



HAL
open science

Préconcentration sélective immunologique en nanofluidique : vers l'identification rapide d'agents du risque biologique

Anne Claire Louer

► **To cite this version:**

Anne Claire Louer. Préconcentration sélective immunologique en nanofluidique : vers l'identification rapide d'agents du risque biologique. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112150 . tel-00876894

HAL Id: tel-00876894

<https://theses.hal.science/tel-00876894>

Submitted on 25 Oct 2013

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : STITS
Laboratoire de Photonique et de Nanostructures

DISCIPLINE PHYSIQUE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenu le 12/09/2013

par

Anne-Claire LOUËR

Préconcentration sélective immunologique en
nanofluidique: vers l'identification rapide
d'agents du risque biologique.

Directeur de thèse :

Anne-Marie HAGHIRI-GOSNET

Directrice de recherche (LPN-CNRS)

Composition du jury :

Président du jury :

Rapporteurs :

Examineurs :

Claude DESLOUIS

Claire SMADJA

Pascal KLEIMANN

Christophe VIEU

Directeur de recherche hors classe

Professeur des universités

Maître de Conférences

Professeur des universités 1ère classe

Table des matières

Remerciements	5
Introduction générale	10
1 Microfluidique et menace biologique	13
1.1 Microfluidique et “lab-on-a-chip” (LOC)	13
1.1.1 Miniaturisation et micro/nanotechnologies	13
1.1.2 Microfluidique : historique et applications, vers les labora- toires sur puce	16
1.1.3 Enjeux des laboratoires sur puce	21
1.1.3.1 Etape de séparation	21
1.1.3.2 Etape de détection	24
1.1.3.3 Limite de détection (LOD) et limite de quantifica- tion (LOQ)	30
1.2 Armes et menaces biologiques	32
1.2.1 Agents de la menace biologique	34
1.2.2 Macrosystèmes de détection de la menace biologique	35
2 Electropreconcentration et séparation sur puce	37
2.1 Electrophorèse capillaire et flux mis en jeu	38
2.2 Electrophorèse dans des nanocanaux	45
2.2.1 Etat de l’art de la preconcentration en nanofluidique	50
2.2.2 Principe de l’electropreconcentration à travers un nanocanal	56
2.2.2.1 Effet de polarisation de la concentration ionique	56
2.2.2.2 4 régimes de focalisation	59
2.2.2.3 Electropreconcentration assistée en pression : vers une sélectivité de la localisation du point focal	64
3 Fabrication des puces fluidiques et expérimentations	69
3.1 Fabrication de puces “tout verre”	71
3.2 Expérimentations	75
3.2.1 Principe d’une expérience de preconcentration	75
3.2.2 Banc automatisé d’expérimentations	76
3.2.3 Description d’une expérience pas à pas	78
3.2.3.1 Préparation de la puce microfluidique	78
3.2.3.2 Lancement d’une expérience	79

3.2.3.3	Traitement des données	80
3.2.3.4	Automatisation du traitement	85
4	Electropréconcentration assistée en pression de la fluorescéine	89
4.1	Electropréconcentration conventionnelle	92
4.1.1	Premières observations expérimentales	92
4.1.2	Prédictions théoriques	93
4.1.3	Résultats expérimentaux	98
4.2	Electropréconcentration assistée en pression	105
5	Electropréconcentration assistée en pression de la BSA	109
5.1	Modèle de l'électropréconcentration classique	111
5.2	Electropréconcentration assistée en pression et influence du couple temps-champ électrique (t,E)	113
5.3	Paramètres déterminants pour l'état stationnaire	118
5.3.1	Positions et largeurs des pics de préconcentration	118
5.3.2	Taux de préconcentration : le rôle du champ électrique	124
5.4	Rôle de la pression	128
5.5	Limites du modèle	136
5.5.1	Reproductibilité de la hauteur de la nanofente	136
5.5.2	Propreté des puces	138
5.5.3	Charge de surface initiale	140
6	Perspectives du travail de thèse	142
6.1	Etudes supplémentaires possibles sur les dispositifs actuels	142
6.1.1	Influence des dimensions du nanocanal	142
6.1.2	Modifications de la charge volumique de surface (VSC)	144
6.2	Remplacement de la nanofente par une membrane Nafion : vers une autre méthode de contrôle de la VSC	146
6.2.1	Définition du Nafion	146
6.2.2	Etat de l'art de la préconcentration à l'aide d'une membrane Nafion	148
6.3	Utilisation de la méthode pour les immunoessais	151
6.3.1	Définition d'un immunoessai	151
6.3.2	Intéraction antigène-anticorps	153
6.3.3	Structure MNM : un outil de diagnostic pour les immunoessais	154
	Conclusion générale	156
A	Systèmes macroscopiques actuels pour la détection de la menace biologique	158
A.1	Eléments déclencheurs : compteurs de particules et indicateurs de biomasse	158
A.2	Systèmes de collecte	160
A.3	Systèmes d'identification	161
A.4	Systèmes 2 en 1 : collecte et identification en un seul dispositif	163

TABLE DES MATIÈRES

B Codes Matlab	164
B.1 Lancement des expériences	164
B.1.1 Code de l'interface graphique	165
B.1.2 Fonction appelée par l'interface graphique	178
B.2 Création des profils de préconcentration	184
B.3 Création de tous les graphiques obtenus dans ce manuscrit	185
B.4 Création des graphes 2D de l'évolution de la préconcentration maximale	186
C Electropréconcentration assistée en pression de la BSA à $\Delta P=0,5$ bar	187

Remerciements

Bonjour et merci, ô toi lecteur, qui prend le temps de lire ce manuscrit (ou tout du moins les remerciements qui sont, je dois bien l'avouer, le plus sympa à lire). Pour commencer tout en douceur je vais te conter ici quelques remerciements destinés à toutes les personnes sans qui ce manuscrit n'aurait jamais vu le jour, tant pour des raisons scientifiques qu'humaines.

Mes premiers remerciements iront tout d'abord aux membres de **mon jury** qui ont accepté de lire, de s'intéresser (du moins je l'espère) et de juger mon travail de thèse. Naturellement, la deuxième personne que je tiens à remercier est ma responsable de thèse, **Anne-Marie**, qui m'a accompagnée tout au long de ces trois années et qui a toujours été présente même dans les moments difficiles. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir fait entièrement confiance dans ce projet qui a été le nôtre. Merci d'avoir toujours pris la peine de dégager du temps quand j'en avais besoin malgré ton emploi du temps surchargé de directrice de groupe. Groupe que je tiens d'ailleurs à saluer puisque c'est avec lui que j'ai travaillé, évolué et grandi : **le groupe Nanoflu**. Un grand merci aux permanents : **Charlie, Dominique, Antoine, André, Jean-Christophe et Gilgueng**. Jean-Christophe et André (good cop / bad cop), comment aurais-je fait sans votre aide initiatrice au tout début de ma thèse, vos conseils scientifiques, vos cours de Matlab (ah Matlab, j'en aurais bien bavé!), votre aide régulière jusqu'au bout, jusqu'aux répétitions de la soutenance? Vous m'avez apporté énormément scientifiquement et vous faites partie de ces (rares) scientifiques que j'admire. C'est dans cette catégorie qu'apparaît aussi **Adrien**. Toi qui a été à l'initiative de ce projet de thèse pendant ton propre doctorat, ce fût un réel plaisir de discuter avec toi et de profiter de ton savoir et de ton expérience. **Antoine**, toi aussi ton aide a été extrêmement précieuse. Bien que tu n'aies pas été Nanoflu à plein temps, tu n'as jamais hésité à prendre du temps pour résoudre mes problèmes et tu as été plus qu'efficace dans la relecture de mon manuscrit alors que rien ne t'y obligeait. Mais en plus de ça, je n'oublierais jamais tous les moments "non scientifiques" qu'on a partagé, ton second degré (qui monte bien vite au millième degré), ton optimisme à toute épreuve, ton humour bien souvent sarcastique mais tellement drôle, les flippers chez Nacer, et j'en passe! Qui plus est, tu fais partie du "noyau initial" qui m'a intégré au groupe et au labo. Comment oublier notre première virée au bar de Nozay (la première semaine de mon stage de fin d'étude) où tu as commandé ... un thé à la menthe. Souvenir qui m'amène d'ailleurs à avoir une grosse pensée pour le reste de ce petit groupe de départ composé à l'époque de trois thésards : **Guillaume, Seb et Clément**.

C'est vous qui m'avez donné l'envie de rester en thèse après mon stage et qui avez commencé à remplir ce catalogue de souvenirs inoubliables. Je n'oublie pas non plus tous mes autres petits camarades non permanents anciens et actuels : **Ludivine** (bien que n'étant pas réellement une Nanoflu j'étais ravie de te voir à chaque visite!), **Syrine, Léa, Karima, Sébastien A., Joni, Zaïd, Leila, Morgane...** et tous ceux que ma mémoire vacillante aurait omis. Une mention très spéciale revient à mon petit thésard préféré, gendre idéal aux yeux de ma maman, sosie de Dawson à ceux de mon beau père, j'ai nommé bien évidemment **Hugo**. Je t'ai pris sous mon aile quand tu as débarqué tel un petit oisillon avec tes croissants, après un long périple en Daniel Meyer (qu'il faut d'ailleurs que je remercie aussi pour avoir assuré mon acheminement chaque jour de cette thèse jusqu'au fin fond de Marcoussis). Tu as ensuite pris ton envol et tu es maintenant un beau faucon, un peu maladroit et tête en l'air mais toujours optimiste, plein d'énergie, d'humour et de bonne volonté.

En plus de ce groupe qui a été le mien pendant trois ans, j'ai eu la chance d'évoluer au sein d'un laboratoire rempli de personnes remarquables. Commençons tout d'abord par le service incontournable du LPN, à qui toute personne a forcément affaire : *l'administration*. Les scientifiques ont un peu trop souvent tendance à l'oublier mais il est évident que sans vous rien ne fonctionnerait. Merci donc aux deux directeurs de laboratoire que j'ai connu, **Jean-Yves et Dominique** (promis je reste dans les parages, tu pourras donc continuer à me traquer), aux deux secrétaires de direction qui se sont succédées, **Dorothée** (mamie, jamais je n'oublierais nos jeux, nos discussions philosophiques, nos pique-niques et nos pauses) et **Sandrine** (ta bonne humeur quotidienne est tellement agréable), à la gestionnaire **Agnès** (toujours tellement gentille, diplomate et présente) ainsi qu'à **Patrick** et à mes trois secrétaires favorites : **Marina, Melissa et Joëlle**. C'était tellement agréable d'avoir des discussions normales de chaussures, de sacs à main et de régime avec vous, même si ça rendait dingues les hommes de *l'atelier mécanique*. D'ailleurs venons-en à ces messieurs qui m'ont tant fait rire en plus de m'aider dans la conception de mes dispositifs expérimentaux. Un grand merci au doyen **Gilbert** (dit Gilou, parti couler des jours heureux à la retraite), au plus sérieux **Nicolas** (bien que ce soit seulement au premier abord), à mon gros bouchon **Olivier** et à mon petit mécano préféré **Seb**. J'ai passé des moments forts agréables et divertissants avec vous ainsi qu'avec **Eric B.** et, plus récemment, **Adrien**. Un troisième service doit être cité à ce niveau, j'ai nommé le fameux *service informatique*. Et bien sûr je ne peux faire autrement que commencer par une personne qui m'est très chère à savoir **Eric** (papy). Bien que tu sois parti au milieu de ma thèse, tu es sans doute l'une des personnes qui m'aura le plus marquée. De plus (et c'est important quand même), ta compétence informatique n'est plus à prouver. Cependant, après ton départ, il a fallu que je me débrouille sans toi et je me suis alors tourné vers les autres membres du SI : **Olivier, Lorenzo, Mehdi et Alain**. Pour finir avec les services du laboratoire il me faut bien sûr évoquer *la centrale technologique* du LPN et plus largement tous les gens avec qui j'ai travaillé en salle blanche. L'ensemble de ces personnes assure non seulement le bon fonctionnement

de la salle blanche mais le font surtout dans une atmosphère conviviale et presque festive. Il va sans dire que pendant les moments difficiles de ma thèse je ne pouvais pas trouver meilleur endroit pour décompresser et me changer les idées qu'avec vous, à la fabrication de mes puces en verre en salle blanche. La liste est bien longue alors sans plus tarder je remercie donc **Laurent** (maître de la métallisation), **Xavier** (alias yéyé, j'espère qu'on continuera nos longues discussions philosophiques, cinématographiques et tout ce qui peut finir en ique), **David** (tu continueras à me ramener en voiture à Massy de temps en temps ?), **Christian** (Cricri, j'adore tellement ton franc parler et tes coups de gueule, je vais prendre exemple sur toi), **Christophe R.** (sans doute le premier de tous ces noms avec qui j'ai tissé des liens), **Mr D.** (ah les longues discussions durant lesquelles tu m'as fait profiter de ta grande expérience de la vie et de ta jeunesse très sage, quand tu ressemblais à Bruce Willis), **Edmond** (désolé d'avoir squatté ton bureau si souvent), **Nathalie et Olivia** (la scie nous en aura fait voir de toutes les couleurs), **Stéphane** (maître du self défense, méchant bonhomme avare de compliment mais personne tellement intéressante), **Jean-Claude, Ali, Laeticia, Kamel, Sophie, Antonella, Anne.** . . Mais bien sûr, quand je pense salle blanche je pense avant tout à une personne qui m'a énormément apportée au cours de ces dernières années et à qui je dois beaucoup, **Luc.** Je me souviens encore de la première fois où on s'est rencontré, à la formation salle blanche, avec ton accent et la fameuse blague du pastis. Tu m'as tout de suite semblé si gentil et je ne m'étais pas trompée, la suite nous l'a prouvé. Merci pour tout. . .

Bien-sûr, j'ai eu l'occasion de croiser dans les couloirs du LPN d'autres personnages qu'il me faut impérativement citer. Tout d'abord, j'aimerais remercier les jeunes demoiselles avec qui j'ai partagé un bureau au cours de cette dernière année, **Lina et ma petite Xuanie.** Ce fût un réel plaisir les filles et vous allez me manquer au quotidien (en particulier le "rangement particulier" de Xuan). Je vais aussi citer une tribu rivale quant à l'occupation du territoire en salle blanche et de la cantine le midi à savoir les "Phydis". Même si il est clair que les Nanoflu sont plus forts que vous, je vous remercie de votre présence et des rapports cordiaux que nous avons entretenus : **Nicolas, Clément, Emilie(s), Christelle et Inès** (attention je te surveille, ne t'approche pas trop de ma nouvelle tribu. . .). Et d'ailleurs parlons-en de cette tribu, mon avenir, **Klearia.** Je ne peux que me réjouir et me hâter de travailler avec vous et de m'épanouir dans l'amitié que l'on partage. Je suis ravie de pouvoir continuer à vous confectionner de bons petits gâteaux, de retrouver enfin ma place dans le bureau avec vous, de faire de longs footings le midi en votre compagnie (du moins au début), de voir grandir vos petites familles, bref de partager ma vie avec vous. On va faire une super équipe j'en suis persuadée. **Clément, Guillaume et Greg,** préparez-vous, j'arrive!!!!

Avant de conclure, je voudrais remercier ma famille et mes amis qui étaient là bien avant la thèse et qui ne se sont pas enfuis depuis. **Ma maman, mon papa, mon beau père, ma demi-soeur, ma sœur adorée et mon beau frère chéri ainsi que mon bébé chat Heaven,** je vous aime et je vous remercie de m'avoir

soutenue et supportée dans tout ce que j'ai toujours entrepris. Mes amis, vous qui avez suivi cette thèse de loin (il faut dire que ce n'est pas le sujet de discussion le plus intéressant pendant les soirées...) mais qui m'avez toujours encouragée et félicitée, merci... **Céline, Laurie, Maud, Enis, Tino, Adil, Valou, Nanou, Aurélie, Delphine, Aurélia, Camille** et je vais m'arrêter là sinon on y est encore dans 20 pages mais ils se reconnaîtront.

Enfin, il m'est très difficile de terminer ces remerciements et de choisir qui évoquer en dernier. C'est pourquoi j'aimerais décrire la reconnaissance, l'estime, la joie et l'admiration que j'éprouve à l'encontre de trois personnes. Ces trois personnes ont constitué les piliers, la base de mon univers et de mon bien être pendant cette thèse. Tout d'abord, **Clément**. Tu es LA personne à l'origine de tout. Tu m'as encadrée pendant mon stage, tu m'as donnée l'envie de reprendre ton sujet de thèse, tu m'as soutenue pendant toute la durée de ce doctorat et tu m'as finalement donnée l'opportunité de faire mes preuves dans ton projet. Tu es petit à petit devenu un modèle, une sorte de mentor dont j'admire le parcours mais aussi un ami, particulièrement cher à mes yeux. Je ne saurais jamais assez te remercier de tout ce que tu as fait pour moi, même sans le savoir, et j'espère pouvoir en faire tout autant pour toi. J'espère aussi avoir l'occasion de voir grandir ta princesse et de me réjouir peut être aussi un jour de l'arrivée d'un petit prince. Je te remercie aussi pour avoir amené dans ma vie celui qui représente mon deuxième pilier, **Guillaume**. J'avais déjà bien entamé ma thèse quand tu as débarqué dans l'équipe et je ne pensais pas pouvoir rencontrer une nouvelle personne à laquelle je m'attacherais autant. Et pourtant tu es arrivé, avec ton petit air et ton sourire timides. Au fur et à mesure du temps, tu t'es révélé et j'ai découvert un homme intelligent, sensible, drôle et gentil. Et puis, après ce qui était au départ une blague, tu es devenu une personne que j'avais absolument besoin de compter parmi mes amis. Et aujourd'hui tu es finalement mon meilleur ami, mon chouchou, mon petit Polochon et j'espère que tu le resteras très longtemps (Friends Forever...). C'est marrant comme la vie nous réserve des surprises comme ça parfois et toi tu es la plus belle surprise de cette thèse... Comme on dit : Last but not least (c'est de l'anglais, ça va tu comprends?), ce n'est pas parce qu'on arrive en dernier qu'on passe en dernier et tu en es la preuve à mes yeux. Enfin, le troisième membre de ce trio de choc ... **Elsa**. Que dire sur toi que tu ne saches déjà et que le monde entier (ou au moins le LPN) ne sache déjà. Sans toi il est quasiment sûr que je ne serais pas parvenu au bout de cette thèse. Sans nos longues discussions, nos apéros, nos pauses dans le nid, nos repas à la Sodexo, nos fous rires et nos blagues sur tout ce qui bouge, nos combats en salle blanche contre les Phydys... J'ai été ravie de partager ces trois années avec toi et j'espère sincèrement que la fin de la thèse ne marquera pas la fin de notre amitié et de notre complicité, mais je suis sûre que c'est impossible. Tous les trois, que vous le vouliez ou non, vous avez été mon roc et pour ça je vous dis simplement merci...

Plus la science avance, plus le mystère s'épaissit
- J. Kauffmann -

A mon modèle et mentor scientifique, à toi Clément.

Introduction générale

La nanofluidique est l'étude du transport de molécules au travers de nanostructures filtrantes dont la taille avoisine l'épaisseur de la double-couche diffuse à la surface du verre. A cette échelle de la centaine de nanomètres, la charge de surface, qui induit une exclusion des ions négatifs à l'extérieur du "nanofiltre", produit un effet de rétention des biomolécules. Si les membranes nanoporeuses, de par leur perméabilité biologique et ionique, ont été les premières utilisées comme filtres sélectifs, des études menées sur le transport électrocinétique au sein d'un nanocanal unique ont permis de montrer qu'il était théoriquement possible de concentrer des solutions, même fortement diluées, avec des taux élevés (jusqu'à 10^3) grâce à un effet de concentration de polarisation. Ce phénomène pourrait être exploité dans de nombreuses applications de diagnostic médical (analyses rapides et précoces d'échantillons bruts), de contrôle qualité (agroalimentaire) ou encore de défense (suivi continu de zones à risques pour la menace terroriste biologique).

La modélisation de la dynamique des phénomènes d'électropréconcentration (sous champ électrique) et de rétention (sous gradient de pression) d'un nanocanal unique s'avère extrêmement ardue. Une multitude d'observations, souvent contradictoires quant au profil de préconcentration obtenu, ont été par ailleurs rapportées dans la littérature, avec des points focaux de préconcentration observés parfois du côté anodique parfois du côté cathodique pour une même protéine. Certaines expériences observent ces points focaux soit très loin en amont dans le microcanal réservoir soit directement à proximité de l'entrée du nanocanal. C'est dans ce contexte qu'a été développé précédemment un modèle unidimensionnel permettant de prédire le profil de concentration de l'analyte en tout point de la structure MNM(Micro/Nano/Microcanal) proposée. Ce travail de modélisation a démontré l'existence de quatre régimes distincts : deux régimes coté anodique et deux régimes coté cathodique, plus ou moins éloignés du nanocanal. Ce modèle a mis en avant la sélectivité de ce processus vis-à-vis de la mobilité électrophorétique et de la valence des analytes préconcentrés, et il a permis d'appréhender un peu mieux la diversité des expériences rapportées. Cependant, le régime de préconcentration obtenu dépend du bioanalyte étudié. Il serait pourtant intéressant de ne plus être tributaire des caractéristiques intrinsèques de la solution analysée et de ne plus subir le régime obtenu mais, au contraire, d'effectuer ce que l'on pourrait appeler une électropréconcentration sélective du dit analyte. Ceci pourrait permettre d'effectuer deux étapes primordiales de tout diagnostic que sont la séparation et la préconcentration d'un mélange. Pour ce faire, nous avons introduit un paramètre

expérimental, une composante hydrodynamique (ou surpression), en sus du champ électrique, pour moduler la localisation de la préconcentration.

A l'aide d'une technologie "tout verre" récemment brevetée, nous élaborons aujourd'hui des puces intégrant une nanofente dans un long microcanal. Ces puces sont parfaitement isolantes, biocompatibles et présentent une tenue exceptionnelle au cours du temps. Elles sont combinées à un banc expérimental "fait maison" complètement automatisé (interfacé avec Matlab), qui permet de contrôler les différents paramètres imposés. Les données recueillies sont ensuite prétraitées par d'autres codes Matlab que nous avons développés. Grâce à ces divers outils, de nombreuses expériences d'électropréconcentration "classique" (champ électrique seul) et assistée en pression ont été réalisées pour deux bioanalytes modèles : la fluorescéine et la BSA (Bovin Serum Albumin). Elles ont permis de déterminer les différents paramètres influant sur la préconcentration de ces deux analytes et de prouver la sélectivité et l'efficacité de la méthode proposée ici. Des régimes de préconcentration inattendus, stables et présentant des taux élevés ont en effet été obtenus au cours de cette thèse.

Ce manuscrit de thèse se compose de six chapitres permettant une étude relativement exhaustive des points que nous venons d'introduire.

- **Le chapitre I** introduit la thématique étudiée et le contexte dans lequel elle s'inscrit afin de mieux comprendre les enjeux du développement d'outils microfluidiques spécifiques. En premier lieu, les concepts de base de la microfluidique et des laboratoires sur puce sont présentés. Puis, dans un second temps, un rapide aperçu de leur utilité dans un cadre de défense (et plus exactement de prévention et d'appréhension de la menace terroriste biologique) est effectué et mène à un panorama des outils de séparation et de détection sur puce. Cela permet au lecteur d'appréhender les objectifs du travail de thèse.
- **Le chapitre II** définit la charge de surface et les flux intervenant dans l'électrophorèse capillaire. Il traite plus précisément du phénomène d'électrophorèse intervenant lors de l'application d'un champ électrique dans une structure particulière appelée structure MNM et composée de deux microcanaux séparés par un nanocanal. Il établit la théorie de l'électropréconcentration et de la séparation de bioanalytes dans une telle structure et dresse un état de l'art des résultats obtenus aujourd'hui grâce à cette réduction nanométrique. Finalement, il introduit l'idée nouvelle proposée dans cette thèse : l'électropréconcentration sélective assistée en pression et permettant de contrôler le régime de préconcentration obtenu.
- **Le chapitre III** détaille le procédé technologique de microfabrication des puces microfluidiques. S'appuyant sur une configuration "tout-verre", cette conception permet l'obtention de puces robustes et durables dans le temps

autorisant l'application souhaitée d'un champ électrique et d'une pression hydrodynamique. Il est ensuite consacré à la description de la plateforme d'expérimentation, véritable outil d'étude de l'électropréconcentration sur puce. Cette plateforme "faite maison" est entièrement automatisée et répond au besoin d'une caractérisation précise, rapide, flexible et complète des phénomènes se produisant au sein de la structure MNM. Le détail d'une expérience d'électropréconcentration y est donné, du lancement de l'expérience au traitement des données en passant par les protocoles mis en place pour assurer les bonnes conditions expérimentales.

- **Le chapitre IV** traite de la préconcentration classique ainsi que de la préconcentration assistée en pression d'un analyte très couramment étudié, la fluorescéine. En se basant sur des simulations effectuées antérieurement à ce travail de thèse et sur des expériences concrètes, il prouve l'utilité de la méthode quant à l'obtention d'une préconcentration efficace et quant à la stabilisation de celle-ci par l'ajout de la pression externe.
- **Le chapitre V** étudie de la même manière les électropréconcentrations d'une molécule, elle aussi beaucoup étudiée : l'albumine de sérum bovin (ou BSA). Il prouve encore l'efficacité de l'introduction du flux hydrodynamique supplémentaire en démontrant la possibilité d'être sélectif dans la localisation du front de préconcentration. Il est en effet possible de choisir le régime obtenu et de s'affranchir de la dépendance de celui-ci aux caractéristiques intrinsèques de l'analyte étudié. Les pics de préconcentration atteints, fonction du temps de l'expérimentation ainsi que du champ électrique et de la pression appliqués, sont remarquablement stables et présentent des taux de préconcentration relativement élevés. La fin de ce chapitre est consacrée aux limites de cette méthode et aux difficultés rencontrées.
- **Le chapitre VI** tente de dresser les perspectives que cette étude permet d'ouvrir. Ainsi, il évoque tout d'abord la possibilité d'utiliser la méthode introduite tout au long de ce travail pour effectuer des immunoessais, petits tests d'analyses rapides effectués directement à partir d'un échantillon brut et permettant de détecter la présence d'une molécule cible. Dans un second temps, il passe en revue un certain nombre de techniques pouvant remplacer le nanocanal tout en conservant les phénomènes qui nous intéressent.

Chapitre 1

Microfluidique et menace biologique

*Toutes les vérités sont faciles à comprendre une fois découvertes,
à nous de les découvrir*

- Galilée -

1.1 Microfluidique et “lab-on-a-chip” (LOC)

1.1.1 Miniaturisation et micro/nanotechnologies

Depuis une quarantaine d’années, le développement des microtechnologies a permis l’extraordinaire évolution de l’électronique et de l’informatique, en démultipliant les performances des composants actuels et en minimisant très fortement leur coût. Au cours des dernières décennies, les outils technologiques développés à l’origine pour la micro-nanoélectronique ont commencé à être appliqués à d’autres domaines, comme, par exemple, celui de la chimie et de la biologie sur puce. Depuis les tout premiers microsystemes biologiques, appelés biopuces (regroupant les puces à ADN et les puces à protéine), on observe aujourd’hui un développement des micro-nanosystemes sur puce aux applications extrêmement variées.

Tous ces dispositifs ont toutefois une origine commune : s’ils ont pu voir le jour, c’est grâce à la miniaturisation. La miniaturisation est à l’origine des propriétés spécifiques à ces micro-nanosystemes. Les avantages d’un dispositif miniaturisé, par comparaison avec une analyse classique à l’échelle macroscopique, sont de trois types : la réduction en volume de l’analyte, le temps réduit d’analyse et les performances en terme de sensibilité [1]. Si on voulait ici résumer les principaux avantages de la miniaturisation, on pourrait donc les répertorier comme suit :

Economie de réactifs et de temps : Pour ne citer qu’un exemple, en séquençage d’ADN à l’échelle macroscopique, le volume injecté dans le séquenceur est de l’ordre de 10 nanolitres, alors que les étapes de la PCR (réaction en chaîne par polymérase) précédant l’analyse impliquent de travailler en général avec des

volumes de l'ordre de $10\mu\text{l}$: ce sont donc plus de 99% de l'analyte et des enzymes coûteuses qui sont jetés en fin de processus ! Travailler avec des dispositifs miniaturisés permet de réduire considérablement les volumes utilisés, qu'il s'agisse de l'analyte ou des réactifs. On réalise donc un gain de temps de manipulation en n'utilisant que de faibles volumes d'échantillons et de réactifs, qui peuvent être rares ou chers. De plus, certains biomarqueurs sont parfois utilisés en faible quantité. Il est donc particulièrement intéressant d'avoir une surface d'échange plus importante par rapport au volume. On comprend bien ici à travers ces exemples pourquoi les applications dans le domaine médical (du diagnostic précoce de maladies ou du suivi thérapeutique) constituent un enjeu majeur des micro-nanobiopuces.

Gain en performances : Des canaux miniaturisés permettent de réduire les distances pour tous les processus et les réactions impliquant des mécanismes de diffusions moléculaire et thermique. Ainsi, s'il faut 17 minutes à une espèce pour diffuser sur 1mm, il ne lui faudra que 100ms pour diffuser sur $10\mu\text{m}$ [2]. En réduisant le libre parcours moyen des espèces dans les microcanaux, on favorise les réactions en augmentant leurs performances [3]. A titre d'exemple, l'analyse d'un échantillon de sérum humain par chromatographie liquide et spectrométrie de masse a été réalisée sur puce et sur capillaire par Horvatovich et al. [4] : la comparaison des deux méthodes montre que le dispositif sur puce a une résolution double pour un volume d'échantillon consommé trente fois inférieur.

Intégration sur puce et diminution des coûts : La miniaturisation des systèmes d'analyse vise également à regrouper plusieurs fonctions sur le même support, voire à créer des chaînes complètes d'analyse. Par analogie avec les circuits intégrés de la microélectronique, on peut imaginer des circuits microfluidiques intégrés, constituant une vraie plateforme fluide analytique. En regroupant les différentes fonctions sur une même puce, la connectique est simplifiée, les canaux sont réduits et les volumes morts minimisés. Ces systèmes miniaturisés deviennent portables ; cette caractéristique est particulièrement intéressante, que ce soit pour le diagnostic médical à domicile, ou pour des urgences sanitaires à grande échelle, dans des zones possédant peu d'infrastructures médicales. Par ailleurs, la réalisation de véritables plateformes multifonctionnelles devient compatible à une production de masse de ces circuits complexes. A l'image des circuits intégrés de la micro-nanoélectronique, on imagine être capable, avec les mêmes outils de fabrication, de produire en série ces plateformes microfluidiques d'analyse. On espère obtenir ainsi des circuits fluidiques conduisant à une meilleure reproductibilité des analyses tout en minimisant les coûts de fabrication. Réduire les coûts permettrait d'envisager des dispositifs jetables, à utilisation unique, supprimant par la même occasion les problèmes de contamination croisée.

Cependant, comme tout nouveau système, les systèmes miniaturisés posent quelques problèmes qu'il faut tenter de résoudre. Citons ici les trois difficultés majeures auxquelles nous pouvons être confrontés lorsque l'on s'attèle à la miniaturisation :

Réduction d'échelle : La réduction d'échelle (downscaling) rend nécessaire la prise en compte de nombreux effets physiques et chimiques lors de la conception. Il faut donc réfléchir à la question de l'influence de la réduction des dimensions sur les différents modes de détection chimique et biologique.

Prépondérance des surfaces : La miniaturisation des dispositifs d'analyse entraîne une forte augmentation du rapport surface-sur-volume. Elle favorise, par exemple, l'adsorption des analytes sur les parois et l'évaporation des liquides. L'influence des surfaces devient prépondérante et il est nécessaire de contrôler précisément les divers phénomènes physiques et chimiques qui s'y déroulent. Un (ou plusieurs) traitement chimique de surface est donc parfois nécessaire. Nous verrons plus loin que tout mon travail de doctorat, qui consiste à étudier des dispositifs nanofluidiques, utilise les propriétés extraordinaires de ce rapport surface-sur-volume élevé. Nous verrons qu'au lieu de considérer ce rapport élevé comme problématique, nous chercherons à utiliser les propriétés spécifiques de la surface du verre en présence d'un électrolyte et sous l'application d'un champ électrique.

Fluidique : La miniaturisation permet de réduire le temps de diffusion, mais elle entraîne également des écoulements laminaires qui ne favorisent pas le mélange. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches pour mélanger les fluides dans les microsystemes. La connexion du microsysteme avec le monde extérieur représente également un problème majeur.

La microfluidique est donc le domaine de recherche pouvant être défini simplement comme l'étude et la manipulation de fluides aux petites échelles. L'apport de la microfluidique n'est plus à démontrer aujourd'hui en ce qui concerne le potentiel d'intégration des applications de diagnostic in vitro. En effet, les techniques d'analyse des protéines sont connues depuis de nombreuses années, mais sont lourdes en temps, coûts et matériels. Le recours à la microfluidique permet d'apporter une miniaturisation, une automatisation, un parallélisme de l'analyse, et, donc, un gain de temps et d'argent considérable. Les premières puces microfluidiques ont été fabriquées il y a presque vingt ans et, aujourd'hui, les chercheurs veulent atteindre des dimensions encore plus petites. On parle alors de nanofluidique, qui est l'étude des écoulements et des phénomènes physiques au contact d'objets dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nanomètres. À cette échelle, le fluide est soumis à des contraintes qui n'existent pas aux échelles plus grandes à cause de la compétition entre les effets de volume et les effets de surface. Il présente, en conséquence, un comportement spécifique.

Mais revenons tout d'abord sur l'historique de la microfluidique et ses applications en les illustrant d'après certains exemples extraits de la bibliographie.

1.1.2 Microfluidique : historique et applications, vers les laboratoires sur puce

Depuis les premières recherches effectuées en laboratoire et les produits commerciaux disponibles aujourd’hui, la microfluidique a une longue histoire. La Figure 1.1 donne un aperçu de l’évolution de cette technologie depuis son apparition dans les années 50 [5]. Les bases du contrôle précis de fluides pour des applications d’impression ont été posées avec le développement de la technologie à jet d’encre continu dans les années 1950 et les premières imprimantes commerciales de Siemens. Ces imprimantes jet d’encre constituent en fait les premiers dispositifs microfluidiques. Dans les années qui suivirent, d’autres grandes enseignes ont continué à révolutionner le monde de l’impression et à aller toujours plus loin. Dans le domaine de l’analyse, les premiers projets de manipulation de liquide en environnement confiné ont débuté avec le développement de la chromatographie en phase gazeuse, de la chromatographie liquide à haute pression et de l’électrophorèse capillaire. Ces techniques ont révolutionné l’analyse chimique, car elles ont permis à de très petits échantillons d’être analysés avec une grande sensibilité. Un grand contrôle des matériaux utilisés (le verre pour les capillaires d’électrophorèse, par exemple), de leurs interfaces en contact avec le liquide (dépôts polymériques en surface du verre) et du contrôle du flux a donné la possibilité de réaliser des dispositifs déjà très performants.

Vu les avantages que nous avons précédemment cités, la microfluidique est attendue comme une technique vraiment révolutionnaire pour un grand nombre de domaines applicatifs. Les attentes sont nombreuses pour le diagnostic précoce de maladies et particulièrement en immunologie. Comme le montre le diagramme d’évolution temporelle de Gervais (1.1), on attend aujourd’hui des nouveaux systèmes qu’ils puissent combiner diagnostic et thérapie. De tels microsystèmes pourraient, de plus, être “personnalisés” pour chaque patient. On peut donc tirer profit des techniques de micro-nanofabrication et de la micro-nanofluidique pour reproduire, au sein d’un vrai “laboratoire sur puce”, les protocoles connus à l’échelle macroscopique. On s’affranchit ainsi de procédés lourds et fastidieux en tirant profit de tous les avantages cités précédemment quant à l’utilisation d’un système miniaturisé. Ainsi, il serait intéressant d’intégrer l’ensemble des processus chimiques et biologiques d’un procédé complet de diagnostic sur une même puce. Sur quelques centimètres carrés, on pourrait alors effectuer :

- la manipulation et le mélange de fluide
- la préparation de l’échantillon
- la séparation des différents analytes
- la détection optique

Ces microsystèmes existent et sont appelés laboratoires sur puce, en anglais “Lab-on-a-chip (LOC)” ou encore “Micro Total Analysis (μ TAS)”.

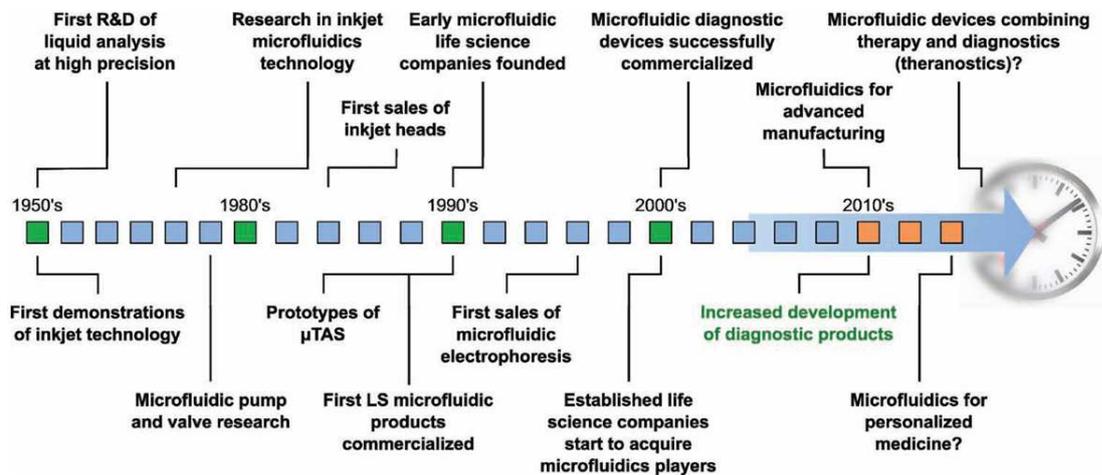


FIGURE 1.1 – Evolution temporelle de la technologie microfluidique [5].

Leurs domaines d'applications sont très variés et de plus en plus nombreux. Pour n'en citer que quelques uns :

- le diagnostic précoce de pathologies
- des systèmes médicaux portables (glucomètre...)
- la détection de menaces sanitaires dans les zones à risques (métro, gares...).
- le contrôle qualité dans l'agroalimentaire

L'intégration de plusieurs fonctions et l'automatisation de ces outils permettent de s'affranchir de grosses structures, comme les laboratoires que l'on connaît, mais aussi de la main d'oeuvre qualifiée. Ils permettent ainsi de :

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

On considère généralement que le premier dispositif microfluidique d'analyse est celui développé par Terry et al. En 1979, ils réalisent un système miniaturisé d'analyse de gaz par chromatographie sur un substrat de silicium [6]. Ce n'est que dix ans plus tard, en 1990, que Manz et al. proposent la notion de "systèmes miniaturisés d'analyse chimique complète" (miniaturized total chemical analysis systems), plus tard abrégé en "microtas" (micro total analysis systems) [7]. Ce terme regroupe les systèmes miniaturisés, possédant généralement une dimension micrométrique, qui intègrent la séquence complète d'analyse d'un échantillon brut

jusqu’à la lecture du résultat. La notion de laboratoire sur puce est moins restrictive que celle de “microtas” : un laboratoire sur puce ne contient pas nécessairement l’intégralité de la chaîne d’analyse. On peut définir un laboratoire sur puce comme un dispositif intégré rassemblant, sur un substrat miniaturisé, une ou plusieurs fonctions d’analyse chimique. Les travaux sur les laboratoires sur puce et les microtas ont rapidement trouvé leur place dans des journaux comme *Electrophoresis* ou *Analytical Chemistry*. La conférence internationale annuelle microtas (International conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences) existe depuis 1994 et le journal *Lab on a Chip* a été créé en 2001. Les travaux récents dans le domaine des laboratoires sur puce et des microsystèmes d’analyse complète font régulièrement l’objet d’articles et de revues.

Gervais et al [5] définissent ce que serait le dispositif LOC idéal de diagnostic en énumérant les critères principaux à remplir. Ainsi, ce système, décrit sur la Figure 1.2, devrait utiliser un tout petit volume d’échantillon brut, prélevé directement sur le patient. Ce volume pourrait être de l’ordre du microlitre, ce qui est significativement plus faible que le volume typique prélevé en général au bout du doigt (environ $25\mu\text{L}$). Le LOC serait donc très peu invasif, ce qui est très important lorsque l’on travaille avec des échantillons rares ou avec des patients fragiles tels que des bébés, des personnes âgées ou encore des personnes souffrant d’anémie. Il faudrait donc que le système réalise un échantillonnage précis et parvienne à concentrer le peu d’échantillon disponible pour pouvoir le traiter et l’analyser. Dans l’idéal, le système devrait aussi pouvoir faire une analyse en parallèle sur plus de 100 analytes et ceci en moins d’une minute. La limite de sensibilité souhaitée attendrait le picomolaire, voire le femtomolaire. Les analytes seraient détectés avec une très grande sélectivité, sans faux positif ou faux négatif et sans contamination d’un échantillon à un autre. Le système devrait aussi être robuste, imperméable et transparent, si la détection utilise une méthode optique. Il serait aussi bon qu’il ait une grande durée de vie et qu’il puisse être utilisé dans une large gamme de température (-50°C à 50°C). Enfin, il se devrait d’être très facile d’utilisation, même pour des personnes non expertes, et peu cher à la fabrication. Parmi l’ensemble de ces souhaits pour le LOC idéal du futur, les enjeux majeurs concernent principalement la très grande sensibilité de la détection couplée à une grande sélectivité (ou spécificité) et une haute reproductibilité (minimisation des faux positif ou faux négatif). Tant que ces enjeux ne seront pas atteints, un tel LOC restera à l’échelle du laboratoire sans pouvoir être commercialisé. D’ailleurs, malgré les nombreux efforts des laboratoires de recherche, les laboratoires sur puce ayant atteint la maturité nécessaire à leur commercialisation sont rares.

Ainsi, STMicroelectronics a développé une plate-forme générique, baptisée In-Check, basée sur une puce en silicium [8]. Elle inclut toutes les fonctions nécessaires à l’identification de séquences données d’oligonucléotides, y compris la PCR et une biopuce intégrée. ST a ensuite travaillé avec plusieurs laboratoires spécialisés pour développer des applications particulières basées sur In-Check. Ainsi, avec la société néerlandaise Mobidiag, ils ont lancé en septembre 2005 un laboratoire sur

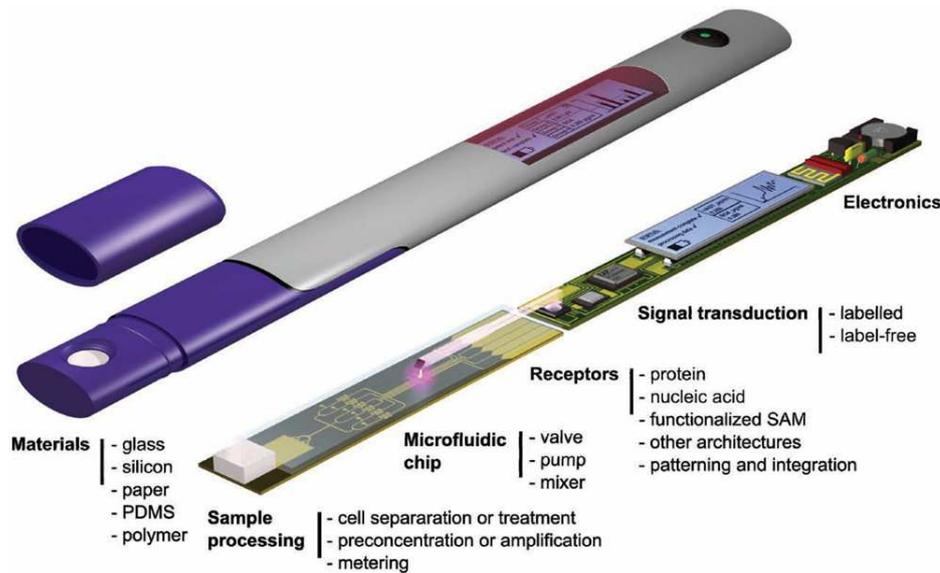


FIGURE 1.2 – Le système de diagnostic LOC idéal. Il doit détecter quantitativement plusieurs analytes, en quelques minutes, avec une sensibilité de l'ordre du femtomolaire à partir de $1\mu\text{L}$ de liquide brut d'un patient. Le dispositif aurait la possibilité de concentrer, en un plus grand volume, l'échantillon avec de très faibles concentrations d'analytes. La puce microfluidique, ici encapsulée dans du plastique violet, est jetable et le coût de fabrication serait inférieur à 1\$. [5]

puce pour le diagnostic rapide de bactéries à l'origine de la septicémie [9]. En mars 2008, ST a annoncé la commercialisation d'une nouvelle application, réalisée en collaboration avec Veredus Laboratories [10]. La puce, nommée "VereFlu", a pour objectif le diagnostic rapide de la grippe (flu) et permet de détecter les principaux types de grippe, y compris la souche H5N1 de la grippe aviaire, en un seul test (Figure 1.3). Plus récemment, Samsung a mis au point le *LABGEO^{IB10}* (Figure 1.4) qui offre une portabilité exceptionnelle car il peut fonctionner sur batterie. Cet appareil permet le dosage précis de plusieurs marqueurs cardiaques en parallèle, en respectant les délais recommandés par l'ESC (Société Européenne de Cardiologie) à savoir dans un temps inférieur à 30 minutes. Il permet d'effectuer jusqu'à 3 tests en 20 minutes sans perdre sur la précision de l'analyse. Cela en fait un produit efficace et performant notamment dans les situations d'urgence nécessitant des tests. Il autorise également d'autres types de tests pour les maladies infectieuses [11]. Ce type d'équipement de diagnostic in-vitro s'avère parfait pour une utilisation en ambulances ou dans les services d'urgence. Enfin, en 2013, Panasonic et le laboratoire de recherche belge IMEC ont fabriqué une petite puce qui teste l'ADN en moins d'une heure (Figure 1.5). Ils ont ainsi pour objectif non seulement de détecter des maladies mais aussi d'améliorer leurs décisions sur les traitements à prescrire. La puce automatise le procédé entier, en prenant une goutte de sang mélangée avec un substrat chimique, en préparant l'ADN pour la PCR et en lançant l'amplification pour le séquençage [12]. Elle réalise ainsi une PCR hautement rapide en réalisant 30 cycles en 9 minutes alors qu'il faut plus de 2h avec une PCR traditionnelle.



FIGURE 1.3 – Photos de la puce Vereflu et du système complet d’analyse VereID (ST/Veredus Laboratories) [10]



FIGURE 1.4 – Photos de la puce et du système complet d’analyse *LABGEO^{IB10}* commercialisés par Samsung [11].

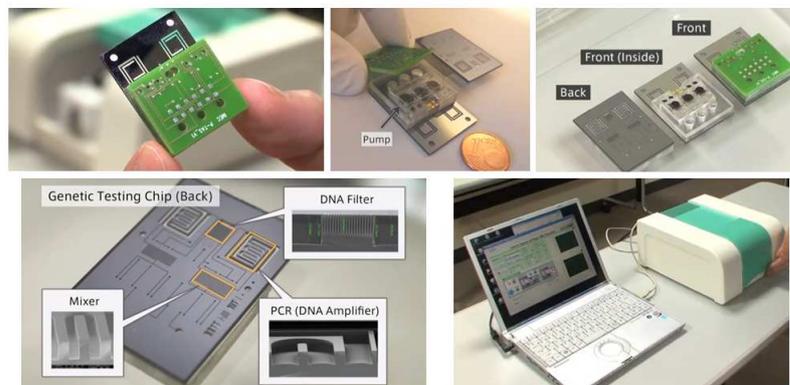


FIGURE 1.5 – Photos de la puce et du système complet d’analyse réalisés par IMEC et Panasonic [12].

1.1.3 Enjeux des laboratoires sur puce

On vient de le voir, les laboratoires sur puce regroupent donc plusieurs fonctionnalités. Parmi celles-ci, on va s'intéresser d'un peu plus près à deux étapes indispensables à tout diagnostic précis et fiable : l'étape de séparation et l'étape de détection.

1.1.3.1 Etape de séparation

Il existe de très nombreuses techniques de séparations d'analytes. Généralement, on les classe en deux grandes familles que sont *la chromatographie* et *l'électrophorèse*. Nous allons tenter ici de résumer brièvement le principe et les caractéristiques de ces deux techniques.

La chromatographie

Le terme de "chromatographie" a été créé par Mikhail Tswett en 1905 pour décrire une technique de séparation de pigments végétaux sur des colonnes remplies d'une substance adsorbante [13]. Les méthodes chromatographiques regroupent depuis des techniques très variées mais qui reposent toutes sur un principe simple : les molécules à séparer sont entraînées par un fluide, appelé "phase mobile", et interagissent (ou au contraire n'interagissent pas) avec un support fixe (solide ou liquide) appelé "phase stationnaire". Le flux de la phase mobile étant continu, c'est la rétention plus ou moins longue des différentes molécules sur la phase stationnaire qui va les séparer les unes des autres. Ainsi, bien que très diverses, les méthodes chromatographiques mettent en jeu un certain nombre de principes communs :

- les substances se répartissent entre deux phases non miscibles, selon un équilibre lié à un coefficient de partition, qui dépend à la fois de la nature des composés et de celle des deux phases considérées
- le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne une succession d'autres équilibres, ce qui se traduit par une migration des substances le long de la phase stationnaire
- la séparation est obtenue car chaque composé migre avec une vitesse qui lui est propre (et dépend du coefficient de partition décrit ci-dessus)

Cependant, la séparation peut se faire de différentes manières et l'on dénombre de multiples techniques de chromatographie qui peuvent être classées selon trois modalités différentes (Figure 1.6) :

- Classification selon la nature physique des phases (on peut alors parler de chromatographie liquide-solide, chromatographie gaz-solide etc. . .)
- Classification selon le phénomène mis en œuvre (chromatographie d'adsorption, d'affinité, de partage, d'exclusion ou d'échange d'ions)
- Classification selon le procédé opératoire (chromatographie sur colonne, papier ou couche mince et chromatographie d'élution ou par développement)

phase stationnaire	principe de séparation	caractéristiques de la phase stationnaire	principe de la fixation et/ou de l'élution
liquide	partage	liquide fixé sur un support inerte (papier, silice...)	distribution des composants du mélange à séparer dans les deux phases liquides selon leur coefficient de partage
solide	adsorption	adsorbant solide polaire	phénomène de surface : formation de liaisons spécifiques entre les composants et la surface adsorbante
	adsorption (phase inverse)	molécules hydrophobes greffées sur de la silice	interactions hydrophobes et élution par diminution de la polarité de la phase mobile
	échange d'ions	résine (polymères d'oses) porteuse de groupements chargés négativement ou positivement	interactions électrostatiques avec les composants de charge opposée
	exclusion (filtration sur gel)	solide poreux	les composants de diamètre supérieur à celui des billes du support sont "exclus" et ceux de diamètre inférieur y diffusent et sont freinés
	affinité	support sur lequel est greffée une molécule (le ligand) spécifiquement reconnue par un des composants de l'échantillon à analyser	déplacement de l'équilibre de liaison [molécule - ligand greffé] en faveur de l'équilibre [molécule - tierce molécule]

FIGURE 1.6 – Tableau résumé des différents types de chromatographie [extrait de la thèse de A. Plécis [14]].

On peut donc s'apercevoir que la chromatographie met en jeu différents critères de séparation selon la nature de la méthode (Figure 1.7). La chromatographie de phase utilise la différence de potentiel chimique entre deux phases alors que les chromatographies d'adsorption profitent du caractère polaire/hydrophobe des molécules. La taille des molécules est le critère de la chromatographie d'exclusion stérique tandis que la charge est celui de la chromatographie ionique.

Pourtant, il pourrait sembler plus efficace d'avoir recours à une méthode multicritère mettant en jeu plusieurs paramètres indépendants. Une telle méthode se démarquerait d'une technique chromatographique (qui n'utilise qu'un seul critère) en discriminant plus finement un échantillon. C'est le cas de la deuxième famille des techniques de séparation : l'électrophorèse.

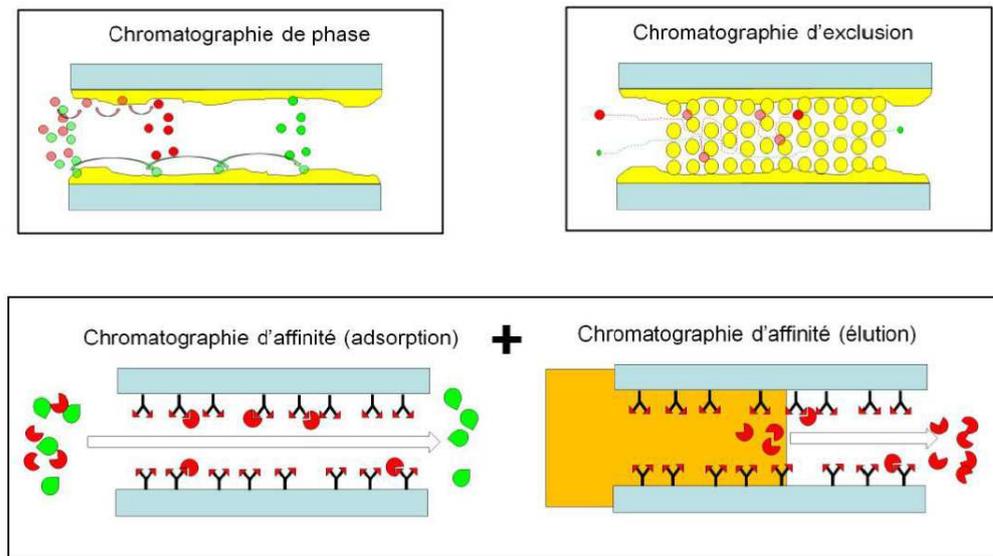


FIGURE 1.7 – Schéma de principe de différentes techniques chromatographiques [extrait de la thèse de A. Plécis [14]].

L'électrophorèse

L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement (protéines, peptides, acides aminés, acides nucléiques et nucléotides) par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Cette technique utilise le critère électrophorétique qui est un paramètre faisant intervenir à la fois la taille et la charge des analytes.

Encore une fois on distingue différents types d'électrophorèse :

- L'électrophorèse sur gel
- La focalisation isoélectrique capillaire (CIEF)
- L'électrophorèse bidimensionnelle
- L'électrophorèse en champs pulsés
- L'immunoélectrophorèse
- L'électrophorèse capillaire de zone

C'est cette dernière qui va nous intéresser dans le cadre de cette thèse. Les mécanismes physico-chimiques mis en jeu en électrophorèse capillaire et sur puce seront expliqués dans le chapitre 2.

1.1.3.2 Etape de détection

Après avoir séparé un mélange d’analytes, il faut pouvoir détecter chacun des composants de manière spécifique et avec une grande sensibilité. Pour ce faire, on peut avoir recours à des techniques diverses de détection de molécules couplées aux systèmes microfluidiques, que l’on peut répartir en trois grandes catégories selon le type de détection :

- Mécanique
- Electrique
- Optique

Qu’elle appartienne à l’un de ces trois catégories, une méthode de détection peut utiliser un marqueur fluorescent ou ne pas en nécessiter. En général, pour faciliter la détection des analytes, les espèces sont en effet conjuguées à des molécules marquantes spécifiques (Figure 1.8). On parle alors de “détection avec marquage”, méthode qui suppose donc de prétraiter l’échantillon. Malgré cette étape de marquage, cette technique de détection optique par fluorescence reste la méthode la plus couramment utilisée en microfluidique car la détection est simple et la sensibilité relativement bonne. Cependant, pour éviter cette phase de pré-marquage, des techniques dites “label-free” (Figure 1.9) ont émergé récemment. Elles permettent une détection très spécifique par reconnaissance moléculaire. Ces méthodes sans marquage nécessitent seulement une pré-fonctionnalisation chimique du capteur physique par une molécule appelée “sonde”. Cette sonde est choisie pour permettre une reconnaissance de l’analyte “cible”, qui ne subit donc aucun pré-traitement.

Sans être exhaustif, tentons de décrire quelques unes de ces techniques de détection.

Les détections mécaniques

La microbalance à quartz [15, 16, 17]

Le principe de base de la microbalance à quartz est la perturbation de l’épaisseur effective du substrat dans laquelle est confinée l’onde acoustique. Plus précisément, en déposant un matériau (polymère, protéine, métal) sur une microbalance, l’épaisseur vue par l’onde acoustique est augmentée de l’épaisseur de cette couche et la fréquence de résonance du dispositif est décalée. La sensibilité de la microbalance et sa capacité à mesurer des masses de quelques nanogrammes/ cm^2 vient, d’une part, des très faibles pertes acoustiques dans le quartz qui confèrent au dispositif un facteur de qualité élevé (quelques dizaines de milliers dans l’air, quelques milliers en phase liquide), et, d’autre part, de notre capacité à mesurer avec une très grande précision la fréquence d’oscillation d’un tel dispositif. Le choix du

substrat piézoélectrique confère au système global une taille réduite et un signal électrique facile à générer et à traiter. La capacité d'un capteur à détecter une très petite quantité de masse adsorbée est, d'une part, liée à la variation de la grandeur mesurée sous l'effet de la perturbation de la masse à mesurer, et, d'autre part, à sa stabilité, et plus généralement au rapport signal sur bruit de la mesure. La géométrie de la microbalance - un disque dans lequel l'onde est confinée en volume, loin des points d'attache du résonateur ou des joints confinant le liquide au-dessus de la surface sensible - lui permet de confiner efficacement l'énergie et de garder un facteur de qualité élevé dans pratiquement toutes les conditions. Malgré ces avantages, la microbalance reste sensible à un stress dans les joints lors de son assemblage ou à la pression hydrostatique du liquide lorsqu'une grande précision est recherchée.

Les micropoutres [18, 19, 20, 21, 22]

Le principe de fonctionnement des transducteurs nanomécaniques, et plus particulièrement des micropoutres, implique la réaction biochimique se produisant au-dessus de la surface de la poutre sous un mouvement mécanique. En effet, tout changement intervenant sur la couche de détection à la suite d'un stimulus externe provoque une réponse de la poutre suspendue. L'adsorption des molécules et la reconnaissance biomoléculaire sur sa surface peut conduire à des changements dans l'amplitude de la poutre ou dans sa fréquence de résonance. La détection de ces changements peut être statique ou dynamique. En mode statique, la flexion est la conséquence d'une contrainte subie par la surface et induite par toute réaction moléculaire qui se produit sur une seule des surfaces du cantilever. Le mode dynamique, lui, ne nécessite pas la fonctionnalisation d'une seule surface de la poutre puisque le changement de la fréquence de résonance dépend de la masse totale absorbée des deux côtés. Dans ce mode, la micropoutre est utilisée comme une microbalance et de très grandes sensibilités peuvent être obtenues.

Les résonateurs à microcanaux suspendus [23]

Un résonateur à microcanaux suspendus est un dispositif microfluidique fournissant des mesures biophysiques de haute précision. Il contient une micropoutre avec un canal microfluidique intégré dans une chambre à vide. La variation de fréquence de résonance (induite et mesurée optiquement) est utilisée pour déterminer la masse de la poutre, permettant de déterminer l'incrément de masse. La technique des résonateurs à microcanaux suspendus est une approche innovante aux méthodes microélectromécaniques à base de fluides puisqu'elle évite une immersion complète de la sonde. En intégrant la fluidique à l'intérieur de l'appareil lui-même, le fonctionnement sous vide du résonateur devient possible. Cela permet la détection d'un changement de masse avec de forts facteurs de qualité, et donc une sensibilité comparable à celle des résonateurs micromécaniques sous vide.

Les détections électriques

L'électrochimie

Les méthodes électrochimiques peuvent être déclinées sous 3 modes :

- Le mode conductimétrique, qui mesure la résistance électrique et la conductance d'un électrolyte
- Le mode potentiométrique, qui mesure des différences de potentiel au travers de membranes semi-perméables, sélectives aux ions à détecter
- Le mode ampérométrique, qui consiste à fixer un potentiel à une électrode de travail et à mesurer les fluctuations temporelles du courant

Ces techniques sont intéressantes car elles sont faciles à intégrer et ne nécessitent pas de dériver les molécules. En revanche, elles nécessitent d'intégrer des électrodes sur les substrats, ce qui est difficilement reproductible d'un substrat à l'autre.

Les dispositifs Chem-FET à nanofils [24, 25, 26]

Comme pour les dispositifs FET (Field Effect Transistor), dans lesquels la modulation de la conductance dans le semi-conducteur - entre l'entrée (source) et la sortie (drain) - est contrôlée par la variation du potentiel électrostatique des porteurs de charge dans le canal de conduction du dispositif, la méthodologie d'un Bio/Chem-FET est basée sur la détection de la variation locale de la densité de charge, que l'on appelle “effet de champ”, qui caractérise l'activité de reconnaissance entre une molécule cible et le récepteur de surface. Ce changement dans le potentiel de surface influence le dispositif Chem-FET ce qui conduit à un changement détectable et mesurable dans la conduction de l'appareil. Parmi ces dispositifs, certains sont fabriqués en utilisant des nanofils semi-conducteurs comme élément de transistor.

Les détections optiques

Les résonateurs en anneau [27, 28]

Un résonateur en anneau est tout simplement une ligne de transmission qui se ferme sur elle même [29]. Ce circuit très simple ne supporte que des signaux dont la longueur d'onde est égale à des multiples de la longueur de l'anneau.

En raison de la nature de l'anneau et du fait qu'il filtre certaines longueurs d'onde de la lumière passant à travers, il est possible de créer des filtres optiques d'ordre élevé en mettant en série plusieurs résonateurs en anneau. En outre, étant donné que les longueurs d'onde de résonance peuvent être modifiées simplement en augmentant ou en diminuant le rayon de chaque anneau, les filtres peuvent être réglables. Les anneaux optiques et les résonateurs cylindriques et sphériques sont utilisés dans le domaine des biocapteurs car ils nécessitent seulement un petit volume d'échantillon pour obtenir des données de spectroscopie avec très peu de signaux Raman de fond et de fluorescence du solvant et autres impuretés.

La résonance plasmonique de surface (SPR) [30, 31]

La résonance des plasmons de surface (ou Surface Plasmon Resonance en anglais) est un phénomène physique principalement connu pour son utilisation comme méthode de mesure de la liaison d'un ligand sur un récepteur adsorbé à la surface d'une couche métallique. Un système de détection SPR mesure la variation de l'indice de réfraction au voisinage de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs. On peut notamment utiliser la résonance de plasmon de surface dans des détecteurs biologiques immunitaires. Une surface du métal (Ag ou Au) est fonctionnalisée avec des anticorps et la liaison d'antigènes sur ces derniers pourra être détectée avec ce procédé. Les avantages de ce système en tant que capteur biologique sont les suivants :

- Pas besoin d'utiliser de marqueurs fluorescents ou radioactifs. Le temps de préparation de la détection est donc réduit
- L'analyse elle-même est aussi très rapide et peut donc être réalisée en temps réel
- La flexibilité du système est grande car il peut s'adapter à la détection de n'importe quel analyte

Les tests par flux latéral [32]

Les tests immunochromatographiques par flux latéral sont des dispositifs simples visant à détecter la présence (ou l'absence) d'un analyte cible dans l'échantillon sans avoir besoin d'équipements spécialisés et coûteux. En règle générale, ces tests sont utilisés pour le diagnostic médical et une application très répandue et bien connue est le test de grossesse à domicile. Cette technologie est basée sur la migration de nano ou microparticules le long d'une membrane. La réponse obtenue est qualitative, c'est-à-dire oui ou non. Chacun des éléments du système a la capacité de transporter des fluides (par exemple, l'urine) spontanément. Le premier élément agit comme une éponge et maintient un excès de liquide de l'échantillon. Une fois trempé, le fluide migre vers le second élément dans lequel le fabricant a enregistré le conjugué, une forme sèche des particules bio-actives dans une matrice

sel-sucre qui contient tout ce qu’il faut pour garantir une réaction chimique optimale entre la molécule cible (par exemple, un antigène) et son partenaire chimique (par exemple, un anticorps) qui a été immobilisé sur la surface de la particule. En même temps que le fluide de l’échantillon dissout la matrice sel-sucre, il dissout également les particules et le tout s’écoule à travers la structure poreuse. De cette façon, l’analyte se lie aux particules lors de la migration plus loin dans le troisième élément. Ce matériau présente une ou plusieurs zones (souvent appelées bandes), où une troisième molécule a été immobilisée par le fabricant. Au moment où le mélange échantillon-conjugué atteint ces bandes, la troisième molécule se lie au complexe. Au bout d’un certain temps, lorsque le fluide est de plus en plus passé sur les bandes, les particules s’accumulent et les bandes changent de couleur. Les avantages de cette technique sont surtout :

- La rapidité d’exécution : le temps d’obtention du résultat après dépôt de l’échantillon est de maximum 20 min
- La technicité réduite : la manipulation est unique (dépôt de l’échantillon) et aucun équipement de laboratoire n’est nécessaire
- Le faible coût

L’immunofluorescence [33, 34, 35]

L’immunofluorescence est une technique d’immunomarquage qui utilise des anticorps (ou immunoglobulines) ainsi que des fluorochromes. En immunofluorescence, on peut réaliser deux types de marquages. Le premier est l’immunofluorescence directe. Lors de ce marquage, on utilise un anticorps dirigé contre la molécule recherchée (l’antigène). Cet anticorps est couplé à un fluorochrome. Ensuite, pour révéler la préparation, on peut utiliser un microscope à épifluorescence ou un microscope confocal. Dans le cas de l’immunofluorescence indirecte, on a deux anticorps. L’anticorps primaire est dirigé contre l’antigène recherché. On utilise ensuite un deuxième anticorps, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour l’anticorps primaire.

Dans les deux cas, le principe est simple. Après excitation par un rayonnement lumineux, les molécules émettent en se désexcitant à une longueur d’onde différente (fluorescence) de la longueur d’onde d’excitation. Pour retourner à son état d’équilibre, la molécule restitue une énergie qui est plus faible que celle absorbée à cause du passage par un ou plusieurs niveaux énergétiques intermédiaires. Cette technique de microscopie est très sensible mais nécessite des expérimentateurs experts et un équipement lourd.

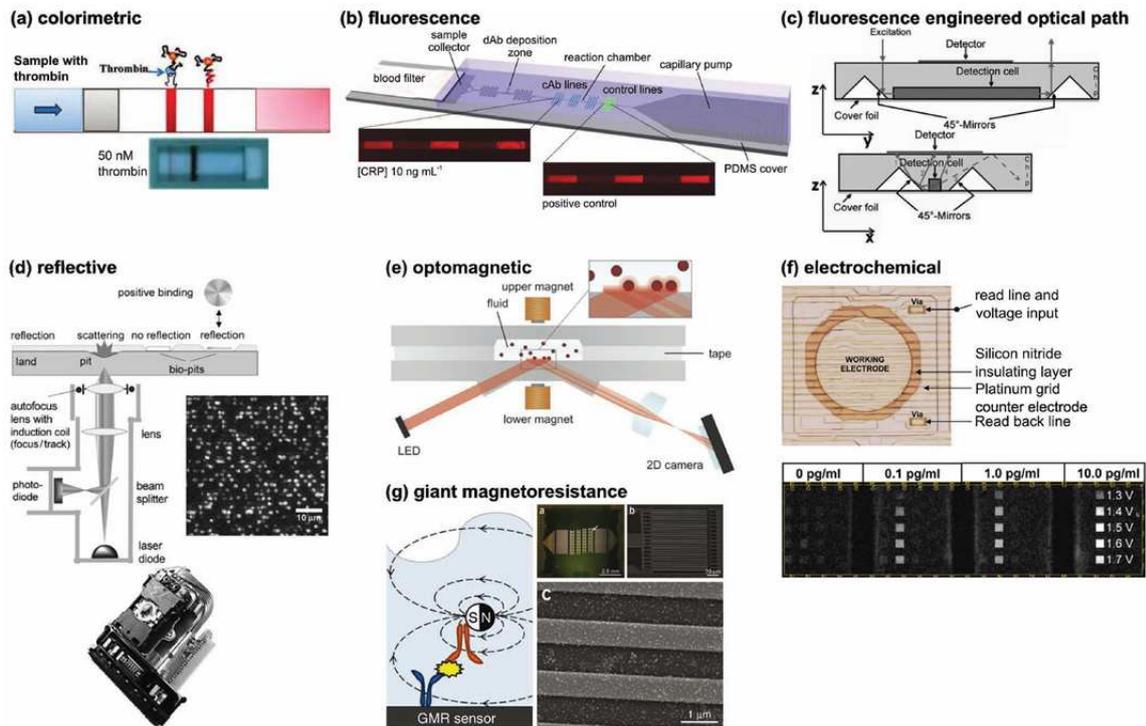


FIGURE 1.8 – Techniques de détection avec marquage. (a) colorimétrie [36], (b) fluorescence [37], (c) fluorescence dans un trajet optique [38], (d) réflexion des particules en utilisant un lecteur de compact disque [39], (e) saisie et lecture opto-magnétique [40], (f) lecture électrochimique [41] et (g) magnétorésistance géante [42].

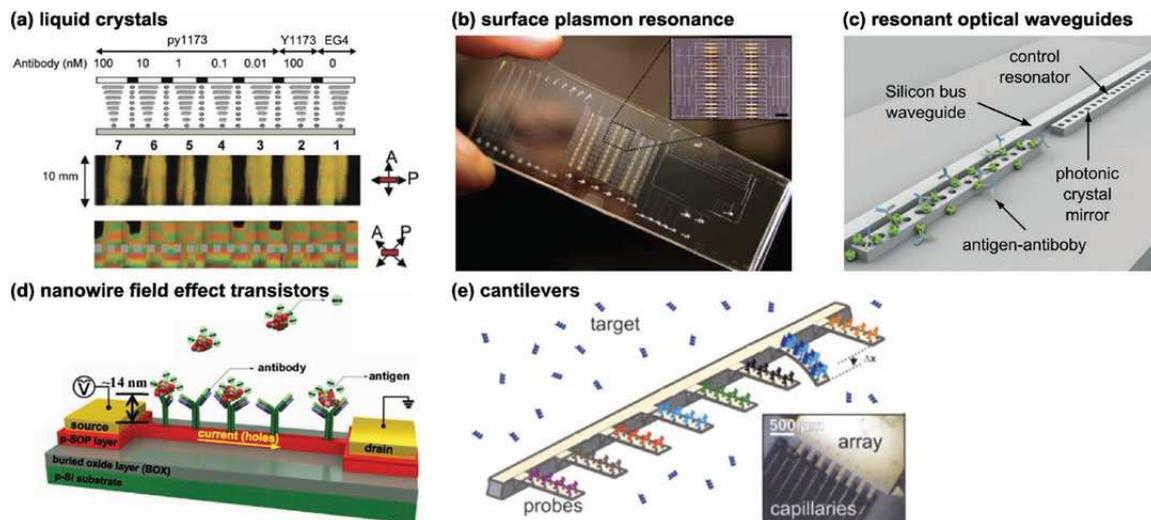


FIGURE 1.9 – Techniques de détection sans marquage ou techniques “label-free”. (a) Cristaux liquides [43], (b) résonance de plasmon de surface [44], (c) guides d’ondes optiques résonnants [45], (d) transistors à effet de champ à nanofils [46], (e) poutres suspendues [47].

