



(12) **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(43) Date de publication:
17.02.2010 Bulletin 2010/07

(51) Int Cl.:
B01L 3/00 (2006.01) H01J 49/04 (2006.01)

(21) Numéro de dépôt: **09165545.6**

(22) Date de dépôt: **15.07.2009**

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL
PT RO SE SI SK SM TR**

(30) Priorité: **24.07.2008 FR 0855077**

(71) Demandeur: **COMMISSARIAT A L'ENERGIE
ATOMIQUE
75015 Paris (FR)**

(72) Inventeurs:
• **Sarrut, Nicolas**
38170, SEYSSINET-PARISSET (FR)
• **Constantin, Olivier**
38100, GRENOBLE (FR)

(74) Mandataire: **Ilgart, Jean-Christophe et al**
Brevalex
3, rue du Docteur Lancereaux
75008 Paris (FR)

(54) **Laboratoire sur puce comprenant un réseau micro-fluidique et un nez d'électronébulisation coplanaires**

(57) L'invention concerne un laboratoire sur puce comprenant une plaque support (46), au moins un réseau fluide formé dans une plaque fluide (51) fixée sur la plaque support, et une plaque capot (41) fixée sur la plaque fluide et recouvrant le réseau fluide. Le réseau fluide est connecté, à une première extrémité, à un orifice d'entrée permettant l'introduction d'un fluide à nébuliser et, à une deuxième extrémité, à une première

extrémité d'un canal de sortie (53) du fluide à nébuliser, formé dans la plaque fluide (51). La plaque fluide (51) se prolonge par un nez d'électronébulisation en forme de pointe (54) où la deuxième extrémité du canal de sortie constitue la sortie d'électronébulisation du laboratoire sur puce. La plaque capot (41) possède un prolongement en forme de pointe (45) formant plafond pour la partie du canal (53) située dans le nez d'électronébulisation.

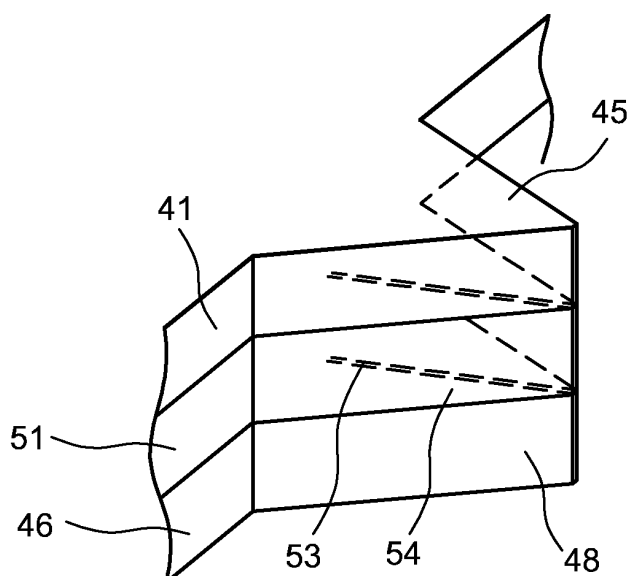


FIG. 6

Description

DOMAINE TECHNIQUE

[0001] L'invention se rapporte à un laboratoire sur puce comprenant un réseau micro-fluidique et un nez d'électronébulisation coplanaires. Elle concerne en particulier le couplage d'un laboratoire sur puce avec un spectromètre de masse.

[0002] Depuis une dizaine d'années, de nombreuses voies ont été explorées pour coupler différents dispositifs micro-fluidiques aux spectromètres de masse. En effet, les méthodes de détection optiques comme la spectrophotométrie ou la fluorescence ne sont pas adaptées à la détection de biomolécules comme les protéines ou les peptides, détection qui intéresse particulièrement le domaine de la protéomique. Les limites sont soit la sensibilité, soit la nécessité de préparer l'échantillon (marquage fluorescent), ce qui, dans le cas de l'identification de protéines après digestion enzymatique par exemple, présente un problème puisque les peptides obtenus ne sont a priori pas connus. La spectrométrie de masse est donc souvent retenue puisqu'elle donne des informations sur la nature des échantillons analysés (spectre d'intensité selon le rapport masse/charge) avec une très bonne sensibilité (femtomole/ μ l), et qu'elle permet d'analyser des mélanges complexes de molécules. Pour cela, il est souvent nécessaire qu'un pré-traitement de l'échantillon soit réalisé en amont de l'analyse. Par exemple, ce pré-traitement consiste en une séparation des composés chimiques et/ou biologique, précédée et/ou suivie d'une concentration des espèces.

[0003] Pour réaliser ce pré-traitement en continu avec l'analyse en un temps minimum et en minimisant les volumes de réactifs utilisés, les progrès récemment réalisés dans le domaine de la micro-fluidique peuvent être mis à profit. A titre d'exemples, des dispositifs micro-fluidiques de digestion enzymatique (Lian Ji Jin, "A microchip-based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping", Lab Chip, 2003, 3, 11-18), d'électrophorèse capillaire (B. Zhang et al., "Microfabricated Devices for Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry", Anal. Chem., vol. 71, n°15, 1999, 3259-3264) ou de séparation 2D (J.D. Ramsey, "High-efficiency Two dimensional Separations of Protein Digests on Microfluidic Devices", Anal. Chem., 2003, 75, 3758-3764 ou N. Gottschlich et al., "Two-Dimensional Electrophoresis / Capillary Electrophoresis on a Microchip", Anal. Chem. 2001, 73, 2669-2674) ont déjà été présentés.

[0004] Le couplage microfluidique / spectrométrie de masse peut reposer sur une technique d'ionisation de l'échantillon par électronébulisation ou électrospray (ou ESI pour ElectroSpray Ionization). A pression atmosphérique et plongé dans un champ électrique intense, l'échantillon liquide pré-traité sortant de la puce micro-fluidique est nébulisé en un gaz d'ions ou en une multitude de gouttelettes chargées pouvant entrer dans le spectromètre de masse (MS) pour analyse. Cette nébulisation passe par la déformation de l'interface formée entre le liquide sortant et le gaz environnant (ménisque liquide/gaz) et la « goutte » de liquide prend une forme conique appelée « cône de Taylor ». Le volume de ce cône constitue un volume mort pour le liquide sortant (espace géométrique dans lequel les composés chimiques peuvent se mélanger), ce qui n'est pas souhaitable, surtout quand la dernière étape du pré-traitement consiste justement en une séparation des composés chimiques de l'échantillon. C'est pourquoi on cherche toujours à minimiser la taille de ce cône, et cela passe entre autres par la réduction des dimensions intérieures et extérieures du canal de sortie de la puce micro-fluidique.

