



HAL
open science

Les laboratoires sur puce : développement d'un système de diagnostic du cancer miniaturisé : de la fabrication à la caractérisation.

Julien Vieillard, Benjamin Hannes, Radoslaw Mazurczyk, Stanislas Krawczyk

► To cite this version:

Julien Vieillard, Benjamin Hannes, Radoslaw Mazurczyk, Stanislas Krawczyk. Les laboratoires sur puce : développement d'un système de diagnostic du cancer miniaturisé : de la fabrication à la caractérisation.. MajecSTIC 2005 : Manifestation des Jeunes Chercheurs francophones dans les domaines des STIC, IRISA – IETR – LTSI, Nov 2005, Rennes, pp.355-363. inria-00000720

HAL Id: inria-00000720

<https://inria.hal.science/inria-00000720v1>

Submitted on 15 Nov 2005

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.

Les laboratoires sur puce : développement d'un système de diagnostic du cancer miniaturisé : de la fabrication à la caractérisation.

Julien Vieillard, Benjamin Hannes, Radoslaw Mazurczyk, Stanislas Krawczyk

Laboratoire d'Electronique, Optoélectronique et Microsystème (LEOM), Ecole centrale de Lyon

36, rue Guy de Collongue, 69134 ECULLY, France

Benjamin.Hannes@ec-lyon.fr

Résumé : Le concept de laboratoire sur puce (« Lab-on-a-chip ») a émergé au début des années 1990. Il s'agit de la miniaturisation, et de l'intégration sur une puce, de systèmes analytiques complexes permettant des analyses rapides tout en consommant de faibles volumes d'échantillon.

Notre objectif est de réaliser des microsystèmes permettant le diagnostic précoce des cancers. Nos capteurs intègrent des réseaux microfluidiques et optiques pour la séparation électrophorétique et la détection par fluorescence de marqueurs protéiques spécifiques d'un cancer. Nous présenterons le contexte scientifique autour des microsystèmes sur puce, et développerons l'originalité de notre système et plus particulièrement l'intégration optique. Après avoir décrit le procédé de fabrication des microsystèmes, nous discuterons des résultats obtenus lors des caractérisations optiques et microfluidiques et des solutions envisagées pour miniaturiser l'unité de contrôle de l'appareil.

Mots Clés : Micro-technologie, Micro-capteurs, Optique intégrée, Microfluidique.

1 INTRODUCTION

1.1 Le contexte biologique

Le cancer, est une prolifération importante et anarchique de cellules anormales qui ont la capacité d'envahir, et de détruire les tissus sains. Le cycle cellulaire grâce auquel les cellules se divisent est le même pour tous les types cellulaires de l'organisme. Il nécessite donc une très haute fiabilité pour garantir un patrimoine génétique identique entre les cellules filles et les cellules mères. Cette qualité est garantie par un mécanisme de contrôle et de réparation très strict et très efficace. Ce sont les molécules appelées marqueurs moléculaires qui sont responsables de ce contrôle. Lorsque ces marqueurs moléculaires sont mutés, ils perdent leurs fonctions de contrôle, devenant alors cancéreux. La cellule va alors accumuler des mutations et des déformations structurales au cours des divisions (immortalisation), provoquant une

croissance cellulaire anarchique, et un développement tumoral.

Ces marqueurs moléculaires, peuvent être extraits à partir de prélèvements sanguins, de biopsies, d'expectorations ou d'analyses d'urine, et dosés lors d'examen de contrôle afin de suivre l'évolution de la tumeur. Lors de la cancérisation, les niveaux d'expressions de certains de ces marqueurs cancéreux sont fortement modifiés. Des profils d'expressions de ces marqueurs ont pu être établis pour certains cancers (prostate, ovaire) dans lesquels nous détectons ces variations [Wan, 2003 ; McIntosh, 2004].

Nous développons un dispositif, permettant un dosage des marqueurs cancéreux spécifiques, qui soit rapide, performant et utilisable par un médecin généraliste. Ce dispositif sera composé d'un microsystème sur puce, permettant l'analyse du prélèvement, et d'une unité de contrôle. C'est dans le microsystème que se déroulera la purification, la séparation, le dosage et l'identification des marqueurs cancéreux. Grâce à l'intégration optique, les microsystèmes développés au laboratoire sont compacts, rapides et jetables. Ils permettent ainsi un diagnostic précoce mais aussi un suivi des cancers.

1.2 L'électrophorèse capillaire

Une technique efficace, à l'échelle macroscopique, pour séparer les gènes comme les protéines est l'électrophorèse. Cette technique permet de séparer les molécules au sein d'une matrice de séparation (gel ou tampon) sous un champ électrique continu. Récemment, son implémentation à des échelles microscopiques a permis de réduire la quantité d'échantillon nécessaire pour l'analyse. C'est l'équipe, dirigée par A.Manz, qui a développé la première électrophorèse capillaire microfluidique sur puce en verre [Manz, 1990]. Depuis le nombre d'études dans ce domaine a connu une très forte croissance [Jacobson, 1994 ; Woolley, 1996].

