

Charges à l'interface liquide/solide: caractérisation par courants d'écoulement et application à la préconcentration de molécules biologiques dans un système micro/nanofluidique

Xichen Yuan

▶ To cite this version:

Xichen Yuan. Charges à l'interface liquide/solide: caractérisation par courants d'écoulement et application à la préconcentration de molécules biologiques dans un système micro/nanofluidique. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de Lyon, 2016. Français. NNT: 2016LYSE1214. tel-01422096

HAL Id: tel-01422096 https://theses.hal.science/tel-01422096

Submitted on 23 Dec 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2016 LYSE1214

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 160 (Électronique, Électrotechnique, Automatique - EEA)

Spécialité de doctorat : Physique **Discipline** : (Micro et Nanotechnologie)

Soutenue publiquement le 04/11/2016, par : Xichen YUAN

Charges à l'interface liquide/solide : caractérisation par courants d'écoulement et application à la préconcentration de molécules biologiques dans un système micro/nanofluidique

Devant le jury composé de :

JAFFREZIC Nicole	DR CNRS	Université Lyon 1
GAMBY Jean	CR	Université Paris VI
DEJOUS Corinne	Prof.	Bordeaux INP
HAGHIRI-GOSNET Anne-Marie	DR CNRS	Université Paris Sud
DENOROY Luc	DR CNRS	Université Lyon 1
KLEIMANN Pascal	MCF	Université Lyon 1
RENAUD Louis	MCF	Université Lyon 1
AUDRY-DESCHAMPS Marie-Charlotte	MCF	Université Lyon 1
HAGHIRI-GOSNET Anne-Marie DENOROY Luc KLEIMANN Pascal RENAUD Louis AUDRY-DESCHAMPS Marie-Charlotte	DR CNRS DR CNRS MCF MCF MCF	Université Paris Sud Université Lyon 1 Université Lyon 1 Université Lyon 1 Université Lyon 1

Présidente Rapporteur Rapporteur Examinatrice Examinateur Directeur de thèse Co-directeur/Invité Co-directrice/Invitée

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique Vice-président du Conseil d'Administration Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire Vice-président de la Commission Recherche Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADIDM. le Professeur Didier REVELM. le Professeur Philippe CHEVALIERM. Fabrice VALLÉEM. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE	
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON	
	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS	
Faculte a Odontologie	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA Directeur : M. X. PERROT	
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques		
Institut des Sciences et Techniques de la Réadantation		
institut des serences et reeninques de la reedapation	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT	
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie		
Humaine		

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé en français

Les charges à l'interface liquide/solide sont un élément originel majeur des phénomènes électrocinétiques observés en micro/nanofluidique. Elles sont donc la colonne vertébrale de mon manuscrit de thèse, qui se décompose en trois parties :

Dans la première partie, un rappel des concepts de base sur les interfaces liquides/solides est proposé au lecteur. Il est suivi d'une description des différentes méthodes expérimentales permettant de mesurer le potentiel zêta de couples solide/électrolyte, puis d'une présentation des travaux de la littérature exploitant les charges aux interfaces pour la préconcentration de molécules biologiques dans des systèmes Micro-Nano-Micro (MNM) fluidiques.

Ensuite, une deuxième partie est consacrée à la mesure du potentiel zêta par la méthode des courants d'écoulement. Nous y présentons l'amélioration du banc expérimental issu des travaux antérieurs à ma thèse, ainsi que le développement de nouveaux protocoles de préparation des surfaces permettant de rationaliser et de stabiliser les mesures. Une application à un détecteur original de molécules biologiques clôt cette deuxième partie.

Enfin, la troisième et dernière partie s'intéresse à la préconcentration de molécules biologiques. Une méthode originale de fabrication des dispositifs MNM et les résultats de préconcentration obtenus, très encourageants, sont décrits. Des premiers modèles numériques et phénoménologiques sont proposés, qui mettent en avant l'originalité de notre travail.

MOTS-CLES

Microfluidique, nanofluidique, laboratoire sur puce, interface solide/liquide, potentiel zêta, préconcentration.

LABORATOIRE ET ADRESSE

Institut des Nanotechnologie de Lyon, UMR 5270 CNRS-UCBL, Batiment Leon Brillouin, 43 Bd du 11 novembre 1918, Villeurbanne cedex France

Résumé en anglais

The charges at liquid/solid interfaces are a key element for both understanding and exploiting the electrokinetic phenomena in micro/nanofluidics. The manuscript of my Ph.D thesis is dedicated to these phenomena, which is divided into three main parts:

Above all, a simple overview of charges at the liquid/solid interface is proposed. Then, several common methods for measuring the zeta potential at the liquid/solid interface are described. Next, various effective methods to preconcentrate the biological molecules is presented with the help of the surface charges.

Secondly, the streaming current, which is a standard method to measure the zeta potential in our laboratory, is detailed. It contains the upgrade of the experimental setup from the previous version and the development of new protocols, which improve dramatically the stabilization and the reproducibility of the measurements. In addition, an original biological sensor is briefly presented based on these advancements.

Lastly, in the final part, we describe a method which is primitively utilised in the fabrication of Micro-Nano-Micro fluidic system. Based on this system, some favourable preconcentration results is obtained. Moreover, numerical simulations are presented to prove the originality of our work.

KEYWORDS

Microfluidics, nanofluidics, lab-on-a-chip, solid/liquid interface, zeta potential, préconcentration.

Liste des communications

ARTICLES

Yuan, X.; Renaud, L.; Audry, M.-C.; Kleimann, P. "Electrokinetic Biomolecule Préconcentration Using Xurography-Based Micro-Nano-Micro Fluidic Devices" <u>Anal. Chem.</u> 2015, 87, 8695–8701.

Dev, A.; Horak, J.; Kaiser, A.; **Yuan, X.**; Perols, A.; Björk, P.; Karlström, A. E.; Kleimann, P.; Jan Linnros. "Electrokinetic effect for molecular recognition: A label-free approach for real-time biosensing" *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *82*, 55–63.

CONFERENCES

Yuan, X.; Audry, M.-C.; Renaud, L.; Kleimann, P. "Electrokinetic Protein Préconcentration Using a Simple and Rapid Prototyping Glass/Tape Based Micro-Nano-Micro fluidic devices" <u>17ème édition des</u> Journées Nationales du Réseau Doctoral en Microélectronique: Lille, France, **2014**. (Poster)

Yuan, X.; Audry, M.-C.; Renaud, L.; Kleimann, P. "Electrokinetic Protein Préconcentration Using a Simple and Rapid Prototyping Glass/Tape Based Micro-Nano-Micro Fluidic Device" journées nationales du GDR Micro Nano Systèmes - Micro Nano Fluidique: Palaiseau, France, **2014**. (Oral)

Yuan, X.; Audry, M.-C.; Renaud, L.; Kleimann, P. "Electrokinetic Protein Préconcentration Using a Simple and Rapid Prototyping Glass/Tape Based Micro-Nano-Micro fluidic devices" <u>8th NAMIS</u> <u>international School</u>: Hsinchu, Taiwan, **2014**. (Poster)

Dev, A.; Horak, J.; Kaiser, A.; **Yuan, X.**; Afrasiabi, R.; Bjork, P.; Karlstrom, A.-E.; Kleimann, P.; Linnros, J. "Influence of electrokinetic potential on microfluidics integrated silicon nanowire sensor arrays for bio-detection" <u>MRS Fall Meeting & Exhibit</u>, Boston, Massachusetts, **2015**. (Oral)

Remerciements



De gauche à droite :

Pascal Kleimann, Louis Renaud, Xichen Yuan et Marie-Charlotte Audry-Deschamps.

En tout premier lieu, je remercie le ministère Français de m'avoir donné la chance de faire des études en France, ainsi que pour le financement de ma bourse de thèse, sans lequel ces travaux n'auraient pas pu être menés.

Ce travail de thèse a débuté au sein de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL) sous la direction de Mme. Catherine Bru-Chevallier. Je la remercie de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'adresse aussi mes remerciements à mes directeurs de thèse M. Pascal Kleimann (directeur de thèse), M. Louis Renaud (co-directeur de thèse) et Mme. Marie-Charlotte Audry-Deschamps (co-directrice de thèse), pour leur disponibilité, leurs conseils avisés et les nombreuses heures de travail et de

correction de ce manuscrit. Mes remerciements vont aussi aux membres du jury, à commencer par Mme. Nicole Jaffrezic, qui a eu la gentillesse de bien vouloir présider le jury, ainsi qu'aux rapporteurs, Mme. Corinne Dejous et M. Jean Gamby, pour leur précieux temps passé à lire et à juger ce manuscrit. Enfin un grand merci aux examinateurs, Mme Anne-Marie Haghiri-Gosnet et M. Luc Denoroy, d'avoir accepté d'être présents.

Je n'oublie pas les autres membres de l'équipe, à commencer par Magalie Faivre, Jérôme Dégoutte et Nicolas Terrier, ainsi qu'à tous les membres qui ont travaillé à un moment ou à un autre avec moi, à savoir Agnès Piednoir (LIM), Jia Liu (INL-INSA) et Apurba Dev (KTH).

Un merci particulier à tous les membres du laboratoire avec, entre autres, Rosaria Ferrigno, pour son soutien et son aide, ainsi qu'à toutes les personnes que j'ai côtoyées de près ou de loin, Patrick, Philippe, Laurent, Guoneng, Anne-Laure, Jean-François, Yasmina, Vincent et Michel. Je souhaite enfin bonne chance et beaucoup de courage à la relève du laboratoire, Amine, Pierrick, Jaime...

Une pensée aussi pour mes amis à Lyon qui m'ont suivi dans mes sorties/voyages.

Enfin, j'adresse mes plus profonds remerciements à ma mère, mon père, ma femme, mes grandsparents pour leurs encouragements, pour m'avoir accompagné sur ce chemin et sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci infiniment...

Glossaire

Acronymes et abréviations

AA	Acide Acrylique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	Alexa Fluor
AFM	Microscope à force atomique
Al ₂ O ₃	Alumine
AMPS	« 2-Acrylamido-2- Methyl-1-Propanesulfonic Acid »
BODIPY	« Boron-dipyrromethene »
BSA	Albumine de sérum bovin
COMOSS	« Collocated Monolith Support Structure »
DCF	« Dichlorofluorescein »
DLVO	« Derjaguin Landau Verwey and Overbeek »
DMAEMA	« 2-(Dimethylamino)ethyl Methacrylate »
DSA	Albumine de sérum canin
EPFL	École Polytechnique Fédérale de Lausanne
ESC	« Extended Space Charge »
FASS	« Field-Amplified Sample Stacking »
FITC	« Isothiocyanate de fluorescéine »
FPDF	« Feedback Pressure Driven Flow »
GFP	Protéine fluorescente verte
HSA	Albumine de sérum humain

HCl	Acide Chlorhydrique
HEMA	« 2-Hydroxyethyl Methacrylate »
HF	Acide fluorhydrique
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
ICP	« Ion Concentration Polarization »
IEEE	Institut des ingénieurs électriciens et électroniciens
IEF	« Isoelectric Focusing »
INL	Institut des Nanotechnologies de Lyon
ISFET	« Ion Sensitive Field Effect Transistor »
KCl	Chlorure de Potassium
КОН	Hydroxyde de Potassium
KTH	« Kungliga Tekniska Högskolan »
LIL	« Laser Interference Lithography »
LPN	Laboratoire de Photonique et de Nanostructures
MEMS	Microsystème électromécanique
MHDA	« Mercaptohexade-canoic acid »
MNM	Micro-Nano-Micro
MOS	Métal Oxyde Semiconducteur
NaCl	Chlorure de Sodium
NaOH	Hydroxyde de Sodium
NHS	« N-hydroxysuccinimide »
OA	« Ovalbumin »
PA	« Proteins parvalbumin »
PBS	Tampon phosphate salin

PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Polyéthylène glycol
PS	Polystyrène
RIE	Gravure ionique réactive
RT	Transcriptase inverse
SAM	Monocouches Auto-Assemblées
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SiO ₂	Dioxyde de Silicium
SRB	Sulforhodamine B
TBE	« Tris base Boric acid and EDTA »
TGF	« Temperature Gradient Focusing »
TI	Inhibiteur de trypsine
TRITC	isothiocyanate de tétraméthylrhodamine
UV	Ultraviolet

Principales notations

φ	Potentiel électrique (V)
$\Gamma_{\rm Si.O}$ -	Densité de sites Si.O ⁻ (1/m ²)
$\Gamma_{\rm Si.OHH^+}$	Densité de sites Si.OHH ⁺ (1/m ²)
Г _{Si.OH}	Densité de sites Si.OH (1/m ²)
$C_{H^+}^0$	Concentration locale d'ions hydrogène (mol/m ³)
А	Section du capillaire, du microcanal ou du système MNM (m ²)
С	Concentration de fluorescéine (M)
C _{bulk}	Concentration ionique des ions de nature i dans l'électrolyte (1/m ³) Concentration de l'ion i dans l'électrolyte (mol/m ³)
Di	Coefficient de diffusion (m ² /s)
e	Charge électrique élémentaire (C)
Е	Champ électrique appliqué au micro/nanocanal (V/m)
Et	Champ électrique tangentiel (V/m)
F	Constante de Faraday (C/mol)
h	Longueur du trajet du faisceau de lumière à travers l'échantillon (m)
i	Indice de l'espèce ionique considérée ($i \in [1,n]$)
J	Densité de courant (A/m ²)
K ₁	Constante d'équilibre de déprotonation (1)
K ₂	Constante d'équilibre de protonation (1)
K _b	Constante de Boltzmann (J/K)
L	Longueur du capillaire, du microcanal ou du système MNM (m)
L _{micro}	Longueur des microcanaux anodique et cathodique (m)

Wmicro	Largeur des microcanaux anodique et cathodique (m)
h _{micro}	Profondeur des microcanaux anodique et cathodique (m)
L _{nano}	Longueur de la membrane Nafion (m)
Wnano	Largeur de la membrane Nafion (m)
h _{nano}	Profondeur de la membrane Nafion (m)
р	Pression (Pa)
R	Constante des gaz parfaits (J/K/mol)
r _{nano}	Diamètre moyen des pores (m)
\$ nano	Porosité des pores (1)
Т	Température (K)
t	Temps (s)
u	Vitesse de flux (m/s)
u _{m,i}	Mobilité ionique (S·mol/kg)
Х	Distance dans la couche diffuse à partir du plan de glissement
Zi	Valence de l'ion i (1)
Γ_{total}	Densité totale de sites de silice (1/m ²)
ΔP	Différence de pression du microcanal/nanocanal (Pa)
3	Coefficient d'absorption molaire $(M^{-1} \mu m^{-1})$
80	Permittivité du vide (F/m)
ε _r	Permittivité relative de l'électrolyte (1)
ζ	Potentiel zêta de l'interface solide/liquide (V)
η	Viscosité de la solution (Pa.s)
θ	Température d'expérience (°C)
λ_D	Longueur de Debye (m)
μ_{eo}	Mobilité électroosmotique (m ² /s/V)

- ρ Densité du fluide (1/m³)
- Σ Densité de charge de surface (C/m²)
- σ Conductivité (S/m)
- $\phi(x) \qquad \mbox{Potentiel local à la distance x (V)}$

Table des matières

Résumé en français	
Résumé en anglais	
Liste des communications	7
Remerciements	9
Glossaire	
Table des matières	
Introduction générale	
Partie 1 :	
Etat de l'art sur l'interface liquide/solide en micro/nanofluidique et sur la préconcentration	
1 L'interface solide/liquide en micro/nanofluidique	
1.1 Physique de l'interface solide/liquide	
1.1.1 Définitions et concepts généraux	
1.1.2 Modèle de la couche diffuse	
1.2 Intérêt de la charge de surface en micro/nanofluidique	
1.3 Méthodes de mesure de la charge de surface	
1.3.1 Courants d'écoulement	
1.3.2 Suivi de courant et suivi d'un marqueur neutre	
1.3.3 AFM à sonde colloïdale	
2 La préconcentration : un défi pour les laboratoires sur puce	
2.1 Le laboratoire sur puce : définition et fonctionnalités	
2.1.1 Intérêts des laboratoires sur puce	
2.1.2 Les différentes fonctionnalités d'un laboratoire sur puce	
2.2 Les différentes méthodes de préconcentration	
2.2.1 « Field-amplified sample stacking »	

		2.2	.2	« Temperature gradient focusing »	49
		2.2	.3	« Isoelectric focusing »	50
		2.2	.4	Préconcentration à partir de membranes	51
	2	.3	Foc	us sur la préconcentration par « Ion Concentration Polarisation » (ICP)	52
		2.3	.1	Principe de fonctionnement	53
		2.3	.2	Classification des préconcentrateurs basés sur l'ICP dans la littérature	55
3		Coi	nclus	sion	65
Part	ie	2 :			67
Mes	sur	e et o	conti	ôle de la charge de surface à l'interface solide/liquide	67
1		His	storiq	ue, introduction et objectifs	71
2		Am	nélio	ration du banc expérimental de mesure du potentiel zêta par courants d'écoulement	77
	2	.1	Des	cription du banc expérimental initial	77
	2	.2	Lim	itations du banc expérimental initial et améliorations apportées	79
		2.2	.1	Prise en compte des variations de température	80
		2.2	.2	Influence du pH de l'électrolyte	81
	2	.3	Prot	tocole expérimental	84
		2.3	.1	Justification de l'utilisation de capillaires de silice	84
		2.3	.2	Matériels et méthodes	85
3		Etu	des o	des interfaces SiO ₂ /KCl et SiO ₂ /NaCl	89
	3	.1	Effe	et de la concentration sur le potentiel zêta	89
		3.1	.1	Résultats expérimentaux	89
		3.1	.2	Discussion sur l'influence du type d'ion (KCl et NaCl)	92
	3	.2	Am	élioration du protocole expérimental : vers une interface stable	92
		3.2	.1	Nettoyer la surface APRES l'exposition de KCl/NaCl	93
		3.2	.2	Nettoyer la surface AVANT l'exposition de KCl/NaCl	94
	3	.3	Inte	rprétation « physico-chimique » des résultats obtenus	96
		3.3	.1	Diminution du potentiel zêta dans les capillaires sans prétraitement	96

	3.3.2	Augmentation de la valeur absolue de potentiel zêta après le prétraitement K0 96	OH∕NaOH
3.4	4 Per	spectives : propositions de manipulations complémentaires	
4	Applic	ation des courants d'écoulement aux capteurs biologiques	
5	Conclu	sion	
Partie 3	3 :		
Mise ei	n œuvre	de la préconcentration par ICP dans un système MNM à membrane	
1	Introdu	ction et objectifs	111
2	La Xur	ography : une technologie originale pour la fabrication de dispositifs MNM	115
2.	1 La	Xurography	116
2.2	2 Av	antages et inconvénients de la Xurography	
2	3 Pro	tocoles de fabrication détaillés suivant le type de membrane	
	2.3.1	Les membranes de type « éponge » : dispositifs MNM 2D (ou « planaires »)	
	2.3.2	Les membranes de type « colonnaires » : dispositifs MNM 3D	123
3	Banc e	xpérimental et quantification de la préconcentration	
3.	1 De	scription du banc expérimental	127
3.2	2 Pro	tocole de préconcentration	129
3	3 Qu	antification par fluorescence de la préconcentration	
	3.3.1	Rappel théorique	
	3.3.2	Dispositifs de calibration	
	3.3.3	Courbes de calibration	
	3.3.4	Effet du pH	
	3.3.5	Exemple de calcul du taux de préconcentration	
	3.3.6	Effet de la répartition des espèces fluorescentes dans l'épaisseur du canal	
4	Systèm	es MNM à membrane Nafion	
4.	1 Eff	et de la tension d'activation et de la largeur de membrane	
4.2	2 Eff	et de la force ionique de l'électrolyte	149
5	Autres	types de membranes	
			19

	5.1	Membrane de polycarbonate	153	
	5.2	Membrane d'alumine		
	5.3	Membrane d'agarose	155	
	5.4	Réseau de nanofentes en verre	157	
	5.5	Puce de préconcentration à bulle	160	
	5.6	Récapitulatif des différents préconcentrateurs MNM réalisés	162	
6	Мс 163	odélisation et description phénoménologique de la préconcentration dans le mode symét	rique	
	6.1	Considérations théoriques - problématiques	164	
	6.1	.1 Position du problème	165	
	6.1	.2 Problématiques au niveau de la membrane de Nafion	168	
	6.1	.3 Problématiques au niveau de la zone déplétée	168	
	6.2	Vers un modèle simplifié de l'électropréconcentration en mode symétrique	170	
	6.2	.1 Comportements électriques et hydrodynamiques de la membrane de Nafion	170	
	6.2	.2 Etude du transport ionique restreint au microcanal anodique	175	
	6.2	.3 Problématique des conditions aux limites proches de la membrane	176	
	6.2	.4 Influence du FPDF sur la dimension de la zone déplétée	177	
	6.3	Description phénoménologique de l'électro-préconcentration en mode symétrique	179	
	6.3	.1 Nécessité d'un modèle 2D	180	
	6.3	.2 Vers un modèle 2D simplifié	180	
	6.3	.3 Résultats de la simulation	181	
	6.4	Conclusion	185	
7	Co	nclusion	187	
8	Ré	férence	189	
Con	Conclusion générale et perspectives			
Ann	exe		199	
A	. Le	modèle « site binding »	199	
B.	Cal	lcul de pH dans la zone de préconcentration	203	

C. flui	Cal diqu	lcul (e d'I	de la résistance électrique et de la résistance hydrodynamique du préconcentrateur INL, EPFL et LPN	MNM		
D.	Détail de modèle 1D sans considérer/en considérant le FPDF dans la partie microcanal anodique 213					
D.1 Introduction						
	D.1	1.1	Géométrie	213		
	D.1	1.2	Les paramètres	214		
Ε	0.2	Mo	dèle physique : Transport of Diluted Species	215		
	D.2	2.1	Propriétés de transport (sans FPDF)	215		
	D.2	2.2	Propriétés de transport (avec FPDF)	216		
	D.2	2.3	Valeurs initiales	216		
	D.2	2.4	Concentration (côté du réservoir)	217		
	D.2	2.5	Concentration (côté de la membrane)	217		
Γ).3	Mo	dèle physique : Poisson's Equation	218		
	D.3	3.1	L'équation de Poisson	218		
	D.3	3.2	Valeurs initiales	219		
	D.3	3.3	Dirichlet Boundary Condition (côté du réservoir)	219		
	D.3	3.4	Dirichlet Boundary Condition (côté de la membrane)	220		
Γ) .4	Cou	uplage	220		
Γ) .5	Rés	sultats	220		
E. ano	Dé ^r diqu	tail o e	du modèle 2D sans considérer ou en considérant le FPDF dans la partie micro	ocanal 221		
E	2.1	Intr	oduction	221		
	E.1	.1	Géométrie	221		
	E.1	.2	Les paramètres	222		
	E.1	.3	Définitions des trois parties du microcanal anodique	222		
E	2.2	Mo	dèle physique : Electric Currents	224		
	E.2	2.1	Isolation électrique	225		

E.2.2	2 Valeur initiale			
E.2.	3 Le potentiel électrique (côté de la membrane)			
E.2.4	4 Le potentiel électrique (côté du réservoir)			
E.3	Modèle physique : Le flux laminaire			
E.3.	1 Les propriétés du fluide			
E.3.	2 Valeur initiale			
E.3.	3 Paroi (côté du réservoir)			
E.3.4	4 Paroi avec les charges (avec le potentiel zêta)			
E.3.:	5 Paroi (côté de la membrane)			
E.4]	Modèle physique : Transport of Diluted Species			
E.4.	1 Propriétés de transport			
E.4.2	2 Flux nul			
E.4.	3 Valeur initiale			
E.4.4	4 La concentration de la protéine			
E.5	Couplage			
E.6	Résultats			
F. Article publié dans « Analytical chemistry »				

Introduction générale

L'Institut des Nanotechnologies de Lyon, et plus particulièrement l'équipe « lab-on-a-chip et Instrumentation » dans laquelle j'ai effectué ma thèse, s'intéressent à la micro/nanofluidique et aux laboratoires sur puce depuis maintenant plus de quinze ans. De par l'augmentation considérable du rapport surface sur volume, les phénomènes physiques à l'interface entre un solide et un électrolyte sont d'une importance capitale en micro/nanofluidique; en particulier la charge de surface et son corollaire : la couche diffuse. Il est donc essentiel de les connaître et de les maîtriser, bien sûr pour comprendre et anticiper les phénomènes observés, mais aussi pour les exploiter de manière optimale dans le cadre de projets applicatifs. Les charges aux interfaces sont donc le fil conducteur de ma thèse, depuis leurs mesures jusqu'à leur exploitation pour la réalisation d'un système de préconcentration de molécules biologiques, qui est une thématique nouvelle de l'équipe.

La première partie de mon manuscrit est donc naturellement consacrée, tout d'abord, à la description de la physique de l'interface liquide/solide, et aux principales grandeurs qui lui sont associées. Puis, les méthodes de mesures du potentiel zêta les plus couramment utilisées y sont rappelées. Enfin, pour conclure, la préconcentration de molécules biologiques, qui exploite très majoritairement les charges aux interfaces, sera présentée, et une étude bibliographique de la littérature consacrée à cette thématique sera proposée au lecteur.

Pour un scientifique, comprendre un phénomène c'est d'abord l'observer et le mesurer de manière fiable. La mesure du potentiel zêta, qui n'est pas une problématique simple, fera donc l'objet de la deuxième partie de mon manuscrit. Une nouvelle version du banc de mesure par courants d'écoulement a été développée pour ma thèse, plus précise et plus fiable; et de nouveaux protocoles de mesures ont été mis au point. Je montrerai que ce nouveau banc de mesure et ces nouveaux protocoles ont permis d'améliorer considérablement la mesure du potentiel zêta, mais surtout de la rendre plus objective et reproductible. Ce travail a aussi été valorisé pour la conception d'un capteur de molécules biologiques très original et prometteur, dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut Royal de Technologie de Stockholm.

Dans le contexte général des travaux sur le « laboratoire sur puce », Everest d'une très large part de la communauté micro/nanofluidique, la préconcentration de molécules biologiques reste encore un défi majeur à relever. La troisième partie de ma thèse est consacrée à ce travail, qui est une première au laboratoire et dans mon équipe. Dans ce cadre, je montrerai comment l'utilisation d'une technologie basée sur la découpe de films polymères a permis de simplifier considérablement la fabrication de puces dédiées à la préconcentration. Les protocoles expérimentaux et les résultats obtenus seront décrits de manière détaillée, ainsi que l'étude des paramètres permettant d'optimiser le taux de préconcentration. Une première ébauche des modèles phénoménologiques de la préconcentration sera proposée, afin de comprendre et d'expliquer dans un premier temps les phénomènes physiques en jeu. Ce modèle a permis de mettre en évidence la singularité et l'originalité de notre mode de préconcentration, en le comparant avec ceux proposés dans la littérature.

Partie 1 : Etat de l'art sur l'interface liquide/solide en micro/nanofluidique et sur la préconcentration

Sommaire

$\underline{1}$ <u>L'inte</u>	rface solide/liquide en micro/nanofluidique	
<u>1.1 Pł</u>	nysique de l'interface solide/liquide	
<u>1.1.1</u>	Définitions et concepts généraux	
<u>1.1.2</u>	Modèle de la couche diffuse	
<u>1.2</u> <u>In</u>	térêt de la charge de surface en micro/nanofluidique	
<u>1.3</u> <u>M</u>	éthodes de mesure de la charge de surface	
<u>1.3.1</u>	Courants d'écoulement	
<u>1.3.2</u>	Suivi de courant et suivi d'un marqueur neutre	
<u>1.3.3</u>	AFM à sonde colloïdale	
<u>2</u> <u>La pré</u>	econcentration : un défi pour les laboratoires sur puce	41
<u>2.1</u> Le	e laboratoire sur puce : définition et fonctionnalités	
<u>2.1.1</u>	Intérêts des laboratoires sur puce	
<u>2.1.2</u>	Les différentes fonctionnalités d'un laboratoire sur puce	
<u>2.2</u> Le	es différentes méthodes de préconcentration	
2.2.1	« Field-amplified sample stacking »	
2.2.2	« Temperature gradient focusing »	
2.2.3	<u>« Isoelectric focusing »</u>	
<u>2.2.4</u>	Préconcentration à partir de membranes	
<u>2.3</u> <u>Fo</u>	ocus sur la préconcentration par « Ion Concentration Polarisation » (ICP)	
<u>2.3.1</u>	Principe de fonctionnement	

	2.3.2	Classification of	des préconcer	ntrateurs basé	s sur l'ICP	dans la	littérature	
<u>3</u>	Conclus	<u>sion</u>						

La microfluidique et la nanofluidique, nées il y a environ vingt ans pour l'une et environ dix ans pour l'autre, sont des domaines scientifiques très pluridisciplinaires. Or, par l'augmentation des rapports de surface sur volume et par l'utilisation des phénomènes électrocinétiques, les charges de surfaces et la couche diffuse présentes aux parois des systèmes micro/nanofluidiques sont essentielles à leur fonctionnement. Il est très souvent primordial de les connaître, de savoir les mesurer, pour pouvoir les utiliser de manière optimale dans le domaine applicatif. Cette première partie bibliographique de mon manuscrit de thèse sera donc consacrée aux charges de surfaces, à la définition des termes et des concepts de base les concernant, aux méthodes de mesures les plus courantes, et à leur exploitation pour la préconcentration de molécules biologiques, qui sera l'objectif principal de ma thèse.

1 L'interface solide/liquide en micro/nanofluidique

Ce premier chapitre propose au lecteur de rappeler les éléments les plus importants liés à l'interface liquide/solide en micro/nanofluidique. Les charges de surfaces sont un sujet extrêmement vaste et il ne s'agit pas ici d'en développer l'ensemble des éléments de manière exhaustive. Nous nous bornerons plutôt à en décrire les concepts de base, suffisants pour comprendre mon travail de thèse, ainsi que les principales méthodes de mesure de ces charges de surfaces.

1.1 Physique de l'interface solide/liquide

1.1.1 Définitions et concepts généraux

Lorsqu'un liquide est mis en contact avec un solide, l'interface ainsi créée se charge, à cause de la dissociation de groupements de surface, ou de l'adsorption des molécules à la surface. Par exemple, la silice, possédant des groupements silanol Si-OH, est sujette à la déprotonation de ces sites surfaciques. Ces sites laissent ainsi leur place à des groupements Si.O⁻ sur la surface, qui devient alors globalement chargée négativement suivant les conditions physico-chimiques.¹ Cette dissociation dépend des espèces présentes dans la solution, du pH, de la température, etc.² Les oxydes ne sont pas les seuls solides capables de se charger en solution. En effet, même les polymères, a priori sans sites dissociables en surface, peuvent pourtant acquérir spontanément une charge par adsorption ou exhiber une charge par fonctionnalisation.³ Il existe un modèle, nommé « Site Binding », permettant de modéliser la charge de surface, qui consiste à prendre en compte l'ensemble des réactions chimiques et des adsorptions à la surface, et qui est présenté en détail en annexe A (Site Binding). Ce modèle permet de comprendre l'influence du pH de la force ionique et de la composition de l'électrolyte, et nous y reviendrons dans la partie 2 de cette thèse.

Considérons une interface chargée en solution, par exemple une surface de silice en contact avec une solution aqueuse. Cette interface est en réalité très souvent complexe, et l'étude de la littérature montre qu'une très grande diversité de modèles et de représentations sont proposées pour la décrire.⁴ Nous prenons le parti ici de ne présenter, en figure 1, qu'un modèle simplifié de cette interface: le modèle de Gouy-Chapman-Stern⁵.



Figure 1 : Modèle de Gouy-Chapman-Stern : distribution des espèces ioniques dans la solution près de l'interface chargée.

Dans ce modèle simplifié, nous avons considéré une interface chargée négativement. Au plus proche du solide, sur l'équivalent d'une ou deux couches atomiques, se situe la couche de Stern, constituée de molécules d'eau et d'ions principalement de charge opposée à celle de l'interface (on parle alors de « contre-ions »). Ces contre-ions présentent deux caractéristiques principales : ils écrantent partiellement la charge de surface, et ils sont très peu mobiles car adsorbés. Au-delà de la couche de Stern, les contre-ions sont mobiles et soumis à deux forces opposées : d'une part l'attraction électrostatique causée par la charge de surface, et d'autre part l'agitation thermique qui a tendance à les faire diffuser. On parle alors de la « couche diffuse ». Le plan situé entre ces deux couches peut être considéré, dans certaines conditions, comme le « plan de glissement hydrodynamique », plan à partir duquel les ions sont mobiles. La couche diffuse, globalement chargée de manière opposée à la surface, écrante progressivement la charge de surface jusqu'à retrouver une neutralité locale dans l'électrolyte, loin de l'interface. Si l'on considère que le tampon est la référence des potentiels électriques, alors on nomme « potentiel zêta » ou « ζ », le potentiel du plan de glissement hydrodynamique. Ce potentiel (en V) est bijectivement lié à la charge de surface (en C/m²) par l'équation de Grahame :

Equation 1 :

$$\sigma = \sqrt{8C_{bulk}\varepsilon K_b T} \sinh\left(\frac{e\zeta}{2K_b T}\right)$$

Où : σ est la densité de charge de surface ; C_{bulk} est la concentration de solution de bulk ; ϵ est la permittivité de solution, T est la température, e est la charge de électron, ζ est le potentiel zêta et K_b est la constante de Boltzmann. Attention, cette relation entre sigma et zêta est valable dans le cas d'un sel monovalent.

Le tableau 1 donne les ordres de grandeurs de la valeur typique du potentiel zêta pour quelques matériaux mis en contact avec un tampon KCl à 0.1 mM et pH = 7 :⁶

Tableau 1 : Potentiel zêta et la charge de surface de SiO₂, Al₂O₃, MgO et NiO avec 10⁻⁴ M de KCl, pH = 7.⁶

matériaux	SiO_2	Al_2O_3	MgO	NiO
potentiel zêta (mV)	-49.1	27.1	18	44.8
charge de surface (mC/m²)	-4.24	2.1	1.36	3.77

Il arrive parfois, et c'est le cas pour mon travail de thèse, que l'on puisse considérer un modèle encore plus simple que celui de Gouy-Chapman-Stern, qui consiste à ne considérer que la couche diffuse et le potentiel zêta, c'est-à-dire en éliminant la couche de Stern et le potentiel d'interface réel. En effet, les phénomènes électrocinétiques dont nous parlerons plus loin (électroosmose, courants d'écoulement, etc...) et le phénomène d'exclusion ionique utilisé pour la préconcentration peuvent parfaitement se comprendre et se modéliser sans utiliser la couche de Stern, mais en tenant compte uniquement de la couche diffuse. Finalement, dans ce modèle simplifié, la charge de surface englobe celle de la couche de Stern. La couche diffuse étant, finalement, l'élément le plus important pour les phénomènes électrocinétiques intervenants en micro/nanofluidique, le prochain paragraphe lui est consacré, avec notamment une étude de la répartition des ions au sein de cette couche.

1.1.2 Modèle de la couche diffuse

Comme nous venons de le décrire, à l'interface liquide/solide, dans la couche diffuse, les ions de l'électrolyte sont soumis à deux forces opposées : l'attraction électrostatique pour les contre-ions (ou la répulsion, pour les co-ions) et l'agitation thermique.⁷ L'influence de la compétition entre ces deux forces sur la répartition des ions et du potentiel électrostatique peut être décrite par l'équation de Poisson-Boltzmann à une dimension, dans laquelle l'énergie électrostatique $E_{st} = z_i * e^* \varphi(x)$ est contrebalancée par l'énergie thermique $E_{th} = K_b * T$. On obtient alors l'équation :⁵

Equation 2 :

$$\nabla^2 \varphi(\mathbf{x}) = -e/\varepsilon \sum_i z_i C_{bulk} e^{-z_i e \varphi(\mathbf{x})/K_{\rm b} T}$$

Où:

x est la distance dans la couche diffuse à partir du plan de glissement hydrodynamique

 $\phi(x)$ est le potentiel local à la distance x (V),

e est la charge élémentaire (C),

 ϵ est la permittivité de solution (F/m),

 z_i est la valence des ions de nature i,

C_{bulk} est la concentration ionique des ions de nature i dans l'électrolyte pour x infini (1/m³),

K_b - la constante de Boltzmann (J/K),

T - la température (K).

A partir de cette équation, on peut déduire le potentiel local $\varphi(x)$ et la distribution des espèces ioniques C_i^x analytiquement dans la couche diffuse dans le cas des électrolytes symétriques, comme le KCl, par exemple. Remarquons tout d'abord que, théoriquement, par la forme exponentielle de l'équation de Poisson-Boltzmann, la dimension de la couche diffuse est infinie.

En faisant l'hypothèse de faibles potentiels de surface, c'est à dire $z_i * e^* \phi(x) \ll K_b T$, dans un mono électrolyte 1:1, alors l'équation de Poisson-Boltzmann peut être linéarisée, et l'on obtient l'équation 2 :⁸

Equation 3:

$$\nabla^2 \varphi(\mathbf{x}) = \frac{1}{\lambda_D^2} \, \varphi(\mathbf{x})$$

Où:

 λ_D est une grandeur qui peut être ramenée à une longueur, nommée longueur de Debye (m) :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon K_b T}{2e^2 C_{bulk}}}$$



Figure 2 : Distribution des ions C_i^x près de l'interface solide/liquide et représentation de la longueur de Debye (λ_D) .

La figure 2 montre la distribution des ions que l'on obtient alors dans la couche diffuse. Comme attendu, la concentration des contre-ions est beaucoup plus élevée que celle des co-ions dans la couche diffuse. Le tableau 2 présente les longueurs de Debye λ_D correspondant à différentes concentrations de solution C_{bulk} de KCl :

KCl concentration (mol/L)	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		

Tableau 2 : Longueur de Debye λ_D pour des concentrations de KCl à 25 °C.

Le calcul montre que les longueurs de Debye sont très faibles aux concentrations usuelles d'électrolytes. En pratique, la couche diffuse dépasse rarement quelques dizaines de nm.

Nous définirons la frontière entre microcanal et nanocanal de manière relative à la longueur de Debye, c'est-à-dire de manière indirecte à la concentration de l'électrolyte (figure 3). On parlera de microcanal lorsque la dimension typique du système fluidique sera beaucoup plus grande que la longueur de Debye, c'est-à-dire lorsque la couche diffuse n'en n'occupera qu'une très faible portion et que la zone neutre de l'électrolyte la majeure partie. Inversement, dans un nanocanal, lorsque la dimension typique du système devient du même ordre de grandeur que la longueur de Debye, on obtient un recouvrement des couches diffuses de parois opposées, et la disparition de la zone neutre dans l'électrolyte. Il est bien

entendu possible de rencontrer, au sein d'une seule puce micro/nanofluidique, les deux types de canaux sous forme de réseaux interconnectés.



Figure 3 : Définition d'un microcanal (non-recouvrement des couches diffuses) et d'un nanocanal (recouvrement des couches diffuses).

Les électrolytes plus complexes que les électrolytes symétriques et/ou les potentiels de surface plus élevés que 25 mV⁴ aboutissent à des solutions de l'équation 1 complexes, mais qui s'approchent relativement bien de la simplification proposée en équation 2. Dans tous les cas, ces simplifications sont suffisantes pour comprendre les éléments de ma thèse, et seront considérés comme telles pour la suite de la présentation de mes travaux. Je propose de nous intéresser maintenant à l'intérêt pratique du potentiel zêta et de la couche diffuse en micro/nanofluidique, notamment pour les applications utilisant les phénomènes électrocinétiques qui leur sont liés.

1.2 Intérêt de la charge de surface en micro/nanofluidique

On comprend aisément qu'aux échelles de la microfluidique et de la nanofluidique, les effets d'interfaces, qu'ils soient d'origine électrostatique ou non, prennent une importance primordiale, à cause de l'augmentation drastique du rapport surface/volume. La rugosité des parois, par exemple, que l'on néglige bien souvent aux grandes échelles, est un problème parfois très problématique en micro/nanofluidique : tous les expérimentateurs qui ont tenté en vain de chasser une bulle d'air coincée dans une aspérité d'un microcanal ne le savent malheureusement que trop bien. Le potentiel zêta d'une interface, et par suite la dissymétrie des populations ioniques dans la couche diffuse, ont été exploités pour réaliser un certain nombre de fonctions en micro/nanofluidique. Je n'ai pas l'ambition d'en faire ici la liste exhaustive, aussi nous bornerons-nous à en décrire ici deux, qui seront utilisés notamment pour réaliser la préconcentration dans la troisième partie de mon manuscrit : l'électroosmose et le phénomène d'exclusion ionique.

Considérons un microcanal dont les parois sont chargées négativement lorsqu'il est rempli par un électrolyte donné. Appliquons une tension aux bornes de ce canal, un champ électrique apparaît alors dans l'électrolyte. Ce champ électrique tend à déplacer les charges à la paroi, mais, rappelons-le, celles-ci ne sont pas mobiles; tandis que les charges situées dans la couche diffuse peuvent se déplacer. Dans le cas présent il s'agit de cations, qui vont donc se mouvoir dans le sens du champ électrique. Par un effet de friction, leur déplacement va entraîner celui du fluide, dans son ensemble. C'est ce que l'on appelle l'électroosmose, qui peut se résumer comme un transfert d'énergie électrique en énergie cinétique. L'électroosmose n'est possible que si les charges à la paroi sont en nombre suffisant pour entraîner les fluides, dit autrement : lorsque le rapport surface sur volume est favorable. Ce phénomène est connu depuis longtemps, et les premiers éléments théoriques ont été développés dès 1903 par Smoluchowski (équation 4), qui donne la vitesse électroosmotique de l'électrolyte, V_{eo} :^{6,8–10}

Equation 4 :

$$V_{eo} = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} E$$

Où:

 ε_r - est la permittivité relative de l'électrolyte,

 ε_0 - la permittivité du vide (F/m),

 ζ - le potentiel zêta de l'interface solide/liquide (V),

 η - la viscosité de la solution (Pa.s),

E - le champ électrique appliqué au micro/nanocanal (V/m).

Cette équation montre que la vitesse électroosmotique est proportionnelle, non seulement au champ électrique dans le canal, et donc à la tension appliquée à ces bornes, mais aussi au potentiel zêta du couple solide/liquide considéré. Il sera donc possible de moduler cette vitesse de manière très simple en modifiant l'un ou l'autre de ses deux paramètres. Un autre avantage majeur de l'électroosmose réside dans la forme très particulière de l'écoulement obtenu. En effet, contrairement aux écoulements hydrodynamiques qui sont toujours de forme plus ou moins paraboliques, l'écoulement électroosmotique est de forme zone, c'est-à-dire avec une vitesse pratiquement constante du fluide sur une section droite du canal. Cette forme d'écoulement est particulièrement avantageuse pour le transport de masse car elle limite considérablement la dispersion de matière. De plus, l'écoulement électroosmotique ne se produira que dans les zones dans lesquelles un champ électrique est présent, et donc, dans un système
micro/nanofluidique complexe il sera possible d'adresser les écoulements dans des zones précisément choisies par des jeux de potentiels électriques aux entrées/sorties du système. Enfin, le fait de ne pas utiliser de pression annule les risques de fuite et simplifie considérablement le banc expérimental.

Dans un canal nanofluidique, par définition, les couches diffuses présentes à proximité des parois se recouvrent, et la zone neutre de l'électrolyte disparaît. On parle de recouvrement des couches diffuses, qui conduit à une quasi-exclusion des co-ions dans le nanocanal, car les couches diffuses sont par nature très majoritairement peuplées de contre-ions. On emploie le terme « d'exclusion ionique » pour décrire ce phénomène. Dit autrement, le recouvrement des couches diffuses revient à créer une barrière de potentiel pour les co-ions à l'entrée du nano canal. Cette barrière de potentiel sera employée par la suite notamment pour la réalisation d'une fonction de préconcentration, comme nous le verrons plus loin dans cette première partie de mon manuscrit. Sans la charge de surface, la préconcentration par exclusion ionique n'existerait pas. On peut penser de manière intuitive que ces deux phénomènes seront liés non seulement à la dimension du nanocanal mais aussi au potentiel zêta de l'interface. La mesure du potentiel zêta est donc un enjeu important, qui fera l'objet de la deuxième partie de mon manuscrit, et dont le chapitre suivant se propose de faire l'étude bibliographique.

1.3 Méthodes de mesure de la charge de surface

1.3.1 Courants d'écoulement

Très pratique à mettre en œuvre, la méthode des courants d'écoulement est utilisée par de nombreuses équipes pour caractériser la charge de surface dans des microcanaux ou des nanocanaux.^{11–17} Son principe, décrit en figure 4, est assez simple, et dual de l'électroosmose : un canal est rempli par un électrolyte puis mis en pression. L'écoulement obtenu entraîne avec lui les charges présentes dans la couche diffuse (mais pas celles situées à la paroi), ce qui aboutit à la production d'un courant électrique, nommé « courant d'écoulement » et noté « I_e », proportionnel à la pression appliquée et au potentiel zêta. Ce courant électrique est collecté via deux électrodes, en platine la plupart du temps, et mesuré par un picoampèremètre.



Figure 4 : Principe de la mesure de potentiel zêta par mesure d'un courant d'écoulement.

La relation de proportionnalité entre le potentiel zêta au plan de glissement hydrodynamique et le courant d'écoulement obtenu pour une pression donnée est connue et déjà démontrée.⁹ Elle permet d'en déduire l'équation 4 :

Equation 5 :

$$\zeta = I_e \frac{\eta L}{\varepsilon A \Delta p}$$

Où:

A - la section du microcanal/nanocanal (m²),

 ΔP - la différence de pression du microcanal/nanocanal (Pa),

L - la longueur du microcanal/nanocanal (m).

Par ses nombreux avantages, cette méthode de mesure a été celle que nous avons privilégiée pendant ma thèse pour la mesure du potentiel zêta ou, ce qui revient au même, des charges de surfaces : elle est relativement simple à mettre en œuvre, très rapide, automatisable, et ne nécessite pas de marqueur chimique particulier. De plus, comme nous le verrons dans la deuxième partie de mon manuscrit, les courants d'écoulement permettent de réaliser des mesures sur des temps très longs, et donc d'observer des variations temporelles parfois inaccessibles aux autres méthodes de mesures. Parmi ces autres techniques de caractérisation, la méthode du suivi de courant donne lieu au paragraphe suivant.

1.3.2 Suivi de courant et suivi d'un marqueur neutre

Le suivi de courant^{18–21} est une méthode pour caractériser la charge de surface dans un microcanal, qui est directement basée sur le phénomène d'électroosmose décrit précédemment.



Figure 5 : Principe du suivi de courant.

Le principe du suivi de courant est le suivant : un canal est rempli par un électrolyte donné (concentration C_1 sur la figure 5), puis cet électrolyte est remplacé dans le réservoir d'entrée par un deuxième électrolyte (concentration C_2 sur la figure 5) exactement de même nature mais dont la concentration est très légèrement inférieure (typiquement 95%). Un écoulement électroosmotique est alors créé entre l'entrée et la sortie du canal. L'électrolyte de concentration inférieure remplace alors progressivement l'électrolyte initial jusqu'à totalement remplir le canal. Au cours de ce remplacement, le courant électrique traversant le canal diminue de manière progressive, et c'est le temps que met cette diminution de courant qui nous renseignera sur la vitesse électroosmotique, et donc sur le potentiel zêta.