[0005] Classiquement, au cours d'une analyse par spectrométrie de masse, l'échantillon est pré-traité « hors dispositif ESI » puis placé manuellement (à la pipette) dans une aiguille creuse dont l'extrémité est électriquement conductrice (« PicoTip emitter » de New Objective par exemple). Un champ électrique est imposé entre la partie conductrice du PicoTip et l'entrée du MS, ce qui permet la formation d'un cône de Taylor à la sortie du PicoTip et la nébulisation de l'échantillon. La géométrie cylindrique « pointue » des PicoTip est idéale pour la formation d'un petit cône de Taylor, mais les limites sur la minimisation de leur taille (classiquement de diamètre extérieur 360 μ m et de diamètre intérieur 10 μ m), celles sur l'obtention d'une bonne reproductibilité par les techniques de fabrication utilisées (étirement) et leur fragilité à l'utilisation sont les principales raisons pour chercher à réaliser d'autres types de dispositifs de nébulisation.

[0006] Dans la littérature, lorsque ces dispositifs sont élaborés par des micro-technologies comme les technologies planes du silicium par exemple (gravure, usinages, dépôts en couches minces et photo-lithographie de matériaux divers sur des substrats présentant des dimensions latérales très grandes devant leur épaisseur), on parle souvent de « nez électrospray » (Tai et al., "MEMS electrospray nozzle for mass spectroscopy", WO-A-98/35376). L'enjeu de telles réalisations est double.

[0007] D'une part, les micro-technologies peuvent permettre de réaliser des interfaces ESI en définissant des structures de type pointe (comme les PicoTips) mais plus petites (pour limiter le volume du cône de Taylor), plus reproductibles et moins fragiles, ce qui présente un intérêt en soi (voir le document WO-A-00/30167).

[0008] D'autre part, les micro-technologies peuvent permettre de réaliser des dispositifs intégrant un réseau fluidique permettant d'assurer le pré-traitement de l'échantillon et une interface de type ESI. Outre les avantages précédemment cités (diminution des volumes morts de sortie, reproductibilité, robustesse de l'interface ESI), on bénéficie de ceux liés à un dispositif de pré-traitement intégré (protocole de pré-traitement en continu avec l'analyse, diminution des temps globaux d'analyse, minimisation des volumes de réactifs).

[0009] Néanmoins, une telle intégration pose trois problèmes majeurs de conception technologique :

- Premièrement, la technologie de réalisation du dispositif doit être compatible avec celle d'un réseau fluide de pré-traitement (réservoirs, micro-canaux, réacteurs...) et d'une interface ESI (géométrie en pointes, dimensions de sortie minimales...), et ce, pour permettre de réaliser le dispositif complet sur un même support ou un même ensemble de supports voyant un enchaînement technologique commun aux deux entités intégrées.
- En second lieu, elle doit être pensée pour ne pas rajouter de volume mort supplémentaire à ceux qui pourraient exister dans le réseau fluide de pré-traitement et dans l'interface ESI pris séparément.
- Enfin, elle doit fournir à l'interface ESI une électrode de nébulisation sans ajouter de volume mort au système. Cette électrode de nébulisation peut être localisée soit à l'extérieur de la structure en pointe (M.Svederberg et al., "Sheathless Electrospray from Polymer Microchips", Anal. Chem., 2003, 75, 3934-3940), soit à l'intérieur du canal de sortie et à proximité de la sortie du dispositif. Dans le premier cas, un champ électrique est imposé uniquement à l'extérieur du dispositif, dans la portion d'air (ou d'un autre gaz) située entre l'extrémité de la pointe et l'entrée du MS. Dans le second cas, un champ électrique existe aussi à l'intérieur du dispositif, dans le segment de liquide situé entre l'électrode et l'extrémité de la pointe. Pour l'implantation d'une électrode externe, il est souvent rapporté (R.B. Cole, "Electrospray ionization mass spectrometry : fundamentals, instrumentation and applications", John Wiley & Sons : New York, 1997) qu'une difficulté majeure est de lui assurer une robustesse suffisante. En effet, les dépôts conducteurs réalisés à cet effet se dégradent très souvent trop rapidement sous l'action des champs électriques intenses.

[0010] La plaque capot peut être électriquement conductrice.

ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTÉRIEURE

[0011] Une avancée majeure dans ce domaine a été proposée dans le document WO-A-2005/076 311 qui divulgue un dispositif micro-fluide permettant divers traitements d'échantillons et disposant d'une bonne interface avec un spectromètre de masse de type ESI, ce qui nécessite :

- Une technologie de réalisation compatible avec celle d'un réseau fluide de pré-traitement (réservoirs, micro-canaux, réacteurs...) et d'une interface ESI en sortie (géométrie en pointes, dimensions de sortie minimales...), et ce, pour permettre de réaliser le dispositif complet sur un même support ou un même ensemble de supports voyant un enchaînement technologique commun aux deux entités intégrées.
- Une conception d'intégration sans volumes morts.
- L'intégration d'une électrode de nébulisation à l'intérieur du canal de sortie et en proximité de la sortie du dispositif.

[0012] Ce laboratoire sur puce comprend un support, au moins un réseau fluide, au moins un orifice d'entrée de fluide relié au réseau fluide et au moins un orifice de sortie de fluide relié au réseau fluide. Il comprend une couche mince solidaire du support et dans laquelle sont réalisés le réseau fluide et un nez d'électronébulisation. Le nez d'électronébulisation est en surplomb par rapport au support et comprend un canal dont une extrémité est reliée au réseau fluide et dont l'autre extrémité constitue ledit orifice de sortie de fluide, le canal étant équipé de moyens de conduction électrique formant au moins une électrode.

[0013] Cependant, il a été constaté que le dispositif décrit dans le document WO-A-2005/076 311 présente un débit de la source d'électronébulisation limité à 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$. En effet, à ce débit, il se produit des débordements au niveau de la base de la source, c'est-à-dire au début du canal de sortie qui est à l'air libre.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

[0014] L'inventeur de la présente invention a étudié quelles pouvaient être les causes de cette limitation de débit et les possibilités d'y remédier. Il a découvert qu'en modifiant la partie source (ou nez) d'électronébulisation des différentes variantes du dispositif décrit dans le document WO-A-2005/076 311, il est possible d'obtenir des débits plus importants. Cette modification de la source ou nez d'électronébulisation consiste à « fermer » la source, soit en la recouvrant d'un « plafond », soit en lui fournissant à la fois un « plafond » et un « plancher ».