Comme nous travaillons à l'échelle micrométrique, le mouvement des fluides dans nos canaux est régit par les lois de la microfluidique. De par leurs dimensions

(50 μm), les canaux microfluidiques que nous fabriquons peuvent être assimilés à des capillaires en silice fondue. Il existe plusieurs modes d'électrophorèse capillaire, mais ici nous ne présenterons que le principe de l'électrophorèse en solution libre ou électrophorèse de zone. Lors d'une électrophorèse, les molécules sont séparées en fonction de leurs vitesses électrophorétiques lesquelles dépendent principalement du ratio charge/taille (1).

$$V = \mu_e * E \quad (1)$$

V représente la vitesse électrophorétique (en cm/s) et E le champ électrique appliqué (en V/cm). E est fonction de la longueur du capillaire et du voltage appliqué. μ_e représente la mobilité électrophorétique d'un ion en ($\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$). Ce dernier paramètre est déterminé par la force électrique F_e (2) que les ions subissent et la force de friction F_f (3).

$$F_e = q * E \quad (2) \quad F_f = - 6 * \pi * \eta * r * v \quad (3)$$

Avec q : la charge de l'ion, η : la viscosité du tampon ($\text{N}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$), et r : le rayon de l'ion (cm) (en supposant la particule sphérique). La viscosité représente la résistance du tampon à suivre un écoulement uniforme et sans turbulence. Dans un capillaire, les forces électriques et de frictions s'opposent permettant l'établissement d'un état stable lorsque elles sont de même valeur et de signe opposés. Cet état permet d'établir une définition pour la mobilité électrophorétique (4) :

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

Sous un champ électrique, les molécules contenues dans le tampon vont s'orienter et migrer en fonction de leurs charges (Fig. 1). Par conséquent, les molécules neutres n'ayant pas d'affinité pour les électrodes ne migreront pas, tandis que les molécules négatives seront attirées par l'électrode positive. Donc, seules les molécules positives atteindraient la zone de détection dans la configuration de la figure 1. Ce problème d'orientation est solutionné grâce aux propriétés intrinsèques de la silice qui possède des groupements silanols (SiOH) ionisables.

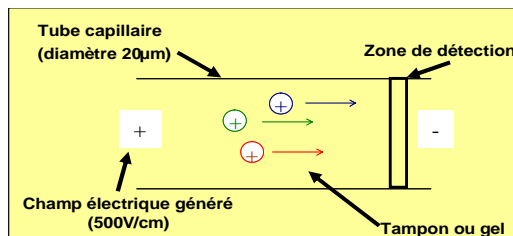


Figure 1 : Orientation des molécules dans le champ électrique dans un capillaire.

Ces groupements possèdent un pH d'ionisation autour de 3. Par conséquent, aux $\text{pH} > 3$ (On utilise

un pH de 9 dans nos expériences), tous les groupements silanols sont ionisés négativement (SiO^-) (Fig. 2a). Le tampon que nous utilisons est une solution polyélectrolytique ; il possède donc des charges positives qui vont pouvoir former des liaisons électrostatiques avec les charges négatives des silanols présents sur les parois (Fig. 2b). Cette interaction va former une double couche électrique (une couche fixe et une couche mobile) à l'interface tampon/capillaire. L'application d'un champ électrique induit le mouvement des cations solvatés de la couche mobile occasionnant le déplacement du tampon vers la cathode (Fig. 2c). Ce phénomène est appelé : Electroosmose.

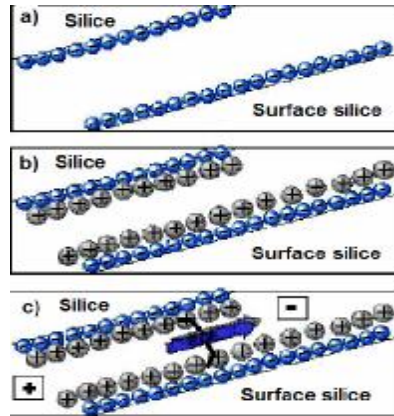


Figure 2 : La force électroosmotique : a) charges négatives des groupements silanols ; b) formation de la double couche électrique ; c) mise en mouvement du tampon par électroosmose (EOF).

L'amplitude de la force électroosmotique peut-être exprimée mathématiquement en terme de vitesse ou de mobilité (5) :

$$v_{EOF} = (\epsilon \zeta / \eta) E \quad (5)$$

ϵ représente la constante diélectrique du tampon ($\text{C}^2/\text{J}\cdot\text{cm}$), ζ , le potentiel zeta correspondant au nombre de charges à la surface du capillaire, et η , la viscosité du tampon. Nous définissons, alors un nouveau paramètre : la mobilité apparente, résultant de la mobilité électrophorétique d'un ion en présence de la force électroosmotique (6).

$$\mu_{app} = \mu_{EOF} + \mu_e \quad (6)$$

Ainsi, les molécules chargées positivement auront une forte mobilité apparente (donc un faible temps de rétention dans le canal) car les forces électrophorétiques et électroosmotiques vont dans le même sens. Les molécules neutres ne seront déplacées que par électroosmose, elles auront donc une mobilité apparente réduite. Tandis que les molécules négatives auront une mobilité faible car les forces mises en jeu s'opposent (Fig. 3).

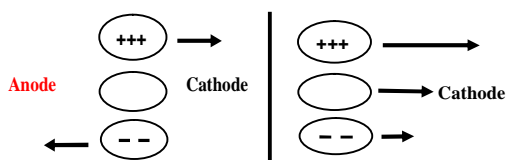


Figure 3 : a) Force électrophorétique seule.
b) Combinaison des forces électrophorétique et électroosmotique.