Une autre méthode, elle aussi basée sur l'électroosmose, et assez couramment utilisée dans la littérature, consiste à suivre une molécule neutre et observable lors de son déplacement dans le canal sous un flux électroosmotique.²² La figure 6 en présente le principe. Après remplissage du canal par un électrolyte et introduction d'un marqueur neutre, une tension est appliquée aux bornes du canal et le passage du marqueur neutre est mesuré par un capteur. Comme pour le suivi de courant, c'est le temps que va mettre le marqueur pour rejoindre le capteur qui va nous renseigner sur la vitesse électroosmotique, et donc le potentiel zêta.



Figure 6 : Principe du suivi d'un marqueur neutre²³.

Le principal avantage de ces deux méthodes (suivi de courant et suivi d'un marqueur neutre) réside dans leur simplicité, mais contrairement à la méthode du courant d'écoulement, qui donne un résultat quel que soit le signe potentiel zêta, il faut ici anticiper ce signe afin de polariser correctement le canal. De plus, lorsque le potentiel zêta est très faible, le remplacement des liquides ou le déplacement du marqueur neutre peuvent être très long; ce qui n'arrive pas avec la mesure de courant d'écoulement dont la valeur dépend de zêta, bien sûr, mais pas la durée de l'expérience.

Les mesures de suivi de courant, de suivi d'un marqueur neutre et de courant d'écoulement ont un point commun : elles nécessitent toutes trois la réalisation d'un canal, c'est-à-dire : des gravures, des collages, etc.... Or, cela n'est pas toujours réalisable. Il est alors possible d'utiliser une autre méthode de mesure, sur des surfaces planes, basé sur l'utilisation de sondes AFM colloïdales.

1.3.3 AFM à sonde colloïdale

Le microscope à force atomique (AFM) peut aussi être utilisé pour mesurer le potentiel de surface d'un échantillon en solution. Le principe de l'AFM est de mesurer la déviation d'un faisceau laser reflété en bout de levier (ou ressort) par une photodiode. Ce levier, monté sur un élément piezo-électrique et muni d'une pointe effilée, est soumis aux interactions pointe/surface qui le fléchissent proportionnellement à leur intensité. Plusieurs modes existent pour relever la topographie de l'échantillon en régulant l'altitude du piezo pour garder la consigne constante (déflexion ou amplitude d'oscillation du levier par exemple). En mode « courbe de force », l'AFM mesure la force d'interaction entre une sonde micrométrique et une surface plane en fonction de la distance les séparant. Pour ce mode, il est préférable d'utiliser un colloïde sphérique collé en bout de levier pour contrôler la géométrie du contact tout en augmentant l'intensité des forces d'interaction.²⁴ A partir de cet enregistrement des forces d'interaction en fonction de la distance, et connaissant le potentiel surfacique de la sonde dans l'électrolyte utilisé, il est possible de remonter au potentiel de surface de l'échantillon par ajustement de la courbe avec le modèle d'interaction DLVO, combinaison des forces attractives de van der Waals et des forces électrostatiques. La figure 7 ci-dessous montre schématiquement, à gauche, une sonde colloïdale en interaction avec un échantillon ; à droite, un exemple de courbes de force en échelle log, associées avec leurs ajustements, dans le cas d'une sonde en borosilicate interagissant avec une surface de silice pour plusieurs concentrations de chlorure de sodium.



Figure 7 : A gauche, schéma d'une sonde colloïdale interagissant avec une surface sous AFM ; à droite, exemple de courbes de force et leurs ajustements dans le cas d'une sonde en borosilicate interagissant avec une surface de silice dans différentes concentrations de chlorure de sodium.

Cette mesure est particulièrement intéressante car elle ne nécessite aucun système microfluidique (juste une goutte d'électrolyte) et peut être directement réalisée sur un échantillon plat. En revanche, la calibration du potentiel de la sonde et l'obligation de la conserver dans un excellent état de propreté s'avèrent délicats.

2 La préconcentration : un défi pour les laboratoires sur puce

La recherche dans le domaine de la micro/nanofluidique a été très active au cours des deux dernières décennies, motivée notamment par les énormes progrès potentiels des systèmes d'analyses biomédicales miniaturisés.²⁵ Ces systèmes sont communément appelés « laboratoire sur puce », ou, en anglais, "lab-on-a-chip", qui intègrent plusieurs étapes de traitement à faible volume dans une seule puce:²⁶ préconcentration, séparation, réaction chimique, détection, etc... qui ont déjà été démontrées avec succès sur une échelle miniaturisée.²⁷

Cependant, la détection et la quantification des biomolécules à de très faibles concentrations restent des problèmes majeurs dans les systèmes microfluidiques, surtout quand d'autres espèces avec de fortes concentrations sont impliquées. Par exemple, dans le sang, il y a plus de 10 000 biomolécules différentes (acides aminés, peptides ...) avec des concentrations variant de quelques centaines de 10⁻¹² M à 10⁻³ M.^{28,29} De toute évidence, il est extrêmement difficile de détecter des biomolécules particulières, par exemple à des concentrations très faibles de l'ordre de 10⁻¹² M parmi d'autres biomolécules plus concentrées, jusqu'à 10⁻³ M. Ainsi, la complexité des échantillons biologiques est un énorme défi pour les méthodes d'analyse et de détection de biomolécules existantes puisque seulement quelques-unes d'entre elles ont à la fois un niveau de détection ultrasensible et une excellente sélectivité. Donc, un préconcentrateur de biomolécule à haute efficacité est souvent nécessaire afin d'améliorer la limite de détection et indirectement d'élargir la gamme de détection.

Dans ce chapitre, nous verrons d'abord présenter l'intérêt des laboratoires sur puce, et les fonctions qui leur sont associées. Nous nous focaliserons alors sur les différentes méthodes de préconcentration proposées dans la littérature, et plus particulièrement sur celle basée sur l'ICP.

2.1 Le laboratoire sur puce : définition et fonctionnalités

2.1.1 Intérêts des laboratoires sur puce

Les analyses biologiques et chimiques ne sont pas les seules applications de la micro/nanofluidique aujourd'hui, mais elles restent toutefois un enjeu majeur de cette discipline de recherche. Comme chacun le sait, ces analyses sont aujourd'hui couramment réalisées dans des laboratoires spécialisés, en ville ou dans les hôpitaux. Ces laboratoires font appel à du personnel très qualifié, et du matériel extrêmement spécifique et souvent coûteux. L'objectif du travail sur les laboratoires sur puce consiste « tout simplement » à intégrer de tels laboratoires d'analyses dans une seule puce micro/nanofluidique :



Figure 8 : Concept schématique d'un laboratoire sur puce microfluidique.³⁰

Par conséquent, un laboratoire sur puce peut être considéré comme un microsystème complexe comprenant des fonctions fluidiques, mécaniques, optiques, électroniques, etc... Ses avantages sont nombreux :

(1) L'utilisation de très faibles quantités d'échantillon, de l'ordre de la dizaine de microlitres la plupart du temps. Les déchets sont réduits, ainsi que les coûts pour certaines analyses très particulières comme par exemple les cristallisations de protéines.

- (2) La réduction du nombre d'opérateurs et du nombre de manipulations d'échantillons ; l'automatisation de l'analyse, et donc la réduction des coûts.
- (3) La portabilité des systèmes d'analyse, dans une ambulance ou dans une zone reculée, par exemple. On parle alors de « point of care ».
- (4) Les vitesses d'analyse plus rapides, offrant des temps de réponses plus courts et des résultats plus précis car moins perturbés par les phénomènes de diffusion.
- (5) Des rapports surface sur volume favorables aux phénomènes électrocinétiques et aux contrôles de température plus rapides et précis.
- (6) Et, d'une manière générale, les systèmes miniaturisés permettent l'intégration de capteurs multiples, et autorisent donc des analyses plus polyvalentes et plus exhaustives.

Un laboratoire sur puce n'est pas simplement un microcanal, ou un nanocanal, mais il est une plateforme microfluidique intégrée, comprenant différentes étapes, comme la préconcentration, le pompage, la séparation, du mélange, la détection etc.^{31–34} Je propose maintenant d'en présenter de manière succincte quelques composants principaux.

2.1.2 Les différentes fonctionnalités d'un laboratoire sur puce

Un lab-on-a-chip n'est pas un simple assemblage de fonctions de base microfluidiques ou nanofluidiques combinées comme des briques de Légo fonctionnelles, contrairement à ce que l'on rencontre en conception électronique, par exemple. En effet, c'est un système plus complexe et dont les différents éléments doivent être conçus chacun en tenant compte de son environnement proche. Au début de ma thèse, l'équipe dans laquelle je me suis intégré avait déjà une certaine expérience en la matière, car trois thèses^{9,35,36} y ont déjà été soutenues sur ce sujet, dès 2004 pour la première d'entre elles. La figure 9 présente une vue schématique de ce que serait un laboratoire sur puce complet et « idéal » :



Figure 9 : Modules fonctionnels d'un laboratoire sur puce microfluidique.³⁷

Parmi l'ensemble des fonctions présentes sur la puce micro/nanofluidique de la figure 9, nous maitrisions au début de ma thèse les fonctions de mélange, de séparation, de contrôle de température, et de détection optique intégrée. Dans une démarche d'intégration supérieure, la préconcentration se devait d'être l'étape suivante, et c'est la raison pour laquelle cette nouvelle fonction a fait l'objet de mon travail de thèse. Je propose donc maintenant de décrire les fonctions majeures rencontrées dans un laboratoire sur puce, puis de nous focaliser sur l'étude bibliographique des travaux proposés dans la littérature sur la préconcentration.

2.1.2.1 Transport de masse

Le pompage de fluides est une fonction essentielle dans un système microfluidique. Il peut s'agir de pompage externe, hydrodynamique ou électroosmotique ; ou interne sous forme de pompes intégrées, qui peuvent être électrochimiques^{38,39}, péristaltiques⁴⁰, électro hydrodynamique⁴¹, acoustique⁴² et magnétohydrodynamique⁴³ etc. Parfois, lorsque la puce n'a besoin d'être remplie qu'une seule fois, la simple capillarité suffit à réaliser le transport de masse dans la puce.

2.1.2.2 Mélangeur

Rares sont les analyses qui ne demandent pas, à un moment ou à un autre du processus, un mélange entre deux fluides, par exemple pour réaliser une dilution, un marquage moléculaire, etc...⁴⁴ Or, à cause des nombres de Reynolds très faibles, l'utilisation des écoulements turbulents n'est pas envisageable aux petites échelles, et seule la diffusion permet ce mélange. Or, la diffusion est un phénomène souvent très lent, surtout avec des biomolécules de grandes tailles telles que protéines, ADN, etc... Il est toujours possible malgré tout, de dessiner des canaux mélangeurs (en forme de « T »), et d'allonger la zone de mélange en fonction du temps demandé par la diffusion, mais alors ces canaux peuvent devenir excessivement longs et prendre une trop grande place sur la puce. Des solutions ont donc été proposées dans la littérature.

Le principe de base d'un mélangeur microfluidique consiste à augmenter l'interface d'échange entre les deux solutions à mélanger; ou, ce qui revient au même, à réduire les distances à franchir par diffusion pour les molécules considérées.⁴⁵ On parlera de mélangeurs passifs lorsque seuls des effets de parois ou de design aboutissent au mélange. Le travail de A. Stroock et coll.⁴⁶, qui utilise très habilement des chevrons inversés au bas des canaux est à ce titre emblématique. A contrario, les mélangeurs actifs utilisent des sources d'énergie externe pour perturber les écoulements : ondes acoustiques⁴⁷/ultrasons⁴⁸, forces diélectrophorétiques⁴⁹, effets électrocinétiques⁵⁰, perturbation de pression⁵¹, effets thermiques⁵² ou magnétiques⁵³ afin d'améliorer la performance de mélange.

2.1.2.3 Séparateur

Les capteurs utilisés dans les laboratoires sur puce ne sont pas toujours suffisamment sélectifs pour être capables de distinguer des biomolécules (ou des classes de biomolécules) entre elles. Il est alors quasisystématiquement obligatoire de séparer les molécules les unes des autres avant de les présenter devant les détecteurs de la puce. Pour cela, deux méthodes dominent : la chromatographie ou l'électrophorèse capillaire.

La chromatographie consiste à séparer les molécules en fonction de leur affinité avec des surfaces, souvent préparées pour jouer le rôle de séparateur. L'échantillon est alors appelé « phase mobile » et les surfaces « phase stationnaire ». Lors de l'écoulement dans la colonne chromatographique, les molécules de la phase mobile voyageront à des vitesses différentes selon leurs affinités avec la phase stationnaire. Celles qui auront tendance à s'adsorber de manière privilégiée mettront plus de temps pour franchir le système, et inversement. La figure 10 représente le principe physique d'une séparation par chromatographie :



Figure 10 : Principe schématique de la séparation par chromatographie.⁵⁴

Pour être efficace, une colonne chromatographique doit présenter la plus grande surface possible pour l'interaction entre la phase stationnaire et les molécules de la phase mobile. Des dessins de canaux particuliers, nommés « COMOSS » (Collocated Monolithic Support Structure) ont été proposés à cette fin.⁵⁴

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative plus rapide que la chromatographie, mais limitée à la séparation de molécules chargées seulement. Le principe de base de cette méthode consiste à séparer les molécules sous l'action d'un champ électrique dans un canal. Nous savons que l'application d'une tension électrique aux bornes du canal induit un écoulement électroosmotique, qui tend à transporter avec lui toutes les molécules présentes en solution. Mais, conjointement à cet écoulement global, les molécules, dès lors qu'elles sont chargées, subissent une vitesse relative qui leur est propre, en fonction de leur rapport taille/charge. On appelle cette vitesse relative : « vitesse électrophorétique », qui correspond à l'équilibre entre les forces de frottement par viscosité et la force électrostatique subie par la molécule dans le champ électrique. Ainsi, lors de leur déplacement dans le canal séparatif, les molécules sont séparées les unes des autres et passent successivement dans la zone de détection de la puce. La figure 11 montre une séparation de cinq acides aminés, sur une puce microfluidique dédiée⁹ :



Figure 11 : Electrophorèse capillaire sur puce pour la séparation de cinq acides aminés : arginine (Arg), glycine (Gly), acide α -aminoapidique (AAd), acide glutamique (Glu), et acide aspartique (Asp).

2.1.2.4 Détecteur

D'une manière générale, il existe deux classes de capteurs : les capteurs sensibles à la quantité de matière, et les capteurs sensibles à la concentration. On retrouve principalement, parmi les premiers, les capteurs optiques⁵⁵ (absorbance et fluorescence); et les capteurs électrochimiques⁵⁶ parmi les seconds. Puisque je n'ai utilisé pour mon travail de thèse que des capteurs optiques seulement, je propose de nous focaliser uniquement sur eux.

La fluorescence induite par laser est la méthode optique la plus fréquemment utilisée dans les systèmes microfluidiques en raison de ses très bonnes performances en termes de limites de détection. Cependant, il arrive très souvent que les biomolécules à détecter ne soient pas fluorescentes (acides aminés, sucres, etc...). On procède alors à un marquage moléculaire avec une espèce fluorescente, ce qui revient à procéder à un mélange dans la puce microfluidique. L'absorbance est plus simple à mettre en œuvre que la fluorescence, et elle est beaucoup plus universelle, mais elle souffre d'un manque de sensibilité qui cantonne cette méthode aux concentrations élevées de biomolécules cibles.

2.1.2.5 Prétraitement

La plupart des échantillons biologiques réels sont trop complexes pour être analysés tels quels. Par exemple, dans un échantillon sanguin, l'analyse d'une protéine du plasma nécessite, a minima, de retirer les éléments (globules rouges, plaquettes, etc...) et à préparer l'échantillon afin de le rendre observable. Cette phase de prétraitement doit être réalisée in-situ si l'on veut obtenir un véritable lab-on-a-chip, et elle reste aujourd'hui probablement l'étape la plus difficile à réaliser dans un système micro/nanofluidique.

Pourtant, des progrès significatifs ont été accomplis en termes de filtration, d'extraction, et de préconcentration.⁵⁷ Beaucoup de techniques de préconcentration, utilisant des caractéristiques des molécules telles que la charge, l'affinité, la mobilité et la taille, ont été appliquées pour améliorer les seuils de détections de biomolécules dans des échantillons réels. La figure 12 se propose de rappeler de manière schématique le principe d'une préconcentration dans un processus analytique :²⁹



Figure 12 : Intérêt de la préconcentration.

La préconcentration de molécules biologiques étant au cœur de ma thèse, je me propose d'en expliquer maintenant les principes physiques de base, et de présenter les travaux les plus emblématiques de la littérature sur le sujet.

2.2 Les différentes méthodes de préconcentration

Plusieurs stratégies sont actuellement disponibles pour réaliser une préconcentration de biomolécules, en lab-on-a-chip ou dans des dispositifs plus conventionnels : « field-amplified sample stacking »,⁵⁸ « isotachophoresis »,⁵⁹ «isoelectric focusing»,⁶⁰ «chromatographic trapping»,⁶¹ «micellar electrokinetic sweeping»,⁶² «temperature-gradient focusing»,⁶³ «membrane préconcentration»,⁶⁴ «ion concentration polarization (ICP) »,⁶⁵ etc. Je propose d'en détailler ici les principes physiques.

2.2.1 «Field-amplified sample stacking »

La méthode de préconcentration nommée « Field-amplified sample stacking (FASS)⁵⁸ » utilise des gradients de conductivité entre un volume d'échantillon injecté et le tampon de séparation pour augmenter localement la concentration en biomolécules d'intérêt. La figure 13 présente le principe physique de cette méthode :



Figure 13 : Schéma de principe de la préconcentration par « Field-amplified sample stacking » (FASS).

Considérons, dans un canal donné, un sandwich composé d'un échantillon de très faible conductivité entouré de deux portions de tampon de séparation de très forte conductivité. Lorsque l'on applique un potentiel aux bornes du système, afin de pratiquer une séparation par électrophorèse capillaire par exemple, le champ électrique ainsi créé ne va pas se répartir de manière homogène : il sera plus élevé dans la portion d'échantillon et plus faible dans le tampon de séparation. Les biomolécules auront donc une vitesse très élevée tant qu'elles resteront dans l'échantillon, puis ralentiront de manière brutale à la frontière entre l'échantillon et le tampon de séparation. C'est donc à cette frontière, là où la vitesse des molécules diminue brutalement, que se produit la préconcentration; exactement de la même manière que la formation d'un zone sur une autoroute dans une zone de ralentissement, par exemple.

2.2.2 « Temperature gradient focusing »

La méthode de « Temperature gradient focusing (TGF)^{63,66} » est basée sur l'utilisation d'un gradient de température, qui concentre des ions chargés en jouant sur les différences de viscosité du liquide dans le microcanal. En effet, la viscosité change de manière très significative avec l'augmentation

de température, typiquement de l'ordre de 20% tous les 10°C, et donc la vitesse des ions aussi pour un champ électrique donné.



Soit le canal de la figure 14, dans lequel un gradient de température est créé :

Figure 14 : Schéma de principe de la préconcentration par « Temperature gradient focusing » (TGF)⁶⁷.

On peut montrer que dans ce type de préconcentration, la vitesse électroosmotique du tampon est relativement constante tout le long de l'écoulement. On choisira alors des ions dont la mobilité électrophorétique est de sens inversé par rapport à l'écoulement électroosmotique. Dans les zones de basse température, la mobilité électrophorétique étant faible, les molécules vont être entrainées dans le sens de l'écoulement électroosmotique global, vers l'intérieur du canal (de la gauche vers la droite dans la figure 14). A l'inverse, dans les zones de températures plus élevées, la mobilité électrophorétique sera en mesure de lutter, voire de dépasser la vitesse électroosmotique, et les molécules vont être entrainées dans le sens inverse de l'écoulement électroosmotique global, vers la gauche dans la figure 14). Les biomolécules vont donc toutes converger vers un même point, qui sera aussi la zone de préconcentration du canal.

2.2.3 « Isoelectric focusing »

La méthode de focalisation isoélectrique (IEF)⁶⁸, ou « Isoelectric Focusing » utilise les différences de points isoélectriques (pI) pour préconcentrer et séparer des biomolécules. En effet, toute molécule biologique possède une valeur de pH pour laquelle sa charge nette est nulle, appelée point isoélectrique

(pI). En dessous de cette valeur de pH, elle est chargée positivement, et au-dessus elle est chargée négativement.



Figure 15 : Schéma de principe de la préconcentration par « Isoelectric focusing ».

La figure 15 représente schématiquement le fonctionnement de ce mode de préconcentration dans un gel d'électrophorèse. Un champ électrique est appliqué au gel, tandis qu'un gradient de pH est formé dans la structure. Le sens de la vitesse électrophorétique étant directement relié au signe de la charge de la molécule, à chaque pI correspondra un point dans le gel vers lequel convergeront les molécules correspondantes. On obtient ainsi une séparation et une préconcentration des molécules dans le même temps.

2.2.4 Préconcentration à partir de membranes

Comme nous le verrons dans les pages suivantes, les membranes, parce qu'elles sont des dispositifs nanofluidiques très simples à utiliser et d'une très grande diversité, sont des candidates idéales pour réaliser des dispositifs de préconcentration de biomolécules. En effet, contrairement aux méthodes présentées précédemment, les membranes évitent l'utilisation de gradient de concentrations ou de température ; ou encore de gel ou de structures à gradients de pH.

Deux classes d'utilisation des membranes peuvent être distinguées : l'utilisation purement géométrique de la taille des pores, on parle alors d' « exclusion stérique »^{64,69}; ou l'utilisation des effets du

recouvrement de la couche diffuse (que nous avons et déjà évoqué précédemment), on parle alors d'« exclusion ionique ».⁶⁴



Figure 16 : Schéma de principe de la préconcentration par exclusion stérique.^{64,69}

L'exclusion stérique, dont la figure 16 donne un exemple dans la littérature, n'est pas le mode de préconcentration le plus fréquemment rencontré, car il ne concerne que les plus grosses molécules et souffre souvent de problèmes de colmatage.⁷⁰ L'efficacité de ce type de système n'est donc pas optimale, et c'est pourquoi nous avons décidé pour ma thèse de privilégier la préconcentration par exclusion ionique, en privilégiant la préconcentration par la méthode ICP, que je propose au lecteur d'analyser en détail dans les prochaines pages.

2.3 Focus sur la préconcentration par « Ion Concentration Polarisation » (ICP)

Historiquement, à notre connaissance, c'est en 2004 que Pu et coll.⁷¹ ont été la première équipe de recherche à travailler sur le phénomène d'ICP. Depuis, cette thématique a été largement développée, et de nombreux chercheurs s'y intéressent dans le monde. La figure 17 propose une représentation cartographique des équipes intéressées par l'ICP dans le monde :



Figure 17 : Laboratoires impliqués dans l'étude de la préconcentration par ICP.

2.3.1 Principe de fonctionnement

Le phénomène d'ICP est intégralement basé sur l'exclusion ionique obtenue grâce au recouvrement de la couche diffuse dans les nanopores d'une membrane ou dans un nanocanal, ou dans un réseau de nanocanaux. Pour rappel, on peut considérer en première approximation qu'un système nanofluidique, quel qu'il soit possède la propriété de bloquer quasi-totalement le passage des cations lorsque sa charge de surface est positive; et inversement, de bloquer les anions lorsque sa charge de surface est négative : on parle alors de « permsélectivité ». Ces propriétés, connues depuis longtemps, ont été utilisées pour de nombreuses applications en ingénierie, telles que les piles à combustible⁷² par exemple.

Considérons, pour comprendre le phénomène ICP, l'exemple de deux microcanaux séparés par une portion nanofluidique (un nanocanal ou une membrane permsélective). Les deux microcanaux et la zone nanofluidique sont de charge de surface négative dans cet exemple, comme représenté figure 18 :



Figure 18 : Vue schématique du phénomène ICP dans un système MNM.73

Lorsqu'un champ électrique est appliqué dans le système, de la gauche vers la droite dans l'exemple de la figure 18, un écoulement électrophorétique des ions de l'électrolyte apparaît et tend à déplacer les cations de la gauche vers la droite, et inversement pour les anions. Le microcanal situé à gauche sur le schéma de la figure 18 est appelé « zone anodique » et le microcanal situé à droite est appelée « zone cathodique ». Or nous savons que la portion nanofluidique du système est une barrière de potentiel pour les anions, tout en laissant passer les cations. Un déséquilibre ionique se crée alors de part et d'autre du nanocanal (ou, le cas échéant, de la membrane). La partie anodique se déplète en cations, qui peuvent traverser la barrière de potentiel ainsi formée, tandis que dans la partie cathodique les anions bloqués s'accumulent. Par respect de la neutralité électrique, émerge alors progressivement une zone très appauvrie en ions, près de la portion nanofluidique, dans la partie gauche du système, c'est-à-dire la zone anodique. Inversement, une zone enrichie en ions apparait de manière conjointe dans la partie située à droite, proche de la portion nanofluidique, c'est-à-dire dans la zone cathodique. C'est cette dissymétrie ionique qui porte le nom de « phénomène ICP », et qui sera exploitée pour créer une préconcentration ionique. En effet, l'ICP ne se limite pas à une modification des répartitions ioniques : les résistances électriques locales, et donc les distributions de champs électriques sont elles aussi modifiées, et ce sont ces variations locales qui permettront d'obtenir les effets de préconcentration.

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'obtention d'un phénomène ICP nécessite la réalisation d'une structure de type « microcanal-nanocanal-microcanal » (on parle alors de « structure MNM »). Les nombreux travaux qui ont porté sur ce thème de recherche ont tous ce point en commun. En revanche, la réalisation de la partie nano (nanocanal unique, réseaux de nanocanaux, membranes, etc...) ou la manière d'obtenir la préconcentration diffère beaucoup d'une équipe à l'autre, et c'est ce que je propose de passer en revue maintenant.

2.3.2 Classification des préconcentrateurs basés sur l'ICP dans la littérature

2.3.2.1 Préconcentrateurs basés sur une membrane nanoporeuse

L'utilisation de membranes nanoporeuses d'une manière générale n'est évidemment pas apparue avec la réalisation de structures MNM, et l'ingénierie utilise ces outils depuis très longtemps pour de nombreuses applications : dessalement d'eau de mer, filtration d'eau polluées, piles à combustible, etc... En ce qui concerne la nanofluidique, les membranes commerciales présentent un grand intérêt de par leur grande diversité de formes (pastille, feuilles, gels, etc..) et la très grande variété des tailles de pores disponibles. En outre, elles permettent la réalisation de structures MNM avec un minimum de technologies de salle blanche, comme nous le verrons dans la troisième partie de mon manuscrit. Au chapitre des inconvénients que l'on peut leur imputer, mentionnons la grande dispersion sur la taille des pores que l'on rencontre parfois, et donc la grande difficulté à modéliser le comportement de ces structures de manière rigoureuse. Enfin, par définition, l'utilisation de membranes commerciales nous limite aux tailles de pores, épaisseurs et matériaux disponibles commercialement; ce qui n'est bien sûr pas le cas avec les nanocanaux réalisés en salle blanche.

A notre connaissance, la première utilisation de membrane pour l'obtention d'une préconcentration par ICP date de 2006, et des travaux de Hatch et al.⁷⁴ qui ont utilisé un gel de polyacrylamide, fabriqués par photo-polymérisation UV. Cette équipe a alors obtenu un taux de préconcentration de 1000, après 5 min et 400V appliqués. En utilisant la même méthode de photopolymérisation pour créer la membrane de préconcentration, Dhopeshwarkar et al.⁷⁵ ont réalisé en 2008 un micro zone d'hydrogel HEMA comme membrane nanoporeuse avec une taille moyenne de pores de 1,6 nm à 1,9 nm, plus petit que ceux de Hatch et al. Les taux de préconcentration sont à peu près égaux à 500 avec 100-300V de tension appliquée dans une gamme de temps entre 150 secondes et 960 secondes. Deux ans après, de 2010 à 2011, Chun et al.⁷⁶ fabriquent une membrane de poly-AMPS, qui est toujours basée sur le même type de processus de photo-polymérisation in situ. Ils ont obtenu un taux de préconcentration de 400 avec 60V de tension appliquée, en 8 min. Cette famille de membranes, qui est basée sur la méthode de photo-polymérisation, a été très populaire à cette époque. Les raisons de ce succès sont les suivantes: tout d'abord, les polymères photo-polymérisables sont très faciles à trouver; ensuite, la taille de pore est globalement petite par rapport à d'autres types de membranes poreuses, et la taille moyenne des pores peut se contrôler facilement en jouant sur la concentration de polymères dans l'électrolyte ; enfin, la forme de la membrane est très facile à définir grâce à la méthode de photopolymérisation. Le défaut principal des membranes ainsi obtenues est leur faible valeur de charge de surface. Or, ce paramètre est très important si l'on veut obtenir des taux de préconcentration élevés.

Le Nafion, qui a une densité de charge de surface assez élevée, de l'ordre de 200 mC/m² à 600 mC/m²,⁷⁷ est justement un très bon matériau pour faire de la préconcentration. De plus, la taille de ses pores est située entre 2 et 4 nm⁷⁸, ce qui est très adapté pour le recouvrement des couches diffuses. C'est la raison pour laquelle les membranes en Nafion ont remplacé progressivement les membranes photopolymérisées. Dès 2008, Hans et al.^{77,79–84} ont réalisé de nombreux travaux utilisant de telles membranes de Nafion.⁷⁹ La figure 19 représente la fabrication d'un dispositif MNM à membrane Nafion par cette équipe : après dépôt d'une membrane de Nafion de quelques centaines de nm d'épaisseur sur un substrat en verre, une partie microfluidique en PDMS est collée avec le substrat par plasma. Suite à ce travail, Meng et al.⁸⁵, Kim et al.⁸⁶, Yang et al⁸⁷ etc. ont utilisé à peu près la même configuration pour développer un système de préconcentration.



Figure 19 : Exemple de préconcentrateur MNM à membrane nanoporeuse (Nafion).⁸⁰

On trouve dans la littérature, d'autres méthodes plus originales ou d'autres matériaux plus exotiques pour obtenir des membranes dans des dispositifs MNM. Par exemple, Yu et al.⁸⁸ et Jen et al.⁸⁹ ont fabriqué des membranes poreuses par un claquage électrique dans un matériau entre deux microcanaux. Ils ont suivi le courant du processus pour confirmer la formation des membranes. Ou encore, Hoeman et al.⁹⁰ obtiennent une membrane d'oxyde de titane nanoporeuse par réaction chimique à

l'interface entre deux écoulements laminaires. Citons encore Wu et al.⁹¹, qui utilisent une membrane de polycarbonate commerciale prise en sandwich entre deux microcanaux en PDMS. Enfin, Choi et al.⁹² ont formé la membrane poreuse en rassemblant des nanoparticules entre deux microcanaux.

Les dispositifs MNM à membrane ont fait la preuve de leur efficacité pour la préconcentration. D'autres systèmes, basés sur la fabrication de nanojonctions, ont été aussi proposés dans la littérature, que je propose de passer maintenant en revue.

2.3.2.2 Préconcentrateurs basés sur les nanojonctions

On appellera « nanojonction » un ou plusieurs nanocanaux (en réseau) séparant deux canaux microfluidiques dans le but de faire de la préconcentration. Ces nanocanaux sont réalisés en salle blanche, avec les techniques habituelles de cet environnement, ce qui implique des temps et des coûts plus élevés qu'avec l'utilisation de membranes. L'avantage des nanojonctions réside principalement dans le fait qu'elles sont très bien maîtrisées en termes de tailles et de dispersion des pores ainsi obtenus, ce qui en fait des objets d'étude particulièrement intéressants. En effet, un système MNM à membranes est très complexe à modéliser de manière satisfaisante, à l'inverse des systèmes MNM à nanojonctions. On pourrait résumer le choix entre membranes et nanojonctions par le fait que les membranes sont probablement plus adaptées pour une application donnée tandis que les nanojonctions sont plus utilisées comme objets d'études.

La majorité des préconcentrateurs basés sur les nanojonctions utilise le silicium et le verre comme substrat, les nanocanaux étant obtenus par photolithographie, gravure, puis collage verre-verre^{93,94}/PDMS^{79,80}/silicium^{95,96}. Leur profondeur, généralement inférieure à 100 nm, peut être contrôlée par le temps de gravure.

La première équipe à travailler sur de tels systèmes MNM à nanojonctions, en 2004, Pu et al.⁷¹, propose un préconcentrateur basé sur deux canaux en «U» reliés par huit nanocanaux (de section 60nm*100nm) en verre. Ils ont montré que ce type de système permet d'obtenir le phénomène d'ICP. Han et al.⁹⁷ ont fabriqué en 2005 des dispositifs similaires en silicium, de profondeur 40 nm, et obtenus des taux de préconcentration de 1 000 000, en 40 min avec 10 V de tension appliquée (figure 20).



Figure 20 : Exemple de préconcentrateur MNM à nanojonction. 98,99

Dans le même temps, Schoch et al.^{8,100} ont fabriqué une nanofente en utilisant une couche de silicium amorphe de 50nm (figure 21). Des facteurs de préconcentration de l'ordre de 600 fois ont été obtenus en 9 min.



Figure 21 : Exemple de préconcentrateur MNM à nanofente unique.⁶⁵

Trois ans après, en 2008, Plecis et al.¹⁰¹ ont utilisé la gravure RIE pour créer un nanocanal de 62 nm dans une lame de verre. Basés sur cette configuration, Louër et al.⁹³ améliorent le système et appliquent une pression supplémentaire pour contrôler la position de la zone de préconcentration et stabiliser le système. Ils obtiennent ainsi un taux de préconcentration de l'ordre de 300. En 2011, Kim et al.¹⁰² fabriquent les dispositifs nanofluidiques en utilisant très astucieusement les propriétés de mouillage

d'une résine SU8 avec des couches auto-assemblées de thiols/MHDA, afin d'obtenir des moules MNM pour du PDMS. Wu et al.¹⁰³ ont pour leur part fabriqué un nanopore pour faire de la préconcentration par la gravure HF sur un capillaire en silice. Sung et al.¹⁰⁴ ont fabriqué un préconcentrateur nanofluidique par collage d'un couvercle de plaque en PDMS sur une lame de verre. Des réseaux de 16 nanocanaux de 50-80 nm de profondeur ont ainsi permis d'obtenir des taux de préconcentration de l'ordre de 100 000 fois en 5 min avec 30V de tension appliquée. Quist et al.¹⁰⁵ ont proposé une méthode très originale pour créer le nanocanal. La puce est fabriquée en utilisant des multicouches souples, et le nanocanal est créé par la déformation d'une microvanne, contrôlée par une pression (figure 22). L'avantage de ce type de préconcentrateur est que la profondeur de nanocanal peut être modifiée facilement avec la pression appliquée, typiquement de 7nm à 55nm :



Figure 22 : Exemple de préconcentrateur MNM à nanovanne.¹⁰⁵

Récapitulatif :

Les deux types de préconcentrateurs, à membrane ou à nanojonctions ont effectivement permis de faire la préconcentration, les exemples présentés ici en sont témoins. Ici nous montrons un tableau (tableau 3) qui classifie les préconcentrateurs ainsi que les paramètres les plus intéressants dans la littérature, de 2004 à 2015.

Tableau 3 : Préconcentrateurs basés sur membrane nanoporeux, nanojonctions et nanocanal dans la littérature.

ref	materiel, taille de critique (nm)	La concentration de Bulk	La concentration de molécule cible	Taux de préconcentration (temps, min) [Volt or E field]	La region de preconce ntration
	silicon Nanofilters (40)	pH 4.6, 10 mM PBS pH 9.1, 10 mM PBS	33 fM GFP	10 ⁷ (40) [5-10 V]	anodic
97		(40) pH 3.5, 10 mM ABS/80 mM TBE	FITC-BSA FITC-ovalbumin FITC dye Mito Orange λ-DNA		
65	Pyrex nanoslit (50)	10μM, 1mM, 1M KCl	30 μM Fluorophore 10 μM rhodamine B 10 μM rhodamine 6G		
106	pdms-glass nanochannel	pH 7.4, 10 mM PBS/pH 7.2, 20 mM PBS	100 nM, 10 nM, 100 pM, and 1 Pm FITC- BSA 100 nM, 10 nM, 100 pM, and 1 pM oval- bumin	10 ⁶ (30) [200 V]	anodic
74	Polyacrylamide	pH 8.3, 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS	FITC- IgG/PA/TI/OA/BSA	10 ³ (5) [400 V]	anodic
107	pdms-glass nanocap (80)	pH 7, 10 mM PBS	400 pM, 4 nM, 40 nM A b-phycoerythrin	10 ⁴ (60) [1000 V]	anodic
108	HEMA hydrogel (2)	pH 8.1, 10 mM Tris-HCl	5 μM FITC-DNA	5×10 ² (2.5) [100 V]	cathodic

109	AA-HEMA hydrogels (2)	pH 8.1, 10 mM Tris-HCl	FTIC-BSA	4×10 ² (16)		
				[300 V]	cathodic	
				4×10 ²		
	neutral hydrogel			[100 V]		
	glass	pH 9.2, 0.1 mM BBS	10 μM Rhodamine 6G	$10^2 (0.92)$	onthodia/	
110	nanochannel (100)				anodic	
				[100 V]	anourc	
			0.1 mM 1mM 10 mM	$10^4 (15)$		
79	Nafion (2-4)	1 mM PBS	0.1 nM, 1nM, 10 nM		anodic	
			BODIPY disulfonate [120 V]	[120 V]		
			40 pM 400 pM 4 nM	104 (5)		
80	Nafion (2-4)	pH 7, 10 mM PBS	40 nM h-Phycoerythrin	[60 X]	anodic	
				[50 V]		
			10 μM, 1 μM, 100 nM	10 ⁵ (10)		
88	toner gap	pH 7.4, 10 mM PBS	FITC-DSA	[80 V]	anodic	
				[00 ,]		
	titania nanoporous membranes	pH 11.5, 80 mM PBS	31 nM DCF	4×10 ³ (6.7)	anodic	
90				[300 V]		
	polycarbonate	pH 8.3, 100 mM TBE/10	300 fM, 3 pM FITC-	10 ⁶ (3.3)		
91	membrane (10)	embrane (10) mM PBS	HSA	[1000 V]	anodic	
		oly-AMPS pH 7.4, 10 mM PBS/15 mM NaCl	30 µM rhodamine 6G			
	poly-AMPS		50 µM fluorescein	4×10^2 (8)		
76				[60 V]	anodic	
				100 nM, 1 μM TRITC-	[00 1]	
			albumin			
0.5				10 ⁴ (7)		
85	Nafion (2-4)	pH 7.4, 10 mM PBS	60 pM AF-BSA	[15 V]	anodic	
94	glass nanoslit	10 иМ to 1 М КС1	1 uM fluorescoin	(20)		
	(62)	10 μ M to 1 M KCI		[100 V]		
	Nafion (2-4)	ion (2-4) 10 mM 1ris-HCl, 1 mM MgCl ₂ , 200 μg/mL BSA, pH 7.4 (IgE)/pH 8(HIV-	o nM aptamer	10 ³ (30)		
83			5 pM to 75 nM human IgE protein		anodic	
		1 RT)		[30 V]		

102	nanoslits (41.4- 76.8)	pH 7.4, 0.1 mM, 0.2 mM, 1 mM PBS	10 μM fluorescein	8 (0.17) [150 V]	anodic
84	Nafion (2-4)	pH 8.4, 1 mM PBS	1 μg/ml, 0.1 μg/ml, 0.01 μg/ml fluorescein	4×10 ³ (30) [100 V]	anodic
111	polyacrylamide	1x HSS	SRB-fluorescent liposomes	3.5×10 ² (2.7) [100 V]	anodic
77	Nafion (2-4)	pH 7.4, 0.01X, 0.1X and 1X PBS	10 ng/mL FITC	[40 V]	anodic
103	silica pore	pH 8.6, 0.1X TBE/1 mM Tris-HCl; 0.1X, 1X TBE	100 μM FITC 100 μM rhodamine 6G 3 μM FITC-BSA/DNA	5×10 ¹ (5) [100 V]	
112	polyacrylamide	0.1 M PBS	10 μM Amplex Red 5 μM hydrogen peroxide	2×10 ² [1000 V]	anodic
113	Nafion (2-4) pdms-glass nanochannel (500)	1mM KCl/Na ₂ HPO ₄	1 μg/mL FITC	[3 V]	anodic
86	Nafion (2-4)	5 mM PBS	1 pM to 100 pM FITC- BSA	10 ⁶ (8)	anodic
114	Nafion (2-4) HEMA-AA (10) HEMA- DMAEMA (10) Agarose (100)	5 mM PBS	100 nM BSA	10 ³ (10) [60 V]	anodic
93	glass nanochannel (150)	450μM KCl	1.5μM BSA	3×10 ² (4.5)	cathodic/ anodic
105	pdms (7,55)	pH 10.5, 2 mM lithium carbonate	20 μM fluorescein	10 ³ (4.5) [200 V]	cathodic/ anodic

92	(TiO ₂)/(SiO ₂)/(P S) nanospheres	pH 5.6, 0.1 mM KCl	[30 V]	anodic			
115	glass nanoslots (40)	pH 7.8, 0.1X PBS	5.8 nM FITC goat anti- mouse IgG	[120 V]	anodic		
116	TMSVE/polyE- 323 (40)	pH 3.4, 0.005% formic acid/5% IPA	10 μM Fluorescein 10 μM Rhodamine 6G	[60 V]			
117	Nafion (2-4)	pH 7, 10 mM PBS	1.0 μg/mL FITC-DSA	10 ⁴ (3.7) [200 V]			
89	Nanofractures	pH 7.4, 1 mM PBS	1 nM and 100 nM (FITC)-BSA	1.5×10 ⁴ (60) [50 V]	anodic		
	Nafion (2-4)	1 mM KCl	100 nM fluorescein	100 (5) [200 V/cm]			
118			1 μM fluorescein	50 (2) [200 V/cm]	anodic		
				pH 7.4, 10 mM PBS	100 nM FITC-BSA	400 (6) [200 V/cm]	
			1 μM FITC-BSA	Saturate the camera	1		
	Nafion (2-4)	Nafion (2-4) 5mM KCl	24.14 nM SRB				
119			0.90 mM Alexa	100 (30)	anodic		
				[60-90 V]			
	Nafion (2-4)	Nafion (2-4) 10mM tris	10 uM fluorescoir	20 (2.2)			
87				[50 V]	anodic		
			10 μM FITC-BSA	15 (2)			
				[50 V]			

3 Conclusion

Comme cette première partie a permis de le rappeler, en micro/nanofluidique rien ne peut se faire ou se comprendre sans prendre en compte les effets de l'augmentation drastique du rapport surface/volume. Les charges de surface sont donc très importantes à étudier, à mesurer, et à maîtriser. Nous avons montré ici que les équipes qui travaillent sur la préconcentration de molécules biologiques, en utilisant des membranes nanoporeuses ou des nanojonctions, ont su exploiter habilement ces charges aux interfaces dans les systèmes Micro-Nano-Microfluidiques, notamment via le phénomène ICP (Ion Preconcentration Polarization).

Je propose maintenant de présenter, dans la deuxième partie de mon manuscrit, comment le potentiel zêta, et donc les charges de surfaces, ont été mesurés au cours de ma thèse, et surtout comment mon travail a permis d'améliorer et de fiabiliser cette mesure.

Partie 2 : Mesure et contrôle de la charge de surface à l'interface solide/liquide

Sommaire

<u>1</u>	<u>His</u>	stori	que, introduction et objectifs	71
<u>2</u>	An	nélic	pration du banc expérimental de mesure du potentiel zêta par courants d'écoulement	77
	2.1	De	scription du banc expérimental initial	77
	<u>2.2</u>	Lin	nitations du banc expérimental initial et améliorations apportées	79
	<u>2.2</u>	<u>2.1</u>	Prise en compte des variations de température	80
	<u>2.2</u>	2.2	Influence du pH de l'électrolyte	81
	<u>2.3</u>	Pro	otocole expérimental	84
	<u>2.3</u>	<u>.1</u>	Justification de l'utilisation de capillaires de silice	84
	<u>2.3</u>	<u>.2</u>	Matériels et méthodes	85
<u>3</u>	<u>Ett</u>	<u>ides</u>	des interfaces SiO ₂ /KCl et SiO ₂ /NaCl	89
	<u>3.1</u>	<u>Eff</u>	fet de la concentration sur le potentiel zêta	89
	<u>3.1</u>	.1	<u>Résultats expérimentaux</u>	89
	<u>3.1</u>	.2	Discussion sur l'influence du type d'ion (KCl et NaCl)	92
	<u>3.2</u>	An	nélioration du protocole expérimental : vers une interface stable	92
	<u>3.2</u>	<u>.1</u>	Nettoyer la surface APRES l'exposition de KCl/NaCl	93
	<u>3.2</u>	<u>2.2</u>	Nettoyer la surface AVANT l'exposition de KCl/NaCl	94
	<u>3.3</u>	Inte	erprétation « physico-chimique » des résultats obtenus	96
	<u>3.3</u>	.1	Diminution du potentiel zêta dans les capillaires sans prétraitement	96
	<u>3.3</u>	<u>8.2</u>	Augmentation de la valeur absolue de potentiel zêta après le prétraitement KOH/NaC	<u>)</u>
			96	
	<u>3.4</u>	Per	spectives : propositions de manipulations complémentaires	98

67

<u>4</u>	Application des courants d'écoulement aux capteurs biologiques	. 101
<u>5</u>	Conclusion	105

Comme nous l'avons rappelé dans la première partie de ce manuscrit, une grande majorité des microsystèmes de type « Lab-On-a-Chip » exploite les phénomènes de charges de surface pour réaliser de nombreuses fonctions : déplacement des fluides, mélange, séparation, préconcentration, etc.... Cette affirmation bien sûr n'est pas exclusive, car l'on peut aussi concevoir des puces microfluidiques relativement simples et fonctionnant sous des régimes purement hydrodynamiques, ou encore des systèmes mixtes.

Le groupe de recherche dans lequel s'est inscrit mon travail de thèse explore depuis longtemps les écoulements électrocinétiques en microfluidique. C'est pourquoi la mesure des charges de surfaces à l'interface liquide/solide, qui sont à la base de tous les phénomènes électrocinétiques en micro/nanofluidique, est devenue progressivement l'un des axes de travail importants du groupe. Cette deuxième partie de mon manuscrit, intitulée « Mesure et contrôle de la charge de surface à l'interface liquide/solide », s'inscrit donc dans ce cadre, et sera déclinée suivant quatre principaux axes.