[0015] L'invention a donc pour objet un laboratoire sur puce comprenant une plaque support, au moins un réseau fluide formé dans une plaque dite plaque fluide fixée sur la plaque support, et une plaque, dite plaque capot, fixée sur la plaque fluide et recouvrant le réseau fluide, le réseau fluide étant connecté, à une première extrémité, à un orifice d'entrée permettant l'introduction d'un fluide à nébuliser et, à une deuxième extrémité, à une première extrémité d'un canal de sortie du fluide à nébuliser, formé dans la plaque fluide qui se prolonge par un nez d'électronébulisation en forme de pointe où la deuxième extrémité du canal de sortie constitue la sortie d'électronébulisation du laboratoire sur puce, la plaque capot possédant un prolongement en forme de pointe formant plafond pour la partie du canal située dans le nez d'électronébulisation.

[0016] Selon un mode particulier de réalisation, la plaque support possède un prolongement en forme de pointe

formant plancher pour la partie du canal située dans le nez d'électronébulisation. Selon une variante de mise en oeuvre, la deuxième extrémité du canal de sortie, constituant la sortie d'électronébulisation, est en retrait par rapport aux prolongements en forme de pointe formant plafond et plancher.

[0017] L'orifice d'entrée peut être un trou formé dans la plaque capot ou la plaque support.

[0018] La plaque capot peut être en silicium.

[0019] La plaque support peut comprendre, côté plaque fluide, une couche de protection apte à protéger le reste de la plaque support lors de la formation du réseau fluide dans la plaque fluide. La plaque fluide peut être en silicium. Dans ce cas, selon une variante de réalisation, la plaque fluide, la couche de protection et le reste de la plaque support proviennent respectivement de la couche mince, de la couche d'oxyde enterrée et du support d'un même substrat silicium-sur-isolant.

[0020] La plaque de capot peut être électriquement conductrice.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

[0021] L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins annexés parmi lesquels :

- la figure 1 est un schéma d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,
- la figure 2 représente la structure COMOSS d'un réacteur de digestion enzymatique utilisé dans le laboratoire sur puce de la figure 1,
- la figure 2A montre un détail de la figure 2,
- la figure 3 représente la structure COMOSS d'un réacteur de pré-concentration utilisé dans le laboratoire sur puce de la figure 1,
- la figure 3A montre un détail de la figure 3,
- la figure 4 représente la structure COMOSS d'un réacteur de chromatographie utilisé dans le laboratoire sur puce de la figure 1,
- la figure 4A montre un détail de la figure 4,
- les figures 5A à 5D sont des vues en coupe transversales d'une plaque capot en cours de fabrication,
- la figure 5D' est une vue en perspective de la plaque capot en cours de fabrication,
- les figures 5E à 5G sont des vues en coupe transversale d'une plaque support en cours de fabrication,
- la figure 5F' est une vue en perspective de la plaque support en cours de fabrication,
- la figure 5H est une vue en coupe transversale de l'assemblage d'une plaque support et d'une plaque fluide,
- les figures 5I à 5K sont des vues en coupe transversale de l'assemblage d'une plaque support et d'une plaque fluide, la plaque fluide étant en cours d'usinage,
- les figures 5L et 5M sont des vues en coupe transversale de l'assemblage de la plaque capot sur l'ensemble constitué par la plaque fluide sur la plaque support,
- les figures 5N et 5O sont des vues en coupe transversales illustrant les dernières étapes de fabrication d'un laboratoire sur puce selon un mode de réalisation de la présente invention,
- la figure 6 est une vue partielle et en perspective d'un laboratoire sur puce selon une première variante de l'invention,
- la figure 7 est une vue partielle et en perspective d'un laboratoire sur puce selon une deuxième variante de l'invention,
- les figures 8A à 8E illustrent une variante de réalisation d'un laboratoire sur puce selon l'invention, utilisant un substrat SOI.

EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS

[0022] La figure 1 est un schéma d'un laboratoire sur puce 1 auquel s'applique la présente invention. Ce dispositif peut avoir 18 mm de longueur sur 5 mm de largeur.

Le réseau fluide

[0023] On décrit d'abord le réseau fluide destiné à préparer un échantillon biologique complexe afin d'en identifier le contenu protéique. Ce réseau fluide est constitué d'un ensemble de réservoirs et de canaux, d'un réacteur de digestion enzymatique, d'un réacteur de pré-concentration et d'un réacteur de séparation par électro-chromatographie liquide. La structure de base de tous ces réacteurs est une cavité profonde munie d'un grand nombre de plots de section carrée ou hexagonale... Ce genre de structure est connue sous le nom de COMOSS (pour "Collocated MONolith Support Structures"). On peut se référer à ce sujet à l'article de Bing He et al. intitulé "Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography", Anal. Chem. 1998, 70, 3790-3797. Pour tous les réacteurs, on tire avantage des grands rapports surface/volume développés par ces structures COMOSS, rapports qui augmentent les probabilités de « rencontre »

entre les molécules des phases mobiles (protéines par exemple pour le réacteur de digestion enzymatique) et celles des phases stationnaires (trypsine par exemple pour le réacteur de digestion enzymatique).

[0024] Après pré-remplissage complet du réseau fluide par du tampon, l'échantillon biologique (protéine) est déposé dans le réservoir R1, puis pompé en électro-osmose du réservoir R1 vers le réservoir R2 à travers le réacteur de digestion enzymatique 2. Des réservoirs de grands volumes sont disposés entre les différents réacteurs du réseau fluide afin de permettre un changement de tampon entre deux étapes consécutives du protocole. Ainsi, R1 contient du bicarbonate d'ammonium ($[\text{NH}_4\text{HCO}_3]=25 \text{ mM}$; $\text{pH} = 7,8$), R2, R3 et R4 contiennent un mélange eau/acétonitrile ACN/acide formique TFA (95% ; 5% ; 0,1%), tandis que R5 contient un mélange eau/acétonitrile/acide formique (20% ; 80% ; 0,1%). Le digest récupéré dans le réservoir R2 doit être concentré avant séparation. Pour cela, il est pompé en électro-osmose vers le réservoir R3 (poubelle). L'ensemble des peptides résultant de la digestion enzymatique est alors « capté » par le réacteur de pré-concentration 3 de faible volume, d'où la concentration. Un gradient d'acétonitrile, réalisé par mélange du tampon de R4 et de celui de R5 dans la structure 4 de type « serpent » (2cm de longueur), vient ensuite décrocher sélectivement les peptides selon leur affinité avec la phase stationnaire (C18 par exemple) du réacteur de pré-concentration 3. Ceux-ci sont « captés » de nouveau par la colonne de chromatographie 5, plus dense que le réacteur de pré-concentration 3. L'enrichissement du mélange en ACN permet de nouveau de décrocher sélectivement ces peptides de la colonne de chromatographie 5, et de les emmener, séparés, vers la sortie 6 de la puce 1 où le liquide est nébulisé vers l'entrée d'un spectromètre de masse non représenté.