1.3 Les laboratoires sur puce

Depuis une trentaine d'années, le développement des microtechnologies a permis l'extraordinaire évolution de l'électronique dont les performances ont été démultipliées et les coûts diminués. Au cours des dernières décennies, les technologies de la microélectronique ont commencé à être appliquées aux processus chimiques et biologiques. Les premiers microsystèmes biologiques étant les biopuces et plus particulièrement, les puces à ADN ou à protéine. Ces biopuces consistent en un microsystème sur lequel nous greffons de petits fragments d'ADN ou de protéine (sonde). Ces sondes vont ensuite interagir, de façon complémentaire, avec des molécules d'intérêt présentes en solution pour les détecter. Ce type de microsystème est utilisé pour comparer le profil des gènes d'un tissu sain avec celui d'un tissu malade. Les biopuces ne sont pas quantitatives et nécessitent plusieurs étapes macroscopiques de préparation de l'échantillon à analyser.

L'apport de la microfluidique n'est aujourd'hui plus à démontrer en ce qui concerne le potentiel d'intégration des applications de diagnostic in vitro [Tian, 2000]. Ces microsystèmes fluidiques nous permettent des analyses plus rapides et moins coûteuses. Il est également possible d'intégrer l'ensemble des processus chimiques et biologiques en conservant une bonne sensibilité ainsi qu'une bonne spécificité de détection. Ainsi sur quelques centimètres carrés, ces dispositifs intègrent :

- Ø la manipulation et le mélange de fluide (micromélangeur [He, 2001]) ;
- Ø la préparation d'échantillon (lyse cellulaire [Schilling, 2002], préconcentration [Park, 2003]) ;
- Ø la séparation de molécules [Dou, 2004] ;
- Ø la détection optique [Mogensen, 2004] ;

Ces microsystèmes sont appelés laboratoires sur puce, Lab-on-a-chip (LOC) ou encore Micro Total Analysis (μ TAS) [Kopf-Sill, 2002] et les domaines d'applications sont très variés (protéomique, diagnostic clinique, agroalimentaire).

1.4 Les méthodes de détection

Il existe plusieurs méthodes de détection de molécules couplées aux systèmes microfluidiques :

1.4.1 Méthodes électrochimiques

Ces méthodes peuvent être déclinées sous 3 modes :

Ø Le mode conductimétrique qui mesure la résistance électrique et la conductance d'un électrolyte.

Ø Le mode potentiométrique qui mesure des différences de potentiel au travers de membranes semi-perméables, sélectives aux ions à détecter.

Ø Le mode ampérométrique qui consiste à fixer un potentiel à une électrode de travail et à mesurer les fluctuations temporelles du courant.

Ces techniques sont intéressantes car elles sont faciles à intégrer [Martin, 2002] et ne nécessitent pas de dériver les molécules [Vandaveer, 2002]. En revanche, elles nécessitent d'intégrer des électrodes sur les substrats, ce qui est difficilement reproductible d'un substrat à l'autre.

1.4.2 Méthodes optiques

1.4.2.1 Absorbance

L'absorbance optique est la propriété intrinsèque de certaines molécules à absorber une partie d'un faisceau incident. Le spectre d'absorbance est obtenu par mesure de la différence entre la lumière incidente et la lumière résiduelle. Ce spectre est considéré comme la signature d'un type de molécules. Par exemple, les peptides ou protéines absorbent dans l'ultraviolet à 280 nm. Cette technique bien que largement développée dans les dispositifs commerciaux, possède des limites de sensibilité relativement faibles pour des applications cliniques.

1.4.2.2 Fluorescence

Naturellement, les gènes et les acides aminés possèdent un rendement quantique faible dans le visible. Il est donc nécessaire de dériver ces molécules à l'aide de molécules fluorescentes (fluorophore) greffées par des liaisons chimiques covalentes. Ces molécules (après excitation par un rayonnement lumineux) émettent en se désexcitant à une longueur d'onde différente (fluorescence) de la longueur d'onde d'excitation.

Le phénomène de fluorescence (selon Jablonski) est dû à l'absorption et l'émission de photons : la molécule absorbe l'énergie des photons incidents de longueur d'onde λ_1 , permettant le passage à un état excité des doublets électroniques. Pour retourner à son état d'équilibre, la molécule restitue une énergie qui est plus faible que celle absorbée à cause du passage par un ou plusieurs niveaux énergétiques intermédiaires. Les fluorophores qui seront utilisés ont été choisis en correspondance avec la longueur d'onde de la source d'excitation laser dont nous disposons : 532 nm (vert). Les fluorophores utilisés sont le CY3 et la rhodamine 6G qui produisent un signal de fluorescence orange facilement détectable. La détection de la fluorescence peut se faire avec des outils macroscopiques tels que la microscopie confocale [Fister, 1998] ou par optique intégrée. Les techniques de microscopie sont très sensibles mais

nécessitent des expérimentateurs experts. L'optique intégrée simplifie l'analyseur, tout en réduisant ses dimensions.

L'intégration peut se faire à plusieurs niveaux :

- Ø La source d'excitation avec l'utilisation de diode laser [Hübner, 2001].
- Ø Le guidage de la lumière laser peut se faire par le biais de fibres optiques positionnées à la verticale de la zone de détection [Hübner, 2001]. Par le biais de fibres optiques insérées directement dans le substrat [Lin, 2004 ; Hsinug, 2005] (Fig. 4a). Par le biais de guide optique intégré dans le microsystème [Lin, 2003] (Fig. 4b).
- Ø Le photodétecteur peut également être remplacé par des photodiodes [Webster, 2001].