Tout d'abord, un bref rappel des travaux antérieurs à ma thèse sera proposé afin de la replacer dans son contexte. Ce rappel conduira tout naturellement le lecteur vers les objectifs de mon travail. Nous présenterons ensuite les améliorations qui ont été apportées au banc de mesure du potentiel zêta par courants d'écoulement. L'amélioration du banc de mesure a permis de mettre au point des protocoles permettant de mieux contrôler et stabiliser les charges de surface, ce qui fera l'objet d'une troisième partie. Enfin, nous présenterons des résultats issus d'une collaboration sur de nouveaux capteurs d'espèces biologiques par mesures de courants d'écoulement, qui sont une voie prometteuse pour les développements futurs de cette activité dans le groupe.

1 Historique, introduction et objectifs

Depuis 2008, l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a pour objectif majeur de développer un préconcentrateur à membrane polarisable, appelé encore « transistor nanofluidique ». Ce dispositif devra, à terme, être intégré dans un microsystème plus vaste et plus complet de type « lab-on-a-chip ». Son principe physique de base repose sur la modification de la charge de surface et de la distribution des concentrations des co-ions et contre-ions dans la couche diffuse par un phénomène purement physique : la polarisation capacitive de l'interface liquide/solide. En effet, ces modifications peuvent aujourd'hui être assez couramment obtenues par des traitements chimiques, mais ces traitements sont souvent assez lourds à mettre en œuvre, et une autre voie pour la polarisation, basée sur des phénomènes physiques, se devait d'être explorée.

Dans ce projet, la première tâche a consisté à fabriquer une membrane nanoporeuse en silicium, donc a priori polarisable^{120,121}, en utilisant une méthode de gravure électrochimique développée dans le groupe (figure 1, droite). Avec cette technologie, nous avons montré qu'il est possible de réaliser des pores de typiquement 200 nm de diamètre, avec des périodes de 300 nm à 1 µm, sur une profondeur de plusieurs dizaines de microns, au meilleur de l'état de l'art.¹²² Ces réseaux de nanopores ont été ensuite intégrés dans un système microfluidique/nanofuidique/microfluidique (MNM) complet et utilisable (figure 1, gauche). L'interface diélectrique/liquide est alors obtenue par oxydation du silicium, qui permet dans le même temps de diminuer le diamètre des pores, jusqu'à 60nm dans notre cas.



Figure 1 : Exemple de dispositif MNM réalisé par l'équipe avant ma thèse pour l'étude de la polarisation.³⁵

Ces systèmes ont fait l'objet de la thèse de Guillaume Laffite, qui a précédé la mienne, mais leur étude sous polarisation n'a malheureusement pas montré d'effets visibles en utilisant les méthodes de caractérisation à notre disposition : les courants d'écoulement (sur lesquels nous reviendrons plus loin). En effet, les mesures par courants d'écoulement, c'est à la fois une force et une faiblesse, sont très
sensibles aux courants faradiques dans les couches. Or, ceux-ci ont toujours été présents dans nos échantillons, et trop importants pour permettre de polariser à des tensions suffisantes pour voir des effets de polarisation sans perturber la mesure des charges de surface; contrairement à d'autres méthodes de caractérisation moins sensibles mais peut-être plus discutables.¹²³

La complexité de réalisation de ces dispositifs, et le besoin de comprendre plus finement l'incidence des défauts de surface sur la polarisation nous ont conduit, dans un deuxième temps, à développer des transistors microfluidiques plus simples (figure 2), et permettant de sonder d'autres types de diélectriques que seulement le S_iO_2 thermique, sans la problématique de remplissage des pores. Ces dispositifs sont réalisés par Xurography¹²⁴, technique que nous détaillerons plus en partie 3, et caractérisés par courants d'écoulement.^{9,122}



*Figure 2 : Prototype de transistor microfluidique réalisé par Xurography permettant l'étude de la polarisation des interfaces diélectriques/électrolyte par courants d'écoulement.*³⁵

Cependant la polarisabilité de l'interface Si/diélectrique/électrolyte n'a pas été mise en évidence dans ces systèmes non plus, quel que soit le diélectrique (et sa fonctionnalisation de surface le cas échéant) déposé sur le silicium (SiO₂, Si₃N₄, Al₂O₃, silanisation, thiols, etc...). Ces résultats étaient très surprenants au vu de la littérature traitant de ce sujet^{123,125–127} et des modèles capacitifs simples (figure 3), qui ne considèrent pas les réactions chimiques possibles à l'interface, mais seulement la capacité du diélectrique.



*Figure 3 : Modélisation du potentiel zêta en fonction du pH avec et sans polarisation dans le cas d'une couche de 50nm de SiO₂ basé sur le modèle capacitif simple.*³⁵

Les modèles ont donc été affinés, afin d'améliorer la compréhension des interfaces polarisables, principalement en considérant la réactivité chimique de l'interface : on parle alors du modèle « Site Binding ».¹ Ce modèle montre de manière claire et systématique une atténuation forte de la polarisabilité théorique par rapport aux modèles précédents, d'un rapport typiquement de 40 (figure 4), de 300 mV à 7 mV. Ces quelques mV de polarisation, bien qu'insuffisants pour réaliser un transistor microfluidique effectif, auraient dû cependant être observés par notre banc expérimental, de sensibilité inférieure au mv. Pourtant cela n'a pas été le cas : nous n'avons jamais été en mesure d'observer la moindre polarisation répétable dans les échantillons testés. L'équipe en a donc conclu que le modèle site-binding devait être affiné pour décrire la polarisation d'une interface, et que les exemples de la littérature, pour certains discutés depuis, présentaient très probablement des biais expérimentaux. Il fallait donc améliorer notre compréhension physique des interfaces avec ou sans polarisation dans le but de trouver « la » surface physique idéale pour la polarisation.



*Figure 4 : Modélisation de la variation du potentiel zêta d'une couche de 50nm de SiO*₂ sous polarisation de 1V, en fonction du pH et en fonction de la concentration en KCl à pH 5.³⁵

Pour parvenir à ces fins, il devenait alors impératif d'augmenter notre base de données pour alimenter le modèle site-binding (notamment les constantes pKa des différentes réactions chimiques pour des couples surfaces/électrolytes), ou d'autres modèles plus complets (prenant par exemple en compte des porosifications et/ou des dégradations de l'interface). Cette base de données, sur les couples surfaces/électrolytes, fonction des types de surface, des types d'électrolytes, de leur pH, de leur force ionique nécessitait un contrôle plus fin des paramètres expérimentaux (température, pH, pollutions des solutions, etc...), et une automatisation accrue du banc expérimental. Par exemple, au cours de nombreuses manipulations longues, nous observons des dérives du potentiel zêta au cours du temps (figure 5). Ces dérives lentes (typiquement quelques mV/h), ne devraient pas, a priori, nous empêcher l'observation d'une polarisation d'apparition quasi-instantanée, même inférieure au mV. Elles posent toutefois une véritable question quant à la stabilité des surfaces dans l'électrolyte, et ne permettent pas de constituer de manière indiscutable la base de données fiable dont nous avions besoin pour développer nos modèles physico-chimiques : en effet, parler dans ces conditions du potentiel zêta d'un couple surface/électrolyte n'a aucun sens. Ces dérives dans les mesures du potentiel zêta, parfois évoquées dans la littérature mais pas toujours, se doivent donc d'être mieux comprises et compensées quand cela est possible.



Figure 5 : Dérive temporelle du potentiel zêta de l'interface SiO₂/KCl sans polarisation. (SiO₂/0.1 mM de KCl).

Partant de ces deux constatations, qui constituent les conclusions principales des travaux précédant ma thèse: l'impossibilité d'observer la polarisation des interfaces, et l'observation de dérives temporelles inexpliquées ; les objectifs et les stratégies de ma thèse concernant les mesures de charges de surface, sont très clairement posés :

- Identifier et réduire au mieux les dérives liées au banc de mesure proprement dit. Comme nous le verrons plus loin, les dérives liées à la température ont été les plus simples à identifier. Les mesures de courants d'écoulement sont des mesures dynamiques : l'électrolyte circule en permanence dans le système microfluidique étudié, et des dérives de mesures peuvent apparaître si cet électrolyte présente lui-même des variations chimiques au cours du temps, comme le pH, par exemple.
- 2. Réduire les dérives liées directement aux interfaces liquides/solides proprement dites, comme par exemple des dégradations physico-chimiques des interfaces.
- Constituer une base de données plus large de potentiels zêta en fonction d'un certain nombre de paramètres (interface, électrolyte, pH, force ionique).
- Utiliser cette base de données pour améliorer la compréhension physique de la polarisation des interfaces.
- 5. Trouver une interface idéalement polarisable, grâce aux mesures effectuées et aux modèles développés.

Les deux prochains chapitres sont dédiés à la présentation des travaux réalisés en vue d'atteindre ces objectifs. L'amélioration du banc de mesure a permis en outre l'ouverture d'une collaboration sur des

mesures biologiques par courants d'écoulement, très prometteuse et fructueuse, qui sera présentée dans un dernier chapitre.

2 Amélioration du banc expérimental de mesure du potentiel zêta par courants d'écoulement

Après avoir décrit l'historique des mesures de charges de surfaces dans l'équipe qui a accueilli ma thèse, et défini les objectifs à atteindre; je propose maintenant de détailler le banc expérimental de mesure de courants d'écoulement antérieur à ma thèse, et les améliorations apportées au cours de mon travail.

2.1 Description du banc expérimental initial

Pour mesurer le potentiel zêta d'une interface solide/liquide, plusieurs méthodes de mesures sont à notre disposition à l'INL : suivi de courant, mesures AFM à sondes colloïdales, et courants d'écoulement. La mesure du potentiel zêta par la méthode des courants d'écoulement est la voie la plus utilisée, car elle est très simple et très rapide (figure 6).



Figure 6 : Rappel du principe de la mesure par courant d'écoulement.

Pour rappel, le principe de le mesure par courant d'écoulement est le suivant : un électrolyte remplit un système microfluidique, la charge de surface crée une couche diffuse de contre-ions, les contreions sont mis en mouvement par une mise en pression du système, et un courant électrique est recueilli, proportionnel à la pression appliquée et au potentiel zêta.

Au début de ma thèse, le banc expérimental de mesure du potentiel zêta par courants d'écoulement était déjà bien établi, bien qu'encore perfectible (figure 7).³⁵



Figure 7 : Schéma du banc expérimental de mesure de courants d'écoulement au début de ma thèse.

Cette version de banc expérimental est pourtant déjà améliorée par rapport au premier banc qui fut développé en 2004.⁹ Notamment, un long travail d'automatisation d'une partie de la mesure avait été mis en œuvre; et une première version de système « antipollution » de l'électrolyte en utilisant une mise sous pression par de l'azote avait été mise au point. Il est important de comprendre ici que les mesures de courants d'écoulement sont des mesures indirectes, et qu'elles demandent de prendre de grandes précautions expérimentales. En effet, l'expérience montre que les courants recueillis sont toujours très faibles, typiquement de quelques centaines de picoampères au maximum et dans les meilleurs des cas. Il faut donc être très vigilant quant aux bruits et pollutions électroniques qui peuvent perturber les mesures, ce qui a été fait dès les premières versions du banc expérimental. Au début de ma thèse, le banc expérimental était ainsi constitué (figure 7) :

- Un pico ampèremètre (Keithley 6487, USA), piloté par ordinateur, et utilisé pour mesurer les courants d'écoulement I_e induits par pression, via deux électrodes de platine à l'entrée et la sortie du système microfluidique.
- Un régulateur de pression, piloté lui aussi de manière informatique, est utilisé pour appliquer une différence de pression Δp aux bornes du système microfluidique que l'on cherche à caractériser. Cette pression est mesurée et contrôlée via un capteur de pression, lui aussi informatisé, et utilisé

dans la boucle de contre-réaction du contrôle de pression. Des connectiques commerciales sont utilisées pour relier le système microfluidique au réservoir d'électrolyte et à la poubelle.

- Le réservoir d'électrolyte est mis en pression par une bouteille d'Azote gazeux dans le but de bloquer la contamination due à l'air, notamment les variations de pH causées par l'absorption de CO₂.
- Le réservoir d'électrolyte, le système microfluidique étudié, les électrodes et la poubelle sont placés dans une cage de Faraday. Les électrodes sont reliées au picoampèremètre via des câbles triaxiaux.

Ce banc expérimental est celui dont j'ai hérité au début de ma thèse. Il était le fruit d'un long travail de développements et d'optimisations, mais encore perfectible comme nous l'avons déjà énoncé. Cependant, il s'est avéré être une base de travail très intéressante, et qui ne demandait qu'à être amélioré en fonction des hypothèses formulées au début de mon travail.

2.2 Limitations du banc expérimental initial et améliorations apportées

Comme montré en introduction de cette deuxième partie de mon manuscrit, l'identification des causes des dérives de potentiel zêta observées, et leur élimination, est l'un des objectifs majeurs de ma thèse. Les hypothèses des origines de ces dérives ont déjà été introduites : tout d'abord, celles liées à l'évolution de l'interface liquide/solide en elle-même. Cette évolution nécessite d'être comprise précisément pour améliorer le modèle site-binding, qui, rappelons-le, ne permettait de prendre correctement en compte la polarisation. Enfin, les dérives liées à l'instrumentation, que nous avons choisi de réduire dans un premier temps, et qui sont :

- Les erreurs liées aux variations de la température du banc expérimental au cours des manipulations aux temps longs.
- Les variations du pH de l'électrolyte conduisant à un changement d'équilibre chimique des ions à la surface induisant un changement de la densité de charge de surface.
- 3. Les pollutions diverses de la solution.

En réponse à ces trois hypothèses, nous proposons maintenant de présenter les améliorations qui ont été apportées chronologiquement au banc expérimental.

2.2.1 Prise en compte des variations de température

Le banc expérimental antérieur à ma thèse ne prenait pas en compte les variations de température lors d'expériences pourtant parfois longues de plusieurs heures. Or, le banc expérimental n'est ni climatisé, ni chauffé, ainsi que la pièce dans laquelle il est placé. Il est donc évident que la température du système microfluidique et de l'électrolyte varie de manière non négligeable, parfois de l'ordre d'une dizaine de degré Celsius lors d'une expérience donnée.

Or, la formule mathématique permettant de déterminer le potentiel zêta par courants d'écoulement ($\zeta = I_e \eta L/\epsilon A \Delta p$) possède deux paramètres qui sont très dépendants de la température (les deux équations suivantes sont linéarisée au première approximation autour de 25 °C) : la viscosité dynamique η de l'électrolyte ($\eta = (1.4506 - 0.02246 \cdot \theta) \cdot 10^{-3}$)¹²⁸, et sa permittivité diélectrique ϵ ($\epsilon = (87.42 - 0.362 \cdot \theta) \cdot 8.85 \cdot 10^{-12}$).¹²⁸ En effet, dans des gammes de température ordinaires θ , de 25 °C à 26 °C, la viscosité et la permittivité varient de -2.53%/°C et dans une moindre mesure, de -0.46%/°C, respectivement. Ces deux variations ne se compensent pas parfaitement, et peuvent donc aboutir à des dérives de mesures de plus de 20% pour 10°C si nous ne les prenons pas en compte. Pour que cette information puisse être connue de manière fiable, indépendamment des autres paramètres physico-chimiques (pH, force ionique etc...), la température se devait d'être mesurée; et ses effets sur la viscosité et la permittivité se devaient d'être corrigés dans le calcul de zêta.

Nous avons donc ajouté au banc expérimental un capteur de température et inclus les formules de compensation des variations de η et de ϵ dans la détermination du potentiel zêta. Nous avons aussi ajouté la possibilité de mesurer la résistance électrique de l'électrolyte présent dans le système microfluidique. En effet, la résistance électrique étant fonction de la conductivité de l'électrolyte, elle-même directement reliée à la viscosité du fluide, une mesure stable après compensation de cette résistance indique de manière fiable que la compensation en température est effective et réaliste. Dit autrement, on peut dire que la stabilité de la « résistance électrique compensée » que nous mesurons est un indice sur la fiabilité de nos mesures. La figure 8 montre un exemple de mesure à temps long, et de l'effet flagrant de cette compensation de température.

Cette première étape du travail a permis d'améliorer considérablement la qualité et la stabilité de nos mesures, mais cependant d'autres dérives, plus faibles, étaient toujours observées. Certes, la température n'étant pas contrôlée, mais seulement mesurée, il était possible que ces variations proviennent, au moins en partie, d'une dépendance du potentiel zêta avec la température. Pour en être certain, nous

devions toutefois rechercher et compenser d'autres sources de dérives. C'est pourquoi les pollutions et les variations du pH de l'électrolyte ont été l'axe suivant de mon travail d'amélioration du banc expérimental.



Figure 8 : Compensation de la température sur la résistance électrique et le potentiel zêta.

2.2.2 Influence du pH de l'électrolyte

Il est connu dans la littérature depuis maintenant longtemps que le potentiel zêta d'une interface est extrêmement dépendant du pH de l'électrolyte étudié (figure 9).² Pour une interface de silice en contact avec une solution aqueuse, cette variation peut théoriquement atteindre jusqu'à -59 mV par unité de pH, ce qui est considérable comparé aux valeurs de zêta, elles-mêmes de l'ordre de quelques dizaines de mV au maximum. Cette dépendance est d'ailleurs très utilisée en chimie analytique par la communauté des sciences séparatives afin d'adapter les vitesses électroosmotiques aux vitesses électrophorétiques des espèces à séparer lors d'une électrophorèse ou d'une électrochromatographie.⁹



Figure 9: Mesure du potentiel zêta d'une couche de S_iO₂ en fonction du pH de l'électrolyte.¹²⁸

Tout d'abord, le pH des solutions a été fixé de manière stable à 5 quel que soit le type d'électrolyte et sa force ionique étudié par la suite, par ajout de HCl et mesure au pH-mètre. Le choix d'un pH 5 a été dicté par deux contraintes antagonistes. D'une part, la figure 4 montre que la meilleure plage de pH pour la polarisation est comprise entre 4 et 7. D'autre part, un pH trop proche de 7 est moins stable, par nature, qu'un pH plus éloigné de cet équilibre. Le choix du pH de 5 nous a donc paru être un bon compromis.

Conjointement, si dans notre cas le pH est une variable physico-chimique de première importance, les travaux antérieurs à ma thèse se contentaient de préparer des solutions à étudier (KCl, NaCl, etc...) à différentes forces ioniques, et à mesurer leur pH afin de connaître cette information. Dans un premier temps, les électrolytes étaient mis en mouvement via de l'air comprimé régulé en pression. Il est rapidement apparu que cette méthode était source de nombreux problèmes, d'une part par l'absorption de CO₂ dans l'électrolyte, comme nous l'avons déjà évoqué, mais aussi très certainement par les pollutions dues aux contaminants présents dans cet air comprimé, des huiles par exemple. Une première solution avait consisté à remplacer l'air comprimé par de l'azote. Cependant, cette solution, élégante au premier abord est rapidement apparue problématique, car en procédant ainsi nous avons clairement observé des dérives très fortes de zêta. Ces dérives ont été attribuées à la désorption du CO₂ inévitablement présent dans l'électrolyte au début de l'expérience, issu du contact avec l'air lors de sa préparation. Ne pas rajouter accidentellement du CO₂ était un problème à résoudre, mais le retirer de l'électrolyte, aussi. C'est pourquoi nous avons dû faire évoluer à nouveau la manière de dispenser l'électrolyte, en le pressurisant tout en prenant le soin de ne plus le mettre en contact direct avec un gaz quel qu'il soit. Pour ce faire,

notre choix s'est porté sur l'utilisation de poches de soins, du même type que celles utilisées dans le milieu médical pour les perfusions, par exemple, que l'on remplit de solution d'électrolyte, et que l'on place dans une chambre hermétique et pressurisée. L'électrolyte est donc toujours mis sous pression de manière contrôlée, mais tout en garantissant une isolation absolue de tout gaz, car une fois la poche remplie elle ne sera plus ouverte, jusqu'à être totalement vidée.

Le nouveau banc expérimental ainsi obtenu est présenté en figure 10 :



Figure 10 : Schéma du banc expérimental de mesure de courants d'écoulement à la fin de ma thèse.

Ce nouveau mode de déplacement de l'électrolyte a permis, grâce au volume du récipient de mise en pression, de placer plusieurs pochettes en parallèle, jusqu'à six en même temps. Les pochettes sont sélectionnées grâce à deux vannes. Une première vanne, permettant le choix de la pochette à vider, est suivie en aval d'une deuxième vanne, reliée à une première poubelle ou au système microfluidique. Cette deuxième vanne a pour fonction de passer très rapidement d'un électrolyte à un autre dans le système microfluidique à étudier, c'est-à-dire d'une pochette à une autre, sans subir sa très forte résistance hydrodynamique, ramenée aux volumes morts dans le banc expérimental.

2.3 Protocole expérimental

Maintenant que le banc expérimental a été décrit, nous proposons au lecteur d'en exposer ici l'utilisation et les protocoles expérimentaux que nous avons conçus.

2.3.1 Justification de l'utilisation de capillaires de silice

Historiquement, le banc expérimental a été utilisé par l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse pour déterminer les charges d'interface dans de nombreux systèmes micro/nano/fluidiques : des puces microfluidiques PDMS/VERRE ou PDMS/PDMS, des puces microfluidiques réalisées par Xurography (verre/polymère/verre), des systèmes micro/nano/microfluidiques à membrane nanoporeuse, des capillaires, etc.... dès lors qu'une connectique -soit commerciale, soit obtenue par nos propres moyens-est adaptée au système que nous voulons étudier. Malgré cette grande diversité possible, il faut noter ici que l'ensemble des mesures qui seront présentées plus loin dans ce manuscrit ont été obtenues dans des capillaires de silice fondue, fournis par la société CIL CLUZEAU. Ce choix se justifie pour deux raisons principales :

 Tout d'abord, l'un des objectifs principaux de ma thèse est de connaître les raisons pour lesquelles le système Si/SiO₂/électrolyte n'est pas polarisable, et donc étudier de manière plus précise qu'auparavant l'interface SiO₂/électrolyte. Or, le matériau constituant les capillaires de silice commerciaux¹²⁹ est très proche, en nature et probablement aussi en structure, du SiO₂ thermique. Ces capillaires de silice fondue sont donc d'excellents modèles expérimentaux. La tableau 1 présente la composition chimique des capillaires que nous avons utilisés pour cette thèse, dont la pureté est supérieure à 99.99%.¹²⁹ L'homogénéité du matériau dans le capillaire est aussi un avantage certain, contrairement, par exemple, aux puces réalisées par Xurography, qui présentent, outre du SiO₂, des couches de polymères ou autres matériaux.

Elément	Abréviation	Quartz fondu	Silice fondue
Aluminium	Al	15	< 0.04
Calcium	Ca	0.5	< 0.02
Chrome	Cr	< 0.05	< 0.001
Cuivre	Си	< 0.05	< 0.001
Fer	Fe	0.1	< 0.03
Lithium	Li	0.6	< 0.002
Magnésium	Mg	0.05	< 0.01
Manganèse	Mn	< 0.05	< 0.0005
Potassium	K	0.4	< 0.01
Sodium	Na	0.3	<0.01
Titane	Ti	1.1	< 0.03
Zirconium	Zr	0.7	< 0.04

Tableau 1 : Composition chimique du quartz fondu et de la silice fondue en ppm (partie par million)¹²⁹.

 Ensuite, les capillaires présentent l'avantage indéniable d'être très économiques, et très pratiques pour un usage rapide et simple (nous avons réalisé plusieurs centaines de mesures), contrairement par exemple aux systèmes micro/nano/microfluidiques à membrane nanoporeuse, qui demandent 48h de fabrication.³⁵

2.3.2 Matériels et méthodes

Les mesures du potentiel zêta par courants d'écoulement ont été réalisées en utilisant le matériel suivant :

- Des capillaires de silice (Cluzeau, France). Plusieurs diamètres sont disponibles (50μm, 75μm et 100μm), mais nous avons choisi de travailler principalement avec des capillaires de diamètre 100μm.
- 2. Afin de vérifier la capacité d'absorption de la silice, point sur lequel nous reviendrons plus en détail dans le chapitre suivant, deux types de cations seront étudiés : K⁺ et Na⁺. Le chlorure de potassium (KCl, ROTH©) et le chlorure de sodium (NaCl, ROTH©) sont préparés et dilués dans des gammes de concentration entre 0.1 mM et 10 mM.
- Le pH, paramètre très important pour la mesure de zêta, est toujours fixé à 5 par ajout d'acide chlorhydrique (HCl) dans la solution. La mesure est réalisée par un pH-mètre (CyberScan PC 6000, Thermo scientific).
- 4. Des connexions commerciales en peek (Cluzeau, France) sont utilisées pour les raccordements entre les tubes téflon d'amenée des électrolytes et les capillaires.

5. Des fils de platine (Pt), de diamètre 1mm (Goodfellow, Huntingdon, UK) sont utilisés comme électrodes, parce que ce matériau a une faible réactivité chimique et donc il ne peut pas être réduit ou oxydé quand une tension lui est appliquée.²⁵

La méthodologie de mesure que nous avons suivie est dans la continuité des protocoles qui avaient déjà été développés précédemment. En voici les détails :

- 1. Un capillaire en silice, de diamètre 100 µm et de longueur de 16 cm est coupé au début de chaque nouvelle expérience. Le choix d'une longueur de 16 cm, adaptée aux dimensions du banc, est relativement arbitraire mais il se justifie suivant deux arguments. Tout d'abord, le capillaire ne doit pas être trop court. En effet, il faut veiller dans le set-up expérimental à ce que les pertes de charges, i.e. les différences de pression lors de l'écoulement de l'électrolyte, se fassent bien au maximum dans le capillaire et non dans les tubes téflon qui amènent l'électrolyte. Si cette précaution n'est pas prise, on risque de majorer dans nos calculs la pression effective et donc de minorer le potentiel zêta mesuré. A l'inverse, un capillaire trop long induit des courants d'écoulement trop faibles, qui, si ils ne présentent pas de problèmes théoriques particuliers, peuvent être tout simplement noyés dans du bruit.
- Les vannes sont pilotées de manière à choisir l'électrolyte à tester. Ce choix n'est pas définitif, et peut être modifié à tout autre moment dans la procédure expérimentale.
- 3. Une procédure spécifique de remplissage du capillaire est ensuite mise en œuvre. Elle consiste, tout d'abord, à ne connecter le capillaire qu'au système fluidique amont (pochettes et vannes); puis à chasser l'air dans le capillaire et vérifier son remplissage correct. La connectique aval est alors reliée au capillaire dans un deuxième temps, et, enfin la cage de faraday est fermée.
- Le régulateur de pression est piloté de manière à appliquer une pression P₁ au réservoir contenant les pochettes d'électrolyte. Nous attendons quelques secondes la stabilisation du système, puis mesurons un courant d'écoulement I₁.
- Une deuxième pression P₂ est appliquée, conduisant à une autre valeur de courant d'écoulement I₂.
- 6. La température dans la cage de Faraday est mesurée, puis le potentiel zêta du couple capillaire/électrolyte est alors calculé, en tenant compte des variations de la viscosité et de la permittivité, par la formule:

$$\zeta = \frac{(I_2 - I_1) \cdot L \cdot (1.4506 - 0.02246 \cdot \theta) \cdot 10^{-3})}{A(P_2 - P_1) (87.42 - 0.362 \cdot \theta) \cdot 8.85 \cdot 10^{-12})}$$

Où :

- L : est la longueur du capillaire, le microcanal et le système MNM fluidique (m),
- A : est la section du capillaire, le microcanal et le système MNM fluidique (m²),
- θ : est la température d'expérience (°C).
 - Les étapes 2 à 6 sont répétées cycliquement en cas de besoin, typiquement toutes les trente secondes; parfois sur des durées de plusieurs dizaines d'heures, voire jusqu'à une centaine d'heures.

3 Etudes des interfaces SiO₂/KCl et SiO₂/NaCl

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats de mesures de potentiel zêta dans des capillaires de silice fondue, surface déjà très étudiée dans la littérature^{130–132}. Ces capillaires sont mis au contact de solutions de KCl et NaCl, dans des gammes de concentration de 0.1 mM à 10 mM, et de pH 5 pour chacune d'entre elles. Ces premiers résultats nous ont conduits vers l'élaboration d'un nouveau protocole expérimental, qui sera décrit dans un deuxième temps. Nous proposerons enfin quelques hypothèses permettant d'expliquer nos observations, et améliorer ainsi notre compréhension d'un point de vue physique et chimie.

3.1 Effet de la concentration sur le potentiel zêta

3.1.1 Résultats expérimentaux

Dans cette partie de mon travail, je me suis attaché à mesurer le potentiel zêta (ainsi que la résistance électrique, comme expliqué précédemment) de capillaires de silice (diamètre : 100 µm ; longueur : 16 cm) avec trois concentrations différentes de KCl et de NaCl, à pH 5 constant : 0.1 mM, 1 mM et 10 mM. Nous avons choisi de faire varier les concentrations d'électrolyte suivant un cycle nous permettant de tester d'éventuels effets d'hystérésis (effet « mémoire » de l'interface) : 0.1 mM \rightarrow 1 mM \rightarrow 10 mM \rightarrow 1 mM \rightarrow 0.1 mM \rightarrow 1 mM \rightarrow 10 mM \rightarrow 1 mM \rightarrow 0.1 mM \rightarrow 1 mM \rightarrow 10 mM \rightarrow 1 mM \rightarrow 0.1 mM \rightarrow 1 mM \rightarrow 10 mM \rightarrow 1 mM \rightarrow 0.1 mM. Chaque valeur de concentration est mesurée pendant 4 heures environ, de manière à bien distinguer des effets éventuels de dérives du potentiel zêta. Ainsi, la durée totale d'une expérience est de 36 heures, rendue possible grâce à l'amélioration du banc pendant ma thèse. Pour chacune des deux espèces de contre-ions, le K⁺ et le Na⁺, les procédures expérimentales sont rigoureusement identiques, ce qui nous permet, pour l'intérêt de la lecture, de superposer les résultats dans la figure 11 :



Figure 11 : Potentiel zêta d'un capillaire de silice (diamètre : $100 \mu m$; longueur : 16 cm) pour différentes concentrations de KCl/NaCl (0.1 mM, 1 mM et 10 mM) à pH 5.

Le graphique de la figure 11 est un des résultats les plus significatifs de ma thèse, et il contient de très nombreuses informations qu'il convient d'exposer ici.

Remarquons d'abord que, malgré toutes nos précautions et nos compensations diverses, les potentiels zêta de la surface de silice ne sont jamais réellement stables. Or, après compensation en température, nous observons clairement que les résistances électriques mesurées le sont, preuve que l'électrolyte reste stable longtemps, notamment son pH. Donc, les dérives du potentiel zêta ne peuvent provenir que des modifications à l'interface silice/électrolyte, car nous avons déjà fixé les paramètres contrôlables comme le pH, et nous avons aussi compensé la viscosité et la permittivité dans l'équation de courant d'écoulement pour tenir compte des variations de température. Signalons ici que les deux expériences de la figure 11 ont été reproduites plusieurs fois, dans des capillaires neufs, et que les résultats obtenus sont répétables. Le problème de la stabilité de l'interface reste donc entier à ce stade de ma thèse.

Toutefois, même si zêta varie, ces dérives permettent de dégager des valeurs relativement fiables, aux dispersions près, que nous pouvons analyser et comparer avec la littérature. Considérons seulement, dans un premier temps, le potentiel zêta de la silice pour des concentrations de KCl et NaCl de 0.1 mM, 1 mM et 10 mM dans la première partie du cycle, c'est-à-dire la première montée en concentration. Pour le KCl, le potentiel zêta mesuré est de -50 mV, -29 mV, -13 mV en moyenne, à 0.1 mM, 1 mM et 10 mM respectivement. Pour le NaCl, le potentiel zêta mesuré est de -54 mV, -34 mV, -16 mV en moyenne, à 0.1 90 mM, 1 mM et 10 mM respectivement. Ces valeurs sont globalement en accord avec la littérature, en première approximation^{2,133}, et ne sont donc pas aberrantes. Leur comparaison avec le modèle site-binding est proposée dans le tableau suivant, qui, nous y reviendrons plus loin, ne tient pas compte du type d'électrolyte, et donc, du type de contre-ions :

	KCl	NaCl	Site-binding
0.1 mM	-50 mV	-54 mV	-48.5 mV
1 mM	-29 mV	-34 mV	-35.6 mV
10 mM	-13 mV	-16mV	-21.9 mV

Tableau 2: Comparaison entre potentiels zêta mesurés et modèle site-binding.³⁵

Le tableau 2 montre une assez bonne correspondance entre les mesures et le modèle site-binding, qui tend toutefois à se dégrader lorsque la force ionique augmente. Cependant, rappelons ici que les valeurs considérées pour les mesures du potentiel zêta sont celles de la première montée en concentration, il nous faut maintenant observer ce qu'il se passe ensuite. Tout d'abord, la dynamique à temps long (que nous nommerons « dérives globales ») des mesures montre clairement un affaiblissement du potentiel zêta au cours du temps. Nous avons volontairement limité ces expériences à 36 heures, mais en extrapolant les courbes, il semblerait que le potentiel zêta puisse tendre vers zéro à très long terme comme le suggèrent les droites en pointillés. Ce phénomène a déjà été observé dans la littérature.^{134–136}. Une part de ce manuscrit sera consacrée à des propositions d'interprétation physico-chimiques de ces résultats, dans le chapitre prochain.

Il est remarquable de noter aussi que les dérives à temps court (que nous appellerons « locales ») sont très dépendantes de la force ionique. Plus la force ionique est faible, plus les dérives locales sont fortes, en valeurs absolues et en valeurs relatives. Le sens des dérives locales est aussi parfois dépendant, non seulement de la force ionique, mais aussi de l'historique récent du capillaire. Pour la concentration 1 mM, les dérives locales sont négatives lorsque l'on passe de 0.1 mM à 1 mM et positives lorsque l'on passe de 10mM à 1mM.

Enfin, et cela est très inattendu a priori, les dérives globales et locales sont très semblables pour le KCl ou le NaCl, alors que les valeurs du potentiel zêta diffèrent de manière très observable. Tout se passe comme si les deux courbes avaient un comportement parfaitement similaire, mais homothétique. Il convient donc maintenant de discuter de l'influence du type d'ion sur les mesures.

3.1.2 Discussion sur l'influence du type d'ion (KCl et NaCl)

D'un point de vue théorique, le modèle Site-Binding tel que développé dans la thèse de mon prédécesseur dans l'équipe ne permet pas d'expliquer le décalage ou l'homothétie entre les courbes d'exposition au KCl et au NaCl de la figure 11. Or, non seulement les potentiels zêta mesurés sont différents entre les deux types d'ions, mais ces différences ne semblent pas aléatoires car elles ont toujours le même comportement : à pH 5 et pour une force ionique donnée, le potentiel zêta de la silice exposée au NaCl est toujours supérieur, en valeur absolue, au potentiel zêta de la silice exposée au KCl.

En réponse à cette observation, nous proposons deux hypothèses :

- Comme décrit précédemment, la littérature rapporte des effets d'atténuation du potentiel zêta au cours du temps liés à des phénomènes d'absorption de contre-ions de la couche diffuse sur l'interface.^{134–136} Or, par définition, cette absorption de contre-ions ne peut que diminuer la charge de surface.
- 2. On peut donc penser que, dans le cas de la silice, l'adsorption des ions K⁺ est plus forte que l'adsorption des ions Na⁺, ce que confirme aussi la littérature¹³⁷. Notons que ce phénomène d'adsorption, s'il est avéré, est très problématique pour la polarisation, et qu'il doit être pris en compte dans le modèle Site-binding afin de mieux décrire l'interface silice/électrolyte.

Dans tous les cas, les problèmes de dérives que nous avons observés, à temps courts et à temps longs, qui sont remarquablement les mêmes pour les deux types d'ions, nous ont conduit à mettre au point de nouveaux protocoles pour obtenir des surfaces stables, comme prévu dans les objectifs de ma thèse.

3.2 Amélioration du protocole expérimental : vers une interface stable

Après élimination des problèmes liés aux variations de température (que nous avons prises en compte) et aux pollutions ou variations de pH des électrolytes, les problèmes de dérives, bien qu'atténués, n'ont pas disparu. La figure 11 et les observations qui lui sont liées en témoignent. Or, la problématique de la stabilité des charges de surface de capillaires de silice n'est pas étrangère non plus à la communauté des sciences séparatives, qui, comme nous l'avons déjà dit, exploite les charges de surface en essayant de les contrôler au mieux, avec des tampons nettement plus complexes que nos mélanges KCl/HCl ou NaCl/HCl.

L'analyse de la littérature du domaine, et les discussions avec des collègues chimistes analytiques, ont montré que la « régénération » des capillaires de silices peut se faire suivant plusieurs recettes, consistant en des cycles de lavage permettant de régénérer les groupements silanols, comme par exemple : soude/eau/HCl/eau/méthanol. Afin de simplifier la procédure de traitement de la surface de la silice, nous décidons d'utiliser seulement le KOH ou le NaOH pour « nettoyer » nos capillaires et obtenir ainsi des interfaces stables.

3.2.1 Nettoyer la surface APRES l'exposition de KCl/NaCl

La première approche que nous avons mise en place a été de nettoyer la surface de silice avec le KOH ou le NaOH après l'exposition au KCl ou au NaCl. Nous nous proposons d'en exposer ici les résultats.

Des expériences similaires à celles de la figure 11 ont été refaites avec du KCl, mais avec un changement majeur. En effet, après exposition au KCl, le capillaire est régénéré par une solution de KOH (de concentration 1mM), puis exposé à nouveau au KCl. Nous obtenons alors la courbe de la figure 12 :



Figure 12 : Evolution du potentiel zêta d'un capillaire de silice, avant et après traitement avec 1 mM de KOH pour différentes concentrations de KCl à pH 5 (0.1 mM, 1 mM et 10 mM de KCl a pH 5).

La courbe de la figure 12 permet d'observer, dans sa première partie, un comportement parfaitement similaire à celui de la figure 11. Cela est tout à fait normal et attendu, soulignant le caractère répétable des dérives. A partir de la 36^{ème} heure, le capillaire est exposé à une solution de KOH à 1mM pendant plusieurs heures. Le potentiel zêta croît alors progressivement de manière très nette (en valeur absolue) jusqu'à atteindre environ -80 mV, valeur que nous n'avions jamais mesurée avec des solutions KCl ou NaCl à pH 5. Cette valeur est compatible avec la littérature et les modèles, qui montrent clairement une augmentation de zêta lorsque l'électrolyte est basique.

Cependant, et ce résultat nouveau était inattendu, après exposition au KOH, le potentiel zêta reste élevé lorsque le capillaire est remis au contact de KCl, et les dérives ne sont toujours pas supprimées. Donc, non seulement le couple silice/KCl dépend des expositions précédentes au KCl à différentes concentrations comme nous l'avons déjà vu (figure 11), mais aussi de l'exposition à d'autres espèces chimiques, en l'occurrence le KOH dans ce cas. Après l'exposition au KOH, les valeurs de zêta diffèrent très nettement d'avant ce « nettoyage », et elles sont toujours plus élevées quelles que soient les concentrations.

Le nettoyage du capillaire de silice après exposition au KCl n'est donc pas une solution satisfaisante, ni du point de vue des dérives, ni du point de vue de la connaissance de l'interface silice/électrolyte. En effet, quantifier dans ces conditions le potentiel zêta de la silice au contact avec le KCl, par exemple, n'a pas de sens, car il se posera toujours la question : « De quelle charge de surface, ou même de quelle surface parle-t-on, indépendamment des dérives locales ou globales ? ».

Nous avons donc choisi une nouvelle stratégie, à savoir nettoyer le capillaire au KOH et/ou au NaOH avant l'exposition aux différents électrolytes à étudier, le KCl et le NaCl dans notre cas.

3.2.2 Nettoyer la surface AVANT l'exposition de KCl/NaCl

La deuxième approche que nous avons mise en œuvre, après l'échec du nettoyage après exposition, a donc consisté à « pré-nettoyer » le capillaire avant exposition aux électrolytes d'intérêt. La procédure est donc la suivante : un premier remplissage au KOH à 1mM ou au NaOH à 1mM est effectué avant l'exposition de la surface au KCl, à trois concentrations : 0.1 mM, 1 mM et 10 mM. Les nouveaux résultats obtenus sont présentés en figure 13 :



Figure 13 : A gauche : Potentiel zêta d'un capillaire de silice (diamètre : 100 μ m ; longueur : 16 cm) en fonction de la concentration de KCl (0.1 mM, 1 mM et 10 mM) à pH 5, prétraité avec 1 mM de KOH (plusieurs fois). A droite : Potentiel zêta d'un capillaire de silice (diamètre : 100 μ m ; longueur : 16 cm) avec les différentes concentrations de KCl (0.1 mM, 1 mM et 10 mM) à pH 5, prétraité avec 1 mM de NaOH (une seule fois).

Dans une première approche, les courbes de la figure 13 peuvent se résumer en une phrase : « l'objectif de stabilisation de l'interface silice/électrolyte est atteint de manière très satisfaisante ». En effet, ce résultat est clair et indéniable : les dérives de zêta sont maintenant très faibles par rapport à celles des figure 11 et figure 12. Ces dérives résiduelles sont très probablement dues aux fluctuations de températures qui ont, rappelons-le, un rôle à jouer dans les équilibres à l'interface liquide/solide. D'ailleurs renseigner ces relations entre zêta et la température est une information intéressante en ellemême. Cette stabilité s'observe avec le prétraitement au KOH (figure 13, gauche) mais aussi avec le prétraitement au NaOH (figure 13, droite). Cependant, la comparaison des courbes de la figure 13 montre une nouvelle fois que les valeurs de la charge de surface de la silice dépendent de l'électrolyte en contact, bien sûr, mais aussi de son passé ; pour une concentration donnée de KCl, le potentiel zêta n'est pas le même si le capillaire a été prétraité au NaOH ou au KOH. Nous parvenons donc aux mêmes difficultés que dans le chapitre précédent : comment dans ces conditions définir une valeur de charge de surface « fiable », et quel protocole expérimental proposer, de manière absolue, à la communauté scientifique ?

Nous avons donc choisi d'arrêter là nos expérimentations sur ce sujet car nous craignons sinon de perdre trop de temps précieux dans des cycles hypothèses/expériences trop longs ou sans fin. Or, nous devions travailler sur la préconcentration dans des systèmes micro/nano/microfluidiques, qui est alors devenu la priorité de ma thèse, et qui fait l'objet de la troisième partie de ce manuscrit. Nous reviendrons plus en détail sur la justification de cet arrêt des manipulations sur les mesures de courants d'écoulement au chapitre 3.4, mais avant cela je propose au lecteur quelques interprétations physico-chimiques des résultats que nous avons obtenus.

3.3 Interprétation « physico-chimique » des résultats obtenus

Dans ce chapitre, nous rappellerons quelques explications offertes par la littérature pour expliquer la dérive du potentiel zêta de la surface de silice, puis nous proposerons quelques nouvelles hypothèses scientifiques et des perspectives de travail qui leurs sont liées.

3.3.1 Diminution du potentiel zêta dans les capillaires sans prétraitement

Comme nous l'avons clairement observé lors de nos premières expériences, c'est-à-dire sans prétraitement, la valeur absolue du potentiel zêta de la silice au contact de KCl n'est jamais stable et elle diminue globalement avec le temps. Ce type de phénomène peut facilement s'expliquer par l'adsorption des ions K^+ et Na⁺ à la surface de silice. Cette explication a déjà été proposée dans la littérature¹³⁷, et nous sommes totalement en accord avec ce modèle.

En parallèle, afin de compléter cette hypothèse simple d'adsorption, je propose de considérer aussi les produits chimiques formés à la surface de silice dans une solution globalement acide (car à pH 5). En effet, il est connu, par exemple, que la réaction $SiO_2 + H_2O = H_4SiO_4$ peut se réaliser de pH 2 à 8.¹³⁸ Or, je pense que l'acide silicique H₄SiO₄ généré à la surface de silice peut se condenser et former un type de gel qui va partiellement écranter l'interface silice/électrolyte, voire la neutraliser. Cette hypothèse peut raisonnablement compléter la première pour expliquer la diminution du potentiel zêta avec le temps, mais nous n'avons pu la tester expérimentalement.

3.3.2 Augmentation de la valeur absolue de potentiel zêta après le prétraitement KOH/NaOH

Comme nous l'avons clairement observé lors de nos expériences, la valeur absolue du potentiel zêta de la silice au contact de KCl augmente drastiquement après un traitement par du KOH ou du NaOH, en comparaison avec la même surface non traitée. Ce comportement de l'interface silice/électrolyte ne dépend pas de l'ordre des expositions et des nettoyages : « KCl \rightarrow KOH/NaOH \rightarrow KCl » ou « KOH/NaOH \rightarrow KCl ».

Une explication élégante et plausible est proposée par Urhan¹³⁹, liée à l'augmentation du nombre de sites susceptibles d'être chargés en solution à cause d'une porosification de la surface de silice. D'un point de vue structurel tout se passe comme si, vu de loin en en 2D la surface augmentait artificiellement sa densité de sites, comme le décrit la figure 14 :



*Figure 14 : Proposition de mécanisme de dissolution de silice dans l'eau par une attaque hydroxyle. La ligne pointillée représente l'interface entre la silice et de l'eau. Adapté de l'article de S. URHAN, 1987.*¹³⁹

Dans son article, Urhan propose un procédé de dissolution de silice dans l'eau par une attaque de type « hydroxyle ». Le nombre de sites Si-OH, susceptibles statiquement de se charger à pH 5 augmente après le traitement par la solution alcaline. Les très courtes distances mises en jeu, interatomiques la plupart du temps, ne permettent a priori pas d'atténuer les effets de cette nouvelle densité. En effet, les « rugosités » ainsi formées restent très faibles devant les longueurs de Debye que nous rencontrons, de l'ordre de quelques nanomètres, et les nouveaux sites créés sont donc « visibles » par la couche diffuse, et donc mesurables par courants d'écoulement.

Je pense que cette explication, bien que satisfaisante, n'est pas la seule qui puisse être proposée. En parallèle, nous pouvons aussi considérer les produits chimiques formés à la surface de silice dans les solutions alcalines que nous utilisons :

$$SiO_2 + 2Na^+ (2K^+) + 2OH^- = Na_2SiO_3 (K_2SiO_3) + H_2O$$

Or, comme pour l'explication précédente, le produit chimique Na_2SiO_3 (K_2SiO_3) généré à la surface de silice peut aussi former un type de gel. Dans l'hypothèse tout à fait plausible que ce gel serait plus chargé que la silice, cela pourrait aussi expliquer l'augmentation du potentiel zêta en valeur absolue. Cette hypothèse n'a pas eu non plus le temps d'être validée de manière satisfaisante.

3.4 Perspectives : propositions de manipulations complémentaires

Comme nous l'avons rappelé au début de ce chapitre, ma thèse s'inscrit dans une thématique plus globale, qui propose de développer un préconcentrateur à membrane polarisable. L'intérêt et l'originalité d'un tel dispositif résident dans la possibilité d'adapter les propriétés permsélectives de la membrane à la molécule biologique que l'on désire préconcentrer, ce qui ouvrirait alors le champ à des applications considérables.