[0025] Un réacteur d'affinité à une protéine donnée (non représenté) peut servir à capter celle-ci dans un mélange multi-protéique véhiculé à travers ce réacteur. Pour cela, on peut intégrer en amont du réseau fluide décrit ci-dessus un ensemble réservoirs/réacteur d'affinité/réacteur de concentration fonctionnant selon les mêmes principes fluidiques que précédemment décrit. Le réacteur d'affinité peut être fonctionnalisé d'anticorps et le tampon d'élution peut être constitué de protéines concurrentes (vis-à-vis de l'anticorps) à celle qu'on souhaite « capter » dans le complexe multi-protéique.

✓ le réacteur d'affinité amont

[0026] De structure COMOSS, il est destiné à capter de manière spécifique une protéine, une famille de protéines, ou un complexe multi-protéique dans l'échantillon biologique complexe. Les outils utilisés pour cette étape peuvent être des anticorps, mais aussi par exemple des petites molécules qui ont une spécificité d'interaction avec la (les) protéine(s) recherchée(s).

✓ le réacteur de digestion enzymatique

[0027] La structure COMOSS du réacteur de digestion enzymatique, représenté à la figure 2, est réalisée à partir d'un ensemble de plots de section hexagonale de $10 \mu\text{m}$ permettant de définir un réseau de canaux d'environ $5 \mu\text{m}$. Sa largeur utile a est constante ($640 \mu\text{m}$), mais sa largeur réelle b fait $892 \mu\text{m}$. La longueur c de la partie active du réacteur fait 15 mm . Ses autres caractéristiques géométriques, à lire en parallèle avec la figure 2, sont décrites dans le tableau suivant :

Entité	Largeur des canaux (μm)	Murs de séparation (μm)
Canal de liaison	640	0
Etage 1	2*320	1*128
Etage 2	4*160	3*64
Etage 3	8*80	7*32
Etage 4	16*40	15*16
Etage 5	32*20	31*8
Etage 6	64*10	63*4

[0028] Cette structure permet éventuellement d'organiser des « billes » de silice de quelques micromètres (Billes Bangs Laboratories distribuées par Serotec France par exemple) fonctionnalisées (Trypsine par exemple) afin d'apporter au réacteur ses propriétés enzymatiques ou de les accroître.

[0029] A titre d'exemple, l'enzyme greffée sur les plots peut être de la trypsine. Le protocole utilisé est celui décrit dans le document FR-A-2 818 662.

[0030] La figure 2A montre un détail de la zone du réacteur référencée 11 sur la figure 2. On reconnaît les plots 12

de section hexagonale permettant de définir le réseau de canaux 13. La référence 14 désigne des billes de silice éventuellement utilisées.

✓ le réacteur de pré-concentration

[0031] La structure COMOSS du réacteur de pré-concentration, représenté à la figure 3, est réalisée à partir d'un ensemble de plots de section carrée de 10 μm permettant de définir un réseau de canaux d'environ 2 μm . Sa largeur utile d est constante (160 μm), mais sa largeur réelle e fait 310 μm . La longueur f de la partie active du réacteur fait 170 μm . Ses autres caractéristiques géométriques, à lire en parallèle avec la figure 3, sont décrites dans le tableau suivant :

Entité	Largeur des canaux (μm)	Murs de séparation (μm)
Canal de liaison	160	0
Etage 1	2*80	1*80
Etage 2	4*40	3*40
Etage 3	8*20	7*20
Etage 4	16*10	15*10

[0032] Cette structure permet éventuellement d'organiser des billes de silice fonctionnalisées afin d'apporter au réacteur ou d'en accroître ses propriétés d'affinité (greffage C18 par exemple).

[0033] La figure 3A montre un détail de la zone du réacteur référencée 21 sur la figure 3. On reconnaît les plots 22 de section carrée permettant de définir le réseau de canaux 23.

✓ le réacteur de séparation par électro-chromatographie liquide

[0034] La structure COMOSS du réacteur de séparation, représenté à la figure 4, est réalisée à partir d'un ensemble de plots de section carrée de 10 μm permettant de définir un réseau de canaux d'environ 2 μm . Sa largeur utile g est constante (160 μm), mais sa largeur h réelle fait 310 μm . La longueur i de la partie active du réacteur fait 12 mm. Ses autres caractéristiques géométriques, à lire en parallèle avec la figure 4, sont décrites dans le tableau suivant :

Entité	Largeur des canaux (μm)	Murs de séparation (μm)
Canal de liaison	160	0
Etage 1	2*80	1*80
Etage 2	4*40	3*40
Etage 3	8*20	7*20
Etage 4	16*10	15*10

[0035] Pour un gain de place, le réacteur peut être réalisé en trois parties de 12 mm de longueur chacune comme le montre la figure 1.

[0036] Cette structure permet éventuellement d'organiser des billes de silice fonctionnalisées afin d'apporter au réacteur ou d'en accroître ses propriétés d'affinité (greffage C18 par exemple).

[0037] La figure 4A montre un détail de la zone du réacteur référencée 31 sur la figure 4. On reconnaît les plots 32 de section carrée permettant de définir le réseau de canaux 33.

La source d'électronébulisation

[0038] On va maintenant décrire en détail un mode de réalisation de la présente invention.

[0039] Une configuration privilégiée est basée sur la mise en mouvement des liquides à nébuliser par hydrodynamique grâce à des pompes haute pression, et non par électroosmose. Il en résulte une omission de certaines des électrodes nécessaires au dispositif divulgué par le document WO-A-2005/076 311. L'électrode nécessaire à une mise à un potentiel donné du liquide à nébuliser est par exemple constituée par le capot choisi en matériau électriquement conducteur. Une variante consiste à choisir un capot électriquement isolant, de même de la plaque fluide et la plaque support. Ceci peut être obtenu par oxydation thermique dans le cas où ces plaques sont en silicium. Dans ce cas, le potentiel électrique

peut être imposé grâce à une jonction liquide disponible dans le commerce, disposée à l'entrée du dispositif, au niveau de sa connexion avec le capillaire d'entrée.

[0040] Un mode de réalisation avantageux de la présente invention repose sur la structuration et l'assemblage de trois plaques de silicium (une plaque support, une plaque fluide et une plaque capot), et leur amincissement par polissage chimico-physique et par gravure DRIE (pour « Dry Reactive Ion Etching »). L'assemblage des plaques peut avantageusement être réalisé par scellement direct, encore appelé scellement moléculaire (ou « wafer bonding » en anglais).

[0041] La réalisation du réseau fluide dans la plaque fluide ne sera pas détaillée dans la suite de la description. On pourra se reporter pour sa réalisation au document WO-A-2005/076 311. Dans l'exemple de réalisation qui va être décrit, le réseau fluide est coplanaire au canal de la source ESI, permettant un couplage sans volume mort (pas de virage, pas de restriction de section, ...). Le réseau fluide peut être principalement constitué de canaux de section carrée et de dimensions $15\text{ }\mu\text{m} \times 15\text{ }\mu\text{m}$.