Nous venons de passer rapidement en revue quelques méthodes conventionnelles de détection qui sont compatibles avec une intégration dans un dispositif “Lab-on-a-Chip”. Ces méthodes utilisent pour la plupart un biocapteur intégré physique [48], qu’il soit optique (réseau plasmonique par exemple [30]), mécanique (micro-poutre vibrante [23]) ou électrique (microcellule électrochimique à microélectrodes, nanofil, etc... [24, 25]). La détection au moyen de ces transducteurs s’effectue, le plus souvent, par reconnaissance moléculaire entre les molécules sondes (préalablement déposées à la surface du transducteur) et la molécule cible recherchée. Si ces méthodes garantissent souvent une vraie spécificité de la détection, elles sont assez complexes à mettre en œuvre puisqu’une étape de fonctionnalisation chimique de surface est nécessaire. De plus, la sensibilité de ces immuno-capteurs dépend de manière critique de la force de la liaison primaire anticorps/antigène, ce qui impose l’utilisation d’anticorps de grande qualité (avec une faible constante de dissociation K_d) pour chaque cible moléculaire visée. Toutes ces techniques ne sont donc pas équivalentes en termes d’efficacité et de sensibilité.

1.1.3.3 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

L’un des enjeux actuels du diagnostic consiste à mettre au point des méthodes de détection extrêmement sensibles, c’est-à-dire permettant de détecter un analyte même s’il est très faiblement concentré en solution. En effet, si l’analyte est une molécule pathogène pour l’Homme, on souhaite être capable de la détecter très rapidement et de manière spécifique, ou, dit autrement, de manière sélective. En terme de sensibilité, on définit donc la limite de détection (“Limit Of Detection” ou LOD en anglais) comme étant le seuil limite en dessous duquel la détection devient impossible. On définit aussi un autre seuil appelé “limite de quantification (LOQ)” qui est la concentration à partir de laquelle on va pouvoir fournir un résultat et une quantité fiable. Ces deux concepts de limite présentent donc une nuance et il est important de noter que, pour établir la présence ou non d’un analyte d’intérêt, c’est la limite de détection qui va nous intéresser et que l’on va tenter d’améliorer. Pour qu’une détection soit la plus efficace possible, il est intéressant de pouvoir repousser encore et toujours cette limite LOD. Aujourd’hui, à la lecture de la littérature, on s’aperçoit que les chercheurs voudraient atteindre une limite LOD dans la gamme du femtomolaire, soit de l’ordre de l’attogramme par mL pour des antigènes de 150 kDa (anticorps typique) [48].

Dans le domaine des biocapteurs, les chercheurs continuent donc d’innover pour améliorer encore les caractéristiques physiques du capteur-transducteur, avec toujours pour objectif la réduction de la limite LOD. La Figure 1.10 présente les LOD de quelques techniques courantes de détection [48]. Pour chaque type de détection (mécanique, électrique ou optique), deux techniques ont été reportées sur la figure, l’une par marquage et l’autre “label-free”. On peut alors comparer, grâce à cette représentation, les sensibilités de chacune des méthodes.

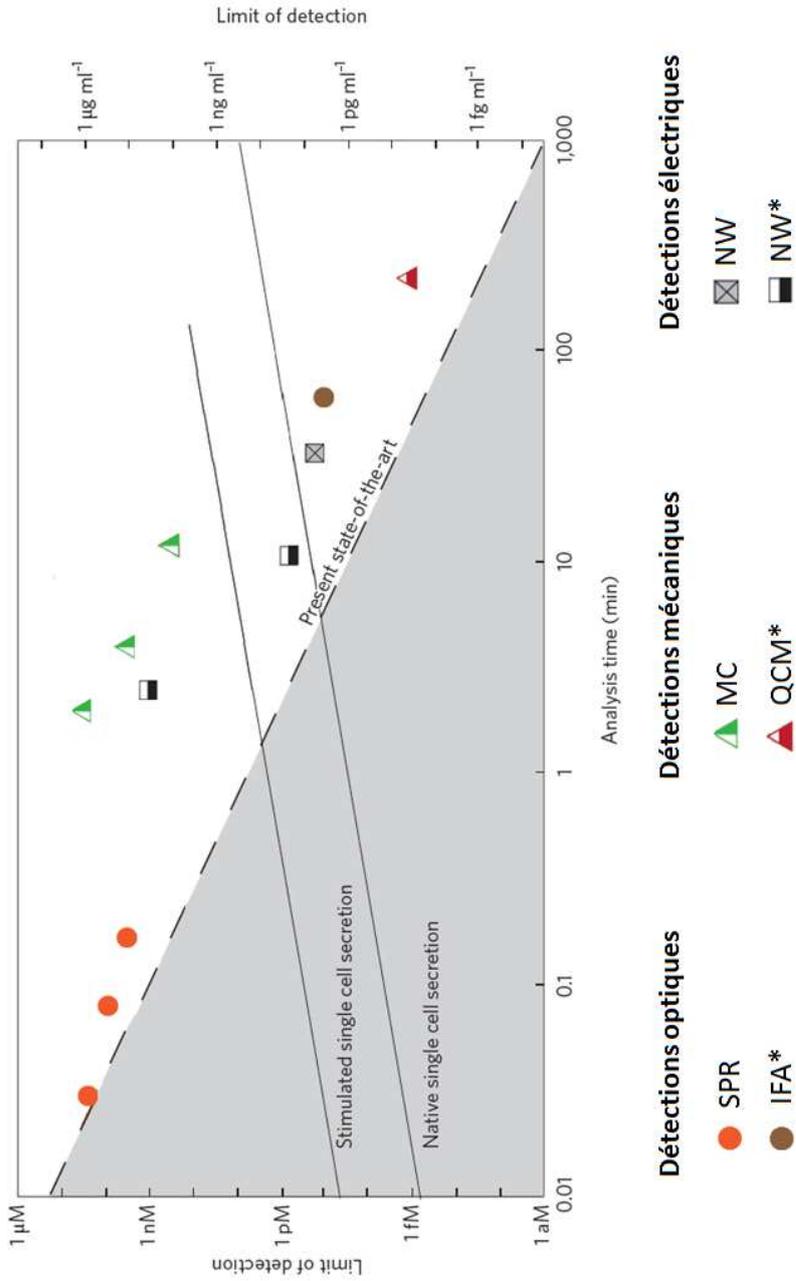


FIGURE 1.10 – Limite de détection (LOD) de différents types de biocapteurs (optiques, mécaniques et électriques). Elle est représentée en moles (axe de gauche) et en grammes par millilitre (axe de droite) en fonction du temps d'analyse. Les astérisques indiquent les méthodes marquées alors que les autres sont "label free". Notez que les deux axes sont logarithmiques. La ligne pointillée noire montre l'état de l'art actuel (avec de plus longues durées d'analyse menant à la limite inférieure de détection). Le biocapteur idéal offrirait de faibles limites de détection et des temps courts d'analyse (c'est à dire qu'il se trouverait en bas à gauche de cette région graphique). SPR : résonance plasmonique de surface; IFA : immunofluorescence; MC : micropoutre; QCM : microbalance à quartz; NW : nanofils.

Ainsi, la résonance plasmonique de surface (SPR - rond orange) présente une sensibilité de l'ordre du nanomolaire alors que la méthode optique marquée, l'immunofluorescence (IFA - rond marron), permet d'atteindre des valeurs de l'ordre de la centaine de femtomolaires. De même, pour les méthodes mécaniques, l'utilisation de microcantilevers (MC - triangle vert) donne une sensibilité aux alentours du nanomolaire alors que la technique de la microbalance à quartz (QCM - triangle rouge) fait descendre cette sensibilité au femtomolaire. Enfin, avec les nanofils (NW - carré), une sensibilité initiale de 5 pM peut être améliorée à 0.15 pM et jusqu'à 1,5 fM par certains procédés d'optimisation [49].

Des systèmes miniaturisés avec une très faible LOD présentent un grand intérêt dans de nombreux domaines que nous avons évoqué précédemment, et plus particulièrement dans un but de défense. En effet, il peut être primordial de concevoir des dispositifs extrêmement sensibles de contrôle continu du milieu environnant afin de se prémunir de l'une des plus grandes menaces d'aujourd'hui, à savoir la menace terroriste biologique.

1.2 Armes et menaces biologiques

Commençons par un peu d'histoire.

- *VIe siècle avant l'ère chrétienne* : les Assyriens empoisonnent les puits de leurs ennemis avec de l'ergot de seigle, un champignon dont la toxine produit de violentes hallucinations (on en extrait notamment le LSD).
- *1346* : lors du siège de Caffa (Crimée), les Tatars jettent les cadavres de pestiférés par-dessus les murs de la ville, obligeant les Génois à se rendre.
- *Guerre de sept ans* : les troupes britanniques distribuent des couvertures infectées par la variole aux indigènes américains alliés aux Français. Selon les estimations, plus de 20 000 indigènes en sont morts puisque cette maladie est alors inconnue sur le continent américain.
- *1932* : l'armée japonaise engage plus de 3000 scientifiques pour faire des recherches sur des agents biologiques comme l'anthrax et le choléra. Ils mettent en place les célèbres unités 100 et 731 qu'ils construisent en Chine et en Manchourie sous le commandement du général Shiro Ishii. Ils se servent alors de dizaines de milliers de civils et de prisonniers de guerre chinois pour servir de cobayes à ces unités.
- *Seconde guerre mondiale* : les Japonais utilisent le bacille de la peste sur des villes chinoises alors que les Britanniques expérimentent le bacille du char-

bon (ou Anthrax) sur l'île Gruinard au large de l'Écosse. Ils amènent sur l'île des moutons qu'ils placent face au vent, la tête dirigée vers une "bombe à anthrax", afin de savoir si les spores peuvent résister en étant dispersées à l'aide d'un explosif. Les résultats sont positifs. Les Anglais brûlent alors les corps des moutons, mais l'îlot ne put jamais être totalement décontaminé. L'accès à cette île est aujourd'hui de nouveau autorisé après 48 ans de mise en quarantaine.

- *27 octobre 1950* : deux semaines après l'entrée des troupes chinoises dans la guerre de Corée (1950-1953), à un moment où l'on craint une généralisation du conflit, George Marshall, le secrétaire américain à la défense, donne le feu vert pour un important programme bactériologique.
- *1984* : dans la petite ville de The Dalles en Oregon, les disciples du Bhagwa Shri Rajneesh tentent de contrôler des élections locales en infectant des bars à salade avec des salmonelles. Environ 900 personnes tombent malades. Cet événement est considéré comme le premier cas de bioterrorisme perpétré aux États-Unis.
- *Fin 2001* : une série d'attentats à l'anthrax a lieu aux États-Unis. Des lettres contenant les bactéries de la maladie du charbon ont été envoyées à cinq bureaux de grands médias (ABC News, CBS News, NBC, New York Post et National Enquirer) et à deux sénateurs américains (Tom Daschle et Patrick Leahy). Conséquence : cinq morts.

L'utilisation d'armes biologiques n'est donc pas récente, elle commence il y a des milliers d'années et se poursuit à travers les siècles jusqu'à sa forme actuelle. Les années de Guerre Froide ont favorisé un essor incroyable dans la recherche et le développement des armes biologiques notamment aux États-Unis et en URSS. Néanmoins, à partir des années 1970, cette tendance s'est inversée avec la recherche d'accords entre les grandes puissances. On aboutit le 10 Avril 1972 à l'ouverture de la convention sur l'interdiction de la mise au point et du stockage des armes bactériologiques ou à toxine (CABT). Elle interdit le développement, la production, le stockage et l'utilisation de microbes ou de leurs produits toxiques, excepté dans des quantités nécessaires à la recherche d'applications de défense et de paix. A ce jour, 153 Etats ont ratifié cette convention. Cependant, on a constaté à de nombreuses reprises l'usage d'agents biologiques ou d'accidents liés à leurs usages. En dépit de la mise en place de la convention sur les armes biologiques, on constate la multiplication de programmes dans ce domaine, comme le projet "Coast" en Afrique du sud (extermination de la population noire à l'aide d'agents biologiques), ou encore les différents projets irakiens avant et pendant la guerre du golf. Depuis les événements de 2001, la crainte d'une action terroriste de grande échelle utilisant des armes biologiques n'a cessé de croître et le bioterrorisme est désormais considéré comme un sujet de préoccupation majeur.

Mais alors qu'est ce réellement qu'une arme biologique ? Ces armes représentent-elles un réel danger ? Quels sont les moyens aujourd'hui mis en œuvre pour lutter ou tout du moins prévenir ce genre d'attaque ?

1.2.1 Agents de la menace biologique

Une arme biologique est une arme utilisant des germes pathogènes destinés à affaiblir les armées ou les populations ennemies par la propagation de maladies pouvant être mortelles. Le terme arme biologique comprend les armes bactériologiques et les armes virologiques. On peut citer notamment le charbon, le virus ebola, la peste, le choléra, ou encore la variole. Les attaques peuvent se faire de différentes manières, par voies respiratoire, alimentaire ou encore cutanée. Une arme biologique idéale est une arme puissante, à faible visibilité, accessible et facile à disséminer. Le bacille du charbon (appelé aussi anthrax), par exemple, est considéré comme un agent excellent car il forme des spores résistantes, parfaites pour la dissémination sous forme d'aérosols.

Les agents du bioterrorisme se classent en 3 niveaux :

- La catégorie A, qui représente la plus haute priorité, comprend les microorganismes qui peuvent être disséminés facilement ou transmis entre patients, qui impliquent une mortalité élevée ou un potentiel en terme de santé publique important et qui sont susceptibles de causer des réactions de panique. Elle comprend la variole, le charbon, la peste, la toxine botulinique, l'agent de la tularémie et des filovirus et les arenavirus (Ebola par exemple).
- La catégorie B inclut des microorganismes plus difficiles à disséminer, qui sont à l'origine de maladies moins graves avec une mortalité plus faible ou des conditions de culture plus complexes, mais qui nécessitent une surveillance et une capacité de diagnostic spécifiques. Elle inclut la fièvre Q, les Rickettsioses, la Brucellose, la Mélioidose, les toxines du ricin, de *Clostridium perfringens* et du staphylocoque (enterotoxine B), ainsi qu'un certain nombre de pathogènes alimentaires et les virus d'encéphalite.
- La catégorie C comprend les maladies émergentes telles que celles transmises par le virus de Crimée Congo, le virus de Nipah, la grippe, ou encore les micro-organismes génétiquement modifiés (comme les mycobactéries multirésistantes de la tuberculose).

Quoiqu'il en soit, leur potentiel de nuisance est tel qu'elles ont été classées dans les armes de destruction massive. Il est donc évident qu'il est indispensable de prendre au sérieux ce genre d'attaques et d'aller au-delà de la CABT qui ne peut pas suffire à enrayer totalement le risque d'attaques biologiques. A défaut de pouvoir les contrer, il est néanmoins primordial de prévenir et de répondre à ces potentielles attaques.

1.2.2 Macrosystèmes de détection de la menace biologique

La réponse rapide à une attaque bioterroriste passe, en premier lieu, par l'identification rapide des agents du bioterrorisme dans des échantillons de l'environnement. Sans la disponibilité de méthodes précises de détection rapide, les premiers intervenants et cliniciens ne peuvent pas prendre de décisions concernant le triage, la gestion ou la prévention de la propagation de la maladie.

Les caractéristiques les plus recherchées dans un système de détection rapide varient mais comprennent généralement :

- **une spécificité élevée** (également appelée le taux réel négatif ou la probabilité qu'un échantillon exempt d'agent du bioterrorisme ait un résultat de test négatif)
- **une haute sensibilité** (également appelée le taux réel positif ou la probabilité qu'un échantillon contenant un agent du bioterrorisme ait un résultat positif au test)
- une préparation d'échantillon minimale
- la capacité à détecter de nombreux agents du bioterrorisme
- la capacité à traiter de nombreux échantillons simultanément
- pas de réactifs coûteux ou spécialisés
- des tailles petites et portables
- la capacité à détecter les agents en temps réel (c'est à dire quelques minutes)
- la capacité à fournir un résultat clairement interprétable
- un faible coût

Pour tenter de répondre à ces critères, les systèmes de détection existants (tous macroscopiques) se composent typiquement de quatre parties (voir Figure 1.11) :

- *un élément déclencheur* (souvent un compteur de particules ou un indicateur de biomasse), qui peut identifier la présence (mais non la nature) d'un produit biologique potentiellement néfaste en identifiant chaque changement dans le fond particulaire environnant. La détection d'une augmentation dans la concentration particulaire provoque alors le démarrage des autres composants du système.
- *un échantillonneur/collecteur*, qui sert à l'échantillonnage de l'agent suspect. Il concentre les aérosols et conserve les échantillons pour des analyses ultérieures.
- *un détecteur*, qui permet de déterminer si les particules sont biologiques ou inorganiques.
- *un élément d'identification*, qui permet de fournir une identification spécifique de l'agent potentiel du bioterrorisme.

En outre, les systèmes ont souvent besoin d'un système de gestion de l'information pour enregistrer et envoyer des données à un centre de contrôle.

Récemment, une cinquantaine de systèmes macroscopiques de détection pour l'identification rapide d'agents potentiels du bioterrorisme dans les échantillons environnementaux et cliniques ont été identifiés par une agence publique américaine pour la santé [50]. Ils se classent en 4 types selon qu'il s'agisse de systèmes de collecte, de compteurs de particules et indicateurs de biomasse, de systèmes d'identification ou de systèmes de collecte et d'identification réunie. Ces systèmes sont détaillés en Annexe A.

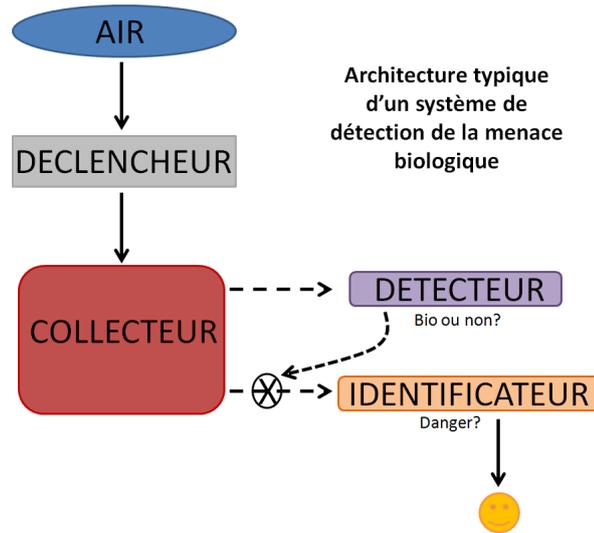


FIGURE 1.11 – Architecture typique d'un système de détection de la menace biologique composé d'un déclencheur, d'un collecteur et d'un système d'identification.

Conclusion

Cette introduction nous a permis de voir que la précision des analyses chimiques et biologiques représente aujourd'hui un grand défi. Les enjeux sociétaux en France et à l'international sont tels qu'ils justifient la nécessité d'effectuer toujours plus de recherches dans les laboratoires français afin de garder une place privilégiée sur le marché. Dans ce contexte, la microfluidique est probablement l'une des avancées majeures qui va permettre (si elle n'a pas déjà commencé) de lever de nombreux verrous technologiques. Ainsi, le concept de laboratoire sur puce est amené à prendre de plus en plus d'ampleur et à se faire sa place petit à petit dans notre vie quotidienne. Le dispositif d'analyse idéal recherché doit être peu invasif, précis, sensible, sélectif, robuste, facile d'utilisation et, bien sûr, bon marché. Il devrait permettre à lui seul d'effectuer plusieurs étapes nécessaires à une analyse complète : la manipulation des fluides, le prétraitement de l'échantillon à analyser, la séparation des différents composants, l'amplification et la détection du signal. Pour mener à bien une analyse complexe de manière très précoce (comme dans le cas d'un échantillon biologique présentant un potentiel risque sanitaire), le couplage d'une bonne séparation et d'une détection spécifique sensible est indispensable. Celui-ci peut être réalisé par une technique particulièrement intéressante qui est l'objet de cette thèse : l'électropréconcentration sur puce.

Chapitre 2

Electropréconcentration et séparation sur puce

*Les hommes, même les scientifiques, ne peuvent s'empêcher d'espérer.
Leurs expectatives sont simplement plus précises.*

- Karl A. Menninger -

Nous avons vu dans le premier chapitre un certain nombre de techniques de détection et de séparation basées sur l'utilisation de transducteurs. D'autres méthodes, qui n'en utilisent pas mais qui sont basées sur la manipulation en solution de l'analyte (molécule cible), existent. Ces méthodes, dites de "préconcentration" de l'analyte, ne font pas intervenir d'étape contraignante de fonctionnalisation de surface. **Elles consistent à contrôler la localisation spatiale de l'analyte dans le canal fluide en fonction du temps.** Parmi ces méthodes, comme la filtration au travers de nano-membranes [51, 52], la focalisation isoélectrique [53] ou encore l'isotachophorèse [54], l'électropréconcentration au travers de nanofentes est une méthode novatrice. La nanofluidique est un domaine complexe et très récent qui n'a été développé et étudié ces dernières années que par quelques groupes de recherche prestigieux dans le monde, comme le MIT [55], l'EPFL [56] ou encore Stanford [57]. Ces dispositifs à nanocanaux ou à nanofentes permettent de préconcentrer une grande variété de biomolécules, comme des protéines qui peuvent être des biomarqueurs de maladies rares, de l'ADN, des nanoparticules, mais aussi des virus ou de petites bactéries. Cette électropréconcentration est possible grâce au caractère de perméabilité sélective de la nanofente, qui se comporte sous champ électrique comme un "super-filtre" moléculaire permettant le passage ou non des biomolécules. Tout au long de ce mémoire, nous montrerons que cette méthode est réellement séduisante car elle permet une préconcentration rapide, en quelques minutes seulement, et avec des taux de préconcentration très élevés.

Le but de ce chapitre de thèse est de présenter les notions de base de la méthode d'électropréconcentration sur puce. Nous décrirons tout d'abord les phénomènes électrocinétiques tels qu'ils sont compris aujourd'hui d'après la bibliographie. Nous citerons, par la suite, quelques résultats majeurs, qui constituent l'état de l'art

aujourd'hui dans ce domaine, et nous résumerons les travaux antérieurs qui ont été menés au LPN dans le cadre des thèses de A. Plecis [14] et de C. Nanteuil [58]. Enfin, nous concluons ce chapitre en présentant la méthode d'électro-préconcentration sélective assistée en pression, nouvelle méthode qui a été étudiée tout au long de ce doctorat. L'objectif du travail de thèse était de démontrer que cette méthode assistée en pression permet de choisir la localisation du point focal de préconcentration. On parle alors de "préconcentration sélective", car il devient possible d'effectuer simultanément la préconcentration et la séparation de l'analyte en quelques minutes.

2.1 Electrophorèse capillaire et flux mis en jeu

L'électrophorèse capillaire, qui a vu le jour bien après les techniques de chromatographie et qui est relativement simple à mettre en oeuvre, repose sur les différences de migration d'analytes chargés sous l'application d'un champ électrique au sein d'une solution liquide. C'est une méthode fiable et efficace pour séparer les différents constituants chargés d'un échantillon liquide. Le critère électrophorétique est un paramètre qui fait intervenir à la fois la taille et la charge des analytes (c'est le rapport des deux dans l'expression simplifiée de la mobilité électrophorétique que nous introduirons plus loin). Ce critère semble donc a priori plus efficace pour discriminer des espèces que la taille seule ou la charge seule ne sauraient distinguer.

L'électrophorèse capillaire

Le phénomène d'électrophorèse a été rapporté au début du 19^{ième} siècle par le scientifique russe Ruess lorsque celui-ci remarqua la migration de particules d'argile en suspension suite à l'application d'un champ électrique [59]. Dès les années 30, la séparation électrophorétique dans des capillaires millimétriques a été étudiée mais la très forte distorsion de flux n'a pas permis à la technique de réellement percer. Ce n'est qu'en 1981, lorsqu'il a été possible technologiquement de réduire considérablement la section des capillaires, que l'avènement de cette technique a eu lieu. Ainsi, en utilisant des capillaires en verre de $75\mu\text{m}$ de diamètre intérieur et des champs électriques de 30kV/m , Jorgenson et Lukacs [60, 61] ont rapporté les premiers exemples d'électrophorèse capillaire moderne réalisant ainsi la première démonstration réelle en microfluidique. Depuis, on recense quasiment un article de revue chaque jour sur ce thème.

Cette technique repose donc sur l'utilisation d'un tube (appelé capillaire), de section submillimétrique, rempli d'un électrolyte support généralement aqueux. Les deux extrémités de ce capillaire sont plongées dans des réservoirs entre lesquels on peut appliquer une différence de potentiel à l'aide d'un générateur de tension externe. On injecte alors une faible quantité d'analytes aux entrées du capillaire (par capillarité, pression, électro-injection...) et l'application d'une différence de

potentiel permet la migration des analytes. Cette migration est dictée par deux effets électrocinétiques gouvernant l'électrophorèse : la mobilité électrophorétique de l'analyte chargé, qui est liée à ses propriétés intrinsèques (taille et charge) et à la viscosité de la solution, et la mobilité électroosmotique, qui correspond à un écoulement de la solution au niveau des parois en verre du tube (ou capillaire).

Le flux électroosmotique

Considérons d'abord ce flux électroosmotique, qui existe même en l'absence d'analyte, dès qu'un champ électrique est appliqué dans la solution aqueuse en contact avec les parois en verre du tube capillaire. Le verre est une silice qui présente en surface des groupements silanols Si-OH. Ces groupements acides se déprotonent à des pH très faibles (leur pKa étant de 2,5) en produisant la réaction acido-basique de déprotonation suivante :



Du fait de ces processus acido-basiques, une charge appelée **charge de surface** se développe à l'interface. Elle est définie par :

$$\sigma_s = \sum_i \frac{q_i}{A} \quad (2.1)$$

avec A la surface et q_i la charge de l'ion i.

Les groupements silanol -SiOH situés à la surface sont ionisés négativement. Pour assurer l'électroneutralité, une partie des cations présents dans l'électrolyte va former **une double couche électrique, appelée EDL**, au niveau de la paroi de silice (Figure 2.1). Cette double couche est soumise en solution à deux forces principales : la diffusion, qui a tendance à disperser les cations dans la solution, et l'attraction électrostatique, qui a tendance à les rappeler vers la surface négative. Plus précisément, et d'après le modèle de Gouy-Chapman, une partie des cations compensant les charges fixes du capillaire se place à une distance très faible de la paroi du capillaire et forme une couche appelée "couche compacte" (ou couche de Stern), alors qu'une autre partie des cations se situe à une distance un peu plus grande pour former une couche appelée "couche diffuse" (ou couche de Gouy-Chapman). Le plan de cisaillement est un plan imaginaire, qui sépare la couche contenant les ions immobiles (couche compacte) de celle contenant les ions mobiles (couche diffuse). **La valeur du potentiel en ce plan correspond au potentiel dit "potentiel zeta" ζ** , qui est relié à la charge de surface σ_s . La valeur de ζ dépend du pH et de la force ionique de la solution.

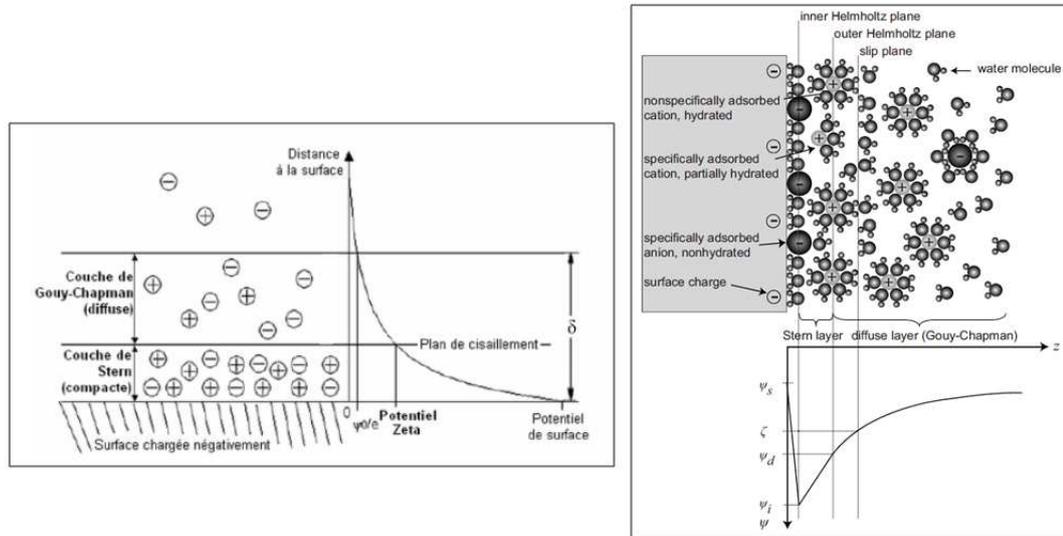


FIGURE 2.1 – Structure de la double couche électrique présente à la surface d'un capillaire chargé négativement.

L'attraction électrostatique responsable du recrutement des contre-ions va venir écranter la charge de surface qui va alors diminuer jusqu'à devenir nulle au centre du liquide. De par la diffusion, qui a tendance à homogénéiser la solution, il faut une certaine distance pour écranter cette charge de surface. Cette distance typique est appelée **longueur de Debye** et est définie de la manière suivante :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_d k_B T}{\sum_i q_i^2 c_i^0}} \quad (2.2)$$

où ϵ_d est la permittivité diélectrique du solvant (ϵ_0 étant la permittivité diélectrique du vide, environ égale à $8,85 \cdot 10^{-12}$ F/m)

ϵ_r est la permittivité relative du solvant (dans l'eau à température ambiante $\epsilon_r=80$)

T est la température exprimée en kelvins

k_B est la constante de Boltzmann, environ égale à $1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K , qui relie température et énergie thermique

c_i^0 est la concentration en ions de charge q_i loin de la charge écranter (là où le champ électrique est nul), exprimée en $ions/m^3$

A très basse température, il n'y aura quasiment plus de diffusion. La longueur de Debye devient extrêmement petite, ce qui signifie que les contre-ions se plaquent contre la surface annulant quasiment la charge de surface. Il est important de souligner que, plus il y a d'ions en solution (ce qui signifie un c_i^0 grand), plus il y aura de contre-ions qui pourront écranter la charge de surface, ce qui conduit à une faible longueur de Debye. Le tableau ci-dessous présente quelques valeurs typiques de longueurs de Debye pour différentes forces ioniques de la solution. On retrouve bien que λ_D est d'autant plus grand que la force ionique est faible.

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

FIGURE 2.2 – Epaisseur λ_D de l'EDL pour des concentrations typiques de KCl à 25 °C.

La compétition entre les deux forces que sont la diffusion et l'attraction électrostatique peut être modélisée par l'équation de Boltzmann à l'équilibre thermodynamique, qui relie la concentration ionique dans le liquide C_i et le potentiel électrique local ϕ :

$$C_i(y) = C_i^0 \exp\left(\frac{z_i F \phi(z)}{RT}\right) \quad (2.3)$$

avec C_i^0 la concentration de l'espèce ionique dans le liquide suffisamment loin de l'interface où le potentiel est nul

z_i la valence de l'espèce i

F la constante de Faraday

L'équation de Poisson, qui donne l'évolution du potentiel en fonction de la densité de charges locale, est, quant à elle, donnée par :

$$\frac{d^2 \phi}{dz^2} = \frac{-\rho}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (2.4)$$

En couplant alors ces deux dernières équations, on retrouve l'évolution du potentiel perpendiculairement à la surface (selon z) à travers l'équation de Poisson-Boltzmann :

$$\frac{d^2 \phi}{dz^2} = \frac{-F}{\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_i C_{\infty,i} Z_i \exp\left(\frac{-F Z_i \phi(z)}{RT}\right) \quad (2.5)$$

L'approximation de Debye-Hückel pour un potentiel suffisamment faible (cas où $F\phi/RT \ll 1$) simplifie la résolution de l'équation en :

$$\phi(z) = \zeta \exp(-y/\lambda_D) \quad (2.6)$$

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r RT}{F^2 \sum_i z_i^2 c_i^0}} \quad (2.7)$$

où l'axe z a pour origine la limite de la zone fluide (quand $z > 0$ les ions peuvent diffuser) et ζ correspond à la valeur du potentiel quand $z=0$. Ce potentiel peut être relié à la charge effective de surface σ_S par une relation de proportionnalité en introduisant la capacité surfacique de la couche diffuse C_{CD} :

$$\sigma_S = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta}{\lambda_D} = C_{CD} \zeta \quad (2.8)$$

Lors de l'application d'un champ électrique aux bornes du capillaire, les cations de la couche compacte subissent des interactions électrostatiques fortes de la part des groupements silanol de la paroi du capillaire. En revanche, les cations de la couche diffuse, bien qu'attirés par les groupements silanol ionisés, vont migrer vers la cathode et entraîner, via des phénomènes de friction, l'ensemble des molécules de l'électrolyte. **Ceci est le phénomène d'électroosmose, qui consiste en un écoulement général du contenu du capillaire en direction de la cathode, en raison de la charge de surface négative de la silice.** Ce phénomène se produit dès que l'on applique un champ électrique à un fluide (même en l'absence de protéine). Ce mouvement de liquide induit est connu sous le nom de **Flux ElectroOsmotique**, que l'on dénommera flux EOF dans la suite de ce manuscrit. Lorsque la couche diffuse est petite devant la section du capillaire, le flux EOF est un écoulement de type "bouchon" où la vitesse du liquide est homogène (voir Figure 2.3).

Il existe une relation simple entre la vitesse de cet écoulement et le potentiel ζ lié à la double couche :

$$\vec{v}_x(z) = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{\eta} (\phi(z) - \zeta) \vec{E}_x \quad (2.9)$$

η étant la viscosité du liquide

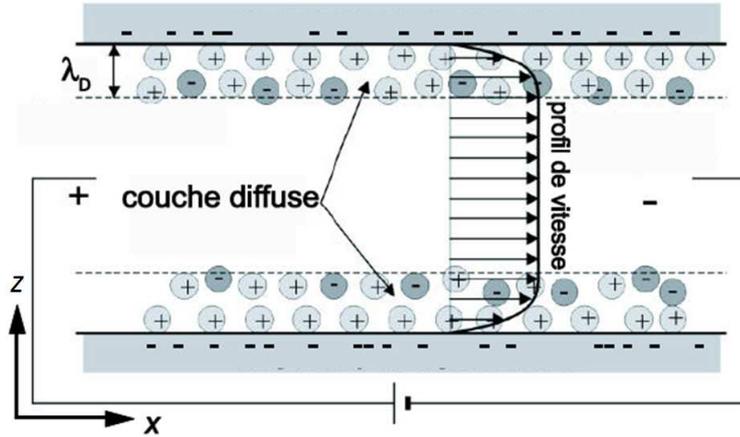


FIGURE 2.3 – Flux électroosmotique EOF induit par le déplacement de la couche diffuse sous l'effet d'un champ électrique externe.

La vitesse electroosmotique est alors définie comme étant la valeur limite pour laquelle le recouvrement des couches est négligeable et le potentiel électrique au centre du capillaire est nul. D'après l'expression de Helmholtz-Smoluchowski, cette vitesse s'exprime par :

$$\vec{v}_{EOF} = -\epsilon_0 \epsilon_r \frac{\zeta}{\eta} \times \vec{E} \quad (2.10)$$

$$\vec{v}_{EOF} = \mu_{EOF} \times \vec{E} \quad (2.11)$$

où μ_{EOF} est la mobilité electroosmotique définie par :

$$\mu_{EOF} = -\epsilon_0 \epsilon_r \frac{\zeta}{\eta} \quad (2.12)$$

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

Pour un capillaire en verre, ou une puce fluidique en verre comme celles que nous utiliserons, le potentiel zeta est négatif et la mobilité électro-osmotique est donc positive.

NB : Si la double couche devient non négligeable par rapport à la section h du capillaire, ce qui peut être le cas des nanocanaux (voir section suivante), on peut

garder une forme similaire de l'équation de Helmholtz-Smoluchowski en définissant le potentiel zeta apparent de la manière suivante :

$$\vec{v}_{EOF} = -\epsilon_0\epsilon_r \frac{\zeta_{app}}{\eta} \times \vec{E} \quad (2.13)$$

$$\zeta_{app} = \frac{1}{h} \int_0^h (\phi(z) - \zeta) dz \quad (2.14)$$

Le flux électrophorétique

Etudions maintenant la deuxième composante électrocinétique, à savoir le flux électrophorétique de l'analyte chargé. Si l'on injecte cet analyte chargé dans ce fluide en écoulement électroosmotique (à cause du champ électrique), il va aussi subir une migration électrophorétique. Cette migration correspond au phénomène de mise en mouvement d'objets chargés distribués dans une solution sous l'action d'un champ électrique. C'est, en quelque sorte, la vitesse propre de l'analyte dépendant de ses caractéristiques intrinsèques.

La vitesse électrophorétique s'exprime par :

$$\vec{v}_{EP} = \mu_{EP} \times \vec{E} \quad (2.15)$$

où μ_{EP} est la mobilité électrophorétique définie par :

$$\mu_{EP} = \frac{Z}{6\pi\eta r} \quad (2.16)$$

avec Z : la charge de l'analyte
 r : son rayon de Stokes
 η : la viscosité du liquide.

Résumons ci-dessous cette introduction sur les phénomènes électrocinétiques.

Si l'on injecte un analyte dans un fluide que l'on soumet à un champ électrique, il sera soumis à deux flux : le flux électroosmotique (subi par l'analyte), qui est lié à la charge de surface des parois en verre, et le flux électrophorétique spécifique à l'analyte. On peut faire ici une analogie très simple pour bien comprendre ce phénomène. Prenons le cas d'une personne qui emprunte un tapis roulant. Si le tapis est alimenté en électricité et donc en marche (dans notre cas c'est l'application du champ électrique), une personne qui se déplace dessus aura une vitesse égale à la somme de la vitesse du tapis (la vitesse électroosmotique) et de sa propre vitesse

de marche (la vitesse électrophorétique). Ainsi, la vitesse d'un analyte est définie par la relation :

$$\vec{v}_{tot} = \vec{v}_{EOF} + \vec{v}_{EP} = (\mu_{EOF} + \mu_{EP}) \times \vec{E} \quad (2.17)$$

Puisque la vitesse électrophorétique dépend des caractéristiques propres de l'analyte, deux analytes différents n'auront pas la même mobilité électrophorétique et il sera alors possible de les séparer.

Dans le cas d'analytes chargés négativement, les mobilités électrophorétiques sont négatives. La mobilité électro-osmotique étant positive, les deux migrations décrites précédemment sont alors en compétition. Ainsi, si l'on est capable de trouver des conditions pour lesquelles les deux flux se compensent exactement, la vitesse totale de l'analyte sera nulle. **On aura alors ce que l'on appelle un point focal et donc la possibilité de concentrer la molécule à cet endroit précis.**

2.2 Electrophorèse dans des nanocanaux

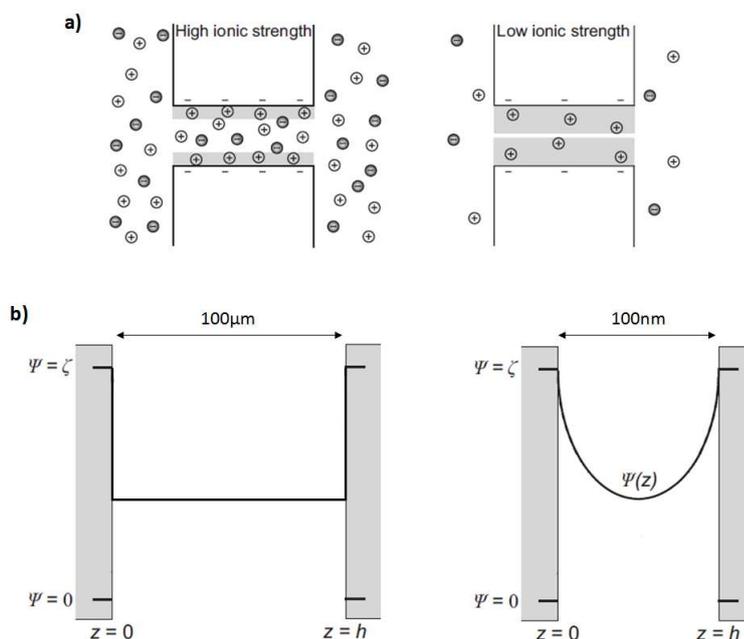


FIGURE 2.4 – a) La double couche électrique (EDL, partie grisée) à haute force ionique est fine ce qui permet aux co-ions de traverser le nanocanal. A faible force ionique, l'épaisseur de l'EDL augmente ce qui rend le nanocanal imperméable aux contre ions. b) Représentation schématique de la distribution de potentiel dans un canal micrométrique (à gauche) ou nanométrique (à droite) de hauteur h dans la direction z .

Puisque la composante électroosmotique est basée sur l'influence du champ électrique sur la double couche électrique EDL, des phénomènes électrocinétiques très spécifiques vont apparaître au cours d'expériences d'électrophorèse dans des nanocanaux fluidiques [57]. En effet, la couche diffuse présente une épaisseur typique variant de quelques nanomètres à la centaine de nanomètres en fonction de la force ionique de l'échantillon (voir Figure 2.4 (a)). Dans un nanocanal, l'épaisseur de la couche EDL avoisinera dans certaines conditions la hauteur du canal. La distribution du potentiel électrique sera alors beaucoup plus complexe que dans le cas d'un canal de dimension micrométrique (Figure 2.4 (b)) et **le nanocanal va se comporter comme un "super-filtre" qui sera plus ou moins perméable aux analytes chargés négativement**. En fonction de la hauteur du nanocanal et de la force ionique de la solution, il pourra y avoir recouvrement de la double couche électrique qui se produit lorsque la hauteur de la fente est quasiment la même que la hauteur de la double couche électrique (Figure 2.4 (a)). Dans ce cas là, on a un nanocanal extrêmement peu perméable aux ions et pouvant présenter un fort potentiel de préconcentration.

A de telles dimensions nanométriques, on a une forte compétition entre trois types de forces : visqueuses, électrostatiques et diffusives (voir Figure 2.5). Ce couplage particulier permet d'obtenir des propriétés de transport très intéressantes que l'on retrouve aussi bien dans des systèmes biologiques naturels que dans des systèmes artificiels.

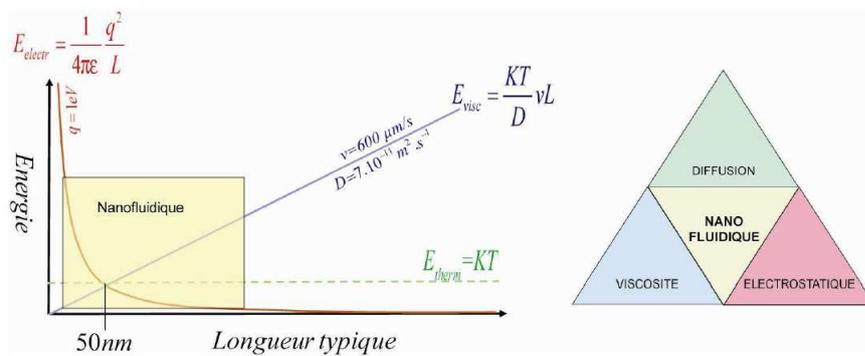


FIGURE 2.5 – Compétition entre les forces visqueuse, électrostatique et diffusive. La nanofluidique se place à la conjonction de ces trois forces. [extrait de la thèse d'A.Plécis [14]]

La nature nous en donne plusieurs exemples et nous démontre parfaitement, depuis des milliers d'années, l'implication du transport nanofluidique dans le système du vivant. Ainsi, l'un des organes vitaux du corps de chaque être vivant, le rein, présente une membrane nanoporeuse et assure, par filtration, l'équilibre hydro-électrolytique du sang et de l'organisme en général. Cette filtration repose sur deux processus : une exclusion stérique et une dépendance forte en charge des molécules filtrées ; plus la charge est négative et moins les molécules passeront

dans l'urine. Ce sont les groupements chimiques chargés négativement et répartis irrégulièrement sur la membrane qui confèrent le caractère sélectif au tri effectué par le rein. **On retrouve ici une propriété de charge de surface très similaire à celle des nanocanaux en verre que nous allons étudier.**

En s'inspirant de la nature, les scientifiques ont donc petit à petit développé des structures nanofluidiques artificielles à commencer par les nano-pores (voir Figure 2.6). Les nanopores sont des petits trous dans une fine membrane, généralement juste assez grands pour permettre à une seule molécule d'ADN de traverser [62]. Ils peuvent être extraits d'organismes vivants ou bien être fabriqués par des procédés de nanotechnologie. Ce sont de puissants capteurs de molécules et d'ions, et ils ont des applications potentielles dans de nombreux domaines technologiques. Grâce à l'avènement des techniques de microstructuration, la recherche s'est ensuite portée sur la création de nanocanaux uni- ou bi-dimensionnels. Ces derniers sont fabriqués soit par des technologies "dures" (gravure lente peu profonde d'un substrat puis collage thermique ou anodique pour fermer le canal) [7, 63, 64], des techniques de couche sacrificielle [65] ou par nano-impression[66] (voir la Figure 2.7). Enfin, depuis quelques années, l'un des grands sujets "à la mode" est l'utilisation de nanotubes de carbone. Ils suscitent un énorme intérêt dans le monde de la recherche, autant fondamentale qu'appliquée, car leurs propriétés sont exceptionnelles à bien des égards. D'un point de vue mécanique, ils présentent à la fois une excellente rigidité, comparable à celle de l'acier, tout en étant extrêmement légers. On estime en effet que la résistance des nanotubes de carbone est environ 100 fois supérieure à l'acier pour un poids 6 fois moindre.

Les objets nanométriques sont donc en pleine expansion, et il n'est donc pas étonnant de voir certains groupes de recherche intégrer cette dimension nanométrique dans des applications d'électrophorèse. Etant donné le très faible volume des nanocanaux, le nombre de molécules pouvant transiter à travers ceux-ci devient rapidement très faible, voire nul. On a alors une forte dissymétrie des concentrations cationiques et anioniques qui conduit à l'effet dit de **Déplétion/Enrichissement** et qui est responsable des propriétés de transport, dites "charges-sélectives", typiques à la nanofluidique. Il s'agit alors de profiter de ces propriétés particulières pour forcer des biomolécules chargées à se préconcentrer à l'entrée de tels canaux nanométriques sous l'influence d'un champ électrique. Plusieurs études expérimentales ont exploitées ce phénomène ces dix dernières années, mais la principale difficulté pour l'interprétation des phénomènes électrocinétiques mis en jeu résulte en la multitude d'observations, souvent contradictoires, quant à la préconcentration obtenue, qu'il s'agisse de la localisation du point focal de préconcentration ou du taux (c/c_0) de préconcentration obtenu.

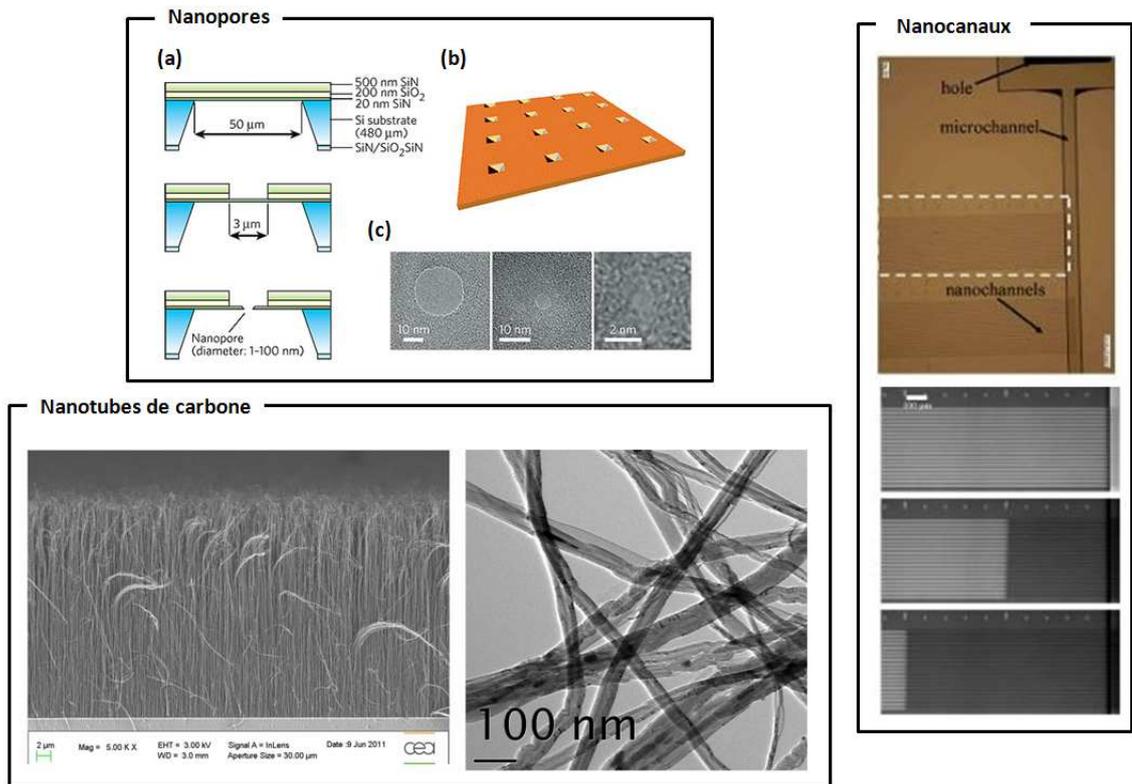


FIGURE 2.6 – Différentes structures nanofluidiques artificielles. **Nanopores** : (a) Schéma de la fabrication d'un nanopore en nitrure de silicium en trois étapes. (b) Image AFM d'un réseau de pores sur une puce. (c) Image TEM de 3 nanopores différents. [67] **Nanocanaux** : Images des nanocanaux silicium-verre fabriqués par une équipe du LAAS [68]. **Nanotubes de carbone** : Croissance homogène de tapis de nanotubes sur la surface d'une plaquette de silicium de 300 mm de diamètre et image TEM montrant la propreté des nanotubes [69].

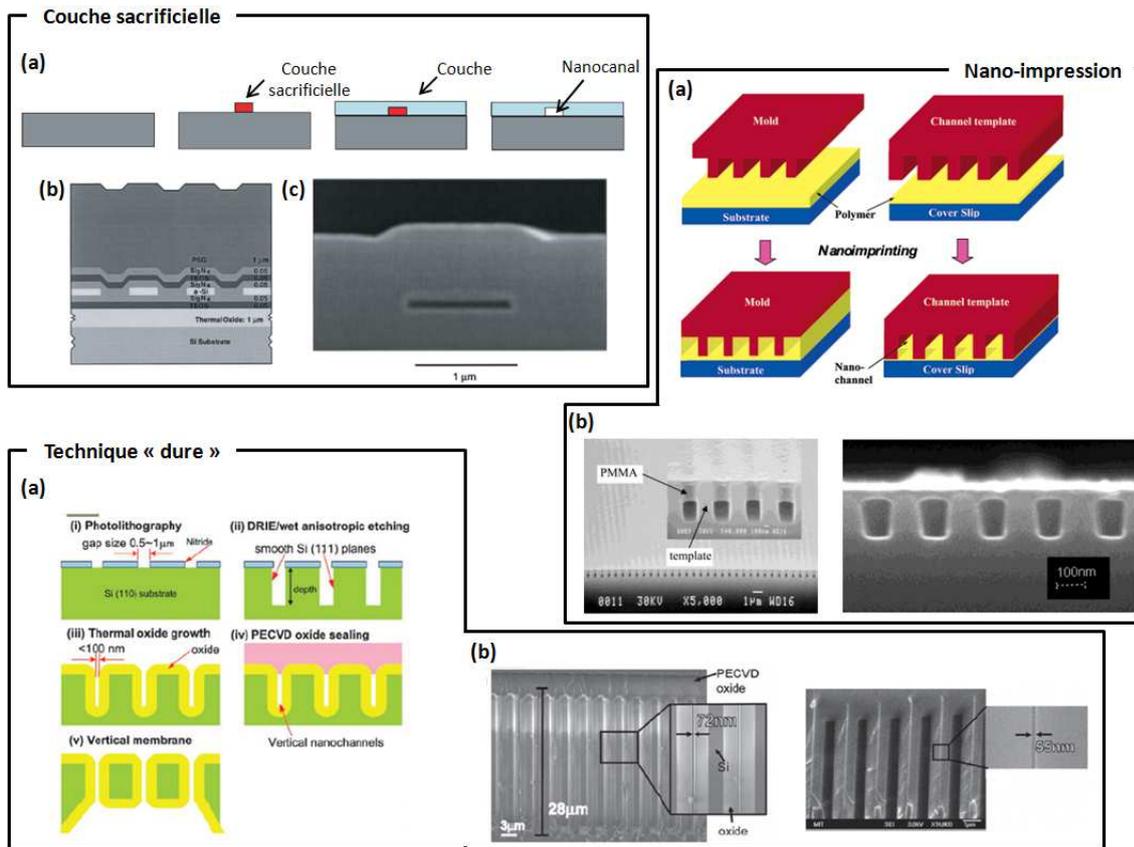


FIGURE 2.7 – Présentation de différentes techniques de fabrication des nanocanaux. **Couche sacrificielle** : (a) Schéma résumé du procédé de fabrication de couche sacrificielle permettant d’obtenir un dispositif nanofluidique. (b) Schéma du procédé de fabrication, avec couche sacrificielle, utilisé par Stern et al. [70]. (c) Microscopie électronique du nanocanal, vu en coupe, obtenu après gravure sélective du α -Si par rapport au Si_3N_4 avec une solution à base de TMAH (voir chapitre 3 pour la définition des ces termes). **Nano-impression** : (a) Schémas des procédés de nano-impression. A gauche : procédé NIL conventionnel en utilisant un moule avec en surface des motifs pour imprimer dans une couche de polymère. A droite : fabrication de canaux nanofluidiques en utilisant un moule pour imprimer dans une fine couche de polymère pour laisser des canaux creux et fermés. (b) et (c) Images TEM des canaux nanofluidiques de Guo et al. [66] fabriqués par nano-impression, de dimensions $300(l) \times 500nm(h)$ et $75 \times 120nm$ respectivement. **Technique “dure”** : (a) Schéma de la fabrication des nanocanaux verticaux de Han et al. [71] (i) photolithographie ; (ii) gravure sèche RIE ou humide KOH ; (iii) croissance thermique d’oxyde ; (iv) PECVD ; (v) gravure du Si. (b) Images TEM des nanocanaux verticaux de $28\mu m$ de profondeur et espacés entre eux de $72nm$ et $55nm$.

2.2.1 Etat de l'art de la préconcentration en nanofluidique

L'électropréconcentration au sein de puces intégrant des nanofentes ou des nanocanaux est donc possible grâce au caractère de perméabilité sélective de la nanofente, qui se comporte sous champ électrique comme un "super-filtre" moléculaire permettant le passage ou non des biomolécules [72, 73, 74, 75, 76].

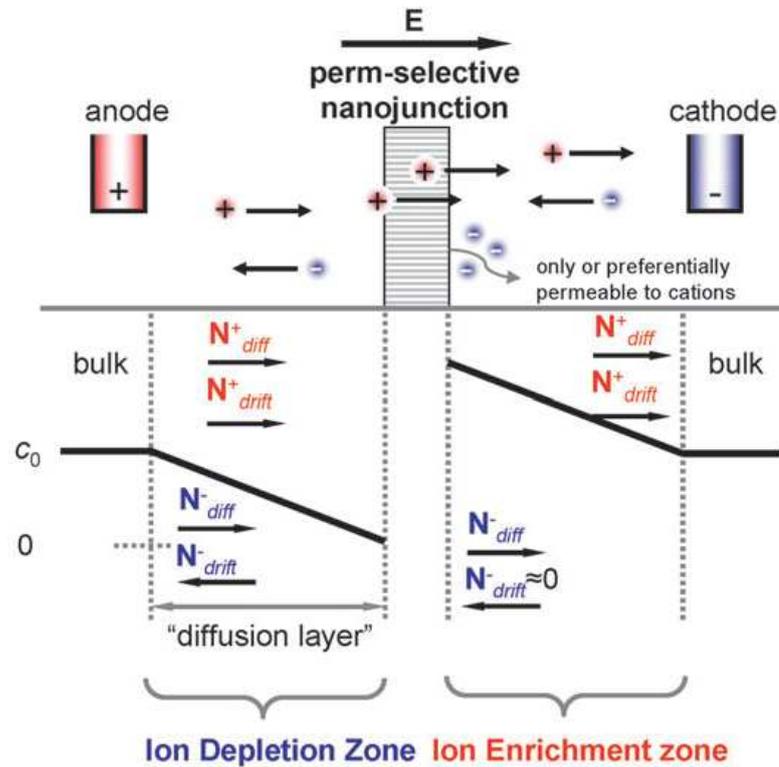


FIGURE 2.8 – Schéma de la distribution de la concentration en ions en amont et en aval d'une nanostructure à perméabilité sélective qui ne laisse traverser que les cations. N^+ et N^- sont les flux des cations et des anions, respectivement, où les indices *diff* et *drift* représentent respectivement les transports ioniques diffusifs et de dérive. E est le champ électrique appliqué à travers la membrane.

Dans une nanofente fluidique, les espèces anioniques et cationiques ne sont donc pas transportées de manière symétrique, ce qui produit un phénomène de déplétion en ions dans le microcanal anodique en amont de la fente, et simultanément un enrichissement en ions dans le microcanal cathodique. Ce phénomène appelé **Polarisation de la Concentration ionique (CP)** [77, 78] permet de piéger les analytes dans l'un ou l'autre des microcanaux réservoirs (anodique ou cathodique).

Les premières démonstrations expérimentales et théoriques de ce phénomène de “déplétion/enrichissement” et la perméabilité sélective de ces nanofentes a été étudiée pour la première fois en 2005 par A. Plécis, lors de son stage à l’EPFL [77]. Puisque les deux EDL en vis à vis ont des épaisseurs qui approchent celle de la hauteur de la nanofente, une barrière électrostatique existe aux interfaces entre les microcanaux et la nanofente, réduisant fortement le transport par diffusion. Par des expériences de diffusion passive de biomolécules à travers une nanofente, A. Plécis avait démontré expérimentalement qu’en modulant la taille de l’EDL par la force ionique de la solution (Figure 2.2), l’effet de répulsion de l’EDL pour les espèces négatives réduit le transport (Figure 2.9). Au contraire, l’attraction dans l’EDL des espèces positives entraîne un “sur-transport” des cations.

Si l’on s’intéresse d’un peu plus près à ces expériences, on voit qu’à faible force ionique, on observe ce qu’on peut appeler un “rétrecissement électrostatique” de la fente, tel que décrit schématiquement sur la Figure 2.9 (a). A force ionique élevée, le flux ϕ^* peu être considéré proportionnel à la section géométrique S^* , tandis que lorsque l’EDL devient plus grande à faible force ionique, la section effective S_{eff} par laquelle les anions peuvent diffuser est réduite, ce qui entraîne un flux effectif ϕ_{eff} plus petit. Cependant, même si cette description schématique est très intuitive dans le cas du transport anionique, l’idée d’une augmentation de la section efficace est peut-être moins évidente dans le cas de cations. La Figure 2.9 (b) donne une description plus précise de l’effet de déplétion/enrichissement sur le flux pour les anions (ligne grise) et les cations (ligne noire) par rapport aux espèces neutres diffusantes (ligne pointillée). La principale conséquence de cet effet est de créer une surconcentration de cations (respectivement une sousconcentration d’anions) dans le nanocanal. Cela induit une augmentation (respectivement une diminution) de la pente du profil de concentration qui est proportionnelle au flux, donc une perméabilité effective supérieure (respectivement inférieure). Expérimentalement (Figure 2.9 (c)), A.Plécis a donc mis clairement en évidence la perméabilité sélective de ces structures confinées selon la force ionique de la solution.

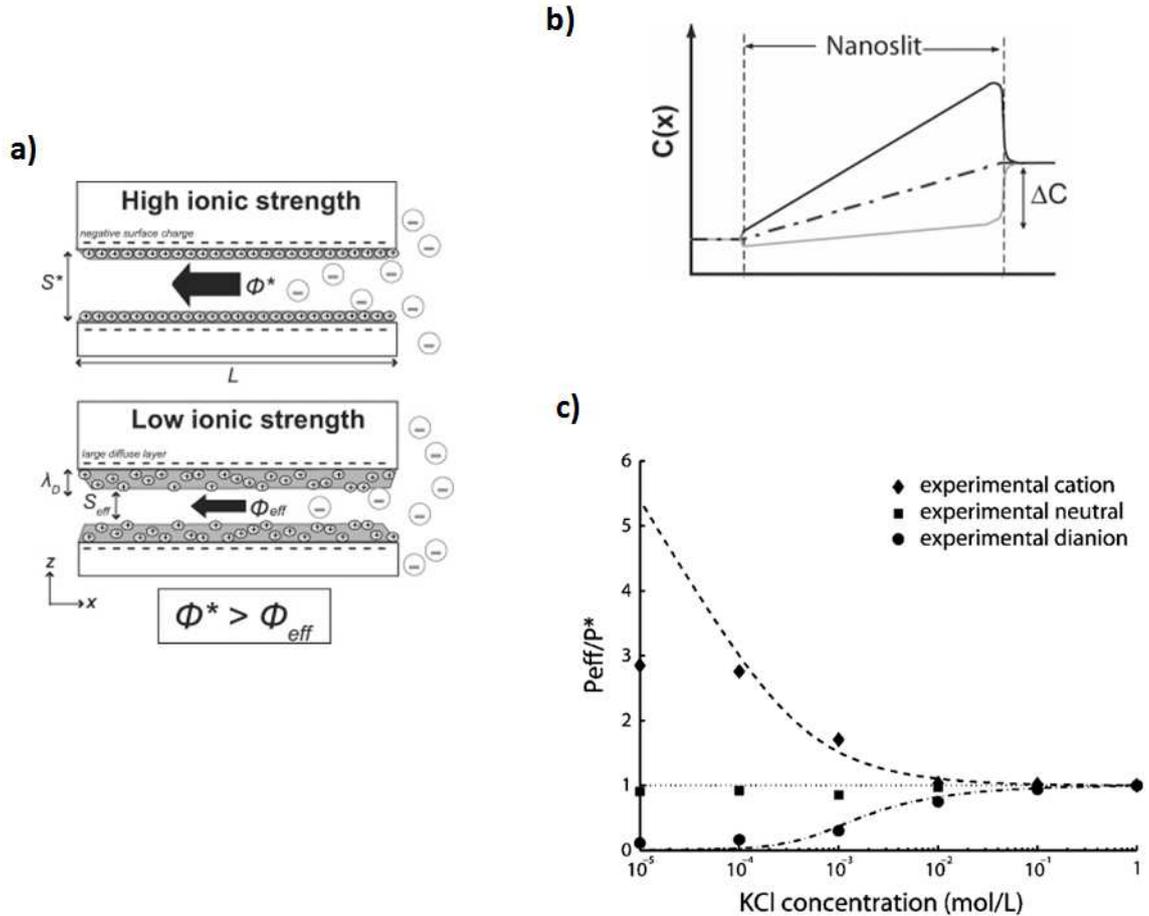


FIGURE 2.9 – a) Schéma de principe de l'effet d'exclusion sur le transport anionique. A force ionique élevée, il y a beaucoup de contre-ions (cations) en solution, et la charge de surface négative du verre est immédiatement écrantée de sorte que les anions (co-ions) puissent diffuser librement dans toute la section géométrique de la fente S^* . Le flux instantané sans interactions électrostatiques ϕ^* est proportionnel à S^* . A faible force ionique, les contre-ions sont moins nombreux et moins efficaces pour protéger la charge de surface négative. L'épaisseur de l'EDL λ_D augmente, de par l'augmentation de la couche diffuse, et, puisqu'elle est principalement composée de cations, la section efficace S_{eff} (à travers laquelle les anions peuvent diffuser) diminue. Il en résulte un flux effectif ϕ_{eff} plus faible. b) Profil de concentration des espèces diffusantes à travers la nanofente. La ligne en pointillé représente le profil de concentration linéaire pour les espèces diffusantes qui n'interagissent pas, tandis que les lignes continues montrent le changement de profil de concentration dans le nanocanal. Aux entrées du nanocanal, les espèces chargées sont discriminées par potentiel électrostatique dans la nanofente. L'effet de déplétion/enrichissement se traduit également par une augmentation de flux des contre-ions (représentée par la ligne noire) et une diminution de flux des co-ions (représentée par la ligne grise), de sorte que ce flux soit proportionnel au gradient local de concentration (la pente du profil de concentration de la nanofente). c) Variation de la perméabilité relative d'un nanocanal de $3\mu\text{m}$ de long en fonction de la force ionique pour différentes charges. Les points représentent les mesures expérimentales tandis que les lignes pointillées sont des fits théoriques. La surface du verre est chargée négativement ce qui a pour effet d'exclure les anions quand il y a recouvrement de l'EDL à faible concentrations de KCl. Au contraire, les cations sont attirés par la fente ce qui facilite leur transport vers l'autre microcanal. [77]

Le potentiel de cette technique pour obtenir de forts taux de préconcentration a été prouvé pour la première fois au MIT à la même époque [79]. La méthode alors utilisée est basée sur le couplage piégeage électrocinétique/flux électroosmotique non linéaire dans une structure composée d'un nanocanal perpendiculaire à 2 microcanaux (Figure 2.10 (a)). Elle consiste à appliquer successivement deux champs électriques distincts : un premier champ E_n est appliqué dans le nanocanal pour créer le phénomène de déplétion puis un second champ E_T est appliqué dans le microcanal anodique afin de générer un flux électroosmotique non linéaire (aussi appelé "électroosmose de second type"). L'application de ces 2 champs permet une accumulation rapide des biomolécules en amont de la zone de déplétion. En fait, l'application de E_n permet d'obtenir l'effet bien connu de **Polarisation de la Concentration** ionique (ICP ou CP en anglais), qui est d'autant plus important que l'épaisseur de la couche de Debye est grande. Nous expliquerons de manière plus détaillée un peu plus loin cet effet de polarisation CP, qui est à l'origine des propriétés exceptionnelles de "super-filtre" de la structure. Au dessus d'une certaine valeur de E_n , il apparaît un nouveau régime non linéaire déjà observé dans les membranes nanoporeuses. On a formation d'une double couche électrique induite qui brise l'électroneutralité et repousse les biomolécules. Lorsque E_T est ensuite appliqué, on obtient un flux électroosmotique fort ce qui permet de piéger les biomolécules à l'interface.

Grâce à cette technique, ces auteurs sont parvenus à concentrer une protéine fluorescente, la GFP, avec un taux de préconcentration de 10^7 en 1h seulement (Figure 2.10 (b)). Indépendamment de la valeur "record" obtenue pour ce taux d'électropréconcentration, on remarque que le front d'électropréconcentration est situé dans le réservoir anodique, dans la zone de déplétion en ions.

Un an après, Schoch et al., à l'EPFL, ont aussi étudié la préconcentration de la GFP dans un système nanofluidique [80]. Avec un système similaire de deux microcanaux séparés par un nanocanal, ils ont préconcentré la même molécule sous un champ électrique tout près de la nanofente. Cette fois, l'électropréconcentration a lieu dans le réservoir cathodique, c'est-à-dire dans la zone d'enrichissement en ions. Ces auteurs ont mesuré des facteurs de préconcentration qui sont dépendants du champ électrique externe appliqué et du temps de préconcentration. Comme on peut le voir sur la Figure 2.11, l'intensité de fluorescence la plus élevée obtenue sous l'application d'un potentiel de 10V correspond à une concentration de la GFP de $23,9\mu\text{M}$ après 9 minutes. La concentration initiale de la GFP injectée dans le dispositif étant de 37nM , cela signifie que le taux d'électropréconcentration valait 600 pour cette expérience.

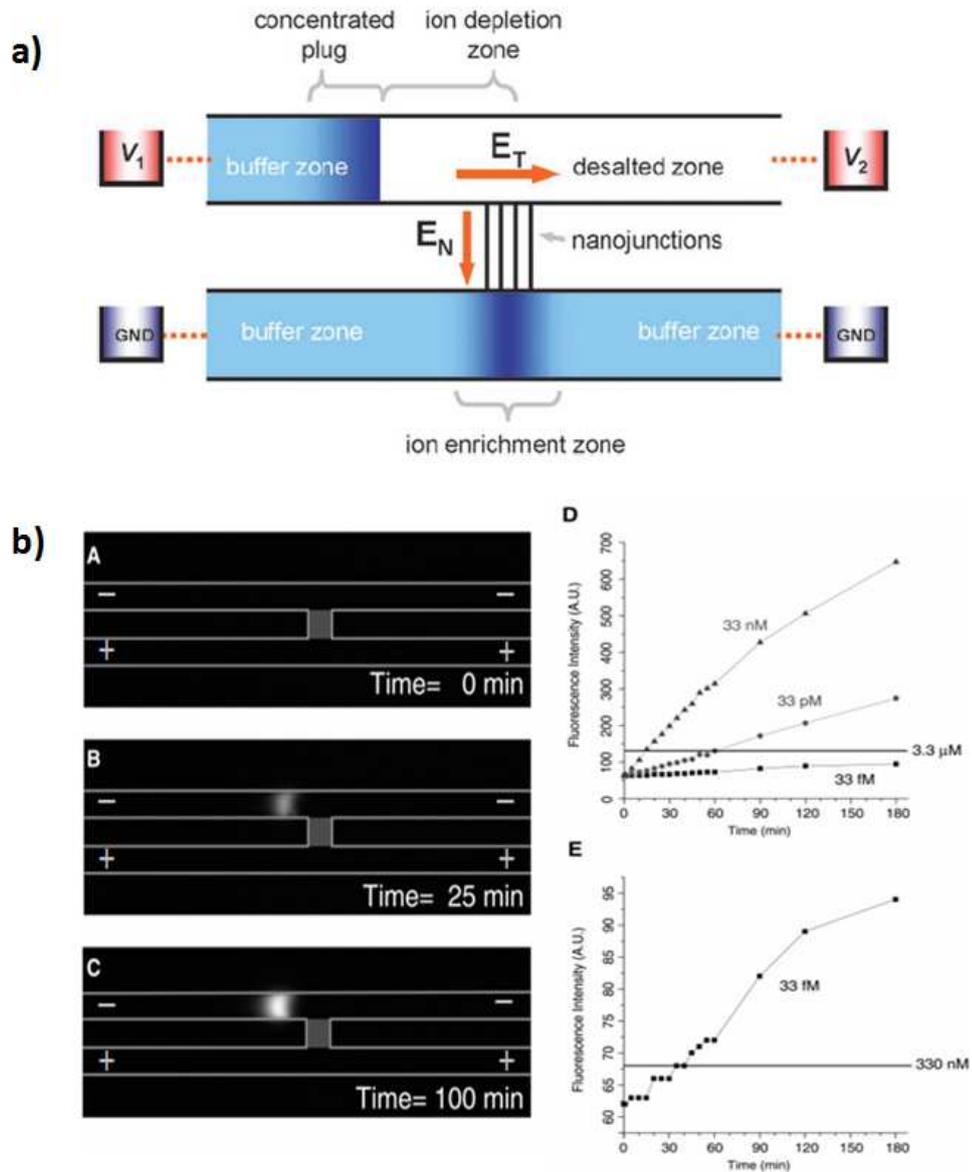


FIGURE 2.10 – Système nanofluidique de concentration de protéines de Wang et al [79] : a) Schéma du dispositif et du principe de la technique. Une fois que les tensions appropriées sont appliquées, la zone de piégeage et la zone de dépletion se forment comme indiquées sur le dessin. E_T représente le champ électrique appliqué au travers de la zone de dépletion tandis que E_n est le champ électrique appliqué dans le nanocanal. b) Résultats obtenus avec ce dispositif pour une préconcentration après 3h pour différentes concentrations. (A) Image pour la GFP à 33 μ m, juste après l'injection de l'échantillon dans le canal microfluidique du haut. (B) Image prise après avoir appliqué $V_S=10V$, $V_D=5V$, et $V_{B1}=V_{B2}=0V$ pendant 25min. (C) Image prise après 100min pour les mêmes valeurs de tensions que (B). (D) Préconcentration de solutions GFP diluées pour trois concentrations initiales différentes. (E) Gros plan sur l'expérience à la concentration de 33fM dans (D).