L'étude de la polarisabilité des interfaces diélectrique/électrolyte est donc un thème majeur dans mon équipe d'accueil. En parallèle à ma thèse, d'autres travaux ont été effectués à cette fin, notamment des caractérisations par AFM à sonde colloïdale sur des matériaux tels que SiO₂, Al₂O₃, SiN, SiOC.¹⁴⁰ Ils ont tous confirmé les premières observations de la thèse de mon prédécesseur, Guillaume Laffite, à savoir une non-polarisabilité des interfaces diélectrique/électrolyte. Il est remarquable de voir que ce résultat négatif est constant, quelle que soit la méthode de caractérisation utilisée. A ce jour, les hypothèses les plus probables permettant d'expliquer ce constat sont:

- Le caractère poreux de ces diélectriques en milieu liquide, qui favorise l'injection de charges. La couche diffuse ne serait donc que très faiblement affectée par la polarisation, qui serait, pour donner une image : « mise sous le tapis ».
- La présence de « pièges » à la surface du diélectrique qui, au même titre que les pièges présents sur une interface diélectrique/semiconducteur d'un transistor MOS (Métal Oxyde Semiconducteur), empêchent toute modulation de la charge dans la couche diffuse. Ce sont d'ailleurs ces pièges qui ont historiquement favorisé le Silicium par rapport au Germanium pour la fabrication de dispositifs électroniques.

L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a exploré une autre voie, radicalement différente dans son approche, qui consiste à protéger ou fonctionnaliser les diélectriques par des dépôts de type monocouches auto-assemblées (SAM). Aucun résultat probant n'a été obtenu non plus par ce biais. En effet, il est très difficile d'obtenir des SAM sans défaut sur des surfaces de l'ordre de quelques mm² ou de quelques cm², et les bénéfices éventuels de ces couches ont été anéantis par des problèmes de fuites électriques. De plus, les expériences ont montré que ces couches ne résistent pas à de forts champs électrostatiques, ce qui ne jouait finalement pas non plus en leur faveur. Le diélectrique idéal est donc probablement un matériau non poreux et sans piège de surface. Comme il devenait très hypothétique de trouver un tel matériau, il a été décidé, au cours de ma deuxième année de thèse, de ne pas explorer plus loin l'étude de la polarisabilité des interfaces solide/liquide, et de focaliser mon travail sur le deuxième aspect fondamental de cette thèse : l'étude et le développement d'un préconcentrateur pour laboratoire sur puce, qui fait l'objet de la partie 3 de ce manuscrit.

Même si ils n'ont pas atteint tous leurs objectifs, mes travaux de thèse auront tout de même permis au groupe dans lequel j'ai travaillé d'améliorer le banc expérimental par courants d'écoulement, et de stabiliser les mesures de potentiels zêta. Toutefois, un travail considérable reste à faire, et voici les perspectives que nous pourrions proposer dans le cadre de travaux futurs :

- Continuer l'amélioration des protocoles expérimentaux, et déterminer, sinon « Un » potentiel zêta d'une interface silice/électrolyte donnée, une procédure permettant d'obtenir des valeurs de potentiels zêta stables et répétables. On ne parlera plus alors DU potentiel zêta d'un couple silice/électrolyte donné, mais DU potentiel zêta d'un triplet « silice/électrolyte/préparation de l'interface » donné, ce qui est original et radicalement différent. Le prétraitement deviendrait alors un acteur essentiel de cette problématique, à prendre en compte au même titre et au même niveau que le pH, la force ionique, le type de contre-ions, etc... Cette nouvelle approche pourrait sans doute trouver un écho très favorable auprès de la communauté.
- Etudier plus en détail et de manière topologique (par AFM, etc...) la très probable porosification de la silice lors du prétraitement. Nous pensons en effet que cette porosification peut se faire de manière relativement profonde si elle dure plus longtemps¹⁴¹, et cet effet serait intéressant à étudier.
- Plusieurs objectifs exposés au début de cette partie restent encore à atteindre, dont le plus important certainement : trouver enfin une interface polarisable et utilisable dans des systèmes micro/nano/microfluidiques.

4 Application des courants d'écoulement aux capteurs biologiques

Mon travail dans le domaine de la caractérisation des charges de surface par courants d'écoulement a été valorisé, en supplément de mes objectifs initiaux, dans le cadre d'une nouvelle collaboration avec l'équipe du Professeur Jan Linnros du « Department of Materials and Nano Physics » de l'Institut Royal de Technologies de Stockholm (KTH) ; collaboration dans laquelle j'ai eu une contribution très active. Dans cette partie, je me contenterai de décrire succinctement ce travail, qui est en lien direct avec les améliorations apportées sur le banc expérimental.

L'équipe du Professeur Jan Linnros travaille depuis quelques années sur des biocapteurs à base de transistors ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor)¹⁴² intégrés dans des canaux microfluidiques. Pour ce type de transistor, l'oxyde de grille est fonctionnalisé avec un bio-récepteur complémentaire de la biomolécule à détecter. Lorsque la molécule cible, que l'on cherche à détecter et qui est le plus souvent chargée en solution, se greffe sur le bio-récepteur suivant le principe clef-serrure, il s'en suit une modification du potentiel de surface qui induit une variation de conductance entre le drain et la source du transistor ISFET. Or, comme nous l'avons vu, les courants d'écoulement permettent de déterminer très facilement le potentiel zêta d'un couple solide/électrolyte. Nous avons proposé à nos collègues Suédois d'étudier les courants d'écoulement comme technique alternative et complémentaire aux ISFET, pour la réalisation de biocapteurs :

- 1. Alternative, puisque les deux techniques sont bien sensibles aux variations de potentiel électrique lors du greffage d'une biomolécule chargée à la surface du capteur.
- 2. Complémentaire, car, en y regardant plus finement, les courants d'écoulement sont sensibles au potentiel zêta ainsi qu'au flux hydrodynamique proche de l'interface, alors que les transistors ISFET ne sont sensibles qu'au potentiel de surface. Nous pensons que cette différence peut être utilisée judicieusement pour augmenter la sélectivité des capteurs.

Pour des raisons évidentes, nous avons travaillé sur le même couple bio-récepteur/bio-molécule d'intérêt que ceux utilisés dans le cadre de l'étude des transistors ISFET par nos collègues Suédois : le couple Biotine/Avidine. Dans ce couple, l'Avidine est la cible, c'est-à-dire la molécule que l'on cherche à détecter, et la Biotine est le complémentaire biologique permettant de rendre le capteur spécifique. Les caractérisations ont été réalisées dans des capillaires, en reprenant les arguments de coût et de simplicité évoqués précédemment. Le principe de la fonctionnalisation des capillaires est donné dans la figure 15. La surface est tout d'abord silanisée avec de l'APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilane). Ensuite, la

Biotine est déposée en injectant dans le capillaire une solution de NHS-PEG₁₂-Biotin. Enfin, le capillaire est traité avec une solution de caséine afin d'inhiber les sites non occupés par la biotine, et donc de limiter les adsorptions non spécifiques.¹⁴³



Figure 15 : Procédure de silanisation et d'immobilisation du récepteur dans les capillaires de silice. (a) La surface de silice est tout d'abord traitée avec une solution d'APTES. (b) La biotine est ensuite immobilisée sur l'APTES. (c) Enfin la surface est traitée avec de la caséine pour combler les sites non occupés afin de réduire les liaisons non spécifiques. (d) Lors de l'utilisation du capteur les molécules d'Avidine viennent se fixer spécifiquement sur les molécules de Biotine.

La figure 16 montre l'évolution du potentiel zêta mesuré par courants d'écoulement au cours d'une injection (à 47 min), dans le capillaire fonctionnalisé, d'une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) contenant de l'Avidine, pour des concentrations de 1nM à 50nM. On y voit clairement un effet de la concentration d'Avidine sur la réponse en potentiel zêta, en termes de niveau mais aussi en termes de dynamique : nous observons que plus l'Avidine est concentrée, plus le potentiel zêta varie (figure 16 à gauche) et plus il varie de manière rapide (figure 16 à droite).



Figure 16 : Gauche : Variation temporelle du potentiel zêta en fonction de l'exposition à différentes concentrations d'avidine. Droite : Taux de variation du potentiel zêta en fonction de la concentration d'avidine.

Ces premiers résultats obtenus dans le cadre d'une détection du couplage Biotine/Avidine sont très encourageants, car ils ont abouti à une limite de détection de 1nM tout à fait honorable. Notre collaboration s'est donc traduite par une présentation orale¹⁴⁴ et une publication dans « Biosensors and Bioelectronics ».¹⁴³ Forts de ce succès, KTH a décidé de continuer ce travail sur la technique des courants d'écoulement, en travaillant notamment sur d'autres couples (Barstar/Dibarnase, Z domain/IgG). La collaboration initiée pendant ma thèse a donc très probablement de belles perspectives de travail à proposer.

5 Conclusion

La mesure du potentiel zêta d'une interface liquide/solide est un problème complexe. Comme cette deuxième partie a pu le montrer, mon travail de thèse a permis d'améliorer le banc expérimental de mesure de zêta par la méthode des courants d'écoulement qui existait à mon arrivée dans l'équipe. J'ai aussi proposé à la communauté scientifique des protocoles expérimentaux, notamment de préparation de la surface, permettant de stabiliser, de rationnaliser, et de fiabiliser la mesure du potentiel zêta. Ce travail a permis de proposer des modèles permettant d'expliquer les instabilités de surface en absence de prétraitement, et inversement. Enfin, mon travail a permis à l'équipe d'avoir un rôle actif dans le démarrage d'une collaboration très encourageante avec une équipe suédoise (KTH-Stockholm) sur des capteurs biologiques basés sur la mesure de courants d'écoulement dans un capillaire de silice.

Les objectifs de ma thèse concernant la mesure de zêta par courants d'écoulement ont donc été atteints, et ce travail permettra, je l'espère, d'étudier dans le futur plus finement des interfaces autres que la silice afin d'obtenir des systèmes nanofluidiques polarisables, c'est-à-dire dont la permsélectivité pourra être ajustée en fonction de l'application visée.

Pour le moment, je propose au lecteur de découvrir dans la troisième partie de mon manuscrit, le travail réalisé sur le thème de la préconcentration de molécules biologiques dans des systèmes Micro-Nano-Microfluidiques.

Partie 3 : Mise en œuvre de la préconcentration par ICP dans un système MNM à membrane

Sommaire

<u>1</u>	<u>1</u> Introduction et objectifs					
<u>2</u>	La X	Kurography : une technologie originale pour la fabrication de dispositifs MNM				
4	<u>2.1</u> <u>1</u>	La Xurography	116			
4	<u>2.2</u>	Avantages et inconvénients de la Xurography				
4	<u>2.3</u> <u>1</u>	Protocoles de fabrication détaillés suivant le type de membrane				
	<u>2.3.1</u>	Les membranes de type « éponge » : dispositifs MNM 2D (ou « planaires »)				
	<u>2.3.2</u>	<u>Les membranes de type « colonnaires » : dispositifs MNM 3D</u>				
<u>3</u>	Band	c expérimental et quantification de la préconcentration	127			
2	<u>3.1</u>	Description du banc expérimental	127			
2	<u>3.2</u> <u>1</u>	Protocole de préconcentration	129			
2	<u>3.3</u>	Quantification par fluorescence de la préconcentration				
	<u>3.3.1</u>	Rappel théorique				
	<u>3.3.2</u>	<u>Dispositifs de calibration</u>				
	<u>3.3.3</u>	<u>Courbes de calibration</u>				
	<u>3.3.4</u>	Effet du pH				
	<u>3.3.5</u>	<u>Exemple de calcul du taux de préconcentration</u>				
	<u>3.3.6</u>	<u>Effet de la répartition des espèces fluorescentes dans l'épaisseur du canal</u>				
<u>4</u>	Syst	èmes MNM à membrane Nafion				
4	<u>4.1</u>	Effet de la tension d'activation et de la largeur de membrane				
4	<u>4.2</u> <u>1</u>	Effet de la force ionique de l'électrolyte	149			
<u>5</u>	Autr	es types de membranes	153 107			
	<u>5.1</u>	Membrane de polycarbonate				
----------	------------	--	----------------	--	--	--
	<u>5.2</u>	Membrane d'alumine				
	<u>5.3</u>	Membrane d'agarose	155			
	<u>5.4</u>	Réseau de nanofentes en verre	157			
	<u>5.5</u>	Puce de préconcentration à bulle				
	<u>5.6</u>	Récapitulatif des différents préconcentrateurs MNM réalisés	162			
<u>6</u>	Mc	odélisation et description phénoménologique de la préconcentration dans le mode symé	<u>étrique</u>			
	163	3				
	<u>6.1</u>	Considérations théoriques - problématiques	164			
	<u>6.1</u>	<u>.1</u> <u>Position du problème</u>	165			
	<u>6.1</u>	.2 Problématiques au niveau de la membrane de Nafion	168			
	<u>6.1</u>	.3 Problématiques au niveau de la zone déplétée	168			
	<u>6.2</u>	Vers un modèle simplifié de l'électropréconcentration en mode symétrique	170			
	<u>6.2</u>	<u>Comportements électriques et hydrodynamiques de la membrane de Nafion</u>	170			
	<u>6.2</u>	<u>.2</u> <u>Etude du transport ionique restreint au microcanal anodique</u>	175			
	<u>6.2</u>	<u>Problématique des conditions aux limites proches de la membrane</u>	176			
	<u>6.2</u>	<u>.4</u> <u>Influence du FPDF sur la dimension de la zone déplétée</u>	177			
	<u>6.3</u>	Description phénoménologique de l'électro-préconcentration en mode symétrique	179			
	<u>6.3</u>	<u>.1</u> <u>Nécessité d'un modèle 2D</u>	180			
	<u>6.3</u>	.2 Vers un modèle 2D simplifié	180			
	<u>6.3</u>	<u>.3</u> <u>Résultats de la simulation</u>	181			
	<u>6.4</u>	Conclusion	185			
7	Co	nclusion	187			

La préconcentration de molécules biologiques dans un laboratoire sur puce est un sujet majeur depuis quelques années dans la communauté des micro/nanofluidiciens, tout comme dans l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse. Cette thématique est intéressante tant d'un point de vue technologique que d'un point de vue physique. En effet, intégrer de manière astucieuse des nanocanaux dans un système microfluidique est un challenge particulièrement excitant. De plus. le couplage microfluidique/nanofluidique complexifie intensément la physique des écoulements et du transport ionique.

Cette troisième partie de ma thèse est donc consacrée à la présentation des résultats que nous avons obtenus sur des préconcentrations de molécules biologiques dans des systèmes MNM. Nous proposons ici de balayer un panorama assez vaste, depuis des aspects très technologiques jusqu'à la description des phénomènes physiques permettant d'obtenir la préconcentration désirée. Pour cela, un premier chapitre sera consacré à l'exposé des objectifs attendus pour ma thèse, puis nous présenterons dans un deuxième temps les méthodes technologiques originales que nous avons développées pour la réalisation de systèmes MNM. Un troisième chapitre sera consacré à la présentation des méthodes de calibration du banc expérimental, étape essentielle pour mesurer de manière fiable les taux de préconcentration obtenus. Le chapitre suivant décrira les résultats obtenus avec une membrane de Nafion, et l'influence des différents paramètres expérimentaux, comme par exemple la tension d'activation ou encore l'épaisseur de la membrane. Nous décrirons ensuite des dispositifs MNM réalisés à titre exploratoire avec d'autres types de matériaux nanoporeux. Enfin, des modèles physiques et phénoménologiques seront proposés, permettant un premier niveau de compréhension des phénomènes mis en jeu lors de la préconcentration de molécules biologiques.

Le lecteur pourra mesurer, à la lecture de cette troisième partie de mon travail, la diversité des compétences demandées pour sa bonne réalisation; et que cette thématique de préconcentration a fait appel à de nombreuses compétences scientifiques et techniques, à la frontière entre physique et ingénierie.

1 Introduction et objectifs

La préconcentration est une étape quasiment incontournable pour la réalisation d'un laboratoire sur puce utilisable en conditions réelles de terrain, car il arrive bien souvent que les analytes d'intérêt soient à de très faibles concentrations et/ou à l'état de traces. De plus, par la nature même des systèmes microfluidiques, les volumes des zones de mesures sont souvent extrêmement faibles, ce qui est très défavorable aux méthodes de mesures sensibles à la quantité de matière, comme les méthodes optiques : l'absorbance ou la fluorescence par exemple. C'est pourquoi cette thématique de recherche a autant de succès dans la communauté des micro/nanofluidiciens depuis une dizaine d'années maintenant.

Confrontée à ces mêmes contraintes expérimentales, l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a pour objectif l'obtention, non seulement de systèmes de préconcentration de molécules biologiques, mas aussi de dispositifs nanofluidiques polarisables, afin de pouvoir sélectionner de manière adaptative le type de molécule à préconcentrer (charge, mobilité, etc...) en temps réel. Les membranes polarisables ont fait l'objet d'une thèse qui s'est déroulée avant la mienne, mais ce travail a montré l'extrême difficulté d'obtenir de telles membranes, et surtout, d'en contrôler les charges de surface par une polarisation physique. La partie précédente de mon manuscrit, qui consistait justement à maîtriser au mieux les mesures de charges de surface par courants d'écoulement afin de déterminer expérimentalement des modulations de potentiels zêta mesurables et contrôlables par des effets de polarisation électriques a montré une nouvelle fois la très grande difficulté de cette tâche. Il est donc apparu qu'il ne serait pas raisonnable de s'entêter dans cette voie pour ma thèse, et qu'il fallait donc dans un premier temps travailler avec des membranes non-polarisables, commerciales de préférence, afin d'engranger dans un premier temps une expérience dans le domaine des dispositifs MNM et de la préconcentration de biomolécules sur puce d'une manière générale; car, rappelons-le ici, aucune préconcentration n'avait été réalisée dans l'équipe avant ma thèse.

Comme présenté dans la première partie bibliographique de mon manuscrit, il existe aujourd'hui dans la littérature plusieurs méthodes pour obtenir une préconcentration avec une membrane permsélective (effets de taille et de charge principalement).^{58–65} Parmi ces approches, notons principalement la méthode de préconcentration basée sur l'ICP (Ion Concentration Polarisation), qui a été beaucoup étudiée grâce à de très bons taux de préconcentration^{81,97} et une relative simplicité de mise en œuvre. Pour rappel, dans ce type de dispositif, le recouvrement des doubles couches dû à la taille nanométrique des pores induit un effet d'exclusion des co-ions. Ainsi, lors de l'activation par une tension appliquée apparaissent deux zones de part et d'autres de la membrane, respectivement déplétée et enrichie

en ions du tampon (voir figure 1). Quand les conditions sont réunies, une zone de préconcentration apparaît alors à la frontière entre la zone « normale » du tampon et la zone déplétée en ions grâce à la perturbation de la distribution des champs électriques dans le système MNM, et particulièrement à cette frontière.



Figure 1 : Schéma de principe de la préconcentration par ICP : a) les deux microcanaux sont séparés par une membrane permsélective qui permet de bloquer les co-ions, b) deux zones sont formées sous l'activation du système, nommées « zone dépletée » et « zone d'enrichissement », c) les biomolécules s'accumulent pour former une zone de préconcentration.

Il en ressort donc que pour obtenir et observer l'effet de préconcentration désiré, nous devons disposer à minima de deux canaux microfluidiques séparés par une zone nanofluidique, avec la possibilité d'un remplissage rapide et efficace du système, ainsi que la possibilité d'appliquer les potentiels aux entrées/sorties et d'observer l'ensemble dans un microscope de fluorescence. La réalisation majeure de ma thèse est d'obtenir un système MNM, et de le mettre en œuvre comme démonstrateur de préconcentration pour une molécule biologique (une protéine fluorescente dans notre cas). Mon plan de travail a donc été subdivisé en cinq objectifs successifs :

1. Concevoir une structure MNM fluidique fiable, simple à fabriquer; et surtout compatible avec une intégration future dans un laboratoire sur puce fonctionnel. En effet, l'étude de la littérature montre de très nombreux préconcentrateurs, mais une analyse critique simple montre que ceux-ci sont finalement rarement exploitables dans une chaine de fonctions microfluidiques. L'exemple le plus emblématique de cet écueil est le travail de Han⁹⁷ en 2005, qui démontre une préconcentration de l'ordre du million en utilisant un nanocanal unique. Ce travail est remarquable car il est un des premiers dans le domaine, mais les temps pour obtenir cet effet, de l'ordre de 100 minutes, ne sont pas compatibles avec certaines analyses (par exemple une réaction de dérivatisation n'est souvent stable que quelques minutes) ; et de surcroit, les volumes de la zone de préconcentration sont extrêmement faibles, ce qui induit une disparition quasi-immédiate de l'effet désiré à cause de la diffusion moléculaire en quelques secondes dès que la polarisation du système disparait. Insistons

ici sur le fait que nous avons voulu pour notre part réaliser un dispositif utilisable, c'est-à-dire fonctionnant à temps courts, sur des volumes assez grands pour être exploitables dans une chaine de fonctions microfluidiques, et utilisant une technologie de préférence simple, rapide et peu couteuse. Tel était donc l'attendu de la première étape de ce travail.

2. Banc expérimental et protocole de quantification du taux de préconcentration

L'analyse de la littérature nous a montré que la quantification du taux de préconcentration par fluorescence est un problème moins simple qu'il ne peut en avoir l'air au premier abord. En effet, la fluorescence en milieu liquide est simple à utiliser pour des études qualitatives, mais devient nettement plus complexe quand il s'agit d'être quantitatif, car les niveaux de fluorescence mesurés sont très souvent fonction du pH local, de la force ionique du tampon, etc... Or, même si nous avions dans notre équipe une certaine expérience en la matière, les contraintes particulières induites par mon sujet (variations locales de pH et de forces ioniques très fortes, par exemple) nous ont conduit à repenser nos approches expérimentales, et donc à concevoir un protocole de quantification le plus adapté possible à la mesure des taux de préconcentration dans les dispositifs MNM que j'ai eu à concevoir et à tester.

3. Optimisation paramétriques du taux de préconcentration

Le troisième objectif de mon travail, après l'obtention de dispositifs MNM fonctionnels et après la mise en place des protocoles expérimentaux associés, a consisté tout naturellement à jouer avec les paramètres expérimentaux à notre disposition pour maximiser les taux de préconcentration et dégager quelques premières tendances quant aux effets de ces paramètres de contrôle : tension appliquée sur le système, concentration du tampon, largeur de la membrane, etc... Etant donné le temps imparti pour cette tâche, il ne s'agissait pas ici d'être exhaustif, mais de commencer à comprendre, par l'expérience, les phénomènes physiques mis en jeu lors de la préconcentration, afin de nourrir les modèles mais aussi acquérir une expérience dans ce nouveau domaine de recherche pour l'équipe.

4. Explorer différents types de nano structures

Comme nous le verrons plus en détail plus loin, les trois premières étapes de ce travail sur les structures MNM ont été réalisées en utilisant exclusivement des membranes de Nafion, pour des raisons pratiques, mais aussi parce que cette membrane est très utilisée dans la littérature. La bonne réalisation des expériences nous a donné raison, mais nous n'avons pas voulu nous limiter à ce seul type de membrane,

afin d'apporter une originalité à mon travail et aussi acquérir une nouvelle expérience dans le domaine. Un autre objectif de mon travail a donc consisté à explorer d'autres structures nanofluidiques, d'autres membranes commerciales bien sûr, mais pas seulement. Je montrerai par exemple au chapitre 5.5 que j'ai obtenu de la préconcentration en introduisant uniquement une bulle d'air dans le système, ce qui est très novateur.

5. Modélisation du phénomène de préconcentration dans la structure MNM fluidique

La préconcentration dans une structure MNM n'est pas un phénomène simple à comprendre, d'autant plus que, comme nous le verrons plus loin, nos systèmes ne fonctionnent pas comme la majorité de ceux rencontrés dans la littérature. Il était donc nécessaire de proposer une analyse de ce qui se passe lors d'une expérience de préconcentration, ce qui fait l'objet du dernier stade de ce travail. Les phénomènes physiques et chimiques mis en jeu sont complexes et couplés, ce qui nous impose de faire appel à des simplifications géométriques et à des modèles numériques sous COMSOL, qui seront présentés de manière la plus simple et pédagogique possible. Ces premiers modèles n'ont pas la prétention d'être complets aujourd'hui, et ils mériteront d'être affinés et complétés dans le futur. Néanmoins, ils sont une première base, solide, qui nous a permis de comprendre un certain nombre de points clés et d'acquérir une première expertise dans ce domaine qui était, rappelons-le, totalement nouveau pour l'équipe au début de ma thèse.

Les cinq objectifs majeurs de cette troisième partie de ma thèse qui ont été exposés ici forment tout naturellement la structure de l'exposé des travaux que je vais présenter au lecteur dans les pages qui suivent : je présenterai tout d'abord les technologies de fabrication des puces MNM de ma thèse, puis je le présenterai le banc expérimental et les protocoles mis en place. Ensuite, un chapitre sera consacré à l'exploration des paramètres expérimentaux et à la maximisation des taux de préconcentration. Une présentation d'autres systèmes MNM incluant des structures nanofluidiques parfois très originales suivra; et cette troisième partie de mon manuscrit sera close par l'exposé des modèles théoriques que j'ai développé au cours de ce travail.

2 La Xurography : une technologie originale pour la fabrication de dispositifs MNM

Comme déjà évoqué précédemment, la réalisation d'un système MNM dédié à la préconcentration était une problématique totalement nouvelle au laboratoire au début de ma thèse : nous partions littéralement de zéro dans ce domaine. Il fallait donc dans un premier temps mettre en place une technologie de fabrication dédiée à mon sujet de thèse, ce qui est une tâche assez fastidieuse et longue mais concluante.

D'un point de vue purement schématique, l'obtention d'un système MNM demande la combinaison de trois éléments fonctionnels : deux zones principales constituées de canaux microfluidiques (ou de réseaux de canaux microfluidiques), un élément nanofluidique entre ces deux zones, et des entrées/sorties pour communiquer avec le monde macroscopique. L'analyse critique de la littérature a exclu d'emblée la réalisation de systèmes MNM à nanocanaux uniques (ou équivalents), car dans le but d'une application réelle future, ce type de dispositif n'est pas indiqué à cause des trop faibles volumes de la zone de préconcentration. En effet, le taux de préconcentration n'est pas le seul critère d'intérêt, le volume aussi; et plus précisément, le produit des deux, c'est-à-dire, la quantité de matière utile dans la zone de préconcentration. Il fallait donc dès le départ imaginer un dispositif dont la partie « nanofluidique » présente une « surface de contact » avec les microcanaux assez grande pour obtenir les volumes escomptés.

C'est pourquoi notre choix s'est porté d'emblée vers des membranes nanoporeuses commerciales, en prenant bien garde de les intégrer de manière simple et efficace dans le système MNM ; c'est-à-dire de manière jointives entre deux portions de canaux microfluidiques. Nous ne sommes pas les premiers à travailler avec de tels systèmes membranaires^{77,85,86,118}, ce qui nous a confortés dans ce choix. Ces membranes commerciales forment un marché très vaste et les références disponibles sont innombrables. Les applications « classiques » de ces produits sont, par exemple, le dessalement d'eau, la dépollution, la chimie analytique, les piles à combustibles, etc... On peut les classer suivant la conformation géométrique des pores, soit des membranes de type « éponge », soit des membranes de type « colonnaire »; et dans la majorité des cas, commercialisées sous forme de pastilles ou de feuilles plus ou moins épaisses (généralement de l'ordre de 100 μ m ou moins) et plus ou moins rigides. Notre choix s'est porté principalement sur des membranes Nafion, qui sont souples et de type « éponge », mais pas seulement, comme nous le montrerons au chapitre 5 de cette partie 3. Il s'agit maintenant de présenter au lecteur comment ces membranes sont insérées dans des dispositifs microfluidiques, et les stratégies technologiques qui ont été choisies pour mon travail de thèse. Tout d'abord, nous devons réaliser les canaux microfluidiques, et à défaut de canaux nanofluidiques en tant que tels, envisager dès la conception générale du système la manière dont la membrane sera insérée.

La littérature regorge de propositions plus ou moins élégantes, ultra-majoritairement basées sur les technologies de salle blanche aujourd'hui devenues relativement classiques : les cycles « dépôts-lithographies-gravures » sur matériaux durs (silicium et verre principalement). On pense bien sûr ici aux gravures chimiques,¹⁴⁵ ou à la RIE.^{97–99}, par exemple. Certains travaux utilisent les techniques de lithographie molle sur PDMS^{85,91}, qui nécessitent elles aussi un passage obligé en salle blanche pour la réalisation des maîtres-modèles. Les éléments nanofluidiques sont quant à eux fabriqués soit par des techniques de photolithographie standard,¹⁴⁵ soit par des méthodes de photo-polymérisation UV,¹¹¹ soit par un claquage électrique sur une restriction entre deux microcanaux.⁸⁸ Le scellement des systèmes MNM, dernière étape technologique à maitriser, est obtenu par du « bonding » verre-verre^{93,94}, verre/PDMS^{79,80}, verre/silicium^{95,96}, méthodes qui demandent elles aussi un accès en salle blanche et un matériel très spécifique (banc de collage anodique, plasma oxygène, etc...). Les matériaux et technologies évoqués ici, et la salle blanche afférente, sont parfaitement disponibles à l'INL grâce à la centrale technologique NanoLyon, mais il a été décidé pour ma thèse d'utiliser une autre technologie, plus rapide, déjà explorée pour la thèse de mon prédécesseur Guillaume Laffitte, et qui s'est avérée être parfaitement adaptée à mon projet : la Xurography.

2.1 La Xurography

La Xurography, en Grec « écriture avec un couteau », peut se définir de manière simple comme l'utilisation d'outils de découpe 2D (lame + machine de découpe) sur des feuilles adhésives (simples ou double-faces), pour la réalisation de microsystèmes en général, et pour la fabrication de puces micro/nanofluidiques dans le cadre de mon travail. En effet, la micro/nanofluidique est une des applications de cette technologie, mais pas la seule : l'article de référence du domaine, proposé en 2005 par Bartholomeusz et al.¹²⁴, ne traite pas de microfluidique, mais pose de manière claire les bases de cette nouvelle technologie en tant qu'outil d'appoint aux technologies de salle blanche. Il est important de comprendre ici que la Xurography n'est pas une technologie originale en elle-même : elle utilisée depuis très longtemps par le monde de l'affichage publicitaire, et qu'il s'agit ni plus ni moins qu'un détournement. C'est d'ailleurs ce qui fait l'élégance du travail de Bartholomeusz et de ses collaborateurs, car ils n'ont pas eu à développer de nouvelles machines, mais simplement à utiliser de l'existant et à l'adapter au domaine des microtechnologies. La figure 2 représente une des machines de découpes disponible de manière courante, et un affichage publicitaire typique réalisé avec ce type de matériel :



Figure 2 : Machine de découpe de films polymères et exemple d'application pour l'affichage publicitaire.

Schématiquement, réaliser une puce microfluidique en utilisant la Xurography peut se résumer en six étapes :

- (1) Dessiner sur un logiciel adapté le tracé en 2D (vue de dessus) du réseau de microcanaux désiré.
- (2) Découper ce réseau dans une feuille adhésive double-face, dont l'épaisseur (typiquement de quelques microns à la centaine de microns) sera in-fine la profondeur des canaux.
- (3) Après découpe, retirer sur la feuille les parties de l'adhésif qui formeront ensuite les canaux.
- (4) Transférer l'adhésif sur un support (généralement une lame de verre ou une feuille polymère souple).
- (5) Couvrir la face supérieur de l'adhésif d'une deuxième lame de verre (ou une feuille polymère), préalablement percée pour les entrées/sorties.
- (6) Coller les connectiques d'entrées/sorties.

Le design de la puce mis à part, le cycle de fabrication d'une puce microfluidique par cette technique n'excède par quelques minutes, ce qui rend cette approche particulièrement intéressante pour le prototypage rapide. Les adhésifs que nous utilisons dans l'équipe sont présentés dans le tableau 1, ils proviennent principalement des fournisseurs Plusform et Tesa, leur épaisseur peut varier de 5 μ m à 110 μ m, et ils ne coutent que quelques euros au m² :

Tableau 1 : Epaisseurs de quelques adhésifs fournis par Plusform et Tesa.

Type d'adhésif	Epaisseur (µm)
tesa@68556	5
tesa@68558	12
tesa@68511	60
Montex DX 1	110

2.2 Avantages et inconvénients de la Xurography

Les avantages de la Xurography pour la réalisation de puces microfluidiques sont très nombreux. Tout d'abord, un gain de temps considérable, comparé à la lithographie molle sur PDMS qui demande typiquement deux heures de travail pour obtenir une puce microfluidique (en supposant que le maîtremodèle soit disponible) ; ou les technologies Si/verre qui nécessitent au moins une journée de travail. La Xurography est aussi une technologie entièrement sèche, ce qui diffère des technologies de salle blanches précitées, qui demandent un certain nombre d'étapes en milieux liquides, comme par exemple lors du développement de résines photosensibles ou pour certaines gravures humides ; induisant un certain nombre de lavages et séchages coûteux en ressources et en temps. Ensuite, la Xurography permet d'obtenir en un seul geste, à la fois la formation des microcanaux mais aussi le scellement de la puce, ce qui évite notamment l'usage de bancs de collage type plasma O_2 ou collage anodique¹⁴⁶, coûteux à l'achat et en fonctionnement. A l'inverse, le matériel utilisé pour la Xurography est extrêmement bon marché : une machine de découpe coute moins de 1500 euros, un couteau 30 euros environ (et permet de couper théoriquement 4000 m de film), et les adhésifs les plus courants ont un prix de quelques euros au m². Enfin, la Xurography permet de réaliser de manière simple et pratique des systèmes microfluidiques multiniveaux, ce qui est possible en PDMS ou en Si/verre mais en complexifiant alors considérablement les technologies mises en œuvre. La Xurography présente donc des intérêts majeurs, qui en font une alternative de choix aux technologies plus couramment rencontrées dans les laboratoires de microfluidique, mais il ne serait pas honnête de ne pas mentionner aussi les inconvénients qu'elle comporte.

En premier lieu, la faible résolution spatiale obtenue, due au positionnement de la lame par la machine mais aussi à la tenue mécanique des films adhésifs lors de la découpe. Notre expérience montre qu'avec le matériel que nous utilisons, cette résolution est de l'ordre de 300 µm typiquement, ce qui est considérablement grand si l'on compare ce chiffre avec les canaux de quelques micromètres atteignables en technologie PDMS ou de quelques dizaines de nm atteignables par des gravures de silicium ou de verre. Il est donc évident que le choix ou non de la Xurography dans un processus technologique donné sera très fortement conditionné par cette contrainte de dimension. Or, il arrive finalement assez souvent que cette « barrière » des 300 µm ne soit pas un problème, car en pratique le design des canaux n'aboutit pas toujours à cette limite. Par exemple, les puces de préconcentration de ma thèse n'ont aucun canal de moins de 600 µm de large, ce qui autorise la Xurography comme technologie de fabrication.

Un deuxième écueil majeur de la Xurography concerne les pressions maximales dans les systèmes avant que des fuites de liquides apparaissent. En effet, les adhésifs et colles présents en surface des films découpés ne peuvent en aucun cas rivaliser avec les liaisons covalentes crées par un plasma oxygène lors d'un collage PDMS/PDMS ou PDMS/Verre ; ou encore les liaisons covalentes crées lors d'un collage anodique Si/verre. Il est d'ailleurs quasi-impossible, et même vain, de chercher à connaître a priori, c'està-dire de manière théorique, la pression maximale d'utilisation d'une puce donnée; tant cette pression va dépendre du design de la puce, du type d'adhésif, de la viscosité du liquide utilisé, des débits demandés, du soin avec lequel l'expérimentateur va fabriquer sa puce microfluidique, etc... L'expérience nous a cependant montré que cette limite en pression n'est pas si faible que cela pour autant, et que nous avons réussi dans l'équipe à obtenir des résultats très intéressants sur un certain nombre de projets : mesures de courants d'écoulement dans des microcanaux, développement de micro-pompes ou de biopiles à combustibles microfluidiques, par exemple. Il suffit le plus souvent de limiter l'excursion en débits pour ne pas rencontrer ce problème éventuel de tenue en pression. Dans le cadre de ma thèse, ce problème n'existe pas car, hormis le remplissage toutes les expériences sont réalisées sous des écoulements électroosmotiques, qui présentent des pressions hydrodynamiques virtuellement nulles.

Un dernier défaut intrinsèque à la Xurography provient de la nature chimique des polymères et des colles présents dans des films adhésifs que nous utilisons. Cette chimie peut être rédhibitoire pour l'utilisation de certains liquides, et plus précisément de certains niveaux de pH (ou encore de certains solvants) qui seraient trop agressifs pour ces matériaux, empêchant de fait leur utilisation. Il faudra alors choisir des matériaux plus robustes comme le verre, le silicium, ou, dans une moindre mesure, le PDMS. A l'inverse, les matériaux du film adhésif peuvent eux aussi présenter une certaine agressivité chimique pour des objets biologiques (biomolécules, bactéries, cellules, etc...) présents dans les solutions étudiées, car ils ne sont à-priori pas tous biocompatibles, loin s'en faut. Dans le cas de ma thèse, les solutions tampons que j'ai utilisées sont aqueuses et relativement douces en termes de pH ; et nous n'avons pas observé de dégradations chimiques des biomolécules que j'ai étudiées à cause des films adhésifs.

Enfin, notons aussi les problèmes d'hétérogénéité de surface que peuvent causer des assemblages très composites à base de verre, de divers polymères et de colles. Là encore, il faut juger au cas par cas si cette hétérogénéité de matériaux est un problème ou non. Pour ma thèse, par exemple, le processus de préconcentration utilise les écoulements électroosmotiques, et donc, par suite, les potentiels zêta des matériaux qui composent les parois. Sans entrer trop dans les détails à ce stade de la rédaction, les canaux microfluidiques de ma thèse ont une section de 600 µm de large (en verre) par 200 µm de profondeur (en polymères), ce qui implique qu'un quart des surface présentent un potentiel zêta a priori différent de celui du verre. Ceci serait probablement rédhibitoire pour la réalisation d'une puce de séparation par électrophorèse capillaire à cause des distorsions de flux aux interfaces, et donc aux dispersions induites sur les pics de séparations. Mais dans le cas de mes travaux, nous n'avons pas relevé de tels problèmes et les puces ont parfaitement joué leur rôle malgré ces problèmes d'inhomogénéité de surface.

Par les avantages qu'elle présente, mais aussi à cause des nombreux inconvénients qui la caractérisent, la Xurography ne peut être qu'une technique d'appoint aux technologies de salle blanche couramment utilisées dans les laboratoires de microfluidique. Elle ne peut en aucun cas prétendre être une solution universelle à tous les besoins technologiques. Elle a cependant été le candidat idéal pour mes travaux de thèse, car ses inconvénients n'ont posé aucun problème pour la bonne réalisation de mon travail; et ses avantages m'ont permis notamment un gain de temps considérable.

Le lecteur remarquera ici que nous n'avons pour l'instant abordé la Xurography que dans le cadre de la fabrication de puces microfluidiques. Or, pour l'obtention de systèmes MNM de préconcentration, il convient d'inclure des parties nanofluidiques dans le système, en l'occurrence par l'insertion de membranes. Je propose donc de décrire maintenant les méthodes et les stratégies que j'ai développées au cours de ma thèse pour remplir cette tâche, en distinguant les deux types de membranes disponibles : « éponges » ou « colonnaires ».

2.3 Protocoles de fabrication détaillés suivant le type de membrane

2.3.1 Les membranes de type « éponge » : dispositifs MNM 2D (ou « planaires »)

Les membranes de type « éponge » présentent une topologie qui ressemble très fortement à celle d'une éponge lorsque qu'elles sont observées en microscopie. Elles sont isotropes et peuvent donc être utilisées dans toutes les directions de manière indifférenciée. Elles sont la plupart du temps commercialisées sous forme de feuilles souples et relativement grandes (typiquement des feuilles A4), pour lesquelles il est possible de réaliser des découpes par Xurography. Dans ce cas, nous allons globalement utiliser une technologie 2D, c'est-à-dire, avec les microcanaux et la membrane dans un seul et même niveau de réseau de canaux micro/nanofluidiques. La figure 3 représente schématiquement un tel type de dispositif :



Figure 3 : Préconcentrateur MNM fluidique en 2D composé de trois couches : verre/adhésif-membrane/verre.

Cette configuration 2D, ou planaire, peut être décrite de manière simple comme : deux microcanaux, chacun en forme de « V », séparés par une encoche dans laquelle sera incluse la membrane. Cette forme particulière des microcanaux est dictée par les contraintes de remplissage du système : en effet, la membrane présente une résistance hydrodynamique extrêmement grande; et un dispositif MNM « en ligne », avec deux microcanaux droits séparés par la membrane s'avère extrêmement longue à remplir à cause de la membrane. Ici, la forme en « V » des canaux (et donc, la forme globale en « X » de la puce) permet de les remplir chacun, indépendamment, sans avoir à lutter contre la résistance de la membrane ni à forcer sur les pressions appliquées. Le procédé détaillé de fabrication d'un tel système est le suivant (figure 4) :

- (1) Nettoyer deux lames de verre, de dimension $50 \cdot 76 \cdot 1$ mm, après avoir percé l'une d'entre elle de quatre trous pour les entrées/sorties avec un foret diamanté.
- (2) Découper les microcanaux et l'encoche pour la membrane dans une feuille adhésive doubleface (figure 4a). Les largeurs minimales sont de 600 μm et la forme globale du système est un « X » comme décrit précédemment.
- (3) Retirer les parties découpées, qui seront ensuite les microcanaux dans le système MNM (figure 4b). Transférer l'adhésif double-face sur la première lame de verre (non percée), qui sert de support au système.
- (4) En fonction des épaisseurs de la membrane et de l'adhésif utilisés, les étapes (2) et (3) peuvent être répétés n fois afin d'ajuster leurs dimensions respectives. Notons ici que la littérature montre que l'on obtient un effet de préconcentration même lorsque la membrane n'occupe pas entièrement tout le volume qui lui est dévolu.⁷⁷

- (5) Découper par Xurography un parallélépipède de membrane, aux dimensions de l'encoche prévue pour l'accueillir.
- (6) Transférer la membrane dans l'encoche (figure 4c).
- (7) Fermer le dispositif en utilisant la deuxième lame de verre, percée, et presser le tout sous 7 bars afin d'assurer la meilleure étanchéité possible, puis coller des connectiques pour les entrées/sorties, en l'occurrence des NanoPorts (N-333-01 IDEX Health & Science, USA) dans le cadre de ma thèse (figure 4d). Ces connectiques seront utilisées dans un premier temps pour le remplissage du système sous pression, puis comme réservoirs d'électrolytes pendant les étapes de préconcentration, dans un deuxième temps.

La figure 4 représente de manière schématique la procédure de fabrication, ainsi qu'une photographie d'un dispositif de préconcentration MNM prêt à l'emploi. L'ensemble du procédé de fabrication demande moins de 15 minutes pour obtenir un tel microsystème, ce qui est remarquablement court et très novateur à notre connaissance dans le domaine de la nanofluidique.



Figure 4 : Procédé de fabrication d'un dispositif MNM 2D basé sur la Xurography : (a) découpe de l'adhésif double-face, (b) retrait des parties découpées, (c) transfert de l'adhésif sur une lame de verre et insertion de la membrane, (d) fermeture du système et collage des entrées/sorties fluidiques, (e) exemple de système MNM 2 D finalisé.

Les membranes de Nafion, que nous avons très majoritairement utilisées dans ma thèse, font partie de cette classe de membranes de type « éponge » (avec des nanopores de l'ordre de 2 à 4 nm), c'est pourquoi je propose de nous attarder ici un instant sur ce cas particulier. Dans le cas précis du Nafion,

nous allons pouvoir exploiter le fait qu'il a tendance à gonfler lorsqu'il est mis en présence d'un tampon aqueux,¹⁴⁷ ce qui sera très utile pour compartimenter de manière bien étanche les deux zones microfluidiques du système. Le tableau 2 présente les épaisseurs de différentes feuilles de Nafion commercialisées :

Tableau 2 :	Epaisseurs of	de quelques	membranes	Nafion	commerciales.
		1 1			

Type de Nafion	épaisseur (µm)
N-117	183
N-115	127
NR-212	51
XL	27.5

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'épaisseur de la membrane de Nafion doit s'adapter à celle de l'adhésif double-face, et réciproquement. Or, l'adhésif que nous utilisons (MONTEX DX-1) présente une épaisseur de 110 µm, ce qui n'est compatible ni avec la membrane d'épaisseur 127 µm ni avec la membrane d'épaisseur 183 µm. Nous avons cependant choisi d'utiliser la membrane d'épaisseur 183 µm et deux couches d'adhésif à 110 µm, soit 220µm au total. Le problème d'adaptation a été résolu grâce à deux phénomènes : d'abord, le fait que les deux couches d'adhésif s'écrasent lorsque le dispositif est scellé sous une pression de 7 bars (nous estimons, après mesures au profilomètre, que cet écrasement est de l'ordre de 10 % environ); et conjointement, la membrane de Nafion accroit son volume lorsqu'elle est mise en présence d'électrolyte, de l'ordre de 8 à 10 % elle aussi. Ainsi, ces deux effets conjoints permettent d'assurer une étanchéité très correcte de la partie nanofluidique du dispositif MNM, que nous avons vérifiée expérimentalement en essayant, en vain, de transférer du liquide par pression entre les deux zones microfluidiques du système.

Dans le cas des membranes colonnaires, c'est-à-dire anisotropes, il n'est pas possible de procéder avec des systèmes planaires, le chapitre suivant (2.3.2) se propose de montrer comment nous avons procédé dans ce cas particulier.

2.3.2 Les membranes de type « colonnaires » : dispositifs MNM 3D

Les membranes de types colonnaires, contrairement aux membranes isotropes, ne peuvent être utilisées que dans une seule direction. Or, pour des raisons purement pratiques, ces membranes sont exclusivement vendues sous forme de feuilles et de pastilles, avec les pores disposés « verticalement »

lorsque la feuille ou la pastille est posée horizontalement. De plus, ces membranes sont soit impossibles à découper car extrêmement rigides et cassantes (ex : alumine), soit très difficilement manipulables après découpe quand ces découpes sont possibles (ex : polycarbonate). Enfin, ces membranes ne sont pas extensibles pour la plupart d'entre elle. Nous avons donc décidé d'utiliser ces membranes telles quelles, sans les découper, et donc de procéder de manière totalement différente qu'avec les membranes « éponges ». Plus précisément, nous avons profité de la possibilité d'empiler des couches d'adhésifs double-face pour réaliser des puces 3D, multi-niveaux, afin de s'adapter à ces nouvelles membranes. La figure 5 représente schématiquement un tel type de dispositif, constitué de trois « étages », avec l'étage inférieur et l'étage supérieur constitués de deux microcanaux, séparés par la membrane (sous forme de pastille) entre les deux.



Figure 5 : Procédés de fabrication des dispositifs MNM 3D basé sur la Xurography, en fonction du type de membrane (souple à gauche et rigide à droite).