[0042] La filière technologique mise en oeuvre utilise des plaques de silicium de 200 mm de diamètre pour réaliser une pluralité de dispositifs. Les dimensions de ces plaques sont données à titre d'exemple de même que leur épaisseur et leurs propriétés.

[0043] Les figures 5A à 5D sont des vues en coupe transversale d'une plaque capot en cours de fabrication, la coupe étant faite selon l'axe longitudinal de la plaque. La figure 5D' est une vue en perspective de la plaque capot à ce stade de la réalisation.

[0044] La figure 5A montre une fraction (correspondant à un capot du dispositif) d'une plaque de silicium 41 de 200 mm de diamètre, polie sur une face et de conductivité électrique comprise entre 0,01 et 0,02 $\Omega\cdot\text{cm}$. La face polie de la plaque 41 est recouverte d'une couche d'oxyde de silicium 42 de $2,5\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur formée par PECVD (pour « Physical Enhanced Chemical Vapor Deposition »). Cette couche d'oxyde servira de masque de gravure.

[0045] Le masque de gravure est ensuite structuré par photo-lithographie. Pour cela, on dépose une couche de résine 43 qui est ensuite photo-lithographiée (voir la figure 5B). La lithographie définit un motif dans la couche de résine 43 laissant apparaître la couche d'oxyde 42. La résine est ensuite retirée. Puis un trou borgne 44, destiné à constituer l'orifice d'entrée du dispositif, est formé dans la plaque 41 par gravure DRIE. Le même masque et la même gravure provoquent la définition et la gravure de la partie droite de la plaque capot pour créer, dans la partie supérieure de la plaque capot 41, et dans son axe longitudinal, un prolongement en forme de pointe 45. La profondeur de gravure est par exemple de $170\text{ }\mu\text{m}$.

[0046] Le masque d'oxyde est ensuite retiré. On obtient alors (voir la figure 5D) une plaque partiellement gravée d'un trou d'entrée fluide 44 et d'un prolongement en forme de pointe 45 qui est une partie de la source ESI.

[0047] La figure 5D' est une vue en perspective correspondant à la vue en coupe transversale de la figure 5D et qui permet de mieux voir le prolongement en forme de pointe 45.

[0048] Les figures 5E à 5G sont des vues en coupe transversale d'une plaque support en cours de fabrication, la coupe étant faite selon l'axe longitudinal de la plaque. La figure 5F' est une vue en perspective de la plaque support.

[0049] La figure 5E montre une fraction (correspondant à un support du dispositif) d'une plaque de silicium 46 de 200 mm de diamètre, polie sur ses deux faces et de $550\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur. L'une des faces de la plaque 46 est recouverte d'une couche d'oxyde de silicium 47 de $2,5\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur formée par PECVD. Cette couche d'oxyde servira de masque de gravure.

[0050] Le masque de gravure est ensuite structuré par photo-lithographie. Pour cela, on dépose une couche de résine qui est ensuite photo-lithographiée. La lithographie définit, après retrait de la résine et gravure DRIE de la partie droite de la plaque support 46, et dans son axe longitudinal, un prolongement en forme de pointe 48. Ce prolongement est mieux visible sur la figure 5F'.

[0051] La plaque 46 est ensuite oxydée thermiquement pour fournir des couches d'oxyde 49 et 50 sur chaque face de la plaque 46. La couche d'oxyde 49 se forme bien sûr également sur les parties gravées de la plaque 46, situées en contrebas du prolongement en forme de pointe 48 (voir la figure 5F'). L'épaisseur de ces couches d'oxyde 49 et 50 peut être de $1,5\text{ }\mu\text{m}$. Ces couches d'oxyde serviront de couches d'arrêt de gravure pour une étape ultérieure de gravure de la plaque fluide (voir la figure 5G).

[0052] La figure 5H est une vue en coupe transversale de l'assemblage de la plaque support et de la plaque fluide (en fait de la plaque destinée à constituer la plaque fluide), la coupe étant faite selon l'axe longitudinal de ces plaques. Cette figure montre une fraction des plaques assemblées (correspondant à un dispositif). Une plaque dite fluide 51 en silicium de 200 mm de diamètre et de $550\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur est fixée, par l'une de ses faces qui est polie, sur la plaque support 46. La fixation se fait par scellement moléculaire, la fixation se faisant du côté du prolongement en forme de pointe 48.

[0053] La plaque fluide 51, fixée sur la plaque support 46, est ensuite amincie, par polissage chimico-physique, jusqu'à obtenir son épaisseur prévue (par exemple $15\text{ }\mu\text{m}$). C'est ce que montre la figure 5I.

[0054] La plaque fluide amincie est ensuite structurée. Cette étape est représentée à la figure 5J. Pour cela, un masque de résine (d'épaisseur $1,5\text{ }\mu\text{m}$) est déposé sur la plaque fluide amincie 51 et photo-lithographié selon un

motif approprié. On réalise alors simultanément, dans la plaque fluidique 51, le réseau fluidique 52 et le canal 53 de la source ESI au moyen d'une gravure DRIE. La couche d'oxyde 49 du support sert de couche d'arrêt à la gravure. La même gravure permet d'obtenir, en partie droite de la plaque fluidique 51 et dans son axe longitudinal, un prolongement en forme de pointe 54, par exemple superposable au prolongement en forme de pointe 48 de la plaque support 46, ainsi

que le canal de sortie 53.

[0055] On procède ensuite à la formation d'une couche 55 d'oxyde de silicium sur la plaque fluidique structurée 51 (voir la figure 5K). L'épaisseur d'oxyde ainsi formé peut être comprise entre 0,1 et quelques μm .

[0056] Les figures 5L et 5M illustrent l'assemblage de la plaque capot sur la plaque fluidique. La plaque capot 41 (voir la figure 5D) et la plaque fluidique 51, qui est déjà scellée à la plaque support 46, sont alignées l'une au-dessus de l'autre comme le montre la figure 5L. Le prolongement en forme de pointe 45 de la plaque capot 41 est alors aligné avec les prolongements 54 de la plaque fluidique et 48 de la plaque support. La plaque capot 41 est alors fixée sur la plaque fluidique 51 par scellement moléculaire (voir la figure 5M). Les prolongements en forme de pointe 48, 54 et 45 sont donc superposés.

[0057] La plaque support 46 est alors amincie par polissage chimico-physique pour libérer le prolongement en forme de pointe 48. C'est ce que montre la figure 5N.

[0058] C'est ensuite au tour de la plaque capot 41 d'être amincie pour obtenir la libération du prolongement en forme de pointe 45 et pour obtenir l'accès au trou 44. Cette étape peut être réalisée par polissage chimico-physique à partir de la face libre de la plaque capot 41. Une gravure DRIE peut être pratiquée pour obtenir une bonne finition de l'ouverture du trou 44. La figure 5O montre le résultat obtenu.