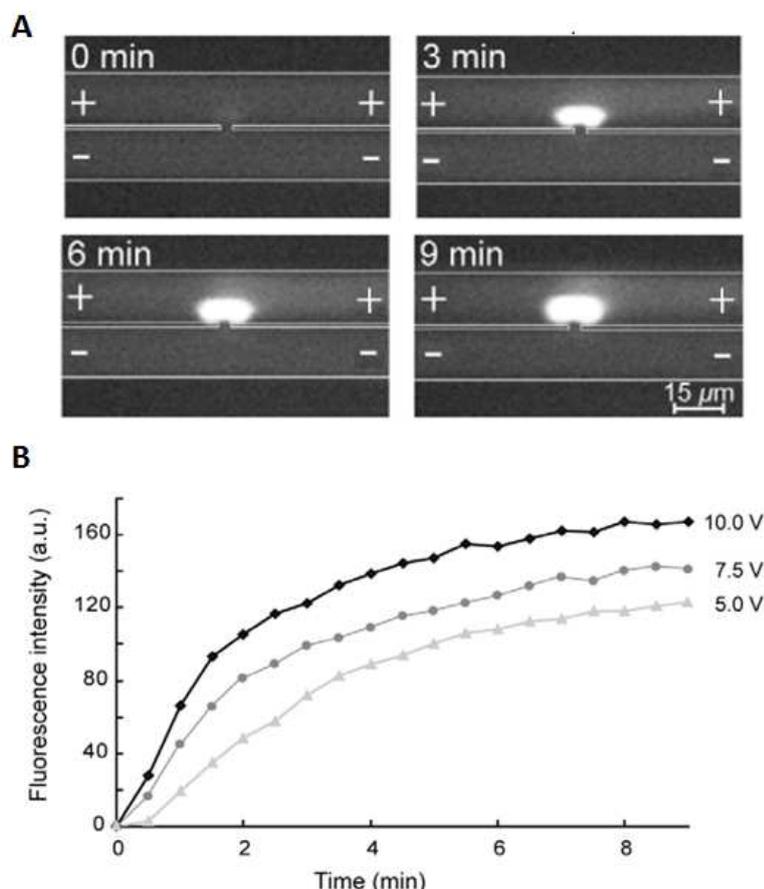


FIGURE 2.11 – Système nanofluidique de préconcentration de protéines de Schoch et al [80] : (A) Images de fluorescence de la zone de préconcentration de la protéine qui augmente en taille et en intensité au cours du temps (ici pour 0, 3, 6, et 9min à 10V) à l’entrée du nanocanal. (B) Préconcentration de la GFP en fonction du temps pour différentes valeurs de champ électrique. La relation linéaire entre la concentration de GFP et l’intensité de fluorescence mesurée a permis de calculer une concentration de $23,9\mu\text{M}$ à 10V après 9min ce qui correspond à un facteur de préconcentration supérieur à 600 fois.

La préconcentration d’une protéine grâce à un nanocanal entre deux microcanaux présente donc clairement des résultats très encourageants. Toutefois, les deux expériences que nous venons de rapporter montrent qu’il existait, il y a 8 ans, des controverses, tant sur la localisation du front de préconcentration (réservoir anodique ou cathodique) que sur l’efficacité de la méthode (taux de préconcentration). Des deux expériences que nous venons de citer, on s’aperçoit en effet que, pour un même analyte (en l’occurrence la GFP), la localisation du point focal de préconcentration différait. En effet, alors que le groupe du MIT avait obtenu un point focal dans le réservoir anodique en amont de la région de déplétion, la préconcentration obtenue par le groupe de l’EPFL s’effectuait dans le réservoir cathodique. Ces deux expériences permettent déjà d’appréhender la complexité du phénomène d’électropréconcentration. Les phénomènes électrocinétiques mis en jeu étant complexes, peu de groupes ont cherché à les analyser et à les prédire.

Ces quelques groupes [77, 78, 80, 81, 82, 83] ont développé des calculs numériques, qui permettent de prédire l'effet CP et de déterminer la concentration de l'analyte, en fonction du temps t en tout point de la structure. On conçoit que ces calculs numériques ne soient pas simples à mettre en oeuvre. Nous résumerons certaines simulations prédictives de A. Plecis un peu plus loin dans ce chapitre.

2.2.2 Principe de l'électropréconcentration à travers un nanocanal

2.2.2.1 Effet de polarisation de la concentration ionique

Pour à la fois séparer et préconcentrer des analytes sur puce, la technique que nous avons choisi d'étudier consiste donc à réduire localement un microcanal en un nanocanal. A cause de cette réduction locale, la nanofente agit tel un "super filtre ionique" lorsqu'un champ électrique est appliqué. Dans le reste de ce manuscrit nous appellerons cette structure particulière la structure MNM pour "Microcanal anodique/Nanofente/Microcanal cathodique", qui est une structure rectiligne, par opposition à la géométrie en H couché des deux premières expériences du MIT et de l'EPFL citées précédemment. Le choix d'une structure rectiligne s'est imposé de lui-même puisqu'il permet de simplifier les calculs théoriques prédictifs.

Tentons de décrire le phénomène qui se produit dans une telle structure MNM (Figure 2.12). Un nombre arbitraire de charges initiales a été choisi afin d'illustrer le phénomène.

Si l'on applique une différence de potentiel entre les deux électrodes situées aux extrémités du canal, on a l'apparition d'une mise en mouvement des ions. Les espèces chargées positivement dans le liquide sont attirées par la cathode et une grande partie d'entre elles traverse la nanofente. Afin de respecter l'électroneutralité en toute section du canal, une partie des cations s'immobilise à l'interface Nano/Micro du côté cathodique. Les espèces négatives, quant à elles, subissent aussi une forte attraction mais cette fois-ci de la part de l'anode. Cependant, à cause de la réduction de section et du fait que le verre soit chargé négativement, ces espèces peuvent très difficilement traverser le nanocanal : elles sont repoussées et restent bloquées à l'interface Nano/Micro du côté cathodique.

Comme la Figure 2.12 le décrit, on observe donc un déséquilibre de chaque côté de la nanofente : on a une déplétion en ions dans le microcanal anodique (à gauche de la structure MNM) alors que l'on a un enrichissement en ions dans le canal cathodique (à droite). C'est le phénomène de "Déplétion/Enrichissement" qui conduit à un profil très particulier de la distribution spatiale de la concentration tout au long de la structure MNM. Il s'agit du phénomène de **Polarisation de la Concentration** ionique, cité précédemment, et appelé CP dans la littérature [57, 78].

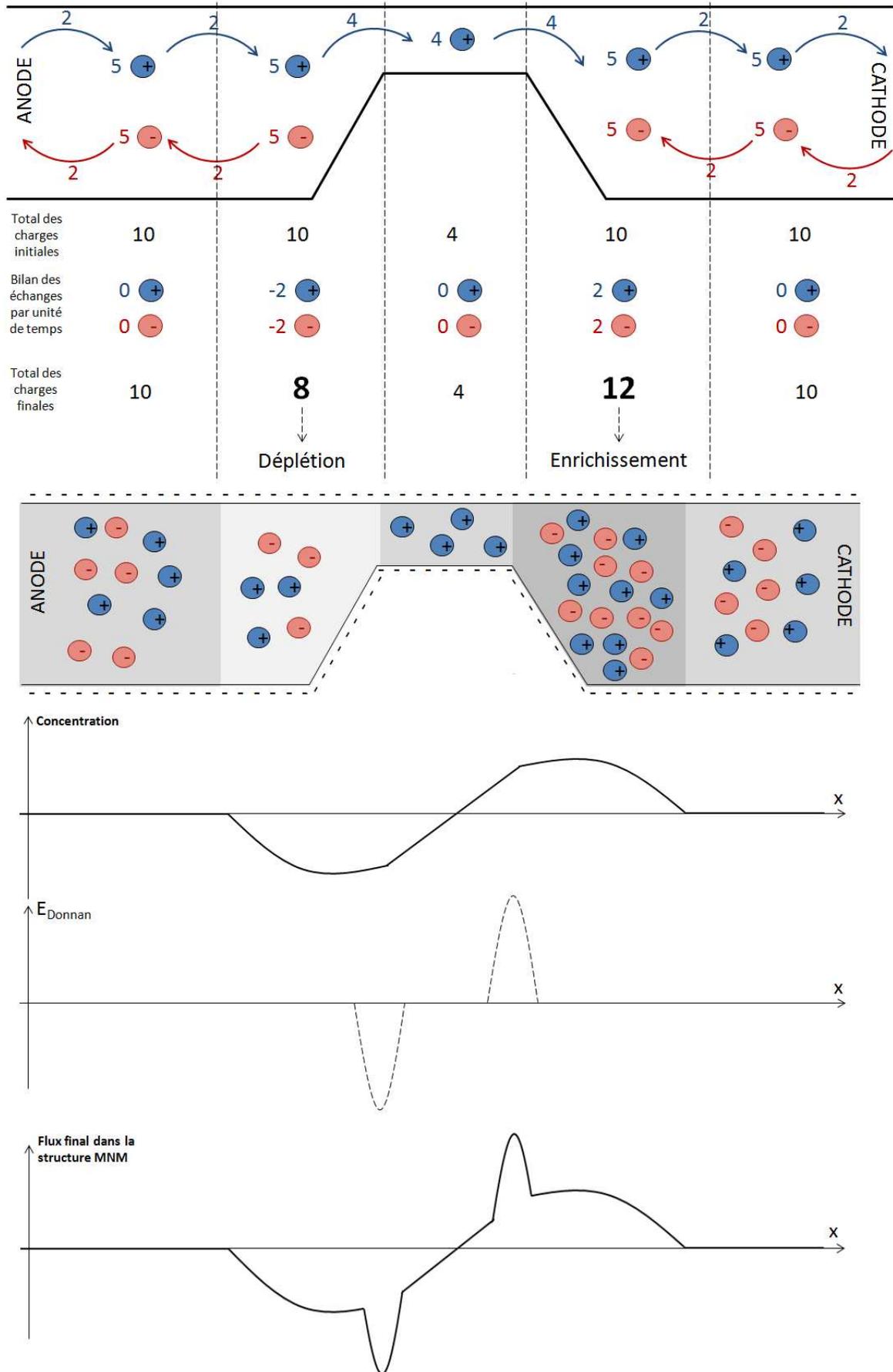


FIGURE 2.12 – Schéma de principe du transport ionique et des variations de flux dans une structure Micro/Nano/Micro fluidique - d'après la thèse de A.Plécis [14]

Dans l'électrophorèse capillaire standard, le champ électrique et la vitesse du liquide sont homogènes le long du capillaire, ce qui résulte en une vitesse constante des molécules dans tout le capillaire. Dans notre cas, puisque la section du canal MNM n'est pas constante, la vitesse du liquide et le champ électrique vont varier au passage de la nanofente, et il est plus approprié de considérer un coefficient de transport, le flux total, qui est défini par la somme des deux composantes électrophorétique et électro-osmotique :

$$\vec{J} = S\vec{v} = \vec{J}_{EOF} + \vec{J}_{EP} = \vec{J}_{EOF} + (\mu_{EP}) \times S\vec{E} \quad (2.18)$$

où μ_{EP} est la mobilité électrophorétique de la particule, E est le champ électrique local, S est la section locale dans la structure MNM et J_{EOF} est le flux électro-osmotique.

Pour un liquide incompressible, J_{EOF} est constant, ce qui signifie que la variation de J dans la structure MNM est principalement due à la variation du champ électrique, tandis que le flux de liquide J_{EOF} est responsable d'une translation du coefficient de transport.

A cause de cet effet de polarisation CP et de la distribution hétérogène des espèces chargées de chaque côté des deux interfaces micro/nano, un potentiel électrique apparaît appelé **potentiel Donnan** [77]. Cette variation du potentiel en entrée et en sortie de la nanofente vient compliquer encore un peu plus la distribution du champ électrique et donc les flux locaux dans chacune des sections de la structure. Finalement, si l'on combine les deux effets précédents (polarisation CP et effet Donnan), on obtient un profil qualitatif du flux final en chaque point de la structure MNM tel qu'il est présenté en bas de la Figure 2.12 [83]. Si un analyte négativement chargé est injecté dans la structure puis soumis à un champ électrique, il évoluera dans un profil de flux de ce type, avec en plus sa propre composante électrophorétique.

Pour pouvoir préconcentrer un analyte à un endroit précis du dispositif, il faut que cet analyte s'accumule en un point x donné, le long de la structure MNM. Il faut donc trouver les conditions qui conduisent à un flux local nul, c'est-à-dire les conditions expérimentales pour lesquelles la courbe représentant le flux dans la structure (Figure 2.12) coupe l'axe des abscisses. L'existence d'un point focal de préconcentration en un point précis de la structure MNM signifie que les deux flux subis par l'analyte (le flux électroosmotique et le flux électrophorétique) se compensent exactement.

2.2.2.2 4 régimes de focalisation

Revenons sur les travaux qui consistent à prédire les conditions d'électropréconcentration qui vont conduire à une localisation donnée en amont ou en aval de la nanofente. Nous allons rapporter ici l'étude qui a été menée par l'équipe américaine de Stanford (équipe de Santiago) [78] et celle qui a été effectuée par A. Plecis pendant sa thèse [14]. Ces travaux sont comparables car ils sont basés sur la même structure rectiligne MNM que la structure que nous étudions dans le cadre de cette thèse. Nous introduisons donc dans cette section toutes les grandeurs et paramètres physiques qui seront nécessaires par la suite à la compréhension de ces simulations.

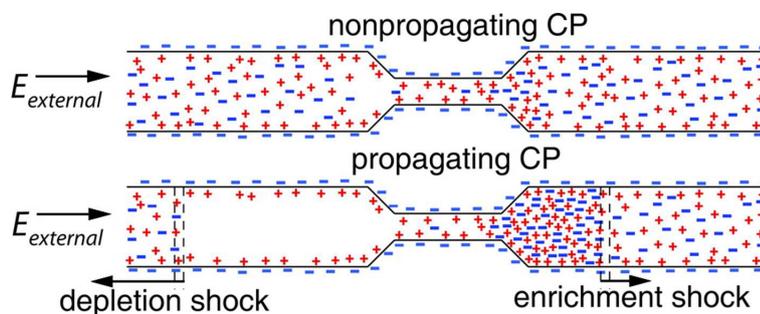


FIGURE 2.13 – Les 2 régimes CP identifiés par Santiago et al. [82] : le CP non propageant, où les effets de polarisation sont à proximité du nanocanal et le CP propageant, pour lequel les frontières des zones d’enrichissement et de déplétion s’éloignent avant d’atteindre parfois un état stationnaire loin du nanocanal en amont ou en aval.

L'équipe américaine de Santiago a identifié deux régimes pour la polarisation CP [82] : un mode propageant, donnant des régimes de préconcentration instables, et un mode non propageant, pour lequel le phénomène de préconcentration est stable et l'analyte se préconcentre en un point focal. La Figure 2.13 ci-dessus décrit ces deux modes : le mode CP sans propagation, pour lequel les effets de polarisation restent localisés à proximité de la nanofente et le mode CP avec propagation, pour lequel l'enrichissement et la déplétion s'éloignent de la nanofente pendant l'électropréconcentration. Le mode non-propageant conduit donc à une préconcentration localisée, à l'entrée (ou sortie) de la nanofente. Le mode avec propagation correspond, quant à lui, à des déplacements des frontières où la concentration en ions varie de manière très abrupte, en aval de la zone de déplétion ("depletion schock" sur la figure 2.13) ou en amont de la zone d'enrichissement ("enrichment schock" sur la figure 2.13). Il est aussi possible d'atteindre un état stationnaire ("steady state") de ces frontières. Nous verrons plus loin que deux régimes focalisants de la préconcentration, associés souvent à des taux de préconcentration très élevés, peuvent alors être obtenus dans le mode CP sans propagation avec des points focaux situés loin de la nanofente, à une centaine de microns.

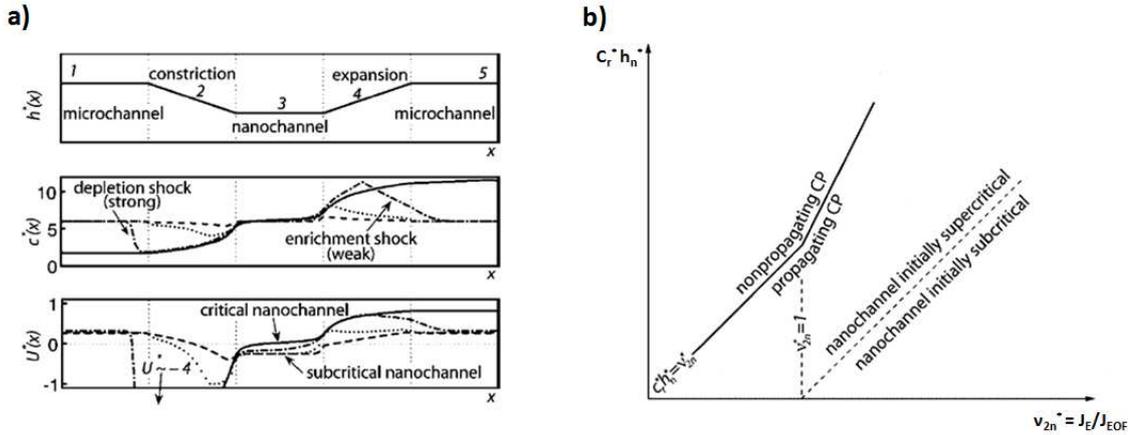


FIGURE 2.14 – a) En haut : Profil des hauteurs de canaux dans le système MNM étudié. 5 régions sont identifiées dans le canal. Les régions 1,3 et 5 ont des aires constantes. Les profils de concentration moyennés sur l'aire (au centre) et les profils de vitesse caractéristiques (en bas) pour différents temps sont représentés. La figure présente le cas d'un CP propageant où $t^*=1$ (ligne pointillée), $t^*=4$ (ligne en points), $t^*=16$ (ligne en points et pointillée) et $t^*=64$ (ligne continue). Une vitesse initiale caractéristique négative dans le nanocanal bloque la pénétration de la zone de déplétion dans la région 3 et permet un avancement de la zone d'enrichissement dans cette région. Cela augmente légèrement la concentration du nanocanal jusqu'à ce que sa vitesse caractéristique atteigne zéro. b) Les régimes CP pour une concentration dans les réservoirs sans dimension (l'inverse du nombre de Dukhin pour le nanocanal) en fonction de la mobilité des co-ions (sans dimension). La ligne continue représente la limite entre un CP propageant et un CP non propageant. La zone de CP propageant peut être divisée en trois régions délimitées par des lignes pointillées. Dans la première région (en partant de la droite), la condition initiale du nanocanal est subcritique (ligne pointillée oblique). Dans la deuxième région, le nanocanal est initialement supercritique mais atteint une condition critique à l'état stationnaire. Dans la troisième région, le nanocanal est toujours supercritique. Les états stationnaires des solutions de concentrations des régions 1,3 et 5 de la figure a) sont représentés. [82]

Dans le cas d'une solution modèle contenant seulement un ion et son co-ion, les deux paramètres clés identifiés par Santiago sont :

1. L'inverse du nombre de Dukhin, qui décrit le **rapport de la conductivité de la solution dans les microréservoirs sur la conductivité de l'EDL**, défini par $c_r^* h_n^* = (v_1 z_1 - v_2 z_2) F h_n c_r / (-2 v_1 \sigma)$ où v_i et z_i sont respectivement la mobilité et la valence de l'ion i (1 pour l'ion et 2 pour le co-ion), F est la constante de Faraday, h_n est la hauteur du nanocanal, σ est la charge de surface et c_r est la concentration du co-ion dans le réservoir. Ce paramètre $c_r^* h_n^*$ est donc le produit de la concentration normalisée c_r^* et de la hauteur normalisée de la nanofente sur la longueur de Debye $h_n^* = h_n / \lambda_D$.
2. **Le rapport de la vitesse des co-ions sur la vitesse électroosmotique** $v_{2n} = v_2 z_2 F \eta / \zeta_n \epsilon$ où ζ_n est le potentiel zeta supposé uniforme tout le long de la structure, η est la viscosité et ϵ est la permittivité.

Avant l'application d'un champ électrique, toutes les sections du canal (représentées sur la Figure 2.14 (a)) sont en équilibre avec les réservoirs et c^* est donc uniforme et égal à c_r^* . Dès qu'un courant est appliqué, on aura un enrichissement ionique dans la zone 4 (cathodique) et une déplétion ionique dans la zone 2 (anodique) comme on l'a vu précédemment. On distingue alors deux cas de figures selon les valeurs des deux paramètres que l'on vient d'introduire :

- Les faibles valeurs du paramètre $c_r^*h_n^*$ et les grandes valeurs de v_{2n} , ce qui correspond à la partie droite et basse du diagramme de phase (voir Figure 2.14 (b)), provoquent une déplétion en ions suffisamment grande à l'interface du côté du micro-réservoir anodique pour provoquer des vitesses caractéristiques négatives dans la région de déplétion. Dans ces conditions, la frontière CP de déplétion se propage dans le microcanal anodique (région 1 de la Figure 2.14 (a)), et dans le même temps la frontière CP d'enrichissement se propage dans le microcanal cathodique (région 5).
- A l'opposé, les grandes valeurs du paramètre $c_r^*h_n^*$ et les petites valeurs de v_{2n} , cas correspondant à la partie gauche et haute du diagramme de phase, génèrent des vitesses caractéristiques positives dans la zone de déplétion et il n'y a pas propagation des ions qui restent localisés en entrée (ou en sortie) de la nanofente dans le microcanal anodique (ou cathodique). Ainsi, le signe de la vitesse caractéristique dans la zone de déplétion détermine l'existence d'un mode CP qui se propage. Il est intéressant de souligner que Santiago et co-auteurs [78] ont démontré que les dimensions des microcanaux et la diffusion axiale ne jouent aucun rôle déterminant pour le caractère propagatif du CP. Les conditions pour obtenir un état limite stationnaire dans le régime CP propagatif sont donc principalement reliées à la hauteur de la nanofente, à la chimie de surface (valeur de la charge de surface) et à la mobilité du co-ion plutôt qu'à la géométrie des microcanaux réservoirs.

A la même époque, les simulations de A. Plécis [83] soulignaient que la compétition entre les forces électroosmotiques et les forces électrophorétiques non linéaires induites par l'effet CP était responsable de 4 régimes de préconcentration. L'exclusion électrostatique est responsable des régimes de stacking (S), pour lesquels la préconcentration se produit à l'entrée de la nanofente, tandis que l'effet de polarisation de concentration (CP) produit les régimes focusing (F), pour lesquels la préconcentration apparaît à une centaine de microns de la nanofente.

La préconcentration aura lieu côté cathodique pour les petits analytes, qui possèdent une très haute mobilité sous champ, car la composante électrophorétique domine le flux électroosmotique. Dans ce cas, lorsque l'électropréconcentration a lieu dans le réservoir cathodique, on l'appellera dans la suite du manuscrit le régime "dominé électrophorétiquement".

Pour les analytes plus lents, ayant une mobilité électrophorétique suffisamment faible pour que ce soit le flux de liquide électroosmotique qui domine, l'électropréconcentration sera observée dans le canal anodique et on parlera du régime "dominé électroosmotiquement". La localisation du point focal de préconcentration est donc déterminée principalement par la mobilité sous champ de l'analyte, pour

une solution de force ionique donnée, et par l'amplitude du flux électroosmotique et de la CP, tous deux dépendant de la charge de surface de la nanofente. En électropréconcentration classique, la localisation du point focal est donc intrinsèque à l'analyte et ne peut être choisie.

Tentons d'expliquer plus clairement ce phénomène d'électropréconcentration classique. **La Figure 2.15 permet d'expliquer de manière simplifiée les 4 régimes possibles.** Cette figure reprend la forme très spécifique du profil du flux au travers de la structure MNM, qui a été expliquée précédemment (voir Figure 2.12).

- *Cathodic Stacking* : Si l'on injecte un analyte chargé négativement dans le canal et si cet analyte a une mobilité électrophorétique très grande, le flux dominant sera le flux électrophorétique. Ce flux étant négatif dans le cas d'un analyte chargé négativement, le flux total de l'analyte dans la structure MNM sera majoritairement négatif. Toutefois, on peut observer sur la figure 2.15 (point en vert clair), que ce flux pourra prendre une valeur nulle dans le microcanal cathodique tout contre la nanofente. **C'est le premier régime observable pour un analyte rapide à l'interface Nanofente/-Microcanal cathodique, comme la fluorescéine, appelé le régime de "cathodic stacking" (CS).**
- *Cathodic Focusing* : Pour un analyte ayant une mobilité électrophorétique un peu plus faible, la différence entre les deux flux électrophorétique et électroosmotique sera un peu réduite et le profil de flux va remonter le long de l'axe des ordonnées. Dans ce cas, **le point focal stable sera situé un peu plus loin de la fente, toujours dans le canal cathodique (voir point en bleu sur la figure) : c'est le régime dit de "cathodic focusing" (CF).**
- *Anodic Focusing* : Pour un analyte ayant une mobilité électrophorétique si faible que la composante électroosmotique domine, on voit clairement, sur la figure 2.15, que le profil du flux coupera cette fois l'axe des abscisses du côté anodique et éloigné de la fente (point rouge sur la figure) : par analogie avec le régime focalisant "cathodic focusing", on aura cette fois-ci **le régime dit "anodic focusing" (AF).** Ces deux régimes, où l'électropréconcentration conduit à des points focaux localisés assez loin de la nanofente, que nous venons de décrire, sont liés au phénomène de "Déplétion/Enrichissement" et à l'effet de polarisation de la concentration CP que nous avons discuté précédemment.
- *Anodic Stacking* : Enfin, pour une mobilité électrophorétique très faible (et donc pour un flux électroosmotique très dominant), **l'électropréconcentration aura lieu à la sortie de la nanofente à l'interface Microcanal anodique/Nanofente (point violet sur la figure) : c'est le régime appelé "anodic stacking" (AS).**

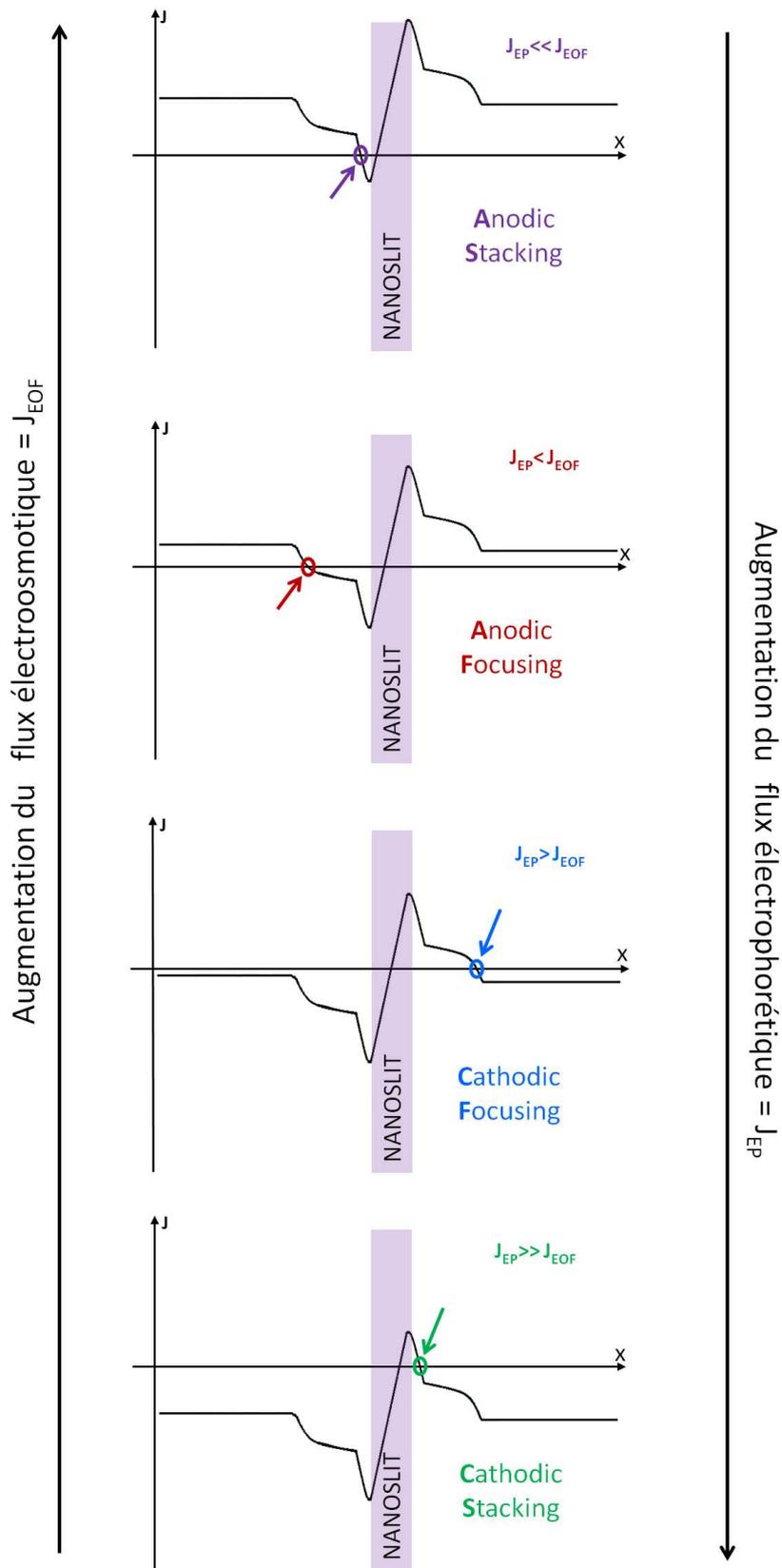


FIGURE 2.15 – Les 4 régimes théoriques de préconcentration dans la structure MNM. Lorsque l'on augmente le flux électroosmotique (ou que l'on diminue le flux électrophorétique) on passe successivement des régimes Cathodic Stacking (CS), Cathodic Focusing (CF), Anodic Focusing (AF), Anodic Stacking (AS).

Ainsi un analyte ayant une forte mobilité électrophorétique, telle que la fluorescéine, se concentrera plutôt dans le microcanal cathodique sous l'action d'un champ électrique. A l'inverse une grosse molécule avec une faible mobilité électrophorétique comme la BSA (Bovin Serum Albumin) subira une préconcentration anodique. Dans le régime électroosmotique et à force ionique modérée ou haute ($>10\text{mM}$), nous avons aussi prédit que le taux de préconcentration le plus important est observé pour le régime AF pour des analytes avec une mobilité électrophorétique inférieure à $10^{-8}\text{m}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$ [83]. Ces simulations permettent une meilleure compréhension de l'efficacité de préconcentration en fonction de la mobilité électrophorétique de l'analyte, de la force ionique de la solution et de la charge de l'analyte. Cette étude montre aussi la forte dépendance de ces processus de préconcentration quant à la nature des analytes préconcentrés. Pour résumer, un analyte à une certaine concentration dans une solution donnée va se préconcentrer en un point précis correspondant à l'un des 4 régimes présentés précédemment.

2.2.2.3 Electropreconcentration assistée en pression : vers une sélectivité de la localisation du point focal

Un analyte peut donc se préconcentrer en un point focal, à un endroit précis du dispositif MNM, où les 2 flux (électroosmotique et électrophorétique) se compensent. Ces flux dépendent du champ électrique externe appliqué, mais aussi de la nature de la solution utilisée et des caractéristiques intrinsèques de l'analyte en question. Pour un état de surface et une valeur de champ électrique donnés, un analyte subira donc un régime précis de préconcentration (anodique ou cathodique, éloigné ou collé à la nanofente). Rappelons par exemple qu'un analyte ayant une mobilité sous champ très élevée et évoluant dans une solution de faible force ionique se préconcentrera dans le canal cathodique (cas du régime dominé électrophorétiquement), tandis qu'un analyte plus "lent", évoluant dans une solution de force ionique modérée, se préconcentrera dans le canal anodique (cas du régime dominé électroosmotiquement). La localisation du point focal de préconcentration de l'analyte ne peut donc pas être choisie en électropreconcentration classique. Si cette localisation pouvait être choisie par l'expérimentateur, on pourrait alors combiner préconcentration et séparation en une seule étape.

Nous allons maintenant décrire **la méthode que nous avons développée et étudiée au cours de ce doctorat et qui devrait permettre de pouvoir choisir cette localisation de la préconcentration indépendamment de la nature de l'analyte. Il s'agit de l'électropreconcentration assistée en pression.**

Nous proposons ici d'étudier l'influence d'un flux hydrodynamique ajouté aux flux électroosmotique et électrophorétique mis en jeu dans la préconcentration de biomolécules modèles. Le but de ce travail de doctorat est de démontrer qu'un tel

flux additionnel permet de contrôler la localisation du point focal de préconcentration, soit dans le réservoir anodique pour une pression appliquée de l'anode à la cathode (définie comme "pression anodique" par la suite), soit dans le réservoir cathodique pour une pression de la cathode vers l'anode (définie comme "pression cathodique"). Cette nouvelle méthode d'électropréconcentration permettra donc de choisir sélectivement l'endroit du point focal. Elle ouvre de ce fait de nouvelles voies pour des analyses nécessitant une augmentation sérieuse en concentration de l'analyte.

Notre idée pour l'obtention d'une préconcentration sélective est donc relativement simple. En plus des deux flux électroosmotique (\vec{J}_{EOF}) et électrophoretique (\vec{J}_{EP}), qui sont en compétition à travers l'effet CP, un flux hydrodynamique supplémentaire ($\vec{J}_{pressure} = \vec{J}_P$) permet de déplacer la position naturelle du point focal de l'analyte dans une direction qui dépend du sens d'application de la pression. Ainsi, alors que dans un dispositif d'électropréconcentration simple le flux, qui est le produit de la vitesse de l'analyte et de la section S, est donné par $\vec{J} = S\vec{v} = \vec{J}_{EOF} + \vec{J}_{EP}$, notre nouvelle méthode est basée sur un flux total donné par $\vec{J} = S\vec{v} + \vec{J}_P = \vec{J}_{EOF} + \vec{J}_{EP} + \vec{J}_P$ où le flux hydrodynamique additionnelle \vec{J}_P peut prendre des valeurs positives ou négatives.

De hautes valeurs de $c_r^*h_n^*$ et de faibles valeurs de v_{2n} favorisent le CP sans propagation [78] pour lequel les effets de polarisation restent localisés à proximité de la nanofente produisant un point de focalisation stable. Le premier paramètre $c_r^*h_n^*$ représente en fait la charge de surface "volumique", c'est-à-dire la charge de surface normalisée par la hauteur du canal en tout point de la structure MNM [84]. On voit clairement qu'il sera possible de faire varier ce paramètre en changeant la force ionique de la solution tampon. Travailler à force ionique élevée permet de diminuer λ_D et donc d'augmenter h_n^* favorisant ainsi le CP sans propagation. Le deuxième paramètre v_{2n} traduit, quant à lui, directement la compétition entre les deux flux électroosmotique (\vec{J}_{EOF}) et électrophoretique (\vec{J}_{EP}). Rajouter une pression hydrostatique additionnelle \vec{J}_P va principalement modifier ce second paramètre et donc affecter l'effet CP.

On va étudier dans cette thèse deux cas qui sont représentatifs de la plupart des expériences déjà existantes en électropréconcentration classique. A faible force ionique et pour des analytes rapides (à mobilité très élevée), comme le bi-anion fluorescéine, la préconcentration est toujours dominée par le flux électrophorétique (J_{EP}), ce qui signifie que la focalisation est généralement localisée dans le réservoir cathodique ($\vec{J}_{EP} \gg \vec{J}_{EOF}$ régime dominé électrophorétiquement). Ceci signifie qu'une pression hydrostatique additionnelle aura une influence limitée sur la préconcentration. A force ionique modérée et pour des protéines plus lentes (à mobilité réduite), comme le sérum bovin d'albumine BSA, les contributions électrophorétique et électroosmotique sont plus équilibrées, ce qui explique que la préconcentration peut s'observer expérimentalement parfois dans le réservoir cathodique ($\vec{J}_{EP} > \vec{J}_{EOF}$ pour un h grand) ou dans le réservoir anodique ($\vec{J}_{EP} < \vec{J}_{EOF}$ régime dominé électroosmotiquement pour un h petit - fente très fine). On s'at-

tend donc à ce que la pression additionnelle \vec{J}_P ait une influence plus forte sur la préconcentration.

Le coefficient de transport d'un analyte anionique peut couper l'axe des flux nuls à plusieurs endroits le long du micro/nanocanal. Il y aura systématiquement deux points d'équilibre correspondant à un flux nul de l'analyte : un front instable (dérivée positive du flux local) toujours situé dans la nanofente et un front de préconcentration stable (dérivée négative du flux) situé dans le microcanal où la préconcentration aura lieu. Nous utiliserons les notations "classique" ou "conventionnelle" quand la préconcentration se produit sous l'action d'un champ électrique seul, sans pression hydrodynamique ($J_p = 0$). La courbe en gras la Figure 2.16 correspond à l'électropréconcentration classique d'un analyte ayant une faible mobilité électrophorétique dans un électrolyte de force ionique modérée et sous l'application d'un champ électrique seul (cas de la BSA par exemple). Dans ce cas là, et d'après les simulations de A. Plécis [83], le point focal est observé dans le microcanal anodique. Deux cas d'ajout de pression hydrodynamique externe sont possibles.

La Figure 2.16 décrit le principe de l'électropréconcentration assistée en pression dans une structure MNM négativement chargée (ce qui est le cas des puces en verre produites au cours de ces trois années de thèse). L'évolution du profil de flux local est représentée pour les différents cas observables.

- Si une pression hydrodynamique positive est ajoutée dans la même direction que le champ électrique, soit de l'anode à la cathode ("pression anodique" – voir flèche rouge sur la Figure 2.16), le profil des flux remonte dans le diagramme puisque ajouter une pression dans cette direction signifie amplifier l'effet du flux électroosmotique (EOF). On obtient alors une préconcentration dans le régime anodique focusing (AF), comme indiqué par le cercle rouge sur la courbe pointillée rouge de la Figure 2.16. Si la pression anodique est augmentée, le régime anodique stacking (AS) sera observé, comme indiqué par le cercle violet sur cette même figure. Ainsi, pour une protéine évoluant dans une solution à force ionique modérée, une pression anodique positive additionnelle favorisera les deux régimes anodiques AF et AS par une simple augmentation de la contribution EOF.
- Considérons maintenant le cas d'une pression additionnelle appliquée dans la direction opposée, soit de la cathode vers l'anode (appelée "pression cathodique" par la suite – cas vert et bleu de la Figure 2.16). La tendance s'inverse puisque la pression cathodique affaiblit le rôle du flux EOF en appuyant la composante électrophoretique. Le profil descend. En appliquant cette pression cathodique, les deux régimes cathodiques, CF et CS, sont observés. Comme pour le premier cas, la préconcentration ne sera pas possible pour des valeurs de pression trop importantes.

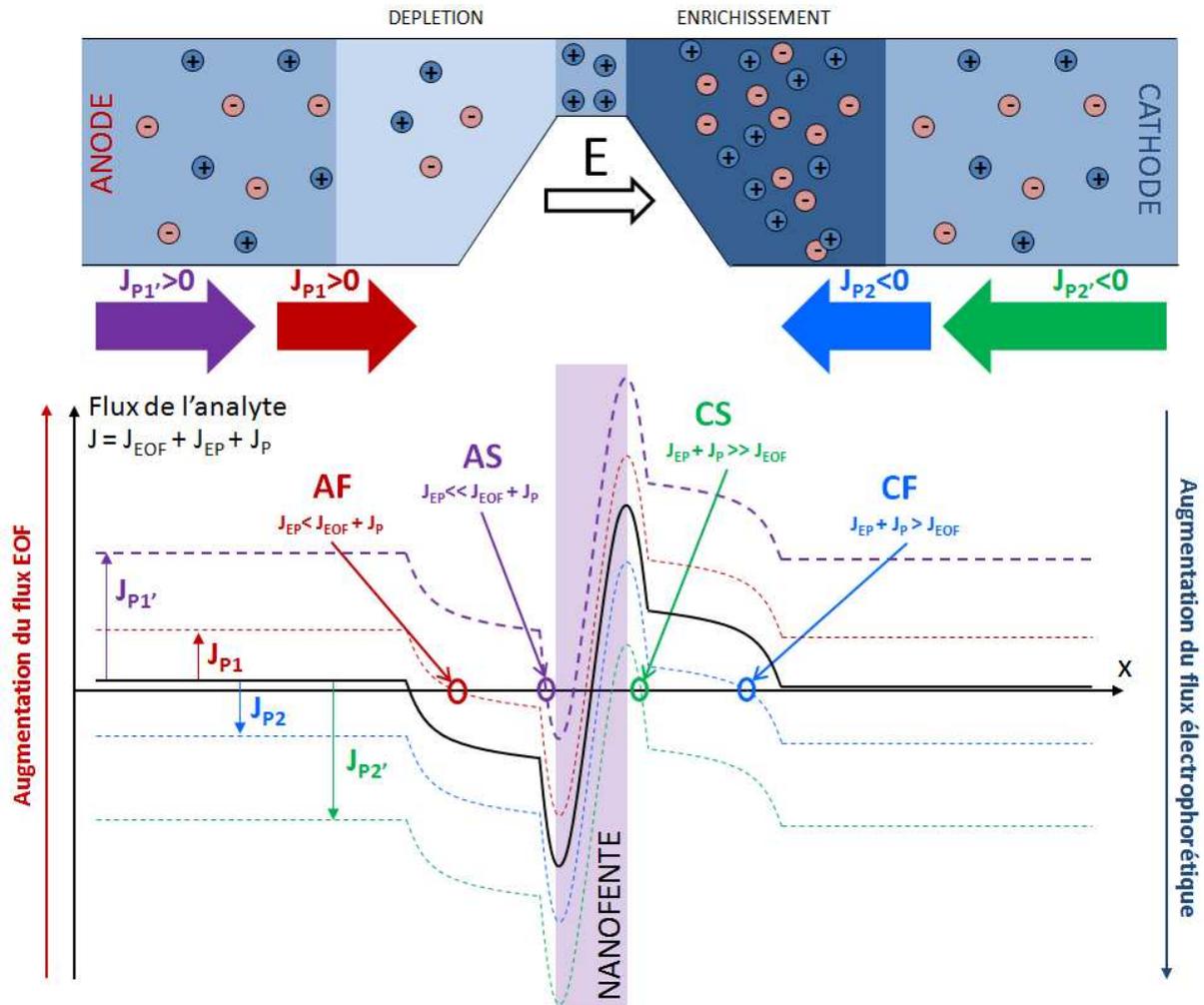


FIGURE 2.16 – Le mécanisme de préconcentration/séparation assistées en pression. Le profil des vitesses locales est représenté dans la structure MNM (vitesse de la molécule en fonction de la distance dans la structure). La courbe en gras correspond à la préconcentration classique d'une protéine à faible vitesse électrophorétique quand un champ électrique seul est appliqué. 4 autres cas sont représentés : 2 cas d'application d'une pression positive (de l'anode à la cathode), qui a pour effet de remonter la courbe dans le diagramme et d'obtenir ainsi les 2 régimes anodiques selon la valeur de la pression (Anodic Stacking en violet et Anodic Focusing en rouge) et 2 cas d'application d'une pression négative (de la cathode à l'anode), qui a pour effet de descendre la courbe dans le diagramme et d'obtenir ainsi les 2 régimes cathodiques (Cathodic Stacking en vert et Cathodic Focusing en bleu).

Ce nouveau protocole d'électropréconcentration assistée en pression va ainsi permettre de choisir la localisation de la préconcentration sans subir le régime imposé. Pour la BSA, les deux régimes anodique et cathodique ont été observés, comme on va le voir dans le chapitre expérimental 5.

Pour la fluorescéine à faible force ionique, l'électropréconcentration est dominée par la composante électrophorétique produisant un régime cathodique. Comme pour la BSA, ajouter une pression cathodique (de la cathode vers l'anode) va stabiliser

le front de preconcentration dans le microcanal cathodique à proximité de la nanofente. Le seul changement à prendre en compte dans la Figure 2.16 est que la courbe initiale (celle en gras) sera positionnée en dessous de l'axe des abscisses de telle manière que le point de preconcentration traditionnelle sera dans le réservoir cathodique. Pour un tel analyte, avec une très grande mobilité électrophorétique, seul le régime cathodique CS est observable, comme on le montrera expérimentalement dans le chapitre expérimental 4.

La preconcentration de particules anioniques peut donc avoir lieu du côté cathodique ou anodique du nanocanal et peut résulter de deux mécanismes différents à savoir l'exclusion électrostatique ou un gradient ionique. Pour les particules cationiques, il est important de noter que le point d'équilibre stable se trouverait dans le nanocanal. Cependant, comme les flux électroosmotiques et les vitesses électrophorétiques ont la même direction dans des canaux MNM négativement chargés, il n'est pas possible de trouver une vitesse nulle. Pour preconcentrer des espèces cationiques, des structures MNM positivement chargées seraient plus appropriées, puisque cela inverserait le gradient de polarisation ionique et donnerait les quatre régimes de preconcentration décrits précédemment. Puisque ce cas n'a jamais été rapporté expérimentalement dans des travaux antérieurs, nous avons décidé de nous focaliser sur la preconcentration de particules anioniques dans des structures MNM négativement chargées et de tenter de décrire plus précisément les caractéristiques des quatre régimes préalablement cités dans la figure 2.16.

Conclusion

Il ressort donc de cette étude théorique que la compétition entre le flux électroosmotique et le flux électrophorétique d'un analyte au sein d'une structure MNM est à l'origine de la localisation de la preconcentration. Les espèces ayant une grande mobilité électrophorétique (telle que la fluorescéine) se preconcentrent dans un régime cathodique (CF ou CS) tandis que celles ayant une faible mobilité électrophorétique (comme la BSA) présentent une preconcentration anodique (AF ou AS). Ces 4 régimes, prédits théoriquement, n'ont pas tous la même efficacité de preconcentration : les modes de "stacking" (S) sont saturants, et ne sont donc pas privilégiés pour des applications de preconcentration rapide et fiable, tandis que les modes focalisants (F) présentent, d'après les simulations, des taux extrêmement intéressants.

Afin de combiner preconcentration et séparation dans une même étape, il est nécessaire de pouvoir choisir le mode de preconcentration de tout analyte, s'affranchissant ainsi des caractéristiques propres de ce dernier et contrôlant l'endroit exact du front de preconcentration. Pour parvenir à cela, une nouvelle méthode de **preconcentration sélective assistée en pression** est proposée et consiste en l'ajout d'un paramètre expérimental - une pression externe - engendrant un troisième flux (hydrodynamique) permettant le contrôle de la localisation de preconcentration.

Chapitre 3

Fabrication des puces fluidiques et expérimentations

La véritable science enseigne, par-dessus tout, à douter et à être ignorant.

- Miguel de Unamuno -

Notre objectif est donc de développer des puces fluidiques de diagnostic capable d'analyser différents analytes contenus dans un mélange. Les milieux nécessitant une telle analyse sont bien souvent complexes. Qu'il s'agisse du sang d'un patient, de salive, d'urine, d'une source d'eau, d'un aliment ou encore d'un échantillon d'air, la très grande population de composants présents rend les analyses très difficiles. Ces composés divers présentent en plus tous des tailles, des charges et des concentrations qui peuvent être différentes. De plus, parmi ces analytes, certains sont très abondants et risquent de masquer le signal correspondant à la présence de l'analyte d'intérêt, souvent très faiblement exprimé. Ces composés d'intérêt étant présents sous forme de trace, l'utilisation de très faibles volumes rend leur détection quasiment impossible et pourtant, il est souvent nécessaire que le volume prélevé soit le plus petit possible. C'est pourquoi il est indispensable d'ajouter un module de préconcentration en amont du module de séparation si l'on souhaite pouvoir travailler directement sur des échantillons bruts.

Afin de développer des outils de diagnostic efficaces et rapides, les scientifiques ont utilisé les outils de la microélectronique pour réduire la taille et automatiser les systèmes d'électrophorèse capillaire. Ces circuits microfluidiques peuvent être fabriqués à partir de différents matériaux selon l'application visée. Deux types de technologies de fabrication peuvent être alors identifiés : les techniques "molles" et les techniques "dures". Dans le cadre de cette thèse, et suite aux travaux effectués par les deux thésards précédents que sont C. Nanteuil [58] et A. Plécis [14], nous avons choisi de travailler avec des puces microfluidiques rigides, entièrement faites en verre. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2, elles sont constituées d'un microcanal (de quelques microns de profondeur) réduit en son centre en un nanocanal d'une centaine de nanomètres. Quatre réservoirs sont placés aux extrémités des canaux de sorte que le motif prend une forme de H avec en son centre la nano-

fente permettant la préconcentration (Figure 3.1). Ces puces sont ensuite montées sur un banc expérimental complètement automatisé afin de réaliser les expériences de préconcentration sélective assistée en pression selon le principe que nous avons détaillé dans le chapitre précédent. Cette préconcentration est suivie par fluorescence en fonction de plusieurs paramètres qui seront étudiés plus tard dans ce manuscrit.

Le but de ce chapitre est donc, dans un premier temps, de détailler le processus de fabrication des puces microfluidiques en verre et l'ensemble de l'instrumentation utilisée pour les expériences. Nous nous intéresserons par la suite à ces expériences de préconcentration, tant par leur principe que par leur déroulement, étape par étape. Enfin, nous verrons dans un dernier temps comment se fait le traitement des données obtenues et les informations que l'on peut obtenir quant à l'efficacité de notre méthode de préconcentration sélective innovante.

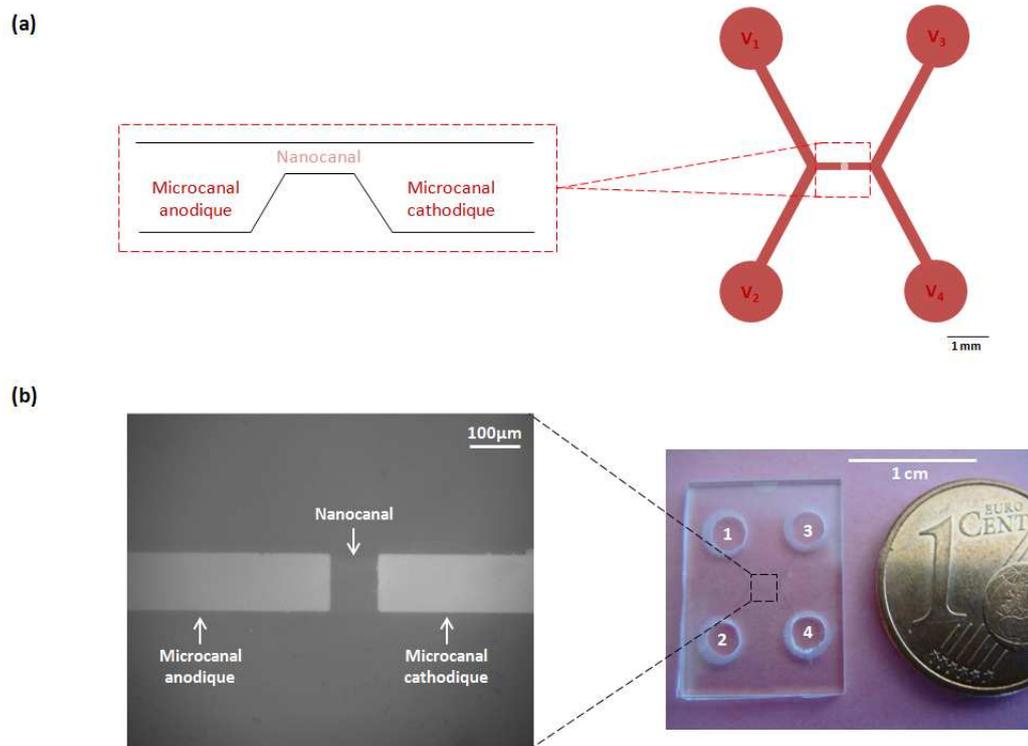


FIGURE 3.1 – (a) Schéma du dispositif de préconcentration et de séparation. La nanofente est située entre deux microcanaux. (b) Photo de la puce en verre et vue au microscope d'un nanocanal de $100\mu\text{m}$ de long et de 150nm de profondeur dans un microcanal de $1\mu\text{m}$ de profondeur.

3.1 Fabrication de puces “tout verre”

L'avènement de la microfluidique a rapidement privilégié le développement de technologies dites “molles” à base de polymères par opposition aux techniques dites “dures”. Ces matériaux permettent un prototypage aisé et une fabrication rapide des dispositifs, tout en garantissant pour les laboratoires un coût bien moindre à la fabrication. Ainsi, les puces les plus courantes sont faites à base de polydiméthylsiloxane, communément appelé PDMS [85, 86]. Cependant, celui-ci présente aussi des inconvénients comme par exemple la difficulté à intégrer des électrodes directement sur sa surface. Mais il pose surtout deux problèmes particulièrement critiques pour nos expériences. Le principal inconvénient du PDMS réside dans le fait qu'il peut adsorber des molécules hydrophobes de la solution et que du PDMS qui n'est pas complètement réticulé peut migrer dans le canal [87]. Or, l'adsorption de protéines sur la surface du PDMS est un problème majeur pour la biologie. On se voit donc obligé d'utiliser des traitements de surface qui peuvent s'avérer longs, coûteux et instables [88]. Le deuxième inconvénient non négligeable des systèmes en PDMS pour des expériences de biologie est la perméabilité du PDMS qui entraîne une évaporation du liquide contenu dans le canal. Cet effet peut conduire à une perte totale du liquide dans le système ou à un changement dans l'osmolarité moyenne. Idéalement, la puce en PDMS devrait être conditionnée plusieurs heures avant son utilisation pour la stabiliser.

C'est pour toutes ces raisons qu'il est intéressant de s'affranchir des technologies molles et de faire appel aux techniques dures. Le premier matériau auquel il est alors naturel de penser est le silicium dont les méthodes d'usinage sont très bien maîtrisées. Cependant, il possède quelques inconvénients majeurs pour notre application. En effet, il est opaque à la lumière visible et manque d'isolation électrique. Ces raisons en font un matériau non adapté à une exploitation en électrophorèse capillaire couplée à une détection par fluorescence.

Le verre quant à lui semble être un matériau idéal pour notre application. Il est en effet un conducteur ionique à très faible conduction, il est transparent dans l'UV et le visible et il est très résistant aux agressions chimiques et au temps [89, 90]. Il constitue donc un matériau idéal pour notre problème si on réussit à usiner les puces, c'est-à-dire à les structurer (chose qui est déjà connue) et à les sceller. C'est concernant ce dernier point qu'un brevet a été déposé par mon prédécesseur alors en thèse, C. Nanteuil, pour développer une méthode de collage “verre/verre” à basse température [91]. Les puces issues de ce principe de fabrication sont alors entièrement en verre et sont imperméables, extrêmement résistantes, adaptées aux sciences du vivant et ne nécessitent pas forcément de traitement de surface.

Nous allons, dans cette partie, détailler le principe de fabrication des puces (Figure 3.2).

1. La première étape consiste à déposer sur un substrat de verre un masque de gravure qui permettra par la suite la structuration du motif (réservoirs, microcanaux et nanocanal). Le masque de gravure choisi ici est une couche de silicium amorphe αSi de 300nm d'épaisseur (étape 1 de la Figure 3.2). Le dépôt de cette couche est un **dépôt diélectrique** réalisé par un bâti de PECVD (Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition). Ce procédé est utilisé pour déposer des couches minces sur un substrat à partir d'un état gazeux. Des réactions chimiques se déroulent au cours du processus après la formation d'un plasma à partir des gaz du réacteur. Le plasma est généralement créé à partir de ce gaz par une décharge électrique pouvant être générée à partir de sources radio-fréquences (13,56 MHz), micro-ondes (2,45 GHz) ou par une décharge électrique continue entre deux électrodes. Le dépôt de αSi s'effectue à 280 ° C et à 700 mTorr, sous flux de He à 400sccm et de SiH_4 à 50sccm, à une puissance de 100 Watts et à basse pression (quelques mTorr). Ce dépôt est suivi d'une étape de recuit sous flux d'azote de 4h à 400 ° C qui va permettre de relâcher les contraintes dans le matériau. La montée en température se fait progressivement à 15 ° C/min et le retour à température ambiante se fait par inertie thermique.

2. Vient ensuite la première **lithographie optique** qui va permettre la préparation de la structuration du masque de gravure (microcanaux et réservoirs). C'est l'étape 2 de la Figure 3.2. La technique de lithographie optique utilise la lumière d'une lampe UV (G-line [$\lambda=436\text{nm}$], H-line [$\lambda=405\text{nm}$], I-line [$\lambda=365\text{ nm}$] suivant les filtres présents sur la machine) afin de structurer des résines avec une résolution latérale de l'ordre du micron. Plusieurs types de résines sont disponibles selon le but à atteindre :
 - les résines négatives, pour lesquelles le rayonnement ultraviolet entraîne une polymérisation des zones exposées, conférant ainsi à ces zones une tenue particulière au solvant de révélation alors que les parties non insolées disparaissent sélectivement dans ce solvant (par exemple, la résine SU-8)
 - les résines positives, pour lesquelles le rayonnement UV produit une transformation chimique des macromolécules, entraînant une solubilité accrue des zones exposées dans le révélateur (résines AZ 9260, S1818 et SJR 5740)
 - les résines inversibles, qui ont la propriété de changer de polarité suite à une étape de recuit dit d'inversion (AZ 5214, TI09XR)

Pour notre procédé de fabrication, nous utilisons l'AZ5214 qui est la résine inversible la plus utilisée et la plus maîtrisée au LPN.

Une lithographie optique se fait alors en trois étapes. Tout d'abord *l'enduction* consiste à réaliser un dépôt homogène de la résine sur le substrat propre et déshydraté par rotation à l'aide d'une tournette. Les paramètres vitesse, accélération et temps fixent l'épaisseur finale de la couche de résine déposée en fonction de sa viscosité. Ici, nous tournons pendant 30" avec une vitesse de 4000 rpm et une accélération de 2000 rpm/s. La résine est alors re-

cuite pendant 1'30 à 125 ° C afin d'éliminer le reste de solvant et pour qu'elle adhère bien au substrat de verre. Après le dépôt de la résine vient la phase *d'insolation*. C'est à ce moment là que l'on utilise une aligneuse et le masque optique présentant les motifs à reproduire sur le substrat. Dans notre cas, on expose la résine pendant 5" (ce qui correspond à une énergie de 50mJ/cm²) puis on effectue un recuit d'inversion du substrat à 125 ° C pendant 1'30 puisque l'on travaille avec une résine inversible. On termine ensuite le processus d'insolation par une étape dit de "flood" de 30" qui correspond à une exposition aux UV faite sans le masque optique. Enfin, on termine le procédé par l'étape de *développement* durant laquelle le substrat enrésiné et insolé est immergé pendant 35" dans un développeur adéquate (en l'occurrence l'AZ MIF 726) afin d'éliminer les parties non insolées et d'avoir alors notre motif "creusé" dans la résine.

3. Une fois le motif dessiné dans la résine, il faut le reproduire dans le masque de gravure. Pour ce faire, on a recours à un procédé de **gravure sèche**, la gravure ionique réactive (ou RIE pour Reactive Ionic Etching), qui va permettre de retirer le silicium amorphe aux endroits où il n'est plus protégé par la résine (c'est l'étape 3 de la Figure 3.2). C'est une gravure physico-chimique, car elle met en jeu à la fois un bombardement ionique (énergie mécanique) et une réaction chimique entre le gaz ionisé et les surfaces de l'échantillon. Les atomes du gaz réagissent avec les atomes de l'échantillon pour former une nouvelle espèce volatile qui sera évacuée par pompage. On parle de gravure sèche car elle se déroule au sein d'un plasma, par opposition à la gravure humide d'un matériau en solution. Le réglage des différents paramètres (pression, puissance, température, polarisation) permet de donner plus ou moins d'importance à l'un ou l'autre des processus de gravure. Notre gravure se fait 18 ° C, à une puissance de 10 Watts et sous flux de SF₆ à 10sccm et à une très faible pression de 30 mTorr.
4. Le masque de gravure est maintenant prêt à être utilisé pour graver le motif dans le verre. On enlève donc tout d'abord la résine restante, qui nous avait été utile pour structurer le motif dans le masque. Pour ce faire, on utilise simplement un solvant comme l'acétone (étape 4a). On peut alors structurer le substrat de verre par une **gravure humide** (étape 4b), qui va permettre d'obtenir une gravure isotrope. La durée de cette étape est très importante et permet de contrôler la profondeur exacte des microcanaux. Pour graver le verre, on utilise un acide à manipuler avec de très grandes précautions, l'acide fluorhydrique HF. On fait donc tremper le substrat dans une solution diluée d'acide fluorhydrique avec un peu d'acide chlorhydrique qui permet d'homogénéiser le mélange :



La vitesse de cette solution de gravure est de 2μm/mn pour le verre que nous utilisons. Selon la hauteur désirée des microcanaux on peut donc calculer le temps de gravure nécessaire.

5. Les réservoirs et les canaux micrométriques sont donc gravés dans le substrat de verre. Il faut à présent faire la même chose pour la structuration du nanocanal. On répète donc les mêmes étapes : **lithographie** (étape 5 de la Figure 3.2), **RIE** (étape 6), **gravure humide** (étape 7) sauf que pour cette dernière étape, on utilise une solution diluée d'acide (Ammonium Fluoride etching mixture AF) qui permet une gravure plus lente et donc l'obtention de profondeurs inférieures au micron.
6. Le substrat étant entièrement structuré, il ne reste plus qu'à retirer le masque de gravure restant. Pour cela, une gravure humide est faite pendant 1'-2' dans une solution de **TMAH** (Tetramethylammonium hydroxide) 5% chauffée à 80 ° C (étape 8 de la Figure 3.2) qui n'attaque pas le verre.
7. Notre substrat en verre microstructuré est donc prêt à être fermé par un capot. Mais avant cela, il nous faut percer le verre sur toute l'épaisseur au niveau des réservoirs pour pouvoir injecter les fluides pendant les expériences. Pour ce faire on utilise une **microbilleuse** qui projette des billes de silice à très grande vitesse et perce ainsi le wafer en quelques minutes.
8. La dernière étape est l'étape de **scellement** du substrat afin d'obtenir une puce (étape 9 de la Figure 3.2) dans laquelle des fluides peuvent circuler. Antérieurement, le capot était fait de PDMS [14], mais pour les raisons discutées précédemment, il se présente maintenant sous forme d'un substrat de verre. Le brevet déposé par C. Nanteuil pendant sa thèse [91] permet un scellement verre/verre à basse température, ce qui autoriserait de nouvelles perspectives comme l'intégration directe d'électrodes dans les puces par exemple. Avant de coller le substrat microstructuré à un autre substrat de verre vierge, il faut s'assurer qu'il n'y ait aucune poussière. Pour cela, on effectue d'un côté un nettoyage “piranha” du capot de verre pendant 15' avec une solution de 30mL H_2O_2 + 150mL H_2SO_4 , et de l'autre côté un nettoyage du wafer structuré pendant 1h dans un mélange dit RCA (parce que développé dans les laboratoires de la “Radio Company of America” en 1960 par Kern et Poutinen et publié en 1970) de 20mL H_2O_2 + 30mL NH_3 28% + 150mL H_2O . Une fois nettoyé, on va activer la surface du capot par un plasma oxygène pendant 30" à 300 millitors. Vient ensuite le collage à proprement parler qui consiste à enduire le capot d'une résine, la HSQ, qui se transforme en silice une fois recuite et permet l'obtention de puce tout en verre. Le dépôt de cette résine s'effectue avec une vitesse de 2000 rpm et une accélération de 2000 rpm/s pendant 30" afin d'obtenir une épaisseur d'environ 300nm. On pose ensuite délicatement le capot enrésiné sur le wafer microstructuré en appuyant doucement avec le doigt en partant du centre pour que l'adhésion se fasse. La puce ainsi collée est ensuite mise au recuit pendant 10h à 300 ° C (montée à 18 ° C/min puis inertie thermique pour la descente).

L'échantillon est prêt. Il ne reste plus qu'à le scier pour avoir une puce rectangulaire (comme sur la Figure 3.1 (b)).

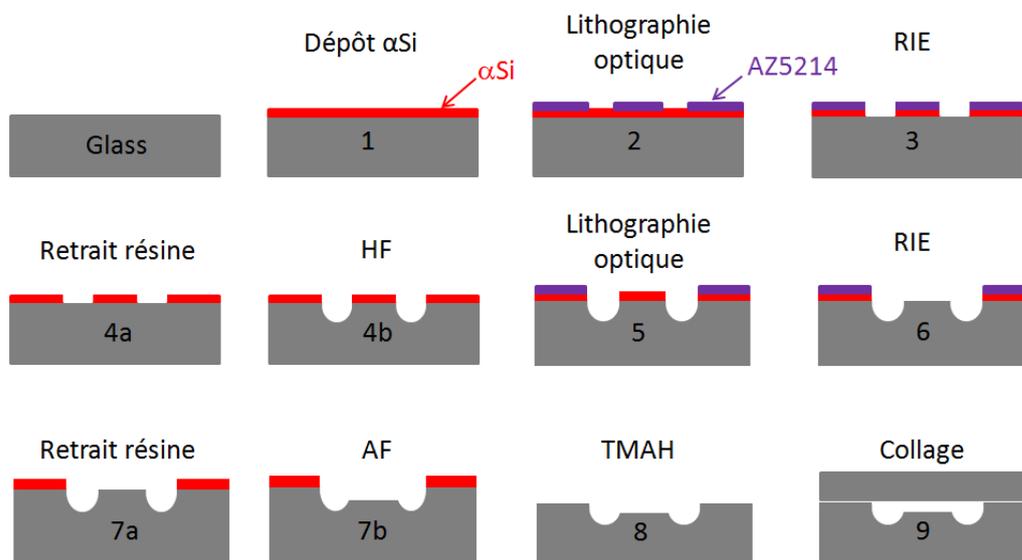


FIGURE 3.2 – Description des 9 étapes du procédé de fabrication des puces "tout verre". 1- dépôt d'un masque de silicium amorphe (α -Si) de 300nm par PECVD. 2- lithographie optique pour la définition des microcanaux à l'AZ5214. 3- RIE SF_6 pour la gravure des microcanaux dans le masque α -Si. 4a- retrait de la résine AZ5214 et 4b- gravure humide HF-HCl du verre. 5- Lithographie optique pour la définition du nanocanal à l'AZ5214. 6- RIE SF_6 pour la gravure du nanocanal dans le masque α -Si. 7a- retrait de la résine AZ5214 et 7b- gravure humide AF du verre. 8- gravure TMAH pour le retrait du masque α -Si. 9- collage basse température [91]

3.2 Expérimentations

3.2.1 Principe d'une expérience de préconcentration

Nous venons donc de passer en revue toutes les étapes de fabrication d'une puce microfluidique contenant un nanocanal au centre d'un microcanal. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, nous voulons utiliser cette forme particulière pour préconcentrer sélectivement un analyte par application d'un champ électrique et d'une pression hydrodynamique externe. Il nous faut donc connecter cette puce à un générateur de tension et de pression, être capable d'injecter une solution d'analytes et suivre, d'une manière adéquate, l'évolution de la concentration d'analytes au cours du temps. Pour ce faire, notre puce microfluidique est tout d'abord montée sur un banc expérimental contenant tout le matériel nécessaire pour l'électrophorèse sélective (voir description complète dans le paragraphe suivant). Le suivi de la concentration d'analytes se fait sur ce banc par

fluorescence, ce qui implique l'utilisation de molécules marquées et d'un ensemble optique (microscope, lampe etc). Le principe d'une expérience de préconcentration est relativement simple : une solution d'analyte modèle très faiblement concentré est injectée dans la puce puis un champ électrique et une pression adéquates sont appliqués dans les réservoirs pendant un temps défini par l'utilisateur. Une caméra se déclenche automatiquement à intervalles choisis pendant toute la durée de l'expérience et constitue un ensemble d'images qui sera traité ultérieurement. Ces images 16 bits permettent de suivre l'évolution de la concentration d'analyte marqué en fluorescence : plus l'intensité de fluorescence mesurée est grande et plus la concentration d'analyte est élevée. On peut donc, grâce à ces images, quantifier l'efficacité de notre préconcentrateur sélectif.

3.2.2 Banc automatisé d'expérimentations

L'électropréconcentration sélective proposée ici est donc possible grâce à l'application de deux composantes indispensables : un champ électrique et une pression hydrodynamique externe. La plateforme d'expérimentation s'articule donc autour d'une puce en verre mais aussi d'un ensemble générateur de tension et générateur de pression. La détection se fait par fluorescence avec un microscope inversé, ce qui nécessite une caméra et une lampe à mercure. Pour commencer une série d'expérimentations, on va donc dans un premier temps monter la puce sur un bloc de PMMA (polyméthacrylate de méthyle) grâce à un joint de PDMS contenant 4 trous au niveau des réservoirs. Ce bloc simple permet un raccordement aisé de toutes les arrivées fluidiques et électriques (voir Figure 3.3). La connexion fluidique se fait par l'intermédiaire de plongeurs, surmontant les réservoirs de la puce, et dans lesquels nous pouvons injecter le liquide à l'aide d'une seringue. La connexion électrique quant à elle se fait via des électrodes de platine immergées dans les plongeurs et connectées à l'extérieur, ce qui va permettre l'application directe d'une différence de potentiel au sein même des canaux de la puce.

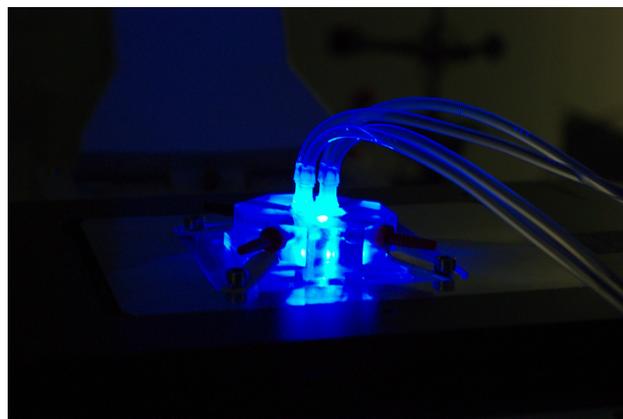


FIGURE 3.3 – Photo du bloc de connectiques fluidiques et électriques du banc d'expérimentations [92].