Lorsque la membrane est souple, cinq couches suffisent pour obtenir un dispositif fonctionnel (figure 5, gauche): verre/adhésif/membrane/adhésif/verre. Lorsque la membrane est rigide, il faut ajouter deux couches d'adhésifs (figure 5, droite), de manière à prévenir les fuites entre les deux réseaux superposés de microcanaux d'amenée des fluides : verre/adhésif/ adhésif/membrane/adhésif/adhésif/verre.

Les membranes souples sont assemblées aux adhésifs en utilisant une plastifieuse, qui a l'avantage d'appliquer conjointement une pression et une température donnée, de manière progressive, ce qui permet de conformer les adhésifs au plus près de la membrane; dont l'épaisseur est le plus souvent très faible par rapport à celle des adhésifs (par exemple 10 μ m contre 110 μ m dans le cas des membranes de polycarbonate). Les membranes rigides et les adhésifs sont assemblés en utilisant une presse, en veillant à ne pas dépasser un seuil critique. Nous n'avons jamais observé de fuites en procédant ainsi, et cette technologie multicouches a donné entière satisfaction, comme nous le verrons au chapitre 5.

Mon travail de thèse a permis de disposer aujourd'hui au laboratoire de deux méthodes de fabrication basées sur la Xurography, de géométrie planaire et 3D, qui peuvent s'adapter à n'importe quel type de membranes. La suite de ce manuscrit démontrera que nous avons réussi à obtenir, grâce à cette technologie, des taux de préconcentration très intéressants en utilisant des membranes de Nafion, d'agarose, de polycarbonate, d'alumine, etc... Mais avant cela, je propose de présenter les protocoles expérimentaux que j'ai développés pendant ma thèse afin d'obtenir et de quantifier des expériences de préconcentration de fluorescéine.

3 Banc expérimental et quantification de la préconcentration

Mesurer de manière correcte le taux de préconcentration d'une biomolécule dans un système Micro-Nano-Microfluidique (MNM) n'est vraiment pas un sujet aisé. En effet, comme les résultats de ce chapitre le montreront très clairement, la dynamique des caméras disponibles sur les microscopes de fluorescence n'est jamais assez grande pour être capable de mesurer à la fois la concentration initiale et la concentration finale de la molécule considérée, pendant l'expérience de préconcentration – aux valeurs typiques des taux de préconcentration que nous obtiendrons, sur une zone donnée de la puce. Au contraire, l'expérience montre que les niveaux de faibles concentrations sont presque toujours noyés dans le bruit ou les courants d'obscurité ; tandis que si l'on n'y prend garde, les niveaux de signaux à la préconcentration peuvent aisément dépasser la saturation des capteurs photosensibles. A cela s'ajoutent les questions d'absorbance optimale des longueurs d'ondes d'excitation, d'ajustement des pH aux caractéristiques de fluorescence des molécules étudiées (du point de vue local dans la zone de préconcentration, ou global dans l'électrolyte), ou encore de photobleaching et donc de vieillissement des solutions. Toutes ces thématiques seront abordées dans ce présent chapitre, qui traite des protocoles expérimentaux que j'ai développés pendant ma thèse, et des méthodes mises au point pour quantifier les préconcentrations de la manière la plus objective et fiable possible.

3.1 Description du banc expérimental

Le banc expérimental que j'ai utilisé pour mes travaux de thèse a été développé et mis en place par une collègue du laboratoire, Magalie Faivre, qui m'a laissé y accéder pour y conduire mes expériences. Je n'avais donc pas le choix ni de la configuration optique, ni de la caméra pour les observations, ni des longueurs d'ondes d'excitation et de collecte du signal. Il me fallait donc, naturellement, adapter mes protocoles au banc expérimental, et non l'inverse. Ce banc de fluorescence est présenté en figure 6 :



Figure 6 : Description schématique du banc expérimental de quantification du taux de préconcentration.

Tout d'abord, les sources d'excitation et les filtres de collecte mis à notre disposition nous ont conduit à travailler avec de la fluorescéine (excitation à 494nm et émission maximale à 521nm). Le microscope de fluorescéine inversé (Leica DMI4000 B) est combiné avec une caméra (12 bits, DFC340 FX, Leica) pour quantifier le signal optique du préconcentrateur MNM fluidique. Un ordinateur est utilisé pour enregistrer toutes les données du microscope et le logiciel ImageJ est utilisé pour caractériser le signal optique de fluorescéine, et convertir en niveaux de gris (12 bits). Notons ici que les 12 bits de la caméra et des analyses logiciel correspondent à une dynamique bien supérieure aux 8 bits d'une image jpeg « classique », que l'on utilise tous les jours en photographie, par exemple. Pourtant, les 4096 niveaux de gris correspondants ne sont pas suffisants pour décrire correctement des niveaux de fluorescences très variables : depuis une concentration à l'état de traces jusqu'à des niveaux très nettement plus élevés lors de la préconcentration. Il faudra donc choisir des paramètres d'exposition et d'éclairement correspondants aux niveaux de préconcentration attendus, car ce sont bien ces valeurs qui nous intéressent in-fine. Enfin, la description du banc expérimental ne serait pas complète sans mentionner le source-mètre Keithley 2400 permettant de mettre la puce MNM sous tension et de mesurer les courants au cours de l'expérience. Notons ici un point très important pour la bonne compréhension de la suite de la lecture de ce chapitre : plutôt que le terme « polarisation », qui renvoie à la polarisation des interfaces dont il est très souvent question dans la partie 2, nous préfèrerons le terme « activation » pour décrire le fait de mettre le système MNM sous tension, et la mesure conjointe des courants électriques dans le système MNM.

3.2 Protocole de préconcentration

Le protocole de préconcentration, qu'il faut distinguer du protocole de mesure du taux de préconcentration est le suivant :

- Du chlorure de potassium (KCl) (ROTH©, de 0.1 mM à 0.1 M) est utilisé comme la solution d'électrolyte.
- (2) La fluorescéine sodium (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, l'excitation à 494 nm et l'émission à 521 nm, dépendante du pH, chargé négativement) est utilisée comme biomolécule à préconcentrer.
- (3) Des fils de platine (Pt) (1 mm de diamètre, Goodfellow, Huntingdon, UK) sont utilisés comme les électrodes.
- (4) Le pH de la solution d'électrolyte est fixé à 5 avant d'ajouter la fluorescéine, de manière à utiliser celle-ci dans sa fourchette de pH optimale, et donc de garantir la reproductibilité maximale des expériences; mais aussi afin de contrôler la densité de charge de surface du verre et donc les vitesses électroosmotiques dans la puce.
- (5) Le remplissage du système est fait à la main, en mettant à profit la forme en X dessinée à cette fin. On utilise pour cela une seringue permettant d'appliquer une pression et permettant le remplissage de chaque branche.
- (6) Après remplissage, on procède à l'activation électrique de la puce, tout en vérifiant l'absence de bulles d'air par le passage du courant. On appellera « canal anodique » la partie en V du système qui sera soumise au potentiel positif, et « canal cathodique » la partie du système à la masse. Les quatre électrodes seront polarisées deux à deux, comme si le dessin du canal était linéaire, avec une électrode à chaque extrémité du système. Ce type d'activation peut être appelé « mode symétrique » car chaque partie du dessin en « X » est polarisée de manière symétrique, contrairement aux nombreux travaux dans la littérature qui ne procèdent pas ainsi. ^{85,97}

En suivant ce protocole pas à pas, après quelques minutes d'activation, la préconcentration de la fluorescéine devient observable, à quelques millimètres de la membrane dans la partie anodique du système. La figure 7 montre deux images à deux instants de l'expérience : (a) à t=0 au début de l'activation, et (b) au bout de quelques minutes (la préconcentration est alors très clairement visible). Ce résultat expérimental montre que les zones de préconcentration sont symétriques, respectant la symétrie des tensions d'activation : en physique, les effets ont toujours les symétries des causes.

Phénoménologiquement (figure 7 c et d), les zones déplétées (cf. partie 1) en ions sont aussi formées symétriquement, donc les zones de préconcentration ne peuvent être elles aussi que symétriques :



Figure 7 : Exemples de vues expérimentales (en haut) et schématiques (en bas) du préconcentrateur MNM avant activation (à gauche) et après activation (à droite).

D'une manière générale, comme expliqué en partie 1, la création d'une zone déplétée près de la membrane dans le canal anodique est une condition nécessaire à l'apparition de la zone de préconcentration par le phénomène ICP. Or, la mesure du courant est un indicateur direct de cette formation car cette zone déplétée est très fortement résistive, et le courant total dans le système décroit lors de sa formation. Comme on peut le voir sur la figure 8, l'observation montre qu'un zone fluorescent (c'est-à-dire la préconcentration de fluorescéine), apparaît toujours conjointement à cette décroissance puis la stabilisation du courant dans le système :



Figure 8 : Exemple de l'évolution du courant électrique à travers la structure MNM lors de l'activation (20 V de tension appliquée, membrane Nafion, KCl 10^{-2} M, fluorescéine 10^{-5} M).

La mesure du courant est donc un excellent indicateur de la formation de la zone de préconcentration, et elle justifie l'utilisation d'un source-mètre au lieu d'un simple générateur de tension électrique.

Puisque les tensions appliquées et les zones de préconcentration sont symétriques dans le système, et que la préconcentration n'a lieu que dans la partie anodique (sauf exception) dans les expériences que j'ai eu à réaliser, nous choisirons dans la suite de ce chapitre de ne représenter qu'une seule des deux branches du « V » de la partie anodique, c'est-à-dire une seule des quatre branches du « X » formé par la puce MNM ; aussi bien dans sa version planaire que dans sa version 3D. En effet, cela permettra de se focaliser directement sur les aspects les plus intéressants à observer, et, de surcroit, cela correspondra aussi au champ de vision des optiques du microscope, qui ne permet pas d'observer les deux branches anodiques en même temps. Mais il faudra bien sûr toujours garder à l'esprit que l'image d'une branche correspond de manière symétrique à celle de l'autre branche. La figure 9 est un exemple du type de représentation que nous utiliserons à présent :



Figure 9 : Simplification de la représentation du canal anodique.

Maintenant que le banc expérimental a été présenté, ainsi que les protocoles d'utilisation de la puce microfluidique, je propose de nous focaliser sur les protocoles de mesure du taux de préconcentration, qui représentent en eux-mêmes une part importante du travail que j'ai eu à mener pour ma thèse.

3.3 Quantification par fluorescence de la préconcentration

Comme nous l'avons déjà précisé, pour quantifier la préconcentration nous utilisons la fluorescéine comme marqueur, pour deux raisons principales : d'abord parce qu'elle est parfaitement adaptée au microscope de fluorescence qui a été mis à notre disposition ; mais aussi parce que cette molécule est couramment utilisée dans la littérature, ce qui nous permettra de comparer nos résultats aisément.^{76,87,93,94,103,105,108,110,118,148}

La question posée dans ce chapitre est de déterminer de manière fiable le taux de préconcentration lors de l'activation de la puce MNM, et d'en faire la cartographie. Il faut pour cela relier de manière bijective le niveau de gris (sur 12 bits) de chaque pixel de la caméra à un niveau de concentration sur le point correspondant dans le microcanal. Un certain nombre de difficultés se posent alors car ce problème physique n'est pas aussi simple qu'il pourrait en avoir l'air de prime abord. Listons ici quelques éléments à prendre en compte lors des mesures :

 Premièrement, chaque « point » que nous mesurons est une projection de l'ensemble des émissions de fluorescence d'une colonne verticale de 200 μm, dans la profondeur du microcanal, situé dans l'alignement optique du pixel considéré. Or, rien ne permet de penser a priori que la répartition des molécules est homogène dans cette colonne, ni que les molécules de fluorescéine sont toutes excitées dans cette colonne, ou que toutes les émissions de fluorescence parviennent réellement jusqu'au capteur, à cause de l'auto-absorbance.

- (2) Ensuite, même en faisant l'hypothèse d'une réponse linéaire des capteurs optiques de la caméra sur toute leur plage d'utilisation ; celle-ci se limite toujours à moins que les 4096 niveaux théoriques, notamment à cause des sources de pollutions lumineuse et au niveau d'obscurité dans les plus bas niveaux (fluorescence de l'adhésif et/ou courants d'obscurité de la caméra, par exemple).
- (3) Enfin, l'ajustement des temps de pause, c'est-à-dire des temps d'intégration du signal sur chaque pixel, devra être adapté à chaque expérience, sachant que le matériel que nous utilisons autorise des réglages entre 25 ms et 800 ms. Les phénomènes à observer sont assez lents pour être observés avec 800 ms entre deux points de mesure (i.e. en respectant les conditions de Shannon).

3.3.1 Rappel théorique

La figure 10 représente schématiquement les trajets optiques des signaux d'excitation et d'émission dans le banc expérimental :



Figure 10: Représentation schématique du banc optique de fluorescence et de la loi de Beer-Lambert.¹⁴⁹

Je propose de nous focaliser maintenant sur ces signaux optiques, de manière à dégager une loi générale de la relation entre le niveau numérique N, de 0 à 4095, d'un pixel donné, et la concentration C d'une colonne de liquide dans la zone de préconcentration. Pour cela, nous devons tout d'abord considérer

la loi de Beer-Lambert, qui décrit l'absorbance du signal d'excitation. Supposons dans un premier temps une concentration homogène C de fluorescéine dans le microcanal. Soit I₀ l'intensité de lumière incidente et I l'intensité de lumière sortante après avoir traversée la colonne de fluorescéine. Ces deux grandeurs sont reliées à la concentration en fluorescéine par la Loi de Beer-Lambert, qui décrit l'absorbance du signal d'excitation :

Equation 6 :

$$-\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot C \cdot h$$

Où : h est la longueur du trajet du faisceau de lumière à travers l'échantillon de matériau (ici la profondeur du microcanal), C est la concentration de fluorescéine (M), ε est le coefficient d'absorption en molaire (M⁻¹ µm⁻¹), qui est très dépendant du pH, ce dont nous reparlerons en détail plus loin dans ce chapitre.

Donc, en posant I_{abs} la quantité de lumière absorbée par la fluorescéine dans le microcanal, nous pouvons écrire :

Equation 7 :

$$I_{abs} = I_0 - I = I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot C \cdot h})$$

Or, la lumière émise par la fluorescéine, notée I_F , dans une colonne donnée du microcanal, dans l'hypothèse où l'auto-absorbance est négligeable, est directement proportionnelle à la lumière absorbée, avec α le rendement quantique de fluorescence de la molécule considérée :

Equation 8 :

$$I_F = \alpha \cdot I_{abs} = \alpha \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot C \cdot h})$$

Cette quantité de lumière est émise dans toutes les directions de l'espace, et une partie seulement parvient jusque vers un pixel donné du capteur de la caméra, à travers les optiques du microscope. Il n'est pas du ressort de ma thèse de calculer en détail les angles solides d'émission de la colonne de fluorescéine, ni les pertes diverses à travers les optiques ou encore les rendements de conversion des pixels de la caméra. Nous considérerons seulement que la relation entre l'émission de fluorescence et le niveau de chaque pixel correspondant N est proportionnelle, avec le facteur de proportionnalité arbitraire K, que nous déterminerons expérimentalement. A cette conversion s'ajoute un niveau d'obscurité, nommé N_{dark}, correspondant à la somme du niveau d'obscurité du pixel, c'est-à-dire la valeur qu'il fournit même en cas d'obscurité totale, et des sources de lumières parasites dans le banc expérimental (fluorescence des adhésifs, des polymères, des poussières, etc...). On obtient alors l'équation 4, qui relie de manière simple la concentration en fluorescéine au niveau N fourni par chaque pixel du capteur :

Equation 9 :

$$N = N_{dark} + K \cdot I_{abs} = N_{dark} + K \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot C \cdot h})$$

Pour rappel, dans cette équation, h est la longueur du chemin optique parcouru par la lumière incidente d'excitation, c'est-à-dire la profondeur du microcanal dans notre cas. Il s'agit donc d'une constante du point de vue expérimental car tous les microcanaux possèdent une profondeur de 200 μ m. Donc, cette équation possède trois paramètres : N_{dark}, K et ε ; et une variable : la concentration en fluorescéine, C.

La détermination théorique des trois paramètres de l'équation 4 n'est pas envisageable de manière simple et en un temps raisonnable. Il faut donc quantifier N_{dark} , K et ε de manière expérimentale, en faisant varier la concentration en fluorescéine dans des microcanaux de référence, de même largeur et de même profondeur que les microcanaux de la puce MNM (600 μ m · 200 μ m), dans lesquels a lieu la préconcentration, et en mesurant la réponse correspondante N de la caméra. Cette calibration permettra ensuite, connaissant N_{dark}, K et ε , de relier bijectivement N à C pendant les expériences de préconcentration.

3.3.2 Dispositifs de calibration

Nous avons donc construit une nouvelle puce microfluidique, dédiée à cette tâche, et qui est représentée en figure 11. Cette puce est constituée de 9 canaux, chacun étant rempli d'une concentration différente de fluorescéine, entre $0.5 \mu M$ et 50 mM dans de l'eau déionisée. Cette gamme de concentration correspond aux valeurs attendues lors des expériences de préconcentrations.



Figure 11: Principe de la calibration de fluorescence.

Chaque canal est mesuré pour différents temps d'exposition, ce qui nous permet de connaitre la valeur idéale, pour une concentration de fluorescéine donnée, permettant à la fois d'éviter la saturation de la caméra, mais aussi de sortir le signal du niveau d'obscurité. Les résultats obtenus sont présentés en tableau 3, qui donne le niveau de gris N moyen dans un microcanal en fonction des concentrations de fluorescéines et des temps d'exposition :

Tableau 3 : Niveaux de gris issus des calibrations obtenues à partir des microcanaux de référence, pour différents temps d'intégration du capteur de la caméra du microscope de fluorescence.

Temps d'exposition (ms)	25	50	100	200	400	800
concentration de fluorescéine (M	()					
5.10-7	6.74	16	31.9	64.7	127	247
5.10-6	8.44	19.6	37.9	75.2	144	267
5.10-5	18.9	38.6	74	145	269	503
5.10-4	95.6	188	326	621	1160	2130
5.10-3	902	1850	3770	2730	Sat.	Sat.
5.10-2	2020	3790	Sat.	Sat.	Sat.	Sat.

3.3.3 Courbes de calibration

Ce tableau de mesure nous permet alors d'obtenir la série de courbes de la figure 12 :



Figure 12: Courbes de calibration obtenues à partir des microcanaux de référence, pour différents temps d'intégration du capteur de la caméra du microscope de fluorescence.

Les courbes de calibration de la figure 12 se décomposent en trois régions différentes. Tout d'abord, pour les faibles concentrations de fluorescéine, un plateau correspondant au niveau d'obscurité N_{dark} . Ensuite, entre C = 50 μ M et C = 5 mM, une zone dans laquelle la réponse du système expérimental est relativement linéaire. Puis, au-delà de C = 5 mM une zone de saturation, probablement causée par le fait que la concentration en fluorescéine devient suffisamment importante pour que l'excitation ne traverse pas entièrement le chemin optique de 200 μ m, conduisant à une réduction de son efficacité relative.

Un enseignement supplémentaire très important peut être tiré de ces courbes, concernant les temps de pause de la caméra : il ne sert à rien d'utiliser des temps d'intégration au-delà de 50 ms. En effet, à basse concentration, la distinction entre le niveau d'obscurité et les faibles concentrations de fluorescéine n'est pas amélioré en augmentant le temps de pause (ce qui est parfaitement logique) ; et à plus forte concentration, c'est la saturation numérique de la caméra, à N = 4096 qui apparait. La dynamique de mesure est alors extrêmement faible, moins de deux décades en concentration pour un temps de 800 ms, par exemple. C'est la raison pour laquelle nous privilégierons des temps d'intégration de 25 ms et 50 ms lors des expériences de préconcentration. Ces deux courbes, à 25 ms et à 50 ms, ont été ajustées suivant le modèle de l'équation 4 (figure 13) :



Figure 13: Ajustement des courbes de calibration pour 25ms et 50ms de temps d'intégration.

On observe que le modèle proposé correspond bien aux point expérimentaux, et, en prenant $L = 200 \ \mu m = 0.02 \ cm$, nous obtenons :

Equation 10 : (pour 25 ms)

$$N = 6.74 + 1800 * (1 - 10^{-2500 * c * 0.02})$$

Equation 11 : (pour 50 ms)

$$N = 16 + 3600 * (1 - 10^{-2500 * c * 0.02})$$

C'est-à-dire : $N_{dark \ 25ms} = 6.74$, $N_{dark \ 50ms} = 16$; $K_{25ms} = 1800$, $K_{50ms} = 3600$; $\epsilon = 2500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Les paramètres N_{dark} et K sont, comme nous l'avons déjà évoqué, des grandeurs purement expérimentales et n'ont pas de modèles simples ou de valeurs tabulées dans la littérature à comparer avec nos résultats. Il faut donc les prendre comme ils sont, tout en vérifiant régulièrement qu'ils sont reproductibles et stables d'une puce à l'autre.

En revanche, le coefficient d'absorption ε de la fluorescéine peut être discuté car il est largement décrit dans la littérature. Comme présenté par Sjöback et al.¹⁵⁰ le coefficient d'absorption ε de la fluorescéine de 470 nm avec le pH de plus de 7.62 est 34600 M⁻¹ cm⁻¹ par rapport ce que nous avons

obtenu (2500 M⁻¹ cm⁻¹). Pour le moment, nous ne pouvons pas expliquer l'écart entre les deux valeurs différentes.

3.3.4 Effet du pH

Remarquons aussi que le coefficient d'absorption ε est très dépendant du pH de la solution, comme le montre de manière flagrante la courbe de la figure 14 :



Figure 14 : Variation relative de l'intensité de la fluorescéine en fonction du pH.¹⁵¹

Nous devrons donc veiller continuellement, dans la puce microfluidique de calibration comme dans les puces MNM, à nous situer dans les bonnes plages de pH, c'est-à-dire typiquement au-dessus de 8. Or, notons ici que la fluorescéine est commercialisée sous la forme d'un sel basique (pKa₁=4.3, pKa₂=6.7).¹⁵¹ Dans la zone de préconcentration, l'augmentation de la concentration de la fluorescéine conduit à une augmentation locale du pH, de pH 5 (qui est le pH initial du tampon) à un pH plus élevé, typiquement plus de 7.8. En effet, des calculs (présentés dans l'annexe B) et des simulations ont été effectués pour vérifier clairement cette hypothèse. Par exemple, un mélange 10 mM de la solution de KCl et 10 μ M de la fluorescéine permet d'obtenir un pH réel de 5.9, et un taux de préconcentration de 10 seulement permet déjà d'obtenir un pH de 7.7, donc l'intensité lumineuse de la fluorescéine est 100% libérée dans la zone de préconcentration. Des mesures de pH dans des solutions modèles ont été effectuées pour confirmer ces calculs. Nous pouvons donc affirmer que les conditions expérimentales de pH rencontrées dans les zones de préconcentration sont bien favorables pour une fluorescence optimale.

3.3.5 Exemple de calcul du taux de préconcentration

Nous pouvons donc utiliser les formules des équations 5 pour déterminer, à partir de de la valeur numérique N d'un pixel de la caméra la concentration de fluorescéine C dans la colonne correspondante du microcanal, et c'est ce que je propose de faire maintenant, sur un exemple typique de préconcentration. Soit une puce MNM 2D, à membrane Nafion, remplie de 10 μ M de fluorescéine dans un tampon 10 mM de KCl à pH 5, et sous une activation de 20V. Après quelques minutes, on peut observer dans chacune des deux branches de la partie anodique de la puce une zone de préconcentration, tel que celui présenté en figure 15, avec des temps d'intégration à 100 ms et 50 ms, à gauche et à droite, respectivement :



Figure 15 : Exemple de saturation du capteur et d'ajustement du temps d'intégration. Conditions expérimentales : $10 \mu M$ de fluorescéine et 10 mM de KCl à pH 5, tension d'activation de 20V. En haut : image brute en 2D (vue de dessus), en bas : moyenne sur chaque colonne

Comme attendu d'après les courbes de la figure 15, l'image de gauche à 100 ms est saturée, et elle n'est proposée ici qu'à titre de démonstration. Il faudra bien entendu travailler avec le temps d'intégration de 50 ms seulement. Les images peuvent être traitées de manière à tracer une courbe de la moyenne des points sur une colonne (correspondant à un élément de largeur sur le microcanal). Ainsi, le microcanal, qui est un élément en 3D, est ramené en 2D par l'intégration inévitable de l'émission de fluorescence dans la profondeur, à une dimension puis par ce calcul de moyenne, ce qui simplifie la lecture.

L'équation suivant, reliant N à C, étant bijective, elle peut être utilisée en utilisant sa réciproque, permettant de déterminer C en connaissant N (pour 50 ms de temps d'exposition) :

Equation 12 :

$$C = -\frac{Log_{10}(1 - \frac{N_{50ms} - 16}{3600})}{50}$$

Ainsi, le niveau de gris maximal N_{max} , dans la figure 15, égal à 2479 correspond à une concentration maximale de fluorescéine égale à 10 mM environ, c'est-à-dire un taux de préconcentration d'un facteur 1000. Il est bien sûr possible d'utiliser la formule de l'équation 6 pour cartographier la zone de préconcentration, comme le montre l'image de la figure 16, obtenue en appliquant cette relation à chaque pixel de l'image à 50 ms de la figure 15, puis en moyennant comme précédemment sur chaque colonne les taux de préconcentration obtenus.



Figure 16 : Exemple de conversion d'une image de fluorescence (après calibration) en une courbe de taux de préconcentration : (a) image brute en niveaux de gris, (b) représentation 2D en isovaleurs du taux de préconcentration (calculé à partir de l'équation 6), (c) moyenne sur chaque colonne du taux de préconcentration.

La seule information à laquelle nous n'avons pas accès reste donc de connaitre la répartition en profondeur de cette préconcentration, car comme nous l'avons déjà évoqué : rien ne permet de penser que cette répartition soit homogène, et le banc expérimental ne nous permet pas d'explorer cette dimension du microcanal. Or, la figure 16 montre que la cartographie 2D du taux de préconcentration est très complexe et très inhomogène. Il doit certainement en être de même dans la profondeur.

3.3.6 Effet de la répartition des espèces fluorescentes dans l'épaisseur du canal

Nous nous sommes donc posés la question de savoir si, à quantité de fluorescéine égale dans une colonne donnée du microcanal, la répartition des molécules jouait un rôle dans l'absorption de la lumière d'excitation, donc de l'émission globale, et donc du niveau de gris N mesuré sur la caméra. Dit autrement, la question posée ici est de savoir si les mesures effectuées dans la puce de calibration, dans laquelle la concentration de fluorescéine dans la profondeur est homogène, sont compatibles avec les images obtenues dans la puce MNM, dans laquelle la concentration de fluorescéine dans la profondeur est très probablement très inhomogène. Pour cela, considérons les deux représentations schématiques de la figure 17 :



Figure 17 : Exemple de deux distributions simples de molécules fluorescentes : répartition homogène (à gauche) et répartition aux parois (à droite).

Dans ces deux représentations, les quantités de molécules sont les mêmes, mais les répartitions sont différentes. Considérons à nouveau la loi de Beert-Lambert, et la quantité de lumière incidente absorbée. On prendra ici, à titre d'exemple, $\delta_1 = 200 \ \mu m$, $\delta_2 = 20 \ \mu m$, $C_1 = 10 \ mM$ et $C_2 = 50 \ mM$, de manière à ce que : $C_1 \cdot \delta_1 = 2 \cdot C_2 \cdot \delta_2$. On peut alors tracer les courbes normalisées d'absorption de la lumière incidente d'excitation, sur la figure 18 :



Figure 18 : Influence de la distribution des molécules sur l'absorbance : répartition homogène (à gauche) et répartition aux parois (à droite).

On observe bien que la lumière absorbée est la même dans les deux cas, c'est-à-dire que c'est uniquement la quantité totale de molécules de fluorescéine dans une colonne verticale du microcanal qui détermine le signal de fluorescence, et donc le niveau de gris N, et non sa répartition spatiale. Ce résultat n'est pas surprenant, il était même attendu, car on sait que les mesures otiques sont sensibles uniquement à la quantité de matière, et non à la concentration, contrairement aux mesures électrochimiques par exemple. L'exemple purement calculatoire de la figure 18 nous permet donc de conclure ce chapitre par deux points essentiels : d'abord, les mesures 2D que nous effectuerons par la suite sont une image projetée de la quantité de matière en fluorescéine dans une colonne du microcanal donnée. Ensuite, les résultats obtenus en niveaux de gris sur chaque pixel du capteur de la caméra pourront être convertis en concentration homogène équivalente de fluorescéine, que nous pourrons alors considérer comme une « concentration homogène apparente ».

Nous sommes donc maintenant en mesure, grâce aux modèles développés et à la puce microfluidique de calibration du banc expérimental, d'observer de manière quantitative les zones de préconcentration de fluorescéine, de manière relativement simple et fiable; en 2D ou en 1D suivant le type de représentation le plus intéressant. Maintenant que les questions relatives aux protocoles expérimentaux et à la mesure de fluorescence dans les microcanaux sont résolues. Nous proposons d'étudier plus en détail, sur des puces MNM 2D à membrane Nafion, l'influence des principaux facteurs expérimentaux sur la position de la zone et sur les taux de préconcentration en fluorescéine. Ce travail fait donc l'objet du chapitre suivant.
4 Systèmes MNM à membrane Nafion

Le Nafion, sous forme de membrane, est un candidat idéal pour la réalisation de systèmes MNM^{8,73,77,83,93,94,101,107,152-154}, et son utilisation très rependue dans la littérature (dessalement¹⁵⁵, pile à combustible¹⁵⁶, activation et inhibition des systèmes neuromusculaires¹⁵⁷) ne doit rien au hasard : ses pores sont petits (2-4 nm de diamètre), ce qui est favorable au recouvrement des doubles couches même aux forces ioniques importantes ; et les densités de charge sont suffisamment élevées pour obtenir un phénomène ICP⁹⁷ exploitable. Cette membrane est en outre parfaitement adaptée à la Xurography et donc à notre environnement technologique. C'est pourquoi nous avons conduit la très grande majorité de nos expériences en utilisant ce matériau. Nous proposons donc de présenter maintenant les résultats obtenus sur des préconcentrations de fluorescéine dans des puces MNM 2D à membranes Nafion, en utilisant de manière rigoureuse les protocoles de calibration décrits au chapitre précédent, et en explorant les paramètres expérimentaux les plus importants : tension et durée d'activation, force ionique du tampon, et épaisseur de la membrane.

4.1 Effet de la tension d'activation et de la largeur de membrane

Pour une géométrie de puce MNM donnée, la tension d'activation est le paramètre de contrôle du phénomène ICP et donc, de la préconcentration probablement le plus simple à faire varier. C'est pourquoi ce paramètre est celui que nous avons tout naturellement testé dans un premier temps. Considérons une puce MNM identique à celle utilisée au chapitre précédent (format 2D, membrane Nafion, largeur de membrane 0,6 mm, canaux microfluidiques en « X », largeur 600 μ m, profondeur 200 μ m, électrolyte de type KCl à 10 mM et pH 5, fluorescéine à 10 μ M de concentration native), et faisons varier la tension d'activation, en l'augmentant progressivement. On obtient alors les images de fluorescence de la figure 19.



Figure 19 : Effet de la tension d'activation sur la zone de fluorescence avec une membrane « fine » (0.6mm). Mise en évidence du «pinch mode».

La préconcentration a toujours lieu du côté anodique, et le taux de préconcentration augmente avec la tension d'activation, ce qui est parfaitement intuitif. On observe aussi de manière flagrante sur cette série d'images un pincement de la zone avec l'augmentation de la tension d'activation, à 40 V, puis à 60 V. Mais, de manière relativement inattendue, la zone de préconcentration disparaît à partir de 80 V, bien en deçà des 200 V maximum qu'autorise notre source de tension. On appellera « pinch mode » ce phénomène, ou « mode pincé », pour décrire le fait qu'une tension excessive vient pincer la zone de préconcentration jusqu'à le faire disparaître.

Au-delà de ces premières observations, nous avons voulu quantifier les variations du taux de préconcentration et du volume de la zone en fonction de la tension d'activation. Or, puisque pour une membrane de 0,6 mm de largeur, le « pinch mode » apparaît à 80V seulement, nous avons décidé de construire une nouvelle génération de puce MNM, identique en tous points à la précédente à la différence près de la largeur de membrane (égale à 1.2mm cette fois-ci), afin d'explorer un champ plus large de tension d'activation. Des expériences similaires à celles de la figure 19 ont été menées avec cette nouvelle puce MNM, conduisant à des résultats parfaitement similaires, mais à une augmentation de la tension d'activation du « pinch mode », à 140 V, toujours en deçà des valeurs maximales offertes par notre banc expérimental. Il fallait donc augmenter encore la largeur de la membrane.

Une troisième génération de puce MNM a été dessinée et construite, avec les caractéristiques suivantes : format 2D, largeur de membrane 1,8 mm, canaux microfluidiques en « X », largeur 600 μ m, profondeur 200 μ m, électrolyte de type KCl à 10 mM et pH 5, fluorescéine à 10 μ M de concentration

native. La tension d'activation est variable, de 0 V à 200 V par pas de 20 V, et le temps d'attente entre deux tensions successives d'activation est de cinq minutes, permettant ainsi au système de se stabiliser avant de prendre une image. Les résultats obtenus sont présentés en figure 20 :





Figure 20: Effet de la tension d'activation sur la taille, la position et l'intensité de la zone de fluorescence avec une membrane « épaisse » (1.8mm).

La figure 21, tirée du graphique de la figure 20, représente le taux de préconcentration en fonction de la tension d'activation :



Figure 21: Effet de la tension d'activation sur le taux de préconcentration. Conditions expérimentales : $10 \mu M$ de fluorescéine, 10 mM de KCl, pH = 5, la tension varie de 0 à 200V par pas de 20 V, temps d'intégration 200 ms, profondeur du microcanal : 200 μ m, épaisseur de membrane Nafion : 1,8 mm.

Nous remarquons aussi que la position de la zone de préconcentration s'éloigne de la membrane avec l'augmentation de la tension d'activation, signifiant une augmentation du volume de la zone déplétée, ce qui correspond là aussi à une vision assez intuitive du système. Ce résultat est très intéressant car il signifie que, outre le taux de préconcentration, le contrôle de la position de la zone de préconcentration nous permettra, à terme, dans un design de lab-on-a-chip donné, de placer dynamiquement ce zone de manière à le disposer suivant une fonction particulière à réaliser ensuite. Par exemple, il sera possible de positionner cette zone exactement à la jonction entre un canal dédié à la préconcentration et un autre dédié à une séparation par électrophorèse capillaire.

Concernant la largeur de la zone de préconcentration, qui a tendance à diminuer lorsque la tension d'activation augmente, une hypothèse raisonnable consiste à penser que l'augmentation de la tension d'activation conduit non seulement à un élargissement de la zone déplétée mais aussi à une amplification du gradient de concertation à la zone frontière entre la zone déplétée et la zone standard de l'électrolyte. Il existe très probablement un seuil de tension d'activation, au-delà de 200 V, pour lequel le « pinch mode » peut être observé dans cette puce dont la membrane fait 1,8 mm de largeur. Mais, pour rappel, nous avons dessiné cette nouvelle puce pour ne pas observer ce phénomène dans la plage 0-200 V.

Dans tous les cas, pour cette puce, la largeur de la zone de préconcentration est toujours supérieure à 1 mm, typiquement, ce qui correspond à un volume minimal de 120 nL. Cette valeur, beaucoup plus grande que ce que l'on trouve classiquement dans la littérature^{85,90,93,97}, doit être relevée car elle correspond à l'un des objectifs majeurs de mon travail thèse : obtenir des zones de préconcentration de

« grands » volumes, et facilement manipulables dans un contexte de mise en série de fonctions micro/nanofluidiques dans un lab-on-a-chip fonctionnel. Nous pouvons affirmer que cet objectif est atteint.

En conclusion, la modulation de la tension d'activation est un puissant outil pour contrôler le volume, la position, et le taux de préconcentration dans la puce MNM ; tant que l'on ne dépasse pas le seuil faisant disparaitre la zone de préconcentration à cause du mode pincé. Un autre paramètre expérimental, de nature chimique, joue lui aussi un rôle important lors de l'expérience de préconcentration : la force ionique du tampon.

4.2 Effet de la force ionique de l'électrolyte

Dans ce chapitre, nous proposons d'étudier l'influence de la force ionique du tampon sur le phénomène de préconcentration. Pour cela, nous utilisons la première génération de puce MNM, dont les caractéristiques sont les suivantes : format 2D, membrane Nafion, largeur de membrane 0,6 mm, canaux microfluidiques en « X », largeur 600 μ m, profondeur 200 μ m, fluorescéine à 10 μ M de concentration native. Ce système MNM est rempli de tampon KCl de concentration variable, de 0.1 mM à 100 mM de KCl à pH 5, par décade; et la concentration native de fluorescéine fixée à 10 μ M pour tous les échantillons. La tension d'activation est de 20 V afin d'éviter le « pinch mode ». Les résultats obtenus sont présentés en figure 22. Malheureusement, pour cette série d'expérience, le champ optique couvert par le microscope de fluorescence n'est pas suffisant pour observer l'ensemble de la zone de préconcentration, les images de la figure 22 ne sont donc que des représentations schématiques, néanmoins très fidèles, des observations que nous avons pu effectuer :



Figure 22 : Influence de la concentration du bulk sur la position et la taille de la zone de préconcentration (à gauche) et sur le taux de préconcentration (à droite).

Ces expériences ont démontré un effet très clair de la concentration du tampon KCl. En effet, lorsque la force ionique augmente, à toutes autres conditions égales par ailleurs, la zone de préconcentration a tendance à diminuer de volume, et à se rapprocher de la membrane. Le taux de préconcentration augmente alors, mais, comme pour la tension d'activation, ce taux décrit une courbe en cloche, atteignant un optimum (jusqu'à 1000 dans notre cas), avant de s'écrouler au-delà d'un certain seuil. L'explication tient au fait que près de la membrane, il existe un vortex (dû au très fort champ électrique) qui perturbe le phénomène de préconcentration. Ce vortex et les problèmes qu'il causent sont décrits par d'autres équipes dans la littérature^{158–160}. Nos observations montrent de manière très claire que lorsque la force ionique est trop importante (par exemple 100 mM), la préconcentration a bien lieu, mais de manière trop rapprochée de la membrane, dans la zone des vortex ou en bordure de cette zone. Les cisaillements ont alors tendance à détruire et à dissoudre la zone de préconcentration plus rapidement qu'il ne se reforme, entrainant ainsi sa disparition progressive. La figure 23 montre une image très parlante d'une zone de préconcentration ainsi piégé dans un vortex :



Figure 23: Mise en évidence du vortex près de la membrane (avec une concentration du bulk à 100 mM KCl et une tension d'activation de 20V).

En conclusion, le choix de la force ionique du tampon dans lequel est préconcentrée la fluorescéine n'est pas anodin, et il conditionne en grande partie la réussite de l'expérience de préconcentration.

Ce chapitre, et le précédent, ont montré que nous avons réalisé un certain nombre d'expériences permettant de mieux comprendre les phénomènes sous-jacents à la préconcentration, et de dégager des premières tendances sur les relations entre choix de dessins des puces MNM (largeur de membrane), les paramètres expérimentaux (force ionique du tampon et tension d'activation) et les performances de la préconcentration : volume et position de la zone, taux de préconcentration. Mais, nous n'avons pas aujourd'hui, à la fin de ma thèse, de modèles théoriques prédictifs permettant de déterminer a priori pour une molécule donnée les bons paramètres permettant d'optimiser la préconcentration. Des premiers modèles ont été développés, qui seront présentés en chapitre 6, mais ils sont encore insuffisants pour, par exemple, être capable de prévenir à l'avance un effet de « pinch mode » ou une zone de préconcentration qui se piège dans un vortex, par exemple. L'expérience reste donc, à ce stade de notre avancée, irremplaçable.

Pour cela, nous avons également montré que nous pouvons nous appuyer sur un procédé technologique innovant, capable de fournir en moins de 15 minutes une puce MNM dédié à la préconcentration de fluorescéine parfaitement fonctionnelle. Cette puce est aujourd'hui capable d'atteindre des taux de préconcentration de l'ordre de 1000 en quelques minutes seulement sur des volumes très largement supérieurs à ceux proposés par la littérature. En cela, les objectifs de ma thèse sont clairement atteints. J'ai cependant désiré aller au-delà de ces premiers objectifs, en explorant d'autres manières de concevoir des puces MNM par Xurography, en utilisant d'autres membranes que le Nafion, voire pas de membranes du tout. Ce travail fait l'objet du chapitre suivant.

5 Autres types de membranes

Ce chapitre est le fruit d'une curiosité et d'un désir d'exploiter les compétences technologiques et expérimentales acquises avec les membranes Nafion pour les transposer à d'autres types de membranes. Ce travail à deux objectifs principaux : en premier lieu, augmenter les connaissances de la communauté sur les puces MNM en complétant l'inventaire des membranes disponibles à cette fin, mais aussi essayer de trouver une manière plus élégante ou plus performante de préconcentrer une biomolécule qu'avec une membrane.

Les expériences présentées dans ce chapitre, sous forme d'un catalogue, doivent être considérée avec un certain recul (et même une certaine bienveillance) car elles ont été réalisées à la fin de ma thèse et de manière assez rapide. Elles n'ont donc ni la prétention d'être exhaustives ou ni d'être le résultat d'aucune optimisation. Il ne faut les considérer que comme des démonstrateurs seulement, qui ont pour rôle de prouver une faisabilité, et qui seront peut-être les prémices des travaux futurs, sur le thème de la préconcentration, dans l'équipe qui a accueilli ma thèse.

5.1 Membrane de polycarbonate

Les membranes de polycarbonate sont des membranes de type colonnaire, pour lesquelles nous avons développé les puces MNM de géométrie « 3D ». Elles sont commercialisées sous forme de pastilles, souples, dont les diamètres varient de 13 à 293 mm, pour une épaisseur de 10 μ m. La taille des pores est très variable, entre 15 nm et 12 μ m. Ils sont chargés négativement, comme ceux du Nafion, avec des potentiels zêta compris typiquement entre -10 mV et -20 mV.¹³³ J'ai utilisé pour ma part des membranes de diamètre 13 mm et dont les pores font 15 nm de diamètre (GE lifescience, 110401). Après sa fabrication conformément au procédé décrit au chapitre 2, la puce a été remplie par un tampon KCl à 10 mM et pH 5, et 10 μ M de fluorescéine. La figure 24 représente un résultat obtenu avec ce type de membrane sous une tension d'activation de 20 V, aboutissant à un taux de préconcentration de 60.



Figure 24 : Préconcentration de fluorescéine dans un système MNM 3D à membrane de polycarbonate.

Cette membrane est donc parfaitement fonctionnelle et elle a permis de démontrer la bonne adaptation de la Xurography aux membranes colonnaires sous forme de pastilles. Cependant, un taux de préconcentration de 60 seulement demanderait à être amélioré et optimisé, ce qui fera peut-être l'objet de travaux plus poussés à l'occasion d'une autre thèse dans l'équipe.

5.2 Membrane d'alumine

Les membranes d'alumine sont également des membranes de type colonnaire, elles doivent donc être intégrées dans des puces MNM de géométrie « 3D ». Elles sont commercialisées sous forme de pastilles, rigides et relativement fragiles, dont les diamètres varient entre 13 et 47 mm, pour une épaisseur de 60 µm. La taille des pores est très variable, entre 20 nm et 200 nm. Ils sont chargés positivement, avec un potentiel zêta de l'ordre de +30 mV.¹⁶¹ Dans notre mode de préconcentration, le potentiel zêta des pores étant positif, la préconcentration devrait avoir lieu dans la partie cathodique de la puce MNM. Pour ce travail, nous avons fait le choix de membranes de diamètre 13 mm et dont les pores font 20 nm de diamètre (Whatman, Anodisc 13).

Après sa fabrication conformément au procédé décrit au chapitre 2, la puce MNM 3D a été remplie par un tampon KCl à 10 mM et pH 5 dans lequel a été diluée 10 µM de fluorescéine. Malheureusement, malgré de nombreux essais, en modulant les tensions d'activation sur une large gamme, nous n'avons pas été en mesure de préconcentrer de la fluorescéine dans cette puce. Nous avons pensé intuitivement, mais sans certitude, que cette configuration devait certainement souffrir des problèmes parfois observés avec la membrane Nafion, soit un effet de « pinch mode », soit un piégeage dans les vortex près de la membrane. Nous avons alors essayé de préconcentrer une autre molécule, une protéine BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) conjugué à de la fluorescéine pour son observation, à une concentration native de 1 μ M. Cette molécule, de masse moléculaire nettement plus grande que la fluorescéine seule, a pu être préconcentrée de manière clairement observable, dans le canal cathodique, avec un taux de préconcentration de 60 sous une tension d'activation de 60 V, comme en témoigne la figure 25 :



Figure 25: Préconcentration de BSA dans un système MNM 3D à membrane d'alumine.

Nous avons donc obtenu une préconcentration avec la membrane d'alumine, mais avec une autre biomolécule que la fluorescéine, et sans savoir exactement pourquoi la puce MNM ainsi formé ne donnait pas de résultat avec de la fluorescéine. Cette question, très probablement liée à des phénomènes que nous n'avons pas encore suffisamment compris méritera d'être traité et résolue à l'avenir.

5.3 Membrane d'agarose

Les membranes d'agarose sont des membranes de type éponge, c'est-à-dire dont les pores sont disposés de manière isotrope. Elles ne sont pas commercialisées sous la forme de feuilles ou de pastilles, mais sous la forme d'un produit à diluer dans de l'eau. Après chauffage, le mélange d'eau et d'agarose devient solide et une membrane est ainsi créée. Dans notre cas, la difficulté consiste à intégrer cette

membrane dans une structure MNM. Nous avons fait le choix de le faire dans une puce MNM 2D, en suivant le protocole décrit en figure 26 :



Figure 26: Procédure de fabrication de la membrane d'agarose.

Tout d'abord, une feuille d'adhésif double face est découpée aux dimensions de la future membrane, puis reportée un support, une lame de verre, par exemple. Puis un mélange d'eau déionisée et d'agarose (5% en masse) est déposé dans le volume libre de la feuille, l'excédent est raclé, et le montage est recouvert d'une seconde lame de verre. En procédant ainsi, nous avons la certitude que la future membrane aura les dimensions exactes de l'encoche qui lui sera réservée dans la structure MNM finale. L'ensemble est ensuite chauffé une minute dans un four à micro-ondes, puis refroidi, solidifiant ainsi la membrane d'agarose. La lame de verre supérieure est enlevée, puis l'adhésif double-face. La membrane d'agarose peut ensuite être retirée, et insérée dans une puce MNM 2D, exactement de la même manière qu'une membrane Nafion obtenue par Xurography. La conformation de la membrane d'agarose dans le système MNM peut être améliorée, après assemblage de la puce MNM 2D, par un second passage au four, qui a tendance à faire légèrement gonfler la membrane. Afin de valider ce procédé technologique de fabrication de membrane d'agarose, nous avons procédé à un certain nombre de tests d'étanchéité, qui se sont tous révélés positifs.