[0059] La séparation des dispositifs en puces individuelles peut être obtenue par découpe, par clivage ou par cassure.

[0060] La figure 6 est une vue partielle et en perspective d'un laboratoire sur puce selon l'invention et obtenu par le procédé qui vient d'être décrit. Dans cet exemple de réalisation, les prolongements en forme de pointe 45 de la plaque capot 41, 54 de la plaque fluidique 51 et 48 de la plaque support 46 ont la même forme. Le canal 53 de la source ESI est donc pourvu, jusqu'à la sortie de la source, d'un plancher constitué par le prolongement 48 et d'un plafond constitué par le prolongement 45.

[0061] La figure 7 est une vue partielle et en perspective d'un autre laboratoire sur puce selon l'invention et obtenu par le procédé décrit. Dans cet exemple de réalisation, l'extrémité du prolongement en forme de pointe 54 de la plaque fluidique 51 est tronquée et est en retrait par rapport aux extrémités des prolongements en forme de pointe 45 de la plaque capot 41 et 48 de la plaque support 46. Cette géométrie de nez d'électronébulisation peut permettre une meilleure stabilité du cône de Taylor.

[0062] D'autres variantes que celles représentées sur les figures 6 et 7 sont possibles du moment que le prolongement en forme de pointe de la plaque capot continue de constituer un plafond pour le canal de sortie. Par exemple, l'extrémité du prolongement en forme de pointe de la plaque support peut être en retrait par rapport à l'extrémité du prolongement en forme de pointe de la plaque fluidique, qui peut elle-même être en retrait par rapport à l'extrémité du prolongement en forme de pointe de la plaque capot.

[0063] On va maintenant décrire un autre mode de réalisation de la présente invention, grâce à l'utilisation d'un substrat SOI disponible commercialement.

[0064] La figure 8A est une vue en coupe transversale d'un substrat SOI. Le traitement de cette plaque sera limité au cas d'un seul laboratoire sur puce par souci de simplification. Le substrat SOI 60 comprend un support 61 en silicium supportant successivement une couche d'oxyde de silicium enterrée 62 et une couche mince de silicium 63. Le substrat 60 peut avoir 200 mm de diamètre. La couche mince 63 peut avoir une épaisseur comprise entre quelques μm et quelques dizaines de μm . Sa face libre est polie. L'épaisseur de la couche d'oxyde peut être comprise entre 0,1 μm et 3 μm . L'épaisseur du support 61 peut être de plusieurs centaines de μm , par exemple 670 μm .

[0065] La couche superficielle de silicium 63 va être utilisée comme plaque fluidique. La figure 8B représente l'étape de structuration de la plaque fluidique. Un masque de résine (par exemple d'épaisseur 1,5 μm) est déposé sur la couche mince 63 et photo-lithographié selon le motif de réseau fluidique désiré. On réalise alors simultanément, dans la couche mince 63, le réseau fluidique 64 et le canal 65 de la source ESI au moyen d'une gravure DRIE. La couche d'oxyde enterrée 62 sert de couche d'arrêt à la gravure. La même gravure permet d'obtenir en partie droite de la couche mince 63 et dans son axe longitudinal, un prolongement en forme de pointe 66.

[0066] On procède ensuite à la formation d'une couche 67 d'oxyde de silicium sur la couche mince 63 structurée (voir la figure 8C). L'épaisseur d'oxyde ainsi formé peut être comprise entre 0,1 et quelques μm .

[0067] La plaque capot est réalisée comme pour le mode de réalisation précédemment décrit (voir les figures 5A à 5D). Elle est alors scellée sur l'élément montré à la figure 8C, en recouvrant le réseau fluidique. C'est ce que montre la figure 8D où la plaque capot structurée est référencée 68. La plaque capot 68 comprend le trou borgne 70, destiné à constituer l'orifice d'entrée du dispositif, et le prolongement en forme de pointe 71. Ensuite, une couche de SiO_2 est déposée sur la face inférieure du support.

[0068] On procède ensuite à une photo-lithographie à partir de la face inférieure de la plaque support. La couche d'oxyde déposée sur la face inférieure du support est gravée pour servir de masque et la couche de résine utilisée pour

cette photo-lithographie est retirée. On procède alors à une gravure DRIE du silicium de la plaque support 61 pour définir la pointe inférieure de la source ESI. Ensuite, la plaque support 61 est amincie par polissage chimico- physique. La figure 8E illustre le résultat obtenu. Elle montre le prolongement en forme de pointe 72 de la plaque support 61. La couche d'oxyde 62 est alors gravée au niveau de la source ESI pour donner à la face inférieure de la source son aspect définitif.

[0069] La plaque capot 68 est alors amincie pour obtenir la libération du prolongement en forme de pointe 71 et pour obtenir l'accès au trou 70. Cette étape peut être réalisée par polissage chimico-physique à partir de la face libre de la plaque capot 68, éventuellement suivi d'une gravure DRIE pour la finition. Le dispositif obtenu est alors similaire à celui illustré par la figure 5O.

[0070] L'utilisation d'un substrat SOI apporte comme avantage le fait que les plaques support et fluidique sont livrées scellées. Un scellement pleine plaque sans motifs garantit un meilleur rendement de scellement. Un autre avantage est constitué par le fait que le couple d'étapes lithographie/gravure DRIE, qui est le plus délicat à mettre en oeuvre pour la gravure du réseau fluidique, intervient en début de fabrication. Cela permet d'écarter le plus tôt possible les plaques défectueuses et donc d'augmenter le rendement final. L'utilisation d'un substrat SOI implique aussi un amincissement par gravure DRIE en moins.