Une fois la puce montée sur le bloc, elle est insérée dans l'ensemble du set-up (voir photo Figure 3.4) qui se compose de :

- Un générateur de tension (Keithley 238) couplé à un multiplexeur (Keithley 7001 et carte 7153) afin d'appliquer dans les 4 réservoirs soit une tension V , soit une mise à la masse, par l'intermédiaire de connecteurs électriques et des électrodes de platine.
- Un pressostat (Bronkhorst El Press) et un bloc de pression maison constitué de 8 électrovannes pilotables (2 pour chaque réservoir). Chaque électrovanne présente 2 positions (ouverte ou fermée) et est indépendante des 7 autres. La pression est envoyée dans des tuyaux fluidiques en plastique souple au niveau des plongeurs.
- Un microscope inversé de fluorescence incluant une illumination adaptée (grâce à une lampe à Mercure HBO 100 ZEISS et un filtre FITC) couplée à une caméra (Hamamatsu ORCA-ER). Ce montage optique permet la mesure d'intensités de fluorescence faibles et donc le suivi de la concentration en analyte. Il est aussi couplé à un shutter (Uniblitz VCMD1) qui permet de limiter le photo-blanchiment. Le déclenchement de l'acquisition de la caméra quant à lui s'effectue grâce à un trigger externe connecté au shutter et à la caméra.

Enfin, tous les instruments de mesure sont pilotés et synchronisés par ordinateur à l'aide du logiciel Matlab et les données sont traitées avec ce même programme. Des interfaces graphiques ont été créés pour améliorer l'interface utilisateur/machine et pour rendre le banc d'expérimentation très simple d'utilisation, même pour une personne non initiée. Cette partie informatique est développée en Annexe B.

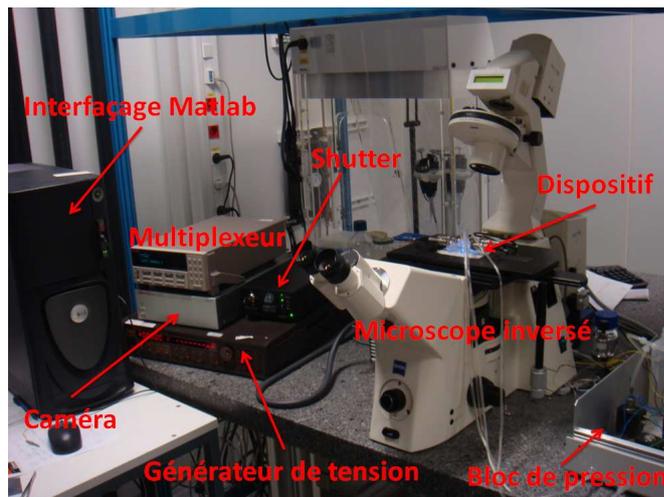


FIGURE 3.4 – Photo de la plateforme expérimentale complète composée d'un générateur de tension, d'un multiplexeur, d'un shutter, d'une caméra, d'une lampe à mercure, d'un pressostat, d'un bloc de vannes permettant de contrôler l'application de la pression, d'un microscope inversé, d'un bloc de connectiques fluidiques et électriques, d'une puce en verre, le tout contrôlé par un PC et le logiciel Matlab.

3.2.3 Description d'une expérience pas à pas

3.2.3.1 Préparation de la puce microfluidique

L'un des verrous majeurs de la validité de tout résultat expérimental est, sans aucun doute, la reproductibilité de ceux-ci. Pour tenter d'assurer une bonne reproductibilité d'une expérience à l'autre, il est important de démarrer chaque expérience avec un état initial similaire. Le fait de travailler avec des puces tout en verre est un avantage puisque celles-ci sont plus robustes dans le temps que les puces en PDMS, qui sont bien souvent des puces à utilisation unique. On peut donc effectuer de nombreuses expériences sur une même puce et ainsi limiter la non reproductibilité liée à la puce elle-même. Cependant, les procédés de fabrication de ces puces ainsi que leur utilisation répétée sont source de différences importantes. En effet, aucune des étapes de fabrication décrites précédemment en paragraphe 3.1 n'est parfaitement identique d'une fois à l'autre, ce qui implique qu'une puce, une fois finie, aura des dimensions et un état de surface particuliers, probablement différents d'une autre puce. Or c'est l'état de surface du verre qui déterminera le flux électroosmotique à travers la charge de surface et aura donc un impact déterminant sur l'électropréconcentration. Il est donc aisé de comprendre pourquoi deux puces d'un même lot de fabrication (et encore plus deux puces provenant d'un lot différent) auront un état initial différent. En plus de ce phénomène intrinsèque à la fabrication en salle blanche, s'ajoute le problème d'état de surface lié aux expériences de préconcentration. En effet, suite à une expérience, il peut y avoir modification (plus ou moins importante) de l'état de surface du verre dû à l'adsorption de la protéine étudiée sur la surface. La protéine une fois "collée" sur la paroi du verre modifie non seulement la charge de surface mais dénature aussi les intensités de fluorescence et les profils obtenus puisque l'intensité initiale n'est pas la même dans tout le canal. On observe alors des pics parasites qui n'ont rien à voir avec une quelconque préconcentration.

Pour pallier ces problèmes d'état de surface, nous avons mis en place deux processus de nettoyage de nos canaux, l'un étant appliqué au montage de la puce sur le banc expérimental et l'autre s'effectuant avant chaque expérience de préconcentration. Rappelons ici d'ailleurs que la géométrie en H avait été privilégiée pour permettre un nettoyage facile de la puce et un apport simplifié des solutions initiales, la diffusion étant le seul mécanisme permettant un transport non sélectif dans la zone centrale à cause de la nanofente.

Le premier nettoyage est donc une étape préliminaire à toute série d'expérimentations réalisée sur une puce. Il permet d'avoir une charge de surface la plus identique possible pour chaque puce. Pour le mener à bien, on réalise plusieurs rinçages consécutifs des canaux à l'aide de différentes solutions : 10 minutes avec une solution de soude 1M puis 10 minutes avec une même solution diluée à 0.1M et enfin 15 minutes à l'eau. Suite à ça, on peut injecter le tampon utilisé pour préparer les solutions de protéines que l'on va étudier et laisser ce tampon circuler dans les canaux toute une nuit. On pourra alors démarrer les mesures avec une charge de

surface la plus similaire possible pour chaque puce.

Le deuxième nettoyage, quant à lui, permet d'obtenir un même état initial avant chaque expérimentation ; une expérimentation étant définie par l'application d'un champ électrique et d'une pression donnés. Il est appliqué de façon automatique par le code Matlab avant chaque application de paramètres de préconcentration et permet de stabiliser l'ensemble. Ce nettoyage avait été mis en place par le précédent thésard, C. Nanteuil, qui, s'étant référé à l'état de l'art, avait noté que les expériences réalisées par l'équipe de Santiago [82] étaient toujours précédées d'un temps de repos de 40 minutes afin de permettre aux conditions initiales de s'établir. Il avait donc cherché à optimiser ce protocole de préparation de la puce avant les mesures d'électropréconcentration et était arrivé à un protocole optimal qui permettait d'assurer un écart type entre les mesures de l'ordre de 10%. Cette méthode de nettoyage est composée d'une déstabilisation préliminaire de la concentration par l'application d'un champ électrique puis d'un temps de repos relativement long. Il se décompose plus exactement en trois étapes qui sont i) un nettoyage électrique par application de 20V pendant 2 minutes ii) une injection hydrodynamique de liquide pendant 10 minutes afin de renouveler la solution dans le dispositif et enfin iii) une mise à l'équilibre en pression dans les quatre réservoirs pendant 10 minutes.

3.2.3.2 Lancement d'une expérience

Une expérience de préconcentration est relativement longue dans le temps et fastidieuse de par les différentes applications (de champ électrique et de pression) successives et la non reproductibilité des expériences. Nous avons donc automatisé tout le processus d'expérimentation afin de multiplier les expériences et en particulier de pouvoir accumuler des données durant la nuit. Tout a été informatisé, de l'application des paramètres, à la prise d'images et jusqu'au traitement préliminaire des données. Ainsi, l'utilisateur n'a qu'à injecter la solution de départ et à démarrer le bon programme Matlab et ensuite le travail se fait tout seul.

Une expérience se déroule donc de la manière suivante :

- **Injection** : On injecte tout d'abord la solution diluée d'analyte dans la puce à l'aide d'une seringue, directement dans les plongeurs surmontant les réservoirs de celle-ci.
- **Nettoyage** : On fait ensuite circuler cette solution dans la puce afin que s'établisse partout la charge de surface. Ce nettoyage dure au moins 1h pour atteindre un état d'équilibre stable de la charge de surface.
- **Acquisition des mesures** : Une fois que la charge de surface est établie partout, on peut lancer les mesures. Pour cela on utilise une interface graphique Matlab dans laquelle il faut remplir les champs libres avec les caractéristiques voulues de la série d'expérience à savoir les champs électriques, les pressions, le temps de la mesure, les paramètres de la caméra (temps d'exposition, gain) et le nom du dossier d'images à créer. La figure 3.5 donne un aperçu

de l'interface graphique à utiliser.

- **Déroulement des mesures** : Une série d'expériences peut compter plusieurs mesures différentes. Une mesure correspond à un champ électrique et une pression imposés et se déroule de la manière suivante :
 - Un premier nettoyage de 20 minutes est effectué afin de se placer toujours dans les mêmes conditions initiales.
 - A la fin du nettoyage, les générateurs appliquent le champ électrique et la pression fixés et la caméra se déclenche. Elle prend alors des photos à intervalles de temps déterminés par l'utilisateur.
 - Une fois le temps d'une mesure écoulé (lui aussi déterminé au lancement de l'expérience), la caméra se ferme et les données sont prétraitées par Matlab et enregistrées à l'endroit spécifique choisi par l'utilisateur.
- **Traitement des mesures** : Enfin, une fois toutes les images acquises par notre plateforme, il ne reste plus qu'à les traiter. Pour cela, on utilise d'autres codes Matlab qui permettent d'exploiter un grand nombre de données des images. Ce point est l'objet du paragraphe qui suit.

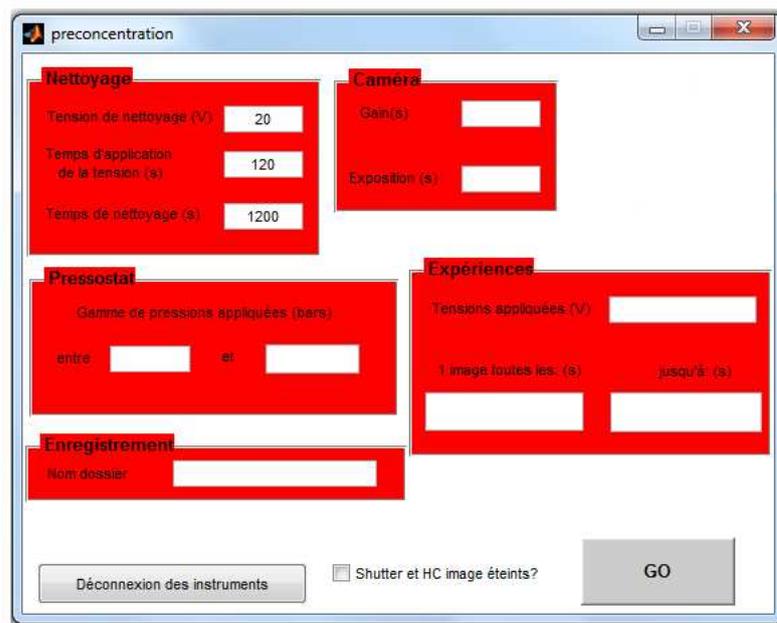


FIGURE 3.5 – Interface graphique Matlab utilisée pour le lancement d'une expérience de préconcentration. L'utilisateur doit renseigner les paramètres de la caméra, les pressions et les champs électriques à appliquer, les intervalles de temps de prise d'images ainsi que le nom du répertoire de stockage des données enregistrées.

3.2.3.3 Traitement des données

Il faut maintenant utiliser l'ensemble des images recueillies lors de l'expérience pour quantifier l'électropréconcentration sélective. A partir des images, on peut

tracer les profils de préconcentration qui représentent l'évolution de l'intensité de préconcentration dans tout le canal au cours du temps. Ces profils peuvent d'abord être tracés en intensité brute, sans aucune correction, afin d'avoir une idée de ce qu'il s'est passé pendant l'expérience et de savoir si, oui ou non, il y a eu préconcentration. Cependant, cette méthode ne nous donne qu'une approche qualitative du phénomène et ne nous permet pas de comparer les expériences entre elles ni de déduire des taux de préconcentration et donc de valider une efficacité quantitative de la méthode proposée. Pour véritablement comprendre et étudier l'augmentation réelle d'intensité de fluorescence au cours du temps, il est nécessaire de corriger l'intensité brute de fluorescence et même de la relier directement à la concentration de protéine afin de pouvoir raisonner en termes de taux de préconcentration.

Une première correction consiste à simplement prendre en compte les conditions initiales ainsi que le bruit de fond de l'expérience. De cette manière, on obtient une première intensité normalisée qui rend un peu mieux compte des conditions réelles de l'expérience et qui ne se contente pas de tracer l'intensité à l'intérieur du canal sans la relier à l'extérieur. Pour tracer cette intensité normalisée on procède de la façon suivante :

$$I_{normalisee} = \frac{I_{brut} - I_{black}}{I_{brut}^0 - I_{black}^0} \quad (3.1)$$

avec I_{brut} : l'intensité dans le canal au temps t

I_{black} : l'intensité du background (hors canal)

I_{brut}^0 : l'intensité dans le canal sur la première image (au temps 0)

I_{black}^0 : l'intensité du background sur la première image (au temps 0)

Grâce à cette intensité normalisée, on obtient un renseignement sur l'allure des profils de préconcentration mais la valeur de l'intensité obtenue ne prend pas en compte ce que l'on pourrait appeler "les variables de l'expérience". En effet, toute expérience de préconcentration est différente des autres puisque, d'une expérience à l'autre et d'un jour à l'autre, tout peut être modifié : les paramètres d'acquisition, l'usure de la lampe, les conditions extérieures d'éclairage de la pièce etc. On peut donc difficilement comparer des courbes obtenues par cette normalisation.

Il est donc nécessaire de corriger plus rigoureusement l'intensité brute. Essayons pour cela de poser le problème. L'intensité due à la fluorescence enregistrée en un point de l'espace (x,y) , pour un échantillon fluorescent de concentration $C(x,y)$, dans un canal d'épaisseur e et pour une expérience au temps t_{exp} est donnée par :

$$I_{fluo}(x, y, t_{exp}, \alpha) = \alpha \cdot \phi \cdot I_{exc}(x, y, t_{exp}) \cdot C(x, y) \cdot e \quad (3.2)$$

où $I_{exc}(x, y, t_{exp})$ est l'ensemble des photons excitant l'échantillon (qui dépend de la lampe mais aussi de l'objectif, du chemin optique...), α dépend des paramètres d'acquisition de la caméra (temps d'exposition, binning, gain) et ϕ est le rendement quantique de fluorescence, intrinsèque au fluorophore. α et ϕ sont indépendants de x , y et t_{exp} .

Cependant, une partie de l'intensité enregistrée ne provient pas de la fluorescence. En effet, quand $C = 0$, la caméra enregistre le signal :

$$I_{black}(x, y, t_{exp}, \alpha) = \alpha \cdot \rho(x, y) \cdot I_{exc}(x, y, t_{exp}) \quad (3.3)$$

où $\rho(x, y)$ est une fonction indiquant comment les photons sont réfléchis par l'échantillon et prenant aussi en compte les photons parasites provenant de la lumière de la pièce. L'intensité brute que l'on obtient lors de nos expériences est donc :

$$I_{brut}(x, y, t_{exp}, \alpha) = I_{fluo}(x, y, t_{exp}, \alpha) + I_{black}(x, y, t_{exp}, \alpha) \quad (3.4)$$

La question qui se pose alors est : comment s'affranchir de la lumière environnante et des variations temporelles ? En effet, l'intensité de la lampe peut changer de jour en jour. De même, le système optique ne va pas envoyer le même nombre de photons d'excitation en chaque point de l'échantillon. C'est pourquoi I_{exc} dépend de x , y et t_{exp} . Pour corriger ce phénomène, il faut enregistrer pour chaque expérience une image permettant d'obtenir ce que l'on appelle ici un I_{white} , une sorte de référence à laquelle se ramener. Pour l'obtenir il faut choisir un échantillon homogène de concentration connue C_{white} , indépendant de (x, y) . Son intensité brute sera alors :

$$I_{white}(x, y, t_{exp}, \alpha_w) = \alpha_w \cdot \phi_w \cdot I_{exc}(x, y, t_{exp}) \cdot C_w \cdot e + I_{blackw}(x, y, t_{exp}, \alpha_w) \quad (3.5)$$

où l'indice w signifie "avec les paramètres correspondant au I_{white} ".

On peut ainsi calculer une intensité corrigée de l'intensité de fluorescence de nos expériences :

$$I_{fluo,corr}(x, y) = \frac{I_{brut}(x, y, t_{exp}) - I_{black}(x, y, t_{exp}, \alpha)}{I_{white}(x, y, t_{exp}, \alpha_w) - I_{black}(x, y, t_{exp}, \alpha_w)} = \frac{\alpha \cdot \phi \cdot C(x, y)}{\alpha_w \cdot \phi_w \cdot C_w} \quad (3.6)$$

soit

$$I_{fluo,corr}(x, y) = f(\alpha, \alpha_w, \phi, \phi_w, C_w) \cdot C(x, y) \quad (3.7)$$

où f est le facteur de proportionnalité entre l'intensité de fluorescence corrigée et la concentration. Il faut calibrer la valeur de $f(\alpha, \alpha_w, \phi, \phi_w, C_w)$ pour des valeurs connues de C .

Pour résumer, on peut mesurer le I_{white} avec des paramètres d'acquisition α_w différents des paramètres expérimentaux α . Cependant il faut toujours garder les mêmes α_w pour comparer des expériences entre elles ; I_{white} doit nécessairement être enregistrée avec les mêmes paramètres d'acquisition. Dans le cas d'expériences où le I_{white} n'a pas été mesuré, on a considéré un I_{white} moyen en faisant l'hypothèse que ce paramètre dépend relativement peu du moment de l'expérience. Ce n'est pas vraiment exact mais cela nous permet d'analyser d'anciennes données qui, à l'époque, n'étaient pas traitées de cette manière.

Pour pouvoir comparer des expériences espacées dans le temps, il faut donc pouvoir les corriger toutes de la même manière. Pour tracer les profils, nous avons utilisé tout au long de ce manuscrit la formule suivante :

$$I_{corrige} = \frac{I_{mes}}{I_{ref}} = \frac{I_{brut} - I_{black}}{I_{white} - I_{blackw}} \quad (3.8)$$

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

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

I_{white} : La valeur d'intensité de référence dans les conditions α_w

I_{blackw} : L'intensité pour $C=0$ dans les conditions α_w

En pratique, avant chaque expérience nous utilisons une puce appelée puce de référence et constituée d'un canal simple de mêmes dimensions que les microcanaux de notre puce de travail (ou puce de préconcentration). Nous utilisons cette puce là et non pas la puce où les expériences de préconcentration seront faites pour éviter toute contamination. En effet, la mesure du I_{white} nécessite l'injection d'une solution fluorescente et va donc changer l'état de surface de la puce ce qui pourrait agir directement sur les préconcentrations ultérieures. C'est pourquoi il est plus astucieux d'utiliser une puce dédiée à la mesure du I_{white} . Le canal de cette puce est rempli d'une solution fluorescente de concentration connue et fixée pour le reste des expériences afin de pouvoir effectuer des comparaisons entre chaque courbe. On définit ensuite les paramètres d'acquisition de la caméra pour cette mesure de référence (I_{white}) puis, comme on peut le voir sur la Figure 3.6, on délimite sur l'image deux rectangles ou régions d'intérêt (ROI), l'un correspondant au canal rempli qui nous intéresse et l'autre identique mais décalé hors du canal et correspondant au background. On peut alors calculer pour chaque x de la ROI une valeur d'intensité moyennée sur y (c'est le dénominateur de la formule 3.8) et définie par la relation :

$$I_{ref} = I_{ROI A}^{moy} - I_{ROI B}^{moy} \quad (3.9)$$

Maintenant que l'on a notre référence, on procède exactement de la même manière que précédemment sur chaque image des expériences de préconcentration en définissant les deux mêmes ROI (la zone intéressante où se produit la préconcentration et le background associé) et en obtenant ainsi le numérateur de la formule 3.8 :

$$I_{mes} = I_{ROI1}^{moy} - I_{ROI2}^{moy} \quad (3.10)$$

Enfin, pour étudier l'efficacité et les caractéristiques de notre préconcentration, il faut coupler cette valeur d'intensité corrigée à la concentration correspondante d'analyte. Pour cela, il faut se référer à une courbe de calibration (exemples sur la Figure 3.7) obtenue en injectant différentes concentrations connues de l'analyte étudié et en calculant l'intensité corrigée obtenue, de la même manière que précédemment. Pour cette courbe de calibration, il est extrêmement important de conserver les mêmes paramètres d'acquisition d'images que ceux que l'on a utilisé pour les expériences de préconcentration. Grâce à cela, on peut alors remonter à des taux réels de préconcentration en reportant sur cette courbe de calibration les intensités de préconcentration obtenues lors des expériences et en regardant la valeur de la concentration associée. Connaissant la concentration initiale d'analyte que l'on a injecté, on peut en déduire le facteur de préconcentration que l'on a obtenu ainsi que la vitesse de la préconcentration.

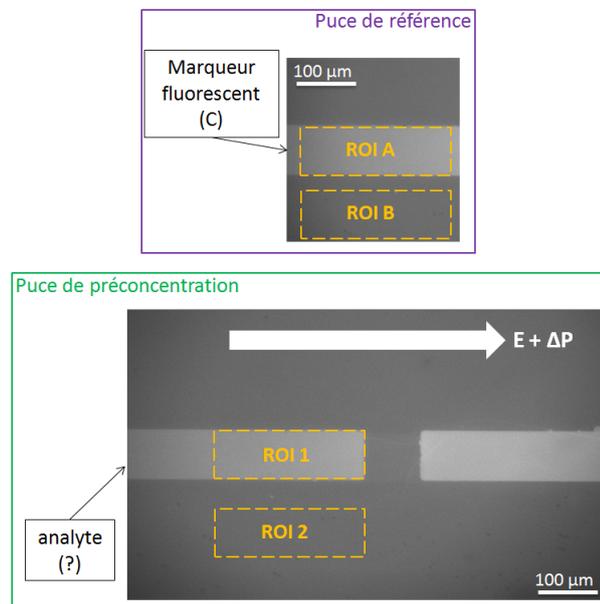


FIGURE 3.6 – Schéma explicatif du calcul de l'intensité corrigée des expériences de préconcentration.

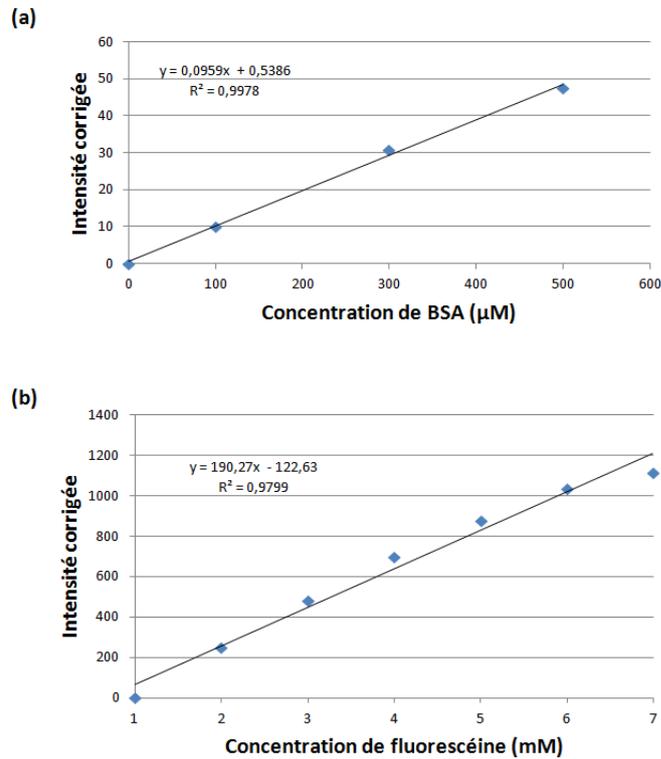


FIGURE 3.7 – Courbes de calibration représentant la relation quasi linéaire entre la concentration d’analyte et l’intensité corrigée de fluorescence correspondante pour (a) la BSA et (b) la fluorescéine, avec des paramètres d’acquisition donnés à chaque fois.

3.2.3.4 Automatisation du traitement

Maintenant que l’on a décidé de la correction à faire sur chaque image, on peut tracer différentes courbes pour chaque expérience. Pour toute la suite de ce manuscrit, nous avons adopté la convention suivante : l’anode du système est à gauche de la fente et la cathode est à droite. Ceci sera retranscrit dans les profils par l’inversion des axes dans le cas anodique. Dans chacun des deux cas, l’axe des ordonnées représentera l’entrée du nanocanal (voir Figure 3.8).

Tous les graphiques présentés par la suite ont été tracés avec l’aide de Matlab. Tout comme pour l’automatisation du banc expérimental, nous avons développé plusieurs codes permettant une utilisation simple et un traitement efficace des données recueillies lors des expérimentations (1 à 2Go par expérience). Nous avons donc maintenant à notre disposition trois interfaces graphiques très intuitives (même pour des utilisateurs ponctuels, non initiés au banc expérimental) et permettant d’obtenir un grand nombre d’informations en quelques minutes seulement. Elles sont composées chacune de champs libres à remplir par l’utilisateur grâce aux informations de l’expérience.

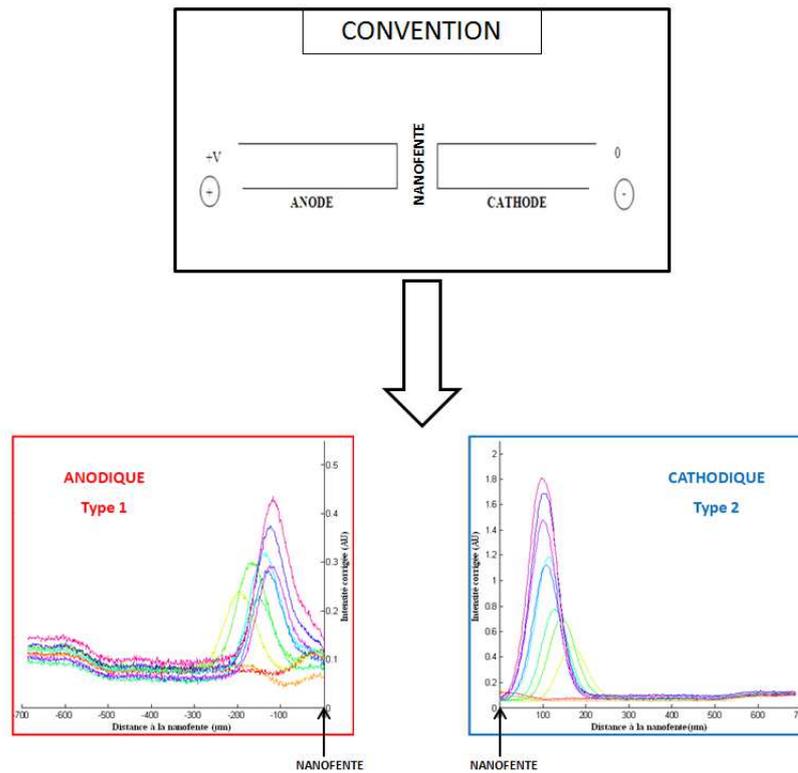


FIGURE 3.8 – Schéma explicatif de la convention adoptée pour la représentation des profils de préconcentration. L’anode du dispositif est à gauche et la cathode à droite. Une préconcentration anodique sera donc représentée avec l’axe des ordonnées (représentant l’entrée de la nanofente) à droite alors que le profil d’une préconcentration cathodique aura l’axe des ordonnées à gauche.

Une première interface nous permet d’obtenir les graphiques fondamentaux de notre étude, à savoir les profils de préconcentration. Ces profils représentent l’évolution de l’intensité corrigée (définie au paragraphe 3.2.3.3) dans le canal au cours du temps, pour un champ électrique et une pression fixes. La Figure 3.9 montre l’interface correspondante ainsi qu’un exemple de courbe obtenue. L’utilisateur doit entrer le nom du dossier contenant les images à traiter ainsi que les paramètres de l’expérience (les champs électriques et pressions appliqués, les intervalles entre les images et le nombre total d’images). Il doit aussi indiquer dans quel canal s’observe la préconcentration. Enfin, il doit renseigner les éléments nécessaires à la correction de l’intensité brute, à savoir les paramètres de la courbe de calibration associée (ordonnée à l’origine et pente).

On peut ensuite faire une étude comparative plus poussée en champ électrique ou en pression. En effet, il est intéressant de connaître l’évolution du taux maximal de préconcentration ou encore de la position du pic en fonction de ces deux paramètres. On peut alors lancer le second traitement, après s’être servi du premier, qui nous permet d’obtenir trois nouvelles informations à savoir l’évolution au cours du temps de l’intensité maximale de préconcentration, de la distance du pic de préconcentration à la nanofente et de la largeur à mi hauteur (ou FWHM)

de ce même pic. Ces informations sont données de plusieurs manières : en fonction du temps, du champ électrique ou même de la pression appliqués. Elles nous renseignent sur l'efficacité de la préconcentration (à travers l'intensité maximale), sa stabilité dans le temps et l'espace (grâce à la distance du pic à la nanofente) ainsi que sur sa sensibilité, retranscrite par la finesse du pic obtenu.

Enfin, le dernier traitement nous donne un autre type de graphe puisqu'il permet d'avoir une cartographie 2D de la préconcentration maximale (comme représenté sur la Figure 3.10). Celle-ci est en fait une échelle de gris nous renseignant sur l'importance de cette préconcentration maximale selon la pression, le champ électrique et le temps appliqués. Elle génère donc un bilan complet et facile à interpréter des résultats obtenus.

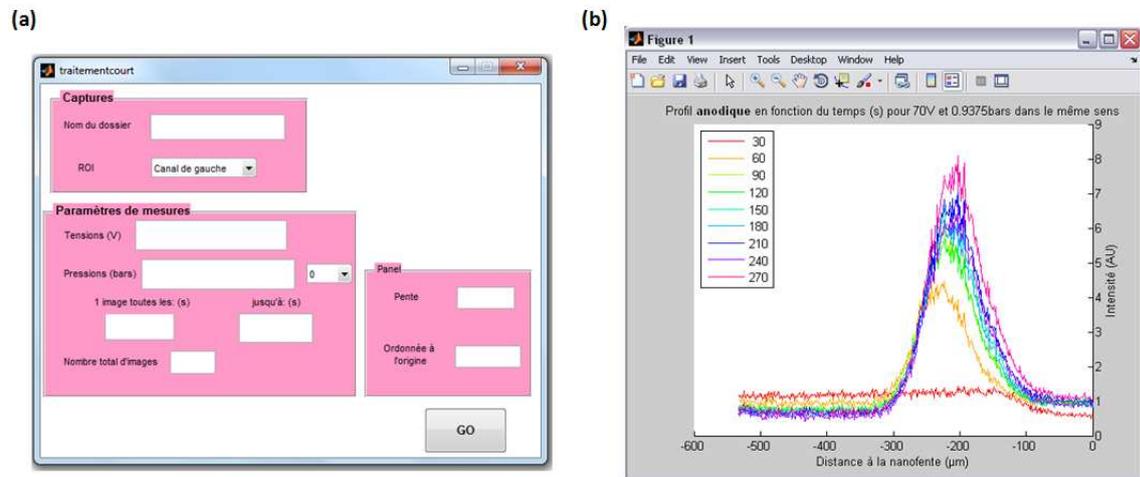


FIGURE 3.9 – (a) Interface graphique Matlab utilisée pour le traitement d'une expérience de préconcentration. Une fois les champs libres remplis par l'utilisateur, l'interface trace les profils de préconcentration correspondants comme sur l'exemple (b).

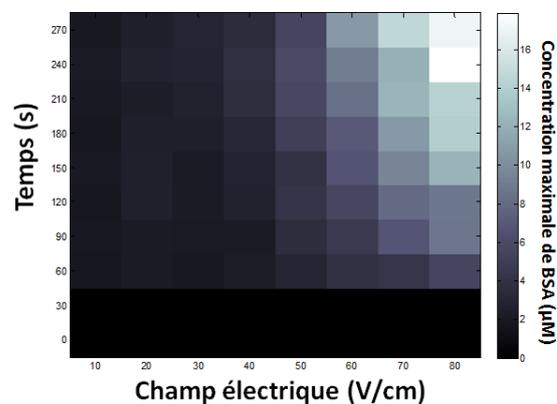


FIGURE 3.10 – Cartographie 2D de la préconcentration maximale en fonction du temps et du champ électrique imposé à une pression fixe.

Conclusion

Après avoir introduit les enjeux de la microfluidique et des systèmes d'analyse en électrophorèse capillaire, puis mis en place la théorie de l'électropréconcentration classique et de celle assistée en pression à l'intérieur d'une structure MNM, nous venons donc d'aborder la mise en œuvre des tels dispositifs. Ces puces fluidiques, présentant une structure en H avec un nanocanal d'une centaine de nanomètres de profondeur au centre d'un microcanal droit (de quelques micromètres de profondeur), sont issues de méthodes classiques de microfabrication. A l'aide d'un procédé de scellement à basse température breveté par le doctorant précédent, C. Nanteuil, nous sommes capables d'obtenir des systèmes d'analyse évolués et robustes. Ces systèmes sont ensuite utilisés sur un banc d'expérimentations créée au LPN avant cette thèse et amélioré au cours de ces trois dernières années. Ce banc, composé de tout l'équipement nécessaire à l'application d'un champ électrique et d'une tension ainsi qu'à une détection en fluorescence, a été entièrement automatisé par nos soins grâce l'utilisation de codes Matlab. Il permet d'effectuer un grand nombre d'expériences de préconcentration, même en l'absence d'un quelconque utilisateur. Le développement d'autres codes et le protocole complet mis en place pour le traitement des données vont nous permettre d'évaluer l'efficacité de la méthode d'électropréconcentration sélective proposée dans ce travail de thèse.

Chapitre 4

Electropréconcentration assistée en pression de la fluorescéine

Régimes dominés électrophorétiquement

*Si vous avez l'impression que vous êtes trop petit pour pouvoir changer quelque chose,
essayez donc de dormir avec un moustique...
vous verrez lequel des deux empêche l'autre de dormir.*
- Le Dalai Lama -

On a vu dans les trois premiers chapitres de cette thèse que les microtechnologies permettaient d'offrir de nouvelles perspectives d'étude et de contrôle de la préconcentration de biomolécules dans les systèmes microfluidiques. Ces technologies permettent d'intégrer des dimensions nanométriques et de proposer une structure MNM tout verre, où la charge de surface joue un rôle toujours plus important ce qui affecte fortement le transport de molécules chargées.

Jusqu'à présent, la plupart des puces microfluidiques analytiques étaient réalisées de façon à maintenir une section constante le long du réseau de microcanaux, la charge de surface étant, quant à elle, fixée par la nature de la solution tampon contenant les analytes, voir par des dépôts polymériques qui venaient tapisser toute la surface interne des microcanaux. C'est la voie classique de la séparation électrophorétique sur puce, qui s'effectue dans un long microcanal, où les analytes sont séparés en fonction de leur mobilité électrophorétique.

L'un des paramètres pertinents pour une séparation est la charge de surface volumique, c'est-à-dire la charge de surface divisée par la section du canal. Comme nous l'avons discuté dans les précédents chapitres, des variations de cette charge de surface volumique se traduiraient par des variations locales de la vitesse de l'analyte dans ces structures et, par conséquent, par le développement "d'embouteillages". On peut donc mettre en œuvre intentionnellement d'importantes variations de

cette charge de surface volumique dans les microcanaux pour générer ces “embouteillages ioniques” et tirer ainsi profit du phénomène pour arrêter sélectivement les espèces ioniques à un endroit précis et prédictible du microcanal. Pour ce faire, on peut introduire une variation de section dans les microcanaux qui peut être une nanofente, et proposer la structure MNM telle qu’elle a été décrite dans le chapitre 2. Cette nouvelle approche de modification locale de la charge de surface volumique est d’autant plus intéressante qu’elle permet d’obtenir simultanément la séparation et la préconcentration de notre analyte en une seule étape. C’est ce nouveau protocole, qui consiste à préconcentrer l’analyte tout en choisissant sa localisation, que nous appelons “l’électropréconcentration sélective”.

Précédemment, des calculs numériques au sein de cette structure MNM (avec $h_{nano} = 50nm$) ont été menés par A. Plécis au cours de sa thèse [14] sur le cas d’analytes chargés négativement et couramment étudiés. Sa première étude concernait l’électropréconcentration cathodique de la fluorescéine à faibles forces ioniques, c’est-à-dire dans une solution de KCl de concentration inférieure à $100\mu M$.

La fluorescéine ($C_{20}H_{10}Na_2O_5$ ou 3H-xanthene-3-one) est une substance chimique complexe composée de deux molécules de phénols liées à un cycle furane lui même relié à un acide benzoïque. Elle est constituée d’une molécule capable de réémettre une lumière fluorescente verte (à 525 nm) lorsqu’elle est excitée par une lumière bleue (à 485 nm). C’est le marqueur fluorescent le plus couramment utilisé. Sa masse moléculaire est de 376,28 g/mol. En solution, c’est donc un petit analyte présentant deux charges négatives et une mobilité électrophorétique relativement grande par rapport à la mobilité électroosmotique de notre dispositif. Ainsi, en électropréconcentration conventionnelle, cet analyte subit des régimes où la composante électrophorétique domine. Ces régimes “dominés électrophorétiquement” correspondent à une préconcentration cathodique.

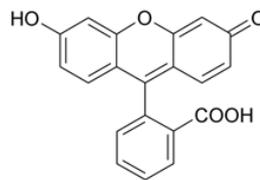


FIGURE 4.1 – Formule chimique de la fluorescéine.

On peut alors tenter de placer les régimes obtenus pour la fluorescéine sur un diagramme de phase comme celui proposé par Santiago et al. [78, 82]. On obtient alors la Figure 4.2. Celle-ci est tracée en fonction de trois paramètres différents : $c_r^*h_n^*$, v_{2n}^* et v_{2mol} . Ces paramètres sont ceux introduits par Santiago et traduisant l’effet de polarisation de concentration seul dans une solution simple contenant un ion et son co-ion ainsi qu’un autre paramètre que l’on a choisi d’introduire et se référant cette fois-ci à l’analyte ajouté à la solution. Ainsi, la ligne en gras (et donc les valeurs de $c_r^*h_n^*$ et v_{2n}^*) sépare la zone de CP propageant (sous la courbe) de la

zone de CP non propageant (au dessus de celle-ci, hachurée en gris), autrement dit les régimes instables des régimes stables, tandis que la valeur de v_{2mol} détermine le type de régime obtenu à savoir cathodique (zone bleue) ou anodique (zone rose). La fluorescéine serait donc quelque part dans la zone bleue de ce diagramme et pourrait se trouver au dessus ou en dessous de la ligne en gras pour donner un régime cathodique plus ou moins stable. Cette représentation sera étudiée de manière plus poussée un peu plus tard dans cette section.

Dans ce chapitre, nous allons étudier cette préconcentration cathodique de la fluorescéine à faibles forces ioniques. Nous reviendrons tout d'abord sur les précédentes simulations d'A. Plécis [14], ainsi que sur le modèle théorique proposé par Santiago et al. [78, 82]. Nous étayerons ces résultats théoriques avec des expériences de préconcentration classique de la fluorescéine dans une puce MNM. Dans un second temps, nous développerons les résultats expérimentaux obtenus avec notre méthode de préconcentration sélective assistée en pression. Nous verrons que l'ajout d'une pression hydrodynamique permet de stabiliser le point de focalisation obtenu en préconcentration conventionnelle.

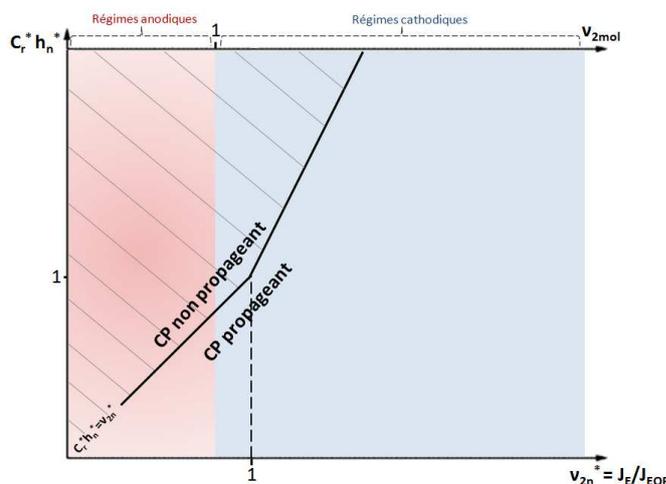


FIGURE 4.2 – Diagramme représentant les zones principales de préconcentration : pour les valeurs $v_{2mol} < 1$ on retrouve les régimes dominés électroosmotiquement (régimes anodiques) alors que pour les valeurs $v_{2mol} > 1$ ce sont les régimes dominés électrophorétiquement (ou cathodiques) qui sont observés. Au dessus de la ligne en gras, on est dans le mode de CP non propageant donnant des régimes stables (zone privilégiée pour des applications de préconcentration) tandis qu'en dessous de cette ligne les régimes seront instables dans le mode de CP propageant. L'obtention de l'un de ces deux modes de CP dépend des valeurs de $c_r^* h_n^*$ et v_{2n}^* . Ce diagramme a été réalisé à partir de celui proposé par Santiago et al. [78]

4.1 Electropréconcentration conventionnelle

4.1.1 Premières observations expérimentales

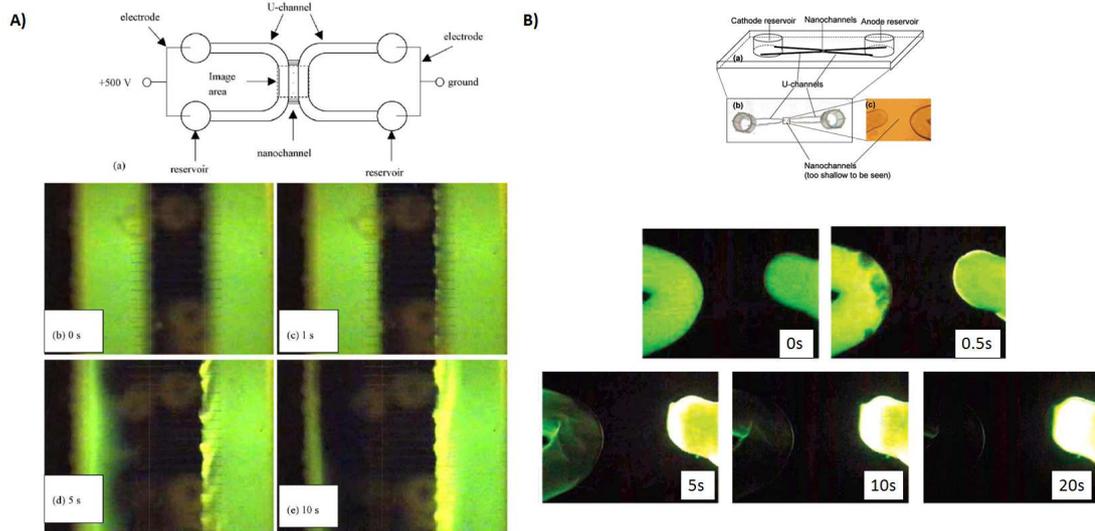


FIGURE 4.3 – Phénomène de déplétion/enrichissement dans le dispositif à nanocanaux de A) Datta et al. [93] (a) Schéma du dispositif à nanocanaux. Les deux canaux en U ($30\text{mm(L)}\times 1\text{mm(l)}\times 50\mu\text{m(p)}$) sont reliés par 50 nanocanaux parallèles ($1\text{mm(L)}\times 5\mu\text{m(l)}\times 300\text{nm(p)}$). (b) Image de fluorescence du dispositif après injection dans les canaux d’une solution de fluorescéine $20\mu\text{M}$ dans un tampon tetraborate de sodium $\text{pH}=9$ à $100\mu\text{M}$. (c-e) Images prises après application d’une tension de 500V pour respectivement 1s, 5s, et 10s. B) Pu et al. [81] Sont représentés, le schéma du dispositif constitué de deux canaux en U ($750\mu\text{m(l)}\times 100\mu\text{m(p)}\times 20\text{mm(L)}$) reliés par 8 nanocanaux ($100\mu\text{m(l)}\times 60\text{nm(p)}\times 1\text{mm(L)}$), ainsi que des images de fluorescence du dispositif prises après injection dans les canaux d’une solution de $30\mu\text{M}$ de fluorescéine dans un tampon tetraborate de sodium $\text{pH}=8$ à $70\mu\text{M}$ et après application d’une tension de 1000V pendant 0,5s, 5s, 10s et 20s.

Les premières expériences d’électropréconcentration conventionnelle de la fluorescéine datent d’il y a maintenant presque une décennie. A ce moment là, les chercheurs travaillaient avec une géométrie quelque peu différente de la nôtre. Au lieu de considérer une forme de H avec un nanocanal entre deux microcanaux droits, comme nous le faisons, ils étudiaient un dispositif constitué de deux larges canaux en U reliés entre eux par un réseau de nanocanaux. Nous présentons ici les travaux d’un groupe américain qui, pour la première fois, avait exploité et mis en lumière le phénomène de déplétion/enrichissement dans ce type de structure.

Par application d’une tension importante (500V ou 1000V), ils ont montré qu’ils étaient capables de préconcentrer, en quelques secondes seulement, la fluorescéine du côté cathodique de leur dispositif [93, 81]. La Figure 4.3 présente deux séries d’expériences réalisées par ce groupe à 2 années d’intervalle. Dans les deux cas, ils ont travaillé avec un dispositif en forme de U avec 8 ou 50 nanocanaux. Ils ont

utilisé de la fluorescéine dans un tampon tetraborate de sodium à pH=8 ou pH=9. La concentration de fluorescéine était fixée à 20-30 μ M tandis que la force ionique du tampon était de 70-100 μ M. La profondeur des nanocanaux variait entre 60 et 300nm. Ils ont injecté la solution dans les canaux puis appliqué une tension aux bornes du dispositif en effectuant un suivi de l'évolution du système en fluorescence.

On peut voir clairement sur les images que l'intensité de fluorescence dans le microcanal cathodique (à droite du dispositif à chaque fois) augmente fortement tandis que celle dans le microcanal anodique (à gauche) diminue. Cette augmentation est d'autant plus forte à l'entrée cathodique des nanocanaux. Au bout d'une dizaine de secondes, le canal cathodique est extrêmement brillant tandis que le canal anodique devient presque noir. La fluorescéine s'est donc préconcentrée dans un régime cathodique, pouvant être comparé au régime CS "Cathodic Stacking", introduit précédemment, grâce au phénomène de déplétion/enrichissement des ions que nous avons expliqué dans le chapitre 2.

Il est important de souligner ici que, pour obtenir cette préconcentration cathodique, ces chercheurs devaient appliquer des tensions extrêmement importantes. Nous reviendrons sur ce point un peu plus loin dans ce manuscrit.

4.1.2 Prédictions théoriques

Suite à ces premières publications d'observations expérimentales, A. Plécis a mené différents calculs théoriques visant à mieux appréhender ce phénomène de déplétion/enrichissement. Les premières simulations concernaient donc la fluorescéine, dans du KCl à faible force ionique [77, 94]. Pour que l'effet d'exclusion enrichissement dans le nanocanal soit maximal, la concentration de KCl était fixée à 10 μ M. La Figure 4.4 (a) (de gauche à droite) montre la variation des profils de concentration de fluorescéine dans le microcanal cathodique en fonction de la densité de charge de surface. Le champ électrique appliqué était aussi modifié pour évaluer comment la compétition entre les forces électrophorétiques et l'électroosmose pouvait influencer l'effet de préconcentration. A. Plécis observait alors trois régimes différents clairement identifiables sur la Figure 4.4 (a).

A faible charge de surface et à tension moyenne (1mC et 40V par exemple), une accumulation de fluorescéine se produit rapidement à l'entrée cathodique de la nanofente. Comme le contreflux du fluide n'est pas suffisant, la fluorescéine est simplement rejetée par la barrière électrostatique induite par la charge de surface du nanocanal. Seule une petite partie des dianions est acceptée dans le nanocanal, donc la concentration de fluorescéine augmente jusqu'à ce que le flux entrant de fluorescéine égalise le flux sortant du nanocanal. Ce régime saturant correspond au régime CS saturant déjà observé par Pu [81] et Datta [93]. Il n'est en fait pas réellement dû au phénomène de polarisation de concentration et correspond simplement à des effets de diffusion. C'est le CP non propageant introduit par Santiago et al. [78] et représenté en vert sur la Figure 4.4 (a). C'est finalement

le régime le plus facile à obtenir lors de l'électropréconcentration conventionnelle, puisque c'est celui obtenu pour une grande variété de conditions expérimentales. En effet, on voit clairement sur la figure que le CS est majoritaire surtout à haut champ électrique appliqué (cas des observations de Pu [81] et Datta [93]). L'observation du régime CF à haut champ n'est possible qu'à très forte charge de surface. C'est donc ce régime CS, plutôt inintéressant pour nos applications, qui est souvent observé.

Quand la charge de surface est augmentée (Figure 4.4 (a) de gauche à droite), le flux EOF est amplifié, ce qui résulte en une translation du coefficient de transport vers des valeurs positives. Comme prédit par la théorie de la compétition des deux flux (rappelée ici en haut de la Figure 4.4), le front de préconcentration est déplacé vers les réservoirs cathodiques dans le microcanal. **Le taux de préconcentration de ce régime CF (régime obtenu dans la zone de CP propageant) est bien plus élevé que celui du régime CS** comme on peut le voir sur la Figure 4.4 (b) où le maximum de concentration après 1min normalisé par la concentration initiale est reporté. La localisation du front de préconcentration se déplace lentement quand le flux EOF est augmenté avec la charge de surface (Figure 4.4 (a) droite). Tandis que cette localisation reste aux alentours de quelques dizaines de micromètres pour des charges de surface modérées, un déplacement rapide de ce front de préconcentration apparaît brutalement au dessus d'une charge de surface critique. Une comparaison des profils de préconcentration à 5 et 5,5mC à 40V illustre cette transition. Lorsque l'on dépasse cette charge de surface critique on obtient un régime correspondant toujours au CP propageant de Santiago mais résultant en un CF instable (zone en bleu foncé sur la Figure 4.4 (a)). Tout comme la zone du CS, la zone d'obtention du CF instable est très vaste. Pour les faibles champs électriques, il n'y a pas de possibilité d'obtention d'un régime intéressant. Selon la charge de surface, soit on obtiendra un CS soit un CF instable. Lorsque l'on augmente ce champ électrique, on peut obtenir un CF stable mais seulement pour une petite gamme de charge de surface. Pour des valeurs trop importantes de cette dernière, la préconcentration migre vers les réservoirs cathodiques. On peut déterminer la limite entre ces deux régimes stable et instable en représentant la vitesse du déplacement du pic de préconcentration. Ainsi, la Figure 4.4 (d) montre une augmentation abrupte de cette vitesse à fortes charges de surface ce qui signifie que le front n'est pas stable et migre. Les taux de préconcentration pour ces régimes instables CF sont toujours plus grands que pour le régime CS (Figure 4.4 (b)). Cependant, comme le front de préconcentration est rapidement repoussé vers les réservoirs, seul le régime CF stable est recommandé pour des applications de préconcentration.

Les conditions d'une préconcentration optimale sont résumées sur la Figure 4.4 (c). Pour déterminer la région du CF stable (zone bleu clair sur la Figure 4.4 (a)), les Figures (b) et (d) de la Figure 4.4 ont été superposées. Outre le fait que ces évolutions nous permettent d'expliquer les résultats obtenus expérimentalement à fort champ par le groupe de Pu et Datta [93, 81] avec l'observation d'un régime

CS, on voit clairement que plus la tension appliquée est élevée, plus la charge de surface devra être importante pour pouvoir espérer obtenir un CF stable. Il est évident que cette stabilité de la préconcentration cathodique CF est plus difficile à observer expérimentalement car la fenêtre d'obtention est extrêmement restreinte. A faible tension appliquée, il est donc nécessaire d'optimiser la charge de surface de la structure MNM pour obtenir une préconcentration stable de forte efficacité. Quand le champ électrique est augmenté, le flux convectif dû au flux EOF et le flux électrophorétique sont eux-aussi augmentés. Toutefois, le flux électrophorétique semble augmenter plus lentement que le flux EOF. En effet, quand on se place à une charge de surface constante de 5mC et qu'on augmente linéairement le potentiel anodique, la préconcentration passe d'un CF instable (à 10 et 20V) à un régime CF stable (à 40V) et atteint finalement un régime CS à fort champ électrique (80V), ce qui indique une préconcentration dominée électrophorétiquement à hautes tensions.

Cette domination électrophorétique à champ électrique élevé a été observée pour des tampons à faible force ionique. Elle peut être expliquée par la saturation du potentiel zeta dit "apparent" ce qui limite le flux EOF. Au contraire, pour des tampons de forces ioniques modérées ou grandes, les calculs numériques ont révélé une saturation du flux électrophorétique à fort champ électrique à cause de l'effet de polarisation [95], tandis que le flux EOF reste proportionnel au champ électrique. Ces résultats peuvent donc expliquer pourquoi les préconcentrations cathodiques (régimes dominés électrophorétiquement) sont généralement obtenues avec des tampons de faible force ionique tandis que les préconcentrations anodiques (régimes dominés électroosmotiquement) sont toujours observées pour de fortes forces ioniques.

Nous avons voulu dans un premier temps faire suite à ces simulations en étudiant expérimentalement l'électropréconcentration conventionnelle (sous champ électrique seul) de la fluorescéine. Si l'on résume les simulations, on peut s'attendre à ce qu'à très faible tension et à grande charge de surface, le profil Cathodic Focusing (CF) soit instable au cours du temps. Un tel profil de préconcentration CF instable correspond à de faibles valeurs de $c_r^*h_n^*$ du mode CP propageant prédit par Santiago et al. [78]. Un profil CF stable peut être observé pour des valeurs de tension et de charge de surface intermédiaires (40V-100V à 10mC), à des valeurs de $c_r^*h_n^*$ plus grandes dans le régime CP non propageant [78]. De plus hautes tensions favorisent le régime Cathodic Stacking (CS) avec une préconcentration localisée proche de l'entrée de la nanofente [83].

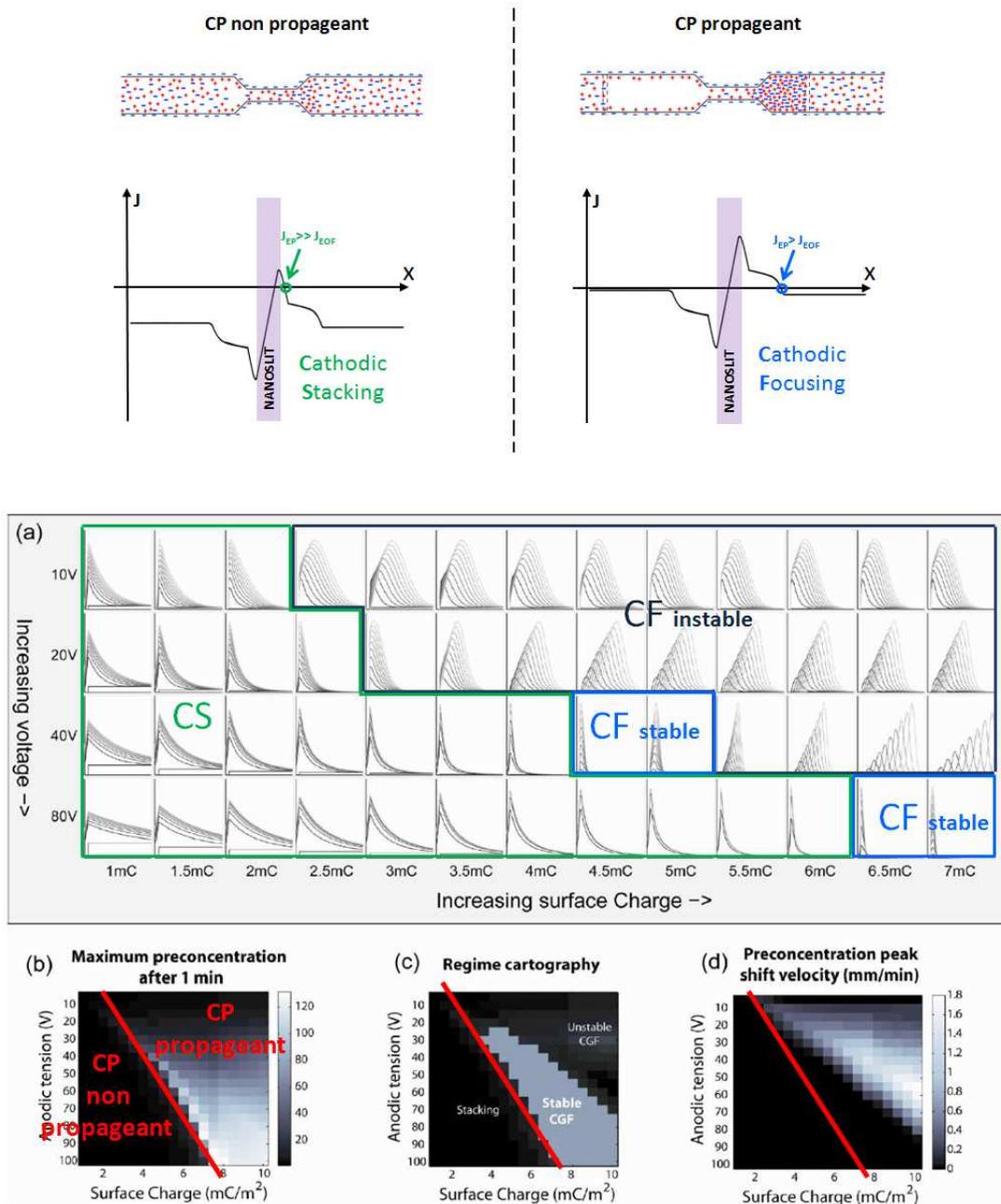


FIGURE 4.4 – Simulations de la préconcentration cathodique de la fluorescéine pour une nanofente de 50nm de hauteur dans une solution de KCl à 10 μ M. (a) Profils de préconcentration selon la charge de surface et le champ électrique en fonction du temps dans le microcanal cathodique. Chaque courbe correspond à un temps additionnel de 6s (la plus claire représentant 60s). Trois types de préconcentration sont observés au fur et à mesure que la charge de surface est augmentée : un premier régime CS présentant de faibles taux de préconcentration, un régime CF réellement intéressant pour des applications quantitatives de préconcentration et enfin un régime CF instable correspondant au CP propageant de Santiago et al.[78] (b) Taux de préconcentration (rapport de la concentration maximum finale sur la concentration initiale de fluorescéine) en fonction de la charge de surface et du champ électrique. (c) Cartographie des régimes CS et CF stables et instables. La meilleure préconcentration s’obtient pour le régime CF stable. (d) Vitesse de déplacement du pic mesurée d’après le déplacement de la position de la préconcentration maximale entre 55 et 60s. (issue de Plécis et al. [83])

On peut alors à ce stade combiner la théorie de Santiago [78] et les simulations de A. Plécis [83] en représentant les zones de préconcentration selon les différents paramètres variables. Ce diagramme de phase que nous avons introduit et décrit précédemment et qui dépend de trois paramètres, $c_r^* h_n^*$ et v_{2n}^* (effet de polarisation de concentration) ainsi que v_{2mol}^* (traduisant les caractéristiques de l'analyte étudié), est représenté sur la Figure 4.5. Lorsque l'on augmente ce dernier paramètre ($v_{2mol}^* > 1$), la vitesse électrophorétique est très grande devant la vitesse électroosmotique ce qui correspond aux régimes cathodiques (C) dominés électrophorétiquement (ceux obtenus pour la fluorescéine par exemple). Lorsque $v_{2n}^* < 1$, la vitesse électrophorétique est faible devant la vitesse électroosmotique ce qui donne alors des régimes anodiques (A) dominés électroosmotiquement. Lorsque la mobilité électrophorétique de l'analyte est très élevée (signifiant v_{2mol}^* grand) ou au contraire très faible (v_{2mol}^* petit), on obtient les deux cas extrêmes du diagramme à savoir les régimes de Stacking AS et CS. Lorsque cette mobilité est modérée par rapport à la mobilité électroosmotique, on obtient les deux régimes de Focusing AF et CF. Chacun de ces régimes peut être stable ou instable selon qu'il se trouve sur ou sous la ligne de séparation du CP propageant/non propageant.

Pour obtenir un régime cathodique focalisant intéressant pour la fluorescéine, il faut être dans la zone de CP non propageant définie par Santiago et représenté à gauche de la ligne continue du diagramme. La zone de CP propageant ne permet en effet pas d'obtenir des régimes stables puisque dans cette zone les effets de polarisation sont tels qu'ils se déplacent vers les réservoirs au cours de la préconcentration. Dans la zone de CP non propageant par contre, il est possible d'obtenir un régime CF intéressant et présentant de forts taux de préconcentration. Or, d'après les expressions numériques des 2 paramètres introduits par Santiago, $c_r^* h_n^*$ et v_{2n}^* sont inversement proportionnels à la charge de surface. Augmenter la charge de surface comme l'a fait A. Plécis (Figure 4.4) permet donc de diminuer les 2 paramètres du diagramme et de se déplacer du numéro 3 au numéro 1 de la Figure 4.5. On passe alors d'un régime CS stable à un régime CF stable puis à un CF instable, ce qui est en accord avec la Figure 4.4.

Cette variation de régime suivant la charge de surface et le paramètre v_{2n}^* n'étant pas trivial, nous avons décidé de garder la même charge de surface et ainsi permettre de maintenir $v_{2n}^* = v_2 z_2 F \eta / \zeta_n \epsilon$ à la même valeur. Pour ce faire le même champ électrique externe fort de 80V/cm a été appliqué pour toutes les expériences avec la fluorescéine. La concentration initiale de fluorescéine a été maintenue à 10 μ M. Notons que, dans ces expériences, la fluorescéine a été diluée dans différentes solutions de tampon borate à pH=9. Même si on n'a pas réalisé de simulations dans ces solutions tamponnées, des tendances peuvent être déduites des simulations précédentes proposées pour des solutions modèles comme le KCl [83] ou l'eau [78, 82]. Pour pouvoir changer la nature du régime de préconcentration cathodique et ainsi se déplacer sur le diagramme et passer d'un CF instable à un CF stable, on va faire varier la force ionique du tampon borate de 5.10⁻⁵M à 10⁻¹M.

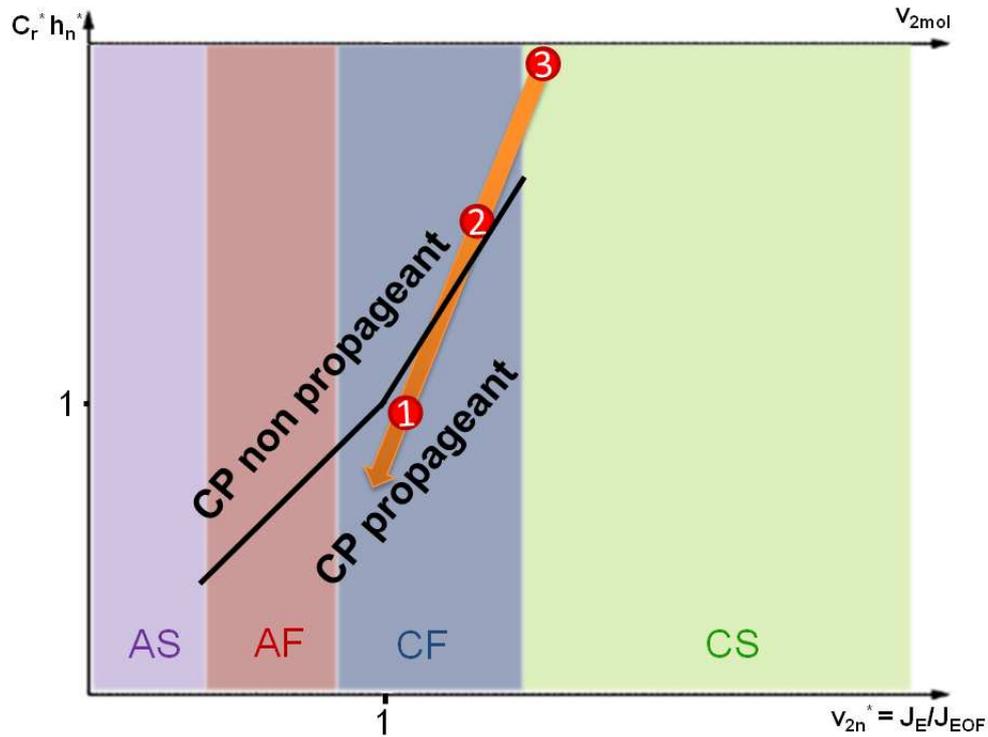


FIGURE 4.5 – Diagramme représentant les différents régimes de préconcentration (réalisé à partir de la théorie proposée par Santiago et al [78] et des simulations de A. Plécis [77]) en fonction de la charge de surface. Le CP propageant ne donne pas de régime stable (numéro 1 - CF instable) et se produit pour une charge de surface élevée. Le CP non propageant présente deux régimes : le CF stable lorsque la charge de surface est modérée et le CS stable se produisant à faible charge de surface.

4.1.3 Résultats expérimentaux

Faisons tout d'abord un point sur la façon de procéder pour obtenir des résultats exploitables. Sur la Figure 4.6 (a) on peut voir un exemple des images obtenues pour une expérience de préconcentration. Grâce à ces images, on peut suivre l'évolution de la fluorescence dans les canaux au cours du temps.

Afin d'obtenir des représentations graphiques des profils de préconcentration, on utilise un code Matlab. L'explication de la méthodologie du code a été expliquée en intégralité dans le chapitre 3, mais nous avons voulu la résumer ici (Figure 4.6 (b)) puisque c'est la première fois que l'on va présenter une série d'expériences. Rappelons donc que le traçage des profils de préconcentration se fait en 4 étapes principales. L'utilisateur doit d'abord déterminer deux régions d'intérêt sur une image de fluorescence. L'une correspond à la zone intéressante où s'effectue la préconcentration (ROI1 en jaune sur la figure) et l'autre est en réalité une translation de la première dans le dispositif mais en dehors du canal (ROI2 en vert sur la figure), prenant en compte ainsi le bruit inhérent à l'expérience. Le code Matlab effectue ensuite le calcul de l'intensité corrigée pour chaque image de la série (donc

chaque temps de l'expérience) et en chaque point de la ROI1.

Cette intensité est déterminée à partir de la valeur brute obtenue en apportant une correction quant au bruit (I_{black}) et à des valeurs de référence (dénominateur). Les couleurs des cercles et des rectangles représentés sur la Figure 4.6 (b) renseignent sur la ROI à considérer pour trouver la valeur du terme entouré. La forme (cercle ou rectangle), quant à elle, donne une information sur les paramètres d'acquisition à considérer. Notons que les paramètres α et α_w peuvent être les mêmes mais, s'ils sont différents, il faut absolument conserver la même valeur du paramètre α_w d'un jour à l'autre (et donc d'une série d'expériences à une autre). Une fois l'intensité corrigée obtenue, Matlab se réfère à la courbe de calibration qui a été tracée de la même manière et qui a été obtenue pour des concentrations connues de fluorescéine. Il en déduit alors les valeurs de concentrations équivalentes aux intensités corrigées trouvées en chaque point de la ROI et peut enfin générer un profil représentant la concentration de la fluorescéine en fonction de la distance dans le canal pour différents temps d'expérience (représentés par les différentes couleurs).

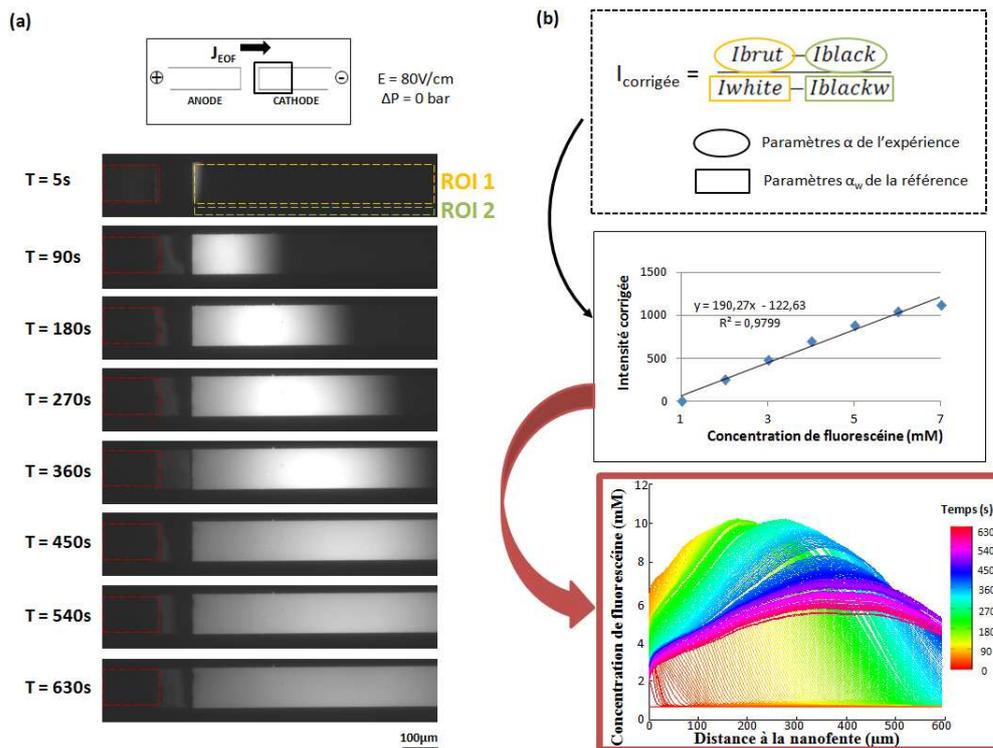


FIGURE 4.6 – (a) Exemples d'images obtenues pour une expérience d'électropréconcentration à différents temps. On obtient ici une préconcentration cathodique. Les pointillés rouges délimitent le microcanal anodique, les pointillés jaunes délimitent la région d'intérêt où s'effectue la préconcentration (ROI1) et les pointillés verts délimitent la région d'intérêt permettant de prendre en compte le bruit (ROI2). (b) Rappel du protocole suivi pour extraire un profil de préconcentration des images présentées en (a). Après avoir délimité les ROI, Matlab calcule l'intensité corrigée grâce à la formule en faisant bien attention de respecter les bonnes conditions d'acquisition et les bonnes ROI. Il se réfère ensuite à la courbe de calibration obtenue avec la même méthode pour en déduire la concentration de fluorescéine équivalente. Cette concentration dans le microcanal au cours du temps est alors tracée.