La taille des pores de la membrane d'agarose est très variable, et elle est conditionnée par le taux relatif de la composition du mélange d'agarose et d'eau. Dans notre cas, un mélange à 5% en masse d'agarose devrait conduire à des pores de l'ordre de 10 à 20 nm.¹⁶² Leur potentiel d'interface est négatif, et de valeur assez faible, typiquement -10 mV.¹⁶³ La largeur de la membrane d'agarose est 600 μ m. Cette membrane a été testée sous les conditions suivantes : solution de 1 μ M de la fluorescéine diluée dans 10 mM de KCl à pH 5. La figure 27 présente les résultats obtenus, c'est-à-dire une préconcentration d'un facteur 40 dans la partie anodique du système MNM, pour une tension d'activation de 200 V :



Figure 27: Préconcentration de fluorescéine dans un système MNM 2D à membrane d'agarose.

Un taux de préconcentration de 40 seulement, pour une tension d'activation pourtant relativement élevée, de 200 V, n'est pas une très bonne performance. Cette relative faiblesse du système est probablement due au faible potentiel zêta des pores et à leur diamètre relativement grand, et, donc une surface volumique apparente nettement plus faible que dans le cas du Nafion. Pour autant, nous avons démontré la faisabilité d'une préconcentration clairement observable avec une membrane d'agarose, ce qui est original à notre connaissance.

Les membranes, qu'il s'agisse de Nafion, d'agarose, polycarbonate ou alumine, sont de parfaits candidats pour la réalisation rapide et simple de systèmes MNM fonctionnels et efficaces.

Cependant, je n'ai pas voulu me limiter à cette seule voie membranaire, et d'autres pistes ont été explorées, en utilisant des compétences particulières développées à l'INL pour obtenir des nanocanaux de manière très simple et rapide; ou encore un système original et novateur de préconcentrateur à bulle. Ces deux solutions novatrices font l'objet des chapitres 5.4 et 5.5.

5.4 Réseau de nanofentes en verre

La géométrie des préconcentrateurs à réseau de nanofentes en verre est différente de celles des systèmes MNM présentés jusqu'à présent. En effet, dans le cas qui nous intéresse ici, la partie nanofluidique du système va être réalisée à la surface de la lame qui verre qui est utilisée d'ordinaire comme un simple support. Sa fabrication est cependant assez proche de celle des systèmes MNM « 2D » à membrane, à la différence près que les deux formes en « V » des microcanaux ne seront pas séparées

par une encoche comme précédemment. La figure 28 détaille le procédé de fabrication de ces nouveaux dispositifs :



Figure 28 : Préconcentration de fluorescéine dans un système MNM à nanofentes en verre.

Les réseaux de nanofentes (ou de nanocanaux) sont réalisés par une technique originale développée à l'INL, appelée LIL (Lithographie par l'Interférence holographique de Laser)¹²⁰. Cette technologie, parfaitement adaptée aux motifs réguliers tels que réseaux de lignes ou de points, consiste à éclairer une résine photosensible négative (NEB22), non pas à travers un masque comme cela se fait classiquement, mais par interférence entre deux faisceaux LASER. Plus précisément, la résine étant négative, elle sera exposée deux fois : une première exposition pour définir les nanofentes, puis une seconde sur un champ plus large (typiquement millimétrique ou centimétrique), pour définir la zone dans laquelle les nanofentes seront situées sur la lame de verre (figure 29) :



Figure 29 : Localisation du réseau de nanofentes par masquage.

Après cette étape de lithographie, une gravure RIE est utilisée pour transférer le motif dans le substrat en verre. La technique LIL permet de modifier très facilement la période des nanocanaux, et la gravure RIE permet de contrôler assez finement leur profondeur. Ainsi, lors de ce travail, j'ai réalisé des réseaux de périodes comprises entre 150 nm et 600 nm, et de profondeurs comprises entre 25 nm et 100 nm. Ainsi, nous avons pu réaliser jusqu'à 10 000 nanofentes en parallèle dans le cadre défini à 1.5 mm de large.

Cette technologie a donné de bons résultats, mais une question importante se pose quant à la pénétration de l'adhésif dans les nanocanaux en verre lors de la fermeture du système et sa mise sous presse. Nous avons donc utilisé l'outil COMSOL afin de représenter (de manière schématique) l'enfoncement du scotch. Pour cela nous avons considéré les paramètres suivants : module d'Young de l'adhésif 2.9 GPa¹⁶⁴, module d'Young du verre 70 Gpa¹⁶⁵, coefficient de poisson de l'adhésif 0.42¹⁶⁴, coefficient de poisson du verre 0.24¹⁶⁶. La figure 30 montre des résultats de simulation sur des nanocanaux de période 200 nm et de profondeurs 25nm, 50 nm et 100nm. Bien que cette simulation ne soit pas à prendre au premier degré, elle montre bien que lorsque le facteur de forme des nanocanaux est défavorable, l'adhésif vient les remplir lors de la mise sous presse. Dans ce cas précis, seuls les nanocanaux de profondeurs 100 nm sont relativement conservés. Il faudra donc en tenir compte lors de la définition du dessin des structures.



Figure 30 : Simulation de la déformation de l'adhésif dans les nanofentes sous une pression de 7 bars.

Ces nanofentes en verre ont été testées sous les conditions suivantes : solution de 1 μ M de la fluorescéine diluée dans 10 mM de KCl à pH 5. Nous avons ainsi obtenu une préconcentration d'un facteur 190 dans la partie anodique du système MNM, pour une tension d'activation de 100 V, ce qui est une performance meilleure qu'avec certaines membranes.

5.5 Puce de préconcentration à bulle

La puce de préconcentration à bulle est un système MNM beaucoup plus original que les précédents, dans lequel les membranes et autres nanofentes sont remplacées par l'interface entre une bulle de gaz formée et les parois des microcanaux dans la zone centrale de la puce. Cette bulle de gaz est obtenue en intégrant un fil en tungstène¹⁶⁷ dans le système de préconcentrateur (figure 31). Le contrôle de la tension appliquée sur l'électrode et du temps de formation de la bulle permettent d'en choisir le volume de manière très fine. La figure 31 montre une image d'une bulle de gaz ainsi formée :



Figure 31 : Formation de la bulle de gaz par électrolyse. La partie nanométrique est située entre la bulle et les coins des microcanaux.

Comme indiqué dans la littérature, la taille de la pellicule de liquide située entre la bulle et les coins des microcanaux est épaisse de quelque centaines de nanomètres à quelques micromètres.¹⁶⁸ De plus cette interface est chargée électriquement¹⁶⁹, mais très faiblement, typiquement moins de -5 mV aux conditions de l'expérience (pH 5).¹⁶⁹ Dans des conditions identiques aux tests précédents, nous obtenons un taux de préconcentration de 40 pour une tension d'activation de 50 V comme en témoigne la figure 32. La zone de préconcentration est située dans la partie anodique de la puce, comme attendu compte tenu du signe de la charge de surface:



Figure 32 : Préconcentration de fluorescéine dans un système MNM 2D à bulle.

Ces premiers résultats sont assez prometteurs et ce travail méritera surement d'être poursuivi car obtenir une préconcentration de cette manière est très original.

5.6 Récapitulatif des différents préconcentrateurs MNM réalisés

Je propose ici de résumer sous forme d'un tableau l'ensemble des résultats obtenus sur tous les types de membranes ou de structures MNM réalisées pendant ma thèse, afin de dégager de manière simple et concise les principaux résultats. La figure 33 présente donc ces résultats sous la forme d'un tableau récapitulatif.



Figure 33: Récapitulatif des différents préconcentrateurs MNM réalisés.

Le bilan global que l'on peut tirer de ce travail est que, nous l'avons déjà évoqué, les objectifs de ma thèse ont été largement atteints et les résultats obtenus sont très largement positifs et encourageants. Les taux de préconcentration, mais aussi les volumes des zones de préconcentration, sont très comparables à ceux présentés dans la littérature. Mon travail sur les systèmes MNM à membrane Nafion a ainsi donné lieu à une publication dans la revue « Analytical Chemistry ». Ce travail demandera bien sûr à être poursuivi et amélioré, avec des développements instrumentaux permettant d'inclure d'autres membranes dans les systèmes MNM, mais aussi d'optimiser les premiers résultats obtenus lors de ma thèse, car il existe encore très certainement des réserves non négligeables de gains en performances.

Ces optimisations devront s'appuyer le développement de modèles physiques prédictifs, qui ne sont pas encore aujourd'hui totalement opérants. Le chapitre suivant se propose cependant de présenter nos premiers travaux en la matière, qui bien qu'encore incomplets, ont le mérite d'expliquer un certain nombre de résultats obtenus.

6 Modélisation et description phénoménologique de la préconcentration dans le mode symétrique

La modélisation du phénomène d'électropréconcentration ne pose a priori aucun problème majeur. Elle consiste en effet à évaluer, dans la structure MNM sous polarisation, le transport des différents ions par diffusion, convection, et migration, permettant ainsi de déterminer les zones dans lesquelles les espèces d'intérêt peuvent s'accumuler et donc se concentrer.

Rappelons que, pour un électrolyte composé de **n** ions, le transport de chaque espèce ionique est parfaitement décrit par l'équation de Nernst-Planck (équation 8).

Equation 13 :

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = \nabla \cdot \left[D_i \cdot \nabla c_i - u \cdot c_i + \frac{D_i \cdot z_i \cdot e}{k_b \cdot T} \cdot c_i \cdot \nabla \phi \right]$$

Où, i est l'indice de l'espèce ionique considérée ($i \in [1,n]$), c_i sa concentration (mol/m³), D_i son coefficient de diffusion (m²/s), z_i sa valence, u la vitesse du fluide (m/s), φ le potentiel électrique (V), e la charge élémentaire ; k_b la constante de Boltzmann (J/K), T la température (K) et t le temps (s).

Dans cette équation, qui doit être résolue pour chaque espèce ionique, les termes " D_i . ∇c_i ", " $u. c_i$ " et " $\frac{D_i.z_i.e}{k_b.T}$. c_i . $\nabla \phi$ " correspondent respectivement aux déplacements ioniques par diffusion, convection et migration.

Cette étude est cependant beaucoup plus compliquée qu'il n'y parait, vues la complexité et l'interdépendance des phénomènes qui rentrent en jeu. Cette complexité est principalement due à la présence de la membrane permsélective qui va donner naissance, comme nous l'avons déjà vu, à une zone déplétée et une zone d'enrichissement. Outre la difficulté de décrire correctement les propriétés électriques et hydrodynamiques de la membrane, le fort champ électrostatique dans la zone déplétée, ainsi que la faible concentration ionique, vont être à l'origine de phénomènes tels que l'apparition d'un vortex proche de la membrane¹⁷⁰, la dissociation des molécules d'eau¹⁷¹, la modulation du potentiel zêta le long des canaux¹⁵⁴, la création d'un flux hydrodynamique de retournement¹⁷², ...

Cette thématique étant nouvelle au laboratoire, un modèle quantitatif de l'électropréconcentration est pour le moment hors de portée. Notre objectif sera ici d'aboutir à un modèle phénoménologique permettant d'interpréter le mode original de préconcentration présenté dans cette thèse, de le comparer aux autres modes connus de la littérature, et enfin de pointer les problématiques à résoudre avant de prétendre à un modèle quantitatif.

6.1 Considérations théoriques - problématiques

De nombreux travaux de la littérature, aussi bien applicatifs que théoriques, font intervenir le phénomène ICP tel que décrit dans la première partie de ce manuscrit^{97,157,173}. Parmi ces travaux, certains auteurs se sont intéressés à la compréhension du phénomène d'électropréconcentration, au travers de modèles analytiques ou numériques (1D¹⁰¹, 2D⁸⁵ ou 3D¹⁷⁴). Cependant, à notre connaissance, aucun modèle global ne permet de rendre compte de l'ensemble des phénomènes observés, et ceci à cause de la complexité des phénomènes physiques intervenant dans la préconcentration. Cette complexité contraint à recourir à des simplifications, qui ne sont valables que dans un périmètre bien déterminé. Nous montrerons en particulier que le mode de préconcentration étudié dans le cadre de cette thèse fait intervenir un flux de retour hydrodynamique, dont les effets sont négligeables dans d'autres travaux de la littérature.

Notons aussi que certains travaux rapportent, pour des conditions expérimentales proches, des résultats de préconcentration différents. Par exemple, la zone de préconcentration, pour une même molécule d'intérêt, peut être située soit du côté anodique^{64,76,77,85,90,97,102,106,112,117,175}, soit du côté cathodique.^{93,109}

Ceci peut s'expliquer par :

- <u>L'importance de la charge de surface des matériaux utilisés</u>. En effet, la charge de surface est à l'origine d'un flux électroosmotique dans la structure MNM qui a une influence primordiale dans le phénomène d'électropréconcentration. L'utilisation, dans la littérature, de matériaux différents pour la réalisation des structures fluidiques de type MNM, ou bien de procédés chimiques de traitement des surfaces différents, peut conduire à une modification significative du transport ionique, et donc du phénomène de préconcentration.
- <u>La différence des propriétés électriques et hydrodynamiques des matériaux nanoporeux utilisés</u>. Il est par exemple clair qu'un nanopore unique a des résistances électrique et hydrodynamique beaucoup plus importantes qu'une membrane nanoporeuse. Un premier effet direct sera une distribution des potentiels électriques différente lors de l'activation de la structure MNM, mais d'autres effets peuvent aussi intervenir. Enfin, notons que la taille des pores peut influencer d'une manière significative les propriétés de permsélectivité.

Ainsi, pour prétendre à un modèle prédictif de l'électropréconcentration, il serait nécessaire de pouvoir quantifier tous les phénomènes physiques rentrant en jeu et de connaître précisément les paramètres physiques (charges de surface, taille des nanopores, porosité de la membrane, ...). Nous nous proposons dans les paragraphes suivants de discuter des phénomènes physiques prépondérants, des problématiques rencontrées au niveau de la membrane de Nafion, ainsi qu'au niveau de la zone déplétée. Ceci nous permettra de poser les bases d'un modèle simplifié adapté à nos résultats expérimentaux, pour arriver à une compréhension phénoménologique du type d'électropréconcentration présenté dans cette thèse.

6.1.1 Position du problème

Les systèmes MNM tels que décrits précédemment comportent 4 entrées-sorties, et ceci, principalement pour des raisons de facilité de remplissage. Cependant, cette architecture permet d'avoir un degré de liberté supplémentaire lors de l'activation du système MNM. En effet, un potentiel électrique différent peut être appliqué sur chaque entrée-sortie.

Dans le cas général, les deux entrées-sorties du canal cathodique sont mises à la masse, et des potentiels V_{a1} et V_{a2} différents sont appliqués au niveau du canal anodique (figure 34). Dans le cas où V_{a1} = V_{a2} on parlera du mode d'activation symétrique, et dans le cas contraire on parlera du mode asymétrique.



Figure 34 : Représentation schématique des tensions appliquées et des flux de liquides dans la structure MNM.

Lors de l'activation du système, des champs électriques vont être créés dans l'ensemble de la structure MNM. Nous appellerons :

- E_{a1}, E_{a2} les champs électriques créés dans les deux branches du canal anodique,
- Enano le champ électrique créé dans la membrane de Nafion,
- E_c le champ électrique créé dans le canal cathodique.

Ces champs vont être à l'origine du déplacement des ions par migration, et aussi à l'origine de flux électroosmotiques. Nous appellerons :

- Q_{eof-al} le flux électroosmotique dans la première branche du canal anodique.
- Q_{eof-a2} le flux électroosmotique dans la deuxième branche du canal anodique.
- Qeof-nano le flux électroosmotique dans la membrane de Nafion.
- Q_{eof-c} le flux électroosmotique dans le canal cathodique.

Il est clair que si les flux électroosmotiques ne sont pas continus dans toute la structure MNM (par exemple si Q_{eof-a1} + $Q_{eof-a2} \neq Q_{eof-nano}$ au niveau de la membrane de Nafion), ils vont être à l'origine de pressions hydrostatiques, qui vont générer des flux hydrodynamiques. Nous appellerons :

- Q_{fpdf-a1} le flux hydrodynamique de retour dans la première branche du canal anodique. L'indice
 « fpdf » signifie ici « Feedback Pressure Driven Flow ».
- Q_{fpdf-a2} le flux hydrodynamique dans la deuxième branche du canal anodique.
- Q_{hyd-nano} le flux hydrodynamique dans la membrane de Nafion.
- Q_{fpdf-c} le flux hydrodynamique dans le canal cathodique.

Notons que toutes les grandeurs définies ici dépendent de la position dans la structure. A titre d'exemple rien n'indique que le champ électrique E_{a1} soit constant dans la première branche du canal anodique. Il serait donc plus rigoureux de le noter $E_{a1}(x)$, ce que nous ne ferons pas par souci de simplification de la présentation.

Ces différentes grandeurs sont liées les unes aux autres par des relations déjà définies dans ce manuscrit. En particulier, les flux électroosmotiques sont reliés aux champs électrostatiques par la relation¹⁷⁶ :

Equation 14 :

$$Q_{eof} = \frac{\varepsilon.\zeta}{\eta}$$
. E. A

Où : ε est la permittivité de l'électrolyte, η sa viscosité, et où pour chaque micro/nanocanal ζ , E et A sont respectivement le potentiel zêta de l'interface solide/liquide, le champ électrostatique et la section.

Pour des raisons de continuité, les flux électroosmotiques et hydrodynamiques sont reliés, au niveau de la membrane de Nafion, par les relations :

Equation 15 :

$$Q_{eof-a1} + Q_{eof-a2} = Q_{fpdf-a1} + Q_{fpdf-a2} + Q_{eof-nano} + Q_{hyd-nano}$$

Equation 16 :

$$2 * Q_{fpdf-c} + Q_{eof-nano} + Q_{hyd-nano} = 2 * Q_{eof-c}$$

Enfin, la répartition des flux dans la structure MNM va dépendre des résistances hydrodynamiques des microcanaux $R_{hyd-micro}$ et de la membrane de Nafion $R_{hyd-nano}$ données par les équations :¹⁷⁶ Equation 17 :

$$R_{hyd-micro} = \frac{12\eta L_{micro}}{w_{micro}h_{micro}^3(1 - 0.63h_{micro}/w_{micro})}$$

Equation 18 :

$$R_{hyd-nano} = \frac{8\eta L_{nano}}{\pi r_{nano}^4} * \frac{1}{\frac{\Phi_{nano} * W_{nano} * h_{nano}}{\pi r_{nano}^2}} = \frac{8\eta L_{nano}}{r_{nano}^2 * \Phi_{nano} * W_{nano} * h_{nano}}$$

 $O\hat{u}$: L_{micro} , w_{micro} et h_{micro} sont respectivement la longueur, la largeur et la profondeur des microcanaux anodique et cathodique, L_{nano} , w_{nano} , h_{nano} sont respectivement la longueur, la largeur, la profondeur de la membrane Nafion et r_{nano} et ϕ_{nano} le diamètre moyen des pores et la porosité.

6.1.2 Problématiques au niveau de la membrane de Nafion

Il y a au moins un point d'accord entre toutes les études traitant de l'ICP : une zone déplétée et une zone d'enrichissement sont formées lors de l'activation de la structure MNM. Ceci est dû aux propriétés permsélectives de la membrane. Comme le montre la figure 35, dans le cas d'une membrane permsélective cationique, les zones déplétée et d'enrichissement se situent respectivement dans les canaux anodique et cathodique.



Figure 35 : Rappel des différentes régions créées lors du phénomène ICP.

Dans le cas d'une membrane de Nafion, qui a une structure de type éponge, les propriétés permsélectives de la membrane, et donc le phénomène ICP, sont difficiles à évaluer ou à modéliser. Pour les mêmes raisons, il sera d'ailleurs aussi complexe de modéliser les résistances électrique et hydrodynamique de la membrane.

De plus, même dans le cas de nanopores à géométrie contrôlée (exemple : nanojonctions⁹⁴), certains travaux de la littérature mettent en évidence des phénomènes complexes comme la diminution de la mobilité des ions⁷⁸ ou la variation de la vitesse électroosmotique¹⁰¹ par rapport au cas d'un microcanal. Ainsi, même pour de tels pores, la modélisation du phénomène ICP est un challenge.

6.1.3 Problématiques au niveau de la zone déplétée

La zone d'enrichissement ne pose, a priori, aucun problème majeur. Dans cette zone, la concentration ionique y est plus élevée que dans le bulk, et le champ électrostatique y est faible. A

l'inverse, de par sa faible concentration ionique, la zone déplétée va concentrer la majeure partie des différences de potentiel appliquées, et est donc le lieu de forts champs électrostatiques.

De ce fait, <u>le canal anodique aura une importance toute particulière dans l'origine du phénomène</u> <u>de préconcentration</u>. Plusieurs phénomènes physiques liés s'y produisent :

Existence d'un gradient de concentration

- \rightarrow Les champs électriques E_{a1}, E_{a2}, ainsi que le potentiel zêta ne sont pas constants.
- → Les flux électroosmotiques Q_{eof-a1} et Q_{eof-a2} ne sont pas homogènes.
- → Génération des flux hydrodynamiques Q_{fpdf-a1} et Q_{fpdf-a2} qui modifient la répartition des ions.

Nous montrerons d'ailleurs que les concentrations ioniques et le champ électrique sont respectivement d'autant plus faibles et importants que l'on se rapproche de la membrane de Nafion. L'interface électrolyte/membrane est donc le lieu de phénomènes tels que :

- La dissociation des molécules d'eau et la création de front de pH¹⁷¹ (figure 36)
- La création d'un vortex qui brasse l'électrolyte¹⁷⁰



*Figure 36 : Schéma montrant la création d'un front de pH proche de la membrane lors de l'activation de la structure MNM (d'après M. Andersen et al.*¹⁷¹)

Chacun de ces phénomènes nécessiterait un modèle spécifique pour être pris en compte, au risque d'aboutir à un modèle multiparamétrique qui laisserait de côté la compréhension physique de l'électropréconcentration, et la part belle à des ajustements hasardeux de paramètres... Il est donc nécessaire de développer un modèle simplifié, tout en justifiant les approximations.

6.2 Vers un modèle simplifié de l'électropréconcentration en mode symétrique

Comme nous l'avons vu précédemment, il y a deux modes d'activation possibles pour les dispositifs MNM : le mode symétrique (étudié dans le cadre de cette thèse, où $V_{a1} = V_{a2}$) et le mode asymétrique (où $V_{a1} \neq V_{a2}$). Chaque mode d'activation a ses propres spécificités, que nous présenterons dans un premier temps. Ceci nous permettra de poser les contours d'un modèle simplifié de l'électropréconcentration en mode symétrique, où nous considérerons uniquement le canal anodique et une membrane permsélective idéale.

6.2.1 Comportements électriques et hydrodynamiques de la membrane de Nafion

Afin d'avoir une meilleure idée du rôle de la portion Nano d'une structure MNM, nous commencerons par comparer quelques résultats de la littérature avec les nôtres. Ceci nous permettra de proposer un modèle électrique et hydrodynamique simplifié pour la membrane de Nafion.

6.2.1.1 Comportement de la membrane de Nafion en fonction du mode d'électropréconcentration (symétrique ou asymétrique).

La figure 37 représente deux structures MNM dont la partie Nano est une membrane de Nafion. Le premier cas (figure 37a) correspond à nos travaux avec un mode d'activation symétrique ($V_{a1} = V_{a2} = 20V$), tandis que le deuxième cas (figure 37b) correspond aux travaux de Shen et al.⁸⁵ avec un mode d'activation asymétrique ($V_{a1} = 20V$ et $V_{a2} = 10V$). Le tableau 4, recense pour chaque cas les paramètres géométriques.



Figure 37 : Représentation schématique des tensions appliquées et des flux d'électrolyte en mode symétrique (à gauche) et en mode asymétrique (à droite).

*Tableau 4 : Paramètres physiques et géométriques utilisés pour décrire et modéliser les systèmes de préconcentration de notre équipe et de Shen et al.*⁷⁸

INL	L (m)	w (m)	h (m)	conductance (S/m)	Porosité	Diamètre des nanopores (m)	Potentiel zêta à pH 5 (mV)
nano	$6 \cdot 10^{-4}$	6 · 10-4	$2 \cdot 10^{-4}$	7.3 ¹⁷⁷	0.3 77	$3 \cdot 10^{-9178}$	- <i>68</i> ¹⁷⁹
micro	$2 \cdot 10^{-2}$	6 · 10-4	$2 \cdot 10^{-4}$	0.141 180			-20 *
EPFL ⁷⁸							
nano	$2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	7.3 ¹⁷⁷	0.3 77	$3 \cdot 10^{-9178}$	- <i>68</i> ¹⁷⁹
micro	8 · 10 ⁻³	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	0.141 180			-20 *

* le potentiel zêta de KCl 10⁻² M/silice est estimé par le résultat de la partie 2.

La première remarque importante est que la résistance hydrodynamique R_{hydro-nano} de la partie Nano est nettement plus importante que celle des microcanaux R_{hydro-micro} (environ 10⁹ fois plus importante, détaillé dans l'annexe 0). <u>La membrane de Nafion pourra donc être considérée comme un mur</u> <u>hydrodynamique, ce qui correspond aux observations lors du remplissage des systèmes</u>. On pourra donc négliger le flux hydrodynamique Q_{hyd-nano} à travers la membrane. De plus la conductance électrique de la membrane de Nafion est nettement supérieure à celle des microcanaux. Le champ électrique dans la membrane pourra donc être négligé, ainsi que le flux électroosmotique Q_{eof-nano}.

Dans le cas de l'activation symétrique, des flux électroosmotiques équivalents Q_{eof-a1} et Q_{eof-a2} sont générés dans chaque branche du canal anodique. Ainsi, des flux hydrodynamiques de retour $Q_{fpdf-a1}$ et $Q_{fpdf-a2}$ sont générés dans ce canal, de manière à garantir la conservation des flux au niveau de la membrane. A savoir :

Equation 19:

 $Q_{eof-a1} + Q_{eof-a2} + Q_{fpdf-a1} + Q_{fpdf-a2} = Q_{eof-nano} + Q_{hyd-nano} \approx 0$

Ces flux hydrodynamiques auront une influence primordiale dans l'explication du phénomène d'électropréconcentration en mode symétrique. Ils sont d'ailleurs clairement visibles lors d'observations du phénomène de préconcentration sous le microscope de fluorescence. Si l'on rajoute des particules visibles dans le canal anodique, on les voit tournoyer comme indiqué sur la figure 38. Proche de la paroi elles sont entrainées en direction de la membrane par le flux électroosmotique. Elles reviennent ensuite par le centre du microcanal, entrainées par le flux hydrodynamique de retour.



Figure 38 : Représentation de la dynamique des boucles de circulation de la fluorescéine dans la zone déplétée.

Pourtant, nulle mention n'est faite de ces flux hydrodynamiques de retour en mode asymétrique.⁸⁵ Cela provient du fait que si V_{a1} est significativement plus important que V_{a2} alors, les flux Q_{eof-a1} et Q_{eof-a2} sont dans le même sens (de l'entrée A1 vers la sortie A2) et sensiblement de la même valeur. Ainsi l'équation de conservation des flux proche de la membrane conduit à : Equation 20 :

 $Q_{eof-a1} + Q_{eof-a2} \approx 0$ (suivant les conventions adoptées ici $Q_{eof-a1} > 0$ et $Q_{eof-a2} < 0$)

et aucun flux hydrodynamique n'est créé dans la structure MNM.

6.2.1.2 Comparaison entre une membrane Nafion et des nanojonctions

Il est maintenant important de s'intéresser à la différence entre une membrane de Nafion et des nanojonctions pour la réalisation de la partie Nano de la structure MNM.

Considérons donc deux structures MNM fonctionnant dans le mode symétrique ($V_{a1} = V_{a2} = 20V$). La figure 39a correspond à nos travaux et la figure 39b correspond aux travaux de Plecis et al.⁹³ Le tableau 5, recense pour chaque cas les paramètres géométriques et physiques.



Figure 39 : Représentation schématique des tensions appliquées et des flux d'électrolyte pour un système MNM à membrane Nafion (à gauche) et pour un système MNM à nanofentes en verre (à droite).

*Tableau 5 : Paramètres physiques et géométriques utilisés pour décrire et modéliser les systèmes de préconcentration de notre équipe et de Plecis et al.*⁹³

INL	L (m)	w (m)	h (m)	conductance (S/m)	Porosité	Diamètre des nanopore (m)	Potentiel zêta à pH 5 (mV)
nano	6 · 10-4	$6 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	7.3 ¹⁷⁷	0.3 77	3 · 10 ^{-9 178}	- <i>68</i> ¹⁷⁹
micro LPN ⁹³	$2 \cdot 10^{-2}$	6 · 10 ⁻⁴	2 · 10-4	0.141 180			-20 *
nano	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-7}$	0.141 180			-20 *
micro	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$	0.141 180			-20 *

* le potentiel zêta de KCl 10⁻² M/silice est estimé d'après les résultats de la partie 2.

Dans le cas de nano-jonctions utilisées en mode symétrique, nous devrions avoir un flux de retour hydrodynamique au même titre que dans le cas de la membrane de Nafion (détaillé dans l'annexe 0).

Ici il est important de noter que la conductance électrique des nano-jonctions est sensiblement du même ordre de grandeur que celle des microcanaux. En effet, la section des nanocanaux est nettement plus importante que pour le Nafion. La concentration ionique est donc plus faiblement affectée. Ainsi, les flux électroosmotiques dans les parties nano et micro sont sensiblement du même ordre de grandeur, et il y a donc une continuité de ces flux électroosmotiques :

Equation 21 :

 $Q_{eof-a1} + Q_{eof-a2} \approx Q_{eof-nano}$

Il n'y a donc pas de flux hydrodynamique de retour, contrairement au cas de la membrane de Nafion.

6.2.1.3 Modèle équivalent de la membrane de Nafion en mode d'activation symétrique

En conclusion, dans le cas d'une structure MNM basée sur une membrane de Nafion :

 la résistance hydrodynamique de la membrane est nettement plus importante que celle des microcanaux. Nous pourrons donc raisonnablement considérer que <u>cette membrane constitue un</u> <u>mur</u> pour les flux hydrodynamiques. la résistance électrique de la membrane est nettement plus faible que celle des microcanaux.
 Nous pourrons donc supposer que la différence de potentiel dans la membrane est négligeable.

Enfin, comme déjà mentionné, la modélisation des propriétés permsélectives de la membrane est très complexe de par sa structure éponge. Nous considérerons donc une membrane permsélective cationique idéale, à savoir une membrane bloquant tous les anions et laissant passer sans résistance tous les cations. Remarquons ici que cette simplification nous interdit de pouvoir simuler le rôle joué par l'épaisseur de la membrane de Nafion, malgré l'observation expérimentale de l'influence de cette épaisseur.

6.2.2 Etude du transport ionique restreint au microcanal anodique

Lors de l'activation de la structure MNM, une zone déplétée en ion se forme du côté anodique. Comme nous l'avons déjà vu, la concentration ionique dans cette zone étant faible sa résistance électrique sera importante. Elle va donc concentrer la majeure partie de la différence de potentiel appliquée. Ainsi les différences de potentiel dans la partie cathodique et dans la membrane de Nafion (cf. partie 6.2.1) pourront raisonnablement être négligées. Les flux électroosmotiques associés seront aussi faibles.

De plus, dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'activation symétrique. Les deux canaux anodiques se comportent donc d'une manière identique. Lorsque la structure est activée en mode symétrique, les flux électroosmotiques Q_{eof-a1} et Q_{eof-a2} sont dirigés vers la membrane. Cette dernière se comportant comme un mur hydrodynamique, ils vont être à l'origine de flux hydrodynamique $Q_{fpdf-a1}$ et $Q_{fpdf-a2}$ de retournement dans les microcanaux. Ces flux sont symétriques ($Q_{fpdf-a1} = Q_{fpdf-a2}$) et égaux (en valeur) aux flux électroosmotiques Q_{eof-a1} et Q_{eof-a2} .

Ainsi, la modélisation du phénomène d'électropréconcentration pourra ainsi être réalisée en restreignant l'étude au canal anodique, comme indiqué figure 40.



Figure 40 : Simplification schématique du microcanal anodique, et représentation des trois zones principales de ce microcanal : zone « Extended Space Charge » (ESC), zone de transition et zone de bulk.

Le canal anodique considéré sera constitué d'une zone déplétée et d'une zone bulk, dans laquelle les concentrations ioniques ne sont pas affectées par le phénomène ICP. D'après la littérature la zone déplétée peut être elle-même divisée en deux zones :

- La zone ESC (Extended Space Charge) dans laquelle la concentration ionique est faible et quasiment constante¹⁸¹. Dans cette zone le champ électrostatique est très intense. Cette zone fait généralement quelques dizaines de micromètres^{97,171}.
- La zone de transition, dans laquelle la concentration ionique augmente progressivement jusqu'à atteindre celle du bulk.

Ainsi, le canal anodique pourra être décomposé en trois zones : l'ESC, la zone de transition et le bulk.

6.2.3 Problématique des conditions aux limites proches de la membrane

Nous limitons donc notre modèle au microcanal anodique, en considérant que la membrane se comporte comme un mur hydrodynamique pour le fluide, qu'elle a une résistance électrique nulle et enfin qu'elle laisse passer idéalement les cations, tout en bloquant les anions.

Comme mentionné dans l'introduction de ce chapitre, le comportement des ions dans le canal anodique peut être modélisé par l'équation de Nernst-Planck. Reste cependant à définir les conditions limites au niveau du réservoir (entrée du canal anodique) et proche de la membrane. Au niveau du réservoir, la concentration des ions peut raisonnablement être fixée à celle du bulk. Au niveau de la membrane de Nafion, il conviendrait idéalement d'imposer un flux nul pour les anions et un flux de migration (fonction du champ électrique au niveau de la membrane) pour les cations.

De telles conditions limites implémentées sous COMSOL ont abouti à des problèmes de convergence des simulations. En effet, la concentration des ions proche de la membrane tend vers zéro, et le champ électrique devient extrêmement important. De plus, physiquement la concentration des ions H_3O^+ et OH⁻ ne peut pas aller au-dessous de 10⁻⁷ M à cause du phénomène de dissociation des molécules d'eau.¹⁸²

Nous avons donc choisi d'imposer, pour tous les ions, une concentration ionique de 10⁻⁷ M proche de la membrane. Nous rappelons ici que l'objectif de ces modélisations est d'arriver à une interprétation phénoménologique de l'électropréconcentration. Nous avons bien conscience que de telles conditions limites ne permettront pas d'obtenir un modèle quantitatif.

Enfin, le fort champ électrostatique qui prend naissance proche de la membrane est à l'origine de phénomènes tels que l'apparition d'un vortex¹⁷⁰, et de la dissociation des molécules d'eau qui va produire un front de pH¹⁷¹. Un modèle quantitatif de l'électropréconcentration nécessiterait de prendre en compte ces phénomènes.

6.2.4 Influence du FPDF sur la dimension de la zone déplétée

Comme nous l'avons vu, la zone déplétée peut être modélisée par la région ESC et une zone de transition. La région d'ESC fait typiquement quelques dizaines de micromètres. Cependant, dans notre cas, le flux hydrodynamique de retour (FPDF) va modifier significativement ces dimensions.

Afin de le montrer, nous avons développé un modèle à 1 dimension sous COMSOL (le détail de ce modèle est présenté en annexe C). Le canal anodique a une longueur de 20 mm et est initialement rempli d'une solution de KCl de concentration 10^{-4} M et soumis à une différence de potentiel de 20 V. Le transport des ions K+ et Cl⁻ est décrit par l'équation de Nernst-Planck, et les conditions limites utilisées sont [K⁺]=[Cl⁻]= 10^{-7} M au niveau de la membrane et [K⁺]=[Cl⁻]= 10^{-4} M au niveau du réservoir (figure 41). L'objectif de ces premières simulations est d'avoir une idée de l'influence du FDPF sur la dimension de la région ESC. Le modèle étant 1D nous ne pouvons pas tenir compte ici du profil de Poiseuille des écoulements hydrodynamiques. Nous considérons donc des écoulements de type zone, avec un flux hydrodynamique équivalent au flux électroosmotique (la membrane se comportant comme un mur).



Figure 41 : Définition des conditions aux limites de la simulation numérique en 1D.

Les figure 42 et figure 43 montrent le champ électrique et la répartition des ions Cl⁻ dans le canal anodique après 30 secondes de polarisation, sans tenir compte du FPDF, puis en tenant compte du FPDF. Ces simulations ont été effectuées en considérant un potentiel zêta de -50 mV, à l'origine du flux électroosmotique.



Figure 42 : Distribution du champ électrique dans le microcanal, après 30 secondes d'activation à 20V, pour un bulk de concentration 10^{-4} M KCl, avec ou sans flux hydrodynamique de retour (FPDF).



Figure 43 : Profil de concentration de Cl⁻ dans le microcanal, après 30 secondes d'activation à 20 V, pour un bulk de concentration 10^{-4} M KCl, avec ou sans flux hydrodynamique de retour (FPDF).

Ces simulations montrent clairement que le FPDF peut avoir une influence non négligeable sur la répartition des ions. Sans FPDF, la région ESC a une dimension inférieure à 50 μ m, ce qui correspond aux résultats de la littérature. En effet, Andersen et al.¹⁷¹ montrent que la dimension théorique de la région ESC est d'environ 15 μ m, et Han et al.⁹⁷ montrent des dimensions de l'ordre de 20 μ m à 30 μ m, mais notre expérience nous a montré qu'avec le FPDF cette zone peut s'étendre jusqu'à plusieurs mm.

Enfin, notons pour la suite que dans la région ESC le champ électrique est très intense et que la concentration des ions est constante. C'est d'ailleurs ce qui différencie la région ESC de la zone de transition.

6.3 Description phénoménologique de l'électro-préconcentration en mode symétrique

Comme déjà introduit dans la partie 6.2.1, le mode de préconcentration présenté dans cette thèse a une origine physique différente de celles présentées dans la littérature. Nous avons en effet vu dans la première partie de ce manuscrit que les préconcentrateurs basés sur l'ICP utilisent les flux électroosmotiques créés dans la structure MNM. Une protéine de faible mobilité va être entraînée par ces flux, et va se focaliser à l'endroit du microcanal où la force électroosmotique est équivalente à la force électrostatique.¹⁸³

Dans le mode de préconcentration présenté dans cette thèse, les flux hydrodynamiques FPDF vont avoir un rôle prépondérant, et l'origine du phénomène de préconcentration sera différente.
6.3.1 Nécessité d'un modèle 2D

Certains groupes^{73,85,94,101,108,152,153,172,175,184} ont proposé des modèles de préconcentration en 1D. Ceci se justifie par des temps de calculs raisonnables et par le fait que l'électroosmose peut être modélisée en 1 dimension.

Dans notre cas, les flux hydrodynamique de retour ayant une importance prépondérante, il est nécessaire d'en tenir compte. Or ces flux ne peuvent pas être correctement pris en compte dans des modèles 1D.

Afin de garantir des temps de calculs raisonnables, nous avons développé un modèle en 2 dimensions, limité au canal anodique. Ce modèle COMSOL, détaillé en Annexe D, est basé sur la résolution de 3 équations :

- L'équation de Nernst-Planck, pour chaque ion (K⁺, Cl⁻, et la fluorescéine Fluo⁻)
- L'équation de Poisson
- L'équation de Navier-Stokes, qui permet de tenir compte de l'électroosmose en utilisant les conditions de non-glissement à la paroi.

6.3.2 Vers un modèle 2D simplifié

Comme indiqué figure 44, le canal anodique est divisé en 3 régions : l'ESC, la zone de transition et le bulk.



Figure 44 : Définition des conditions aux limites de la simulation numérique en 2D.

Les paramètres et conditions utilisés sont les suivants :

- La concentration ionique dans la région ESC est fixée à 10⁻⁷ M. Ceci se justifie par le fait que, dans cette région, la concentration des ions est sensiblement constante, comme vu dans la partie 6.2.4. Rappelons ici, qu'à cause du phénomène de dissociation des molécules d'eau, nous avons supposé que la concentration des ions proche de la membrane était de 10⁻⁷ M (voir partie 6.2.3).
- La dimension de la région ESC est fixée à 4 mm pour une tension d'activation de 20V. Ceci correspond à un résultat expérimental (figure 38, concentration de KCl 10 mM à pH 5 ; 10 μM de fluorescéine; 0,6 mm d'épaisseur de la membrane de Nafion ; 20 V de tension appliquée).
- La dimension de la zone de transition est arbitrairement fixée à 0.5 mm.
- Le potentiel zêta des microcanaux est fixé à -50 mV, et nous considérerons que cette valeur est constante le long du canal. Ceci est bien évidemment une approximation, puisque le potentiel zêta varie en fonction du pH et de la force ionique. Rappelons que le potentiel zêta intervient dans le calcul du flux électroosmotique dans le canal anodique.
- Les conditions limites concernant l'équation de Navier-Stokes sont un flux nul au niveau de la membrane de Nafion et la pression atmosphérique au niveau du réservoir.

6.3.3 Résultats de la simulation

La figure 45 représente le champ électrostatique et le champ de vitesse dans le canal anodique, après 5 minutes d'activation sous 20 V.



Figure 45 : (a) Représentation du champ de vitesse de l'électrolyte dans la zone déplétée : mise en évidence des boucles de recirculation, (b) distribution du champ électrique dans le microcanal (tension d'activation de 20V).

Le champ électrostatique est très intense dans la région ESC et nous pouvons noter un très fort gradient de champ dans la zone de transition. Concernant le champ de vitesse, trois choses importantes sont à noter :

- La création d'un flux hydrodynamique de retour (FPDF) au niveau de la membrane, qui se comporte comme un mur hydrodynamique.
- Une vitesse de déplacement du fluide négligeable au niveau du bulk. Ceci est dû au fait que le flux électroosmotique, à l'origine du mouvement du fluide, dépend du champ électrique. Il sera donc le plus intense dans la région ESC.
- Il existe un flux de retournement à la limite entre la région ESC et la zone de transition. Ceci est dû au fait que, dans cette région, il existe un fort gradient de champ électrique et par conséquent un fort gradient de flux électroosmotique.

La région ESC est donc soumise à un flux de recirculation. Considérons maintenant que l'on vienne rajouter des molécules de fluorescéine dans le réservoir. Ces molécules vont être progressivement entrainées vers la membrane de Nafion par le flux électroosmotique. Elles seront ensuite piégées dans la région ESC par le flux de recirculation. La figure 46 montre le taux de préconcentration ainsi que le champ de vitesse de la fluorescéine. Le champ de vitesse de la fluorescéine tient compte de la convection (donc du champ de vitesse du fluide), de la migration et de la diffusion.

Ces résultats de simulation montrent que la fluorescéine se concentre à l'interface entre la région ESC et la zone de transition, au niveau de la paroi du microcanal. Il faut cependant noter que les molécules de fluorescéine ne sont pas piégées au niveau de cette interface. Elles tournoient continuellement dans la région ESC. La figure 46d montre que les lignes de champ de vitesses se concentrent au niveau du retournement, ce qui implique que la concentration de fluorescéine est plus importante à ce niveau.



Figure 46 : Résultats numériques donnant le taux de préconcentration et le champ de vitesse de la fluorescéine. Zooms progressifs sur la zone de préconcentration.

6.4 Conclusion

Le mode de préconcentration étudié dans le cadre de cette thèse est différent de ceux couramment reportés dans la littérature^{85,93}. En effet, dans le cas des travaux de Han⁹⁷, la fluorescéine se concentre là où la somme des forces (convection + migration) est nulle. C'est un mode de préconcentration statique. Dans notre cas, la fluorescéine est piégée dans la zone ESC par un mouvement de recirculation du fluide. La concentration de fluorescéine est plus importante à l'endroit où les lignes de champ de vitesse se concentrent. C'est un mode de préconcentration dynamique.

Le modèle présenté ici est un modèle phénoménologique basé sur des simulations simplifiées, et ne se veut donc pas être un modèle quantitatif. En effet les phénomènes physiques intervenant dans le mécanisme de préconcentration sont nombreux et complexes. Chaque phénomène (comportement électrique, hydrodynamique, électroosmotique et permsélectif de la membrane, vortex proche de la membrane, dissociation des molécules d'eau, évolution de la charge de surface sur les parois, ...) nécessiterait une étude propre.

Avant de prétendre à un modèle quantitatif, il faudrait à minima insérer dans la structure MNM des capteurs, permettant de mesurer le pH, la concentration ionique, le potentiel, à différents endroits des microcanaux.

7 Conclusion

Cette partie de mon travail de thèse, consacrée à la préconcentration de molécules biologiques dans des systèmes MNM à membranes, a tenu ses promesses et a globalement rempli ses objectifs. En effet, bien que cette thématique était nouvelle dans l'équipe, nous avons réussi à proposer une puce intégrant une membrane Nafion et permettant d'obtenir des taux de préconcentration de fluorescéine très encourageants (de l'ordre de 1000). Nous avons aussi montré que les volumes de zones de préconcentration sont ici compatibles avec l'intégration future de cette fonction dans un laboratoire sur puce plus complet, et surtout, plus complexe. En utilisant une technique de découpe de polymères, la Xurography, nous avons démontré la possibilité de fabriquer ces systèmes micro/nanofluidiques en des temps très courts (moins de 15 minutes), sans technologie de salle blanche, pour des coûts très faibles et avec l'avantage de pouvoir intégrer différents matériaux nanoporeux, ce qui offre la possibilité d'ajuster les propriétés permsélectives à la molécule à préconcentrer. Enfin, des premières ébauches de modèles phénoménologiques ont été proposées, qui, sans être totalement satisfaisants, ont permis de comprendre les principaux effets physiques en jeu ; et surtout en quoi notre travail diffère de la littérature.

8 Référence

Bibliography

- (1) Yates, D. E.; Levine, S.; Healy, T. W. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases 1974.
- (2) Kirby, B. J.; Hasselbrink, E. F. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 187–202.
- (3) Karnik, R.; Castelino, K.; Fan, R.; Yang, P.; Majumdar, A. Nano Lett. 2005, 5, 1638–1642.
- (4) Jacob N. Israelachvili. In *Intermolecular and surface forces*; Cambridge University Press: Cambridge, **2011**; Vol. 1, p. 706.
- (5) Robert J. Hunter. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2002, 210, 125.
- (6) Cheng, L.-J. Ion and molecule transport in nanochannels, 2008.
- (7) Zeebe, R. E. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2011**, *75*, 2483–2498.
- (8) Schoch, R. B. *Transport Phenomena in Nanofluidics: From Ionic Studies to Proteomic Applications*; Ph.D. Thesis No. 3538, EPFL, Lausanne, **2006**.
- (9) Renaud, L. Etudes de systèmes microfluidiques: Application à l'électrophorèse sur puces polymères, 2004.
- (10) Andersen, M. Electrokinetics of nanochannels and porous membranes with dynamic surface charges, **2012**.
- (11) Andersen, M. B.; Bruus, H.; Bardhan, J. P.; Pennathur, S. J. Colloid Interface Sci. 2011, 360, 262–271.
- (12) Renaud, L.; Kleimann, P.; Morin, P. *Electrophoresis* 2004, 25, 123–127.
- (13) Erickson, D.; Li, D. J. Colloid Interface Sci. 2001, 237, 283–289.
- (14) van der Heyden, F. H. J.; Stein, D.; Dekker, C. Phys. Rev. Lett. 2005, 95, 116104.
- (15) Xue, S.; Yeh, L.; Ma, Y.; Qian, S. J. Phys. Chem. C 2014.
- (16) Morikawa, K.; Mawatari, K.; Kato, M.; Tsukahara, T.; Kitamori, T. Lab Chip 2010, 10, 871.
- (17) Crosnier de Bellaistre, M.; Renaud, L.; Kleimann, P.; Morin, P.; Randon, J.; Rocca, J. L. Electrophoresis 2004, 25, 3086–3091.
- (18) Borysiak, M. D.; Yuferova, E.; Posner, J. D. Anal. Chem. 2013, 85, 11700–11704.
- (19) Baldessari, F. J. Colloid Interface Sci. 2008, 325, 526–538.
- (20) Tandon, V.; Bhagavatula, S. K.; Nelson, W. C.; Kirby, B. J. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1092–1101.
- (21) Rossky, P. J. Faraday Discuss. 2010, 146, 13.
- (22) Křížek, T.; Kubíčková, A.; Hladílková, J.; Coufal, P.; Heyda, J.; Jungwirth, P. *Electrophoresis* 2014, 35, 617–624.