Revendications

1. Laboratoire sur puce comprenant une plaque support (46, 61), au moins un réseau fluidique formé dans une plaque dite plaque fluidique (51, 63) fixée sur la plaque support, et une plaque, dite plaque capot (41, 68), fixée sur la plaque fluidique et recouvrant le réseau fluidique, le réseau fluidique étant connecté, à une première extrémité, à un orifice d'entrée (44, 70) permettant l'introduction d'un fluide à nébuliser et, à une deuxième extrémité, à une première extrémité d'un canal de sortie (53) du fluide à nébuliser, formé dans la plaque fluidique (51, 63) qui se prolonge par un nez d'électronébulisation en forme de pointe où la deuxième extrémité du canal de sortie constitue la sortie d'électronébulisation du laboratoire sur puce, **caractérisé en ce que** la plaque capot (41, 68) possède un prolongement en forme de pointe (45, 71) formant plafond pour la partie du canal située dans le nez d'électronébulisation.
2. Laboratoire sur puce selon la revendication 1, dans lequel la plaque support (46) possède un prolongement en forme de pointe (48) formant plancher pour la partie du canal située dans le nez d'électronébulisation.
3. Laboratoire sur puce selon la revendication 2, dans lequel la deuxième extrémité du canal de sortie, constituant la sortie d'électronébulisation, est en retrait par rapport aux prolongements en forme de pointe formant plafond (45) et plancher (48).
4. Laboratoire sur puce selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel ledit orifice d'entrée (44, 70) est un trou formé dans la plaque de capot ou la plaque support.
5. Laboratoire sur puce selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel la plaque capot est en silicium.
6. Laboratoire sur puce selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la plaque support (46) comprend, côté plaque fluidique, une couche de protection (49) apte à protéger le reste de la plaque support lors de la formation du réseau fluidique dans la plaque fluidique (51).
7. Laboratoire sur puce selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel la plaque fluidique (51) est en silicium.
8. Laboratoire sur puce selon les revendications 6 et 7 prises ensemble, dans lequel la plaque fluidique (63), la couche de protection (62) et le reste de la plaque support (61) proviennent respectivement de la couche mince, de la couche d'oxyde enterrée et du support d'un même substrat silicium-sur-isolant.
9. Laboratoire sur puce selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel la plaque capot est électriquement conductrice.

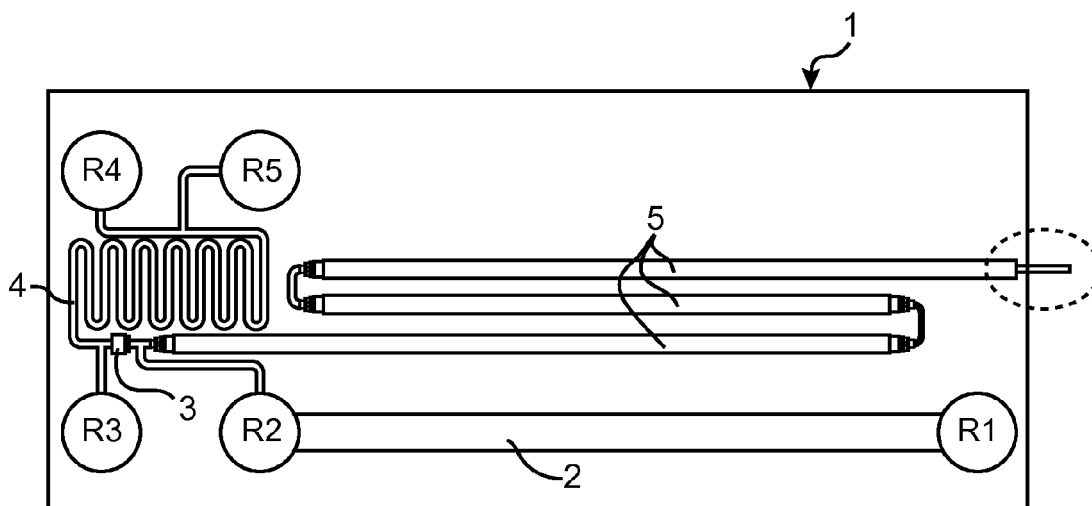


FIG. 1

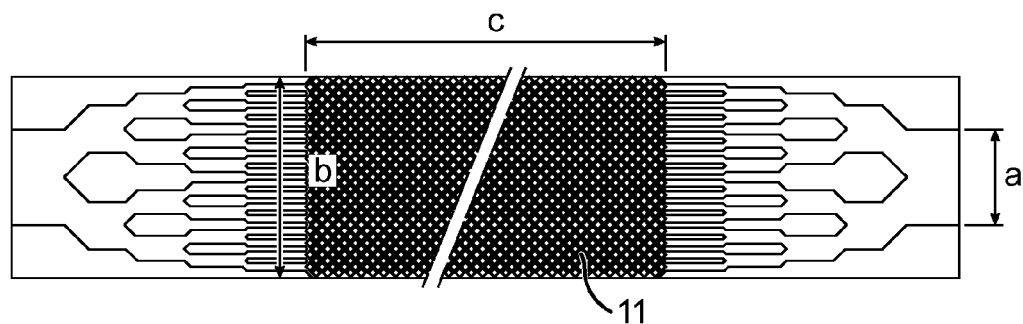


FIG. 2

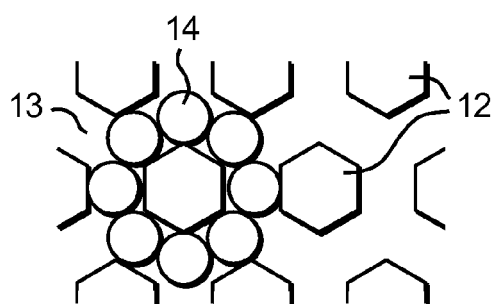


FIG. 2A

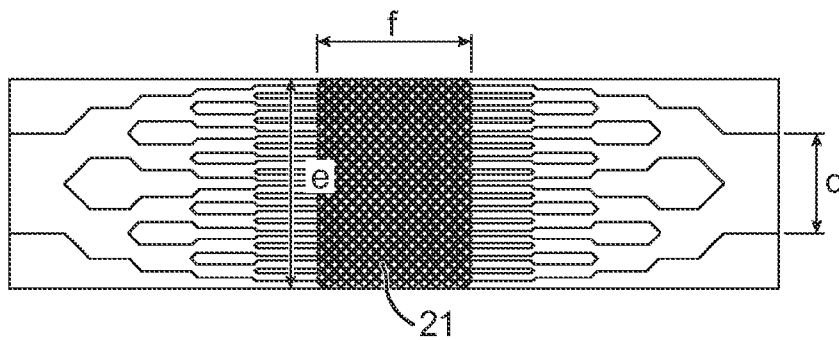


FIG. 3

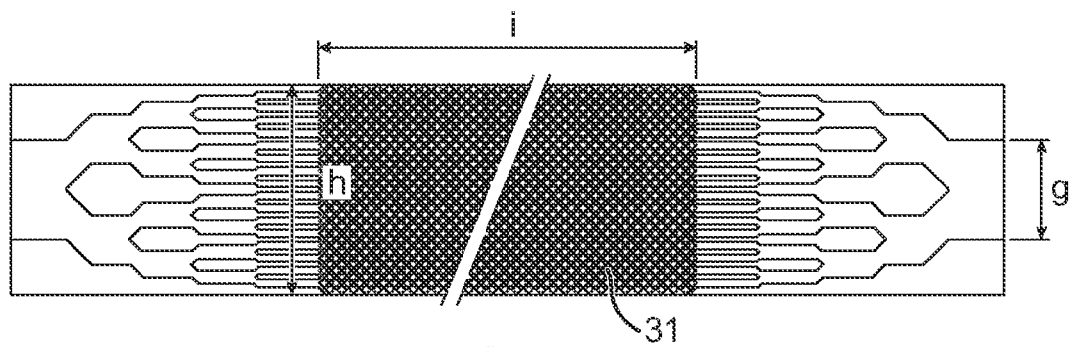
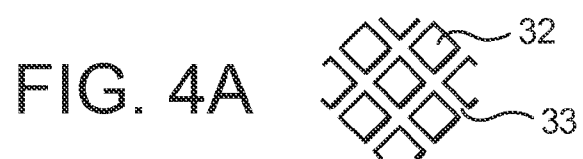