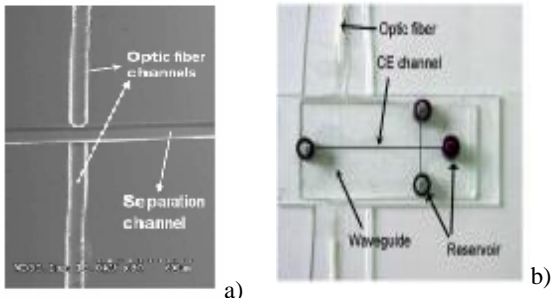


Figure 4 : a) Zone de couplage entre canaux microfluidiques et fibres optiques insérées.
b) LOC intégrant des guides optiques et un réseau microfluidique.

Au laboratoire, nous utilisons des guides optiques intégrés dans le verre pour le guidage de la lumière laser et de la fluorescence. D'une part, les guides optiques nous apportent une souplesse plus importante que les fibres enterrées dans lesquelles le positionnement est peu précis. D'autre part, ils permettent d'intégrer plusieurs éléments optiques passifs sur puce (Jonction Y [Kou, 2004]). Contrairement aux technologies de dépôt, et de gravure sèche mises en oeuvre dans les dispositifs susnommés, la technologie de fabrication des guides par échange d'ions pour laquelle nous avons opté est moins coûteuse et moins complexe.

2 FABRICATION

Les LOC sont classiquement réalisés en silicium, en verre ou en polymère (PMMA, PDMS). Les LOC en silicium ou en verre sont fabriqués par des méthodes issues de la microélectronique : photolithographie et gravure chimique [Gawron, 2001 ; McCreedy, 2000]. Les microsystèmes en polymère sont réalisés par d'autres méthodes comme le « hot embossing », le moulage par injection ou l'ablation laser [Becker, 2000]. Au LEOM, nous réalisons nos substrats en verre car le verre est transparent et isolant. De plus, les techniques de micro-usinage du verre sont bien maîtrisées au laboratoire.

2.1 Les guides optiques

La première étape technologique consiste à réaliser des guides d'ondes (réalisation à l'IMEP-INPG), dans un substrat en verre (75x25mm), par échange d'ions. Le guidage optique consiste à augmenter l'indice d'une zone de géométrie cylindrique pour piéger la lumière par réflexion totale. Dans cette technique (Fig. 5), un échange d'ions s'effectue entre les ions sodium (Na^+) présents dans le verre et les ions M^+ présents dans un bain de sels fondus ($\text{M}^+=\text{K}^+$ ou Ag^+) à une température élevée (300-400°C). Les ions K^+ permettent de fabriquer des guides planaires, et les ions Ag^+ permettent d'enterrer les guides optiques. Le changement de composition chimique dans les zones actives se traduit par une augmentation de l'indice du verre dans celles-ci : les guides d'ondes sont formés.

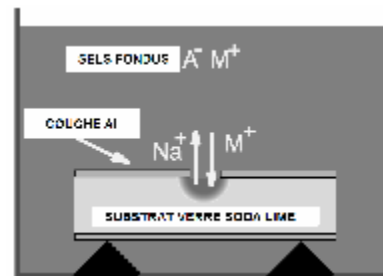


Figure 5 : Réalisation des guides optiques par échange d'ions. $\text{M}^+=\text{K}^+$ ou Ag^+ , $\text{A}^-=\text{NO}_3^-$.

2.2 Les canaux microfluidiques

L'étape technologique suivante est la réalisation de la partie microfluidique (Fig. 6). Nous utilisons un système de double masquage (Chrome/Résine) capable de supporter l'agression chimique au cours de la gravure du verre. La couche de chrome intercalée entre le verre et la couche de résine sert de promoteur d'adhérence entre le verre et la résine. Pour la gravure du verre, nous utilisons un mélange entre une solution commerciale BOE (Buffered Oxide Etchant) et de l'acide chlorhydrique. L'ajout d'acide pendant la gravure, bloque la formation de cristaux insolubles. Différents types de mélanges (BOE : $\text{HCl} : \text{H}_2\text{O}$) à différents ratio et différentes températures ont été testés, ce qui nous a permis d'obtenir des vitesses de gravure du verre allant jusqu'à 1,2 $\mu\text{m}/\text{min}$. La rugosité de surface n'excédant pas 10 nm nous obtenons de bonnes performances pour le comportement des fluides ainsi que pour les éléments optiques.

2.3 Fabrication du capot

Pour la fabrication des réservoirs, nous avons testé deux solutions : le perçage du verre ou du polymère préalablement déposé sur le substrat. L'utilisation d'une couche de polymère comme capot assure l'étanchéité du système, tout en permettant de fabriquer des réservoirs plus grands. Pour nos

travaux, nous avons utilisé un polymère le PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) (Sylgard 184).