La Figure 4.7 montre des profils expérimentaux de préconcentration obtenus avec cette méthode pour différentes préconcentrations cathodiques classiques (sans ajout de pression hydrodynamique externe $J_P=0$). On y a représenté la concentration équivalente de fluorescéine en fonction de la distance à la nanofente pour différents temps de préconcentration. On peut donc voir qu'à très faible force ionique ($5.10^{-5}M$), où l'effet d'enrichissement dans la nanofente est maximal, il n'y a pas de préconcentration stable. L'intensité de fluorescence commence par fortement augmenter, reflétant une préconcentration, mais après 3 minutes d'expérience, le pic d'intensité décroît tout en s'éloignant de la nanofente vers les réservoirs cathodiques. Un tel profil de préconcentration ressemble au CF instable [83] dans le CP propageant [82]. Ce cas est représenté sur la Figure 4.5 par le numéro 1 en rouge. L'intensité atteint une valeur expérimentale **maximale** (ici calibrée et correspondant à 10mM environ, ce qui équivaut à un taux de préconcentration de 1000 puisque la concentration initiale de fluorescéine était de $10\mu M$) comme attendue.

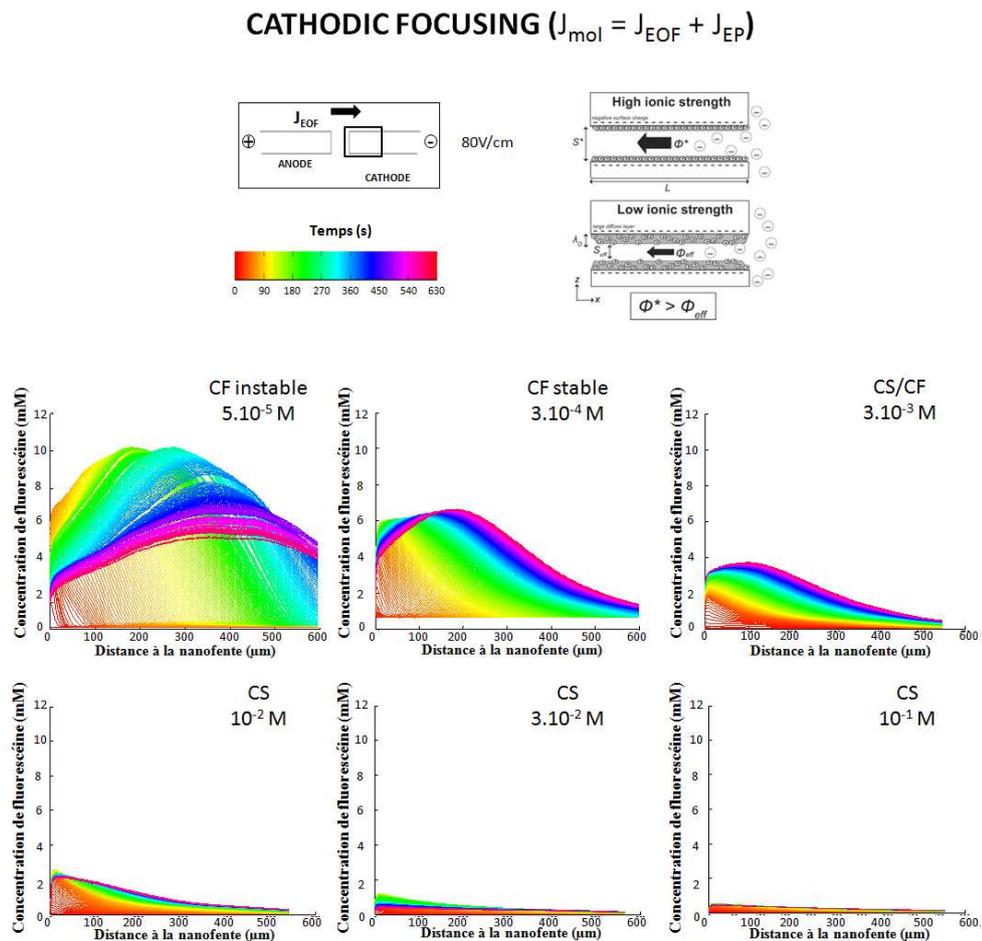


FIGURE 4.7 – Le rôle de la force ionique de la solution tampon dans la préconcentration conventionnelle de la fluorescéine : en augmentant la force ionique on stabilise d'abord la préconcentration cathodique puis on rapproche d'autant plus le pic de concentration que l'on augmente cette force ionique et on diminue, dans le même temps, l'efficacité de préconcentration.

En augmentant la force ionique du tampon à 3.10^{-4}M , on voit clairement que le régime CF se stabilise. Après 10 minutes d'application du champ électrique, le pic de préconcentration n'a pas diminué en intensité et reste à une valeur maximale de 9mM atteinte aux alentours de 5 minutes. De plus, contrairement au cas précédent, le front ne s'est pas complètement déplacé vers les réservoirs cathodiques. La localisation du front de préconcentration a très peu varié et se situe au final à environ $200\mu\text{m}$ de l'entrée cathodique de la nanofente. A cette valeur de force ionique, la préconcentration semble donc relativement stable dans le temps et l'espace. Ceci n'est pas surprenant puisque, à haute valeur de v_{2n}^* fixée, augmenter la force ionique correspond à une augmentation de $c_r^*h_n^*$ due à une augmentation de h_n^* avec une longueur de Debye qui est largement réduite.

Dans le diagramme de phase ($c_r^*h_n^*$, v_{2n}^*) de la Figure 4.5, un tel point CF stable correspond au CP non propageant proche de la limite propageant/non propageant (point rouge numéro 2). On a réellement un régime stable et intéressant, qui produit des taux de préconcentration élevés. En augmentant encore la force ionique jusqu'à 3.10^{-3}M , le pic se rapproche encore plus de l'entrée de la fente. Le taux de préconcentration est notablement diminué puisque la concentration obtenue est de 4mM. On attribue donc ce régime de préconcentration à un régime à la limite du CF et du CS.

La comparaison entre ces préconcentrations nous permet d'observer qu'il n'existe donc qu'une petite "fenêtre" de force ionique, entre 3.10^{-4}M et 3.10^{-3}M , permettant d'obtenir le régime Cathodic Focusing stable souhaité. Comme dans les simulations théoriques, si l'on continue à augmenter la force ionique, on se rend compte qu'on tend vers un régime CS où le pic de préconcentration se rapproche de plus en plus de la nanofente. Par contre, comme attendu, la préconcentration diminue fortement et le régime paraît assez peu intéressant en termes de taux de préconcentration. Si l'on reporte ces résultats sur le diagramme précédant revisité, on obtient la Figure 4.8. En augmentant la force ionique, on passe d'un CF instable à un CS en passant par un CF stable pour une petite fenêtre de force ionique. En effet, augmenter la force ionique de la solution aura pour effet d'augmenter $c_r^*h_n^*$ et v_{2n}^* d'après les expressions numériques de ces paramètres qui sont proportionnels à la force ionique.

Il est intéressant ici de tracer l'évolution de la concentration maximale obtenue en électropréconcentration en fonction de la force ionique de la solution tampon. La Figure 4.9 (b) rapporte donc l'intensité maximale des pics de préconcentration de la Figure 4.7 en fonction de la force ionique. On voit clairement sur cette courbe que plus la force ionique est élevée et plus l'intensité de préconcentration est faible. On y a reporté en grisé la zone qui correspond à un recouvrement des deux doubles couches électriques face à face (EDLO pour Electric Double Layer Overlap) dans la nanofente. Sachant que la nanofente utilisée pour nos expériences est haute de 150nm, l'épaisseur de l'EDL est de $\lambda_d=75\text{nm}$. D'après le tableau de la Figure 2.2 du chapitre 2, qui donnait des valeurs de la concentration ionique en fonction de λ_d ,

cette épaisseur correspond à une force ionique d'une solution de KCl de $5.10^{-5}M$. Nous ferons ici l'approximation que cette valeur est comparable à celle obtenue pour le tampon borate utilisé dans nos expériences.

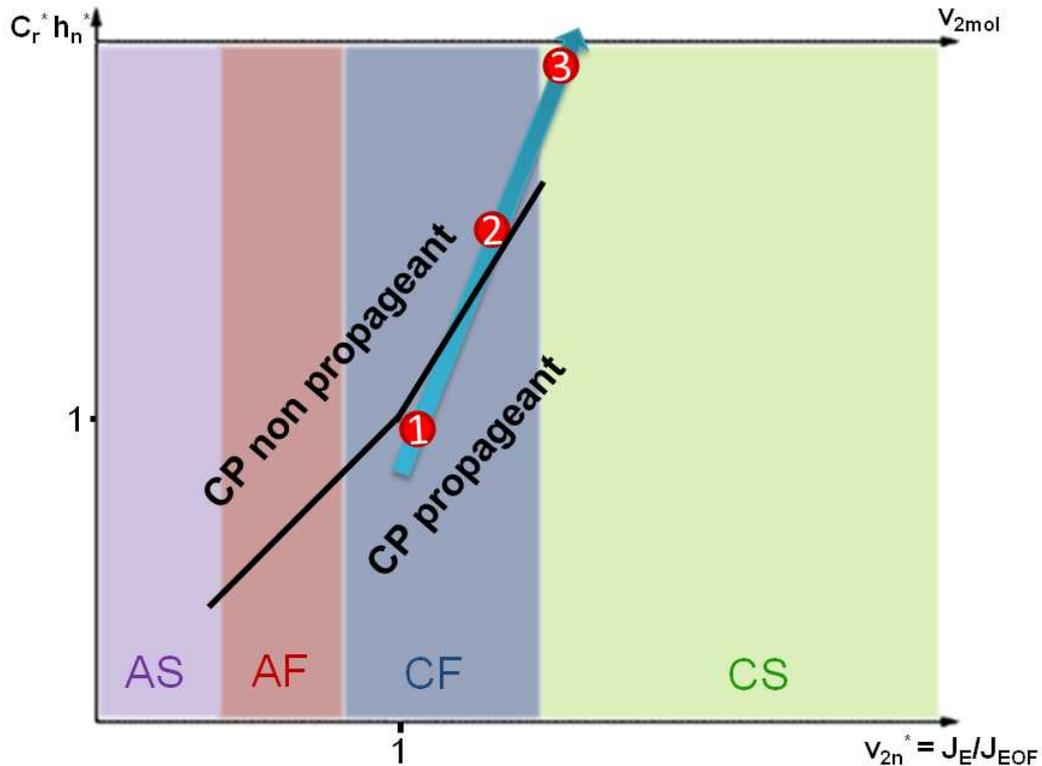


FIGURE 4.8 – Diagramme représentant les différents régimes de préconcentration de la fluorescéine (réalisé à partir de la théorie proposée par Santiago et al [78] et des simulations de A. Plécis [77]) en fonction de la force ionique. Le CP propageant ne donne pas de régime stable (numéro 1 - CF instable) et se produit pour une force ionique faible. Le CP non propageant présente deux régimes : le CF stable lorsque la force ionique est modérée et le CS stable se produisant à forte force ionique.

Il est intéressant maintenant de comparer cette évolution avec les mesures expérimentales du temps de diffusion de la fluorescéine dans une nanofente de 50nm de haut qui avaient été effectuées par A. Plecis précédemment [77]. Ces mesures de diffusion sont rapportées dans la Figure 4.9 (a). On y observe une augmentation forte du temps de diffusion à faible force ionique, conjointement à une perméabilité qui décroît. Ceci traduit bien un passage ionique réduit dans la nanofente. Sur l'évolution du temps de diffusion, il est intéressant d'observer que ce temps augmente fortement entre $5.10^{-4}M$ et $10^{-2}M$, et donc, bien avant qu'il y ait recouvrement des deux doubles couches. En 2009, le groupe de P. Renaud à l'EPFL [96] avait refait des expériences de diffusion couplées avec des mesures optiques de spectroscopie à corrélation de fluorescence. Ces résultats, présentés en Figure 4.10, montrent le temps de diffusion effectif τ_{eff} en fonction de la force ionique de la solution.

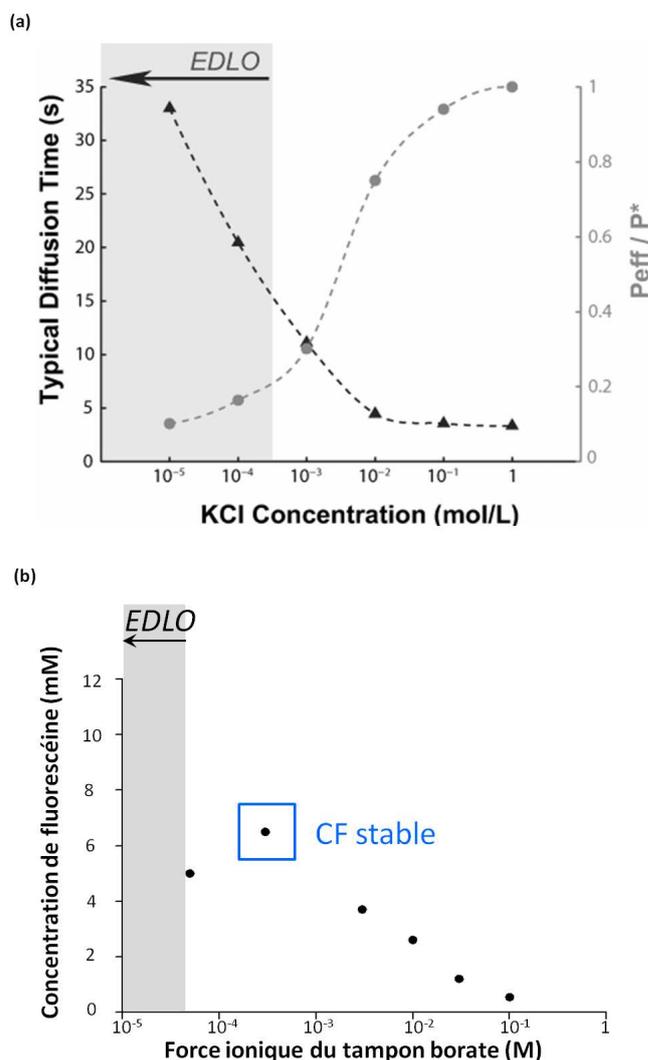


FIGURE 4.9 – (a) Temps de diffusion typique pour la fluorescéine à différentes forces ioniques pour une nanofente de $3\mu\text{m}$ de long [83]. Les résultats sont également représentés à travers le changement de perméabilité relative P_{eff} / P^* , qui ne dépend pas des paramètres géométriques de notre système. La perméabilité est inversement proportionnelle à τ_{diff} : moins la nanofente est perméable, plus il faut de temps pour équilibrer les concentrations. Le phénomène d’enrichissement/déplétion est déjà important avant le recouvrement de l’EDL (lorsque la longueur de Debye dépasse la moitié de la hauteur de la nanofente), qui se produit à une concentration entre 10^{-4}M et 10^{-3}M dans une fente de 50nm de haut. (b) Concentration maximale de fluorescéine à différentes forces ioniques pour les expériences d’électropréconcentration classique pour une nanofente de 150nm de haut, pour laquelle le recouvrement de l’EDL se fait vers $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$

Comme attendu, à haute force ionique, τ_{eff} est similaire à $\tau_{surface}$ car toutes les protéines interagissent avec les parois de la nanofente à cause de l’extension limitée de l’EDL et du grand ratio surface sur volume du canal. Quand l’épaisseur de l’EDL est augmentée, le temps de diffusion effectif décroît jusqu’à atteindre un minimum proche de la valeur du temps de diffusion du tampon τ_{bulk} . Cela correspond au cas décrit en Figure 4.10 (c), où les protéines n’atteignent plus les parois du nanocanal

à cause de la taille de l'EDL, ce qui donne lieu à une diffusion des protéines presque aussi rapide que celle dans le tampon, sous de telles conditions. On observe bien, par ces mesures, une décroissance rapide du temps effectif de diffusion à force ionique intermédiaire qui a lieu avant la fermeture complète de la fente et, donc, avant recouvrement des EDL dans la partie grisée EDLO. Finalement, à très faible concentration ionique (similaire à celle de l'EDLO), les rares protéines qui peuvent passer la nanofente ont un temps de diffusion similaire à $\tau_{surface}$.

À force ionique élevée, on a donc un passage facilité dans la nanofente. L'effet de focalisation de la préconcentration dans le microcanal cathodique loin de l'entrée de la nanofente est donc fortement diminué ce qui se traduit par une intensité de préconcentration beaucoup moins intense et un pic "fuyant" dans le nanocanal.

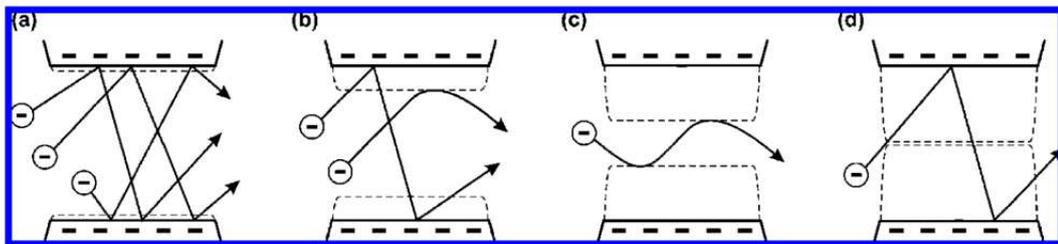
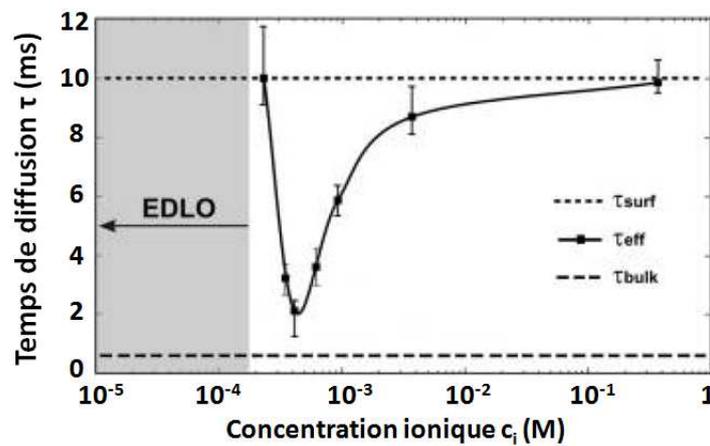


FIGURE 4.10 – Temps de diffusion effectifs pour des protéines WGA (Wheat Germ Agglutinin) dans une nanofente de 50nm de haut et pour différentes forces ioniques. Les points expérimentaux sont représentés et des guides pour l'œil sont tracés par interpolation. Les lignes en tirets et en pointillés représentent des valeurs fixes de paramètres, respectivement $\tau_{bulk} = 0,6$ ms et $\tau_{surf} = 10$ ms. Dans l'encadré bleu, les schémas du comportement typique de biomolécules négativement chargés dans une nanofente en verre à différentes forces ioniques ont été représentés. Ce modèle est basé sur deux populations différentes de molécules : celles qui ne touchent jamais les parois (N_{bulk} , τ_{bulk}) et celles qui s'adsorbent sur les surfaces et sont ralenties (N_{surf} , τ_{surf}) : (a) À fortes concentrations ioniques, l'EDL est fine et n'empêche pas la plupart des molécules d'interagir avec les surfaces ($N_{bulk} \rightarrow 0$) ; (b) quand la concentration ionique décroît, l'EDL augmente et certaines molécules n'interagissent plus avec les surfaces (le nombre de ces molécules augmente d'autant plus que l'EDL augmente) ; (c) quand l'EDL est assez large, la plupart des molécules n'interagit plus avec les surfaces ($N_{surf} \rightarrow 0$) ; et (d) quand il y a recouvrement de l'EDL, très peu de molécules entre dans le canal. [96]

4.2 Electropréconcentration assistée en pression

Considérons maintenant les mêmes expériences mais avec l'ajout d'une pression hydrodynamique externe. Il s'agit donc d'un protocole original que l'on a nommé "l'électropréconcentration assistée par une pression".

Appliquons d'abord une pression externe de 0,9 bar de la cathode vers l'anode. Nous effectuons ainsi une électropréconcentration assistée par une pression cathodique correspondant aux flèches de pression bleue et verte de la Figure 2.16. Nous avons simplifié cette figure pour identifier plus clairement comment se déplace le profil : cette nouvelle figure de principe est représentée en haut de la Figure 4.12 (voir deux pages plus loin). La courbe en gras dans ce diagramme, qui correspond à une préconcentration classique sans pression, se trouve sous l'axe vertical des vitesses nulles puisque c'est la vitesse électrophorétique qui domine produisant ainsi le profil Cathodic Focusing (CF), plus ou moins stable, que l'on vient d'observer dans le paragraphe précédent. Ajouter une pression cathodique devrait déplacer le profil vers des valeurs de vitesse encore plus négatives et ainsi le faire descendre dans le diagramme, ce qui implique un rapprochement du pic de préconcentration vers la fente. L'ajout d'une pression hydrodynamique cathodique devrait donc avoir le même effet sur la préconcentration que l'augmentation de la force ionique vu précédemment.

La Figure 4.11 présente quelques images de deux expériences d'électropréconcentration différentes : l'encadré de gauche (en bleu foncé) relate les résultats de l'électropréconcentration classique d'une solution de fluorescéine $10\mu\text{M}$ dans un tampon borate $50\mu\text{M}$ à $\text{pH}=9$, tandis que l'encadré bleu clair de droite présente l'électropréconcentration de la même solution mais cette fois-ci avec l'ajout d'une pression cathodique de 0,9 bar. Sur la Figure 4.11 de gauche, on retrouve donc tout d'abord les résultats de l'électropréconcentration conventionnelle vus au paragraphe précédent avec une préconcentration cathodique instable, diminuant au cours du temps et dérivant vers les réservoirs. Lors de l'ajout de la pression (à droite de la figure), il semblerait que cette préconcentration cathodique se stabilise puisque la zone de préconcentration semble statique et constante en intensité à partir de 250s.

Pour mieux évaluer le phénomène, la Figure 4.12 met en parallèle les résultats obtenus précédemment pour la préconcentration conventionnelle de la fluorescéine à 5.10^{-5}M et 3.10^{-4}M (encadré noir à gauche de la figure) et ceux obtenus avec une pression cathodique de 0,9 bar (encadré bleu). On trace ici l'évolution des profils de concentration en fonction du temps.

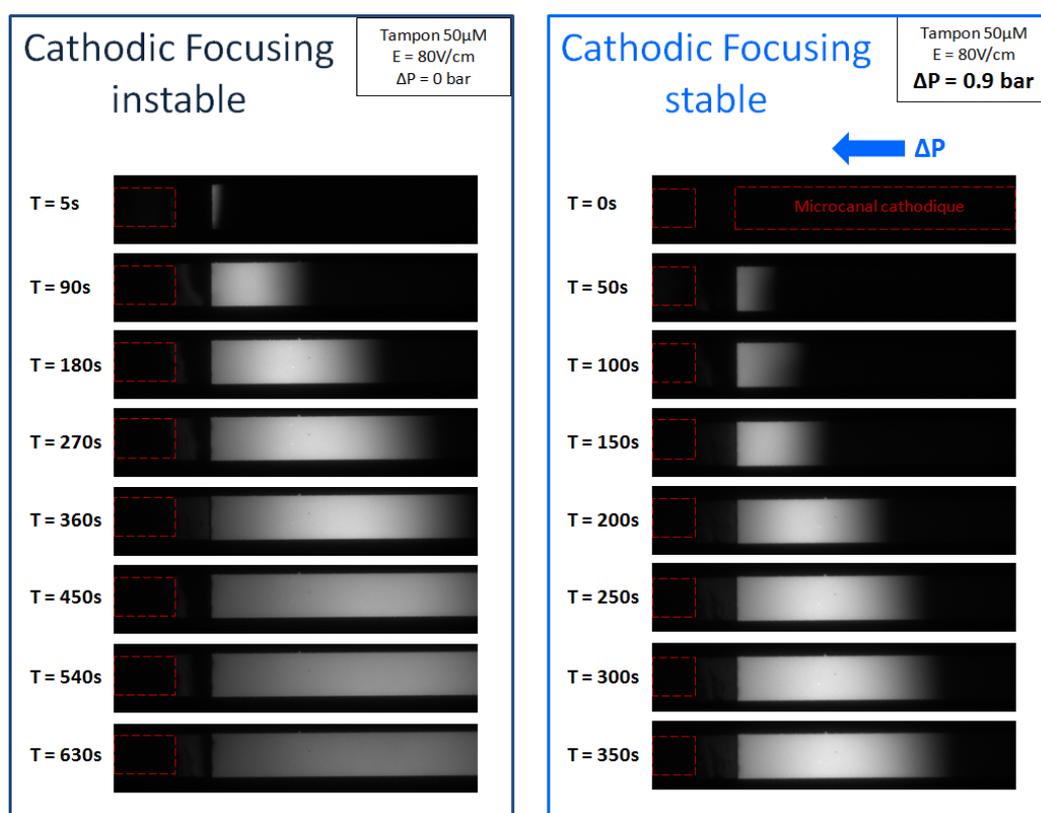


FIGURE 4.11 – Images obtenues pour différents temps lors de deux expériences d'électropréconcentration différentes : (à gauche) Electropréconcentration conventionnelle avec $E=80\text{V/cm}$ présentant un régime focusing cathodique instable. (à droite) Electropréconcentration assistée par une pression cathodique de 0,9 bar produisant un régime CF stable.

Comme on peut le voir sur cette Figure 4.12, la pression cathodique additionnelle a bien l'effet escompté puisque les pics de préconcentration sont affinés et stabilisés, même à très faible force ionique (cas à 5.10^{-5}M). Pour les deux forces ioniques, la préconcentration CF stable présente quasiment les mêmes taux de préconcentration que ceux issus de l'électropréconcentration conventionnelle. Si l'on compare à chaque fois les valeurs maximales des Figures 4.12 (a) et (b), on constate en effet qu'avec ou sans la pression, on obtient une intensité de fluorescence correspondant à 9mM (soit 900 fois la concentration initiale) pour la première force ionique et 7mM (soit 700 fois la concentration initiale) pour la deuxième. La pression n'a donc pas d'effet négatif sur la valeur du taux de préconcentration. Ceci signifie que le flux total auquel est soumis le dianion reste quasiment le même, tandis que la région du CP est comprimée vers la nanofente. Enfin, comme pour l'électropréconcentration classique, on remarque que plus la force ionique du tampon est grande et plus le front de préconcentration est proche de la nanofente. Dans le même temps, en se rapprochant de l'entrée du nanocanal, on remarque que le taux de préconcentration décroît légèrement à plus forte force ionique.

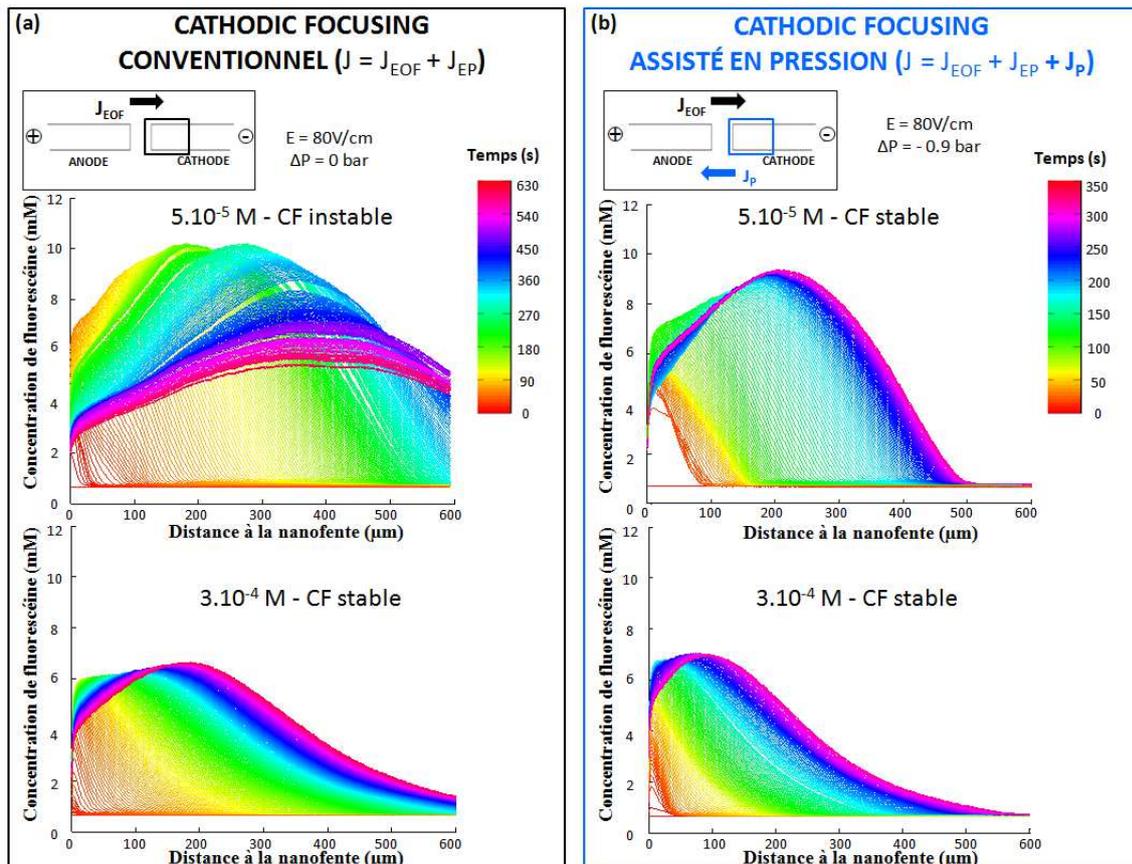
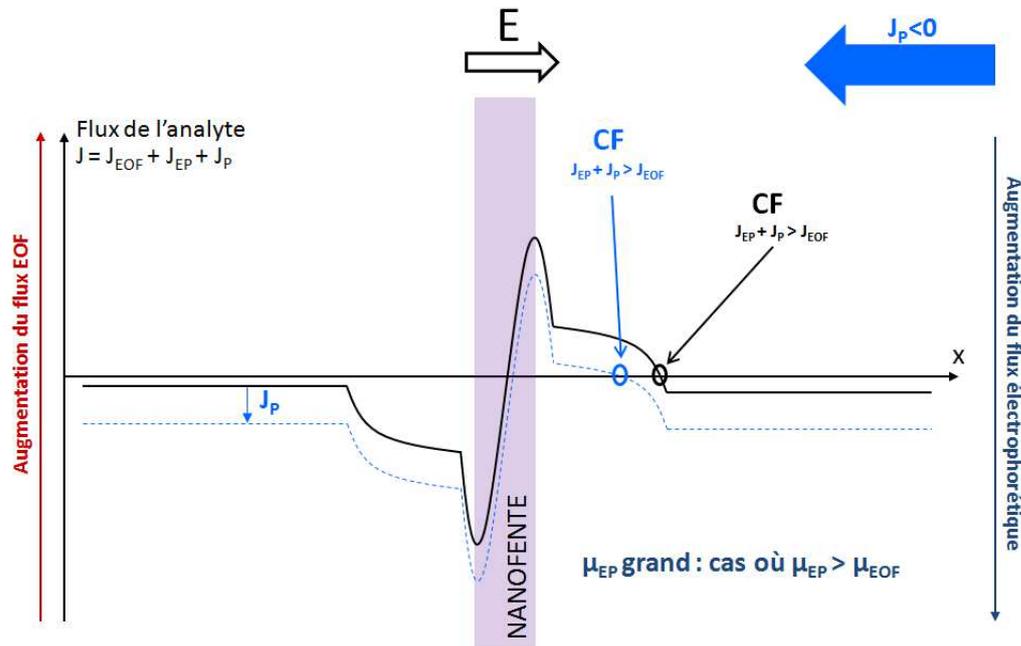


FIGURE 4.12 – Le rôle de la force ionique de la solution tampon dans l'électropréconcentration sélective de la fluorescéine : (gauche) une électropréconcentration conventionnelle comparée à (droite) une électropréconcentration assistée par une pression cathodique.

Une telle électropréconcentration assistée par une pression cathodique permet donc un meilleur contrôle du flux de liquide en réduisant la composante EOF et en permettant ainsi un meilleur état stationnaire dans le régime dominé électrophorétiquement.

Conclusion

Nos expériences d'électropréconcentration classique et assistée en pression avec la fluorescéine démontrent que la structure MNM permet d'obtenir une préconcentration cathodique intéressante du dianion. En termes de taux de préconcentration, on arrive quasiment à un facteur 1000, ce qui équivaut aux résultats obtenus dans la littérature. En ce qui concerne les régimes de préconcentration obtenus, nous avons appuyé les précédentes simulations de A. Plécis par nos résultats expérimentaux. Ainsi, il a été démontré que l'augmentation de la force ionique de la solution permettait de passer d'un régime CF instable et "dérivant" vers les réservoirs cathodiques, à un régime CF stable se rapprochant d'autant plus du nanocanal que la force ionique est grande. Enfin, et c'est là le résultat majeur, **l'addition d'une pression cathodique** (de la cathode à l'anode) **permet la stabilisation du front de préconcentration. Dans ce nouveau régime cathodique assisté en pression, c'est donc toujours la composante électrophorétique qui domine, mais notre nouveau protocole permet d'obtenir le régime CF stable sur une plus grande gamme de force ionique.**

Chapitre 5

Electropréconcentration assistée en pression de la BSA

Régimes dominés électroosmotiquement

*La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.
Si la pratique et la théorie sont réunies, rien ne fonctionne et on ne sait pas
pourquoi.*

- Albert Einstein -

En travaillant avec la fluorescéine à force ionique faible, on a donc validé le mécanisme proposé pour la structure MNM et confirmé l'avantage d'une pression externe ajoutée à l'électropréconcentration classique. Cette pression a permis de stabiliser un régime Cathodic Focusing, jusque là instable, avec l'application d'un champ électrique seul. On va maintenant étudier l'ajout d'une telle pression sur la préconcentration de particules plus lentes, comme des protéines par exemple, dans des électrolytes à forces ioniques modérées. En effet, des taux de préconcentration impressionnants ont déjà été obtenus avec des protéines dans le cas où l'électrolyte avait une force ionique modérée ($\approx 10\text{mM}$) et où la différence de tension appliquée variait de 10 à 200V.

Nombre de ces travaux concernait la préconcentration de l'albumine de sérum bovin (BSA). Cette protéine, qui est extraite du sérum de bovin, est largement utilisée en laboratoire de biologie en raison de sa stabilité, de sa "neutralité" dans de nombreuses réactions biochimiques et de son faible coût. Elle est disponible très facilement et en grande quantité car elle provient du sang de bovin purifié qui est un sous-produit de l'industrie bovine. Sa masse moléculaire est de 66,430kDa. En solution, la BSA peut adopter différentes conformations selon le pH et la force ionique de la solution. Les mécanismes de transformation de cette molécule sont encore mal connus mais, basiquement, la structure spatiale des albumines ressemble à un cœur et se compose de 6 sous-domaines (3 domaines) qui répètent le motif d'hélice α [97]. Les divers isomères, correspondant à différents pH, correspondent

en fait à des contenus différents de l'hélice α [98]. Les conformations de la BSA sont classées comme suit : E=étendue ; F=migration rapide ; N=forme normale dominante à un pH neutre ; B=forme basique et A=âgée à un pH alcalin (voir Figure 5.1 (a)) [99]. De ce fait, la mobilité électrophorétique de la BSA dépend, elle aussi, du pH et de la force ionique (voir Figure 5.1 (b)). Dans le cadre de nos expériences, nous pourrions approximer la valeur de cette mobilité à $\mu_{EP} = -2.10^{-8} m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$. Nous nous sommes donc tout d'abord interrogés sur l'électropréconcentration classique de la BSA en se basant sur le modèle et sur les simulations d'A. Plécis [14]. Nous verrons que, de par ses caractéristiques intrinsèques, la BSA se préconcentre, dans la structure MNM et sous l'action d'un champ électrique, dans un régime anodique. Cependant, dans un second temps, nous allons voir qu'en ajoutant une pression hydrodynamique externe adéquate, il nous est possible de changer ce régime de préconcentration et d'obtenir un régime cathodique. En plus de stabiliser les régimes, comme on l'a vu avec la fluorescéine, notre méthode est donc bien une méthode de préconcentration sélective puisque nous montrerons qu'il est possible de choisir le régime de préconcentration en faisant varier la pression. Nous étudierons, par ailleurs et en détail, les paramètres permettant d'atteindre un état stationnaire. Nous évoquerons aussi le rôle de la pression et la dépendance de la préconcentration quant à cette valeur de flux hydrodynamique. Enfin, nous nous intéresserons aux limites de la méthode et, en particulier, aux problèmes de répétabilité.

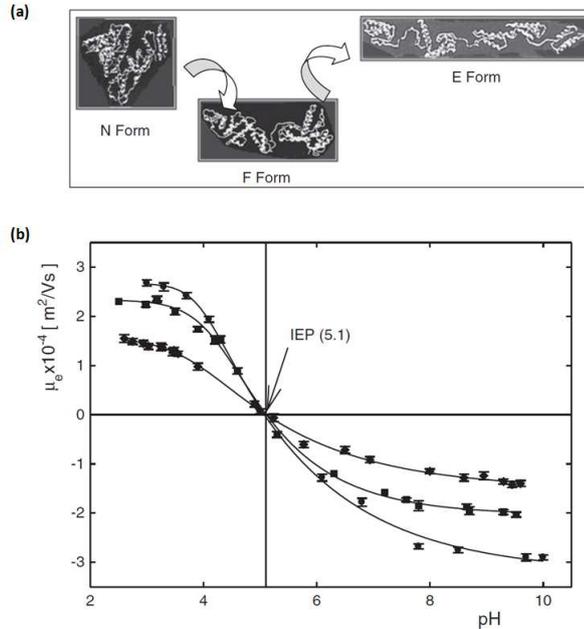


FIGURE 5.1 – (a) Différentes formes moléculaires des isomères de la BSA. E=étendue ; F=migration rapide ; N=forme normale dominante à un pH neutre [99]. (b) La dépendance en pH de la mobilité électrophorétique de la BSA. ronds : $I=1.10^{-3}$ mol/L, carrés : $I=1.10^{-2}$ mol/L et losanges : $I=0,15$ mol/L [97].

5.1 Modèle de l'électropréconcentration classique

Dans ces simulations, A. Plécis s'était donc aussi intéressé à d'autres types d'analytes que la fluorescéine et avait aussi étudié l'influence de la mobilité d'une protéine sur le facteur de préconcentration. Sur la Figure 5.2 (en bas au centre), on peut observer la décroissance du taux de préconcentration calculé après $t=1\text{min}$ en fonction de la mobilité de la protéine. Dans ce travail de simulations, la charge nette de la protéine a été maintenue à $-2e^-$, tandis que le coefficient de diffusion varie. On observe que le facteur de préconcentration reste petit pour des protéines rapides, présentant une mobilité électrophorétique supérieure (en valeur absolue) à $-4.10^{-8}\text{m}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$, mais augmente drastiquement pour des protéines plus lentes, pour atteindre une valeur maximale $c_{max}=800$ pour une protéine de mobilité $-1.10^{-8}\text{m}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$.

Si l'on regarde maintenant comment évolue la localisation (ou distance à la nanofente) du pic de préconcentration après 1min d'expérience (Figure 5.2, en haut au centre), on retrouve bien une localisation soit cathodique soit anodique.

Quand la mobilité de la particule est suffisamment grande ($< -5.10^{-8}\text{m}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$), la migration électrophorétique surpasse le flux contre-électroosmotique et la préconcentration intervient alors du côté cathodique du nanocanal, comme représenté sur les Figures 5.2 (a) et (b). C'est le cas des expériences avec la fluorescéine. La concentration maximum est tout d'abord maintenue à l'entrée cathodique de la nanofente (régime CS, Figure 5.2 (a)) puis, quand la vitesse électrophorétique est diminuée en valeur absolue (c'est-à-dire pour $\mu_{EP} > -7.10^{-8}\text{m}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$), le pic de concentration maximum bouge lentement vers la cathode, ce qui correspond à un régime CF (Figure 5.2 (b)). On voit, d'après ces figures, que le régime CF conduit à un meilleur taux de préconcentration que le régime CS, comme ce que l'on a pu observer précédemment au cours de l'étude de l'électropréconcentration de la fluorescéine.

Cependant, les taux de préconcentration de ce régime CF restent faibles comparativement aux taux obtenus pour le régime AF (Figure 5.2 (c)). Lorsque les mobilités électrophorétiques sont supérieurs à $-5.10^{-8}\text{m}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$, les taux de préconcentration "s'envolent" et, pour $\mu_{EP} = -1,2.10^{-8}\text{m}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$, le facteur de préconcentration vaut 800, valeur 100 fois plus élevée que celle des taux correspondant aux régimes cathodiques (d'une solution de force ionique modérée). Si le transport électrophorétique est encore diminué ($\mu_{EP} > -1.10^{-8}\text{m}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$), le pic de préconcentration retourne à l'entrée de la nanofente dans un régime AS avec des taux négligeables de préconcentration (Figure 5.2 (d)).

On observe donc une très grande différence du taux c_{max}/c_0 entre les deux régimes anodique AF et AS. Ces taux reflètent directement l'efficacité de l'électropréconcentration. Le taux très élevé (de 800) du régime AF démontre bien que la région anodique, correspondant à la très forte déplétion en ions de l'effet CP, est celle où l'électropréconcentration est la plus efficace.

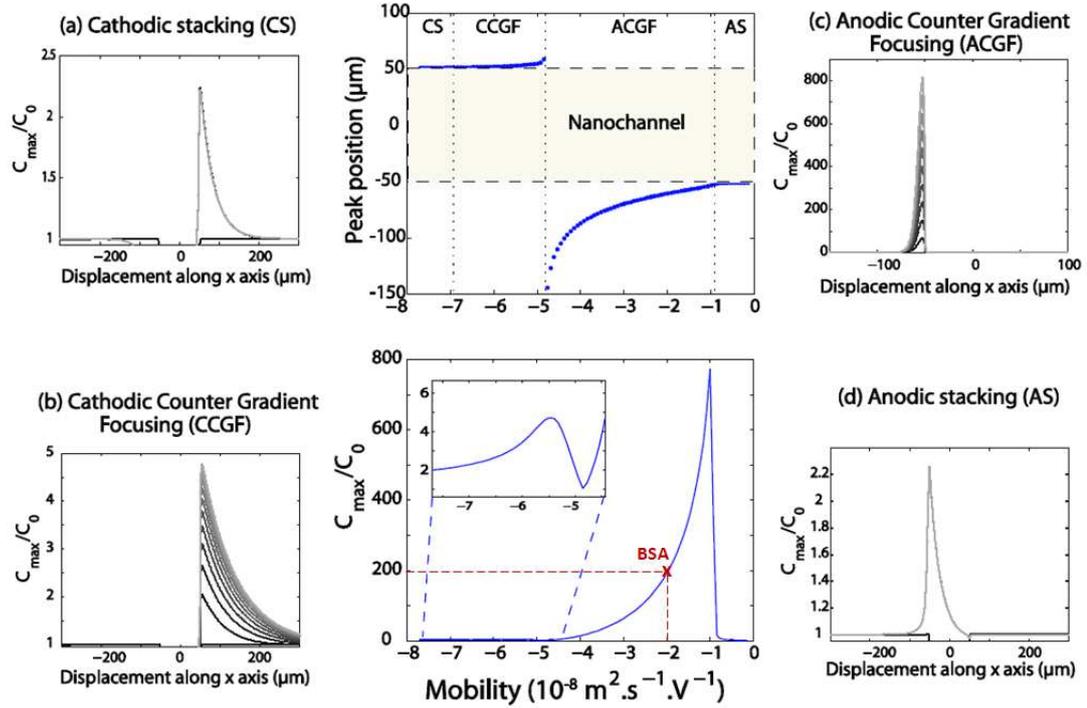


FIGURE 5.2 – Localisations du pic de préconcentration et taux de préconcentration maximaux après 1min en fonction de la mobilité de la protéine (centre). Les profils de préconcentration (a)-(d) correspondent à des mobilités électrophorétiques décroissantes (respectivement 7,1 ; 5,4 ; 1 et $0,54 \cdot 10^{-8} m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$). [83]

Nous avons montré précédemment qu’il était possible de faire varier le coefficient de transport J et le type de régime de préconcentration en changeant le flux de liquide total à travers des variations de la charge de surface, de la force ionique et de la vitesse EOF. Cependant, il est clair que l’on peut aussi maintenir le transport convectif constant et diminuer la migration électrophorétique en diminuant μ_{EP} . Dans ce cas, la préconcentration des analytes varie des régimes cathodiques aux régimes anodiques en suivant le scénario dépeint à la Figure 2.15 théorique. L’augmentation du flux total due à la diminution des mobilités électrophorétiques explique pourquoi la plupart des études expérimentales utilise comme analytes des petites molécules de colorant migrant rapidement, et présente donc préférentiellement des régimes cathodiques de préconcentration, tandis que des études basées sur des analytes plus volumineux, comme l’ovalbumine ou la GFP, rapportent des régimes anodiques.

A forte force ionique, la barrière électrostatique du nanocanal est trop petite pour donner une saturation (“stacking”) efficace, ce qui explique pourquoi les régimes de “stacking” cathodique CS et anodique AS produisent de faibles taux de préconcentration. Au contraire, la sélectivité de charge du nanocanal permet toujours la création d’un gradient ionique de polarisation. Du côté cathodique

du microcanal, le gradient ionique est étalé par le flux électroosmotique, ce qui provoque un déplacement rapide du front de préconcentration et restreint le processus de préconcentration à des temps plus longs (pas de régime CF stable). Au contraire, le gradient anodique est comprimé à l'entrée de la nanofente par le flux de liquide, ce qui donne un gradient ionique très fort et stable (Figure 5.2 (c)). Ce régime AF produit les meilleurs taux de préconcentration pour des forces ioniques modérées de la solution.

D'après ces simulations, une protéine avec une mobilité électrophorétique faible telle que la BSA ($\mu_{EP} = -2.10^{-8}m^2.s^{-1}.V^{-1}$) se préconcentrera préférentiellement dans un régime anodique dans une structure MNM. Il devrait pouvoir atteindre un facteur maximal de préconcentration c_{max}/c_0 de l'ordre de 200 d'après la Figure 5.2 (trait pointillé rouge). Nous allons démontrer, dans ce chapitre, qu'avec l'ajout d'une pression hydrodynamique externe, il sera possible de choisir la localisation du pic de préconcentration, dans le réservoir anodique (régime AF) ou dans le réservoir cathodique (régime CF). Le fait de pouvoir atteindre ce régime CF de préconcentration est une "première" [83]. On verra que ce régime présente des caractéristiques particulièrement intéressantes et des taux de préconcentration se rapprochant de ceux du régime AF (Figure 5.2 (c)).

5.2 Electropréconcentration assistée en pression et influence du couple temps-champ électrique (t,E)

Dans cette section, on étudie donc l'électropréconcentration assistée en pression dans une solution de force ionique modérée, dans le régime dominé électroosmotiquement, pour l'analyte BSA. Celui-ci a été dilué dans une solution de tampon borate 50mM à pH=10, à une concentration de $1,5\mu M$. Similairement aux expériences de fluorescéine, un champ électrique de 80V/cm et une pression de 0,9 bar sont appliqués pour ces expériences d'électropréconcentration assistée en pression. Rappelons que, pour une telle protéine, avec une faible mobilité électrophorétique, la préconcentration classique se produit dans le microcanal anodique du dispositif. Nous avons, encore une fois, simplifié le diagramme de la Figure 2.16 pour ce cas spécifique et le nouveau diagramme est représenté en haut de la Figure 5.3. La courbe noire en gras correspond à l'électropréconcentration classique sans pression. Le flux total est ici positif, puisque c'est le flux EOF qui domine, produisant ainsi le régime focalisant AF. Si une pression anodique, c'est à dire de l'anode vers la cathode, est ajoutée (flèche rouge), la BSA doit rester dans un régime AF comme pour l'électropréconcentration classique. Par contre, si une pression cathodique, c'est à dire de la cathode vers l'anode, est utilisée, il devrait être possible de translater le profil de flux et d'obtenir une préconcentration cathodique CF (en

bleu sur la figure).

Nous avons donc voulu, dans un premier temps, valider expérimentalement ce modèle en ajoutant tour à tour la pression dans un sens, puis dans l'autre. La Figure 5.3 représente les deux expériences différentes d'électropréconcentration assistée en pression : à gauche et encadrée en rouge, une pression hydrodynamique positive est ajoutée dans la même direction que le champ électrique de l'anode vers la cathode ("pression anodique" - voir la flèche rouge) tandis qu'à droite et encadrée en bleu, une "pression cathodique" est appliquée dans le sens inverse, de la cathode vers l'anode (voir la flèche bleue). Comme on peut le voir sur la Figure 5.3 (a), la pression anodique a pour effet de stabiliser un régime Anodic Focusing (AF) comme attendu. La Figure 5.3 (b), quant à elle, montre l'obtention d'un régime Cathodic Focusing (CF) avec l'ajout d'une pression cathodique. Si l'on se réfère de nouveau au diagramme simplifié d'explication (en haut de la Figure 5.3), on peut donc affirmer que l'ajout d'une telle pression (correspondant à la flèche bleue) a réellement permis de translater la courbe en gras (électropréconcentration conventionnelle) en la faisant passer sous l'axe des abscisses. Le point focal apparaît donc en cathodique, comme représenté sur le profil pointillé bleu.

Pour ces expériences, nous avons corrélé l'intensité de fluorescence à la concentration équivalente de BSA pour extraire la valeur du taux de préconcentration (voir paragraphe 3.2.3.3). Notons que, par la suite, les diagrammes se référant au régime anodique seront encadrés en rouge, tandis que ceux concernant le régime cathodique seront encadrés en bleu. Nous pouvons, tout d'abord, calculer ces taux de préconcentration obtenus pour chacun des régimes. Pour le régime AF, obtenu avec l'ajout de la pression anodique, on obtient une concentration équivalente de BSA maximum c_{max} de $150\mu\text{M}$ à $t=4\text{min}$ (Figure 5.3 (a)). La concentration initiale de BSA c_0 étant de $1,5\mu\text{M}$, le taux de préconcentration maximal est $c_{max}/c_0 = 100$. Cette valeur du taux de préconcentration est du même ordre de grandeur que le taux simulé pour un régime AF en électropréconcentration classique, qui était de 200 (Figure 5.2 en bas au centre). Avec une pression cathodique, le régime CF présente des taux de préconcentration bien plus importants. D'après la Figure 5.3 (b), $c_{max}=450$ ce qui signifie qu'un taux de préconcentration c_{max}/c_0 de 300 est atteint pour ce régime. Ces valeurs se rapprochent donc plus de celles simulées pour le régime AF que pour le régime CF (qui étaient de l'ordre de 5 d'après la Figure 5.2) en électropréconcentration classique. L'ajout de la pression, en plus de permettre l'obtention d'un régime cathodique pour l'analyte BSA, permet donc d'obtenir des taux de préconcentration du même ordre de grandeur, voir plus importants, que ceux des simulations d'électropréconcentration classique.

Ces expériences démontrent donc que deux régimes focalisants différents peuvent être obtenus en changeant la direction d'application d'une pression additionnelle de 0,9 bar. Comme on l'a discuté précédemment pour la fluorescéine, ce nouveau protocole permet une meilleure stabilisation du front de préconcentration grâce à la réduction de l'ensemble EOF/flux électrophorétique. Ces régimes focalisants rap-

portés en Figure 5.3 sont remarquables car ils apparaissent symétriques en termes de localisation (distance à la nanofente) et montrent différentes dépendances du taux de préconcentration au cours du temps.

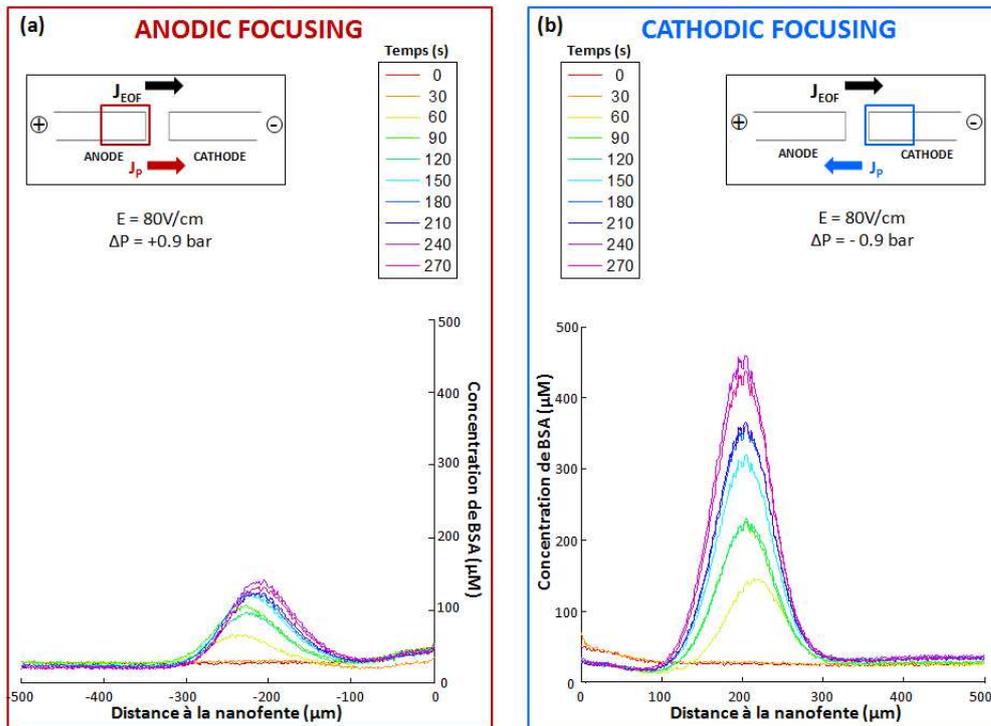
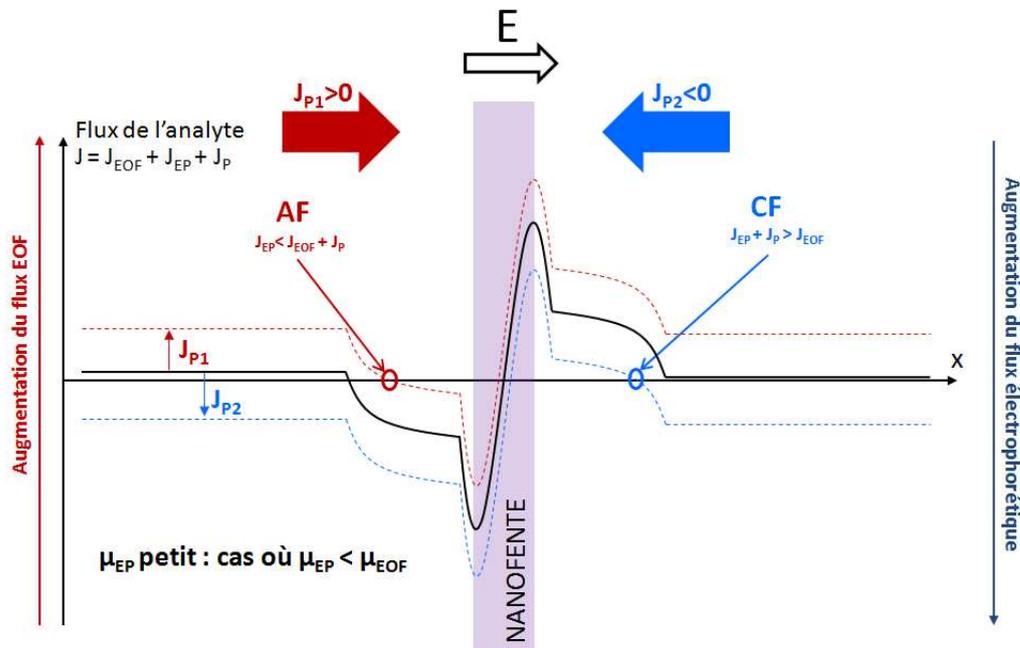


FIGURE 5.3 – Deux types de préconcentration de la BSA : Anodic Focusing (AF) quand le champ électrique et la pression sont appliqués dans la même direction correspondant à une “pression anodique” et Cathodic Focusing (CF) quand les deux flux sont opposés (cas d’une “pression cathodique”). $E=80V/cm$ et $\Delta P=+/- 0,9$ bar.

5.2 Electropréconcentration assistée en pression et influence du couple temps-champ électrique (t,E)

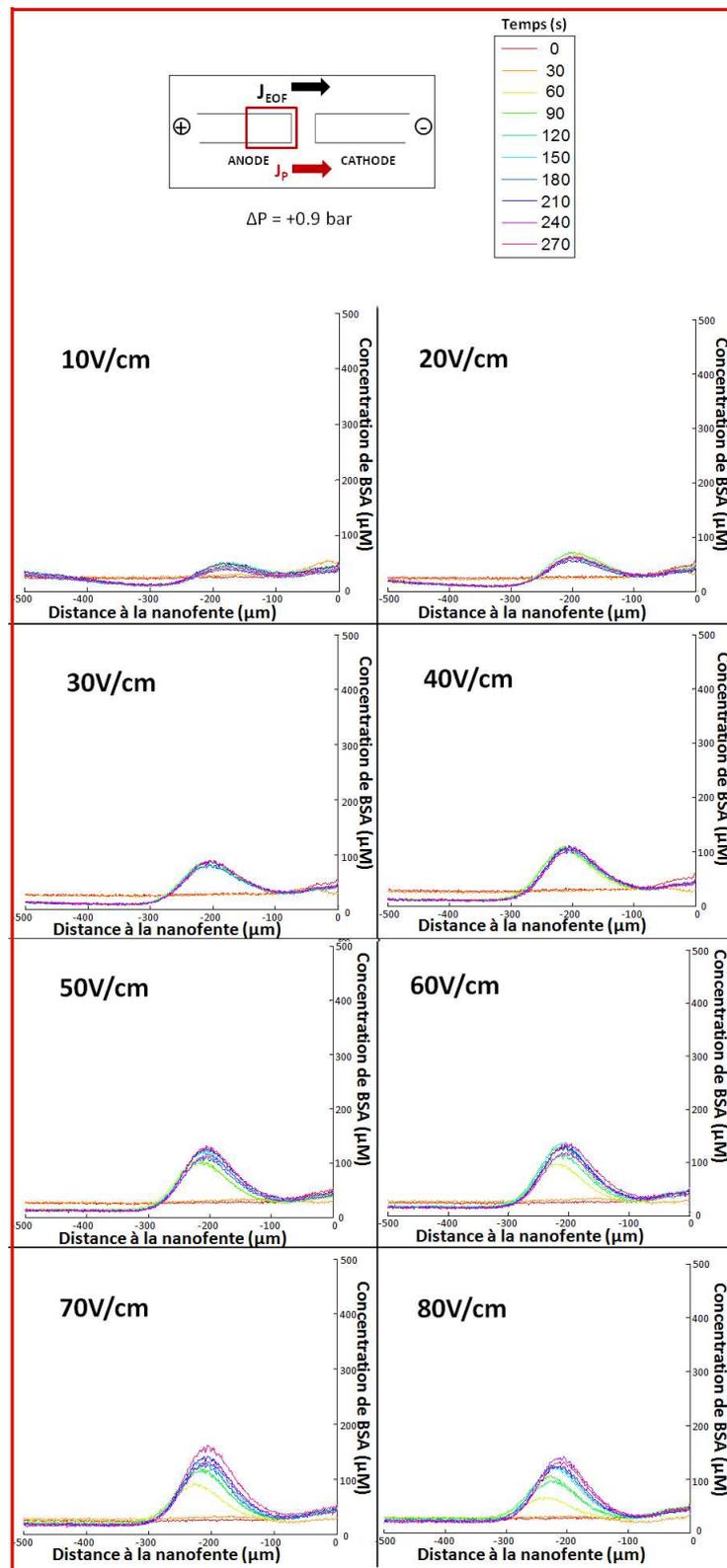


FIGURE 5.4 – Le rôle du champ électrique sur l'électropréconcentration assistée d'une pression anodique $\Delta P=0,9$ bar. La localisation du front dans le réservoir anodique ne semble pas affectée par la valeur du champ mais, par contre, le taux de préconcentration est un peu plus important à mesure que le champ électrique appliqué augmente. Cette augmentation semble atteindre un palier pour 70V/cm.

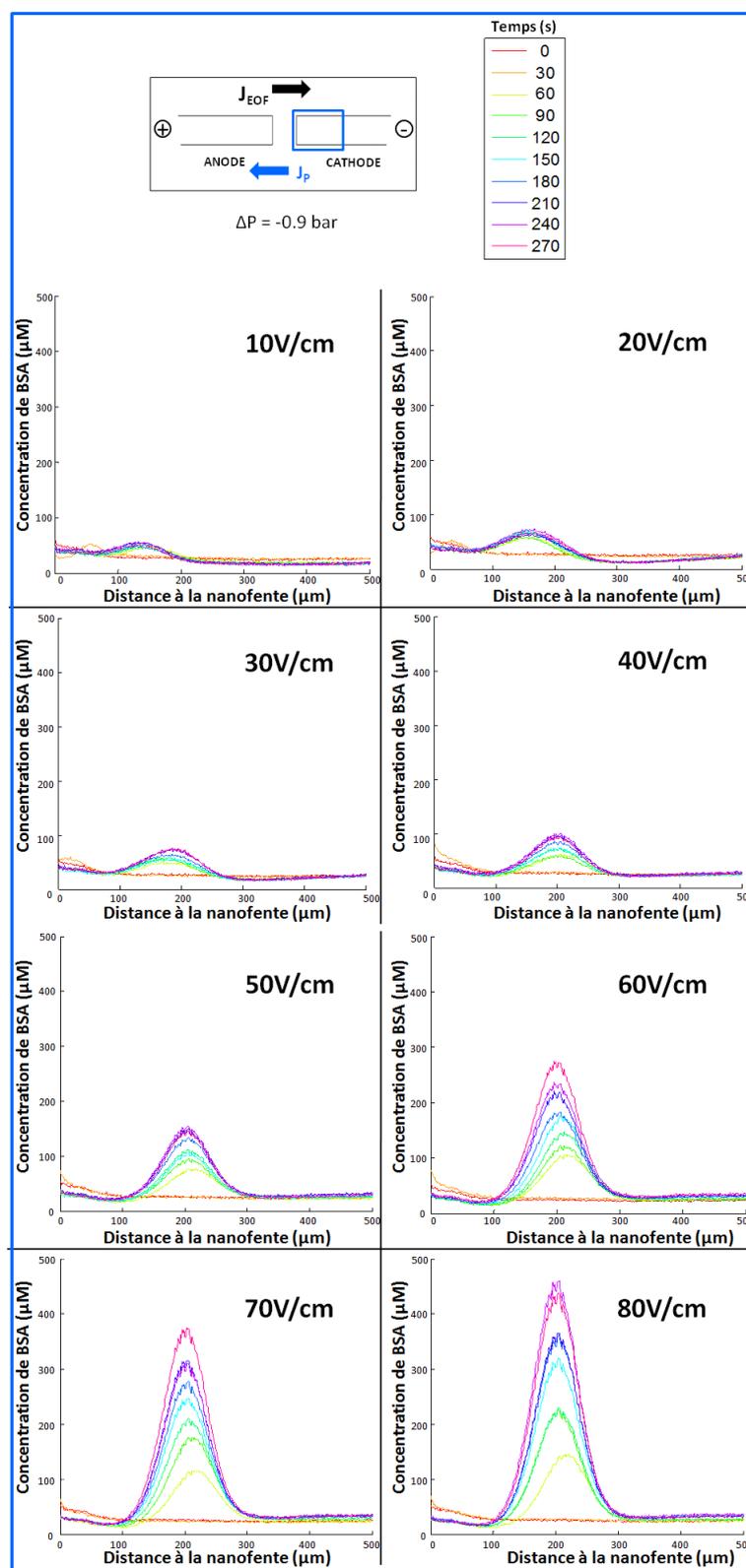


FIGURE 5.5 – Le rôle du champ électrique sur l'électropréconcentration assistée d'une pression cathodique $\Delta P=0,9$ bar. La localisation du front dans le réservoir cathodique ne semble pas affectée par la valeur du champ, mais le taux de préconcentration est plus important que le champ électrique appliqué augmente. Cette augmentation de la préconcentration avec le champ électrique ne semble pas saturer comme pour le régime anodique.

Pour analyser plus en détail les caractéristiques de ces deux régimes focalisants, les rôles respectifs du champ électrique et du temps ont été analysés. Les Figures 5.4 et 5.5 montrent comment le profil de préconcentration varie au cours du temps et lorsque la valeur du champ électrique augmente à une pression hydrodynamique fixe de 0,9 bar, respectivement pour les deux régimes. Comme l'avait déjà prédit A. Plécis avec les simulations faites pour la fluorescéine (Figure 4.4), le champ électrique a un impact très important sur l'électropréconcentration. En effet, le maximum d'intensité de fluorescence augmente avec la valeur du champ électrique appliqué. Cette observation est d'autant plus évidente sur la préconcentration cathodique (Figure 5.5). Ainsi, on voit clairement que de 10V/cm à 80V/cm, la concentration maximale en BSA est multipliée par un facteur 5. Nous discuterons de cette dépendance en champ un peu plus tard, au paragraphe 5.3.2. Comme attendu, le temps d'expérimentation a un impact sur la valeur maximale de la préconcentration obtenue. On peut le voir à travers les différentes couleurs utilisées pour représenter la variation au cours du temps (espacés de 30s). A première vue, plus le temps augmente et plus la préconcentration est importante. L'évolution temporelle de la préconcentration sera discutée, elle aussi, plus loin au paragraphe 5.3.2. Par contre, la localisation du front de préconcentration ne semble pas être affectée par la valeur du champ électrique, ni par le temps. Le pic reste au même endroit du canal au cours du temps et quelque soit le champ électrique appliqué (les graphiques semblent presque superposables), et ce, pour les deux types de préconcentration. La position du pic de BSA représente donc un paramètre stationnaire pour ce régime de préconcentration.

5.3 Paramètres déterminants pour l'état stationnaire

5.3.1 Positions et largeurs des pics de préconcentration

Nous avons donc voulu étudier un peu plus précisément comment la localisation de ce front de préconcentration, c'est à dire la distance entre le maximum d'intensité de fluorescence et la nanofente, était modifiée avec le temps et le champ électrique appliqué (Figure 5.6).

La Figure 5.6 donne plusieurs représentations de l'évolution de la localisation du pic dans le canal pour chacun des régimes. Les graphes (a) et (c) tracent l'évolution de cette distance en fonction du temps, à champ électrique fixe (différentes couleurs sont alors utilisées pour traduire la variation du champ), tandis que les graphes (b) et (d) tracent aussi l'évolution de la distance, mais cette fois-ci en fonction du champ appliqué (dans ce cas là, les différentes couleurs se réfèrent au temps). On retrouve donc les mêmes informations dans ces différents graphes, mais le fait qu'ils ne soient pas tracés de la même manière permet une visualisation différente du phénomène et une mise en valeur des différentes informations.

Ainsi, au vu des Figures 5.6 (a) et (c), la première chose notable est que, pour les deux régimes focalisants, le pic est remarquablement **stable au cours du temps**. En effet, on remarque instantanément que pour une valeur donnée de champ électrique appliqué (une même couleur), le pic de préconcentration reste quasiment à la même position dès son apparition, et ce même après 5 minutes d'expérience. Sur ces deux graphes, nous avons tracé des guides pour l'oeil à $E=40\text{V/cm}$ pour le régime anodique et à $E=80\text{V/cm}$ pour le régime cathodique. Le but de ces guides est d'aider le lecteur à suivre plus facilement l'évolution temporelle. Ainsi, si l'on prend, par exemple, le cas de la préconcentration anodique obtenue par l'application d'un champ électrique de 40V/cm (points bleus), on voit que l'on peut tracer une droite quasiment parfaite de 60s à 270s correspondant à $d=210\mu\text{m}$. Comme on l'avait vu pour la fluorescéine, l'application d'un champ électrique et d'une pression dans notre structure MNM permet donc d'obtenir une excellente stabilité dans le temps.

A faibles champs électriques, la stabilité temporelle du pic de préconcentration semble un peu moins bonne. La courbe correspondant à $E=10\text{V/cm}$, par exemple, présente des variations de la distance de l'ordre d'une quarantaine de μm autour d'une position moyenne. Cependant, on n'attribue pas ce résultat à une mauvaise stabilité, mais simplement à une faiblesse du code Matlab utilisé pour tracer ces courbes. A faible tension imposée, le pic de préconcentration n'est pas très important en termes d'intensité et présente des valeurs relativement proches de celle du bruit. Lorsque Matlab recherche la distance du pic de préconcentration, il recherche en fait la distance correspondant au point d'intensité la plus élevée. Or, à faibles champs électriques, il se peut que le profil de préconcentration présente des valeurs si faibles que le maximum trouvé par Matlab ne corresponde pas exactement à l'emplacement du pic. Il est donc très difficile pour le code de fournir une valeur exacte de la position du pic lorsque celui-ci est très faible en intensité.

A champs plus forts ($E=60\text{V/cm}$ à $E=80\text{V/cm}$), la distance à la nanofente met un temps un peu plus long pour se stabiliser qu'à $E=40\text{V/cm}$, de l'ordre de 120s à 180s en anodique et 80s en cathodique. Pour ces deux régimes focalisants, la préconcentration démarre loin de la nanofente (environ $250\mu\text{m}$) pour venir se stabiliser, après un court régime transitoire, $40\mu\text{m}$ plus près.

On peut aussi remarquer, sur les Figures 5.6 (b) et (d), que la valeur du champ électrique n'impacte que très légèrement sur la position du pic après $t=100\text{s}$. Un champ électrique supérieur à 20V/cm pour le régime anodique et 40V/cm pour le régime cathodique est nécessaire pour atteindre la stabilisation. Ainsi, pour des champs électriques suffisamment élevés, le front de préconcentration reste à la même distance de $225\mu\text{m}$ pour le profil anodique et $210\mu\text{m}$ pour le profil cathodique. Les positions des pics de préconcentration sont donc plutôt **stables en fonction du champ électrique** pour les deux régimes focalisants.

