (hors ligne) car les protéines ou peptides doivent être co-cristallisés avec une matrice absorbant l'énergie du laser incident. Le couplage avec le MALDI présente l'avantage d'être plus tolérant aux contaminants comme le sel. Le caractère hors ligne permet aussi d'éviter les problèmes d'incompatibilité entre les solvants utilisés dans la puce et la spectrométrie de masse. Des dispositifs microfluidiques permettant d'effectuer des étapes de préparation d'échantillon, réactions protéolytiques, préparation et dépôt sur des cibles MALDI intégrées ont été développés. Gustafsson et al., ont mis au point un dispositif microfluidique en forme de CD dans le but de dessaler les peptides issus d'une digestion en utilisant de la phase inverse

intégrée à la puce. L'éluion des peptides et le dépôt de matrice se font directement sur un réservoir ouvert intégré à la puce et donc accessible au laser de la source MALDI⁴³. Cependant la plupart des puces microfluidiques sont dotées de canaux fermés et donc inaccessibles au laser. Plusieurs approches ont été mises en place pour coupler les canaux microfluidiques fermés à la source MALDI. Cependant, ces solutions sont généralement difficiles à mettre en œuvre.

3.4.2 Couplage à une source électrospray (ESI)

Les meilleures performances de la protéomique par spectrométrie de masse sont atteintes par l'approche chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse par la source nanospray⁶⁴. Vu les similarités qu'il ya entre le HPLC et les puces microfluidiques (débit, linéarités), le nanospray est l'approche la plus adaptée pour un couplage robuste entre la microfluidique et la spectrométrie de masse. De ce constat sont nés plusieurs développements visant à trouver la meilleure configuration pour ce couplage. Les méthodes de couplage entre dispositifs microfluidiques et spectromètre de masse peuvent être classées en 3 catégories : spray à partir du canal microfluidique directement, spray à partir d'un tip conventionnel intégré à la puce et enfin spray à partir d'un tip micro-usiné (Tableau 5 et Figure 12)⁶⁵. La qualité du spray dépend du matériau dont la surface externe doit être hydrophobe pour limiter la mouillabilité et éviter la dispersion du liquide. Par ailleurs de meilleures performances sont observées avec des tip ayant une forme conique. Une alternative est d'intégrer un tip conventionnel directement à la puce³⁹.

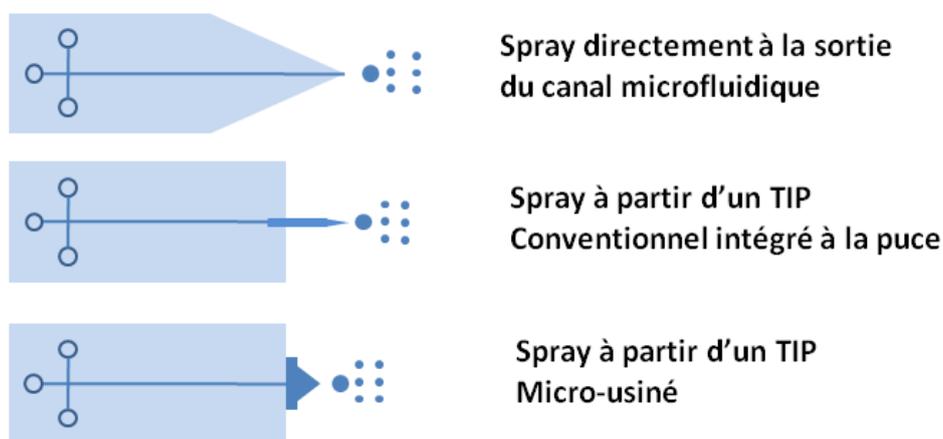


Figure 12 : Approches de couplage de dispositifs microfluidiques à la MS par électrospray

Spray direct : c'est le couplage le plus simple. Il consiste à utiliser le prolongement du micro-canal comme une source ESI en prenant le soin d'intégrer une microélectrode dans la puce pour l'application du voltage⁶². Ce dernier possède une surface hydrophobe. C'est aussi un polymère qui peut être facilement découpé pour obtenir une forme conique. Cependant, cette approche produit un spray instable et est peu sensible. Ces contre performances sont souvent dues à un matériau (hydrophile) et une géométrie (non-conique) inadaptés. Wang *et al.*, ont opté pour un couplage direct et un spray à partir du bord de la puce. Le matériau de la puce étant hydrophile, la sortie du canal microfluidique a été recouverte avec un polymère hydrophobe le polytetrafluoroéthylène (PTFE)⁶⁶.

TIP conventionnel intégré : l'utilisation d'un composant externe, inséré à la puce microfluidique pour servir d'émetteur électrospray est une bonne alternative face aux faibles performances du spray direct. L'émetteur externe peut être une fibre microstructurée ou un simple capillaire. L'utilisation d'un capillaire doté d'un revêtement avec des particules d'or a permis le couplage d'une unité de digestion sur puce à la MS⁶⁷. Cette approche présente une sensibilité satisfaisante mais elle est caractérisée par un volume mort entraînant une perte de résolution pour les puces intégrant une unité de séparation.

TIP micro-usiné : les meilleures performances du couplage d'une puce microfluidique à la MS sont obtenues avec les TIP micro-usinés directement à la sortie de la puce en choisissant la forme géométrique et le matériau les plus adaptés. Cette approche est cependant peu répandue du fait des exigences nécessaires à sa fabrication. Le couplage entre une puce et la MS repose essentiellement sur l'intégration d'un émetteur avec un voltage élevé sans ou avec un très faible volume mort⁴¹. Un protocole d'intégration d'un tip conventionnel à une puce microfluidique sans volume mort est proposé par Dietze *et al.*, il consiste à aligner le masque optique et le capillaire émetteur sur la résine photosensible en amont de la polymérisation⁶⁸. Si un polymère hydrophobe comme le PDMS est utilisé pour la fabrication de la puce et du tip, il n'est pas nécessaire de traiter la surface externe du tip⁶⁹. La plupart des approches proposées n'offre pas de résultats leur permettant de rivaliser avec les méthodes conventionnelles.

Tableau 5 : Approches de couplage des dispositifs microfluidiques à la spectrométrie de masse

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Spray à partir d'un micro-canal	Facile, rapide	Instabilité, Dispersion du volume, Sensibilité faible, perte en résolution
TIP conventionnel intégré	Sensibilité	Volume mort, perte en résolution
TIP micro-usiné	Pas de volume mort, spray stable	Fabrication complexe, besoin d'une salle blanche