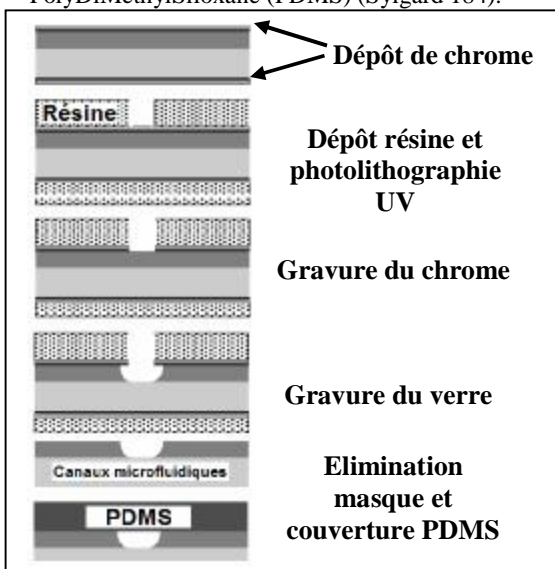


Figure 6 : Réalisation du circuit microfluidique.

Selon l'application, le PDMS permet un collage sur verre réversible ou permanent. Un traitement avec un plasma oxygène garantissant un capotage irréversible. Le collage permanent rend le PDMS hydrophile et présente un écoulement de fluide homogène sur toutes les surfaces. Malheureusement, les canaux sont difficilement nettoyables ensuite. Le collage réversible permet d'utiliser plusieurs fois le même substrat mais complique l'analyse car le PDMS est naturellement hydrophobe. Des traitements chimiques avec une solution d'hydroxyde de sodium permettent de diminuer cette absorption, et garantissent un remplissage des canaux par capillarité. Une procédure de nettoyage et de conditionnement des substrats en salle blanche permet de recycler les LOC sans contamination.

3 LES REALISATIONS

La première génération de substrat réalisée (Fig. 7) intègre 2 canaux microfluidiques croisés pour l'injection et la séparation de biomolécules (largeur : 80 μ m, profondeur : 20 μ m). Le canal d'injection (longueur : 1cm) permet le mélange de l'échantillon avec les différents composants nécessaires à la séparation.

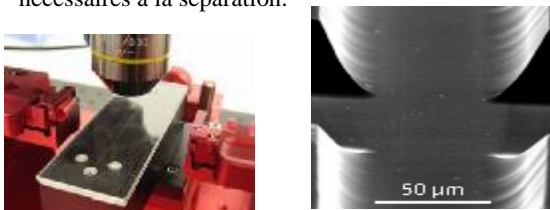


Figure 7 : A gauche : vue large champ d'un LOC. A droite : photo MBE des canaux microfluidiques.

La génération suivante intègre des guides optiques de différentes tailles (2 à 20 μ m) en plus des canaux microfluidiques. Les guides optiques sont perpendiculaires au canal de séparation et sont utilisés pour le guidage de la lumière laser et la collection de la fluorescence émise (Fig. 8).

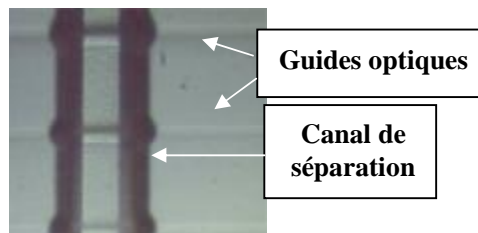


Figure 8 : Intersection entre les canaux microfluidiques et les guides d'onde (x 200).

La troisième génération de microsystemes réalisés, possède deux colonnes de séparation interconnectées (Fig. 9). Des colonnes interconnectées en parallèle permettront la séparation multiparamétrique et la détection de plusieurs marqueurs tumoraux. Des traitements chimiques appropriés dans chacun des canaux permettront d'effectuer des séparations simultanées sous différentes conditions (modification du pH, anticorps greffés sur la surface du canal...) afin d'extraire un maximum d'informations à partir d'un même échantillon de sang.



Figure 9 : Laboratoire sur puce possédant 2 canaux de séparation en parallèle. Longueur du canal court :5cm ; longueur du canal long :7cm.

La géométrie des canaux microfluidiques mise en place dans la troisième génération des LOC devient vraiment intéressante grâce à l'optique guidée. Elle permet de visualiser deux réactions simultanément sans utiliser de plate-forme de déplacement du substrat de haute précision, laquelle était indispensable en microscopie classique.

4 RESULTATS

4.1 Les résultats optiques

Le banc de caractérisation est composé d'un laser YAG doublé de 100 mW à 532 nm (vert) et d'une lampe à vapeur de mercure pour l'excitation. La collection de la fluorescence est effectuée par un photodétecteur ou une caméra numérique. Nous travaillons avec 2 configurations optiques possibles. Dans la première, appelée parallèle, les guides optiques présents sur le LOC sont alignés avec une fibre optique monomode connectée au laser pour

l'excitation. Un guide colinéaire, connecté au photodétecteur est utilisé pour collecter la fluorescence émise. La deuxième configuration, appelée perpendiculaire, utilise la même voie d'excitation que précédemment. En revanche, la collection du signal fluorescent est effectuée à la verticale du canal microfluidique au travers d'un objectif de microscope.

Les tests de caractérisation ont consisté à évaluer l'aspect du spot laser après guidage au travers d'un guide de 9 μm (Fig. 10). Le guidage nous permet de suivre le cheminement de la lumière laser au travers du substrat, tout en conservant un spot homogène en sortie de guide.