5.3 Paramètres déterminants pour l'état stationnaire

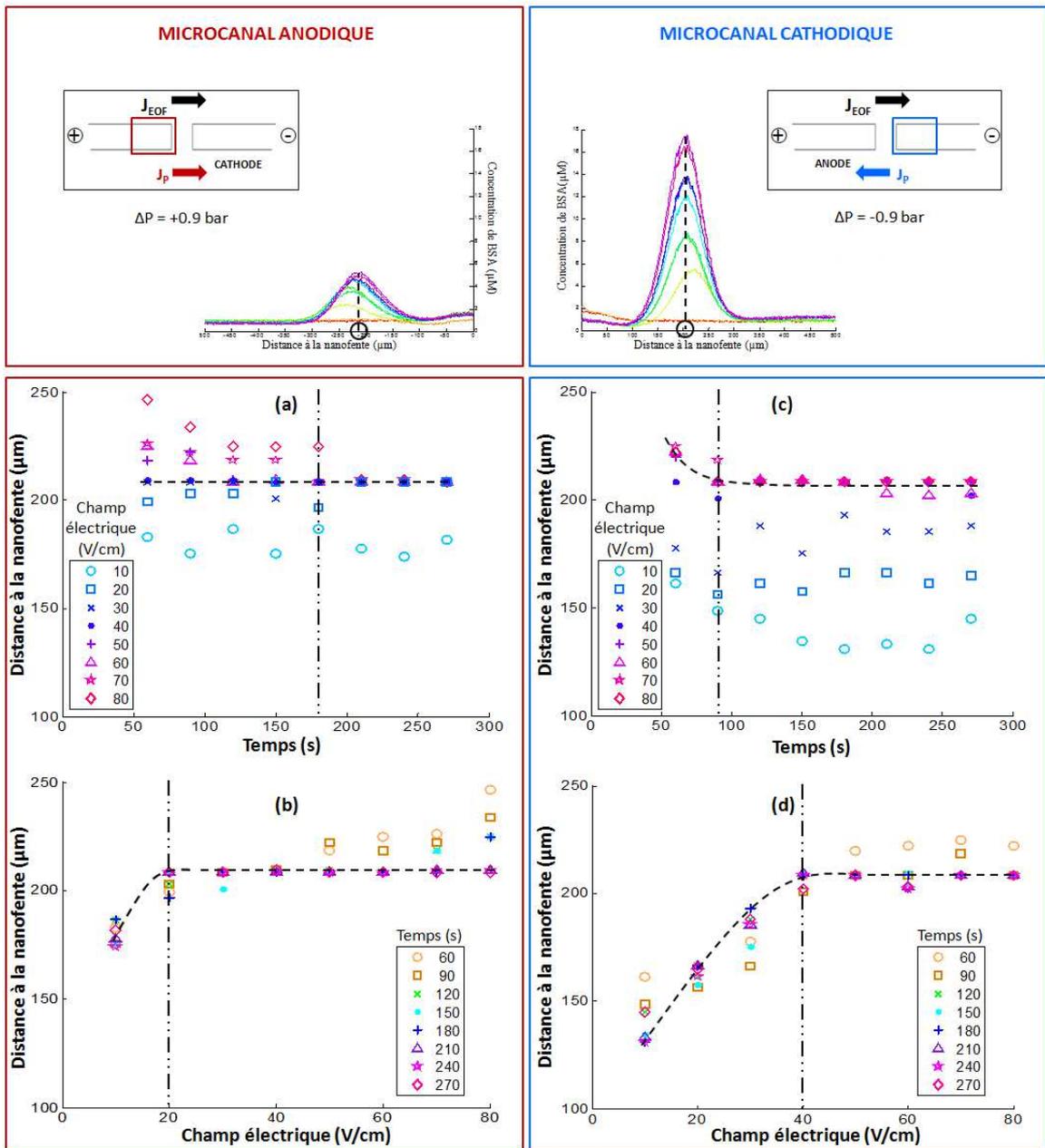


FIGURE 5.6 – Evolution de la distance à la nanofente du pic de préconcentration assistée d'une pression $\Delta P=0,9$ bar dans le microcanal anodique en fonction (a) du temps pour différents champs électriques, représentés par différentes couleurs et (b) du champ électrique pour différents temps. (c) et (d) Evolution de la distance à la nanofente du pic de préconcentration dans le microcanal cathodique en fonction respectivement du temps et du champ électrique appliqué. Pour les deux régimes, le pic est stable dans le temps et plutôt stable en champ électrique après 2min d'électropréconcentration et pour des champs électriques supérieurs à 40V/cm. Des guides pour l'oeil ont été tracés en pointillés.

Nous avons voulu aussi faire une étude nous permettant de caractériser la forme du pic. Pour pouvoir séparer et différencier deux pics différents, ce qui est le but ultime de toute puce de séparation par électrophorèse, il est nécessaire que les pics de préconcentration soient les plus fins possibles et ne présentent pas d'asymétrie. On peut alors introduire la notion de résolution en électrophorèse capillaire. Ce paramètre, caractéristique d'un système d'observation optique, traduit la capacité d'un dispositif à discerner deux pics de fluorescence. Plus il est grand, meilleur est le pouvoir de séparation. Par définition (voir Figure 5.7), il dépend de la largeur des pics de préconcentration ainsi que des temps pour lesquels ils apparaissent. Dans notre cas, la structure MNM a pour but de préconcentrer et séparer dans le même temps un mélange d'analytes. La résolution de notre préconcentrateur/séparateur est donc, par principe, indépendante du temps et n'est liée qu'aux largeurs des pics : plus les pics seront fins, meilleure sera la résolution.

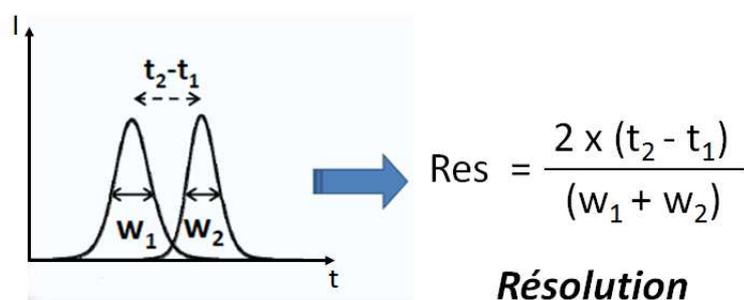


FIGURE 5.7 – Explication du pouvoir de résolution qui caractérise un système optique.

Pour évaluer cet aspect de notre dispositif, nous avons donc analysé la forme des pics de préconcentration. D'après les profils obtenus en Figures 5.4 et 5.5, il paraît tout à fait raisonnable de dire que les pics ne présentent pas d'asymétrie notable. Si l'on trace pour chaque profil un guide perpendiculaire à l'axe des ordonnées et partant du maximum du pic de préconcentration (comme on l'a fait en haut de la Figure 5.6), on s'aperçoit que l'on a presque un effet de miroir. Les pics sont donc sensiblement symétriques.

Chaque pic a été analysé de manière plus précise en calculant la largeur à mi hauteur (FWHM) qui va nous permettre de quantifier numériquement la finesse du pic de préconcentration. La Figure 5.8 présente l'évolution de cette largeur à mi hauteur pour les pics de préconcentration des deux régimes. Elle montre que la FWHM est relativement constante dans le temps et selon le champ électrique appliqué.

Les Figures 5.8 (a) et (c) permettent de se rendre compte que le temps a très peu d'influence sur la largeur à mi hauteur. Là encore, nous avons tracé des guides pour l'oeil à 80V/cm pour le régime cathodique et 40V/cm pour le régime anodique. On voit alors que l'on peut quasiment tracer des droites du début à la

fin de l'expérience pour les deux régimes. Comme pour la distance à la nanofente, on notera ici que les résultats obtenus pour les faibles champs électriques sont dûs au code Matlab et à la manière de tracer les courbes.

Les Figures 5.8 (b) et (d) rendent compte de l'évolution de la FWHM en fonction du champ électrique appliqué. On voit que, pour les deux régimes, un champ électrique supérieur à 40V/cm permet d'obtenir une très bonne stabilisation de la largeur des pics.

Cette étude a donc montré que la largeur à mi hauteur est relativement indépendante des conditions de l'expérience. Elle est, en effet, d'environ $75\mu\text{m} \pm 10\%$ quelque soit le temps et le champ électrique appliqué. On aurait pu pourtant s'attendre à ce qu'en augmentant le temps et le champ électrique, on augmente la préconcentration (comme on l'a vu avec les deux figures précédentes), et donc qu'on détériore la résolution du pic. Or, on voit bien que ce n'est pas le cas puisque la résolution de la détection en fluorescence ne varie que très légèrement au cours du temps et en modifiant le champ électrique. De plus, même si on privilégie des valeurs encore plus faibles, $75\mu\text{m}$ semble être une FWHM acceptable compte tenu de la dimension centimétrique du canal entier. On devrait être capable d'observer des pics différents correspondants à divers analytes.

Quoiqu'il en soit, il découle surtout de cette étude que les paramètres temps et champ électrique ne semblent pas limitant en termes de résolution et de stabilité, quelles que soient les conditions de préconcentration.

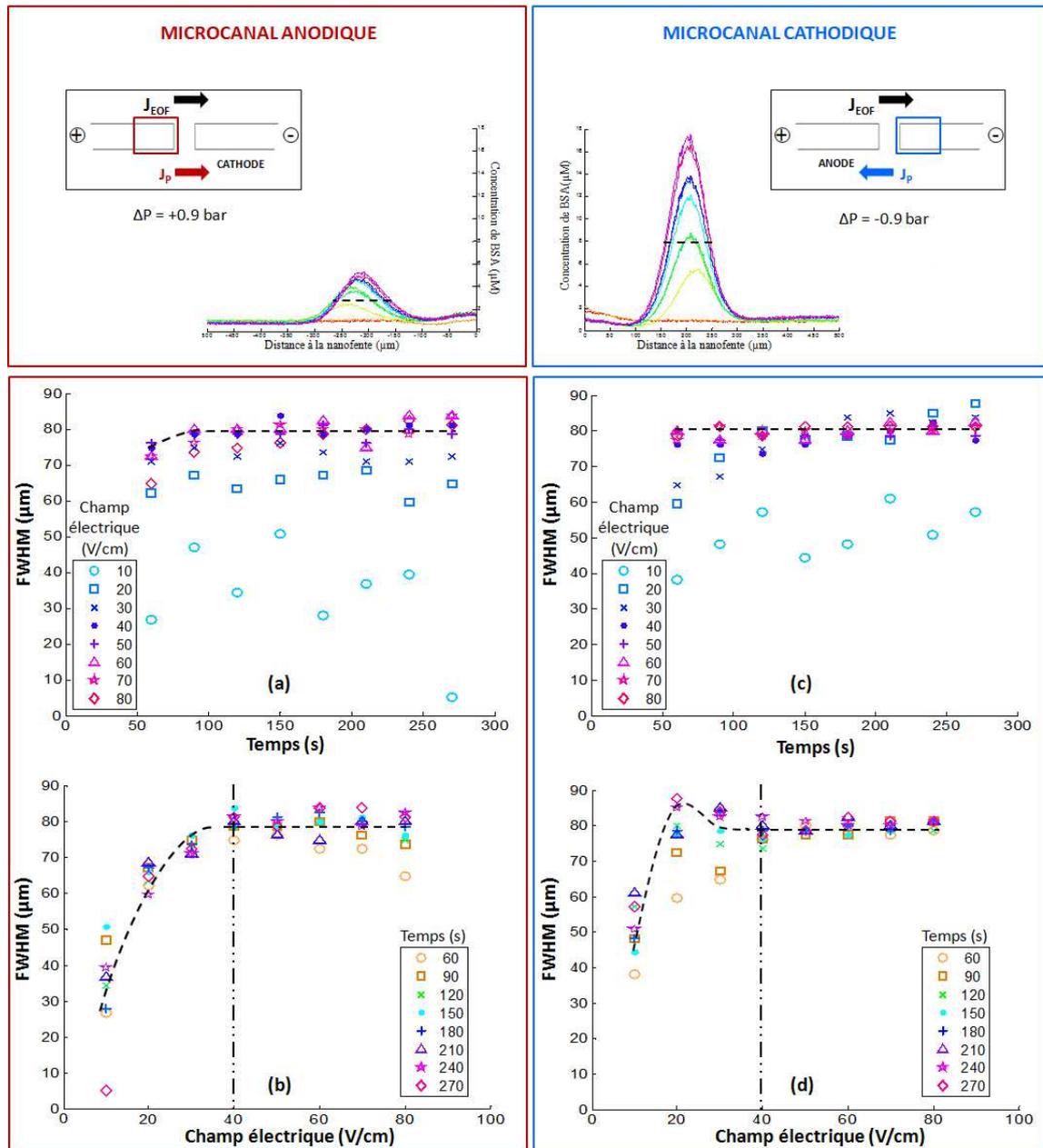


FIGURE 5.8 – Evolution de la largeur à mi hauteur FWHM pour les deux régimes d'électropréconcentration assistée d'une pression $\Delta P=0,9$ bar. (gauche) régime Anodic Focusing obtenu avec une pression anodique. (droite) régime Cathodic Focusing obtenu avec une pression cathodique. (a) et (c) FWHM en fonction du temps. (b) et (d) FWHM en fonction du champ électrique appliqué. Des guides pour l'oeil ont été tracés en pointillés.

5.3.2 Taux de préconcentration : le rôle du champ électrique

Notre méthode de préconcentration sélective permet donc d'obtenir des pics stables dans le temps et l'espace. Il est maintenant intéressant de discuter des taux de préconcentration obtenus, et donc de l'efficacité de cette préconcentration. Pour cela, nous allons procéder comme précédemment en étudiant l'influence du champ électrique et du temps sur l'intensité de fluorescence. Comme pour la fluorescéine, nous avons calculé la concentration maximale de BSA correspondante à l'intensité maximale en fluorescence pour pouvoir en déduire la valeur du taux de préconcentration c_{max}/c_0 , et donc quantifier l'efficacité de notre protocole assisté en pression (cf paragraphe 3.2.3.3). La Figure 5.9 trace l'évolution de la concentration maximale de BSA obtenue pour les deux régimes de préconcentration. Comme pour la distance à la nanofente, deux types de représentation ont été adoptés : l'évolution de cette concentration en fonction du temps (Figures 5.9 (a) et (c)) ou du champ électrique (Figure 5.9 (b) et (d)).

Pour le régime focalisant anodique AF, l'évolution de la concentration de BSA en fonction du champ électrique (Figure 5.9(b)), pour différents temps, montre une valeur maximum de $150\mu\text{M}$ à $E=70\text{V}/\text{cm}$, soit un facteur de préconcentration de 100 (la concentration initiale de BSA étant de $1,5\mu\text{M}$). On observe, tout d'abord, une augmentation presque linéaire de la préconcentration, puis la courbe prend une forme de "cloche" en atteignant le maximum et en diminuant après. Cette dépendance non linéaire du facteur de préconcentration a été prédite pour une solution modèle de KCl [94] et ce n'est pas surprenant d'observer expérimentalement qu'une tension optimale devrait être appliquée pour une valeur donnée de mobilité électrophorétique d'une biomolécule. Si la vitesse du fluide due à l'électroosmose présente une dépendance quasi linéaire avec le champ électrique, le processus de polarisation en concentration est responsable d'une saturation du courant à haut champ électrique. L'évolution de la concentration avec le champ électrique résulte donc d'une transition continue d'un transport dominé électrophorétiquement à un transport dominé électroosmotiquement.

Pour le régime focalisant cathodique, la même dépendance devrait aussi être observée (Figure 5.9(d)). Cependant, on n'observe pas expérimentalement de valeur maximale de concentration de BSA. On peut supposer ici que le champ électrique optimal à appliquer doit être plus grand que $80\text{V}/\text{cm}$. Si notre banc expérimental avait permis l'application d'un champ encore plus élevé, la concentration maximale aurait peut être continué à augmenter avec le champ, et on aurait sans doute retrouvé cette forme de "cloche" pour l'évolution du facteur de préconcentration. Puisque notre expérience de préconcentration cathodique s'est limitée à un champ électrique de $80\text{V}/\text{cm}$, on observe seulement la première phase d'augmentation linéaire où plus le champ électrique est important et plus la préconcentration est forte. Cependant, ceci est surtout vrai à partir d'un champ électrique conséquent (environ $40\text{V}/\text{cm}$) car, à champ faible, l'intensité de préconcentration est constante et plutôt faible. **Le résultat expérimental majeur concerne le fait qu'une**

telle préconcentration assistée en pression cathodique est plus efficace qu'une préconcentration anodique. En effet, la concentration maximale de BSA atteint une valeur trois fois plus forte que celle obtenue en anodique avec une valeur de $500\mu\text{M}$ correspondant à un facteur de préconcentration de 300. Nous pensons même qu'il serait possible d'obtenir des taux de préconcentration encore plus importants avec l'application d'un champ électrique toujours plus fort, c'est à dire supérieur à $80\text{V}/\text{cm}$, lors d'une électropréconcentration de la BSA assistée par une pression cathodique.

Il est intéressant de comparer ces mesures expérimentales avec les simulations théoriques effectuées précédemment par A. Plécis au cours de sa thèse [14]. Il avait étudié l'influence du champ sur la préconcentration classique des protéines, sans pression, à force ionique modérée. La Figure 5.10 (issue de sa thèse) décrit l'évolution du taux de préconcentration avec le champ électrique pour une charge de surface donnée et pour 4 analytes différents ayant des mobilités électrophorétiques différentes (1 correspond à la fluorescéine). On observe bien une courbe en cloche pour l'analyte de $\mu_{EP}=0,2\mu_{fluo}$. Comme pour la préconcentration de la fluorescéine à faible force ionique (chapitre 4), il s'attendait à observer une non linéarité dans la compétition entre le flux électroosmotique et le flux électrophorétique quand la tension appliquée aux bornes de la structure MNM était augmentée. En effet, à champs électriques forts, la polarisation a pour effet de limiter le courant [95]. L'augmentation du champ électrique et la diminution de la concentration ionique dans le microcanal anodique aura tendance, au contraire, à fortement augmenter le flux électroosmotique. A force ionique modérée, l'augmentation du champ électrique a donc pour conséquence de passer d'un régime de transport dominé par l'électrophorèse à un régime dominé par le flux électroosmotique. Il avait alors prévu qu'il existait une valeur optimale de champ électrique, pour laquelle le taux de préconcentration était maximal. Au-delà de cette valeur, la préconcentration avait tendance à diminuer, voir à disparaître pour des champs électriques trop importants. Comme le suggère la Figure 5.10, cette valeur optimale dépend de la mobilité de la molécule. Dans notre cas de préconcentration assistée en pression, il va de soi que l'ajout d'un flux hydrodynamique modifie ces prédictions. Cependant, on retrouve bien ici (avec les résultats des Figures 5.9 (b) et (d)) les mêmes allures de courbes et le fait qu'il semble exister une valeur optimale de champ électrique à appliquer pour obtenir la préconcentration la plus forte possible.

Les Figures 5.9 (a) et (c) nous montrent l'évolution de l'intensité de préconcentration d'une manière différente. On a tracé ici la concentration maximale de BSA en fonction du temps, pour les différents champs électriques appliqués (représentés par différentes couleurs). On retrouve bien sur ces figures que, plus le champ électrique est important, plus la préconcentration est intense, et ceci est d'autant plus vrai pour le régime cathodique. La différence de dynamique entre le régime anodique et le régime cathodique est particulièrement visible sur cette représentation, et il ne fait aucun doute que, en termes d'intensité, c'est le régime

cathodique qui présente les plus fortes valeurs de taux. A fort champ électrique, l'augmentation de la préconcentration au cours du temps est forte. Cette augmentation est clairement linéaire avec le temps, chose que l'on ne pouvait pas facilement observer sur les Figures 5.9 (b) et (d).

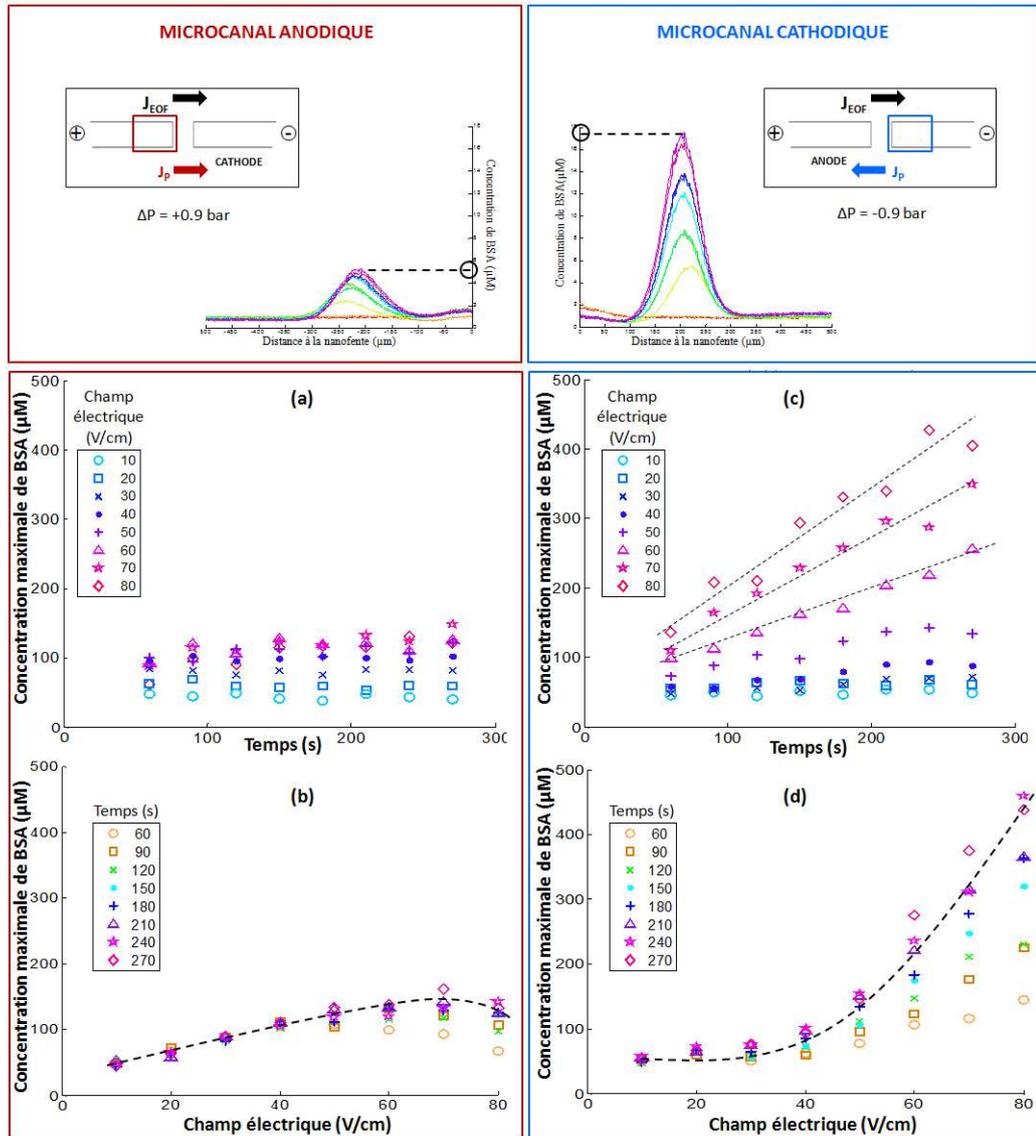


FIGURE 5.9 – Evolution de l'intensité de préconcentration pour les deux régimes. Celle-ci a été reliée à la concentration de BSA équivalente et des guides pour l'oeil ont été tracés en pointillés. (gauche) régime Anodic Focusing obtenu avec une pression anodique. (a) Concentration maximale de BSA en fonction du temps. La dépendance en champ électrique peut être observée grâce aux points de différentes couleurs. (b) Concentration maximum de BSA en fonction du champ électrique appliqué. La dépendance en temps peut être observée grâce aux points de différentes couleurs qui montrent une sorte de maximum. (droite) régime Cathodic Focusing obtenu avec une pression cathodique. (c) Concentration maximum de BSA en fonction du temps. La dépendance en champ électrique peut être observée grâce aux points de différentes couleurs. (d) Concentration maximum de BSA en fonction du champ électrique appliqué. La dépendance en temps peut être observée grâce aux points de différentes couleurs qui montrent un régime non saturant et de plus forts taux de préconcentration.

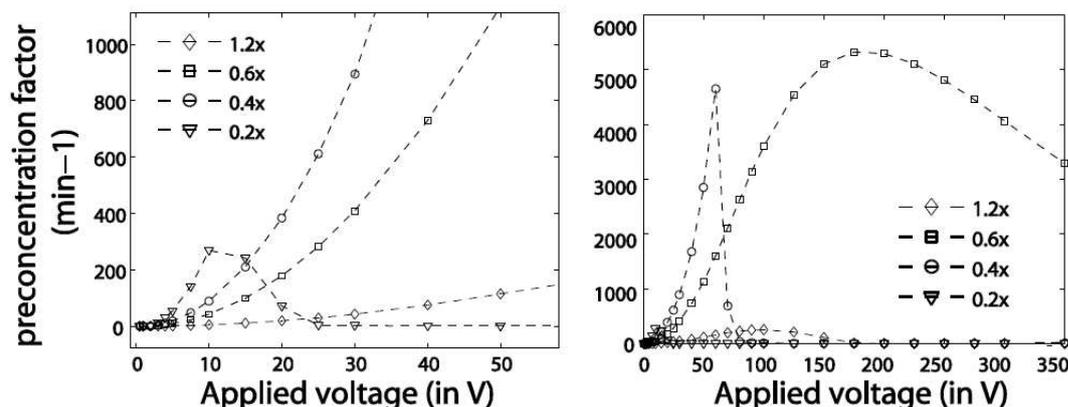


FIGURE 5.10 – Influence du champ électrique transverse sur le taux de préconcentration pour une charge de surface fixe et pour différentes mobilités électrophorétiques. [58]

Cette linéarité est un peu moins évidente pour le régime anodique puisqu'il sature en efficacité de préconcentration. Pour l'ensemble de ces évolutions temporelles, nous avons réalisé des régressions linéaires pour chaque champ électrique, comme le montrent les Figures 5.9 (a) et (c). On a ensuite reporté les pentes de chaque droite sur la Figure 5.11 pour avoir une idée plus précise de la cinétique en concentration maximale de nos expériences d'électropréconcentration assistée en pression. En superposant les résultats obtenus pour le régime anodique et pour le régime cathodique, on s'aperçoit qu'en augmentant le champ électrique, le facteur de préconcentration anodique augmente très légèrement. Au vu des observations faites précédemment, il est probable qu'en poussant l'étude pour des valeurs plus hautes de champs électriques une saturation apparaisse. Le facteur de préconcentration cathodique, quant à lui, augmente fortement avec le champ électrique de façon non linéaire, et cette augmentation est rapide aux champs supérieurs à 40V/cm.

Cette différence d'évolution entre les régimes cathodique et anodique doit être commentée. L'application d'une pression anodique produit un flux additionnel à la composante EOF, qui a pour effet de décroître l'effet du gradient de polarisation CP et donc le taux de préconcentration. Inversement, l'application d'une pression cathodique contrebalance le flux EOF du liquide augmentant l'effet de polarisation CP. Toutes ces observations sont en accord avec de précédentes simulations théoriques et solutions modèles [78, 82, 83].

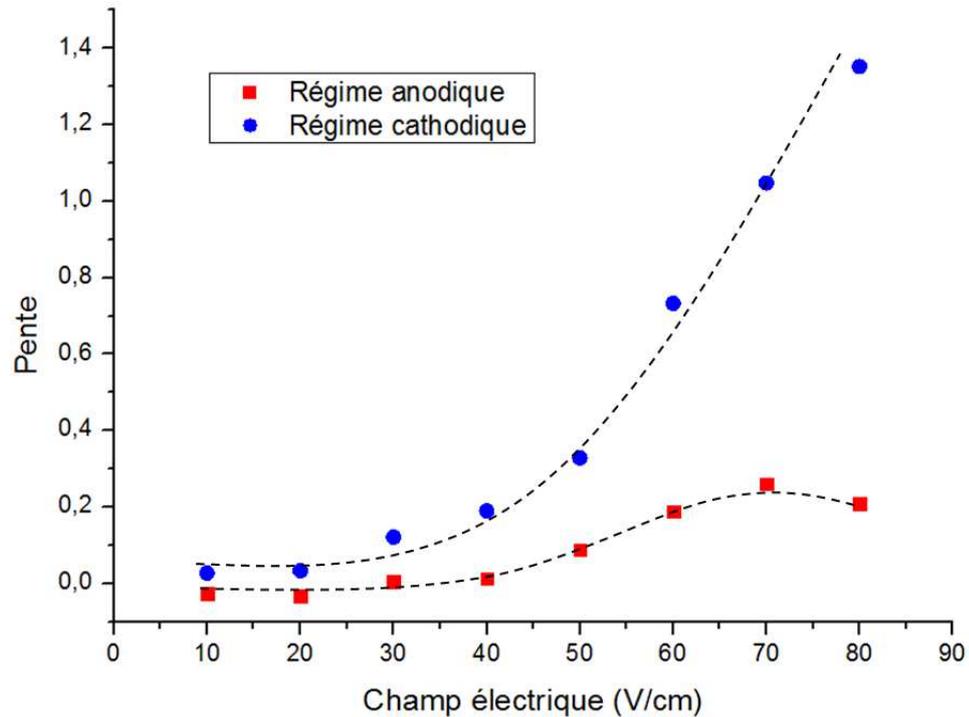


FIGURE 5.11 – Une régression linéaire a été réalisée pour chaque champ électrique des Figures 5.9 (a) et (c). La pente de chaque droite a ensuite été reportée ici en fonction du champ électrique pour le régime anodique (carrés rouges) et cathodique (ronds bleus). Des guides pour l’œil ont été tracés en pointillés.

5.4 Rôle de la pression

La préconcentration sélective assistée en pression a donc été démontrée grâce à l’application d’une pression hydrodynamique externe de 0,9 bar dans les deux directions possibles. Nous avons vu que l’efficacité de l’électropréconcentration dépendait de deux paramètres : le temps et le champ électrique. En fonction de ces deux variables, on obtient des régimes de préconcentration plus ou moins intéressants de par leur stabilité et leur intensité.

Il est maintenant intéressant de s’interroger sur le rôle de la valeur de cette pression additionnelle. Durant sa thèse, C. Nanteuil avait étudié le phénomène de rétention dans la structure MNM [58]. Le nom de “rétention” signifie que seule une pression est appliquée au travers de la fente, sans champ électrique. L’application de cette seule pression produit aussi une exhaltation en concentration. Après avoir élaboré un modèle pour mieux comprendre la dynamique et l’efficacité de ce phénomène, il était arrivé à la conclusion que celui-ci dépendait de plusieurs paramètres différents, dont la valeur de la pression à travers la vitesse du fluide [58]. Il avait mis en évidence un effet de saturation du phénomène de rétention avec une valeur maximale du phénomène de concentration correspondant à une

pression optimale, au-delà de laquelle la concentration chute drastiquement. Ce modèle avait été validé expérimentalement et corroborait les résultats obtenus antérieurement par A. Plécis [14]. La Figure 5.12 résume ces résultats identiques obtenus par ces deux précédents thésards. Les diagrammes 5.12 (a) et (c) (respectivement obtenus par A. Plécis et C. Nanteuil) montrent le phénomène de saturation en fonction du temps qui correspond à une valeur maximale d'intensité relativement faible. Ces faibles valeurs et la dynamique relativement lente de la concentration ionique par rétention en fait un phénomène peu intéressant pour des applications de préconcentration rapide et efficace (c'est d'ailleurs la raison pour laquelle cette voie avait été éliminée). Les Figures 5.12 (b) et (d), quant à elles, montrent la dépendance de ce maximum de préconcentration avec la pression appliquée et prouvent qu'une valeur trop importante de la pression fait chuter l'efficacité de la préconcentration.

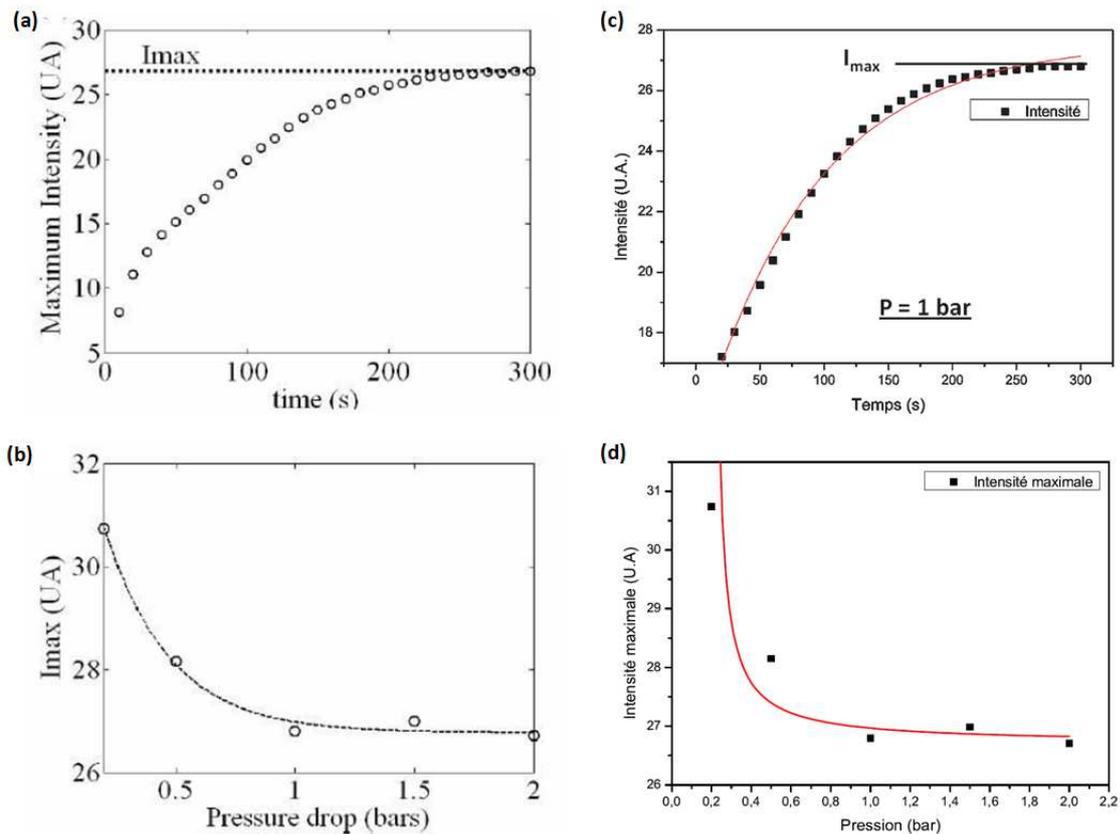


FIGURE 5.12 – (a) et (b) Résultats expérimentaux de A. Plécis sur la rétention de la fluorescéine dans du KCl $10\mu\text{M}$ et dans une structure MNM avec $h_{nano}=60\text{nm}$ et $h_{micro}=2,5\mu\text{M}$ [14]. On voit respectivement sur ces figures l'augmentation progressive de l'intensité de la fluorescéine à l'entrée du nanocanal en fonction du temps par application d'une pression seule et la dépendance de l'intensité maximale de la rétention au gradient de pression appliqué (l'intensité diminue avec les fortes pressions). (c) et (d) Résultats expérimentaux de C. Nanteuil sur la rétention de la fluorescéine dans du KCl $10\mu\text{M}$ [58]. On retrouve exactement les mêmes résultats de saturation de l'intensité et de décroissance d'efficacité lors de l'augmentation de la pression appliquée pour le phénomène de rétention.

Nous nous sommes donc, nous aussi, intéressés à la valeur de la pression et à son rôle dans notre méthode de préconcentration sélective. Si l'on se réfère aux courbes (b) et (d) de la Figure 5.12, il s'avère qu'à la pression de 0,9 bar (avec laquelle nous avons travaillé précédemment), l'intensité maximale de préconcentration de rétention est presque minimale. En diminuant la pression, il devrait donc être possible, a priori, d'augmenter le taux de préconcentration. Bien que ces résultats aient été obtenus pour le phénomène de rétention seul et avec de la fluorescéine dans du KCl, il nous a paru intéressant de voir si la diminution de notre pression additionnelle permettrait d'augmenter le taux de préconcentration de notre protocole d'électropréconcentration assistée en pression.

Nous avons donc réalisé les mêmes expériences de préconcentration (BSA à $1,5\mu\text{M}$ dans du tampon borate 50mM à $\text{pH}=10$, $E=10\text{-}80\text{V/cm}$), dans la même puce que précédemment ($h_{\text{micro}}=1\mu\text{M}$ et $h_{\text{nano}}=150\text{nm}$), mais en appliquant cette fois-ci une pression anodique ou cathodique de 0,5 bar.

La première observation est que nous retrouvons la sélectivité de l'électropréconcentration de la même manière que lors de l'application de la pression à 0,9 bar. Un régime anodique focalisant est obtenu lorsque la pression est ajoutée de l'anode vers la cathode et un régime cathodique focalisant est retrouvé lorsque la pression est appliquée dans l'autre sens, de la cathode vers l'anode. On retrouve les mêmes caractéristiques que précédemment, à savoir la saturation de l'intensité maximale aux alentours de 70V/cm pour le régime anodique et l'augmentation de cette intensité jusqu'à au moins 80V/cm pour le régime cathodique. Encore une fois, les pics obtenus sont stables en temps et en champ électrique et l'efficacité de préconcentration est plus importante pour le régime CF que pour le régime AF. Par souci de simplification, nous ne présenterons pas ici tous les résultats obtenus de la même manière que ce que nous avons fait avec $\Delta P=0,9$ bar, mais seulement les profils obtenus à 80V/cm (Figure 5.13), qui peuvent être comparés directement à ceux de la Figure 5.3 ($\Delta P=0,9$ bar). Cependant, le lecteur pourra, s'il le souhaite, retrouver l'ensemble des résultats en Annexe C. Outre la reproductibilité de toutes ces observations remarquables et discutées en détail au début de ce chapitre, ce qui nous intéresse le plus dans le cadre de notre étude, c'est d'évaluer l'influence de la pression. Nous avons donc choisi ici de superposer les résultats des deux pressions afin de se rendre compte précisément du rôle de la valeur du flux hydrodynamique.

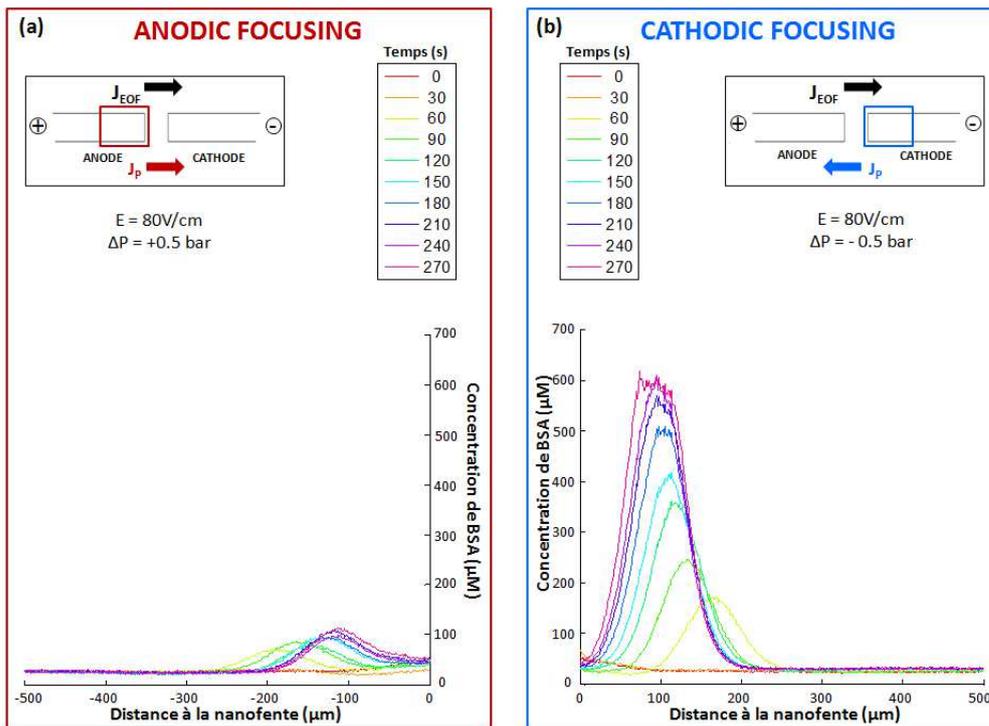
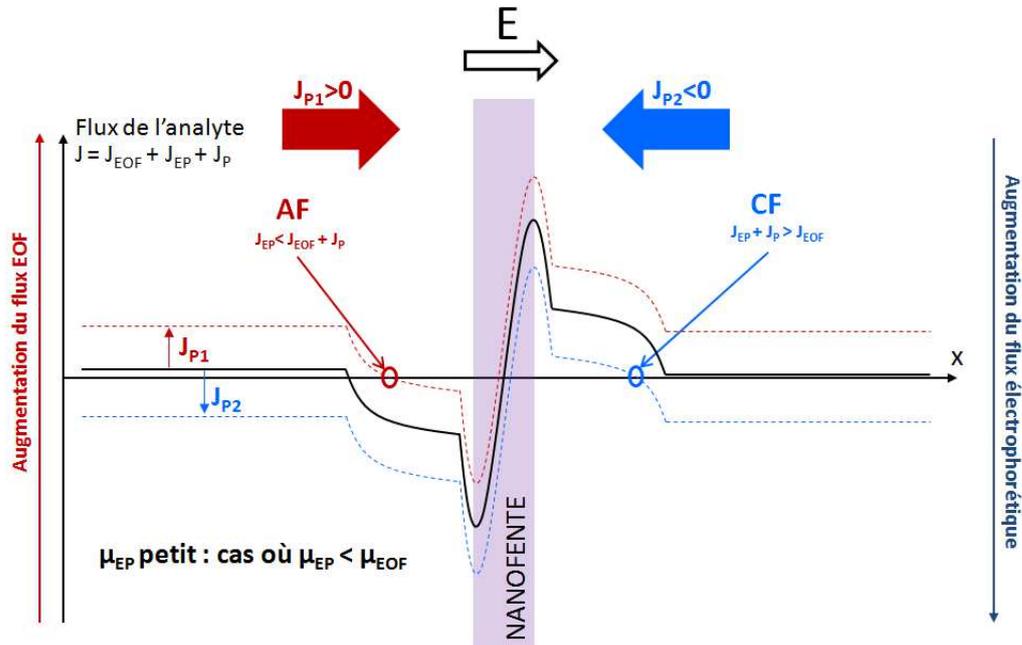


FIGURE 5.13 – Deux types de préconcentration de la BSA : Anodic Focusing (AF) quand le champ électrique et la pression sont appliqués dans la même direction correspondant à une “pression anodique” et Cathodic Focusing (CF) quand les deux flux sont opposés (cas d’une “pression cathodique”). $E=80V/cm$ et $\Delta P=+/- 0,5 \text{ bar}$.

La Figure 5.14 reporte les résultats de la préconcentration cathodique de la BSA sous un champ électrique $E=80\text{V/cm}$ et pour les deux pressions cathodiques différentes de 0,9 et 0,5 bar. On voit que la concentration maximale de BSA obtenue est plus importante lorsque la pression est diminuée (Figure 5.14 (a)). Alors que l'on avait un maximum d'environ $450\mu\text{M}$ avec $\Delta P=0,9$ bar, ce qui correspondait à un taux de préconcentration de 300 (la concentration initiale de BSA étant de $1,5\mu\text{M}$), on atteint $600\mu\text{M}$ avec la pression de 0,5 bar, correspondant à un taux de préconcentration de 400. Notons que l'on a choisi ici de ne montrer les résultats que d'un seul champ électrique pour éviter la redondance mais cette augmentation dans l'intensité de préconcentration est observée pour tous les champs électriques. On confirme donc bien que, pour l'électropréconcentration assistée en pression, l'efficacité de préconcentration est meilleure à pression plus basse, comme observé pour le phénomène de rétention. Contrairement à ce qui était observé pour la rétention, on n'a pas de saturation du maximum de préconcentration au cours du temps pour le régime cathodique, du moins pendant les cinq premières minutes d'expérience.

En ce qui concerne la largeur du pic, la Figure 5.14 (b) montre que les résultats obtenus aux deux pressions sont plutôt similaires. Au cours du temps, la finesse du pic reste relativement constante, aux alentours de $75\mu\text{m}\pm 10\%$, et le pic est encore symétrique.

Si l'on s'intéresse à la localisation du pic dans le microcanal de préconcentration, on s'aperçoit très vite qu'il y a un déplacement du pic d'une centaine de microns entre les deux pressions. La Figure 5.15, qui présente encore une fois l'exemple de l'application de $E=80\text{V/cm}$ et des deux pressions distinctes, montre les deux profils de préconcentration au cours du temps et la distance du maximum de préconcentration dans le microcanal cathodique. A pression plus basse, le front d'électropréconcentration du régime cathodique focalisant est bien plus proche de l'entrée du nanocanal qu'à haute pression. De plus, le pic semble un peu moins stable à 0,5 bar qu'à 0,9 bar. Même si on a obtenu un régime CF dans les deux cas, il semble donc que la valeur de la pression nous permette de modifier ce régime en termes d'intensité et de localisation.

Il faut cependant noter ici que ces résultats vont à l'encontre de la théorie proposée au chapitre 2. En effet, d'après la figure théorique proposée et rappelée ici en Figure 5.16 (figure simplifiée), l'addition d'une pression cathodique permet l'obtention de régimes cathodiques d'autant plus proches de l'entrée du nanocanal que le flux hydrodynamique est important. Or, d'après nos résultats, c'est l'inverse qui se produit : le pic de préconcentration est à une plus petite distance pour la plus faible pression de 0,5 bar. A défaut de pouvoir expliquer cette contradiction, il nous paraît clair que le mécanisme simplifié proposé dans ce manuscrit, pour tenter d'appréhender l'évolution du profil de flux dans la structure MNM, est limité. Les équations régissant les phénomènes [14] devraient être reposées de manière plus précise. Ainsi, il faudrait prendre en compte l'ajout du flux hydrodynamique externe, de la solution étudiée (toutes les simulations étaient, en effet, réalisées dans du KCl et non pas dans les conditions réelles de nos expériences), du pH et

de tous les paramètres pouvant être sources de modifications de l'effet CP.

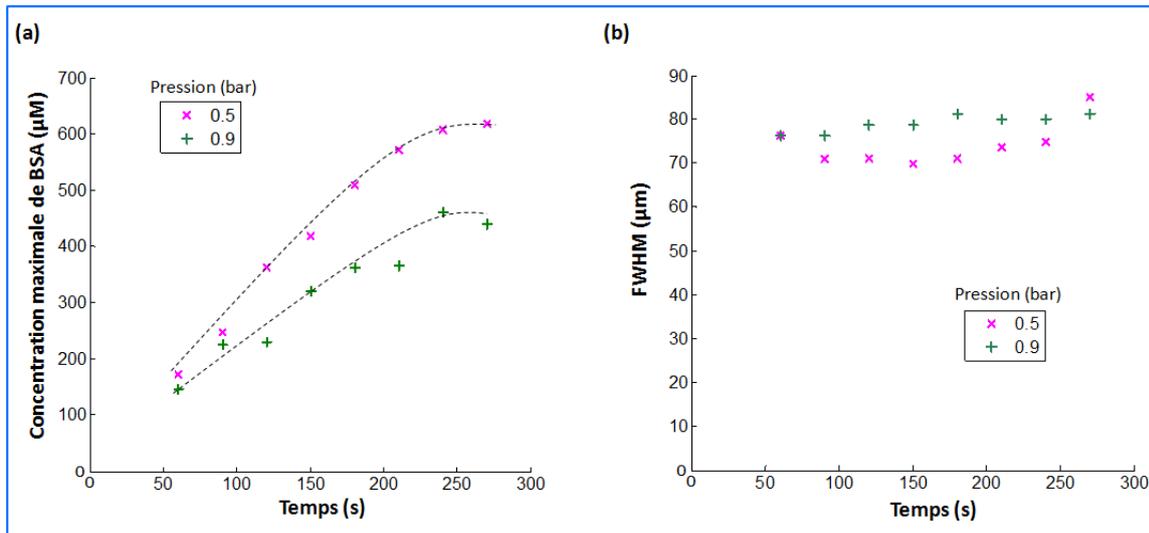


FIGURE 5.14 – (a) Concentration maximale de BSA en fonction du temps à deux pressions cathodiques différentes pour $E=80\text{V/cm}$. (b) Largeur à mi hauteur du pic de préconcentration obtenue pour deux pressions cathodiques différentes à $E=80\text{V/cm}$.

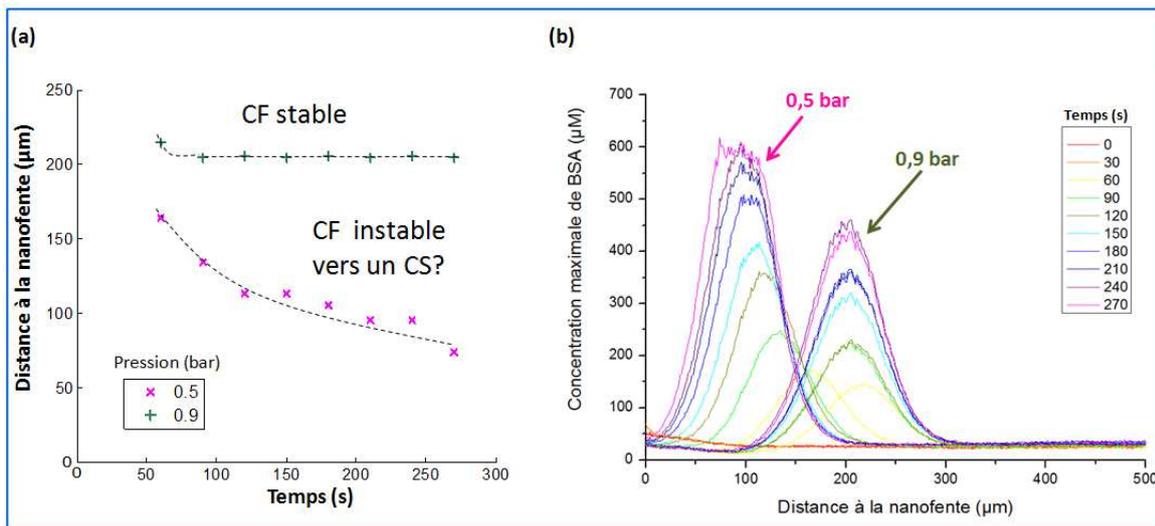


FIGURE 5.15 – (a) Distance à la nanofente du maximum de préconcentration en fonction du temps à deux pressions cathodiques différentes pour $E=80\text{V/cm}$. (b) Profils de préconcentration obtenus pour ces deux expériences de préconcentration différentes.

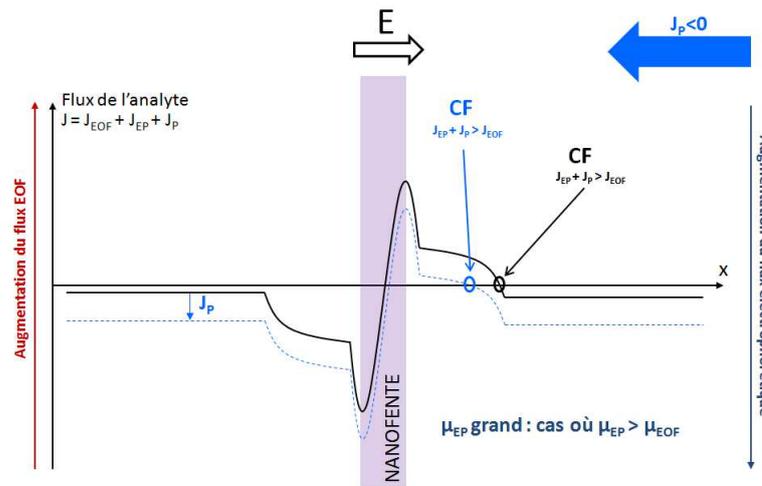


FIGURE 5.16 – Le mécanisme simplifié de préconcentration/séparation assistées en pression cathodique. Plus la pression appliquée est importante et plus le front de préconcentration se rapproche de l'entrée cathodique du nanocanal.

L'utilisation d'un flux hydrodynamique ajouté aux deux composantes traditionnelles de l'électrophorèse sur puce n'en est donc actuellement qu'aux prémices. Elle a permis d'obtenir la sélectivité de la localisation du front d'électropréconcentration (anodique ou cathodique) et d'obtenir des taux de préconcentration supérieurs à ceux attendus dans le cas du régime choisi, le CF. Il est évident que les caractéristiques de ce flux hydrodynamique, et en particulier sa valeur, peuvent avoir une importance capitale dans l'électropréconcentration. L'étude en pression devrait être approfondie, pour une gamme de pression plus large, pour différents champs électriques et pour plusieurs analytes.

D'après les premières mesures réalisées, on peut supposer qu'il existe une valeur de pression maximale à ajouter pour obtenir une efficacité de préconcentration optimale. C'est en tout cas ce que suggère la Figure 5.17 qui trace l'évolution de l'intensité corrigée (mais non calibrée) au cours du temps de différents régimes d'électropréconcentration cathodiques obtenus après application de plusieurs pressions successives et d'un champ électrique de 50V/cm. Ces premières expériences préliminaires ont été réalisées avec de la fluorescéine 5 μ M dans une solution de tampon borate 50mM à pH=9, afin d'éviter au maximum toute difficulté expérimentale que l'on a pu observer avec la BSA et que nous allons discuter. Elles montrent tout d'abord que l'intensité de préconcentration augmente au cours du temps en suivant différentes dynamiques, selon la valeur de la pression ajoutée, et que, dans un deuxième temps, l'intensité maximale de préconcentration est obtenue pour une valeur de pression de 0,4 bar. On peut aussi tracer cette figure d'une façon différente en représentant l'intensité obtenue à un temps donné en fonction de la pression appliquée. On obtient alors la Figure 5.18 qui permet de retrouver le fait qu'une pression de 0,4 bar donnent les meilleurs résultats de préconcentration. Au delà de cette valeur, l'intensité diminue avec l'augmentation de la pression.

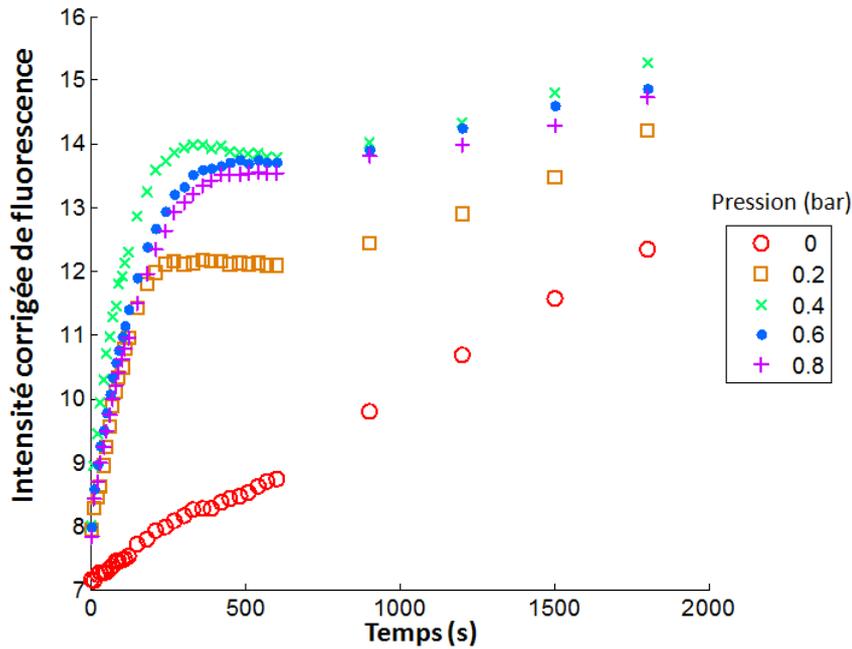


FIGURE 5.17 – Intensité corrigée de fluorescence en fonction du temps pour différentes pressions cathodiques à $E=50\text{V/cm}$. La solution étudiée est une solution de fluorescéine à $5\mu\text{M}$ dans une solution de tampon borate 50mM $\text{pH}=9$. On voit que la dynamique de préconcentration dépend de la valeur de la pression appliquée et qu’une pression limite de $0,4$ bar donne les meilleurs valeurs d’intensité.

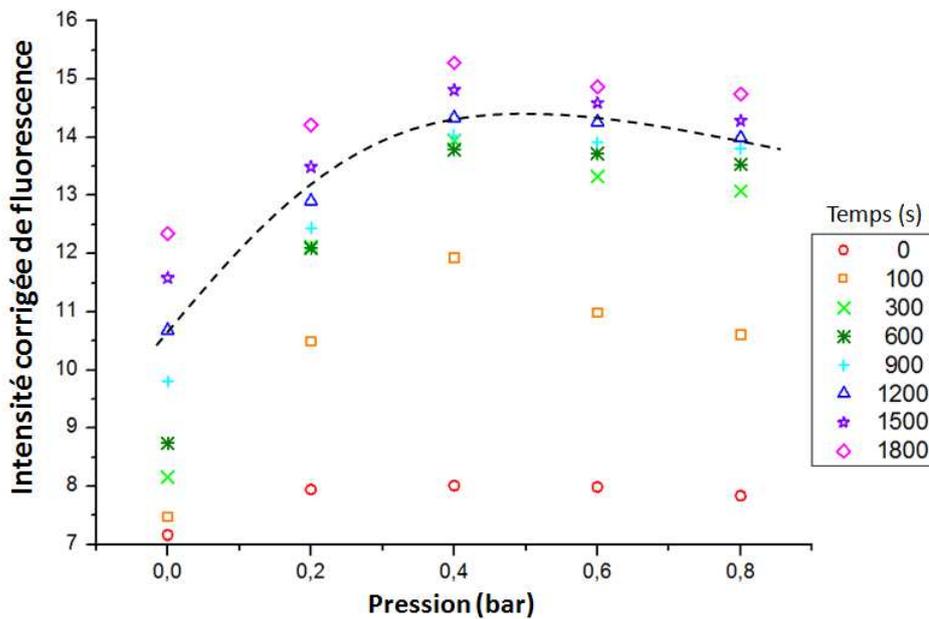


FIGURE 5.18 – Intensité corrigée de fluorescence en fonction de la pression appliquée pour différents temps à $E=50\text{V/cm}$. La solution étudiée est une solution de fluorescéine à $5\mu\text{M}$ dans une solution de tampon borate 50mM $\text{pH}=9$. On retrouve qu’il existe une pression limite de $0,4$ bar donne les meilleurs valeurs d’intensité.

5.5 Limites du modèle

En dépit de ces résultats prometteurs qui corroborent, en partie, la théorie mise en place avec la Figure théorique 2.16, nous nous sommes aperçus que la préconcentration obtenue pouvait varier d'une puce à l'autre. Donnons ici un exemple concret qui reflète au mieux ces résultats variables de la préconcentration. Nous avons vu précédemment que, lors de l'électropréconcentration conventionnelle (sans ajout de pression) d'une molécule lente, telle que la BSA, dans un dispositif MNM, on devait obtenir une préconcentration anodique. Or, dès ce stade, il nous est arrivé d'être confrontés à l'obtention d'un régime cathodique, contradictoire avec la théorie. L'ajout d'une pression additionnelle, qui devrait en principe permettre la sélectivité de l'électropréconcentration, n'a donc plus les mêmes effets sur ces expériences.

Ce phénomène de non reproductibilité des expériences doit être commenté et il est indispensable d'en explorer les raisons et de tenter de le résoudre. En fait, si la position du front de préconcentration et l'intensité de fluorescence sont reproductibles jour après jour dans une même puce, nous avons observé quelques contradictions d'une puce à l'autre. Nous supposons que ces contradictions sont liées à des difficultés expérimentales bien connues que nous allons évoquer plus en détail : (i) la hauteur et la forme du long nanocanal peuvent légèrement différer même si les puces en verre proviennent d'un même lot, (ii) la propreté des puces avant chaque expérience n'est pas la même à chaque fois à la fin de chaque procédé technologique, (iii) la charge de surface du nanocanal est difficile à fixer à une valeur précise et répétable, même si un procédé de nettoyage d'une heure est systématiquement imposé dans chaque nouvelle puce MNM.

5.5.1 Reproductibilité de la hauteur de la nanofente

Nous avons vu, à travers les chapitres précédents, que la base de notre modèle de l'électropréconcentration sélective à travers une structure MNM était le phénomène de concentration de polarisation, lié à la double couche électrique dans le nanocanal. Le recouvrement de cette EDL, dont la hauteur dépend des conditions de l'expérience et en particulier de la force ionique de la solution, conditionne le phénomène. La hauteur de la nanofente joue donc un rôle déterminant dans les résultats obtenus et, plus exactement, la hauteur effective h_{eff} ($h_{eff}=h-2\lambda_d$). Il est évident qu'une étude poussée sur les impacts de cette hauteur serait fort intéressante et permettrait de trouver des conditions optimales de préconcentration. Il faut noter ici que toutes les puces utilisées pour les expériences présentées dans ce manuscrit avaient une hauteur de nanofente de 150nm. Mais, même sans cette étude, il est aisé de comprendre que ce paramètre géométrique peut être la première source expliquant les différences obtenues d'une puce à l'autre.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3 de ce manuscrit, les techniques de fabrication utilisées pour la structuration des puces microfluidiques forment un ensemble difficile à reproduire exactement. L'étape de gravure de la nanofente, qui est l'étape critique pour le problème dont nous discutons ici, est une gravure chimique donc elle est, par définition, isotrope et très sensible à un grand nombre de paramètres. Même en étant le plus précis possible, il n'est pas simple de préparer la même solution de gravure au millilitre près, de laisser tremper le substrat de verre à la seconde près et de reproduire les conditions de gravure à l'exact identique à chaque fois. D'une puce à l'autre, les hauteurs de nanofente présentent donc de petites différences, qui plus est à si petite échelle. Même en contrôlant les profondeurs après gravure à l'aide d'un profilomètre, on ne peut pas être entièrement sûr de l'état du nanocanal, surtout que le profilomètre utilisé peut aussi être source d'incertitude. Il ne serait donc pas étonnant que, aussi minimes soient-elles, ces différences puissent avoir des conséquences plus importantes sur les résultats de préconcentration obtenus. Le système d'électropréconcentration que nous avons utilisé paraît très sensible et il peut être très facile de basculer d'un régime à l'autre en modifiant très légèrement l'un des nombreux paramètres qui gouvernent les phénomènes électrocinétiques et les flux.

La Figure 5.19 montre deux exemples illustrant ce problème de deux régimes différents obtenus avec les mêmes conditions d'expérience pour deux puces distinctes. Nous avons voulu préconcentrer une solution de BSA $1,5\mu\text{M}$ dans du tampon borate 50mM à $\text{pH}=10$. A chaque fois, un champ électrique de $30\text{V}/\text{cm}$ et une pression cathodique (de la cathode vers l'anode) de $0,8$ bar ont été appliqués sur des puces de dimensions théoriquement similaires, à savoir une hauteur de nanofente de 150nm et une hauteur de microcanal de $1,5\mu\text{m}$. Or, on s'aperçoit que deux régimes différents sont obtenus d'une puce à l'autre. La puce A présente une préconcentration de type AF tandis que la puce B montre un régime proche du CS. Alors que les conditions initiales sont censées être les mêmes, on voit donc bien qu'on peut obtenir une divergence dans les résultats obtenus d'une puce à l'autre.

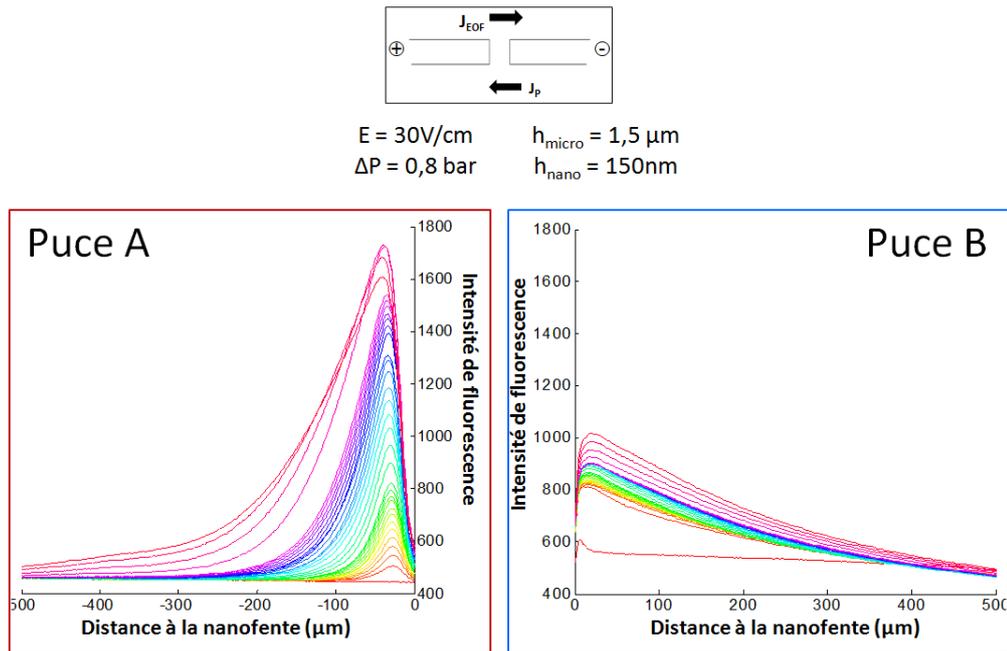


FIGURE 5.19 – Profils de préconcentration obtenus pour 2 puces différentes dans les mêmes conditions d’expérience soit : $E=30\text{V/cm}$, $\Delta P=0,8\text{ bar}$, $h_{nano}=150\text{nm}$, $h_{micro}=1,5\mu\text{m}$. La solution étudiée est une solution de fluorescéine à $1,5\mu\text{M}$ dans une solution de tampon borate 50mM $\text{pH}=9$. On trouve deux profils différents : un AF et un CS.

5.5.2 Propreté des puces

Un autre paramètre primordial pour l’obtention de résultats exploitables et pertinents est, sans aucun doute, la propreté des canaux dans lesquels se déroule l’électropréconcentration. L’étude et le suivi que l’on effectue de la préconcentration des analytes se fait par fluorescence. Il faut donc dans un premier temps que, avant une quelconque expérience, nos canaux soient vierges de toute intensité de fluorescence. De plus, il est important qu’aucune impureté (même non fluorescente) ne soit présente puisque tout corps étranger viendrait faire obstacle au phénomène et “parasiter” la préconcentration obtenue. Notons ici que, dans tout ce manuscrit, on fait l’hypothèse que les analytes marqués en fluorescence utilisés sont purs. Autrement dit, on part du principe que, dans une solution de BSA par exemple, un pic de préconcentration correspondrait forcément à la présence de la BSA et ne serait pas à associer au marqueur seul. Avec ce postulat, la présence de contaminations pourrait se traduire, par exemple, par l’obtention d’un autre pic de fluorescence non attendu (et non révélateur d’un vrai régime de préconcentration) ou bien encore par un taux de préconcentration réelle qui se retrouverait diminué de par l’accumulation de l’analyte aux endroits contaminés au lieu de l’endroit souhaité de préconcentration.

La propreté des canaux est, encore une fois, une chose difficile à contrôler précisément. Une première difficulté est inhérente au procédé de fabrication utilisé puisqu’il est composé de très nombreuses étapes, chacune source de contamination. Plus parti-

culièrement, l'étape de microbillage nécessaire à la réalisation des quatre réservoirs microfluidiques est extrêmement polluante, puisqu'elle utilise un très grand nombre de toutes petites billes de silice, et, même si un nettoyage relativement "agressif" est effectué avant le scellement des puces, le dispositif final n'est pas exempt d'un risque de contamination résiduelle.

Dans un deuxième temps, une contamination est presque impossible à éviter entre chaque expérience de préconcentration sur une même puce, en particulier lors de l'utilisation de molécules telle que la BSA. En effet, un phénomène d'adsorption sur les parois peut exister dès qu'il existe localement une variation de pH. Dans ce cas, dès la deuxième expérience, il est possible, et même très probable, d'observer de la BSA résiduelle à certains endroits du canal de préconcentration où une adsorption a eu lieu. Encore une fois, cette contamination antérieure à l'expérience de préconcentration peut venir "perturber" le phénomène et fausser les résultats. Pour tenter de limiter ces problèmes de propreté, des protocoles systématiques de nettoyage ont été mis en place. Ainsi, rappelons-le, un nettoyage à base d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène est effectué sur les deux faces de la puce avant le scellement. En plus de cela, un rinçage à la soude concentrée est fait avant la première utilisation d'une puce et un nettoyage électrique et fluïdique est appliqué entre chaque nouvelle application de champ électrique et de pression. Mais, malgré cela, il est très fréquent d'obtenir des résultats faussés par une contamination. La Figure 5.20 montre un exemple de profil obtenu, typique des phénomènes de contamination. Sur ce profil, on retrouve 5 pics parasites qui ne sont pas forcément reliés à la préconcentration. La courbe rouge correspond au temps 0. On voit que, déjà au temps initial, des pics parasites sont présents dans le profil et une intensité de fluorescence non nulle (ou tout du moins qui ne correspond pas simplement au bruit de fond) est obtenue (pics 1 à 4). Celle-ci est très sûrement due à l'adsorption de BSA lors des expériences précédentes. Du coup, au fur et à mesure du temps, ces pics peuvent s'intensifier et laisser penser, à tort, à des pics de préconcentration. Sur ce profil, le pic 5 est le seul qui ressemble à de la préconcentration réelle mais il s'avère plutôt instable dans le temps. On voit donc clairement, à travers cet exemple, que lorsqu'une puce est d'ores et déjà contaminée avant l'expérience, le profil de préconcentration est affecté.

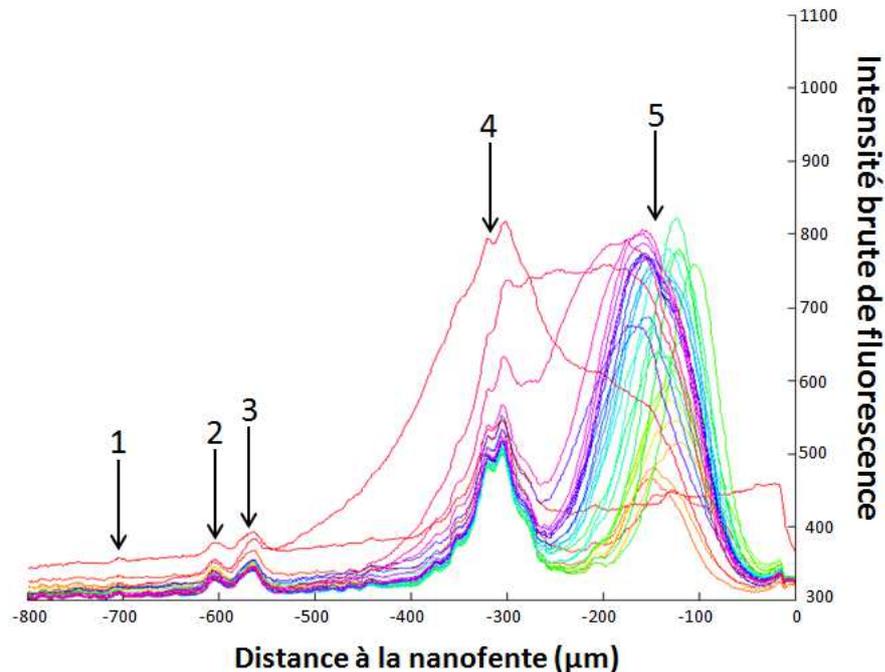


FIGURE 5.20 – Exemple de profil de préconcentration obtenu avec une puce polluée. 5 pics notables sont obtenus. Seul le numéro 5 peut être considéré comme un pic de préconcentration réelle, les autres n'étant dus qu'à la présence de contaminants dans la puce.

5.5.3 Charge de surface initiale

Enfin, le paramètre sans doute le plus important pour piloter le mécanisme de déplétion/enrichissement est la charge de surface initiale du verre. En introduisant le principe d'électrophorèse sur puce, on a vu que cette charge de surface était un facteur très important des mécanismes électrocinétiques. C'est donc ce paramètre $\sigma_{s(t=0)}$ (ou encore le potentiel zeta $\zeta_{t=0}$) qui va gouverner les résultats obtenus. Pour cette raison, de nombreux groupes de recherche font le choix de traiter leurs canaux (avec de la BSA par exemple) afin de maîtriser cette charge de surface initiale et de s'affranchir de la dépendance de ce facteur. Dans le cadre de nos expériences, il est certain que l'état de surface initial peut différer pour chaque puce si le nettoyage au NaOH effectué n'est pas assez reproductible pour maintenir $\zeta_{t=0}$ à la même valeur.