- (23) Jr, J. R. G.; Belongia, B. M.; Arnold, R. G.; Ogden, K. L.; Baygents, C. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64, 2572.
- (24) Ducker, W. a.; Senden, T. J.; Pashley, R. M. Nature 1991, 353, 239–241.
- (25) Schoch, R.; Han, J.; Renaud, P. Rev. Mod. Phys. 2008, 80, 839–883.
- (26) Gorkin, R.; Park, J.; Siegrist, J.; Amasia, M.; Lee, B. S.; Park, J.-M.; Kim, J.; Kim, H.; Madou, M.; Cho, Y.-K. *Lab Chip* **2010**, *10*, 1758–1773.
- (27) Abbas, A.; Brimer, A.; Slocik, J. M.; Tian, L.; Naik, R. R.; Singamaneni, S. Anal. Chem. 2013, 85, 3977–3983.
- (28) Häggström, M. Wikiversity J. Med. 2014, 1.
- (29) Rabilloud, T. Proteomics 2002, 2, 3.
- (30) Lab-on-a-chip http://lab-on-chip.gene-quantification.info/.
- (31) Whitesides, G. M. *Nature* **2006**, *442*, 368–373.
- (32) Nge, P. N.; Rogers, C. I.; Woolley, A. T. Chem. Rev. 2013, 113, 2550–2583.
- (33) Mark, D.; Haeberle, S.; Roth, G.; von Stetten, F.; Zengerle, R. Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 1153– 1182.
- (34) Sackmann, E. K.; Fulton, A. L.; Beebe, D. J. Nature 2014, 507, 181–189.
- (35) Laffite, G. Etude et développement de dispositifs micro- et nanofluidiques a interface polarisable de type silicium / diélectrique, **2012**.
- (36) YASSINE, O. Développement d'un Laboratoire-sur-Puce: mélange, séparation, détection et refroidissement, UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1, 2008.
- (37) Customized Microfluidic Solution http://www.thinxxs.com/main/thinxxs/mailing-california.html.
- (38) Liu, R. H.; Lodes, M. J.; Nguyen, T.; Siuda, T.; Slota, M.; Fuji, H. S.; McShea, A. Anal. Chem. 2006, 78, 4184–4193.
- (39) Liu, R. H.; Nguyen, T.; Schwarzkopf, K.; Fuji, H. S.; Petrova, A.; Siuda, T.; Peyvan, K.; Bizak, M.; Danley, D.; McShea, A. Anal. Chem. 2006, 78, 1980–1986.
- (40) Unger, M. A.; Chou, H.; Thorsen, T.; Scherer, A.; Stephen, R.; Unger, M. A.; Chou, H.; Thorsen, T.; Scherer, A.; Quake, S. R. *Science (80-.).* 2000, *288*, 113–116.
- (41) Felten, M.; Geggier, P.; Jäger, M.; Duschl, C. Phys. Fluids 2006, 18, 10-14.
- (42) Nguyen, N. T.; Meng, A. H.; Black, J.; White, R. M. Sensors Actuators, A Phys. 2000, 79, 115– 121.
- (43) Patel, V.; Kassegne, S. K. Sensors Actuators, B Chem. 2007, 122, 42-52.
- (44) Toonder, J. Den; Bos, F.; Broer, D.; Filippini, L.; Gillies, M.; de Goede, J.; Mol, T.; Reijme, M.; Talen, W.; Wilderbeek, H.; Khatavkar, V.; Anderson, P. Lab Chip 2008, 8, 533–541.

- (45) Hessel, V.; Löwe, H.; Schönfeld, F. Chem. Eng. Sci. 2005, 60, 2479–2501.
- (46) Stroock, A. D.; Dertinger, S. K. W.; Ajdari, A.; Mezic, I.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M. Science 2002, 295, 647–651.
- (47) Liu, R. H.; Yang, J.; Pindera, M. Z.; Athavale, M.; Grodzinski, P. Lab Chip 2002, 2, 151–157.
- (48) Yang, Z.; Matsumoto, S.; Goto, H.; Matsumoto, M.; Maeda, R. Sensors Actuators, A Phys. 2001, 93, 266–272.
- (49) Deval, J.; Tabeling, P.; Chih-Ming Ho. In *Technical Digest. MEMS 2002 IEEE International Conference. Fifteenth IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (Cat. No.02CH37266)*; IEEE, 2002; pp. 36–39.
- (50) Oddy, M. H.; Santiago, J. G.; Mikkelsen, J. C. Anal. Chem. 2001, 73, 5822–5832.
- (51) Yi-Kuen Lee; Deval, J.; Tabeling, P.; Chih-Ming Ho. In *Technical Digest. MEMS 2001. 14th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (Cat. No.01CH37090)*; IEEE, 2001; Vol. 0, pp. 483–486.
- (52) Xu, B.; Wong, T. N.; Nguyen, N. T.; Che, Z.; Chai, J. C. K. Biomicrofluidics 2010, 4.
- (53) West, J.; Karamata, B.; Lillis, B.; Gleeson, J. P.; Alderman, J.; Collins, J. K.; Lane, W.; Mathewson, A.; Berney, H. Lab Chip 2002, 2, 224.
- (54) Slentz, B. E.; Penner, N. A.; Lugowska, E.; Regnier, F. *Electrophoresis* 2001, 22, 3736–3743.
- (55) Nie, S.; Zare, R. N. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1997, 26, 567–596.
- (56) O'Mahony, A. M.; Wang, J. Anal. Methods 2013, 5, 4296.
- (57) Lichtenberg, J.; de Rooij, N. F.; Verpoorte, E. Talanta 2002, 56, 233–266.
- (58) Jung, B.; Bharadwaj, R.; Santiago, J. G. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3476–3483.
- (59) Han, C. M.; Katilius, E.; Santiago, J. G. Lab Chip 2014, 14, 2958–2967.
- (60) Jung, B.; Bharadwaj, R.; Santiago, J. G. Anal. Chem. 2006, 78, 2319–2327.
- (61) Yu, C.; Davey, M. H.; Svec, F.; Fréchet, J. M. Anal. Chem. 2001, 73, 5088–5096.
- (62) Liu, Y.; Foote, R. S.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. Lab Chip 2005, 5, 457–465.
- (63) Kim, S. M.; Sommer, G. J.; Burns, M. a; Hasselbrink, E. F. Anal. Chem. 2006, 78, 8028–8035.
- (64) Song, S.; Singh, A. K.; Kirby, B. J. Anal. Chem. 2004, 76, 4589–4592.
- (65) Plecis, A.; Schoch, R. B.; Renaud, P. Nano Lett. 2005, 5, 1147–1155.
- (66) Ross, D.; Locascio, L. E. Anal. Chem. 2002, 74, 2556-2564.
- (67) Huber, D.; Santiago, J. G. J. Heat Transfer 2005, 127, 806.
- (68) Herr, A. E.; Molho, J. I.; Drouvalakis, K. A.; Mikkelsen, J. C.; Utz, P. J.; Santiago, J. G.; Kenny, T. W. 2003, 75, 1180–1187.
- (69) Fu, J.; Wang, Y.; Han, J. **2013**, 1–16.

- (70) Morrison, M. a.; Benoit, G. Environ. Sci. Technol. 2001, 35, 3774–3779.
- (71) Pu, Q.; Yun, J.; Temkin, H.; Liu, S. Nano Lett. 2004, 4, 1099–1103.
- (72) Renaud, L.; Selloum, D.; Tingry, S. *Microfluid. Nanofluidics* 2015.
- (73) Zangle, T. A.; Mani, A.; Santiago, J. G. *Langmuir* **2009**, *25*, 3909–3916.
- (74) Hatch, A. V.; Herr, A. E.; Throckmorton, D. J.; Brennan, J. S.; Singh, A. K. Anal. Chem. 2006, 78, 4976–4984.
- (75) Dhopeshwarkar, R.; Hlushkou, D.; Nguyen, M.; Tallarek, U.; Crooks, R. M. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 10480–10481.
- (76) Chun, H.; Chung, T. D.; Ramsey, J. M. Anal. Chem. 2010, 82, 6287–6292.
- (77) Ko, S. H.; Song, Y.-A.; Kim, S. J.; Kim, M.; Han, J.; Kang, K. H. Lab Chip 2012, 12, 4472–4482.
- (78) Shen, M. Rapid Prototyping of Microfluidic Devices : Realization of Magnetic Micropumps , Fuel Cells and Protein Preconcentrators, **2010**, Vol. 4915.
- (79) Kim, S. J.; Han, J. Anal. Chem. 2008, 80, 3507–3511.
- (80) Lee, J. H.; Song, Y.-A.; Han, J. Lab Chip 2008, 8, 596–601.
- (81) Lee, J. H.; Song, Y. A.; Tannenbaum, S. R.; Han, J. Anal. Chem. 2008, 80, 3198–3204.
- (82) Jeong, H. L.; Cosgrove, B. D.; Lauffenburger, D. a.; Han, J. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 10340– 10341.
- (83) Cheow, L. F.; Han, J. Anal. Chem. 2011, 83, 7086–7093.
- (84) Ko, S. H.; Kim, S. J.; Cheow, L. F.; Li, L. D.; Kang, K. H.; Han, J. Lab Chip **2011**, 11, 1351–1358.
- (85) Shen, M.; Yang, H.; Sivagnanam, V.; Gijs, M. a M. Anal. Chem. 2010, 82, 9989–9997.
- (86) Kim, M.; Jia, M.; Kim, T. Analyst 2013, 138, 1370–1378.
- (87) Yang, R.-J.; Pu, H.-H.; Wang, H.-L. Biomicrofluidics 2015, 9, 14122.
- (88) Yu, H.; Lu, Y.; Zhou, Y.; Wang, F.; He, F.; Xia, X. Lab Chip 2008.
- (89) Jen, C.-P.; Amstislavskaya, T. G.; Kuo, C.-C.; Chen, Y.-H. PLoS One 2014, 9, e102050.
- (90) Hoeman, K. W.; Lange, J. J.; Roman, G. T.; Higgins, D. A.; Culbertson, C. T. *Electrophoresis* 2009, *30*, 3160–3167.
- (91) Wu, D.; Steckl, A. J. Lab Chip 2009, 9, 1890–1896.
- (92) Choi, E.; Kwon, K.; Kim, D.; Park, J. Lab Chip 2014.
- (93) Louër, A.-C.; Plecis, A.; Pallandre, A.; Galas, J.-C.; Estevez-Torres, A.; Haghiri-Gosnet, A.-M. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7948–7956.
- (94) Plecis, A.; Pallandre, A.; Haghiri-Gosnet, A.-M. Lab Chip 2011, 11, 795–804.
- (95) Mao, P.; Han, J. Lab Chip 2009, 9, 586–591.

- (96) Mao, P.; Han, J. Lab Chip 2005, 5, 837–844.
- (97) Wang, Y.-C.; Stevens, A. L.; Han, J. Anal. Chem. 2005, 77, 4293–4299.
- (98) Han, J.; Craighead, H. G. J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film. 1999, 17, 2142.
- (99) Han, J.; Craighead, H. G. Science 2000, 288, 1026–1029.
- (100) Schoch, R. B.; Renaud, P. Appl. Phys. Lett. 2005, 86, 253111.
- (101) Plecis, A.; Nanteuil, C.; Haghiri-Gosnet, A.-M.; Chen, Y. Anal. Chem. 2008, 80, 9542-9550.
- (102) Kim, C.-B.; Chun, H.; Chung, J.; Lee, K. H.; Lee, J. H.; Song, K.-B.; Lee, S.-H. Anal. Chem. **2011**, *83*, 7221–7226.
- (103) Wu, Z.-Y.; Fang, F.; He, Y.-Q.; Li, T.-T.; Li, J.-J.; Tian, L. Anal. Chem. 2012, 84, 7085–7091.
- (104) Sung, K.-B.; Liao, K.-P.; Liu, Y.-L.; Tian, W.-C. Microfluid. Nanofluidics 2013, 14, 645–655.
- (105) Quist, J.; Trietsch, S. J.; Vulto, P.; Hankemeier, T. Lab Chip 2013, 13, 4810-4815.
- (106) Kim, S. M.; Burns, M. A.; Hasselbrink, E. F. Anal. Chem. 2006, 78, 4779-4785.
- (107) Lee, J. H.; Chung, S.; Kim, S. J.; Han, J. Anal. Chem. 2007, 79, 6868-6873.
- (108) Dhopeshwarkar, R.; Crooks, R. M.; Hlushkou, D.; Tallarek, U. Anal. Chem. 2008, 80, 1039-1048.
- (109) Hlushkou, D.; Dhopeshwarkar, R.; Crooks, R. M.; Tallarek, U. Lab Chip 2008, 8, 1153–1162.
- (110) Huang, K.-D.; Yang, R.-J. Electrophoresis 2008, 29, 4862-4870.
- (111) Kondapalli, S.; Connelly, J. T.; Baeumner, A. J.; Kirby, B. J. *Microfluid. Nanofluidics* **2011**, *11*, 537–544.
- (112) Yanagisawa, N.; Dutta, D. Anal. Chem. 2012, 84, 7029-7036.
- (113) Kim, B.; Heo, J.; Kwon, H. J.; Cho, S. J.; Han, J.; Kim, S. J.; Lim, G. ACS Nano 2013, 7, 740–747.
- (114) Online, V. A.; Kim, M.; Kim, T. 2013, 6007–6015.
- (115) Chung, P.-S.; Fan, Y.-J.; Sheen, H.-J.; Tian, W.-C. Lab Chip 2014, 15, 319–330.
- (116) Shin, I. H.; Kim, K.-J.; Kim, J.; Kim, H. C.; Chun, H. Lab Chip 2014, 14, 1811–1815.
- (117) Wang, C.; Ouyang, J.; Wang, Y.; Ye, D.; Xia, X. Anal. Chem. 2014, 86, 3216–3221.
- (118) Chao, C.-C.; Chiu, P.-H.; Yang, R.-J. Biomed. Microdevices 2015, 17, 25.
- (119) Choi, J.; Huh, K.; Moon, D. J.; Lee, H.; Son, S. Y.; Kim, K.; Kim, H. C.; Chae, J.-H.; Sung, G. Y.; Kim, H.-Y.; Hong, J. W.; Kim, S. J. *RSC Adv.* 2015, *5*, 66178–66184.
- (120) Liu, J.; Kleimann, P.; Laffite, G.; Jamois, C.; Orobtchouk, R. Appl. Phys. Lett. 2015, 106, 53107.
- (121) Laffite, G.; Roumanie, M.; Gourgon, C.; Perret, C.; Boussey, J.; Kleimann, P. J. Electrochem. Soc. 2011, 158, D10.
- (122) Laffite, G.; Zheng, X.; Renaud, L.; Bessueille, F.; Charlaix, E.; Kleimann, P. Int. J. Nanosci. 2012, 11, 1240021.

- (123) Schasfoort, R. B.; Schlautmann, S.; Hendrikse, J.; Berg, A. van den. *Science (80-.).* **1999**, *286*, 942–945.
- (124) Bartholomeusz, D. A.; Boutte, R. W.; Andrade, J. D. J. Microelectromechanical Syst. 2005, 14, 1364–1374.
- (125) Nam, S.; Rooks, M. J.; Kim, K.; Rossnagel, S. M. Nano Lett. 2009, 9, 2044.
- (126) Guan, W.; Reed, M. a. Nano Lett. 2012, 12, 6441–6447.
- (127) Lee, S.-H.; Lee, H.; Jin, T.; Park, S.; Yoon, B. J.; Sung, G. Y.; Kim, K.-B.; Kim, S. J. *Nanoscale* **2014**, *7*, 936–946.
- (128) Kleimann, P. Effets d'interface: de la micro-nano structuration du silicium par gravure électrochimique aux transistors nanofluidiques; 2012.
- (129) Fused silica capillary http://www.molex.com/molex/common/staticLoader.jsp?fileName=/PolymicroTechnologiesCatal og.html.
- (130) Duval, J. F. L.; Huijs, G. K.; Threels, W. F.; Lyklema, J.; van Leeuwen, H. P. J. Colloid Interface *Sci.* 2002, *260*, 95–106.
- (131) Gu, Y. (Peter); Li, D. J. Colloid Interface Sci. 2000, 226, 328-339.
- (132) El-Gholabzouri, O.; Cabrerizo, M. A.; Hidalgo-Álvarez, R. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *159*, 449–457.
- (133) Kirby, B. J.; Hasselbrink, E. F. *Electrophoresis* 2004, 25, 203–213.
- (134) Plecis, A. etude et controle de la charge de surface dans les dispositifs micro/nanofluidiques : nouveaux outils pour les sciences separatives, **2008**.
- (135) Ehmann, T.; Bächmann, K.; Fabry, L.; Rüfer, H.; Serwe, M.; Ross, G.; Pahlke, S.; Kotz, L. J. Chromatogr. A 1998, 816, 261–275.
- (136) Kaupp, S.; Bubert, H.; Baur, L.; Nelson, G.; Wätzig, H. J. Chromatogr. A 2000, 894, 73-77.
- (137) Dishon, M.; Zohar, O.; Sivan, U. Langmuir 2009, 25, 2831–2836.
- (138) Boehm, H.-P. Angew. Chemie 1980, 92, 328–328.
- (139) Urhan, S. Cem. Concr. Res. 1987, 17, 141-152.
- (140) Audry, M.-C.; Ramos, S.; Charlaix, E. J. Colloid Interface Sci. 2009, 331, 371-378.
- (141) Fujima, T.; Futakuchi, E.; Tomita, T.; Orai, Y.; Sunaoshi, T. Langmuir 2014, 30, 14494–14497.
- (142) Chen, S.; Nyholm, L.; Jokilaakso, N.; Karlström, A. E.; Linnros, J.; Smith, U.; Zhang, S.-L. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2011**, *14*, J34.
- (143) Dev, A.; Horak, J.; Kaiser, A.; Yuan, X.; Perols, A.; Björk, P.; Karlström, A. E.; Kleimann, P.; Jan Linnros. *Biosens. Bioelectron.* 2016, *82*, 55–63.
- (144) Dev, A.; Horak, J.; Kaiser, A.; Yuan, X.; Perols, A.; Björk, P.; Karlström, A. E.; Kleimann, P.; Jan

Linnros. In MRS Fall Meeting & Exhibit; Boston, Massachusetts, 2015.

- (145) Foote, R. S.; Khandurina, J.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. Anal. Chem. 2005, 77, 57-63.
- (146) Waldbaur, A.; Rapp, H.; Länge, K.; Rapp, B. E. Anal. Methods 2011, 3, 2681.
- (147) Kwak, R.; Guan, G.; Peng, W. K.; Han, J. Desalination 2013, 308, 138–146.
- (148) Dhopeshwarkar, R.; Crooks, R. M.; Sun, L. Lab Chip 2005, 5, 1148–1154.
- (149) http://nptel.ac.in/courses/102103047/module6/lec31/1.html.
- (150) Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **1995**, 51, L7–L21.
- (151) Diehl, H.; Markuszewski, R. Talanta 1989, 36, 416-418.
- (152) Mani, A.; Zangle, T. A.; Santiago, J. G. Langmuir 2009, 25, 3898–3908.
- (153) Kim, S. J.; Wang, Y.; Lee, J. H.; Jang, H.; Han, J. Phys. Rev. Lett. 2007, 99, 44501.
- (154) Kim, S. J.; Li, L. D.; Han, J. Langmuir 2009, 25, 7759-7765.
- (155) Jeon, H.; Lee, H.; Kang, K. H.; Lim, G. Sci. Rep. 2013, 3, 3483.
- (156) Shen, M.; Walter, S.; Gijs, M. a. M. J. Power Sources 2009, 193, 761-765.
- (157) Song, Y.-A.; Melik, R.; Rabie, A. N.; Ibrahim, A. M. S.; Moses, D.; Tan, A.; Han, J.; Lin, S. J. Nat. Mater. 2011, 10, 980–986.
- (158) Demekhin, E. a.; Nikitin, N. V.; Shelistov, V. S. Phys. Fluids 2013, 25.
- (159) Chang, H.-C.; Yossifon, G.; Demekhin, E. a. Annu. Rev. Fluid Mech. 2012, 44, 401-426.
- (160) Druzgalski, C. L.; Andersen, M. B.; Mani, a. Phys. Fluids 2013, 25.
- (161) Pedimonte, B. J.; Moest, T.; Luxbacher, T.; von Wilmowsky, C.; Fey, T.; Schlegel, K. A.; Greil, P. Acta Biomater. 2014, 10, 968–974.
- (162) Pernodet, N.; Maaloum, M.; Tinland, B. Electrophoresis 1997, 18, 55–58.
- (163) Kim, M.; Kim, T. Analyst 2013, 138, 6007–6015.
- (164) Young's modulus and possion's ratio of acrylic
 https://www.dsm.com/content/dam/dsm/somos/en_US/documents/Brand-Status-Product Datasheets/US English A4/Somos WaterClear Ultra 10122 US English A4.pdf.
- (165) Young's modulus https://en.wikipedia.org/wiki/Young%27s_modulus.
- (166) poisson's ratio https://en.wikipedia.org/wiki/Poisson's_ratio.
- (167) Girardin, G.; Layouni, Y.; Morin, P.; Cabrera, M. Int. J. Mater. Form. 2010, 3, 1083–1086.
- (168) Fisher, L. R.; Mitchell, E. E.; Hewitt, D.; Ralston, J.; Wolfe, J. Colloids and Surfaces 1991, 52, 163-174.
- (169) Jia, W.; Ren, S.; Hu, B. **2013**, *8*, 5828–5837.

- (170) Kwak, R.; Pham, V. S.; Lim, K. M.; Han, J. Phys. Rev. Lett. 2013, 110, 1–5.
- (171) Andersen, M. B.; Rogers, D. M.; Mai, J.; Schudel, B.; Hatch, A. V; Rempe, S. B.; Mani, A. *Langmuir* **2014**, *30*, 7902–7912.
- (172) Dydek, E. V.; Zaltzman, B.; Rubinstein, I.; Deng, D. S.; Mani, A.; Bazant, M. Z. *Phys. Rev. Lett.* 2011, *107*, 118301.
- (173) MacDonald, B. D.; Gong, M. M.; Zhang, P.; Sinton, D. Lab Chip 2014, 14, 681–685.
- (174) Qian, S.; Ai, Y. 2012, 153, 382.
- (175) Jia, M.; Kim, T. Anal. Chem. 2014, 86, 7360-7367.
- (176) Kirby, B. *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics : transport in microfluidic devices*; Cambridge University Press: Cambridge, **2010**.
- (177) Fontanella, J.; Mclin, M.; Wintersgill, M.; Calame, J.; Greenbaum, S. Solid State Ionics 1993, 66, 1–4.
- (178) Catalano, J.; Hansen, M. R.; Wagner, M.; Jensen, G. V.; Pedersen, J. S.; Bentien, A. 2014.
- (179) Barbati, A. C.; Kirby, B. J. Langmuir 2014, 30, 1985–1993.
- (180) Dongqing Li. Electrokinetics in Microfluidics; 2004.
- (181) Höltzel, A.; Tallarek, U. J. Sep. Sci. 2007, 30, 1398-1419.
- (182) Bandura, A. V. J. Phys. Chem. Ref. Data 2006, 35, 15.
- (183) Chen, C. H.; Sarkar, A.; Song, Y. A.; Miller, M. a.; Kim, S. J.; Griffith, L. G.; Lauffenburger, D. a.; Han, J. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 10368–10371.
- (184) Bahga, S. S.; Bercovici, M.; Santiago, J. G. Electrophoresis 2012, 33, 3036-3051.
- (185) Windbacher, T.; Sverdlov, V.; Selberherr, S. 2010, 85-95.
- (186) Eijkel, J. C. T.; van den Berg, A. Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 957–973.
- (187) Jiang, Z.; Stein, D. Langmuir 2010, 26, 8161-8173.
- (188) Jiang, Z.; Stein, D. Phys. Rev. E 2011, 83, 31203.
- (189) LOWRIE, W. Fundamentals of Geophysics, second edition; 2007.

Conclusion générale et perspectives

Le sujet de cette thèse concerne l'étude des charges à l'interface entre un électrolyte et un solide, dans le contexte général de la micro/nanofluidique. Mon travail s'est décomposé en deux axes majeurs : tout d'abord, la mesure et la caractérisation de la charge de surface par la méthode des courants d'écoulement, puis l'utilisation des propriétés induites par la charge de surface en nanofluidique pour la préconcentration de molécules biologiques.

Au début de ma thèse, la mesure du potentiel zêta d'une interface liquide/solide par courants d'écoulement restait encore une question complexe, 10 ans après les premières expériences réalisées au laboratoire, notamment à cause de la persistance de dérives qui étaient incomprises et très problématiques. Outre les améliorations du banc expérimental existant, qui ont permis de limiter les dérives d'ordre expérimental (pH, température), mon travail a aidé à l'amélioration de notre compréhension de la physicochimie des interfaces. Nous avons notamment montré que le potentiel zêta d'une interface SiO2/électrolyte n'est pas seulement caractéristique de cette interface, mais dépend aussi très fortement de l'historique de l'interface (type d'électrolyte rencontré, prétraitement, vieillissement, ...). En particulier, nous avons mis en évidence qu'un protocole de préparation des surfaces nous permettait de fournir une information fiable et répétable sur le potentiel zêta de la silice en contact avec des électrolytes de KCl et de NaCl. Nous avons valorisé ces résultats par une collaboration avec l'Institut Royal Technologique de Suède, en utilisant astucieusement et de manière très originale la mesure de courants d'écoulement comme un capteur innovant de molécules biologiques. Les objectifs de ma thèse relatifs à la mesure des charges de surface ont donc été largement atteints, et les résultats obtenus nous invitent à explorer d'autres matériaux que la silice afin de découvrir des interfaces polarisables, et de permettre ainsi de choisir la permsélectivité des systèmes MNM en fonction des molécules à préconcentrer.

La préconcentration de molécules biologiques était le deuxième axe majeur de mon travail de thèse, ce qui constituait une thématique totalement nouvelle pour l'équipe dans laquelle je me suis intégré. Mon travail a donc consisté, dans un premier temps, à mettre en place une technologie permettant d'obtenir des systèmes MNM de manière rapide et sans faire usage de procédés de salle blanche. Un protocole de quantification des taux de préconcentration a ensuite été proposé, et des préconcentrations de fluorescéine d'un facteur de l'ordre de 1000 ont été obtenues. Au-delà de ce simple nombre, ce sont surtout les conditions expérimentales et les volumes de la zone de préconcentration qui sont particulièrement encourageants, car ils ouvrent la voie à une réelle intégration de cette étape de prétraitement de

l'échantillon dans un véritable laboratoire sur puce. De manière à pouvoir optimiser de manière rationnelle ces premiers résultats, une première série de modèles phénoménologiques et de simulations numériques des phénomènes qui interviennent lors de la préconcentration ont été développés. Ils ont permis notamment de comprendre en quoi notre travail diffère des modes de préconcentration habituellement proposés dans la littérature, et donc de démontrer l'originalité de notre puce de préconcentration. Les perspectives de ce travail semblent claires : dans un premier temps, il faudra bien sûr comprendre plus finement ce qu'il se passe dans le système MNM et comparer les modes de préconcentration symétriques et asymétriques afin d'optimiser la préconcentration, pour ensuite intégrer cette fonction dans les puces séparatives déjà réalisées dans l'équipe. Ainsi, la réalisation d'un véritable laboratoire sur puce, complet et réellement fonctionnel, pourra commencer à être sérieusement envisagée.

Annexe

A. Le modèle « site binding »

Pour modéliser la charge de surface, il nécessite de connais tous les réactions chimiques à la surface. Contrairement aux les cations de sodium et potassium, les protons (ou des ions hydronium) dans la solution peuvent réagir chimiquement avec une surface de verre.¹⁷⁶ Basée sur ce type de réaction chimie comme la protonation et déprotonation, les chercheurs crées une modèle : « Site Binding »,^{1,8,10,25,185,186} pour modéliser la charge de surface avec la concentration des ions locaux.

Ici nous montrons un exemple de « site binding » de la surface de silice. Nous commençons par la réaction chimie de la surface de silice : la protonation et la déprotonation. Voici sur le figure 1, la protonation est le processus d'ajout des ions hydrogène sur le site Si.OH ; la déprotonation est l'inverse du processus de réduction des ions hydrogène à partir du site Si.OH :¹



Figure 1 : Le processus de protonation/déprotonation a l'interface liquide/solide de silice avec trois types de sites. Le site Si.OH charge nulle; le site Si.O⁻ charge négative; le site Si.OHH⁺ charge positive.

Dans la figure 1, ces trois types de sites de silice avec les valence différents représentent les formes des sites de silice différentes (Le site Si.OH de charge nulle; le site Si.O⁻ de charge négative; le site Si.OHH⁺ de charge positive).^{187,188} Sur la figure 1 à gauche, le processus est la protonation, à droite, la processus est le déprotonation. La réaction chimique de protonation et déprotonation est présentée dans l'equation 22 et l'equation 23 respectivement. Elles sont définies par des équilibrés chimiques comme présenté dans l'equation 24 et l'equation 25.

Equation 22 :

$$Si.OH + H^+ \leftrightarrows Si.OHH^+$$

Equation 23 :

$$Si.OH \leftrightarrows Si.O^- + H^+$$

Equation 24 :

$$K_1 = 10^{-pK_1} = \frac{C_{H^+}^0 \cdot \Gamma_{\text{Si.O}^-}}{\Gamma_{\text{Si.OH}}}$$

Equation 25 :

$$K_2 = 10^{-pK_2} = \frac{C_{H^+}^0 \cdot \Gamma_{\text{Si.OH}}}{\Gamma_{\text{Si.OHH}^+}}$$

Où:

K₁ - est la constante d'équilibre de déprotonation du site de silice (1),

K₂ - la constante d'équilibre de protonation du site de silice (1),

 $C_{H^+}^0$ - le concentration locale d'ions hydrogène (mol/m³),

 $\Gamma_{Si.OH}$ - le nombre de Si.OH place par mètre carré (1/m²),

 $\Gamma_{Si.O^-}$ - le nombre de Si.O⁻ place par mètre carré (1/m²),

 $\Gamma_{Si.OHH^+}$ - le nombre de Si.OHH⁺ place par mètre carré (1/m²).

De cette manière, la densité de charge de surface Σ peut être calculée en connaissant le nombre de sites total de silice Γ_{total} (equation 26) et le nombre de formes différentes des sites de silice $\Gamma_{Si.OH}$, $\Gamma_{Si.O-}$ et $\Gamma_{Si.OHH^+}$ (equation 27) à partir de la constante d'équilibre K₁ et K₂:

Equation 26 :

$$\Gamma_{\rm total} = \Gamma_{\rm Si.OH} + \Gamma_{\rm Si.O^-} + \Gamma_{\rm Si.OHH^+}$$

Equation 27 :

$$\Sigma = \mathbf{e} \cdot (\Gamma_{\mathrm{Si},\mathrm{OHH}^+} - \Gamma_{\mathrm{Si},\mathrm{O}^-})$$

Où:

 Γ_{total} - est le nombre du site total de silice par mètre carré (1/m²),

 Σ - la densité de charge de surface (C/m²).

La densité de charge de surface Σ en fonction de la concentration d'ions hydrogène à proximité de la surface $C_{H^+}^0$ est obtenue (l'equation 28) en combinant toutes ces quatre équations ci-dessus.¹⁸⁷

Equation 28 :

$$\Sigma = \mathbf{e} \cdot \Gamma_{total} \cdot \frac{(C_{H^+}^0)^2 - K_1 K_2}{(C_{H^+}^0)^2 + K_2 C_{H^+}^0 + K_1 K_2}$$

Dans l'equation 28, le profil de concentration des ions hydrogène dans le couche diffuse $C_{H^+}^0$ est très important. Idéalement, le nombre total de sites de silice Γ_{total} et la constante d'équilibre K₁ et K₂ sont constants, donc la densité de charge de surface Σ est varié avec la concentration d'ions hydrogène dans le couche diffuse $C_{H^+}^0$ qui est relie avec la concentration de contre-ions, le pH, la température, la taille et le valence de contre-ions.^{2,133}

B. Calcul de pH dans la zone de préconcentration

Ici est détaillé le calcul du pH des solutions de fluorescéine utilisées pour les expériences de préconcentration. Les solutions utilisées résultent d'un mélange de deux solutions :

- Une solution de sel de fluorescéine de sodium *FlNa*₂ de concentration 50 mM (solution mère),
- Une solution de chlorure de potassium *KCl* à 10 mM ajustée à pH 5 avec de l'acide chlrodrique *HCl* (solution support).

La concentration finale de fluorescéine désirée étant au maximum de 50μ M, une dilution par 1000 au minimum de la solution mère dans la solution support est nécessaire. Cette dilution fait intervenir un si petit volume de la solution de $FlNa_2$ (typiquement 0.5 mL) par rapport au volume de la solution support (500mL) que nous négligeons l'influence de ce mélange sur les concentrations de *KCl* et *HCl*.

Pour des pH supérieurs à 3 unités, nous pouvons considérer la fluorescéine comme une dibase faible (pKa₁=4.3 et pKa₂=6.7), qui fait intervenir les deux réactions suivantes :

(1)
$$Fl^{2-} + H_3O^+ \Leftrightarrow FlH^- + H_2O$$
 $K_1 = \frac{1}{Ka_2} = \frac{[FlH^-]}{[Fl^{2-}][H_3O^+]}$

(2)
$$FlH^- + H_3O^+ \Leftrightarrow FlH_2 + H_2O$$
 $K_2 = \frac{1}{Ka_1} = \frac{[FlH_2]}{[FlH^-][H_3O^+]}$

Sans omettre l'autoprotolyse de l'eau :

(3)
$$2 H_2 0 \Leftrightarrow H_3 0^+ + 0 H^ K_e = [H_3 0^+][0 H^-]$$

Nous pouvons alors établir un tableau des espèces présentes en solutions à l'instant initial du mélange (hormis les ions spectateurs), puis dresser l'avancement des réactions qui s'opèrent au sein de la solution.

	$[Fl^{2-}]$	$[FlH^{-}]$	$[FlH_2]$	$[H_3 0^+]$	$[OH^{-}]$
Etat initial	C ₀	/	/	h ₀	negl
(1)	-e ₁	e1	/	-e ₁	/
(2)	/	-e ₂	e ₂	-e ₂	/
(3)	/	/	/	e ₃	e ₃
Etat final	co-e ₁	e ₁ -e ₂	e ₂	$h_0-e_1-e_2+e_3$	e ₃

Pour connaître le pH final, il faut alors trouver e_1 , e_2 et e_3 qui satisfont les équilibres réactionnels (1), (2) et (3) (système de 3 équations à trois inconnues). Le pH est alors donné par :

$$pH = -\log(h_0 - e_1 - e_2 + e_3)$$

La figure 1 ci-dessous montre, à gauche, l'évolution du pH d'une solution de fluorescéine en fonction de la concentration initiale c_0 de dianions Fl^{2-} dans la solution : à partir de $c_0=50 \mu$ M la solution atteint un pH de 7.3 unités. A droite est représentée l'intensité de fluorescence d'une solution de fluorescéine en fonction du pH. Nous pouvons constater que, passée la barre de pH 7.3 (*ie* $c_0 = 50 \mu$ M), la fluorescence atteint 95% de son intensité maximale. Nous travaillons donc à priori toujours avec des solutions telles que la fluorescéine est au maximum de sa fluorescence.



Figure 1 : Gauche : évolution du pH d'une solution de fluorescéine résultant d'un mélange d'une faible quantité de solution mère dans une solution support de KCl à pH 5 en fonction de la concentration initiale c_0 de Fl^{2-} . Au-delà de $c_0=50\mu M$, le pH devient supérieur à 7.3. Droite : intensité de fluorescence d'une solution de fluorescéine en fonction du pH¹². Au-delà d'un pH de 7.3, l'intensité de fluorescence dépasse 95 %.

Remarque sur les conditions expérimentales :

Nous avons fait ici le calcul de pH des solutions de fluorescéine « hors conditions expérimentales ». Lorsqu'elles sont utilisées durant les expériences de préconcentration, nous savons que la membrane permsélective de Nafion laisse passer les cations (K^+ et H_3O^+) au détriment des anions (Cl^- et OH^-). Ainsi sans avoir de mesures de pH locales, nous soupçonnons un accroissement du pH dans la zone déplétée accompagnée d'une acidification dans la zone enrichie. Hors, la préconcentration de la fluorescéine se fait précisément du côté de la zone déplétée, là où la solution tend à devenir basique. Nous serions alors toujours dans la région de 100% d'intensité de fluorescence, même pour de faibles concentrations initiales de Fl^{2-} .

C. Calcul de la résistance électrique et de la résistance hydrodynamique du préconcentrateur MNM fluidique d'INL, EPFL et LPN

Comme nous devrons comparer la résistance électrique et la résistance hydrodynamique de microcanal et nanocanal, nous montrons les équations pour le décrire :

La résistance électrique de canal¹⁸⁹ :

$$R_{micro} = \frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}}$$
$$R_{nano} = \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{A_{nano}}$$

Ou : R est la résistance électrique de canal ; σ est la conductivité de électrolyte dans le canal ; L est la longueur de canal et A est la section du canal ; R_{total}, R_{micro} et R_{nano} sont la résistance électrique de préconcentrateur MNM fluidique, la résistance électrique du microcanal et la résistance électrique du nanocanal respectivement et etc.

Ici, la partie de nano est la nanocanal comme dans le cas de LPN, il y a seulement un nanocanal connecté les microcanaux anodiques et les microcanaux cathodiques ; si nous prenons le cas d'INL et le cas d'EPFL, la partie de nano est la membrane de Nafion, pour simplification nous avons considéré la membrane de Nafion est construit par beaucoup de nanocanaux en parallèle, et la résistance électrique de la membrane de Nafion peut réécrire comme le suivant :

$$R'_{nano} = \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{\pi R^2_{nano}} \frac{1}{\frac{\Phi_{nano}A_{nano}}{\pi R^2_{nano}}} = \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{\Phi_{nano}A_{nano}}$$

Ou : R_{nano} et ϕ_{nano} sont le rayon de nanopore dans la membrane de Nafion et la porosité de la membrane de Nafion respectivement.

Avec les paramètres dans le

Tableau 4 et le Tableau 5, nous avons obtenu la résistance électrique de la partie micro et la partie nano dans les trois cas à t = 0s:

• La résistance électrique de la partie nano dans le cas d'INL et le cas d'EPFL sont plus petit par rapport la résistance électrique de la partie micro (environ 1/1000 dans le cas d'INL et environ 1/100 dans le cas d'EPFL).

• La résistance électrique de la partie nano dans le cas de LPN est comparable avec la résistance électrique de la partie micro (environ 1/2 dans le cas de LPN).

En considérons la configuration de préconcentrateur MNM fluidique sur la Figure 37, nous pouvons écrire le courant *I* dans le préconcentrateur MNM fluidique a t=0 s avec l'activation de la tension U_{total} ¹⁸⁹:

Dans le cas de LPN

$$I = \frac{U_{total}}{R_{total}} = \frac{U_{total}}{\frac{2}{\frac{1}{R_{micro}} + \frac{1}{R_{micro}}} + R_{nano}} = \frac{U_{total}}{R_{micro} + R_{nano}} = \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{A_{nano}}}$$

Dans le cas d'INL et EPFL

$$I = \frac{U_{total}}{R_{total}} = \frac{U_{total}}{\frac{2}{\frac{1}{R_{micro}} + \frac{1}{R_{micro}}} + R'_{nano}} = \frac{U_{total}}{R_{micro} + R'_{nano}} = \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{\phi_{nano}A_{nano}}}$$

Donc, la tension appliquée sur le microcanal et le nanocanal U_{micro} , U_{nano} et le champ électrique sur le microcanal et le nanocanal E_{micro} , E_{nano} sont les suivants a t=0 s:

Dans le cas de LPN

$$U_{micro} = I * R_{micro} = \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}}$$
$$U_{nano} = I * R_{nano} = \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{A_{nano}}$$
$$E_{micro} = \frac{U_{micro}}{L_{micro}} = \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{1}{A_{micro}}$$
$$E_{nano} = \frac{U_{nano}}{L_{nano}} = \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{1}{A_{nano}}$$

Dans le cas d'INL et EPFL

$$U_{micro} = I * R_{micro} = \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{\Phi_{nano}A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}}$$

$$U_{nano} = I * R'_{nano} = \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{\Phi_{nano}A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{\Phi_{nano}A_{nano}}$$

$$E_{micro} = \frac{U_{micro}}{L_{micro}} = \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{\Phi_{nano}A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{1}{A_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}}$$

$$E_{nano} = \frac{U_{nano}}{L_{nano}} = \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{\Phi_{nano}A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{1}{\Phi_{nano}A_{nano}}$$

En utilisant le champ électrique sur le microcanal et le nanocanal E_{micro} , E_{nano} , nous pouvons écrire le flux d'électroosmose (Q_{eof}) dans le microcanal et dans le nanocanal $Q_{eof-micro}$ et le $Q_{eof-nano}$ respectivement¹⁷⁶ :

Dans le cas de LPN :

$$Q_{eof-micro} = \frac{\varepsilon_{micro}\zeta_{micro}}{\eta_{micro}} E_{micro} * A_{micro} = \frac{\varepsilon_{micro}\zeta_{micro}}{\eta_{micro}} * \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{micro}}$$
$$Q_{eof-nano} = \frac{\varepsilon_{nano}\zeta_{nano}}{\eta_{nano}} E_{nano} * A_{nano} = \frac{\varepsilon_{nano}\zeta_{nano}}{\eta_{nano}} * \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}} \frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}} \frac{L_{nano}}{A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{nano}}$$

Dans le cas d'INL et EPFL :

$$Q_{eof-micro} = \frac{\varepsilon_{micro}\zeta_{micro}}{\eta_{micro}} E_{micro} * A_{micro}$$

$$= \frac{\varepsilon_{micro}\zeta_{micro}}{\eta_{micro}} * \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}}\frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}}\frac{L_{nano}}{\varphi_{nano}A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{micro}}$$

$$Q_{eof-nano} = \frac{\varepsilon_{nano}\zeta_{nano}}{\eta_{nano}} E_{nano} * A_{nano} = \frac{\varepsilon_{nano}\zeta_{nano}}{\eta_{nano}} * \frac{U_{total}}{\frac{1}{\sigma_{micro}}\frac{L_{micro}}{A_{micro}} + \frac{1}{\sigma_{nano}}\frac{L_{nano}}{\varphi_{nano}A_{nano}}} * \frac{1}{\sigma_{nano}}$$

Revenons dans le cas de LPN, l'électrolyte (KCl) et le substrat (silice) sont la même dans le microcanal et dans le nanocanal, c'est-à-dire la permittivité d'électrolyte ε (KCl), le potentiel zêta ζ (KCl/silice), la viscosité d'électrolyte η (KCl) et la conductivité d'électrolyte σ (KCl) sont la même à t=0 s. Donc le Q_{eof-micro} égal le Q_{eof-nano}. Ce type de phénomène peut expliquer par la figure suivant (Figure 85) :



Figure 85 : la configuration hydrodynamique équivalente du préconcentrateur MNM fluidique dans le cas de LPN. Dans ce cas, le $Q_{eof-micro}$ presque égal le $Q_{eof-nano}$, il n'y a quasiment pas de flux supplémentaire dans ce système.

Dans la Figure 85, $R_h\mu$ représente la résistance hydrodynamique de microcanal et R_hn représente la résistance hydrodynamique de nanocanal. Dans ce cas, le $Q_{eof-micro}$ égal le $Q_{eof-nano}$, il n'y a quasiment pas de flux supplémentaire dans ce système. Donc, nous n'avons pas le flux de retours dans le cas de LPN.

Si l'électrolyte et le substrat ne sont pas la même dans le microcanal et dans le nanocanal, c'est-àdire la permittivité d'électrolyte ε , le potentiel zêta ζ , la viscosité d'électrolyte η et la conductivité d'électrolyte σ ne sont pas la même à t=0 s. Donc, le Q_{eof-micro} ne égal pas le Q_{eof-nano}, comme nous avons présenté le cas d'INL et le cas d'EPFL. Nous devrons calcul le flux supplémentaire créé par l'écart entre le Q_{eof-micro} et le Q_{eof-nano} en commençant par la résistance hydrodynamique de microcanal R_hµ et la résistance hydrodynamique de nanocanal R_hn qui peut réécrire par la suite¹⁷⁶ :

$$R_{h}\mu = \frac{12\eta L_{\text{micro}}}{w_{\text{micro}}h_{\text{micro}}^{3}(1 - 0.63h_{\text{micro}}/w_{\text{micro}})}$$
$$R_{h}n = \frac{8\eta L_{\text{nano}}}{\pi R_{nano}^{4}} * \frac{1}{\frac{\Phi_{nano} * w_{nano} * h_{nano}}{\pi R_{nano}^{2}}} = \frac{8\eta L_{\text{nano}}}{R_{nano}^{2} * \Phi_{nano} * w_{nano} * h_{nano}}$$

 $Ou : w_{micro}, h_{micro}, w_{nano}$ et h_{nano} sont la largeur de microcanal, la profondeur de microcanal, la largeur de la membrane de Nafion et la profondeur de la membrane de Nafion respectivement.

En utilisant les paramètres sur le

Tableau 4 et les équations pour calculer le flux d'électroosmose et la résistance hydrodynamique dans la partie micro et la partie nano, nous obtenons dans les deux cas (le cas d'INL et le cas d'EPFL) :

- $Q_{eof-micro} >> Q_{eof-nano}$, (plus de 50 fois)
- $R_{hydro-nano} >> R_{hydro-micro}$, (environ 10⁹ fois)

Donc, nous avons obtenu un d'autre type de phénomène qui peut expliquer par la figure suivant (Figure 86) par rapport le phénomène dans le cas de LPN (Figure 85):



Figure 86 : la configuration hydrodynamique équivalente du préconcentrateur MNM fluidique dans le cas d'INL et EPFL. Dans ces cas, le $Q_{eof-micro}$ est plus grand par rapport le $Q_{eof-nano}$, il y a surement le flux supplémentaire dans ce système.