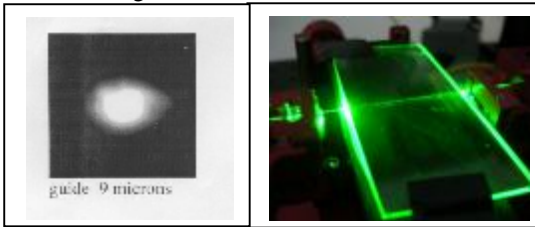


Figure 10 : A gauche : faisceau laser en sortie d'un guide optique. A droite : faisceau laser au travers du guide optique.

Après quantification, nous obtenons un rendement de 65%, ce qui correspond à une puissance optique collectée maximale de 32,5 mW. Nous avons rempli les canaux microfluidiques d'un fluorophore organique : la rhodamine 6G afin d'étudier la sensibilité de notre système. Comme on peut le voir sur la figure 11, on obtient une émission de fluorescence localisée au niveau de l'intersection entre le guide et le canal. Afin de bien visualiser les guides (Fig. 11a), nous n'utilisons pas de filtre optique. Sur la figure 11b), nous avons filtré la lumière laser excitatrice. Nous constatons qu'après filtration laser la lumière parasite détectée dans la figure 11a) a disparu confirmant qu'il n'y a pas d'autre source d'excitation que la lumière laser provenant du guide optique couplé au laser.

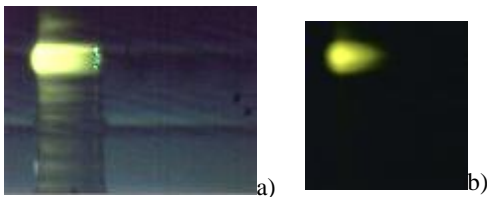


Figure 11 : Emission de fluorescence dans un canal microfluidique a) sans filtre optique. b) après filtration de la lumière laser.

Pour permettre la distribution de la lumière laser sur les microsystèmes, afin d'exciter différentes régions ou différents canaux simultanément, l'IMEP-INPG a réalisé des guides possédant une jonction en Y (Fig. 12). Le pied du Y étant couplé avec un laser fibré pour permettre une distribution guidée de la

source laser. Les tests de caractérisation sont présentés dans la figure 12 dans laquelle nous visualisons une émission localisée de la fluorescence en différents points du substrat.

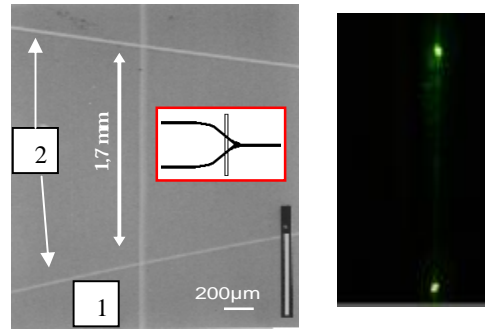


Figure 12 : Géométrie de la structure et émission de fluorescence localisée. 1 : canal de séparation ; 2 : branches de la jonction Y.

4.2 Les caractérisations microfluidiques

4.2.1 Les courbes de calibration

Un des objectifs de ce projet est de pouvoir détecter et quantifier de faibles quantités de marqueurs cancéreux, afin de comparer les niveaux d'expression obtenus avec ceux attendus chez un patient sain. La loi de Beer-Lambert, décrit une relation de proportionnalité entre l'intensité de la fluorescence émise et la concentration de l'échantillon en solution. Afin d'établir une courbe de calibration pour étalonner notre système, nous avons testé différentes concentrations de rhodamine et mesuré l'intensité de la fluorescence émise. Ces tests ont été réalisés sur les deux configurations présentées préalablement. Nous obtenons une croissance du signal proportionnelle à l'augmentation de la concentration en rhodamine dans les deux configurations testées. Il sera donc possible de quantifier la concentration de marqueurs cancéreux en fonction de l'intensité de la fluorescence acquise. Les résultats obtenus nous ont également permis de tester les limites de sensibilité de notre système. Nous avons détecté 200 pmol/L de rhodamine dans la configuration perpendiculaire contre 500 nmol/L dans la configuration parallèle. Cette différence est due au fait qu'il est difficile de s'affranchir des signaux parasites provenant de la source d'excitation dans la configuration parallèle, provoquant un bruit de fond élevé. Les résultats obtenus dans la configuration perpendiculaire sont comparables aux résultats obtenus par d'autres groupes et ce, même si la sensibilité de notre photodétecteur est bien plus faible que celle des photomultiplicateurs utilisés par d'autres [Hubner, 2001]. Ces résultats sont reproductibles sur plusieurs jours et sur plusieurs substrats.

4.2.2 La manipulation de fluide

Nous avons commencé par manipuler des fluides simples (tampon) contenant des molécules organiques (rhodamine 6G), puis biologiques (Streptavidine). Les séquences électriques, sont programmées à l'aide d'un générateur haute tension de 3000V possédant 8 voies indépendantes. Ce générateur fonctionne avec de très faibles intensités pour limiter les échauffements au sein des canaux microfluidiques. Pour s'assurer du bon fonctionnement des séquences électriques, nous visualisons la fluorescence émise à l'aide d'une caméra numérique. Pour faciliter la visibilité, nous utilisons 20 $\mu\text{mol/L}$ de rhodamine 6G. Les tensions électriques sont acheminées jusqu'aux réservoirs des laboratoires sur puce par des électrodes en platine. La rhodamine étant chargée positivement, elle possède une mobilité électrophorétique qui va la déplacer dans le sens du champ électrique. Afin de pouvoir contrôler le volume d'échantillon injecté dans le canal de séparation, nous avons mis au point une séquence électrique d'injection adaptée. Une représentation schématisée (Fig. 13a), modélisée (Fig. 13b) de cette injection ainsi qu'une photo (Fig. 13c) de l'injection réalisée sur nos dispositifs, sont présentées ci-dessous :