Les résultats d'électropréconcentration varieront donc d'une puce à l'autre si les paramètres cités ne sont pas reproduits. On peut donner deux raisons principales à cela, que l'on vient d'évoquer en parlant de la propreté de la puce : l'adsorption non spécifique des analytes étudiés (comme on l'a évoqué dans le paragraphe précédent) ainsi que l'historique de la puce (les prétraitements effectués,

les expériences réalisées, la fréquence d'utilisation, le temps de vie de la puce etc). En premier lieu, on pourrait évaluer l'adsorption des analytes que l'on utilise dans notre structure MNM afin d'avoir une idée quantitative et de pouvoir corriger par la suite les résultats obtenus. Un autre banc expérimental d'électroporèse au laboratoire utilise des transistors fluidiques intégrant des électrodes de grille en matériau polarisable, mis en contact direct avec l'électrolyte, afin de contrôler parfaitement la charge de surface. Des films minces semiconducteurs en SiC, Al et CNx ont été choisis, car ils possèdent une gamme de polarisabilité (-2V à +2V) suffisamment grande pour permettre un ajustement du flux EOF sans réactions faradiques parasites. Intégrées dans des dispositifs à microcanaux longs, ces électrodes permettent d'ajuster les mobilités des molécules biologiques dans une gamme de potentiel qui dépend fortement du matériau grille. Les mesures du flux EOF sont obtenues avec une grande précision grâce à une géométrie particulière de pont de Wheastone. Il pourrait donc être intéressant de combiner la géométrie et la méthode assistée en pression avec ces transistors fluidiques afin de s'affranchir du problème de charge de surface. C'est l'une des perspectives intéressantes que ce sujet de thèse peut proposer.

Conclusion

Les expériences d'électropréconcentration assistée en pression avec la BSA ont permis de prouver l'efficacité de la méthode en termes de sélectivité. Grâce à une pression additionnelle judicieusement choisie (valeur et direction), nous sommes parvenus à obtenir les deux régimes focalisants pour cette molécule : un régime anodique AF (régime obtenu classiquement sous champ électrique seul), par l'ajout d'une pression anodique (de l'anode vers la cathode) et un régime cathodique CF, par l'ajout d'une pression cathodique (de la cathode vers l'anode). Les caractéristiques des régimes obtenus dépendent de plusieurs paramètres que sont la valeur du champ électrique appliqué, le temps d'expérimentation et, bien sûr, la valeur de la pression ajoutée. Le régime cathodique, en plus d'être atteint grâce à notre technique, présente des caractéristiques très intéressantes. Il est particulièrement stable et, contrairement au régime anodique dans les mêmes gammes de champ électrique et de pression, ne sature pas en intensité de préconcentration et atteint des taux de préconcentration maximaux élevés de 400.

Cependant, le problème majeur rencontré au cours de cette thèse est un souci de répétabilité. La compétition entre les différents flux électrocinétiques se produisant au sein de la structure MNM est extrêmement sensible et la moindre variation dans les paramètres influents peut changer le régime obtenu du tout au tout. Ainsi, d'une puce à l'autre, la dimension du nanocanal, la propreté de la puce ou encore la charge de surface initiale sont autant de paramètres à contrôler précisément, ce qui reflète la difficulté de mise en oeuvre de la technique.

Chapitre 6

Perspectives du travail de thèse

6.1 Etudes supplémentaires possibles sur les dispositifs actuels

6.1.1 Influence des dimensions du nanocanal

Comme discuté à la fin du chapitre précédent, certains paramètres influent fortement sur les résultats obtenus lors de l'électropréconcentration assistée en pression des différents analytes. Il pourrait être intéressant d'étudier le rôle de certains de ces paramètres sur la qualité de l'électropréconcentration. Tout au long de ce manuscrit, nous avons vu que le phénomène d'électropréconcentration dans la structure MNM était lié à l'effet d'enrichissement/déplétion et au rôle de la double couche électrique. Dans le chapitre 4, comme illustré sur la Figure 4.10, nous avons discuté de l'influence de la force ionique sur cette double couche et sur la valeur de **la hauteur effective de la nanofente** h_{eff} , qui est le paramètre pertinent qui gouverne le passage des ions.

Dans un premier temps, il pourrait donc être intéressant de poursuivre l'étude du rôle de **la hauteur effective de la nanofente** sur l'électropréconcentration assistée en pression. Modifier la force ionique était une façon élégante de jouer sur la valeur de h_{eff} sans varier la hauteur physique de la fente. Cela nous a permis dans une même puce de hauteur h de récolter des informations à différentes valeurs de h_{eff} . Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude en ayant à disposition tout un jeu de puces, avec des hauteurs h physiques différentes. Pour la fluoréscéine, ceci permettrait d'établir une cartographie en force ionique et en h des meilleurs paramètres (champ électrique et pression) conduisant au régime CF stable pour lequel la fenêtre optimale semble restreinte avec un h de 150nm.

Dans un second temps, il serait aussi intéressant d'étudier l'influence de **la longueur des nanocanaux** utilisés. En effet, depuis le début de ce travail, on parle beaucoup des différentes épaisseurs et de leur influence mais, à aucun moment, nous ne discutons de la longueur de la nanofente. Est-ce la même chose d'avoir

une fente de $100\mu\text{m}$ de long (ce qui est le cas de toutes les expériences présentées dans ce manuscrit) ou de $25\mu\text{m}$? A l'inverse, augmenter la longueur du nanocanal influera-t-il de manière bénéfique sur le taux de préconcentration? Ces questions méritent d'être soulevées et étudiées. Han et al. ont effectué une rapide étude de l'influence de la longueur et de l'épaisseur du filtre ionique (membrane Nafion) sur l'intensité de préconcentration obtenue [100].

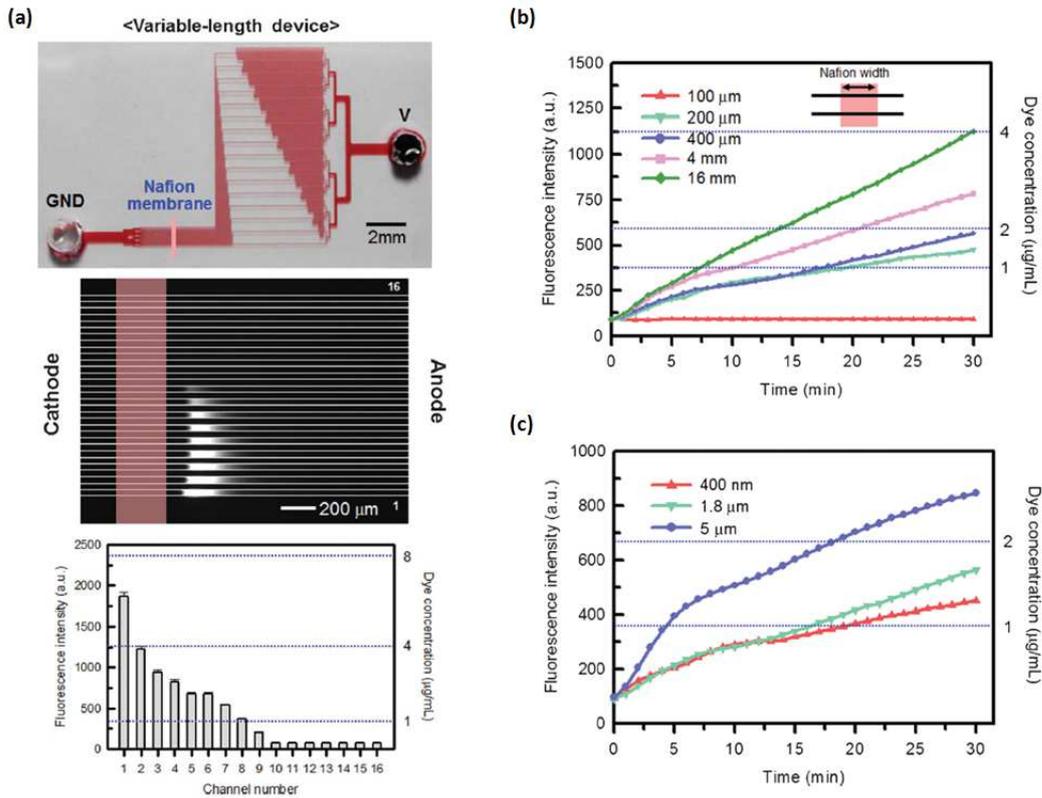


FIGURE 6.1 – (a) Concentrateurs nanofluidiques parallèles de Han pour lesquels la longueur de la membrane Nafion varie. Les microcanaux font $50\mu\text{m}$ de large et $15\mu\text{m}$ de profondeur. Une tension de 40V est appliquée pendant 20min à une solution de 100ng/mL d'Alexa Fluor 488. Le diagramme en barres montre l'intensité de fluorescence dans chaque canal de longueur différente. (b) Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour des largeurs de membranes différentes (c) Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour des épaisseurs de membranes différentes.

Ils ont observé une forte dépendance de l'efficacité de préconcentration selon les dimensions de la membrane utilisée en lieu et place de notre nanofente. La Figure 6.1 (b) montre l'influence de la longueur de la membrane Nafion sur l'intensité de fluorescence au cours du temps et la Figure 6.1 (c) étudie l'influence de l'épaisseur de la membrane. On observe que l'intensité obtenue est d'autant meilleure que cette longueur et cette épaisseur sont grandes. Augmenter la longueur du nanocanal aurait certainement pour effet de renforcer cette action et d'observer ainsi des taux de préconcentration toujours plus grands.

Dans cette perspective, nous avons produit des puces en verre contenant 5 microcanaux parallèles présentant des longueurs de nanocanaux différentes (Figure 6.2).

Au moment de la rédaction de ce mémoire, des mesures sont en cours pour évaluer l'influence de la longueur du nanocanal sur la préconcentration obtenue.

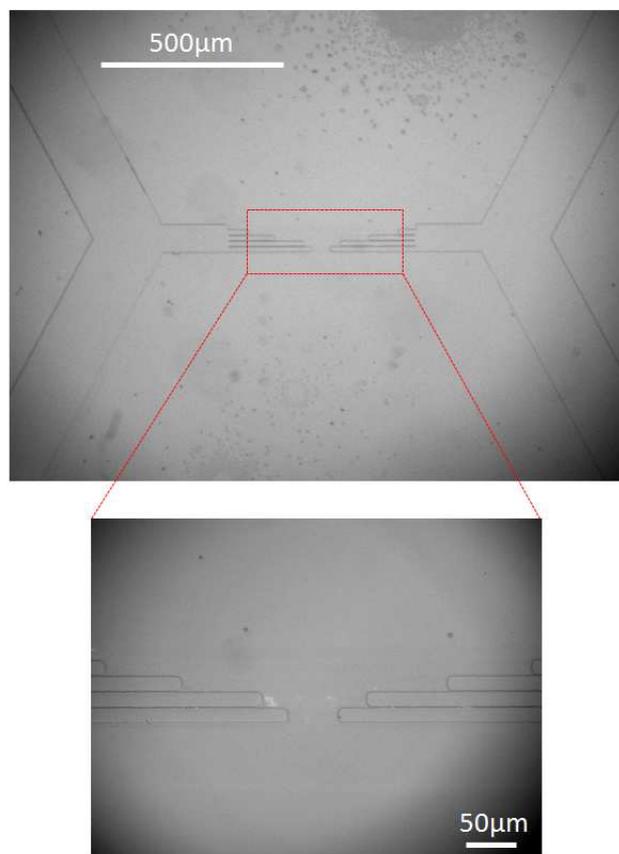


FIGURE 6.2 – Photos au microscope d’une structure MNM contenant 5 microcanaux parallèles présentant chacun une longueur de nanocanal différente.

6.1.2 Modifications de la charge volumique de surface (VSC)

En plus de la forte influence des dimensions du nanocanal, nous avons vu dans le chapitre 5 que la charge de surface était l’un des paramètres clés de la préconcentration et de son efficacité. En effet, la forme et la charge de surface des microcanaux sont des paramètres importants pour le transport ionique et massique dans les systèmes microfluidiques. Comme nous l’avons indiqué, un grand nombre d’études et de développements a été réalisé afin d’optimiser séparément ces fonctions. En 2010, Plécis et al. [84] proposaient de les examiner ensemble en définissant un nouveau paramètre plus pertinent, appelé charge de surface volumique (VSC en anglais). Cette charge de surface volumique est le rapport de la charge de surface sur la hauteur de section des microcanaux. Les effets non-linéaires induits par une rapide variation de cette VSC (Figure 6.3) peuvent résulter en un processus de préconcentration sélective qui peut être utilisé pour la préconcentration et la séparation simultanées de biomolécules. L’intégration d’une nanofente au centre d’un microcanal droit est une première méthode qui permet de modifier locale-

ment cette charge volumique de surface pour obtenir la préconcentration sélective recherchée. Cependant, d'autres stratégies peuvent être appliquées pour modifier cette charge volumique de surface.

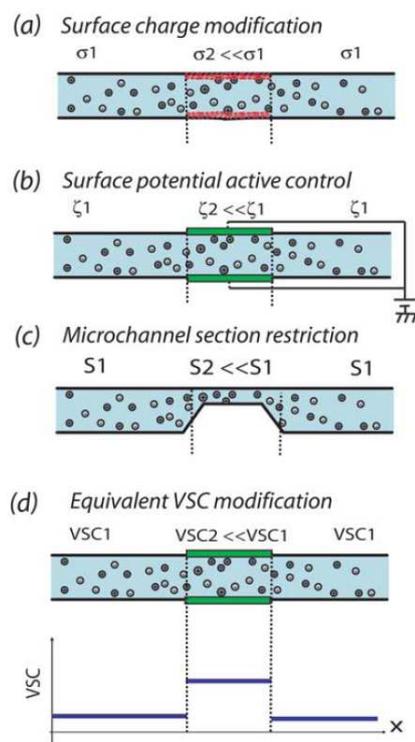


FIGURE 6.3 – Stratégies pour obtenir des variations de la charge volumique de surface (VSC) dans un microcanal droit. Ces variations peuvent être induites par (a) des prétraitements chimiques de surface, (b) des surfaces électro-actives telles que les électrodes polarisables ou (c) des restrictions de hauteur comme dans le cas d'une structure MNM. En termes de VSC, toutes ces structures résultent en un système équivalent (d).

Nous citerons ici deux autres méthodes qui permettent, elles-aussi, de moduler la charge de surface : l'utilisation de **prétraitements chimiques** ou bien une technique de contrôle physique.

La première consiste à recouvrir la surface des canaux en verre d'une ou de plusieurs couches d'un polymère judicieusement choisi. De nombreux groupes de recherche ont montré que l'utilisation d'un tel traitement chimique de surface permet d'améliorer la séparation d'analytes. Ainsi, Henry et al. [101] ont obtenu une efficacité de préconcentration du diamino-butane plus grande avec un recouvrement multicouche. De la même manière, Katayama et al. [102] ont montré que la mobilité électroosmotique était stabilisée dans un capillaire de verre et dans une vaste gamme de pH en effectuant un tel recouvrement.

La deuxième méthode proposée par Plécis et al. [84] est l'**utilisation d'interfaces polarisables** qui permet de moduler en temps réel la charge de surface par polarisation d'une électrode qui tapisse la surface interne du canal de séparation. Ces interfaces, directement immergées dans l'électrolyte, permettent en fait de modifier la valeur du potentiel zeta grâce à la tension appliquée.

6.2 Remplacement de la nanofente par une membrane Nafion : vers une autre méthode de contrôle de la VSC

La structure MNM et le dispositif complet proposés dans ce travail de thèse peuvent donc être encore améliorés et d'autres études pourraient être réalisées. Il serait, par exemple, possible de remplacer le nanocanal en verre par d'autres structures qui provoqueraient aussi le phénomène de déplétion/enrichissement mais qui pourraient, soit être plus faciles à mettre en œuvre, soit plus efficaces dans la préconcentration. Nous allons discuter ici d'une expérience qui pourrait être menée dans le futur, à savoir l'utilisation d'une membrane en Nafion.

6.2.1 Définition du Nafion

Le Nafion est un fluoropolymère-copolymère basé sur un tétrafluoroéthylène sulfonaté découvert dans la fin des années 1960 par Walther Grot de DuPont. Il est le premier d'une classe de polymères synthétiques avec des propriétés ioniques appelés ionomères. La combinaison du squelette stable en téflon avec les groupes acides sulfoniques donne au Nafion ses caractéristiques :

- Il est très conducteur pour les cations, ce qui convient pour de nombreuses applications de membranes.
- Il résiste aux attaques chimiques. Selon DuPont, seuls les métaux alcalins (en particulier le sodium) peuvent dégrader le Nafion sous des températures et pressions normales.
- Il est un catalyseur superacide. La combinaison du squelette fluoré, des groupes acides sulfoniques, et l'effet stabilisateur de la matrice polymère font du Nafion un acide très fort, avec un $pK_a \approx -6$.
- Il est sélectif et hautement perméable à l'eau.

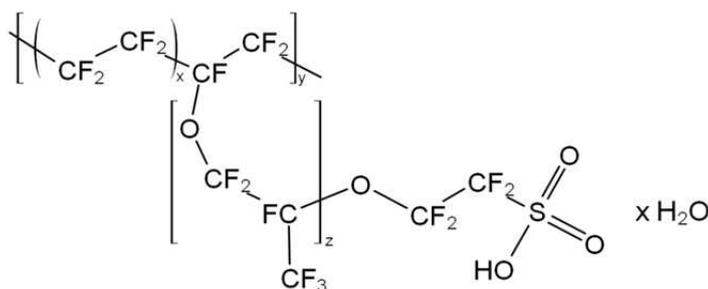


FIGURE 6.4 – Formule chimique du Nafion.

Techniquement, le Nafion peut se trouver sous forme de résine ou de billes de polymère. Deux méthodes sont alors principalement utilisées pour la fabrication d'une membrane Nafion. Han et al. présentent ces deux procédés en donnant l'exemple de la fabrication d'une puce verre/PDMS structurée comportant une membrane Nafion qui vient remplacer le nanocanal de notre géométrie en H [71].

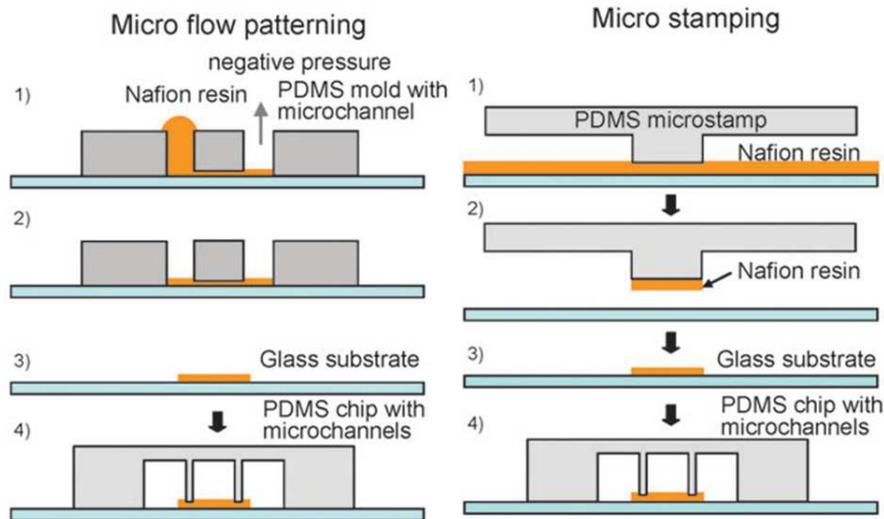


FIGURE 6.5 – Schéma des deux principes de fabrication d'une membrane Nafion [71]. (à gauche) "Patterning method". 1) Un petit volume de résine Nafion est déposé d'un côté du canal d'un moule en PDMS et une pression négative est appliquée pour remplir le dit canal. 2) La membrane Nafion est ainsi structurée. 3) Après un recuit de 10min à 95°C , le tout peut être scellé à la puce microstructurée en PDMS (c'est l'étape 4)). (à droite) "Printing method". 1) Un timbre de PDMS aux dimensions de la membrane voulue est mis en contact avec la résine Nafion. 2) Par impression, on dépose ensuite la membrane sur le substrat de verre. 3) La membrane Nafion est ainsi structurée. 4) Le tout est enfin scellé à la puce microstructurée en PDMS.

Ces deux techniques sont donc les suivantes :

- "Microflow Patterning method" (Figure 26 à gauche) : Pour ce procédé de fabrication, un moule en PDMS contenant un microcanal est utilisé et la structuration de la membrane va se faire par remplissage du canal par la résine. Le moule en PDMS est donc tout d'abord collé sur un wafer de verre et un petit volume de résine Nafion (de l'ordre du μL) est déposé d'un côté du canal. Par application d'une pression négative de l'autre côté du canal, le canal va alors se remplir complètement. Après durcissement du dispositif à 95°C pendant 10min, le moule en PDMS utilisé pour la structuration peut être retiré et la puce de travail structurée (en PDMS elle aussi) peut être scellée à l'ensemble verre-Nafion par collage plasma.
- "Printing method" (Figure 26 à droite) : Comme son nom l'indique, cette technique est une méthode d'impression. La fine couche de résine Nafion est

déposée sur le substrat de verre par impression à l'aide d'un timbre en PDMS des dimensions désirées. Finalement, tout comme avec le premier procédé, la puce en PDMS est collée sur le substrat de verre.

6.2.2 Etat de l'art de la préconcentration à l'aide d'une membrane Nafion

Le groupe de Han au MIT a été le premier (et pour l'instant le seul connu) à avoir utilisé le Nafion pour préconcentrer des biomolécules. Un de leurs systèmes a été conçu dans ce but afin d'augmenter le taux d'une réaction enzyme-substrat [103]. Le principe, décrit à la Figure 6.6-A, est le suivant : on utilise le préconcentrateur en Nafion pour amener les réactifs (enzyme et substrat) en un point focal précis où aura lieu la réaction enzymatique.

Sur la figure, le canal coloré en vert correspond au canal rempli de solution tampon tandis que le canal coloré en rouge est rempli du mélange enzyme/substrat. On applique tout d'abord 0V en GND et 50V en V1 et V2. Il y a alors création de la zone de déplétion près de la membrane Nafion (effet de polarisation). On applique ensuite 50V en V1 et 25V en V2. Cette différence de potentiel induit un flux électroosmotique tangentiel qui va piéger les molécules de trypsin et de BODIPI FL caséine en amont de la zone de déplétion (c'est la zone de réaction). En faisant ensuite des mesures de fluorescence, ils ont remarqué que le taux de la réaction enzyme-substrat augmentait considérablement dans la zone de réaction (fort pic d'intensité cf Figure 6.6-C). En comparant des expériences réalisées sans préconcentration et d'autres avec, ils se sont aperçus que le taux de réaction avait été multiplié par 6 : il ne faut que 10 minutes avec préconcentration pour obtenir les résultats obtenus en 1h sans préconcentration. De plus, l'intensité de fluorescence (donc la sensibilité du système) est multipliée par 100 grâce à la préconcentration.

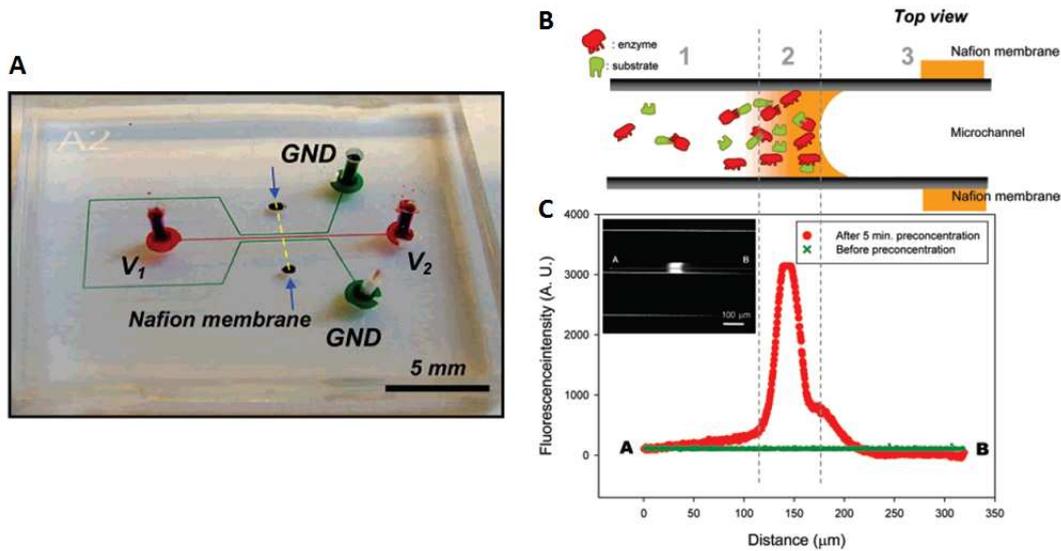


FIGURE 6.6 – (A) Système de préconcentration et de réaction avec une membrane Nafion de Han et al [103]. (B) Schéma du piégeage électrocinétique de l'enzyme et du substrat. (C) Profil d'intensité le long du microcanal représentant la mesure du produit de la réaction enzyme-substrat après 5min de préconcentration. On observe une augmentation du produit de la réaction enzyme-substrat dans la zone de réaction générée par le piégeage électrocinétique (zone 2). La zone 1 contient le mélange trypsin-caséine BODIPY FL qui est en dehors de la zone de réaction. La différence des signaux fluorescents entre les zones 1 et 2 indique une amélioration de la réaction enzyme-substrat grâce à la préconcentration. La zone 3 illustre la zone de déplétion.

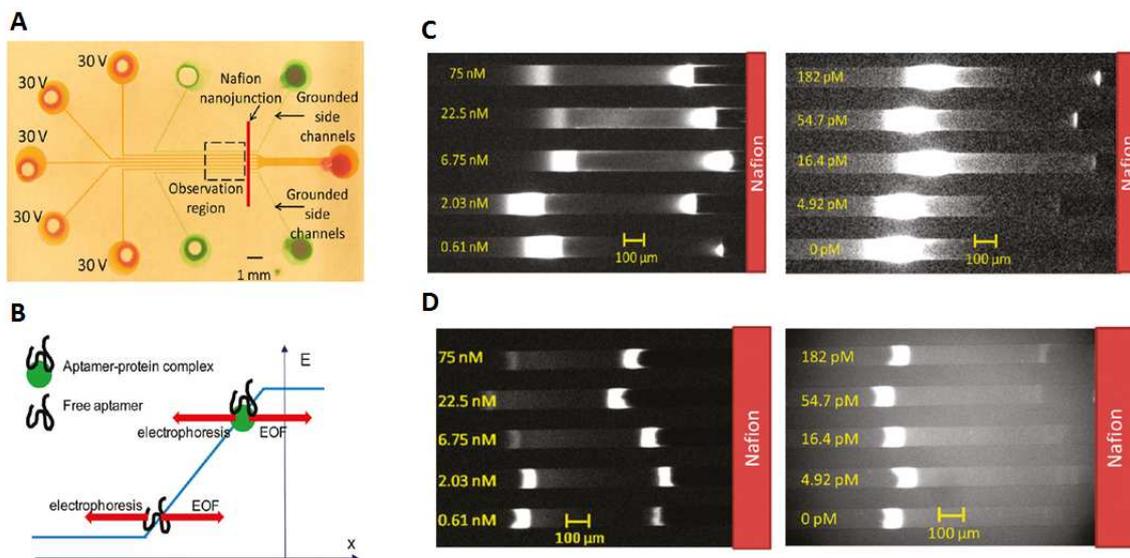


FIGURE 6.7 – (A) Système de préconcentration et de réaction multicanaux en PDMS avec une membrane Nafion [104]. Les images expérimentales sont prises dans la région d'observation. (B) Les aptamères seuls et le complexe aptamère/protéine se concentrent à différents endroits à cause de leurs mobilités électrophorétiques différentes. (C) Résultats expérimentaux pour le dosage de l'IgE dans une solution tampon après 30min de préconcentration. (D) Résultats expérimentaux pour le dosage de l'IgE dans du sérum d'âne 10%.

Par la suite, ils ont réalisé un système encore plus perfectionné, avec 5 canaux d'entrées permettant de faire 5 préconcentrations à la fois [104], comme le montre la Figure 6.7-A. Ils ont cette fois-ci travaillé avec des aptamères, qui sont des oligonucléotides simple brin ayant subi de multiples séries de sélection *in vitro* afin se lier spécifiquement à différentes cibles moléculaires, et qui rivalisent avec les anticorps en termes de sensibilité et spécificité. Les aptamères présentent l'avantage d'avoir un faible coût de production (car ils sont obtenus par synthèse chimique) et ont en plus une aptitude à survivre à des conditions difficiles tout en étant faciles à marquer. Leur principal inconvénient réside dans le fait que le complexe peut se dissocier pendant des temps longs de migration, ce qui entraîne une diminution du signal voir une absence de signal.

Leur système a permis d'effectuer des dosages électrophorétiques de deux biomarqueurs de maladies différentes : IgE (réponse allergique et défense contre les parasites) et HIV-1 RT (diagnostic et cible thérapeutique du HIV-1). Les aptamères seuls (de hautes mobilités électrophorétiques) sont concentrés dans la zone de faible champ électrique, tandis que les complexes (de plus faibles mobilités à cause de leur masse) se concentrent plus près de la membrane Nafion où le champ est plus fort (Figure 6.7-B). Les molécules cibles seules sont capables de migrer et donc les aptamères qui se sont dissociés de leur cible dans la zone des complexes peuvent très vite se relier avec des protéines seules et régénérer le complexe. Grâce à différentes petites optimisations chimiques, ils sont parvenus à obtenir des facteurs de préconcentration ≥ 1000 en 30min d'expérience (Figure 6.7-C), une position du pic du complexe remarquablement stable (moins de $200\mu\text{m}$ de déplacement), une résolution de 3,9 pour les pics et des limites de détection relativement faibles (4,4 pM pour l'IgE et 9 pM pour le HIV-1 RT après 30min de préconcentration). Ils sont même allés plus loin en dosant l'IgE dans du sérum dilué 10% d'âne pour démontrer l'application de leurs essais pour une analyse d'échantillons complexes (Figure 6.7-D).

En 2012, ce même groupe a démontré que l'intégration d'un nanopréconcentrateur à fente pouvait être couplé à un immunotest ELISA classique pour améliorer la cinétique de ce type de test et travailler avec des solutions très diluées [100]. Leur système (voir Figure 6.8) est très semblable au notre sauf qu'ils ont remplacé le nanocanal de la structure en H que nous avons proposé par une membrane en Nafion déposée au fond d'un microcanal droit en PDMS. Ils sont parvenus à montrer que l'intensité de fluorescence obtenue avec un tel système (courbe rouge de la Figure 6.8 (g)) était bien plus élevée que celle obtenue avec le système classique (courbe verte de cette même figure). Le mécanisme de la Figure 6.8 (e) remplace la nanofente utilisée tout au long de cette thèse par une membrane Nafion. Cela revient en fait à moduler localement la charge de surface volumique (VSC) (comme représenté en Figure 6.3 (d)). C'est avec ce même principe que le groupe de Han a obtenu les résultats de la Figure 6.1. Utiliser cette membrane et moduler sa hauteur permet de moduler la VSC, comme on le faisait avec la nanofente.

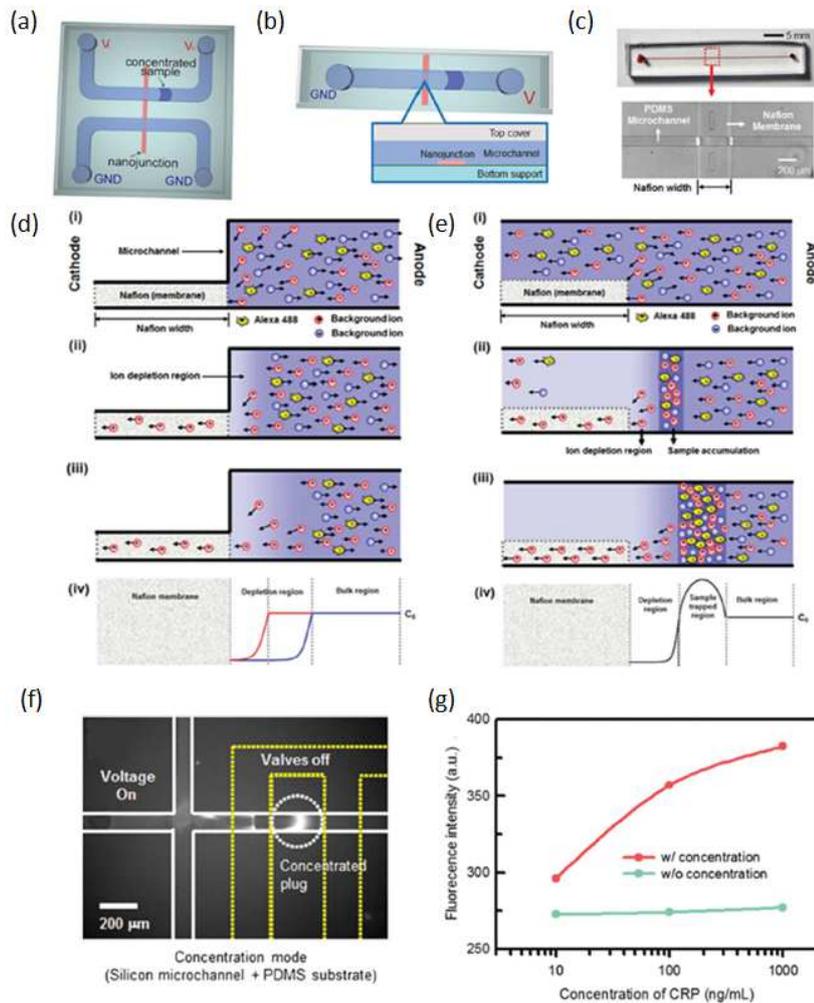


FIGURE 6.8 – Schéma (a) d'un concentrateur nanofluidique conventionnel et (b) de la géométrie proposée ici avec une membrane Nafion déposée au fond d'un microcanal droit. (c) Vue optique du microcanal en PDMS incluant la membrane Nafion (36mm de long, 100mm de large et 15mm de haut). (d) Le mécanisme de l'effet de polarisation dans la structure conventionnelle. (e) Le mécanisme de cet effet dans la nouvelle structure permettant la circulation d'un flux additionnel au dessus de la membrane Nafion. La longueur de la zone de dépletion augmente au cours du temps. (f) Vue au microscope du système complet de préconcentration pour les immunotests. (g) Courbe d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration de la CRP. Avec le nouveau dispositif (courbe rouge) on a concentration donc augmentation de l'intensité de fluorescence. [100]

6.3 Utilisation de la méthode pour les immunoessais

6.3.1 Définition d'un immunoessai

Les immunoessais, qui exploitent la sensibilité et la spécificité des interactions anticorps-antigène, sont utilisés pour la quantification de protéines et de

petites molécules dans de nombreux domaines, tels que le diagnostic médical, la protéomique (autrement dit l'étude d'une cellule, d'un organite, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme à un moment donné et sous des conditions données), la recherche pharmaceutique ou biologique... Le tout premier immunoessai a été développé dans les années 50 par Rosalyn Sussman Yalow et Solomon Berson, mais ce n'est qu'à la fin des années 60 que cette technique est devenue plus populaire et plus simple à utiliser grâce à la découverte de méthodes permettant de lier chimiquement les enzymes aux anticorps.

Les immunoessais peuvent se classer en deux catégories principales selon qu'ils soient homogènes ou hétérogènes. Dans les immunoessais hétérogènes, les anticorps sont immobilisés sur un support solide et interagissent avec l'antigène au niveau de la couche limite. Dans ce cas là, les anticorps non liés et les autres réactifs peuvent facilement être éliminés. Dans le cas des immunoessais homogènes, les anticorps et les antigènes interagissent en solution. Les anticorps liés et non liés sont alors discriminés grâce aux changements physiques ou chimiques provoqués par la réaction de liaison. On peut aussi encore diviser ces immunoessais (hétérogènes et homogènes) en deux modes : le mode compétitif et le mode non-compétitif. Dans le premier cas, les antigènes cibles de l'échantillon sont en compétition avec des antigènes exogènes marqués pour un nombre limité de sites de liaison sur l'anticorps. Le signal généré est alors inversement proportionnel à la concentration d'antigène. Dans le second cas, les antigènes sont capturés par un excès d'anticorps et sont détectés après la liaison ultérieure d'une deuxième série d'anticorps marqués qui se lient à l'antigène sur un site différent. Ces immunoessais, dits immunoessais "sandwich", produisent cette fois-ci un signal proportionnel à la concentration d'antigène. On utilisera le mode compétitif dans le cas de petits antigènes limités en nombre de sites de liaison tandis que le mode non compétitif sera adapté pour les antigènes ayant plus d'un site de liaison (typiquement des analytes > 1000 Da).

Dans la plupart des immunoessais, on retrouve de nombreuses étapes de nettoyage, mélange et incubation qui sont très coûteuses en termes de travail et de temps puisqu'elles peuvent prendre de plusieurs heures, à plus de deux jours pour un seul essai. En fait, l'immunoréaction en elle-même est assez rapide, mais, ce qui prend le plus de temps, c'est le temps d'incubation dû au transport de masse inefficace des immunoagents, qui migrent de la solution à la surface où s'effectue la liaison. En plus de ça, les immunoagents utilisés sont relativement chers. Or, la consommation de ces agents peut être extrêmement réduite si le système est miniaturisé. C'est la raison pour laquelle il y a aujourd'hui une grande demande pour le développement de plateformes d'immunoessais automatisées et miniaturisées. Une telle plateforme doit être capable de simplifier les procédures, réduire les temps de test et la consommation d'échantillon tout en améliorant l'efficacité de réaction. Il semble donc tout à fait perspicace de mener de plus larges investigations sur les plateformes microfluidiques puisque celles-ci remplissent ces critères, comme on l'a évoqué précédemment.

Dans ce contexte, de nombreuses recherches ont d'ores et déjà été faites et ont donné naissance à un marché en forte expansion ces dernières années : celui des biopuces. Les puces à ADN sont les plus développées et sont aujourd'hui commercialisées. La plupart d'entre elles repose sur une détection optique par fluorescence. Pour résumer, des brins d'ADN sont fixés sur un support solide (du verre le plus souvent) et l'ADN cible complémentaire est marqué avec un fluorophore. L'hybridation de l'ADN cible sur la puce est détectée, après des opérations de lavage et séchage de la puce, grâce au signal de fluorescence émis par ce fluorophore. Il existe aussi un autre type de biopuces, les puces à protéines, mais celles-ci sont autrement plus délicates à mettre au point. Les protéines sont beaucoup moins simples à manipuler que les oligonucléotides, d'une part à cause de leur grande variabilité, et d'autre part à cause de leur très grande sensibilité aux conditions du milieu dans lequel elles sont (pH, salinité, température etc) qui peuvent causer la perte de leur activité voir inhiber l'interaction avec la sonde choisie. De plus, contrairement aux puces à ADN, une grande majorité des puces à protéines doit être conservée en solution afin de maintenir l'activité enzymatique ou de reconnaissance des protéines immobilisées.

6.3.2 Intéraction antigène-anticorps

Les essais immunologiques sont donc basés sur la réaction spécifique entre un antigène et un anticorps (biomolécules impliquées dans le système immunitaire) pour la détection et la quantification d'antigènes. Les essais immunologiques constituent une des méthodes les plus communes en chimie bioanalytique pour le diagnostic et le contrôle des maladies.

Les anticorps (Ab) sont des glycoprotéines (masse moléculaire de 150kDa) dont la synthèse est déclenchée dans l'organisme par injection d'un antigène (c'est le produit d'une réponse immunitaire). Ils sont bivalents, c'est-à-dire qu'ils contiennent deux sites de liaison identiques par molécule. Les antigènes (Ag) sont, quant à eux, des substances (masse moléculaire > 1 kDa) dont l'injection provoque la synthèse, par l'organisme, d'anticorps spécifiques. Les anticorps et les antigènes contiennent des sites de reconnaissance moléculaire, appelés respectivement **paratope** et **épitope**. Un anticorps réagit spécifiquement avec un antigène complémentaire pour former un complexe Ab-Ag. L'affinité d'un anticorps pour son antigène est très élevée et il y a liaison, même à des concentrations très faibles. Ceci explique la sensibilité élevée des essais immunologiques. Des limites de détection de l'ordre du femtomolaire (10^{-15} mol) peuvent être atteintes pour certains essais.

On peut identifier deux types d'anticorps, à savoir les anticorps polyclonaux et les anticorps monoclonaux. Les premiers sont des mélanges complexes d'anticorps isolés du sérum sanguin qui reconnaissent une série d'épitopes différents. Ils possèdent une large gamme de sélectivité et affinité ce qui peut donner lieu à des

réactivités croisées ou à des interférences dans un essai immunologique. Les monoclonaux, quant à eux, sont des anticorps spécifiques qui se lient à un épitope particulier. Ils possèdent, du coup, des propriétés plus reproductibles et représentent les anticorps de choix pour les essais analytiques. De la même manière, il existe deux types d'antigènes : les antigènes complets, qui peuvent induire une réaction immunitaire par eux-mêmes, et les antigènes incomplets (ou haptènes) qui sont des molécules de plus faible masse moléculaire et qui ne le peuvent pas. C'est lorsqu'ils sont attachés à une protéine telle que l'albumine (on parle alors de transporteur protéique) qu'ils peuvent stimuler la production d'anticorps spécifiques. Par contre, une fois produits, les anticorps anti-haptène reconnaîtront l'haptène même sans le transporteur protéique.

Un immunocomplexe est formé entre un anticorps et un antigène ayant des paratopes et épitopes assortis. La formation du complexe antigène-anticorps est réversible et implique de nombreuses interactions non-covalentes (et relativement faibles) de types électrostatique, hydrophobe, van der Waals et pont hydrogène. La stabilité de toutes ces liaisons non covalentes est influencée par les conditions physico-chimiques du milieu. Elle est diminuée par l'augmentation de la température, de la force ionique, de l'osmolarité et l'abaissement ou l'augmentation du pH. Toutes ces modifications sont des conditions qui permettent de dissocier les complexes antigène-anticorps. Toute interaction anticorps-antigène débute par une interaction primaire impliquant la reconnaissance spécifique et la liaison de l'épitope antigénique au paratope de l'anticorps correspondant. L'interaction primaire est rapide (de l'ordre du milliseconde) et macroscopiquement invisible. Des réactions secondaires anticorps-antigène, résultant d'antigènes multivalents, produisent de l'agglutination ou précipitation d'un réseau polymérique antigène-anticorps. Un produit visible est formé sur un temps allant de quelques minutes à quelques heures.

6.3.3 Structure MNM : un outil de diagnostic pour les immunoessais

Maintenant que l'on a défini l'interaction antigène-anticorps ayant lieu dans un immunoessai, il est aisé de comprendre notre volonté d'utiliser la méthode de préconcentration sélective à travers une structure MNM pour envisager un outil de diagnostic rapide, fiable et simple à mettre en œuvre. Chez un patient malade (patient A), des anticorps sont sécrétés en réponse à l'infection dont il souffre (c'est-à-dire en réponse à la présence d'antigènes). Le sang d'un individu malade est donc composé d'antigènes, d'anticorps et de complexes antigène-anticorps. Le sang d'un patient sain (patient B), par contre, ne possédant pas d'antigènes, sera exempt d'anticorps. Ainsi, si l'on prélève un peu de sang en provenance des deux patients, que l'on mélange ces échantillons à une solution contenant l'antigène recherché marqué en fluorescence, et que l'on effectue sur ces échantillons une expérience de préconcentration sélective, comme on l'a décrite tout au long de ce

manuscrit, on pourrait obtenir deux résultats différents, signature ou non de la maladie (Figure 6.9) :

- Le sang du patient A malade, ayant secrété des anticorps de par son infection, réagira avec l’antigène marqué en fluorescence ajouté à l’échantillon brut. On aura alors formation d’un complexe fluorescent antigène-anticorps en plus de la présence de l’antigène fluorescent seul qui n’aura pas réagi. Ce complexe sera plus gros que l’antigène seul donc sa mobilité électrophorétique sera plus faible. L’idée serait alors d’étalonner, en champ électrique et en pression, une puce fluide de structure MNM afin de préconcentrer à deux endroits différents l’antigène seul et le complexe antigène-anticorps. L’antigène fluorescent que l’on ajoute pourra être étudié dans la structure de manière à trouver des paramètres permettant de le préconcentrer cathodiquement. Lorsque le complexe se forme, le flux électrophorétique deviendra moindre et l’on passera alors à un régime anodique. Ainsi, on observera deux fronts de préconcentration correspondant à ces deux entités.
- Le sang du patient B sain, quant à lui, n’a pas nécessité la sécrétion d’anticorps. Lors de l’expérience, il y aura donc présence uniquement de l’antigène fluorescent ajouté. On observera alors un seul front de préconcentration cathodique.

Ce genre d’immunoessai est donc un test que nous souhaiterions réellement faire avec nos puces fluidiques. Pour ce faire, la Direction Générale de l’Armement (DGA), avec qui nous travaillons, nous a fourni de l’ovalbumine (antigène) ainsi que plusieurs anticorps marqués en fluorescence de cet immunogène (polyclonaux ou monoclonaux, provenant de différents animaux). Au moment de l’écriture de ce manuscrit, des protocoles sont mis en place pour réaliser ces tests immunologiques.

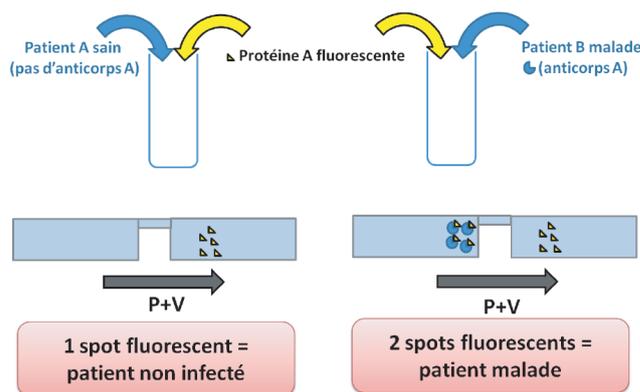


FIGURE 6.9 – Schéma principe de l’utilisation d’une structure MNM comme immunoessai. Un antigène fluorescent A est ajouté aux échantillons de sang de deux patients, l’un malade et l’autre sain. Lorsque le patient est malade, il y a formation du complexe antigène-anticorps et donc présence de deux spots fluorescents correspondant à l’antigène seul et au complexe. Dans le cas d’un patient sain, il n’y a présence que de l’antigène fluorescent seul donc un seul pic de fluorescence [58].

Conclusion générale

Le chapitre I a permis d'introduire le concept de microfluidique et de laboratoires sur puce. A l'instar de la microélectronique, la microfluidique connaît un essor considérable et est en passe de devenir LA technologie permettant des analyses fiables, rapides et bon marché d'échantillons bruts (sang, air, eau, agroalimentaire...). Que ce soit dans un but médical à travers des outils de diagnostic, environnemental par le contrôle de la qualité de l'eau par exemple ou encore de défense avec la surveillance continue de zones à risques, le développement de laboratoires sur puce est à son apogée. Nous avons vu qu'en l'occurrence, c'est ce dernier domaine qui intéresse la Direction Générale de l'Armement (DGA) dans l'optique de créer un dispositif miniaturisé permettant de prévenir la menace biologique terroriste.

Le chapitre II a introduit plus précisément le but de ce travail de thèse en montrant que, dans ces laboratoires sur puce, l'une des étapes primordiales de tout diagnostic, quel qu'il soit, était le prétraitement de l'échantillon avant identification. Ainsi, pour parvenir à détecter, identifier et quantifier facilement un agent pathogène, deux étapes clés sont nécessaires : la séparation et la préconcentration des analytes recherchés. Pour réaliser ces deux phases de traitement de l'échantillon en une seule étape, la technique d'électrophorèse capillaire a été exploitée dans une structure particulière contenant une restriction, un nanocanal, au centre d'un microcanal droit. Les flux mis en jeu dans cette technique ont été introduits et ont montré que cette structure, appelée MNM (pour Micro/Nano/Micro), est à l'origine d'un phénomène de concentration de polarisation sous champ électrique qui permet l'existence de 4 régimes de préconcentration. Afin de séparer un mélange complexe d'analytes, il est nécessaire que la préconcentration soit sélective, c'est-à-dire que l'on puisse choisir le régime de préconcentration obtenu. Pour ce faire, l'idée de départ de ce travail était d'ajouter un flux additionnel, à travers une pression hydrodynamique externe, capable de moduler l'endroit de préconcentration. Un mécanisme a été proposé à la fin de ce chapitre pour prévoir les différents comportements possibles.

Le chapitre III était réservé à la mise en place expérimentale de cette étude. Dans un premier temps, le procédé complet de fabrication des puces utilisées a été décrit. Ces puces, "tout en verre" se sont avérées relativement complexes à fabriquer mais présentaient l'avantage d'être robustes, biocompatibles et adaptées aux expériences visées. Le banc expérimental automatisé utilisé pour les expériences

de préconcentration sur ces puces a, par la suite, été détaillé. Les équipements, le protocole de lancement des expériences ainsi que le traitement des données ont été passés en revue et ont permis de mieux appréhender le déroulement d'une expérience de préconcentration.

Le chapitre IV a débuté l'étude expérimentale à proprement parler à travers l'utilisation du banc précédemment décrit pour l'électropréconcentration d'un analyte couramment étudié : la fluorescéine. Nous avons, tout d'abord, étudié dans ce chapitre l'électropréconcentration classique, par application d'un champ électrique uniquement, de ce dianion et, plus précisément, l'influence de la force ionique sur les résultats obtenus. Nous avons alors vu que le régime cathodique obtenu variait, tant en termes de taux de préconcentration que de localisation du front, selon cette force ionique. Dans un second temps, nous avons étudié l'électropréconcentration assistée en pression de la fluorescéine. Cela nous a permis de voir que l'ajout d'une pression cathodique permettait de stabiliser le front de préconcentration et d'améliorer les résultats.

Le chapitre V s'est ensuite concentré sur l'électropréconcentration assistée en pression d'une autre molécule, la BSA (Bovin Serum Albumin). Il a donné la preuve de l'efficacité de notre méthode de préconcentration sélective en prouvant que, par l'ajout d'une pression adéquate, nous avons été capable de préconcentrer la BSA dans un régime non conventionnel (par rapport à ses caractéristiques intrinsèques) à savoir un régime cathodique. Tout comme pour la fluorescéine, l'ajout d'une pression a permis de stabiliser les fronts de préconcentration mais aussi de changer de régime. On a alors vu que chacun des régimes obtenus étaient dépendants de trois paramètres : le temps, le champ électrique et la pression. Ce chapitre s'est finalement terminé sur les limites de la méthode et les problèmes rencontrés, en particulier le souci de répétabilité des résultats.

Le chapitre VI a clôturé ce travail par la présentation de différentes perspectives quant à la suite possible du sujet. Ainsi, il serait possible d'étudier plus précisément les dimensions du nanocanal mais aussi de le remplacer par d'autres stratégies comme une membrane Nafion ou encore des électrodes polarisables. Tous ces dispositifs de préconcentration sélective pourraient finalement être utilisés dans l'optique de réaliser un immunoessai, outil de diagnostic fiable et rapide.

Cette thèse s'achève donc sur des résultats encourageants et une quantité d'études possibles. Elle a mis en évidence la possibilité de contrôler efficacement les propriétés de préconcentration d'un analyte via une technique d'électropréconcentration sélective modulée en pression. L'optimisation de cette technique doit, bien sûr, être poursuivie mais c'est un premier pas dans la création de systèmes préconcentrateur/séparateur efficaces. D'un point de vue personnel, ces trois années m'ont permis d'acquérir savoir-faire, organisation et méthode, grâce à l'utilisation d'outils dédiés et au suivi d'une étude complète menée du début à la fin. Cette expérience sera, j'en suis convaincue, une arme de plus pour affronter ce qui m'attend.

Annexe A

Systèmes macroscopiques actuels pour la détection de la menace biologique

Comme on l'a évoqué dans le premier chapitre de ce manuscrit de thèse, les systèmes macroscopiques existants pour la détection de menaces biologiques sont généralement composés de quatre parties que sont le déclencheur, le collecteur, le détecteur et l'élément d'identification. Une agence américaine à passer en revue, et dans les moindres détails, tous les systèmes actuellement aboutis [50]. Nous allons ici détailler chacun des éléments composants ce genre de systèmes et donner quelques exemples de produits finis commercialisés ou, tout du moins, utilisés en conditions réelles.

A.1 Eléments déclencheurs : compteurs de particules et indicateurs de biomasse

L'élément déclencheur est la première étape de la détection. Il fournit une information sur l'air, continuellement surveillé, sans pour autant nécessiter de consommables, donc en gardant une charge logistique faible. Typiquement, le déclencheur est un compteur de particules ou un indicateur de biomasse qui permet de déterminer si la taille, le nombre, ou les propriétés des particules recueillies suggèrent la présence d'agents du bioterrorisme. Cette approche est donc particulièrement adaptée en ce qui concerne les prélèvements systématiques effectués pour prévenir les attaques terroristes dans les zones publiques à risques.

Pour réduire les faux positifs et les faux négatifs, beaucoup de systèmes de détection combinent un élément déclencheur avec un second élément détecteur (tel que la fluorescence qui fournit une plus grande sélectivité) en une seule technologie, dite de repérage. Des technologies de repérage plus efficaces peuvent détecter des particules présentes dans l'air en temps quasi réel et différencier des particules biologiques d'autres particules évitant ainsi une activation inutile du reste du système.

Pour fonctionner, les compteurs de particules et les indicateurs de la biomasse utilisent divers méthodes. Parmi elles, on retrouve principalement la cytométrie en flux et la technologie des biocapteurs.

La cytométrie en flux (CMF) :

La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules, à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, en les comptant et en les caractérisant. C'est la lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) qui permet de classer la population suivant plusieurs critères et de les trier. En mesurant la fluorescence et la lumière diffuse de l'échantillon, les cytomètres en flux évaluent de nombreuses caractéristiques cellulaires, notamment la taille des cellules, la quantité d'ADN, la présence de séquences nucléotidiques spécifiques et de protéines cellulaires.

Dans une expérience menée au laboratoire national de Los Alamos qui compare la capacité de la cytométrie en flux et de l'électrophorèse sur gel pour mesurer l'ADN bactérien, la cytométrie en flux est environ 200.000 fois plus sensible que l'électrophorèse sur gel (capable de détecter du picogramme d'ADN) et le fait en 10 minutes contre 24 heures pour l'électrophorèse sur gel [105].

La technologie des biocapteurs :

Les biocapteurs utilisent des données provenant d'organismes vivants afin d'évaluer la potentielle toxicité d'échantillons de l'environnement. Par exemple, les canaris étaient traditionnellement utilisés dans les mines de charbon afin de détecter des niveaux toxiques de gaz méthane et, plus récemment, en tant qu'agent de détection neurotoxique dans le raid policier de 1995 au Japon contre la secte Aum Shinrikyo. De même, des poissons ont été utilisés pour surveiller la qualité de l'eau. A plus petite échelle, des données provenant d'enregistrements extracellulaires de types de cellules excitables (telles que les neurones et les cardiomyocytes) ont été évaluées pour leurs réactions physiologiques aux toxines.

Actuellement, la recherche se porte sur la production de cytokines par les cellules immunitaires utilisées comme biocapteurs pour les antigènes. Des problèmes techniques, liés au milieu nutritif nécessaire pour maintenir en vie les biocapteurs, ont empêché les biocapteurs à base de cellules d'être largement utilisables, mais ces capteurs peuvent devenir un élément précieux de l'arsenal de détection futur, en particulier pour la détection des toxines et des agents chimiques.

L'agence américaine a relevé 14 compteurs de particules ou indicateurs de biomasse : 1 compteur de particules commercial (Met One Aerocet 531 Mass/Particle Counter) et 3 indicateurs de biomasse commerciaux (Digital Smell/Electronic Nose, Ameba Biosensor et Spreet), ainsi que 10 systèmes qui sont actuellement en

cours de développement ou limités à une utilisation militaire.

Les systèmes varient largement en terme de taille : certains, comme le Met One Aerocet 531 Mass/Particle Counter, sont conçus pour être utilisés dans la surveillance de salles blanches et sont de la taille d'une grande calculatrice de poche, d'autres pèsent 10 kilogrammes mais peuvent encore être facilement portés par un seule personne. En revanche, plusieurs systèmes militaires sont conçus pour être montés sur un navire ou véhicule à moteur. Les limites de taille des particules qui peuvent être comptées par ces systèmes varient entre 0,3 et 20 μ m.

Il est aussi important pour ces systèmes qu'ils :

- soient situés à proximité des systèmes de collecte afin que les échantillons recueillis puissent être systématiquement et rapidement testés
- aient la capacité de transmettre rapidement les résultats au responsable (situés souvent loin du dispositif) qui peut, soit faire des tests supplémentaires sur l'échantillon pour l'identification spécifique de l'organisme du bioterrorisme, soit prendre des mesures pour limiter l'exposition supplémentaire à l'aérosol suspect ou à l'environnement contaminé

A.2 Systèmes de collecte

Si le déclencheur émet une réponse positive, il initie le système et un système de collecte se met alors en route. L'échantillonnage de l'agent biologique est une étape cruciale du système complet d'identification. Les systèmes de collecte sont utilisés pour prélever des échantillons provenant de l'environnement (air, eau, particules de surfaces suspectes...) ou d'un patient (ou un animal) pour une identification ultérieure. Il se doit de ne pas détériorer l'échantillon prélevé et d'être portable. La plupart des systèmes existants prélève des particules en suspension sur des filtres. Cependant, lorsque les systèmes d'identification utilisés par la suite exigent un échantillon liquide, le système de collecte doit prélever un échantillon sous forme d'aérosol ou de particules et le transformer sous forme liquide.

Pour certains agents, la dose effective est extrêmement faible ce qui nécessite l'emploi d'appareils collecteurs à très haute efficacité.

Deux conditions doivent être remplies pour que les systèmes de collecte soient le plus utile aux premiers intervenants, cliniciens ou travailleurs de la santé publique, en cas d'attaque terroriste :

- Le système de collecte doit être utilisé dans la zone infectée. Dans le cas d'une attaque non prévue, ce n'est possible que s'il est déjà en place dans les zones à risques (aéroports, métro, stades...). Dans le cas d'une attaque prévue, ces systèmes doivent être assez portables pour qu'ils puissent être amenés par les premiers intervenants à l'endroit de l'attaque suspectée et

qu'ils puissent collecter des échantillons d'environnement viables.

- Les collecteurs doivent avoir un débit suffisamment élevé et l'efficacité de collecte doit permettre de recueillir des agents du bioterrorisme aérosolisés s'ils existent.

Il existe aujourd'hui sur le marché 4 systèmes autonomes disponibles, aux dimensions macroscopiques (voir Figure A.1) : Smart Air Sampler System 2000 Plus Chem-Bio Air (SASS), BioCapture, SpinCon, et Portable High-Throughput Liquid Aerosol Air Sampler System (PHTLAAS). Ils peuvent être utilisés dans des cadres de santé publique, de services d'incendie, de surveillance continue des zones à haut risque (bâtiments publics, aéroports...), de salles blanches ou encore à destination d'équipes spécialisées en matériaux dangereux.

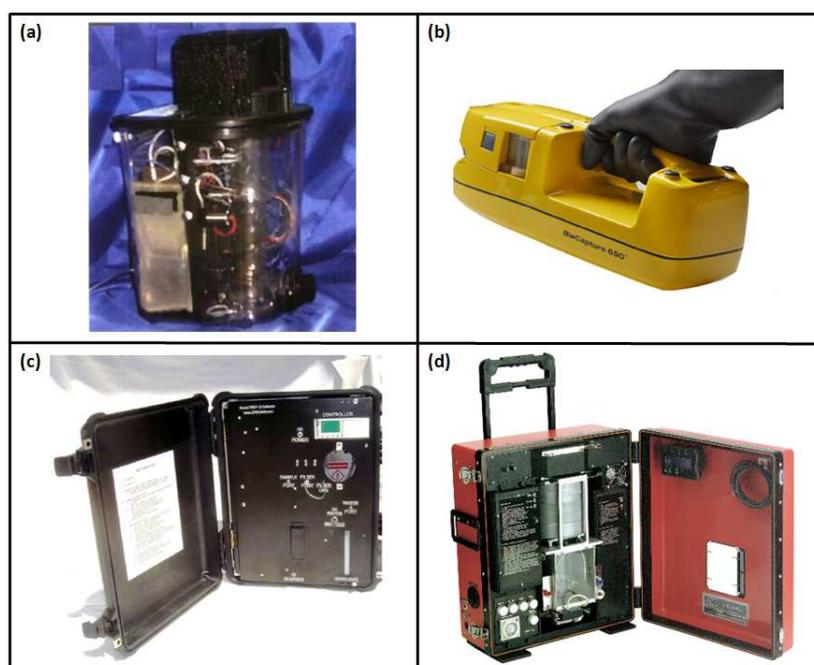


FIGURE A.1 – Photos des 4 systèmes de collecte commerciaux existants a) Smart Air Sampler System 2000 Plus Chem-Bio Air (SASS), b) BioCapture, c) SpinCon et d) Portable High-Throughput Liquid Aerosol Air Sampler System (PHTLAAS).

A.3 Systèmes d'identification

Une fois collecté, l'échantillon biologique se doit d'être analysé et identifié afin de connaître le risque encouru et de déterminer la marche à suivre pour les personnes exposées. C'est là qu'intervient le système d'identification de l'agent biologique collecté. En général, les systèmes sont limités à une série d'agents

présélectionnés et ne peuvent pas identifier d'autres agents sans l'ajout de nouveaux équipements chimiques ou sans une reprogrammation.

Encore une fois, il existe plusieurs techniques d'identification dont trois méthodes principales.

Les méthodes à base d'anticorps :

Les systèmes à base d'anticorps utilisent des anticorps développés à reconnaître des cibles spécifiques sur les antigènes ou les cellules d'intérêt pour détecter de potentiels agents pathogènes. L'utilisation d'anticorps confère à cette technique une haute spécificité et les seuils de détection varient entre 10^3 à 10^4 cellules microbiennes par millilitre. Cependant, ces systèmes posent aussi des problèmes techniques à savoir, entre autres, des liaisons non spécifiques (qui conduisent à de nombreux résultats faussement positifs, souvent attribués à la contamination des sols), une réactivité croisée et la dégradation de l'anticorps avec le temps (qui peut conduire à des résultats faussement négatifs). La disponibilité des anticorps est aussi un facteur limitant ainsi que le fait qu'ils testent tous un seul agent par essai. Malgré ces problèmes techniques, les systèmes à base d'anticorps peuvent, en plus d'être à la fois très sensibles et spécifiques, être assez petits pour être utilisés sur le terrain et les rapports suggèrent que les résultats peuvent être obtenus en 5 à 45 minutes à partir d'un test anticorps de poche.

Les méthodes à base d'acides nucléiques :

Les systèmes à base d'acides nucléiques (ou systèmes PCR) utilisent la liaison sélective entre des sondes d'acides nucléiques et les acides nucléiques complémentaires de l'agent pathogène qui nous intéresse. Les sondes sont conçues pour se lier spécifiquement à une séquence d'acide nucléique qui est unique à l'agent pathogène, ou pour identifier une séquence d'acide nucléique qui est commun à plusieurs agents pathogènes. Ces méthodes sont donc similaires aux méthodes basées sur des anticorps dans le fait qu'elles sont limitées par la disponibilité de sondes et qu'elles testent seulement un agent par essai. Par contre, contrairement aux méthodes anticorps, les systèmes existants sont conçus pour lancer plusieurs essais à la fois et ils peuvent le faire en 7 à 60 minutes. La réaction se produisant en quelques minutes, ce qui prend le plus de temps avec l'utilisation de ces systèmes est la préparation de l'échantillon et le temps nécessaire pour détecter le signal. En outre, la sensibilité de ces systèmes pour les bactéries est comprise entre 1.000 et 10.000 unités formant des colonies (UFC). Toutefois, de récents rapports suggèrent qu'ils pourraient être capables d'une plus grande sensibilité.

En ce qui concerne la taille, beaucoup de ces systèmes sont assez petits pour être portés par une seule personne même si ils restent plus gros que les systèmes à base d'anticorps.

La spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/-charge (m/z). La technique pourrait détecter des concentrations aussi basses que 10^6 cellules. Elle s'avère très utile lorsque les échantillons sont testés sur le terrain puisqu'ils sont alors susceptibles de contenir des constituants multiples (contaminants) qui doivent être séparés avant de pouvoir être identifiés de façon fiable.

Parmi ces technologies, il s'avère que certaines sont plus adaptées à des agents particuliers. Les systèmes à base d'acides nucléiques, par exemple, ne peuvent pas détecter les toxines car, à la différence des bactéries et des virus, les toxines ne contiennent pas d'acide nucléique. En revanche, la spectrométrie de masse est plus efficace pour la détection de toxines que de bactéries. Le choix de la méthode utilisée va donc dépendre de l'agent visé par le système et des caractéristiques recherchées par les utilisateurs selon l'environnement traité.

A.4 Systèmes 2 en 1 : collecte et identification en un seul dispositif

Certains systèmes sont un peu plus développés et combinent collecte et identification dans une simple unité. La plupart de ces systèmes ont été développés par l'armée et ont l'avantage d'avoir été rigoureusement évalués pour coller aux standards du département de la défense. En tout, on en compte une dizaine mais la plupart des données d'évaluation ne sont pas rendues publiques et il s'avère donc difficile d'en faire une étude un tant soit peu poussée. Cependant, ce que l'on peut en dire c'est qu'ils ont, au minimum, la taille d'un réfrigérateur et nécessitent donc des camions pour leur transport. Leur grande taille interdit leur utilisation par les premiers intervenants et les cliniciens. Toutefois, ils peuvent être intéressants pour la surveillance continue dans les espaces publics considérés comme des cibles probables (aéroports, métro, gares...).

Annexe B

Codes Matlab

Cette annexe explique le principe des différents interfaces graphiques développées sous Matlab pour l'acquisition et le traitement des données. Il serait inutile et bien trop long de détailler tous les codes pour chaque interface, mais nous donnerons ici un exemple de l'un de ces programmes (celui utilisé pour le lancement des expériences) pour donner au lecteur une idée de la partie informatique du banc expérimental.

Pour une question de visibilité, lorsque les phrases sont trop longues, elles sont coupées et un retour à la ligne est effectué et signalé par le symbole ↵

B.1 Lancement des expériences

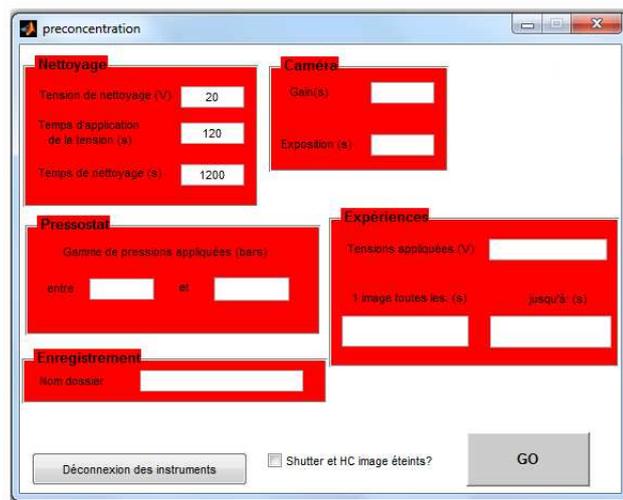


FIGURE B.1 – Interface graphique Matlab utilisée pour le lancement d'une expérience de préconcentration. L'utilisateur doit renseigner les paramètres de la caméra, les pressions et les tensions à appliquer, les intervalles de temps de prise d'images ainsi que le nom du répertoire de stockage des données enregistrées.

Cette première interface graphique (Figure B.1) permet de lancer les expériences de préconcentration qui vont se dérouler automatiquement. L'utilisateur doit renseigner plusieurs champs concernant le nettoyage préliminaire à effectuer, les paramètres de la caméra à contrôler, les pressions et les champs électriques à appliquer, le temps de l'expérience, les intervalles entre chaque image et, enfin, le nom du dossier dans lequel seront enregistrées les images acquises.