Comme le Q_{eof-micro} est plus grand par rapport le Q_{eof-nano}, le flux créé par l'EOF dans le microcanal ne peut pas totalement traverse la membrane de Nafion par le flux d'EOF dans le nanocanal, il doit trouver une solution. Et en plus, le R_{hydro-nano} est plus grand par rapport le R_{hydro-micro}, il y a très peu de flux hydrodynamique dans le nanocanal (Q_{h-nano}) peut traverser la membrane de Nafion. Donc, dans notre cas (le cas d'INL), nous avons travaillé dans le mode symétrique, tous les deux microcanaux sont symétrique, il n'y a pas un sortie pour le reste du Q_{eof-micro}, nous devrons créer un flux de retour pour l'équilibrer. Cependant, Dans le cas d'EPFL, nous avons travaillé dans le mode asymétrique, nous avons un flux qui traverse un de microcanal anodique à l'autre, il y a toujours un sortie pour le Q_{eof-micro}, soit un soit l'autre.

Pour conclusion, nous ne travaillons pas le même type de preconcentration comme présenté dans la littérature.

D. Détail de modèle 1D sans considérer/en considérant le FPDF dans la partie microcanal anodique

D.1 Introduction

Ce modèle 1D a été développé pour étudier l'influence du FPDF (Feedback Pressure Driven Flow) sur la répartition des ions dans le microcanal anodique d'un préconcentrateur MNM fluidique. Les données présentées sont issues du fichier automatiquement généré par Comsol, et permettront au lecteur d'obtenir tous les détails du modèle.

D.1.1 Géométrie

La figure en bas montre la partie de microcanal anodique dans un système de préconcentrateur MNM fluidique en 1D. Nous avons la membrane de Nafion à gauche et le réservoir à droite.



Geometry

L'unité de longueur est en millimètre (mm).

La longueur de microcanal est 20 mm qui correspondant à la longueur du microcanal anodique dans l'expérience.

D.1.2 Les paramètres

Nous avons ensuite défini les paramètres et les constantes dans la simulation. Nous définirons la concentration de solution de bulk (ckclb), la tension appliquée entre la membrane de Nafion et le réservoir (Vvar), la pression entre eux (pre) et etc. Ensuite, nous avons aussi défini les constantes comme la constante d'ionisation de l'eau (kw) par exemple.

Parameters			
Name	Expression	Value	Description
ckclb	0.1[mol/m^3]	0.1 mol/m ³	Concentration de solution de KCl
kw	1e-8[mol^2/m^6]	$1*10^{-8} \text{ mol}^2/\text{m}^6$	Constante ionique
e0	8.85e-12[F/m]	8.85*10 ⁻¹² F/m	Permittivité vide
er	78.5	78.5	Permittivité relative
e	1.6e-19[C]	1.6*10 ⁻¹⁹ C	charge d'électrons
Т	295[K]	295 K	température
kb	1.38e-23[J/K]	1.38*10 ⁻²³ J/K	Constante de Boltzmann
NA	6.02e23[mol^ - 1]	6.02*10 ²³ 1/mol	Constante d'Avogadro
eta	0.001[Pa*s]	0.001 Pa·s	viscosité
Vvar	20[V]	20 V	Différence de potentiel
pre	0[Pa]	0 Pa	Pression d'entrée

D.2 Modèle physique : Transport of Diluted Species

Pour simplifier, nous étudions seulement la distribution des ions de la solution (les ions K⁺ et Cl⁻) dans le microcanal anodique.

Dans ce modèle, nous utilisons le « transport of diluted species » pour décrire l'équation de Nernst-Planck (détaillé dans le chapitre 6 de la partie 3) dans tous les domaines. Voici les conditions limites pour le modèle sans considérer le FPDF et le modèle avec le FPDF.

D.2.1 Propriétés de transport (sans FPDF)

Voici l'équation pour décrire l'équation de Nernst-Planck dans le modèle où il n'y a pas de FPDF.

Equations

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \nabla \cdot (-D_i \nabla c_i - z_i u_{m,i} F c_i \nabla V) = R_i$$
$$\mathbf{N}_i = -D_i \nabla c_i - z_i u_{m,i} F c_i \nabla V$$

Où: $c_i \pmod{m^3, i=+,-}$ est la concentration de l'espèce i, Z_i sa valence, N_i , mol/(m²·s) son flux, $D_i \pmod{m^2/s}$ son coefficient de la diffusion, $u_{m,i} (S \cdot mol/kg)$ sa mobilité, F (C/mol) est la constante de Faraday, et V le potentiel.

Attention, dans le modèle sans considérer le FPDF, nous avons seulement considéré l'effet de diffusion et l'effet de migration.

Nous avons les coefficients de diffusion pour les ions K⁺ ($2.01*10^{-9}$ [m²/s]) et Cl⁻ ($1.94*10^{-9}$ [m²/s]).

Les coefficients de migration sont basés sur l'équation de Nernst-Einstein (en bas) en considérant les coefficients de diffusion en haut :

$$u_{m,i} = \frac{D_i}{RT}$$

Où : R est le constant des gaz parfaits et T est la température.

La valence pour les ions K^+ et Cl^- est 1 et -1 respectivement.
D.2.2 Propriétés de transport (avec FPDF)

En considérant le FPDF, l'équation de Nernst-Planck est décrite par :

Equations

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \nabla \cdot (-D_i \nabla c_i - z_i u_{m,i} F c_i \nabla V) + \mathbf{u} \cdot \nabla c_i = R_i$$
$$\mathbf{N}_i = -D_i \nabla c_i - z_i u_{m,i} F c_i \nabla V + \mathbf{u} c_i$$

Où : **u** est la vitesse de flux (m/s).

Dans le modèle avec le FPDF, nous avons considéré l'effet de diffusion, l'effet de migration et l'effet de convection.

Nous utilisons les mêmes coefficients de diffusion, les mêmes coefficients de migration et les charges pour K⁺ et Cl⁻.

Pour la partie de convection, nous définirons une vitesse de flux pour le FPDF de la membrane de Nafion au réservoir.

D.2.3 Valeurs initiales



Initial Values

Pour les valeurs initiales entre la membrane et le réservoir, nous avons défini la concentration de K+ et Cl-, qui sont 0.1 mol/m^3 et 0.1 mol/m^3 respectivement a t = 0 s.

			.	•				
0	5	10	15	20	25	30	35	

Concentration

Du côté du réservoir, nous avons aussi défini la concentration de K+ et Cl-, qui sont 0.1 mol/m³ et 0.1 mol/m³ respectivement tout les temps. Parce que nous considerons que le reservoir est de dimension infinie, il n'y a pas de variation.

D.2.5 Concentration (côté de la membrane)

D.2.4 Concentration (côté du réservoir)

-1 -0.8 -0.6 -0.4 -0.2 0 0.2 0.4 0.6 0.8

Du côté de la membrane, nous avons aussi défini la concentration de K+ et Cl-, qui est de 10^{-4} mol/m³ et 10^{-4} mol/m³ respectivement. Nous avons en effet considéré cette concentration à cause du phénomène de dissociation des molécules d'eau (voir la partie 6.2.4 dans la partie 3).

D.3 Modèle physique : Poisson's Equation

Nous utilisons l'équation de Poisson pour décrire la relation entre le potentiel et la distribution des ions dans le microcanal anodique dans tous les domaines.

D.3.1 L'équation de Poisson

Voici l'équation pour décrire l'équation de Poisson dans le modèle où il n'y a pas de FPDF et avec le FPDF.

Equations

$$\nabla \cdot (-c\nabla V) = f$$
$$\nabla = \frac{\partial}{\partial x}$$

Où : c est la permittivité (F/m) et f est la densité de la charge (C/m³).

Avec :

•	Diffusion Coefficient	
с	e0*er	F/m
•	Source Term	
f	NA*e*(ckk-ccl)	C/m ³



Initial Values

Nous ne mettrons pas la tension dans le microcanal anodique à t = 0 s.

D.3.3 Dirichlet Boundary Condition (côté du réservoir)

0 5 10 15 20 25 30 35

Dirichlet Boundary Condition

Nous mettrons Vvar (20 V) au côté du réservoir.

D.3.4 Dirichlet Boundary Condition (côté de la membrane)





Nous mettrons 0 V au côté de la membrane.

D.4 Couplage

- Le potentiel électrique (V) dans l'équation de Poisson est lié avec le champ électrique (∇V) dans l'équation de Nernst-Planck.
- 2. La densité de charge d'espace (f) dans l'équation de Poisson est liée avec la distribution des ions et leurs charges dans l'équation de Nernst-Planck.

D.5 Résultats

Les résultats sont montrés dans la partie 6.2.4 de la partie 3.

E. Détail du modèle 2D sans considérer ou en considérant le FPDF dans la partie microcanal anodique

E.1 Introduction

Ce modèle 2D a été développé pour étudier l'influence du FPDF (Feedback Pressure Driven Flow) sur la répartition des ions dans le microcanal anodique d'un préconcentrateur MNM fluidique. Les données présentées sont issues du fichier automatiquement généré par Comsol, et permettront au lecteur d'obtenir tous les détails du modèle.

E.1.1 Géométrie

La figure suivante montre la partie du microcanal anodique dans un système MNM fluidique en 2D. Nous avons la membrane de Nafion à gauche et le réservoir à droit.



Geometry

L'unité de longueur est en centimètre (cm).

La longueur du microcanal est 2 cm et la largeur de 0.06 cm, correspondant au structures réalisées.

E.1.2 Les paramètres

Nous avons ensuite défini les paramètres dans la simulation. Le tableau suivant, montre que nous avons défini la longueur d'ESC, la longueur de transition, la tension appliquée et le rapport entre la concentration de réservoir et la concentration proche de la membrane.

Parameters

Name	Expression	Value	Description
ESC_length	0.4[cm]	0.004 m	Longueur de l'ESC
volt	20[V]	20 V	Tension d'activation
transition_length	0.05[cm]	5*10 ⁻⁴ m	Longueur de la zone de transition
concentration_ratio	1000	1000	Rapport des concentrations dans le réservoir / à la
			concentration proche de la membrane.

E.1.3 Définitions des trois parties du microcanal anodique

Nous avons séparé le microcanal anodique en trois parties : la zone de bulk, la zone d'ESC et la zone de transition (présentées dans la partie de 6.3.2 dans la partie 3).

E.1.3.1 La zone de solution de bulk

Bulk solution

La concentration de KCl dans cette zone est fixée à 0.1 mol/m³.

E.1.3.2 La zone d'ESC

ESC region solution

La concentration de KCl dans cette zone est fixée à 0.0001 mol/m³.

E.1.3.3 La zone de la solution de transition

Transition solution

Dans cette zone, la concentration de KCL varie linéairement de 0.0001 mol/m^3 à 0.1 mol/m^3 de gauche à droite.

E.2 Modèle physique : Electric Currents

Dans ce modèle, nous utilisons le « electric currents » pour décrire le champ électrique dans le microcanal anodique dans tous les domaines.

Electric Currents

Voici l'équation pour décrire le champ électrique dans le modèle.

Equations

$$\nabla \cdot \mathbf{J} = Q_j$$
$$\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E} + \mathbf{J}_{\mathbf{e}}$$
$$\mathbf{E} = -\nabla V$$

Où : **J** est la densité de courant, σ est la conductivité et E est le champ électrique.

E.2.1 Isolation électrique

Nous définirons que les frontières bleues sont des frontières isolées électriquement.

Electric Insulation

Avec l'équation pour décrire l'isolation électrique.

Equations

 $\mathbf{n} \cdot \mathbf{J} = 0$

E.2.2 Valeur initiale

Nous définirons dans tous les domaines à t = 0 s, la tension initiale à 0 V.

Initial Values



E.2.3 Le potentiel électrique (côté de la membrane)



Nous mettrons 0 V au côté de la membrane.

E.2.4 Le potentiel électrique (côté du réservoir)



Electric Potential

Nous mettrons 20 V au côté du réservoir.

E.3 Modèle physique : Le flux laminaire

Nous utilisons le modèle « laminar flow » pour décrire la convection dans le microcanal anodique dans tous les domaines. Il est basé sur l'équation de Navier-stokes.

Laminar Flow

E.3.1 Les propriétés du fluide

Fluid Properties 1

Voici l'équation pour décrire l'équation de Navier-Stokes dans le modèle.

Equations

$$\rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} =$$
$$\nabla \cdot \left[-\rho \mathbf{I} + \mu \left(\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^{\mathsf{T}}\right)\right] + \mathbf{F}$$
$$\rho \nabla \cdot (\mathbf{u}) = 0$$

Où : ρ est la densité de fluide, **u** est la vitesse de flux, p est la pression, μ est la viscosité du fluide.

E.3.2 Valeur initiale

Nous définirons dans tous les domaines à t = 0 s, la pression initiale est 0 Pa.

Initial Values

E.3.3 Paroi (côté du réservoir)



Wall

Nous mettrons 0 Pa au côté du réservoir.

E.3.4 Paroi avec les charges (avec le potentiel zêta)

Nous considérons l'électroosmose en utilisant les conditions de glissement à la paroi.



Wall with surface charge (to calculate electroosmotic velocity)

Voici l'équation pour décrire la vitesse d'électroosmose vers la paroi.

Equations

$$\mathbf{u} = \mu_{eo} \mathbf{E}_{t}$$
, $\mu_{eo} = -\frac{\epsilon_{r} \epsilon_{0} \zeta}{\mu}$, $\mathbf{E}_{t} = \mathbf{E} - (\mathbf{E} \cdot \mathbf{n}) \mathbf{n}$

Où : **u** est la vitesse de flux, μ_{eo} la mobilité d'électroosmose, ζ le potentiel zêta, E_t le champ électrique tangentiel.

Nous utilisons le champ électrique créé dans le modèle de courant électrique avec un potentiel zêta de -0.05 V.



E.3.5 Paroi (côté de la membrane)

Wall (membrane side)

Nous supposons qu'il n'y a pas de glissement au niveau de la membrane.

E.4 Modèle physique : Transport of Diluted Species

Dans ce modèle, nous utilisons le « transport of diluted species » pour décrire l'équation de Nernst-Planck dans tous les domaines.

Transport of Diluted Species

Voici les équations pour décrire l'équation de Nernst-Planck.

Equations

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \nabla \cdot (-D_i \nabla c_i - z_i u_{m,i} F c_i \nabla V) + \mathbf{u} \cdot \nabla c_i = R_i$$
$$\mathbf{N}_i = -D_i \nabla c_i - z_i u_{m,i} F c_i \nabla V + \mathbf{u} c_i$$

Où: $c_i \pmod{m^3}$ est la concentration de l'ion i, Z_i sa valence, $N_i \mod/(m^2 \cdot s)$ son flux, $D_i (m^2/s)$ le coefficient de diffusion, $u_{m,i}$ (S·mol/kg) est la mobilité, F (C/mol) est la constant de Faraday, **u** est la vitesse de flux et V est le potentiel.

E.4.1 Propriétés de transport

Transport Properties

Pour la partie de la diffusion :

Nous avons les coefficients de diffusion pour les ions K^+ (2.01*10⁻⁹[m^2/s]), Cl⁻ (1.94*10⁻⁹[m^2/s]) et pro⁻ (4*10⁻¹⁰[m^2/s]) (pro⁻ indique la protéine comme analyte).

Pour la partie de la migration :

Les coefficients de migration sont basés sur l'équation de Nernst-Einstein :

$$u_{m,i} = \frac{D_i}{RT}$$

Où : R est la constante des gaz parfaits et T est la température.

Les valences pour les ions K^+ , Cl^- et pro⁻ sont 1, -1 et -1.

Le champ électrique vient du modèle du courant électrique.

Pour la partie de la convection :

La vitesse de flux vient du modèle du flux laminaire.

E.4.2 Flux nul

No Flux

Les flux est nul sur les frontières en bleu.

E.4.3 Valeur initiale

Initial Values

Nous définirons que la concentration de la protéine est 10⁻² mol/m³ dans tous les domaines.

E.4.4 La concentration de la protéine



Concentration of protein

La concentration proche de la membrane est fixée à 10^{-2} mol/m³.

E.5 Couplage

- Le champ électrique créé dans le modèle de courant électrique est utilisé dans le modèle flux laminaire pour calculer la vitesse de flux électroosmose ; et il est aussi utilisé dans le modèle « transport of diluted species » pour calculer la migration.
- 2. Le champ de la vitesse de flux dans le modèle du flux laminaire est utilisé dans le modèle « transport of diluted species » pour avoir la partie de la convection.

E.6 Résultats

Les résultats sont montrés dans la partie 6.3.3 de la partie 3.

F. Article publié dans « Analytical chemistry »

Xichen Yuan, Louis Renaud, Marie-Charlotte Audry, Pascal Kleimann, Electrokinetic Biomolecule Preconcentration Using Xurography-Based Micro-Nano-Micro Fluidic Devices, Analytical chemistry 87 (17), 8695-8701





Electrokinetic Biomolecule Preconcentration Using Xurography-**Based Micro-Nano-Micro Fluidic Devices**

Xichen Yuan, Louis Renaud, Marie-Charlotte Audry, and Pascal Kleimann*

Institut des Nanotechnologies de Lyon INL-UMR5270, CNRS, Université Lyon1, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne, France

Supporting Information

ABSTRACT: In this paper we introduce a low cost rapid prototyping framework for designing Micro-Nano-Micro (MNM) fluidic preconcentration device based on ion concentration polarization (ICP) phenomenon. Xurography-based microchannels are separated by a strip of ion perm-selective Nafion membrane which plays the role of nanofluidic potential barrier for the negatively charged molecules. As a result, by using this rapid and inexpensive fabrication technique, it is possible to get preconcentration plugs as high as 5000 fold with an original symmetric electroosmotic flow (EOF) condition. Due to its simplicity and performance, this device could be implemented in various bioanalysis systems.



The research in the field of micro- and nanofluidics was quite active during the past decade notably motivated by the potential advantages of miniaturized biomedical analysis systems.¹ These systems are commonly referred to as "lab-on-achip" devices. For example, they integrate several low-volume processing steps into a single chip:² biomolecule sorting, separation, reaction, and detection, which have already been successfully demonstrated on a miniaturized scale.³

However, low concentration biomolecule detection and quantification is still a major issue in biosensors especially when a high concentration of other biomolecule background is involved. For example, in blood, there are more than 10 000 different biomolecules (amino acids, peptides...) with concentrations varying from a few picomolar to hundreds of millimolar.^{4,5} Obviously, it is extremely difficult to sense picomolar concentration of one particular biomolecule within several millimolar of other biomolecules. So the complexity of biosamples is a huge challenge to existing biomolecule detection methods since only few of them have both an ultrasensitive detection level and excellent selectivity. Thus, the high-efficiency biomolecule preconcentrator is often necessary to improve the detection limit and indirectly to broaden the detection range.

Several strategies are currently available to provide sample preconcentration including field-amplified sample stacking, isotachophoresis,⁷ isoelectric focusing,⁸ chromatographic trap-ping,⁹ micellar electrokinetic sweeping,¹⁰ temperature-gradient focusing,¹¹ membrane preconcentration,¹² ion concentration polarization (ICP),13 etc. Particularly, the ICP phenomenon has a great potential since it could guide any charged biomolecules in electrolyte to a given location and separate them from one another. $^{\rm l,14,15}$ Additionally, the ICP could achieve a sufficient preconcentration rate without suffering from clogging as some size exclusion preconcentrator.

The group of J. Han has developed several microfluidic biomolecule preconcentration systems based on electrokinetic trapping and nonlinear electroosmotic flow in a chip. By using advanced microfabrication techniques, glass-silicon based^{17,18} and glass-PDMS based^{19,20} perm-selective nanojunctions, they proposed high-efficiency micro-nano-micro (MNM) fluidic preconcentrators. Using those technologies, an excellent preconcentration rate of one million was demonstrated with charged green fluorescent protein (GFP) biomolecules.²¹ Plecis et al. developed a glass-glass bonding technique to fabricate MNM fluidic preconcentrators: a single nanochannel used as the ion perm-selective section provides a high preconcentration rate (300 for bovine serum albumin (BSA)).^{22,23} However, both of these fabrication processes include photolithography, reactive ion etching, bonding and thermal oxidation, which are time-consuming and not available in most laboratories. Besides, preconcentration volume in these systems are considered as relatively low (<100 pL), which may not be easily delivered.

Here, we propose a rapid, cleanroom-free, and low-cost prototyping technique, xurography,^{24,25} for fabricating glasstape bonded MNM fluidic preconcentrators. Microchannels were fabricated using a patterned double face self-adhesive film and two glass slides as shown in Figure 1. This technique only needs a cutting plotter²⁴ which is traditionally used in the industry for cutting graphics in adhesive films without photolithographic processes or chemicals. Similarly, Nafion membrane,²⁶ a highly efficient ion perm-selective membrane, is also tailored by the cutting machine. The MNM fluidic device is formed by integrating this Nafion strip between glass/tape based anodic channel and cathodic channel which is in contrast to other porous materials (e.g., glass nanochannels) from its

Received: April 10, 2015 Accepted: July 27, 2015

ACS Publications © XXXX American Chemical Society



Figure 1. Glass/tape based MNM fluidic biomolecule preconcentrator with an integrated Nafion strip. The tape as well as the Nafion strip are tailored using a cutting plotter. This Nafion strip separates the two anodic and cathodic microchannels from each other.

high conductance.²⁷ Let us note that, as described in the paper, an original symmetric electrokinetic preconcentration could be realized in this Nafion-integrated MNM fluidic device. However, this prototyping technique also has some drawbacks, such as (i) geometrical reproducibility of the fabrication process (see the Supporting Information); (ii) geometrical limitations;²⁴ and (iii) low bonding energy compared to PDMS/glass plasma bonding or silicon/glass anodic bonding. Still this MNM fluidic device provides the preconcentration rate as high as 5000 in 5 min for higher volumes than previously described (>10⁵ pL).

EXPERIMENTAL SECTION

Micro-Nano-Micro Device Fabrication. Figure 2 shows the fabrication process of glass-tape bonded MNM fluidic preconcentrators. As detailed in Figure 2a,b, a 220 μ m thick double face self-adhesive film (Plusform, Germany; Tesa, Germany, available thickness varies from 5 μ m to hundreds of micrometers) is patterned using a cutting plotter (CE5000-40-CRP, American). The width of microchannel in this work is 600 μ m (yet the cutting plotter could make the channel as

narrow as 300 μ m, according to the previous work of Bartholomeusz et al.²⁴). A piece of Nafion strip is cut from a larger Nafion membrane (no. 117, thickness 183 μ m, DuPont) by using the same cutting plotter. The integration of the Nafion strip is realized thanks to the guiding channel (Figure 2b,c). Patterned double face self-adhesive films with the piece of Nafion strip in the center is sandwiched between two pieces of glass slides (76 mm × 50 mm × 1 mm, Dutscher, France). Then, the three layers are combined together by using a press machine at 7 bar. The gap between the Nafion and the glass slides disappears thanks to the sponge-like structure of the Nafion that swells at the aqueous contact. Four NanoPorts (N-333-01 IDEX Health&Science) used as reservoirs are aligned and glued to the four drilled holes on the top of the glass slide (Figure 2d). The preconcentration chip is finalized by placing four platinum wires (1 mm in diameter, Goodfellow, Huntingdon, U.K.) as electrodes into the four fluidic reservoirs. The overall dimensions of the MNM fluidic device are 50 mm \times 76 mm \times 2 mm. In order to facilitate the electrolyte filling process, each microchannel has an inlet and an outlet. Figure 2e shows the final device, which is fabricated within 15 min.

Reagents and Chemicals. For preconcentration experiments, Fluorescein sodium (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, excitation at 494 nm and emission at 521 nm, pH dependent, negatively charged) and potassium chloride (ROTH) were used as the tracer and bulk solution, respectively. The pH of KCl buffer solution was fixed at 5 by titration (hydrochloric acid, Sigma-Aldrich) and verified by a pH meter (CyberScan pH 6500, Eutech instrument). The main purpose of fixing the pH at 5 is to ensure the reproducibility of the experiments. Indeed, fixed pH enables to control the glass surface charge density in the bulk solution region and so the EOF velocity. The fluorescein stock solution were prepared at 50 mM. All the solutions were made from deionized water produced by a Milli-Q source (Millipore, Milli-Q, 18.2 MQ cm). Two kinds of fluorescein dilutions (1 μ M and 10 μ M) have been made in four different bulk concentrations (0.1, 1,



Figure 2. Fabrication process of MNM fluidic device based on xurography. (a) Patterned double-sided self-adhesive tape (yellow layer) with two liners (pink layers) after cutting. (b) Unnecessary parts are peeled off. (c) Patterned adhesive double face tape is bonded to a glass slide (light blue), meanwhile a piece of Nafion strip (red) is integrated to separate the two microchannels fabricated by xurography. (d) Cover glass slide with drilled holes is then aligned and compressed with adhesive double face tape before gluing the four reservoirs on top of the glass slide. (e) View of the final MNM fluidic preconcentrator.

в

Article

10, and 100 mM) in the experiments (see the Supporting Information).

Protocols and Measurement Setup. Before starting the measurement, the MNM fluidic preconcentrator is washed by DI water first. Then KCl buffer solution (from 0.1 mM to 0.1 M, titrated to pH 5) is mixed with a low concentration of fluorescein. The solution is injected into both anodic and cathodic microchannels. A source meter (Keithley 2400) is used to apply symmetrical electrical potential (in the range of 0-200 V) as shown in the graphic abstract and to measure electrical current through the Pt electrodes.

For the quantification, fluorescent images of preconcentration phenomenon are captured by a CCD camera (12 bits, DFC340 FX, Leica) combined with a Leica DM14000 B inverted microscope equipped with a mercury short arc lamp (HBO 103w/2, OSRAM). The ImageI software is used for fluorescence image analysis.

Quantification of Preconcentration. In order to properly quantify the preconcentration rate, the gray levels obtained in the experiments need to be carefully calibrated. Reference microfluidic devices are chosen as a calibration method. Six reference microchannels (220 μ m thick, the same as experimental devices) are filled with different concentrations of fluorescein (from 500 nM to 50 mM, pH > 7), and they are characterized using different exposure times (from 25 to 800 ms) as shown in Figure 3.



Figure 3. Calibration curves obtained from microscope images for different concentrations of fluorescein through 220 μ m thick reference samples with various exposure times. The best detection range in our conditions is from 0.1 mM to 10 mM (sparse lines). The black dashed line is the ideal case of concentration of fluorescein versus gray level at 25 ms exposure time (without noise, dark current, and saturation, etc.). The red dashed line is the limitation of the 12 bit camera.

The curves of Figure 3 show clearly three regions. The first region is a constant response region for low concentrations of fluorescein (less than 50 μ M), due to the dark current and environmental background light source. The second region (from 50 μ M to 5 mM of fluorescein) is the linear response region. The third region (more than 5 mM of fluorescein) is the saturation region, due to the nonlinearity responses of fluorescein and the saturation of the CCD camera. Those calibration curves need to be determined before each experiment to take into account changes such as variations in the camera orientation, light source intensity, brightness of the room, temperature, etc.

RESULTS AND DISCUSSION

It has been theoretically and experimentally reported $^{15,22,23,27-34}$ that MNM fluidic devices can be used as charged biomolecules preconcentrators. However, as shown in Figure 4, symmetric anodic potential conditions used in this



Figure 4. Symmetric EOF preconcentration system based on the ICP phenomenon. (Nafion used as a perm-selective membrane, 10 mM KCl, 10 μ M fluorescein, pH = 5; applied voltage, 20 V; operating time, 250 s).

work lead to two symmetric stable preconcentration plugs which are located at a few millimeters from the Nafion membrane. We name it "symmetric mode" in contrast with the "asymmetric mode" where two different potentials are applied at the anodic side. 21,35,36

Both of these two modes, symmetric and asymmetric mode, benefit from ICP. Briefly, when a voltage is applied across the Nafion membrane, its perm-selective property leads to the formation of two regions: a depletion region in the anodic part and an enrichment region in the cathodic part.^{1,14,32} It results in the amplification of the electrical field inside the depletion region (more than 30-fold) comparing to outside of the depletion region.¹⁴

In the asymmetric mode, ^{21,37,38} the biomolecules are accumulated in one preconcentration plug because they are driven to the ion depletion zone by ${\rm EOF}^{\rm 21}$ or pressure-driven flow²² in one direction, while the depletion zone block them electrostatically. Oppositely, in the symmetric mode reported here, two preconcentration plugs are formed (Figure 4). It is very important to note that here, thanks to the use of a Nafion membrane, the net flow rate in the microchannel is nearly zero by neglecting the electroosmotic flow²⁷ and hydrodynamic in the nanochannels (see the Supporting Information). flow As a result, a back flow, named feedback pressure driven flow (FPDF),40 is generated in symmetric mode in order to maintain the zero net flow rate in the microchannel (against EOF). As shown in Figure 5, phenomenologically, the strong electrical field 14,34 leads to a circulation flow in the depletion region.

Unsurprisingly, the FPDF will change the distribution of ions in the anodic channels and therefore will change the preconcentration mechanism. The EOF-FPDF circulation will confine the biomolecules and make them turn around in the depletion region.

Here a simple explanation about the preconcentration mechanism is proposed, which involves the bulk region, transition region, and depletion region as shown in Figure 5. The biomolecules are delivered by EOF (see the Supporting Information) from the reservoir to the Nafion membrane near the microchannel walls (from region 1 to region 2). As the



Figure 5. Phenomenological explanation of the preconcentration mechanism under a symmetric EOF system by 2D simulation. (Conceptual view of contour, convection velocity magnitude; conceptual view of arrow surface, convection + migration (biomolecules)).

negatively charged biomolecules are electrostatically blocked by the nanochannels, these biomolecules are mixed by the EOIinduced vortex^{32,40,41} near the Nafion membrane (region 3) and released by the FPDF (region 4). Finally, the biomolecules are constrained by the EOF-FPDF to follow a circulating loop passing through region 2, region 3, and region 4, which is depicted on Figure 5b as red dotted ellipses. This trajectory is submitted to a strong deceleration near region 5 (see velocity arrows in Figure 5a) so that the time spent by the fluorescein molecules near region 5 is much longer than elsewhere along the loop, resulting in a higher concentration in this area. Thus, preconcentration occurs.

In summary, the circulation generated by EOF and FPDF in microchannels continuously carries the biomolecules to this preconcentration region. Further investigation and modeling will be performed to explore this symmetric preconcentration mode.

On the basis of the comprehension of the symmetric EOF preconcentration system, several studies and developments have been carried out in order to optimize the preconcentration rate by varying different parameters. Here, voltage, bulk concentration, and Nafion width will be presented since these parameters have a significant effect on the preconcentration rate.

Formation of Preconcentration Region. First let us note that from our experiences (Nafion used as a perm-selective membrane, 10 mM KCl, 1 μ M fluorescein, pH = 5), preconcentration occurs in the anodic side of the MNM fluidic device (symmetric mode). Besides, we observe experimentally that the preconcentration region moves further away from Nafion membrane as the voltage increases. Even so, the preconcentration plugs are nearly not expanding toward the anodes after a few minutes of constant voltage (see the Supporting Information Figure S2). As shown in Figure 6, the distance between the Nafion membrane and the preconcentration region is measured at 4.2 mm for 20 V, 5.4 mm for 40 V, and 6.3 mm for 60 V, respectively. This phenomenon could be explained as follows: The preconcentration region is located at the interface of the depletion region/bulk solution. Moreover, the size of the depletion region increases with the applied voltage, so that the preconcentration region moves further away from Nafion membrane as the voltage increases.

Voltage and Nafion Width Effect on Preconcentration Rate. Figure 7 shows the preconcentration rate as a function of applied dc voltage and Nafion membrane width. It is clear that,



Article

Figure 6. (Top view) Location and shape of preconcentration plug in a MNM fluidic device (the operating time after voltage applied is 250 s for all these three conditions while the plug is stable after 250 s (see Figure S2).



Figure 7. Preconcentration rate of the concentrated sample depending on the width of the Nafion strip and applied voltage. These experiments were done in the following conditions: 10 μ M fluorescein, 10 mM KCl, pH = 5, voltage varies from 0 to 200 V, 200 ms exposure time, 220 μ m thick microchannel, Nafion width varies from 0.6 mm to 3.0 mm. The preconcentration rates are measured in every 250 s.

in terms of voltage, the value of the preconcentration rate increases with the raise of voltage. However, we also observed that the preconcentration rate saturates progressively upon increasing of the applied voltage.

We observed that for the narrow Nafion membrane (0.6 mm and 1.2 mm), the preconcentration effect disappears if the voltage exceed a certain threshold. This phenomenon, that we propose to name it "pinch mode", could result from a large velocity gradient for high voltage. As already mentioned, the net flow rate in the microchannel is zero (EOF counteract FPDF). When a high voltage is applied, EOF velocity increases with the

electric field, FPDF velocity also increases due to the zero net flow rate. As the dimension of the cross section is always the same, velocity gradient increases near the shear plane (where the velocity of biomolecules is supposed to be zero). So near the shear plane, the preconcentration plug is easily leaked from the wall as shown in Figure 8.



Figure 8. "Pinch mode": preconcentration plug disappears due to high voltage (Nafion 117 (183 μ m height) with a 0.6 mm width; fluorescein 10 μ M mixed with KCl 10 mM; applied voltage, 20–80 V; 200 ms exposure time and all the gray level are fixed at 100/4096 (12 bits)).

Clearly, the curves of Figure 7 also indicate that wide Nafion membranes (1.8 mm, 2.4 mm, and 3.0 mm) prevent the "pinch mode" for voltages below 200 V. However, Figure 7 also indicates that a Nafion membrane width of 1.8 mm is an optimal value for the biomolecules preconcentration in our conditions. Narrower membranes (0.6 mm and 1.2 mm) or wider membranes (2.4 mm and 3.0 mm) lead to a lower preconcentration rate. Further studies and supporting works are needed to have a better comprehension of this phenomenon. In conclusion, from our preliminary results, the higher

woltages lead to better preconcentration rate. Besides, suitable membrane width produces a better preconcentration rate.

Bulk Solution Effect on Preconcentration Rate and Preconcentration Location. Here we study the preconcentration rate influenced by the ionic strength of the buffer solution. Table 1 shows experimental results of the preconcentration rate for different concentrations of bulk solutions (fluorescein 10 μ M, pH = 5).

Table 1. Preconcentration Rate in Different Concentration of Bulk Solutions

concn of KCl (mM) (bulk solution)	preconcentration rate
0.1	around 200
1	around 3500
10	more than 5000
100	around 400

The position of the preconcentration region as a function of ionic strength could be explained as follows:³⁴ As in p-n junctions, the governing principle here is electroneutrality. The uncompensated negative ions generated from the ICP phenomenon in the anodic microchannel need to be balanced by the positive ions presented in the solution, then electroneutrality requires to increase the depletion length (size of the depletion region) to satisfy the relationship until the depletion region has reached its equilibrium dimensions. So in the case of low bulk concentration (0.1 mM KCl in our case), the

depletion length is longer because of the small amount of positive ions present in the bulk solution. On the other hand, in the case of a high bulk concentration (10 mM KCl in our case), the depletion length is shorter because there is a large amount of positive ions present in the bulk region. As a result, for high bulk concentration, a high electrical field gradient is obtained, so the biomolecules are limited in a small region, thus with a better biomolecules accumulation efficiency. Oppositely for low bulk concentration, the biomolecules are limited in a low electric field gradient, hence with a moderate biomolecules accumulation efficiency as shown in Table 1.

However, these results clearly show an optimal value of the KCl concentration in terms of the preconcentration rate, close to 10 mM. With the raising of the ionic strength, the preconcentration region approaches the Nafion strip until it reaches to the vortices presented in Figure 9.³² Thus, we observed clearly that, when the KCl concentration exceeds a certain threshold, the vortices perturb the preconcentration regions.



Figure 9. Preconcentration region for 100 mM KCl bulk concentration is very close to the Nafion membrane. So the preconcentration region will be perturbed by vortices formed near the Nafion membrane.

As pointed out in the literature, the vortices near the Nafion membrane is due to the electroosmotic instability (EOI).^{42–44} In our experiment, the preconcentration plug for 100 mM KCl bulk concentration is very close to the Nafion membrane, so the EOI induced vortices near the membrane perturbs the preconcentration plug. It leads to an unstable preconcentration condition compared with previous bulk solutions (0.1 mM to 10 mM KCl bulk solution).

Discussion. After studying the influence of different parameters on the preconcentration phenomenon, it is also interesting to compare this preconcentration device with published preconcentration devices, as shown in Table 2.

From Table 2, it can be pointed out that our MNM fluidic preconcentrator has a comparable preconcentration rate to those found in the literature and the best preconcentration volume. Such a great volume of preconcentration plug and the huge number of available biomolecules could be easily delivered to any other integrated biochemical processing steps, inside a lab-on-chip system, such as mass spectrometry, UV detection, or immunobiosensors.³³ Besides, a large amount of available molecules are presented in the preconcentration plug. These massive amounts of concentrated molecules will be enough to compensate any loss due to analyte transport to the sensing region.

We also demonstrate that, by using the rapid and inexpensive micro fabrication technique, xurography, it is possible to get satisfactory and promising results. Thanks to the xurography technique, it is extremely easy to fabricate this MNM fluidic device: from preparing material to assembling device, the whole

Table 2. Comparison with Other Work

ref	filter material	tracer concentration level	preconcentration rate (time, min)	preconcentration volume (pL)	available amount of molecules
45	titania membrane	dichlorofluorescein (31 nM)	4×10^3 (7)	10 ^a	8.21×10^{8}
21	nanochannel	rGFP (33 fM)	10^7 (40)	1.2"	2.62×10^{5}
36	Nation 117 strip	AF-BSA (60 pM)	2×10^4 (7)	3400 ^{er}	2.7×10^{9}
22	nanochannel	BSA (1.5 μ M)	3×10^2 (4.5)	30^a	8.94×10^{9}
this work	Nation 117 strip	fluorescein (10 μ M)	5×10^3 (5)	200 000	6.62×10^{15}
<i>a</i>					

"Estimated.

process does not use any photolithography or chemicals and the entire fabrication process takes less than 15 min.

CONCLUSION

In this work, we have developed an original biomolecule preconcentrator, using both xurography and a glass/tape based rapid and low-cost prototyping technology. Our MNM fluidic device can be easily fabricated in most of the laboratories since all the materials could be purchased from the scientific market. Without using photolithography or chemicals, all the processes take less 15 min and it is not necessary to use cleanroom facilities. We demonstrate a preconcentration factor of more than 5000-fold within 5 min in 200 000 pL preconcentration volume in an original symmetric EOF condition. This preconcentration results of symmetric mode could be certainly reproduced by the similar preconcentration devices fabricated by using the standard photolithography technique and other soft-lithography techniques but the fabrication process is not as fast as xurography.

PERSPECTIVES

In the future, this type of MNM preconcentration device will be integrated with other functionalities, such as separation, mixing and quantification, in a lab-on-chip.^{27,38,46} Besides, we plan to study preconcentration of other charged biomolecules. Additionally, this simple and rapid prototyping fabrication technique will be used to integrate other types of nanofluidic channels, such as nanopore alumina membrane, glass nanojunction array, etc. Finally, we will numerically solve an electrokinetic model consisting of four coupled equations: the Poisson–Nernst– Planck–Navier–Stokes equations in the MNM fluidic device, which will provide in detail the physical insight of the preconcentration phenomenon in order to optimize the performance.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.anal-chem.5b01352.

Additional experimental data (PDF)

Video showing position of the preconcentration plugs in 10^{-1} M KCl with 10^{-5} M fluorescein (AVI)

Video showing position of the preconcentration plugs in 10^{-2} M KCl with 10^{-5} M fluorescein(AVI)

Video showing position of the preconcentration plugs in 10^{-3} M KCl with 10^{-5} M fluorescein (AVI)

Video showing position of the preconcentration plugs in

 10^{-4} M KCl with 10^{-5} M fluorescein(AVI) Video showing the formation of preconcentration of the

symmetric EOF system (AVI)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: pascal.kleimann@univ-lyon1.fr. Phone:+33 4 72 44 62 59. Fax:+33 4 72 43 27 40.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the program of ANR-PNANO. All authors would like to thank EEA Lyon (Electronique Electrotechnique Automatique de lyon) for the financial support for the Ph.D. grant of Xichen Yuan. We also gratefully appreciate Liming Huang from the Tesa Company for providing us the test samples. Finally, we acknowledge Magalie Faivre for corrections to the text.

REFERENCES

(1) Schoch, R.; Han, J.; Renaud, P. Rev. Mod. Phys. 2008, 80, 839–883.

(2) Gorkin, R.; Park, J.; Siegrist, J.; Amasia, M.; Lee, B. S.; Park, J.-M.; Kim, J.; Kim, H.; Madou, M.; Cho, Y.-K. *Lab Chip* **2010**, *10*, 1758– 1773.

(3) Abbas, A.; Brimer, A.; Slocik, J. M.; Tian, L.; Naik, R. R.; Singamaneni, S. Anal. Chem. 2013, 85, 3977–3983.

(4) Häggström, M. Wikiversity J. Med. 2014, 1, (2). DOI: 10.15347/ wjm/2014.008.

(5) Rabilloud, T. Proteomics 2002, 2, 3.

(6) Jung, B.; Bharadwaj, R.; Santiago, J. G. Electrophoresis 2003, 24, 3476–3483.

(7) Han, C. M.; Katilius, E.; Santiago, J. G. Lab Chip 2014, 14, 2958–2967.

(8) Jung, B.; Bharadwaj, R.; Santiago, J. G. Anal. Chem. 2006, 78, 2319–2327.

(9) Yu, C.; Davey, M. H.; Svec, F.; Fréchet, J. M. Anal. Chem. 2001, 73, 5088-5096.

(10) Liu, Y.; Foote, R. S.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. Lab Chip 2005, S, 457–465. (11) Kim, S. M.; Sommer, G. J.; Burns, M. a; Hasselbrink, E. F. Anal.

Chem. 2006, 78, 8028–8035. (12) Song, S.; Singh, A. K.; Kirby, B. J. Anal. Chem. 2004, 76, 4589–

4592. (13) Plecis, A.; Schoch, R. B.; Renaud, P. Nano Lett. 2005, 5, 1147-

1155. (14) Kim, S. J.; Song, Y.-A.; Han, J. Chem. Soc. Rev. **2010**, 39, 912–

922. (15) Cheow, L. F.; Han, J. Anal. Chem. 2011, 83, 7086-7093.

(15) Cheow, L. E. Hall, J. Julii, Chem. 2011, 63, 7060–7053.
 (16) Morrison, M. a.; Benoit, G. Environ. Sci. Technol. 2001, 35, 3774–3779.

(17) Mao, P.; Han, J. Lab Chip 2009, 9, 586-591.

F

(18) Mao, P.; Han, J. Lab Chip 2005, 5, 837-844.

(19) Lee, J. H.; Song, Y.-A.; Han, J. Lab Chip 2008, 8, 596-601.

(20) Kim, S. J.; Han, J. Anal. Chem. 2008, 80, 3507-3511.

(21) Wang, Y.-C.; Stevens, A. L.; Han, J. Anal. Chem. 2005, 77, 4293-4299.

DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01352 Anal. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

(22) Louër, A.-C.; Plecis, A.; Pallandre, A.; Galas, J.-C.; Estevez-Torres, A.; Haghiri-Gosnet, A.-M. Anal. Chem. 2013, 85, 7948-7956. (23) Plecis, A.; Pallandre, A.; Haghiri-Gosnet, A.-M. Lab Chip 2011, 11, 795-804.

(24) Bartholomeusz, D. A.; Boutte, R. W.; Andrade, J. D. J. Microelectromech. Syst. 2005, 14, 1364–1374.

(25) Renaud, L.; Selloum, D.; Tingry, S. Microfluid. Nanofluid. 2015, 18, 1407.

(26) Spry, D. B.; Fayer, M. D. J. Phys. Chem. B 2009, 113, 10210-10221.

(27) Ko, S. H.; Song, Y.-A.; Kim, S. J.; Kim, M.; Han, J.; Kang, K. H. Lab Chip 2012, 12, 4472-4482.

(28) Mani, A.; Zangle, T. A.; Santiago, J. G. Langmuir 2009, 25, 3898 - 3908

(29) Zangle, T. A.; Mani, A.; Santiago, J. G. Langmuir 2009, 25, 3909-3916.

(30) Schoch, R. B. Transport Phenomena in Nanofluidics: From Ionic Studies to Proteomic Applications. Ph.D. Thesis No. 3538, EPFL, Lausanne, Switzerland, 2006. (31) Plecis, A.; Nanteuil, C.; Haghiri-Gosnet, A.-M.; Chen, Y. Anal.

Chem. 2008, 80, 9542-9550.

(32) Kim, S. J.; Wang, Y.; Lee, J. H.; Jang, H.; Han, J. Phys. Rev. Lett. 2007, 99, 044501.

(33) Lee, J. H.; Chung, S.; Kim, S. J.; Han, J. Anal. Chem. 2007, 79, 6868-6873.

(34) Kim, S. J.; Li, L. D.; Han, J. Langmuir 2009, 25, 7759-7765.

(35) Kim, M.; Kim, T. Analyst 2013, 138, 6007-6015.
(36) Shen, M.; Yang, H.; Sivagnanam, V.; Gijs, M. a M. Anal. Chem. 2010, 82, 9989-9997.

(37) Jia, M.; Kim, T. Anal. Chem. 2014, 86, 7360-7367.

(38) Kwak, R.; Kim, S. J.; Han, J. Anal. Chem. 2011, 83, 7348-7355.

(39) Dhopeshwarkar, R.; Crooks, R. M.; Hlushkou, D.; Tallarek, U. Anal. Chem. 2008, 80, 1039-1048.

(40) Dydek, E. V.; Zaltzman, B.; Rubinstein, I.; Deng, D. S.; Mani, A.; Bazant, M. Z. Phys. Rev. Lett. 2011, 107, 118301. (41) Kwak, R.; Pham, V. S.; Lim, K. M.; Han, J. Phys. Rev. Lett. 2013,

110, 1-5. (42) Demekhin, E. A.; Nikitin, N. V.; Shelistov, V. S. Phys. Fluids

2013, 25, 122001. (43) Chang, H.-C.; Yossifon, G.; Demekhin, E. a. Annu. Rev. Fluid

Mech. 2012, 44, 401-426. (44) Druzgalski, C. L.; Andersen, M. B.; Mani, A. Phys. Fluids 2013,

25, 110804. (45) Hoeman, K. W.; Lange, J. J.; Roman, G. T.; Higgins, D. A.;

Culbertson, C. T. Electrophoresis **2009**, *30*, 3160–3167. (46) Chen, C. H.; Sarkar, A.; Song, Y. A.; Miller, M. a.; Kim, S. J.;

Griffith, L. G.; Lauffenburger, D. a.; Han, J. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 10368-10371.

G

Article