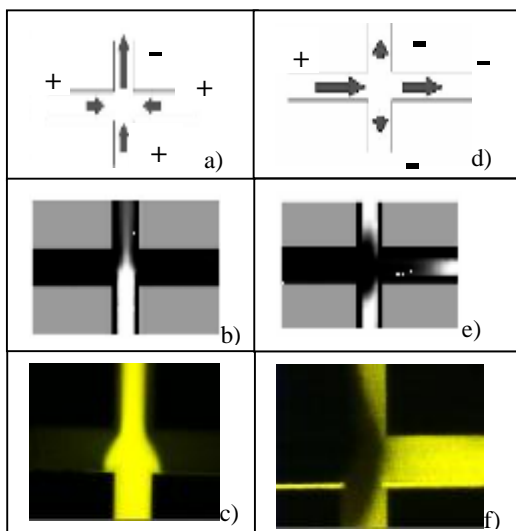


Figure 13 : Injection focalisée électriquement. a) schéma; b) modélisation ; c) résultats expérimentaux.

Séparation des constituants : d) schéma ; e) modélisation ; f) résultats expérimentaux.

L'étape suivante consiste à injecter l'échantillon présent au niveau de la jonction des canaux dans le canal de séparation. Cette séquence se fait en deux temps :

Ø Amorçage du segment présent à la jonction dans le canal de séparation. Et renvoi de la rhodamine en excès dans les réservoirs du canal d'injection.

Ø Migration de la rhodamine jusqu'à la zone de détection.

Le détail de cette séquence est schématisé (Fig. 13d), modélisé (Fig. 13e) et caractérisé (Fig. 13f).

Après migration dans le canal de séparation, le segment d'échantillon est capturé au niveau de la zone de détection par un photodétecteur. Le signal acquis par le photodétecteur est visualisé sous la forme d'un électrophérogramme dans lequel la molécule détectée se présente sous la forme d'une gaussienne plus ou moins large selon la complexité de l'échantillon analysé (Fig. 14).

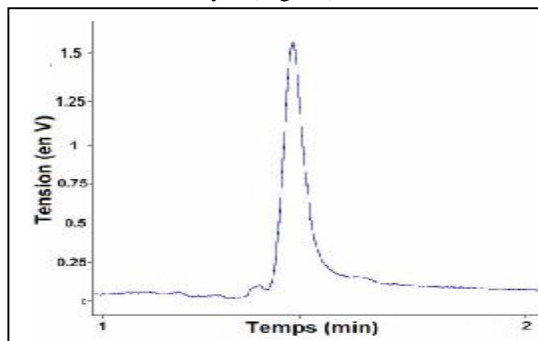


Figure 14 : Électrophérogramme obtenu pour 10 $\mu\text{mol/L}$ de streptavidine. Champ électrique appliqué : 230V/cm, longueur de séparation : 5cm.

5 L'ANALYSEUR

Le LEOM développe actuellement une unité de contrôle aux dimensions réduites qui intègre différents blocs fonctionnels réalisant les fonctions nécessaires à l'analyse. Une diode laser (Hamamatsu 635 nm, 20 mW) et son driver (Thorlabs) sont utilisés comme source d'excitation. Un photodétecteur avec son circuit d'amplification, capable de détecter une fluorescence de quelques pW, a été conçu au laboratoire. Le générateur haute tension étant remplacé par de petits modules hautes tensions (± 6000 volts) fournies par des convertisseurs DC/DC (EMCO). L'ensemble des blocs fonctionnels est piloté par un microcontrôleur (Microchip). Les informations acquises sont ensuite transmises à un ordinateur par un module USB et traitées à l'aide d'un logiciel d'acquisition, développé par le laboratoire sous LabVIEW®. Les cartes électroniques du premier prototype de l'unité de contrôle sont actuellement en tests (Fig. 15).



Figure 15 : Photo de l'unité de contrôle en test.