B.1.1 Code de l'interface graphique

```
function varargout = preconcentration(varargin)
% preconcentration M-file for preconcentration.fig
%     preconcentration, by itself, creates a new ⇔
%     preconcentration or raises the existing
%     singleton*.
%
%     H = preconcentration returns the handle to a new ⇔
%     preconcentration or the handle to
%     the existing singleton*.
%
%     ⇔
%     preconcentration('CALLBACK', hObject, eventData, handles, ...) ⇔
%     calls the local
%     function named CALLBACK in preconcentration.M with ⇔
%     the given input arguments.
%
%     preconcentration('Property', 'Value', ...) creates a ⇔
%     new preconcentration or raises the
%     existing singleton*. Starting from the left, ⇔
%     property value pairs are
%     applied to the GUI before preconcentration_OpeningFcn ⇔
%     gets called. An
%     unrecognized property name or invalid value makes ⇔
%     property application
%     stop. All inputs are passed to ⇔
%     preconcentration_OpeningFcn via varargin.
%
%     *See GUI Options on GUIDE's Tools menu. Choose "GUI ⇔
%     allows only one
%     instance to run (singleton)".
%
% See also: GUIDE, GUIDATA, GUIHANDLES
%
% Edit the above text to modify the response to help ⇔
%     preconcentration
%
% Last Modified by GUIDE v2.5 13-Feb-2013 16:04:57
```

```

% Begin initialization code – DO NOT EDIT
gui_Singleton = 1;
gui_State = struct('gui_Name',       mfilename, ...
                  'gui_Singleton',  gui_Singleton, ...
                  'gui_OpeningFcn', @preconcentration_OpeningFcn, ...
                  'gui_OutputFcn',  @preconcentration_OutputFcn, ...
                  'gui_LayoutFcn',  [] , ...
                  'gui_Callback',   []);
if nargin && ischar(varargin{1})
    gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
end

if nargout
    [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
else
    gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
end
% End initialization code – DO NOT EDIT

% — Executes just before preconcentration is made visible.
function preconcentration_OpeningFcn(hObject, eventdata, varargin)
    handles = varargin;
% This function has no output args, see OutputFcn.
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% varargin   command line arguments to preconcentration (see VARARGIN)

% Choose default command line output for preconcentration
handles.output = hObject;

set(handles.figure1, 'CloseRequestFcn', @closeGUI);

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% UIWAIT makes preconcentration wait for user response (see UIRESUME)
% uiwait(handles.figure1);

mickey = imread('Mickey.jpg');
```

```
axes(handles.axes2)
image(mickey)
axis off;

% — Outputs from this function are returned to the command ↔
% line.
function varargout = preconcentration_OutputFcn(hObject, ↔
    eventdata, handles)
% varargout cell array for returning output args (see ↔
% VARARGOUT);
% hObject handle to figure
% eventdata reserved – to be defined in a future version of ↔
% MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Get default command line output from handles structure
varargout{1} = handles.output;

function outputDirectory_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to outputDirectory (see GCBO)
% eventdata reserved – to be defined in a future version of ↔
% MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of ↔
% outputDirectory as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents ↔
% of outputDirectory as a double

outputDirectory = get(hObject,'String');

% — Executes during object creation, after setting all ↔
% properties.
function outputDirectory_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to outputDirectory (see GCBO)
% eventdata reserved – to be defined in a future version of ↔
% MATLAB
% handles empty – handles not created until after all ↔
% CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on ↔
% Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), ↔
    get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
```

```

    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
end

function gainvect_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to gainvect (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject, 'String') returns contents of gainvect ↵
%         as text
%         str2double(get(hObject, 'String')) returns contents ↵
%         of gainvect as a double

% — Executes during object creation, after setting all ↵
%         properties.
function gainvect_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to gainvect (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    empty – handles not created until after all ↵
%           CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on ↵
%         Windows.
%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject, 'BackgroundColor'), ↵
    get(0, 'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
end

function exposure_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to exposure (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject, 'String') returns contents of exposure ↵
%         as text
%         str2double(get(hObject, 'String')) returns contents ↵
%         of exposure as a double

```

```
% — Executes during object creation, after setting all ↔
    properties.
function exposure_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to exposure (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↔
    MATLAB
% handles    empty – handles not created until after all ↔
    CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on ↔
    Windows.
%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject, 'BackgroundColor'), ↔
    get(0, 'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
end

function p1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to p1 (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↔
    MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject, 'String') returns contents of p1 as text
%         str2double(get(hObject, 'String')) returns contents ↔
    of p1 as a double

% — Executes during object creation, after setting all ↔
    properties.
function p1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to p1 (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↔
    MATLAB
% handles    empty – handles not created until after all ↔
    CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on ↔
    Windows.
%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject, 'BackgroundColor'), ↔
    get(0, 'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
```

end

```
% — Executes on selection change in popupmenu1.
function popupmenu1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to popupmenu1 (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: contents = cellstr(get(hObject,'String')) returns ↵
%        popupmenu1 contents as cell array
%        contents{get(hObject,'Value')} returns selected ↵
%        item from popupmenu1

% — Executes during object creation, after setting all ↵
%        properties.
function popupmenu1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to popupmenu1 (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    empty – handles not created until after all ↵
%           CreateFcns called

% Hint: popupmenu controls usually have a white background ↵
%        on Windows.
%        See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject, 'BackgroundColor'), ↵
get(0, 'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
end
```

```
function voltageexp_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to voltageexp (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of ↵
%        voltageexp as text
%        str2double(get(hObject,'String')) returns contents ↵
%        of voltageexp as a double
```

```
% — Executes during object creation , after setting all ⇔
properties.
function voltageexp_CreateFcn(hObject , eventdata , handles)
% hObject    handle to voltageexp (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ⇔
MATLAB
% handles    empty – handles not created until after all ⇔
CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on ⇔
Windows.
%          See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject , 'BackgroundColor' ) , ⇔
get(0 , 'defaultUicontrolBackgroundColor' ))
    set(hObject , 'BackgroundColor' , 'white' );
end

function timeclean_Callback(hObject , eventdata , handles)
% hObject    handle to timeclean (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ⇔
MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject , 'String' ) returns contents of timeclean ⇔
as text
%          str2double(get(hObject , 'String' )) returns contents ⇔
of timeclean as a double

% — Executes during object creation , after setting all ⇔
properties.
function timeclean_CreateFcn(hObject , eventdata , handles)
% hObject    handle to timeclean (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ⇔
MATLAB
% handles    empty – handles not created until after all ⇔
CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on ⇔
Windows.
%          See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject , 'BackgroundColor' ) , ⇔
get(0 , 'defaultUicontrolBackgroundColor' ))
```

```

    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
end

function voltageclean_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to voltageclean (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject, 'String') returns contents of ↵
%       voltageclean as text
%       str2double(get(hObject, 'String')) returns contents ↵
%       of voltageclean as a double

% — Executes during object creation, after setting all ↵
%       properties.
function voltageclean_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to voltageclean (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all ↵
%           CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on ↵
%       Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject, 'BackgroundColor'), ↵
    get(0, 'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
end

function timebreak_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to timebreak (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject, 'String') returns contents of timebreak ↵
%       as text
%       str2double(get(hObject, 'String')) returns contents ↵
%       of timebreak as a double

```

```
% — Executes during object creation, after setting all ↔
    properties.
function timebreak_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to timebreak (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↔
    MATLAB
% handles    empty – handles not created until after all ↔
    CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on ↔
    Windows.
%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject, 'BackgroundColor'), ↔
    get(0, 'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
end

function tpsmanip1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to tpsmanip1 (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↔
    MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject, 'String') returns contents of tpsmanip1 ↔
    as text
%         str2double(get(hObject, 'String')) returns contents ↔
    of tpsmanip1 as a double

% — Executes during object creation, after setting all ↔
    properties.
function tpsmanip1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to tpsmanip1 (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↔
    MATLAB
% handles    empty – handles not created until after all ↔
    CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on ↔
    Windows.
%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject, 'BackgroundColor'), ↔
    get(0, 'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
```

end

```
function tpsmanip2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to tpsmanip2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of tpsmanip2 ↵
%       as text
%       str2double(get(hObject,'String')) returns contents ↵
%       of tpsmanip2 as a double
```

```
% — Executes during object creation, after setting all ↵
%       properties.
```

```
function tpsmanip2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to tpsmanip2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all ↵
%           CreateFcns called
```

```
% Hint: edit controls usually have a white background on ↵
%       Windows.
```

```
%       See ISPC and COMPUTER.
```

```
if ispc && isequal(get(hObject, 'BackgroundColor'), ↵
get(0, 'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
end
```

end

```
% — Executes on button press in checkbox1.
```

```
function checkbox1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to checkbox1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of ↵
%           MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
```

```
% Hint: get(hObject,'Value') returns toggle state of checkbox1
```

```
% — Executes on button press in instruout.
```

```
function instruout_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to instruout (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of ↵
```

```
MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)

% on va creer une boite de confirmation pour etre sur de ⇐
    bien vouloir
% deconnecter les instru

% Get the current position of the GUI from the handles ⇐
    structure
% to pass to the modal dialog.
pos_size = get(handles.figure1, 'Position');
% Call modaldlg with the argument 'Position'.
user_response = modaldlg('Title', 'Confirm deconnexion');
switch user_response
case { 'No' }
    % take no action
case 'Yes'
    % si on clique sur 'YES' alors on deconnecte ⇐
    tout
        instrumentList = instrfind;      % on cherche les ports ⇐
            GPIB et series
        nInstr = size(instrumentList,2);    % on recupere le ⇐
            nombre de ces ports ouverts

        % on va alors fermer et supprimer tous ces ports pour ⇐
            eviter une erreur si on relance la GUI
        for i = 1:nInstr
        fclose( instrumentList(i) )
        delete( instrumentList(i))
        end

        cameraList = imaqfind;          % on fait la meme chose pour ⇐
            la camera
        nCamera = size(cameraList,2);
        for i = 1:nCamera
            delete( cameraList(i))
        end
disp('tous les intruments sont maintenant deconnectes')
end

% — Executes on button press in go.
function go_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to go (see GCBO)
% eventdata    reserved – to be defined in a future version of ⇐
MATLAB
```

```

% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)

% verification pour ne pas avoir d'erreur en ayant laisse le ⇐
shutter ou HC image ouverts
verif = get(handles.checkbox1, 'Value')
if verif==0
msgbox('ATTENTION: pour que la manip se lance ⇐
correctement il faut eteindre le shutter et HC ⇐
image!!!!')
else
set(hObject, 'BackgroundColor', 'green'); % on met le ⇐
bouton GO en vert quand une manip est en cours

% si tout est bon on lance l'initialisation de nos ⇐
appareils et on recupere toutes les donnees ⇐
entrees par l'utilisateur

[keithsource, keithswitch, vid, shutter, parport, press]=init();

gainvect = str2num (get(handles.gainvect, 'String'))
tpsmanip1 = str2num (get(handles.tpsmanip1, 'String'))
tpsmanip2 = str2num (get(handles.tpsmanip2, 'String'))
exposure = str2num (get(handles.exposure, 'String'))
pressure = str2num (get(handles.p1, 'String'))
voltageexp = str2num (get(handles.voltageexp, 'String'))
timeclean = str2num (get(handles.timeclean, 'String'))
voltageclean = str2num ⇐
(get(handles.voltageclean, 'String'))
timebreak = str2num (get(handles.timebreak, 'String'))
outputDirectory = get(handles.outputDirectory, 'String')
flux = get(handles.popupmenu1, 'Value') - 1

% Une fois qu'on a recupere nos donnees, on appelle ⇐
la fonction manips

manips(voltageclean, timebreak, gainvect, ⇐
voltageexp, flux, pressure, exposure, timeclean, ⇐
tpsmanip1, tpsmanip2, outputDirectory, ⇐
keithsource, keithswitch, vid, shutter, parport, ⇐
press);

set(hObject, 'BackgroundColor', [.8 .8 .8]); % on ⇐
remet le bouton en gris a la fin de la manip

fclose(keithsource);
fclose(keithswitch);
fclose(shutter);

```

end

```
function closeGUI(src, evnt)
%src is the handle of the object generating the callback ⇔
    (the source of the event)
%evnt is the The event data structure (can be empty for some ⇔
    callbacks)

% cette fonction va servir a deconnecter tous les ⇔
    instruments et fermer la
% figure quand on fermera la GUI. C'est quasiment la meme ⇔
    que celle du
% bouton "deconnexion des instruments"

instrumentList = instrfind;
nInstr = size(instrumentList, 2);

for i = 1:nInstr
    fclose( instrumentList(i) )
    delete( instrumentList(i) )
end

cameraList = imaqfind;
nCamera = size(cameraList, 2);
for i = 1:nCamera
    delete( cameraList(i) )
end

disp('Tous les intruments sont maintenant deconnectes')
%ferme la figure de la GUI
delete(gcf)
```

```
function p2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to p2 (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ⇔
    MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject, 'String') returns contents of p2 as text
%        str2double(get(hObject, 'String')) returns contents ⇔
    of p2 as a double
```

```

% — Executes during object creation, after setting all ↔
% properties.
function p2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to p2 (see GCBO)
% eventdata  reserved – to be defined in a future version of ↔
%           MATLAB
% handles    empty – handles not created until after all ↔
%           CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on ↔
%       Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject, 'BackgroundColor'), ↔
get(0, 'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
end

```

B.1.2 Fonction appelée par l'interface graphique

```

function [backtime, gainvect] = manip(voltageclean, ↔
timebreak, gainvect, voltageexp, flux, pressure, exposure, ↔
timeclean, tpsmanip1, tpsmanip2, outputDirectory, ↔
keithsource, keithswitch, vid, shutter, parport, press);

nb_gain = length(gainvect); % le nombre de gains imposes est ↔
% egal a la taille de la matrice gainvect
exposurePause = exposure + 0.1; %en secondes, ↔
% probablement temps pour que la camera ecrive les data sur ↔
% le disque
nb_voltage = length(voltageexp); % le nombre de voltages ↔
% imposes est egal a la taille de la matrice voltage
nb_pressure = length(pressure); % le nombre de pression ↔
% imposees est egal a la taille de la matrice pressure
nb_tpsmanip1 = length(tpsmanip1);
nb_tpsmanip2 = length(tpsmanip2);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% reglages camera %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%% Configuration de la camera
%% argument 1 : nom du driver
%% argument 1 : camera
%% argument 2 : type
%% argument 3 : condition
%% argument 4 : source

```

```
%triggerconfig(vid,'hardware','LowLevel','Leveltrigger');

triggerconfig(vid,'hardware','FallingEdge','EdgeTrigger');

%% set( objet , Nom de la propriete , Valeur )

set(vid,'TriggerRepeat',Inf); %Inf: Keep executing the ⇐
    trigger every time the trigger condition is met until the ⇐
    stop function is called or an error occurs.
vid.FramesperTrigger = 1; %When trigger arrives, take one image
src = getselectedsource(vid); %prends la source d'images de ⇐
    l'objet camera appele vid
set(src,'Gain',gainvect(1));
set(src,'Exposuretime',exposure);

fprintf(keithswitch,':open all')

%% Creation du dossier avec le nom entre par l'utilisateur ⇐
    outputDirectory dans le disque D/data_preconcentration
%mainResultsDirectory = fullfile('D:', 'data_preconcentration')
mainResultsDirectory = fullfile('N:', 'manip-anne-claire')
mkdir(mainResultsDirectory, outputDirectory)
fullOutputDirectory = fullfile(mainResultsDirectory, ⇐
    outputDirectory)

fprintf(keithsource, 'J0X');
fprintf(keithsource, 'F0,1X');
fprintf(keithsource, 'S3P0X');
fprintf(keithsource, ['L1E-3,0X'])
fprintf(keithsource, 'R1X');
fprintf(keithsource, 'N1X');
fprintf(keithsource, 'G13,2,2X');

%% Envoi de commandes
fprintf(keithswitch,':close (@ 1!1!1, 1!1!2, 1!2!3, ⇐
    1!2!4)'); % signifie que 3 et 4 sont au voltage impose ⇐
    tandis que 1 et 2 sont a 0V

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% acquisition images %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

numeroexperienceencours=0;
pauseTimeForPressiostat = 15;

for i = 1:nb_gain % boucle sur le nombre de gains imposes
    set(src, 'Gain',gainvect(i)); % on met le gain de la ⇐
```

```

camera a la valeur de la boucle
for j = 1:nb_voltage % boucle sur le nombre de ↵
    voltages imposes
    for k = 1:nb_pressure % boucle sur le nombre de ↵
        pressions imposees

        %% Demarrage de la camera
        start(vid); %Start = timer associated to ↵
            camera object vid

        numeroexperiencecours=numeroexperiencecours+1;

        %% Afficher le numero de l'experience
        disp(['experience numero ' ↵
            num2str(numeroexperiencecours) ' sur ' ↵
            num2str(nb_gain*nb_voltage*nb_pressure)])

        %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
        % Nettoyage %
        %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

        %% On met une pression de 1bar environ pour ↵
            le nettoyage

        pressureForCleaning = 10000; %(1-32000 = ↵
            0-3 bar)
        p = ↵
            ddepoke(press, 'P(9)', pressureForCleaning); ↵
            % ddepoke parle avec le pressostat ↵
            "press" et impose la pression 10000 ↵
            grace a P(9)

        putvalue(parport, [1 0 1 0 1 1 1])

        %% Affichage "nettoyage"
        disp('nettoyage')

        fprintf(keithsource, ['Q0,' ↵
            num2str(voltageclean) ',0,' ↵
            num2str(timebreak*100) ', ' num2str(10) ↵
            'X']); % on applique la tension de ↵
            clean (20V) pendant le tps de clean soit ↵
            2mn(*100 obligatoire pour avoir le bon ↵
            temps en secondes)
        fprintf(keithsource, 'H0X');

        pause(timebreak) % on fait une pause de ↵
            2mn puis de 10mn

```

```

pause(timeclean/2)

%% Mise en equilibre du liquide dans le ↵
    chip et attente avant la mesure
putvalue(parport,[1 1 1 1 1 1 1 1])

pause(timeclean/2)

%% Affichage "fin nettoyage"
disp('fin nettoyage')

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Mesures %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%% On impose la pression et on la laisse se ↵
    stabiliser

pressureconv=(pressure(k)*32000)/3;    % ↵
    on va convertir la pression indique par ↵
    l'utilisateur (en bars) pour que le ↵
    pressostat comprenne (entre 0 et 32000)
p = ddepoke(press,'P(9)',pressureconv); % ↵
    ddepoke parle avec le pressostat "press" ↵
    et impose la pression de la boucle grace ↵
    a P(9)
pause(pauseTimeForPressiostat)

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% 1ere image%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% boucle permettant d'imposer la pression ↵
    dans le sens decide par l'utilisateur
if flux==0;
    putvalue(parport,[0 0 0 0 1 1 1 1])
elseif flux==1;
    putvalue(parport,[1 1 0 0 1 1 1 1])
else flux==2;
    putvalue(parport,[0 0 1 1 1 1 1 1])
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%Shutter and image acquisition%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%% Ouvre shutter
fprintf(shutter,'%@');
pause(exposurePause)

```

```

% Le shutter envoie un signal trigger ⇔
    signal a la camera
% pour prendre une image

%% Ferme shutter
fprintf(shutter, 'A');

V = voltageexp(j);

% on applique la tension de la boucle ⇔
    pendant le temps de la manip
fprintf(keithsource, ['Q0, ' num2str(V) ⇔
    ',0, ' num2str(tpsmanip1(1)*100) ', ' ⇔
    num2str(10) 'X']);
fprintf(keithsource, 'H0X');

pause(tpsmanip1(1))

%% Images suivantes
% on impose le voltage et on ouvre et on ⇔
    ferme le shutter
% autant de fois que l'utilisateur l'a demande

nbimgtot=1;    %on a deja pris une image

for p=1:nb_tpsmanip1

    if p==1
        nb_images=tpsmanip2(p)/tpsmanip1(p);
    else
        nb_images=(tpsmanip2(p)-tpsmanip2(p-1))/tpsmanip1(p)
    end

nbimgtot=nbimgtot+nb_images;

    for m=1:nb_images

        if (p==nb_tpsmanip1 && m==nb_images)
            P = 10;
        elseif m==nb_images
            P = tpsmanip1(p+1)-exposurePause;
        else
            P = tpsmanip1(p)-exposurePause;
        end

        fprintf(keithsource, ['Q0, ' ⇔

```

```
        num2str(V) ',0,' num2str(P*100) ↔
        ', ' num2str(10) 'X']];
fprintf(keithsource, 'HOX');

%% Ouvre shutter
fprintf(shutter, '@');
pause(exposurePause)

%% Ferme shutter
fprintf(shutter, 'A');

pause(P)

end

end

%% Remise a zeros du port parallel
putvalue(parport,[1 0 1 0 1 1 1 1])

%% Remet le voltage a zero apres chaque mesure
fprintf(keithsource, ['Q0,' num2str(0) ',0,' ↔
num2str(1*10) ', ' num2str(1) 'X']]);

%% Envoi de commandes
fprintf(keithsource, 'HOX');

%% Recuperation des images
[ini]= getdata(vid,nbimgtot); % ini ↔
represente les datas provenant de vid

%% Enregistrement des fichiers
for l = 1 : nbimgtot
    dataNumber = ↔
        (numeroexperienceencours-1)*(nbimgtot) ↔
        + 1; % calcul quelle numero ↔
        d'image c'est

% si on a plus de 10 images il faut mettre ↔
un 0 avant
% sinon ds l'ordre alphabetique le 11 ↔
viendra entre le
% 1 et le 2 et on aura beaucoup de mal a ↔
traiter les
% donnees. Il vaut dc mieux avoir 01, 02 ↔
etc... idem pr
% 100 images
```

```

if dataNumber > 99
    fileName = [ 'image' num2str(dataNumber) ↵
                '.tif' ];
elseif dataNumber > 9
    fileName = [ 'image0' num2str(dataNumber) ↵
                '.tif' ];
else
    fileName = [ 'image00' ↵
                num2str(dataNumber) '.tif' ];
end

fullFilename = fullfile(fullOutputDirectory, ↵
                        fileName);

imwrite( ini(:, :, 1), fullFilename, 'tif', ↵
        'Compression', 'none');
end

%% Arrêt de la camera
stop(vid);      %%Stop timer associated to camera

end
end
end

p = ddepoke(press, 'P(9)', 10000);  %% A la fin des ↵
    mesures, on applique une petite pression de 1 bar ↵
    pour laisser la manip en flush

fprintf(keithswitch, ':open all')

%% Affichage "Fin de la manip" a l'ecran
disp('Fin de la manip')

end

```

B.2 Création des profils de préconcentration

Cette deuxième interface graphique (Figure B.2 (a)) génère les profils de préconcentration (Figure B.2 (b)) des expériences représentant, pour chaque temps, la concentration de l'analyte en fonction de la distance dans la région d'intérêt sélectionnée, pour une pression et un champ électrique donnés. L'utilisateur doit renseigner les paramètres de l'expérience, à savoir le nom du dossier où se trouve les images à traiter, le microcanal sélectionné où se produit la préconcentration, les champs électriques et les pressions appliqués, le nombre d'images total à traiter, les intervalles entre chaque image et, enfin, les paramètres de la courbe de calibration

utilisée pour relier l'intensité obtenue à la concentration d'analyte correspondante. Lorsque l'interface est lancée (grâce au bouton "GO"), l'utilisateur doit sélectionner la région d'intérêt sur la première image de la série.

Comme pour la première interface, et pour les suivantes, ce programme se compose d'un premier code définissant l'interface graphique en elle même et d'une fonction, appelée par l'interface, permettant le tracé des données.

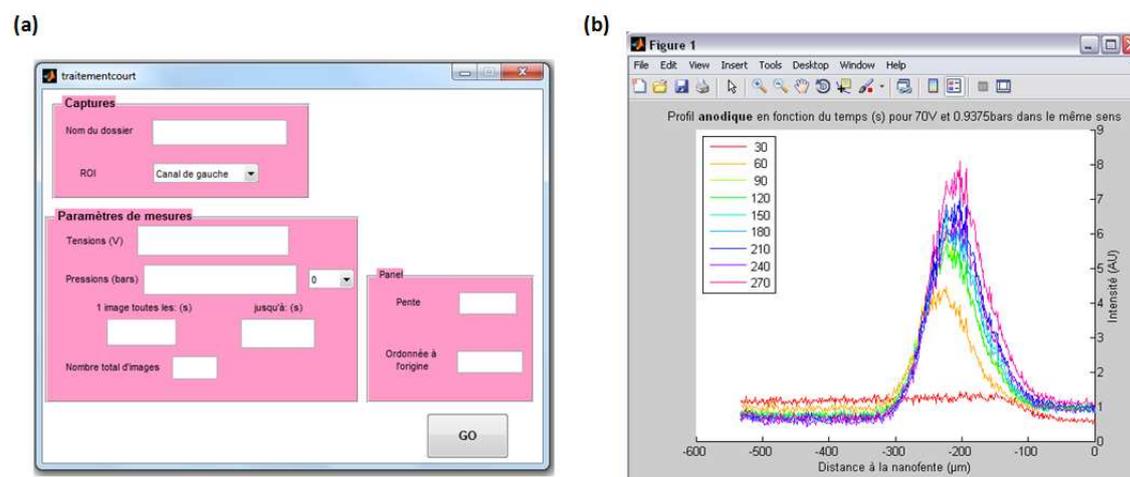


FIGURE B.2 – (a) Interface graphique Matlab utilisée pour le traitement d'une expérience de préconcentration. Une fois les champs libres remplis par l'utilisateur, l'interface trace les profils de préconcentration correspondants comme sur l'exemple (b).

B.3 Création de tous les graphiques obtenus dans ce manuscrit

Cette troisième interface (Figure B.3), à utiliser après avoir lancé la deuxième, permet d'obtenir, en plus des profils de préconcentration, toutes les courbes permettant de suivre l'évolution des différentes caractéristiques des régimes de préconcentration obtenus. On obtient ainsi les graphes présentés dans ce manuscrit : la concentration maximale de l'analyte en fonction du temps, du champ électrique, ou de la pression ; la distance à la nanofente de ce maximum de préconcentration selon l'un de ces trois paramètres ou encore la largeur à mi hauteur du pic de préconcentration en fonction des mêmes variables.

B.4 Création des graphes 2D de l'évolution de la préconcentration maximale

Cette quatrième interface graphique (Figure B.3 (a)) permet d'obtenir une cartographie en deux dimensions présentant, sur une échelle de gris, la concentration maximale de l'analyte en fonction du temps et du champ électrique pour une pression fixe (Figure B.3 (b)). L'utilisateur doit renseigner les champs libres concernant le nom du dossier à traiter, l'endroit de la ROI, les champs électriques et les pressions appliqués, les intervalles pour les images, le nombre total d'images ainsi que d'autres informations utiles pour le traitement précis et complet.

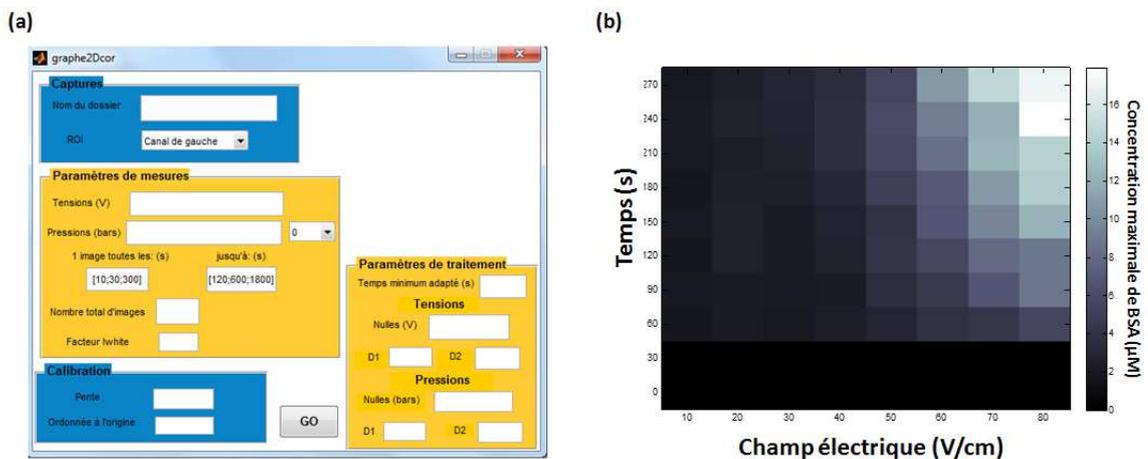


FIGURE B.3 – (a) Interface graphique Matlab utilisée pour l'obtention de la cartographie 2D du maximum de préconcentration en fonction du temps et du champ électrique, pour une pression fixe. Une fois les champs libres remplis par l'utilisateur, l'interface trace un graphe 2D en échelle de gris, comme sur l'exemple (b).

Annexe C

Electropréconcentration assistée en pression de la BSA à $\Delta P=0,5$ bar

De la même manière que pour la première pression étudiée de 0,9 bar, nous avons analysé les caractéristiques de la préconcentration obtenue lors de l'application d'un champ électrique et d'une pression hydrodynamique externe de 0,5 bar. Encore une fois, nous avons pu obtenir, en changeant le sens de la pression, les deux régimes focalisant AF et CF, tous deux dépendant du temps et de la valeur du champ électrique imposé. Les Figures C.1 et C.2 présentent les profils de préconcentration obtenus pour, respectivement, le régime anodique et le régime cathodique. Comme précédemment, il semble que plus le champ électrique est fort et plus le maximum d'intensité de fluorescence est grand, en particulier pour le régime cathodique. Le régime anodique, lui, a l'air encore une fois de saturer à 70V/cm. En ce qui concerne la localisation de la préconcentration, les pics obtenus ici paraissent un peu moins stables qu'avec la pression plus élevée. Au cours du temps, ces pics se rapprochent légèrement de l'entrée de la nanofente, d'environ une cinquantaine de μm entre 1min et 5min (de la courbe jaune à la courbe rose).

Cette fois-ci encore, des graphiques plus détaillés ont été tracés afin de suivre l'évolution, au cours du temps et en champ électrique, de la concentration de BSA équivalente à l'intensité de fluorescence obtenue, de la distance du front de préconcentration à la nanofente et de la largeur du pic à mi hauteur. Les résultats obtenus sont très semblables à ceux qui avaient été observés pour une pression de 0,9 bar (détaillés au chapitre 5). Outre le fait que les taux de préconcentration obtenus ici sont quelque peu supérieurs aux précédents (Figure C.3), la seule différence notable tient à la distance des pics dans le canal. Comme on l'a discuté au chapitre 5, ces pics sont plus proches de l'entrée du nanocanal et il s'avère aussi que cette distance est un peu moins stable dans le temps (Figure C.4).

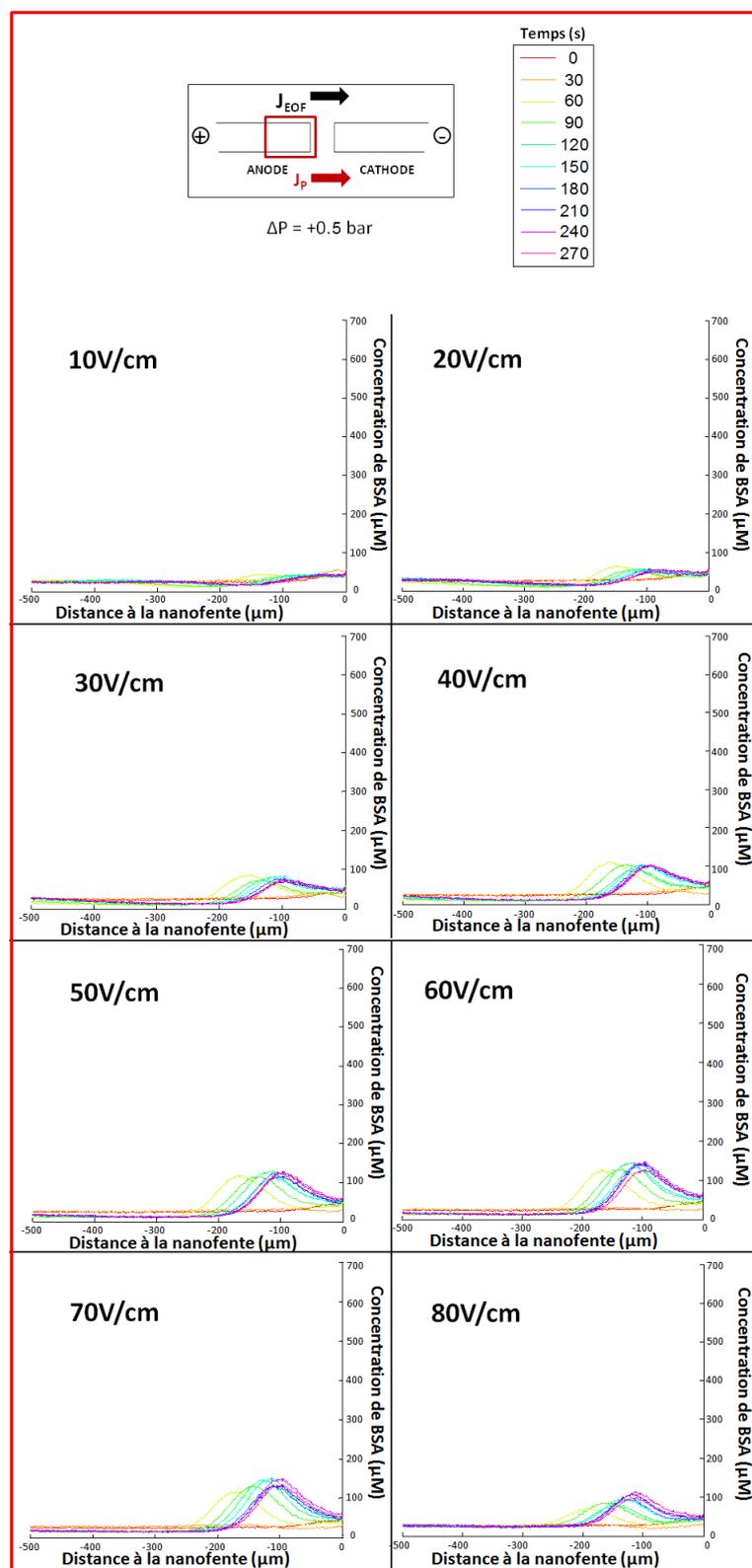


FIGURE C.1 – Le rôle du champ électrique sur l'électropréconcentration assistée d'une pression anodique $\Delta E=0,5 \text{ bar}$. La localisation du front dans le réservoir anodique ne semble pas affectée par la valeur du champ mais, par contre, le taux de préconcentration est un peu plus important à mesure que le champ électrique appliqué augmente. Cette augmentation semble atteindre un palier pour 70V/cm.

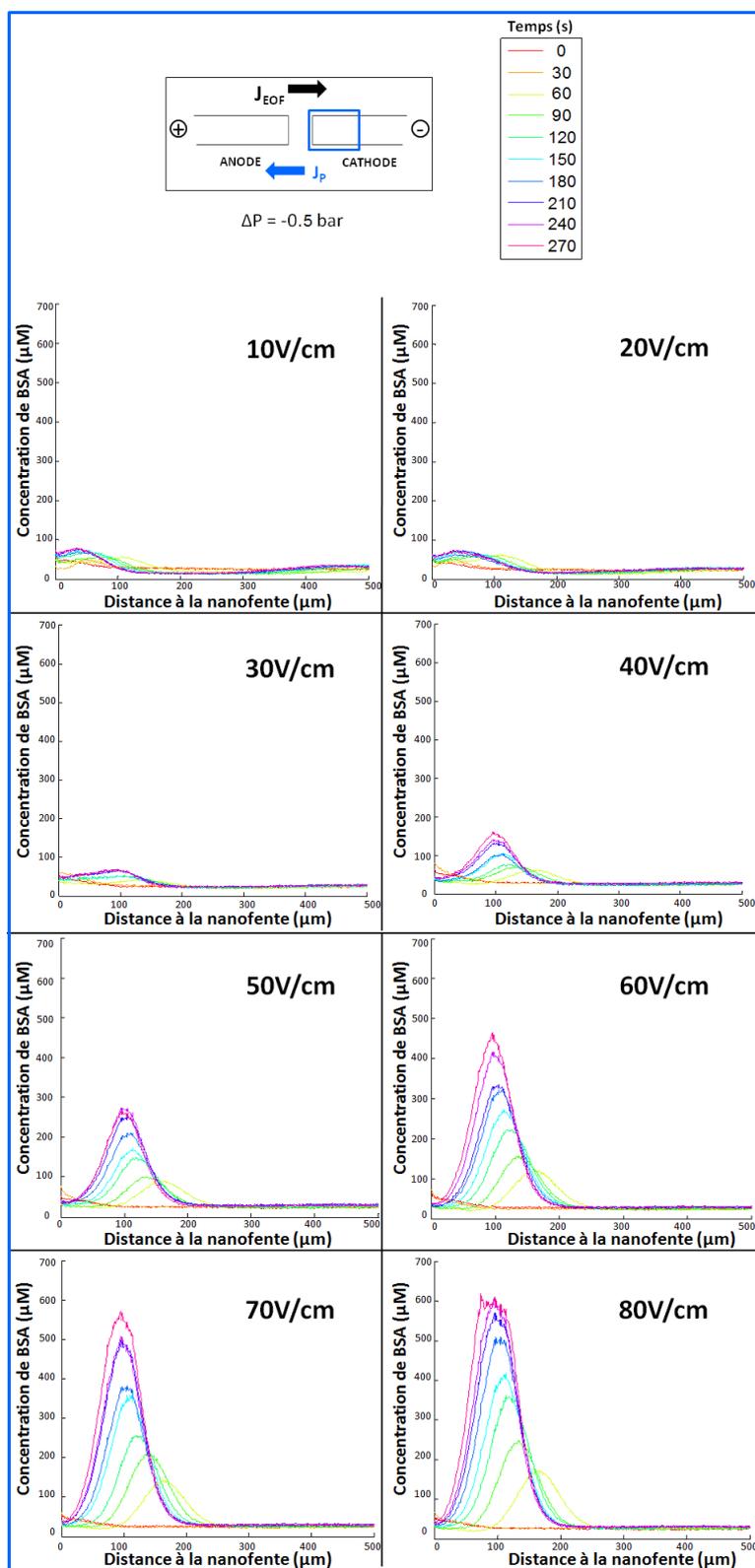


FIGURE C.2 – Le rôle du champ électrique sur l'électropréconcentration assistée d'une pression cathodique $\Delta P=0,5$ bar. La localisation du front dans le réservoir cathodique ne semble pas affectée par la valeur du champ mais, par contre, plus celui-ci est important, plus le taux de préconcentration est grand. Cette augmentation de la préconcentration avec le champ électrique ne semble pas saturer comme pour le régime anodique.

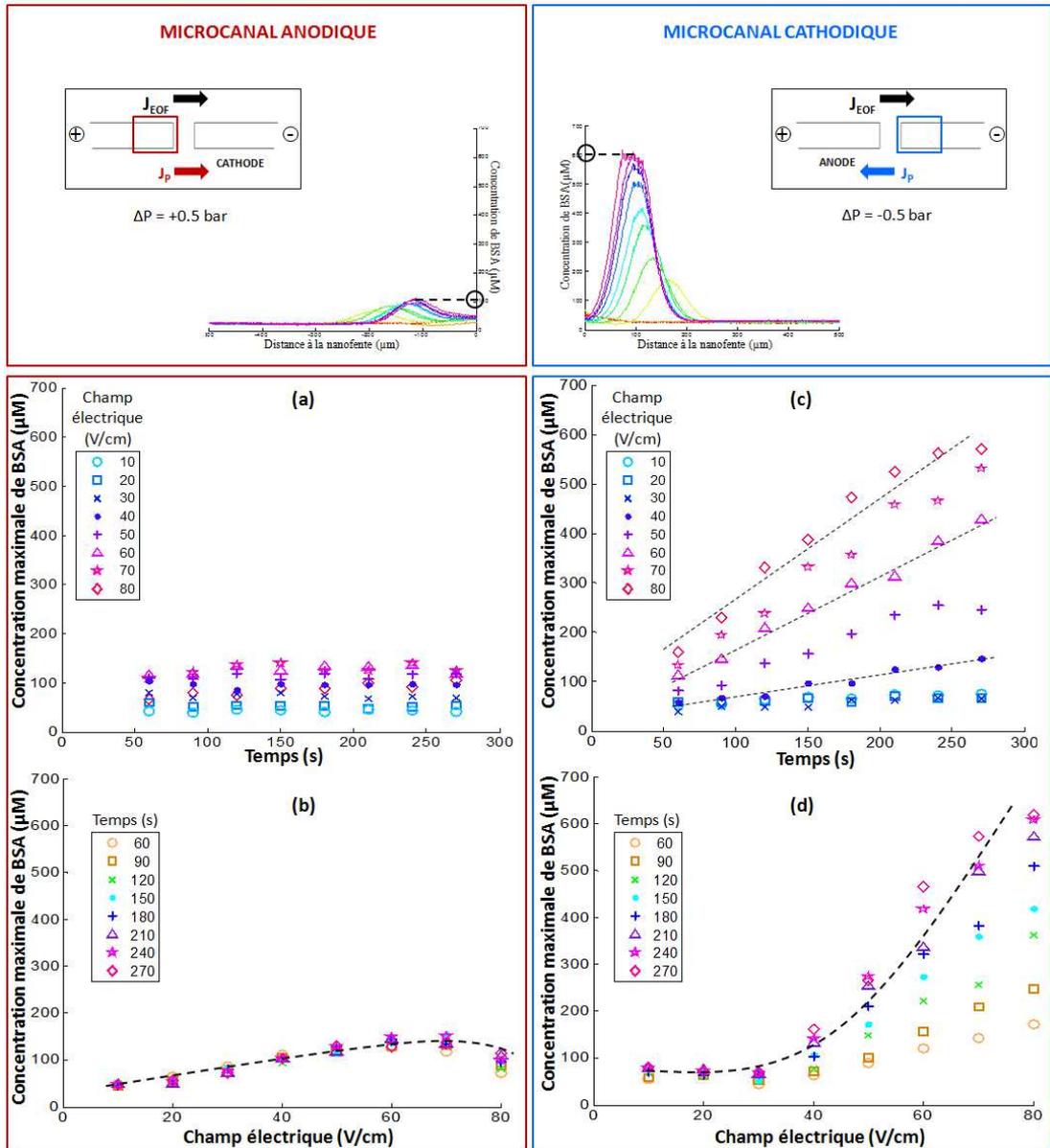


FIGURE C.3 – Evolution de l'intensité de préconcentration pour les deux régimes assistés d'une pression $\Delta P=0,5$ bar. Celle-ci a été reliée à la concentration de BSA équivalente. (gauche) régime Anodic Focusing obtenu avec une pression anodique. (a) Concentration maximale de BSA en fonction du temps. La dépendance en champ électrique peut être observée grâce aux points de différentes couleurs. (b) Concentration maximum de BSA en fonction du champ électrique appliqué. La dépendance en temps peut être observée grâce aux points de différentes couleurs qui montrent une sorte de maximum. (droite) régime Cathodic Focusing obtenu avec une pression cathodique. (c) Concentration maximum de BSA en fonction du temps. La dépendance en champ électrique peut être observée grâce aux points de différentes couleurs. (d) Concentration maximum de BSA en fonction du champ électrique appliqué. La dépendance en temps peut être observée grâce aux points de différentes couleurs qui montrent un régime non saturant et de plus forts taux de préconcentration.

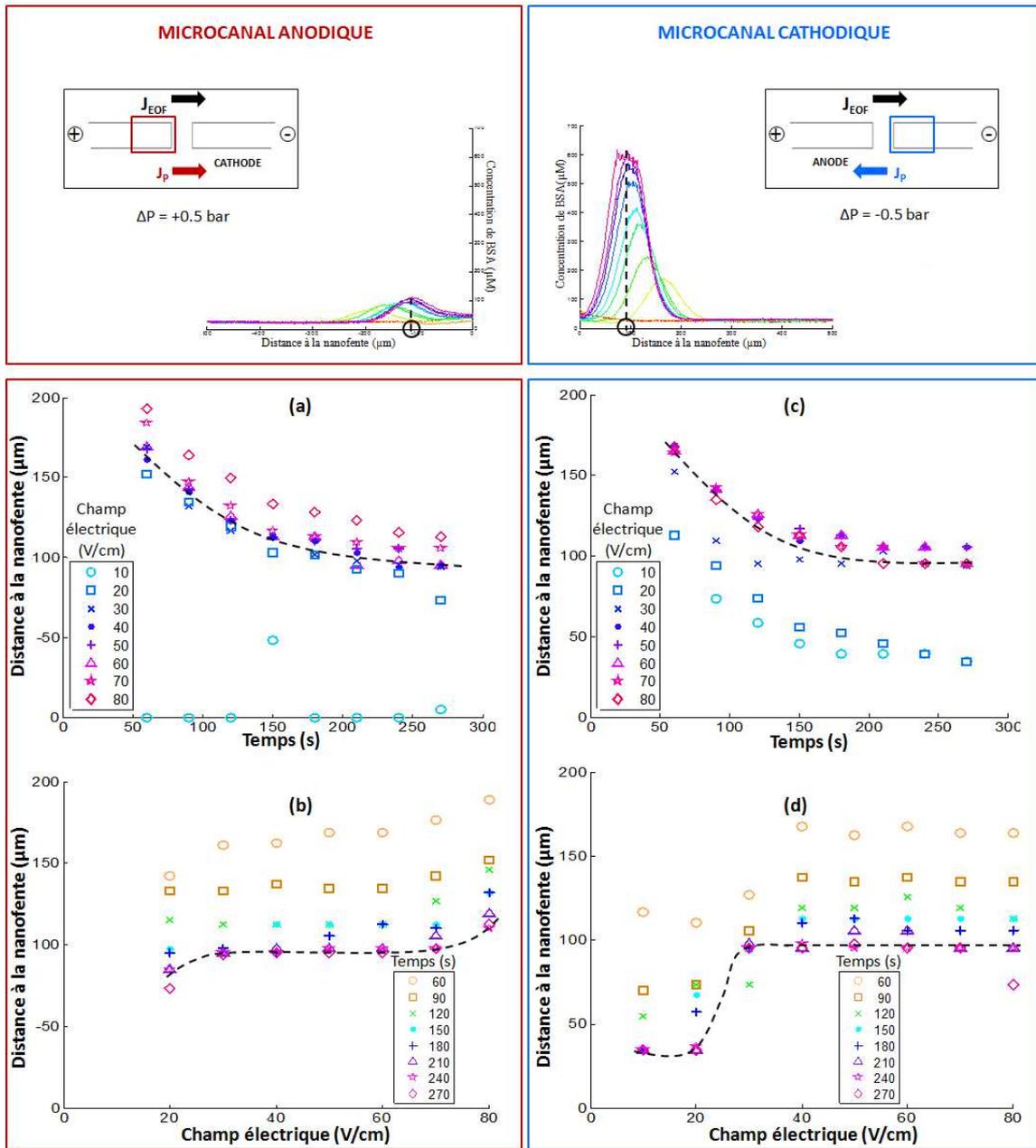


FIGURE C.4 – Evolution de la distance à la nanofente du pic de préconcentration assistée d’une pression $\Delta P=0,5$ bar dans le microcanal anodique en fonction (a) du temps pour différents champs électriques représentés par différentes couleurs et (b) du champ électrique pour différents temps. (c) et (d) Evolution de la distance à la nanofente du pic de préconcentration dans le microcanal cathodique en fonction, respectivement, du temps et du champ électrique appliqués. Pour les deux régimes, le pic est extrêmement stable dans le temps et plutôt stable en champ électrique surtout pour les champs forts.

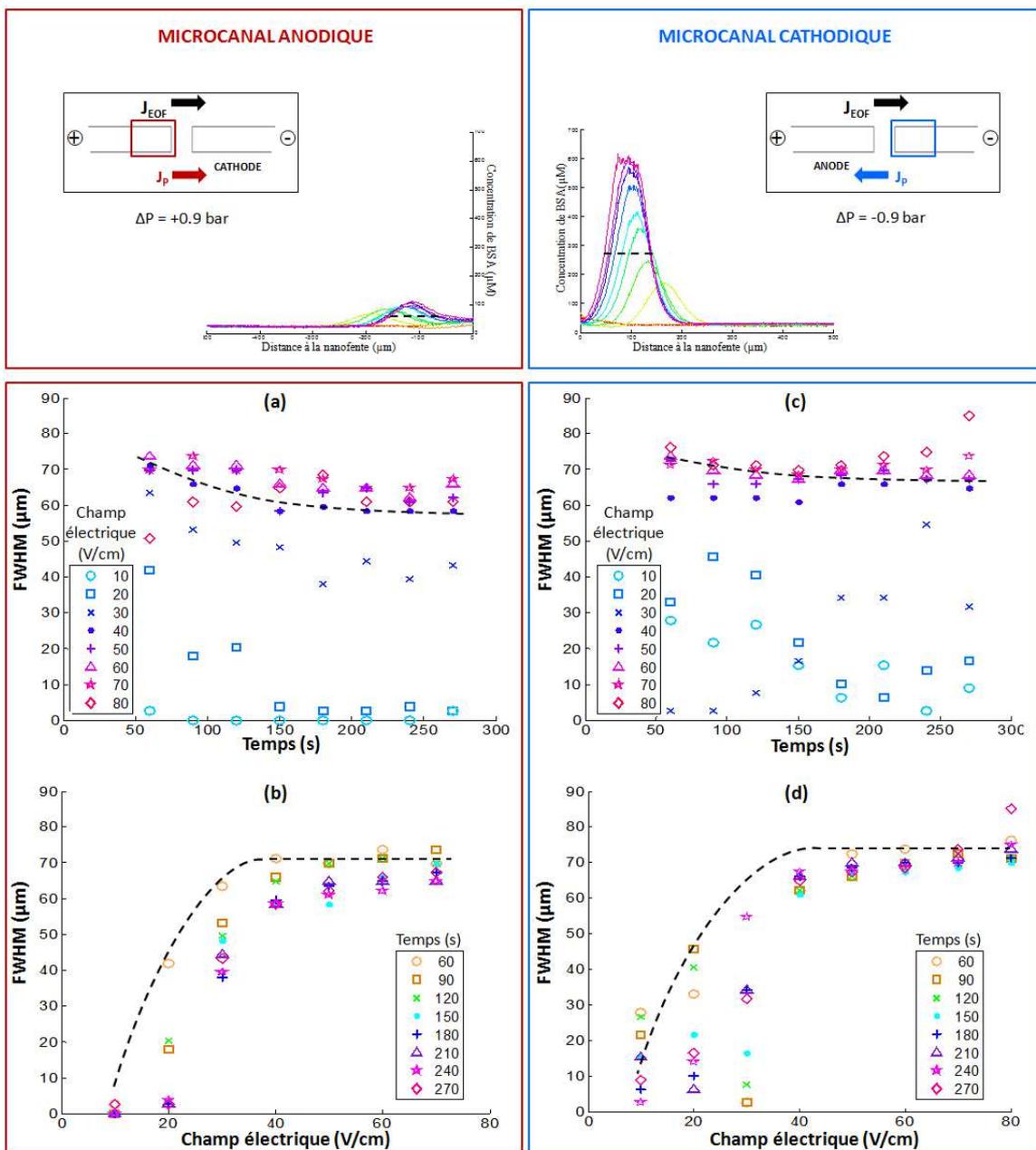


FIGURE C.5 – Evolution de la largeur à mi hauteur FWHM pour les deux régimes de préconcentration assistée d'une pression $\Delta P=0,5$ bar. (gauche) régime Anodic Focusing obtenu avec une pression anodique. (droite) régime Cathodic Focusing obtenu avec une pression cathodique. (a) et (c) FWHM en fonction du temps. (b) et (d) FWHM en fonction du champ électrique appliqué.

Bibliographie

- [1] N. Lion, F. Reymond, H. Girault, and J. Rossier, “Why the move to microfluidics for protein analysis,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 15, pp. 31–37, 2004.
- [2] M. U. Kopp, H. J. Crabtree, and A. Manz, “Developments in technology and applications of microsystems,” *Curr Opin Chem Biol*, vol. 1, pp. 410–419, 1997.
- [3] D. Janasek, J. Franzke, and A. Manz, “Scaling and the design of miniaturized chemical analysis systems,” *Nature*, vol. 442, pp. 374–380, 2006.
- [4] P. Horvatovich, N. Govorukhina, T. Reijmers, A. V. D. Zee, F. Suits, and R. Bischoff, “Chip-lc-ms for label-free profiling of human serum,” *Electrophoresis*, vol. 28, pp. 4493–4505, 2007.
- [5] L. Gervais, N. D. Rooij, and E. Delamarche, “Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnosics,” *Advanced Materials*, vol. 23, no. 24, pp. H151–H176, 2011.
- [6] S. Terry, J. Jerman, and J. Angell, “A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer,” *IEEE Trans. Electron. Devices*, vol. 26, pp. 1880–1886, 1979.
- [7] A. Manz, Y. Miyahara, J. Muira, Y. Watanabe, H. Miyagi, and K. Sato, “Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology,” *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 1, pp. 249–255, 1990.
- [8] S. Petralia, E. Alessi, M. Amore, C. Schneider, E. Klaric, and R. Verardo, “In-check system : a highly integrated silicon lab-on-chip for sample preparation, pcr amplification and microarray detection towards the molecular diagnostics point-of-care,” in *IMCS - The 14th International Meeting on Chemical Sensors*, 2012.
- [9] “Stmicroelectronics and mobidiag unveil lab-on-chip for rapid bacterial diagnosis.” <http://www.accessmylibrary.com/article-1G1-136817364/lab-chip-enables-rapid.html>. Accessed : 2013-06-26.
- [10] “Vereduslabs.” <http://www.vereduslabs.com>. Accessed : 2013-07-07.
- [11] “The compact and lightweight portable immunity analysis system - samsung labgeoib10.” http://www.samsungmedison.com/ivd/labgeo_ib10.jsp. Accessed : 2013-06-26.
- [12] “Guizmodo.” <http://gizmodo.com/imec/>. Accessed : 2013-06-26.

-
- [13] M. Tswett, "Physical chemical studies on chlorophyll adsorptions," *Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft*, vol. 24, pp. 316–323, 1906.
- [14] A. Plecis, *Etude et controle de la charge de surface dans les dispositifs micro-nanofluidiques : nouveaux outils pour les sciences separatives*. PhD thesis, Universite Paris-Sud 11, 2007.
- [15] N. Kim, D.-K. Kim, and Y.-J. Cho, "Development of indirect-competitive quartz crystal microbalance immunosensor for c-reactive protein," *Sensor. Actuat. B-Chem.*, vol. 143, pp. 444–448, 2009.
- [16] S. Kurosawa, M. Nakamura, J. Park, H. Aizawa, K. Yamada, and M. Hirata, "Evaluation of a high-affinity qcm immunosensor using antibody fragmentation and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (mpc) polymer," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, pp. 1134–1139, 2004.
- [17] Y. Weizmann, F. Patolsky, and I. Willner, "Amplified detection of dna and analysis of single-base mismatches by the catalyzed deposition of gold on au-nanoparticles," *Analyst.*, vol. 126, pp. 1502–1504, 2001.
- [18] N. Backmann, C. Zahnd, F. Huber, A. Bietsch, A. Pluckthun, H.-P. Lang, H.-J. Guntherodt, M. Hegner, and C. Gerber, "A label-free immunosensor array using single-chain antibody fragments," *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol. 102, pp. 14587–14952, 2005.
- [19] P. Waggoner, M. Varshney, and H. Craighead, "Detection of prostate specific antigen with nanomechanical resonators," *Lab Chip*, vol. 9, pp. 3095–3099, 2009.
- [20] G. Wu, R. Datar, K. Hansen, T. Thundat, R. Cote, and A. Majumdar, "Bioassay of prostrate-specific antigen (psa) using microcantilevers," *Nature Biotechnology*, vol. 19, pp. 856–860, 2001.
- [21] K. Wee, G. Kang, J. Park, J. Kang, D. Yoon, J. Park, and T. Kim, "Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using peizo-resistive self-sensing micro-cantilevers," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, pp. 1932–1938, 2005.
- [22] K. Hwang, J. Lee, J. Park, D. Yoon, J. Park, and T. Kim, "In-situ quantitative analysis of a prostate-specific antigen (psa) using a nanomechanical pzt cantilever," *Lab Chip*, vol. 4, pp. 547–552, 2004.
- [23] M. V. Muhlen, N. Brault, S. Knudsen, S. Jiang, and S. Manalis, "Label-free biomarker sensing in undiluted serum with suspended microchannel resonators," *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 1905–1910, 2010.
- [24] G. Zheng, X. Gao, and C. Lieber, "Frequency domain detection of biomolecules using silicon nanowire biosensors," *Nano Letters*, vol. 10, pp. 3179–3183, 2010.
- [25] E. Stern, A. Vacic, N. Rajan, J. Criscione, J. Park, B. Ilic, D. Mooney, M. Reed, and T. Fahmy, "Label-free biomarker detection from whole blood," *Nature Nanotech.*, vol. 5, pp. 138–142, 2010.
- [26] Y. Bunimovich, Y. Shin, W.-S. Yeo, M. Amori, G. Kwong, and J. Heath, "Quantitative real-time measurement of dna hybridization with alkylated

- nonoxidized silicon nanowires in electrolyte solution,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, pp. 16323–16331, 2006.
- [27] A. Washburn, M. Luchansky, A. Bowman, and R. Bailey, “Quantitative, label-free detection of five protein biomarkers using multiplexed arrays of silicon photonic microring resonators,” *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 69–72, 2010.
- [28] M. Luchansky and R. Bailey, “Silicon photonic microring resonators for quantitative cytokine detection and t-cell secretion analysis,” *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 1975–1981, 2010.
- [29] K. Chang and L. H. Hsieh, *Microwave Ring Circuits and Related Structures*. John Wiley & Sons, Inc, 2004.
- [30] R. Rich and D. Myszka, “Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 11, pp. 54–61, 2000.
- [31] X. Yao, X. Li, F. Toledo, C. Zurita-Lopez, M. Gutova, J. Momand, and F. Zhou, “Sub-attomole oligonucleotide and p53 cDNA determinations via a high-resolution surface plasmon resonance combined with oligonucleotide-capped gold nanoparticle signal amplification,” *Anal. Biochem.*, vol. 354, pp. 220–228, 2006.
- [32] R. Lipsitz, “Diagnostics at home : Pregnancy tests,” *Sci. Amer.*, vol. 283, pp. 110–111, 2000.
- [33] S. Cesaro-Tadic, G. Dernick, D. Juncker, G. Buurman, H. Kropshofer, B. Michel, C. Fattinger, and E. D. ., “High-sensitivity miniaturized immunoassays for tumor necrosis factor alpha using microfluidic systems,” *Lab Chip*, vol. 4, pp. 563–569, 2004.
- [34] R. Fan, O. Vermesh, A. Srivastava, B. Yen, L. Qin, H. Ahmad, G. Kwong, C.-C. Liu, J. Gould, L. Hood, and J. Heath, “Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood,” *Nature Biotechnol.*, vol. 26, pp. 1373–1378, 2008.
- [35] A. Diercks, A. O. A, C. Hansen, J. Spotts, D. Rodriguez, and A. Aderem, “A microfluidic device for multiplexed protein detection in nano-liter volumes,” *Anal. Biochem.*, vol. 386, pp. 30–35, 2009.
- [36] H. Xu, X. Mao, Q. Zeng, S. Wang, A.-N. Kawde, and G. Liu, “Aptamer-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for protein analysis,” *Analytical Chemistry*, vol. 81, pp. 669–675, 2009.
- [37] L. Gervais and E. Delamarche, “Toward one-step point-of-care immunodiagnosics using capillary-driven microfluidic and PDMS substrates,” *Lab Chip*, vol. 9, pp. 3330–3337, 2009.
- [38] T. Mairal, I. Frese, E. Llaudet, C. B. Redondo, I. Katakis, F. V. Gernar, K. Drese, and C. O. Sullivan, “Microfluorimeter with disposable polymer chip for detection of coeliac disease toxic gliadin,” *Lab Chip*, vol. 9, pp. 3535–3542, 2009.
- [39] S. A. Lange, G. Roth, S. Wittemann, T. Lacoste, A. Vetter, J. Grassle, S. Kopta, M. Kolleck, B. Breitingner, M. Wick, J. K. H. Horber, S. Duebel,

- and A. Bernard, "Measuring biomolecular binding events with a compact disc player device," *Angew. Chem. Int.*, vol. 45, pp. 270–273, 2005.
- [40] D. M. Bruls, T. H. Evers, J. A. H. Kahlman, P. J. W. V. Lankvelt, M. Ovsyanko, E. G. M. Pelssers, J. J. H. B. Schleipen, F. K. de Theije, C. A. Verschuren, T. V. D. Wijk, J. B. A. V. Zon, W. U. Dittmer, A. H. J. Immink, and J. H. N. M. W. J. Prins, "Rapid integrated biosensor for multiplexed immunoassays based on actuated magnetic nanoparticles," *Lab Chip*, vol. 9, pp. 3504–3510, 2009.
- [41] J. Cooper, N. Yazvenko, K. Peyvan, K. Maurer, C. R. Taitt, W. Lyon, and D. L. Danley, "Targeted deposition of antibodies on a multiplex cmos microarray and optimization of a sensitive immunoassay using electrochemical detection," *PLoS ONE*, vol. 5, p. e9781, 2010.
- [42] R. S. Gaster, D. A. Hall, C. H. Nielsen, S. J. Osterfeld, H. Yu, K. E. Mach, R. J. Wilson, B. Murmann, J. C. Liao, S. S. Gambhir, and S. X. Wang, "Matrix-insensitive protein assays push the limits of biosensors in medicine," *Nat. Med.*, vol. 15, pp. 1327–1332, 2009.
- [43] T. Govindaraju, P. Bertics, R. Raines, and N. L. Abbott, "Using measurement of anchoring energies of liquid crystal on surface to quantify proteins captured by immobilized ligands," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, pp. 11223–11231, 2007.
- [44] E. Ouellet, C. Lausted, T. Lin, C. Yang, L. Hood, and E. Lagally, "Parallel microfluidic surface plasmon resonance imaging arrays," *Lab Chip*, vol. 10, pp. 581–588, 2010.
- [45] S. Mandal, J. M. Goddard, and D. Erickson, "A multiplexed optofluidic biomolecular sensor for low mass detection," *Lab Chip*, vol. 9, pp. 2924–2932, 2009.
- [46] A. Kim, C. S. Ah, C. W. Park, J.-H. Yang, T. Kim, C.-G. Ahn, S. H. Park, and G. Y. Sung, "Direct label-free electrical immunodetection in human serum using a flow-through-apparatus approach with integrated field-effect transistors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, pp. 1767–1773, 2010.
- [47] R. McKendry, J. Zhang, Y. Arntz, T. Strunz, M. Hegner, H. P. Lang, M. K. Baller, U. Certa, E. Meyer, and H. J. Guntherodt, "Multiple label-free biodection and quantitative dna-binding assays on a nanomechanical cantilever array," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 99, pp. 9783–9788, 2002.
- [48] J. Arlett, E. Myers, and M. Roukes, "Comparative advantages of mechanical biosensors," *Nature nanotechnology*, vol. 6, pp. 203–215, 2011.
- [49] X. Gao, G. Zheng, and C. Lieber, "Subthreshold regime has the optimal sensitivity for nanowire fet biosensors," *Nano Letters*, vol. 10, pp. 547–552, 2010.
- [50] D. Bravata, K. McDonald, D. Owens, D. Buckeridge, C. Haberland, C. Rydzak, M. Schleinitz, W. Smith, H. Szeto, D. Wilkening, M. Musen, B. Duncan, B. Nouri, M. Dangiolo, H. Liu, S. Shofer, J. Graham, and S. Davies, "Bio-terrorism preparedness and response : use of information technologies and

- decision support systems,” tech. rep., Agency for Healthcare Research and Quality, 2002.
- [51] H. Virk, S. Kaur, and G. Randhawa, “Role of ion track filters in environmental surveillance,” *Environment International*, vol. 27, pp. 359–362, 2001.
- [52] J. A. Quinn, J. L. Anderson, W. S. Ho, and W. J. Petzny, “Model pores of molecular dimension preparation and characterization of track-etched membranes,” *Biophysical Journal*, vol. 12, pp. 990–1007, 1972.
- [53] Y. Wang, M. Choi, and J. Han, “Two-dimensional protein separation with advanced sample and buffer isolation using microfluidic valves,” *Analytical Chemistry*, vol. 76, no. 15, pp. 4426–4431, 2004. PMID : 15283583.
- [54] A. Asif and D. Chung, “Transient isotachopheresis of highly saline trace metals under strong electroosmotic flow conditions,” *Electrophoresis*, vol. 26, no. 3, pp. 668–673, 2005.
- [55] P. Abgrall and N. Nguyen, “Nanofluidic devices and their applications,” *Analytical Chemistry*, vol. 80, pp. 2326–2341, 2008.
- [56] J. Eijkel and A. V. D. Berg, “Nanofluidics : what is it and what can we expect from it,” *Microfluid. Nanofluid.*, vol. 1, pp. 249–267, 2005.
- [57] R. Schoch, J. Han, and P. Renaud, “Transport phenomena in nanofluidics,” *Reviews of Modern Physics*, vol. 80, pp. 839–883, 2008.
- [58] C. Nanteuil, *Etude du transport ionique a travers un nanocanal fluidique : vers l’electroreconcentration selective*. PhD thesis, Universite Paris-Sud 11, 2010.
- [59] F. Ruess *Mem. Soc. Imp. Natur. Moscou*, vol. 2, pp. 327–337, 1809.
- [60] J. Jorgenson and K. Lukacs, “High resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis,” *Journal of Chromatography*, vol. 218, pp. 209–216, 1981.
- [61] J. Jorgenson and K. Lukacs, “Free zone electrophoresis in glass capillaries,” *Clinical Chemistry*, vol. 27, pp. 1551–1553, 1981.
- [62] J. Clarke, H. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, A. Reid, and H. Bayley, “Continuous base identification for single-molecule nanopore dna sequencing,” *Nature Nanotechnology*, vol. 4, pp. 265–270, 2009.
- [63] K. Knowles and A. V. Helvoort, “Anodic bonding,” *International Materials Reviews*, vol. 51, pp. 273–311, 2006.
- [64] P. Mao and J. Han, “Fabrication and characterization of 20 nm planar nanofluidic channels by glass-glass and glass-silicon bonding,” *Lab Chip*, vol. 5, pp. 837–844, 2005.
- [65] N. R. Tas, J. Haneveld, H. V. Jansen, M. Elwenspoek, and A. V. D. Berg, “Capillary filling speed of water in nanochannels,” *Applied Physics Letters*, vol. 85, pp. 3274–3276, 2004.
- [66] L. Guo, X. Cheng, and C. Chou, “Fabrication of size-controllable nanofluidic channels by nanoimprinting and its application for dna stretching,” *Nano Letters*, vol. 4, pp. 69–73, 2004.

- [67] H. Craighead, "Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules," *Nature*, vol. 442, pp. 387–393, 2006.
- [68] "Invasion capillaire de nanocanaux." <http://www.laas.fr/N2IS/21-30499-Invasion-Capillaire-de-Nanocanaux.php>. Accessed : 2013-07-07.
- [69] M. Pinault, M. Mayne-LHermite, C. Reynaud, V. Pichot, P. Launois, and D. Ballutaud, "Growth of multiwalled carbon nanotubes during the initial stages of aerosol-assisted ccvd," *Carbon*, vol. 43, pp. 2928–2976, 2005.
- [70] M. B. Stern, M. W. Geis, and J. E. Curtin, "Nanochannel fabrication for chemical sensors," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 15, pp. 2887–2891, 1997.
- [71] S.-J. Kim, Y.-A. Song, and J. Han, "Nanofluidic concentration devices for biomolecules utilizing ion concentration polarization : theory, fabrication, and applications," *Chem. Soc. Rev.* 39, vol. 39, pp. 912–922, 2010.
- [72] Z. Yuan, A. Garcia, G. Lopez, and D. Petsev, "Electrokinetic transport and separations in fluidic nanochannels," *Electrophoresis*, vol. 28, no. 4, pp. 595–610, 2007.
- [73] X. Xuan and D. Li, "Solute separation in nanofluidic channels : Pressure-driven or electric field-driven?," *Electrophoresis*, vol. 28, no. 4, pp. 627–634, 2007.
- [74] A. Garai and S. Chakraborty, "Steric effect and slip-modulated energy transfer in narrow fluidic channels with finite aspect ratios," *Electrophoresis*, vol. 31, no. 5, pp. 843–849, 2010.
- [75] S. Movahed and D. Li, "Electrokinetic transport through nanochannels," *Electrophoresis*, vol. 32, no. 11, pp. 1259–1267, 2011.
- [76] A. Conlisk, "The debyehuckel approximation : Its use in describing electroosmotic flow in micro- and nanochannels," *Electrophoresis*, vol. 26, no. 10, pp. 1896–1912, 2005.
- [77] A. Plecis, R. Schoch, and P. Renaud, "Ionic transport phenomena in nanofluidics : Experimental and theoretical study of the exclusionenrichment effect on a chip," *Nano Letters*, vol. 5, pp. 1147–1155, 2005.
- [78] A. Mani, T. Zangle, and J. Santiago, "On the propagation of concentration polarization from microchannelnanochannel interfaces part i : Analytical model and characteristic analysis," *Langmuir*, vol. 25, no. 6, pp. 3898–3908, 2009. PMID : 19275187.
- [79] Y. Wang, A. Stevens, and J. Han, "Million-fold preconcentration of proteins and peptides by nanofluidic filter," *Analytical Chemistry*, vol. 77, no. 14, pp. 4293–4299, 2005.
- [80] R. Schoch, *Transport phenomena in nanofluidics : From ionic studies to proteomic applications*. PhD thesis, EPFL, 2006.
- [81] Q. Pu, J. Yun, H. Temkin, and S. Liu, "Ion-enrichment and ion-depletion effect of nanochannel structures," *Nano Letters*, vol. 4, pp. 1099–1103, 2004.

- [82] T. Zangle, A. Mani, and J. Santiago, "On the propagation of concentration polarization from microchannel/nanochannel interfaces part ii : Numerical and experimental study," *Langmuir*, vol. 25, no. 6, pp. 3909–3916, 2009. PMID : 19275188.
- [83] A. Plecis, C. Nanteuil, A.-M. Haghiri-Gosnet, and Y. Chen, "Electropre-concentration with charge-selective nanochannels," *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 24, pp. 9542–9550, 2008. PMID : 19006338.
- [84] A. Plecis, A. Pallandre, and A.-M. Haghiri-Gosnet, "Ionic and mass transport in micro-nanofluidic devices : a matter of volumic surface charge," *Lab Chip*, vol. 11, pp. 795–804, 2011.
- [85] S. M. Kim, M. A. Burns, , and E. F. Hasselbrink, "Electrokinetic protein pre-concentration using a simple glass/poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip," *Analytical Chemistry*, vol. 78, pp. 4779–4785, 2006.
- [86] J. H. Lee, Y.-A. Song, , and J. Han, "Multiplexed proteomic sample pre-concentration device using surface-patterned ion-selective membrane," *Lab Chip*, vol. 8, pp. 596–601, 2008.
- [87] A. Paguirigan and D. Beebe, "From the cellular perspective : exploring differences in the cellular baseline in macroscale and microfluidic cultures," *Integrative Biology*, vol. 1, pp. 182–195, 2009.
- [88] J. Zhou and A. E. N. Voelcker, "Recent developments in pdms surface modification for microfluidic devices," *Electrophoresis*, vol. 31, pp. 2–16, 2010.
- [89] C. Lin, G. Lee, Y. Lin, and G. Chang, "A fast prototyping process for fabrication of microfluidic systems on soda-lime glass," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 11, pp. 726–732, 2001.
- [90] A. Grosse, M. Grewe, and H. Fouckhardt, "Deep wet etching of fused silica glass for hollow capillary optical leaky waveguides in microfluidic devices," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 11, pp. 257–262, 2001.
- [91] C. Nanteuil and A.-M. Haghiri-Gosnet, "Manufacturing process of a microfluidic chip and plate associated," 2010.
- [92] "Klearia microfluidics research and development." <http://www.klearia.com>. Accessed : 2013-06-26.
- [93] A. Datta, S. Gangopadhyay, H. Temkin, Q. Pu, and S. Liu, "Nanofluidic channels by anodic bonding of amorphous silicon to glass to study ion-accumulation and ion-depletion effect," *Talanta*, vol. 68, pp. 659–665, 2006.
- [94] *A particule image anemometry technique for a non-invasive, quick determination of average flow rates in microchannels*, 2007.
- [95] S. Kim, Y. Wang, J. H. Jang, and J. Han, "Concentration polarization and nonlinear electrokinetic flow near a nanofluidic channel," *Physical Review Letters*, vol. 99, pp. 1–4, 2007.
- [96] N. Durand, C. Dellagiacomma, R. Goetschmann, A. Bertsch, I. Marki, T. Lasser, and P. Renaud, "Direct observation of transitions between surface-dominated and bulk diffusion regimes in nanochannels," *Analytical Chemistry*, vol. 81, pp. 5407–5412, 2009.

-
- [97] B. Jachimska and A. Pajor, "Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces," *Bioelectrochemistry*, vol. 87, pp. 138–146, 2012.
- [98] J. Foster, *Albumin Structure, Function and Uses*. Pergamon, Oxford, 1977.
- [99] D. Carter and J. Ho, "Structure of serum albumin," *Adv. Protein Chem.*, vol. 45, pp. 153–203, 1994.
- [100] S. Ko, Y.-A. Song, S. Kim, K. Kang, and J. Han, "Nanofluidic preconcentration device in a straight microchannel using ion concentration polarization," *Lab Chip*, vol. 12, pp. 4472–4482, 2012.
- [101] K. Boonsong, M. Caulum, B. Dressen, O. Chailapakul, D. Crokek, and C. Henry, "Influence of polymer structure on electroosmotic flow and separation efficiency in successive multiple ionic layer coatings for microchip electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 29, pp. 3128–3134, 2008.
- [102] H. Katayama, Y. Ishihama, and N. Asakawa, "Stable cationic capillary coating with successive multiple ionic polymer layers," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 2254–2260, 1998.
- [103] J. Lee, Y.-A. Song, S. Tannenbaum, and J. Han, "Increase of reaction rate and sensitivity of low-abundance enzyme assay using micro/nanofluidic preconcentration chip," *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 9, pp. 3198–3204, 2008. PMID : 18358012.
- [104] L. Cheow and J. Han, "Continuous signal enhancement for sensitive aptamer affinity probe electrophoresis assay using electrokinetic concentration," *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 18, pp. 7086–7093, 2011.
- [105] L. Frazer, "Go with the flow : an updated tool for detecting molecules," *Environ Health Perspect.*, vol. 108(9), pp. A412–4, 2000.