BIBLIOGRAPHIE

- [Becker, 2000] Becker, H., Gärtner, C. : « Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications ». *Electrophoresis*, 21, 1, 12-26 (2000).
- [Dou, 2004] Dou, Y.H., Bao, N., Xu, J.J., Meng, F., Chen, H.Y. : « Separation of proteins on surface-modified poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices ». *Electrophoresis*, 25, 17, 3024-3031 (2004).
- [Fister, 1998] Fister, J.C., Jacobson, S.C., Davis, L.M., Ramsey, J.M. : « Counting Single Chromophore Molecules for Ultrasensitive Analysis and Separations on Microchip Devices ». *Analytical Chemistry*, 70, 3, 431-437 (1998).
- [Gawron, 2001] Gawron, A.J., Martin, R.S., and Lunte, S.M. : « Microchip electrophoretic separation systems for biomedical and pharmaceutical analysis ». *European Journal of Pharmaceutic Science*, 14, 1, 1-12 (2001).
- [He, 2001] He, B., Burke, B.J., Zhang, X., Zhang, R., Regnier, F.E. : « A Picoliter-Volume Mixer for Microfluidic Analytical Systems ». *Analytical Chemistry*, 73, 1942-1947 (2001).
- [Hsiung, 2005] Hsiung, S.K., Lin, C.H., Lee, G.B. : « A microfabricated capillary electrophoresis chip with multiple buried optical fibers and microfocusing lens for multiwavelength detection ». *Electrophoresis*, 26, 6, 1122-1129 (2005).
- [Hübner, 2001] Hübner, J., Mogensen, K.B., Jorgensen, A.M., Friis, P., Telleman, P., Kutter, J.P. : « Integrated optical measurement system for fluorescence spectroscopy in microfluidic channels ». *Review of Scientific Instruments*, 72, 1, 229-233 (2001).
- [Jacobson, 1994] Jacobson, S.C., Hergenroder, R., Koutny, L.B., Ramsey, J.M. : « High-Speed Separations on a Microchip ». *Analytical Chemistry*, 66, 7, 1114-1118 (1994).
- [Kopf-Sill, 2002] Kopf-Sill, A.R. : « Successes and challenges of lab-on-a-chip ». *Lab on a Chip*, 2, 3, 42N-47N (2002).
- [Kou, 2004] Kou, Q., Yesilyurt, I., Studer, V., Belotti, M., Cambri, E., Chen, Y. : « On-chip optical components and microfluidic systems ». *Microelectronic Engineering*, 73-74, 876-880 (2004).
- [Lin, 2004] Lin, C.H., Lee, G.B., Fu, L.M., Chen, S.H. : « Integrated optical-fiber capillary electrophoresis microchips with novel spin-on-glass surface modification ». *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 1, 83-90 (2004).
- [Lin, 2003] Lin, C.H., Lee, G.B., Chen, S.H., Chang, G.L. : « Micro capillary electrophoresis chips integrated with buried SU-8/SOG optical waveguides for bio-analytical applications ». *Sensors and Actuators A*, 107, 2, 125-131 (2003).
- [Manz, 1990] Manz, A., Graber, N., Widmer, H.M. : « Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing ». *Sensors and Actuators B*, 1, 1-6, 244-248 (1990).
- [Martin, 2002] Martin, R.S., Ratzlaff, K.L., Huynh, B.H., Lunte, S.M., « In-Channel Electrochemical Detection for Microchip Capillary Electrophoresis Using an Electrically Isolated Potentiostat ». *Analytical Chemistry*, 74, 5, 1136-1143 (2002).
- [McCreedy, 2000] McCreedy, T. : « Fabrication techniques and materials commonly used for the production of microreactors and micro total analytical systems ». *Trends of Analytical Chemistry*, 19, 6, 396-401 (2000).
- [McIntosh, 2004] McIntosh, M.W., Drescher, C., Karlan, B., Scholler, N., Urban, N., Hellstrom, K.E., Hellstrom, I. : « Combining CA 125 and SMR serum markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma ». *Gynecologic Oncology*, 95, 9-15 (2004).
- [Mogensen, 2004] Mogensen, K.B., Klank, H., Kutter, J.P. : « Recent developments in detection for microfluidic systems ». *Electrophoresis*, 25, 3498-3512 (2004).
- [Park, 2003] Park, S.R., Swerdlow, H. : « Concentration of DNA in a Flowing Stream for High-Sensitivity Capillary Electrophoresis ». *Analytical Chemistry*, 75, 17, 4467-4474 (2003).
- [Schilling, 2002] Schilling, E.A., Kamholz, A.E., Yager, P. : « Cell Lysis and Protein Extraction in a Microfluidic Device with Detection by a Fluorogenic Enzyme Assay ». *Analytical Chemistry*, 74, 8, 1798-1804 (2002).
- [Tian, 2000] Tian, H., Jaquins-Gerstl, A., Munro, N., Trucco, M., Brody, L.C., Landers, J.P. : « Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis by Capillary and Microchip Electrophoresis: A Fast, Simple Method for Detection of Common Mutations in BRCA1 and BRCA2 ». *Genomics*, 63, 1, 25-34 (2000).
- [Vandaveer, 2002] Vandaveer IV, W.R., Pasas, S.A., Martin, R.S., Lunte, S.M. : « Recent developments in amperometric detection for microchip capillary electrophoresis ». *Electrophoresis*, 23, 21, 3667-3677 (2002).
- [Wan, 2003] Wan, X.S., Xu, Y.A., Ware, J.H., Kennedy, A.R., « Three Immunoassays Based on Monoclonal Antibodies Specific for Prostate Specific Antigen (PSA), α -1-Antichymotrypsin (ACT), and the PSA-ACTComplex ». *The Prostate*, 56, 131-141 (2003).
- [Webster, 2001] Webster, J.R., Burns, M.A., Burke, D.T., Mastrangelo, C.H. : « Monolithic Capillary Electrophoresis Device with Integrated Fluorescence Detector ». *Analytical Chemistry*, 73, 7, 1622-1626 (2001).
- [Woolley, 1996] Woolley, A.T., Hadley, D., Landre, P., DeMello, A.J., Mathies, R.A., Northrup, M.A. : « Functional Integration of PCR Amplification and Capillary Electrophoresis in a Microfabricated DNA Analysis Device ». *Analytical Chemistry*, 68, 23, 4081-4086 (1996).