FIG. 4



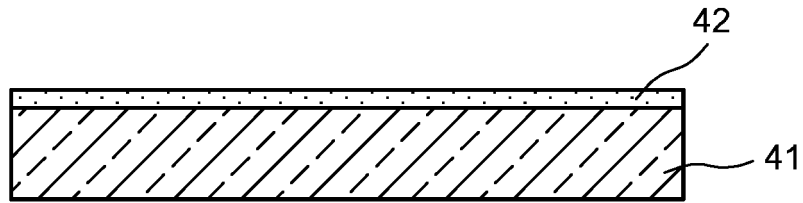


FIG. 5A

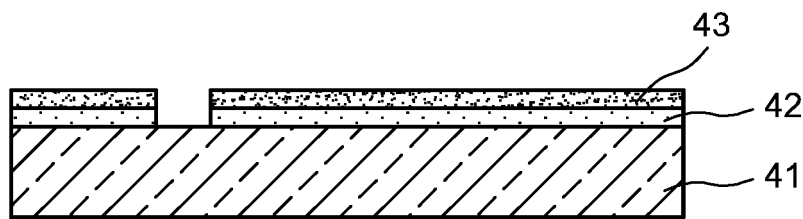


FIG. 5B

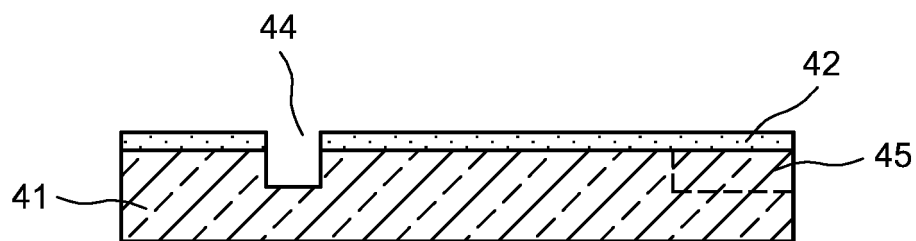


FIG. 5C

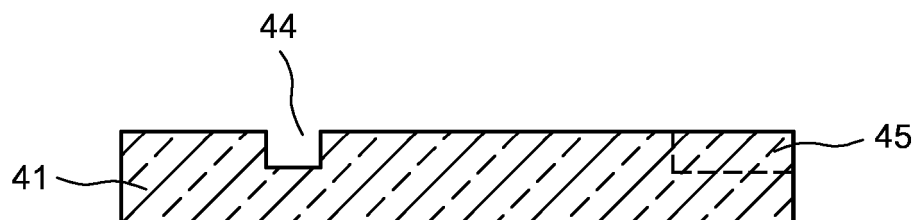
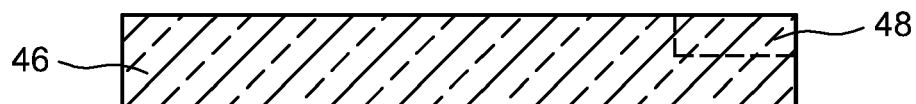
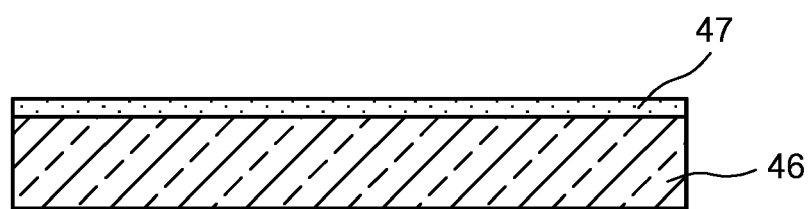
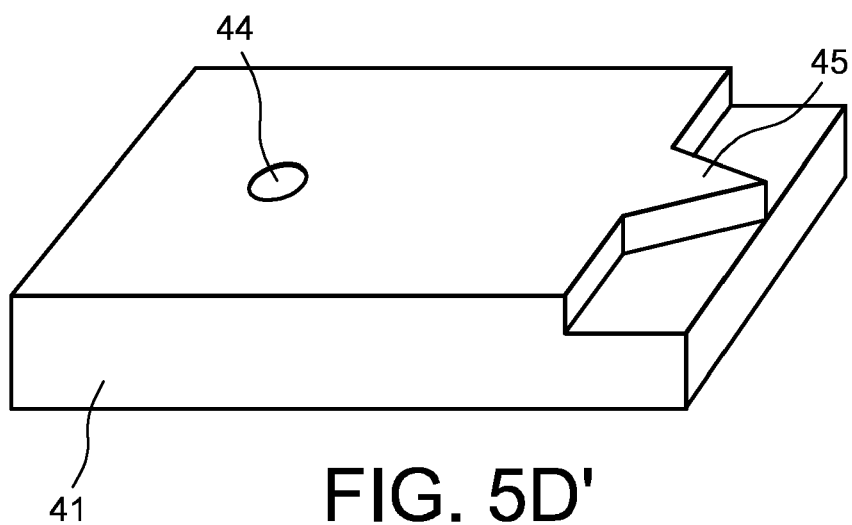
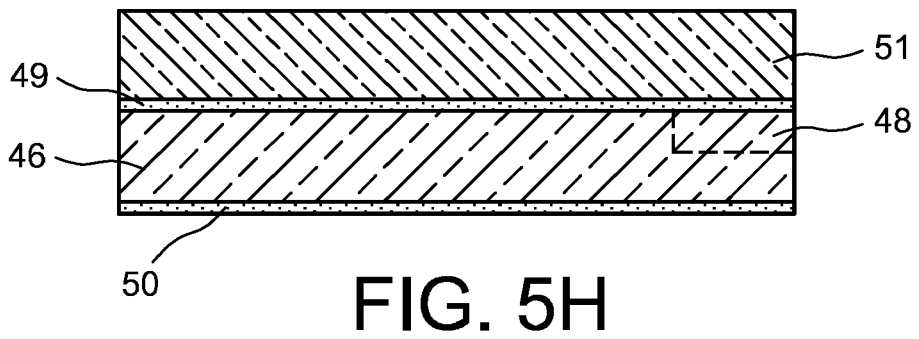
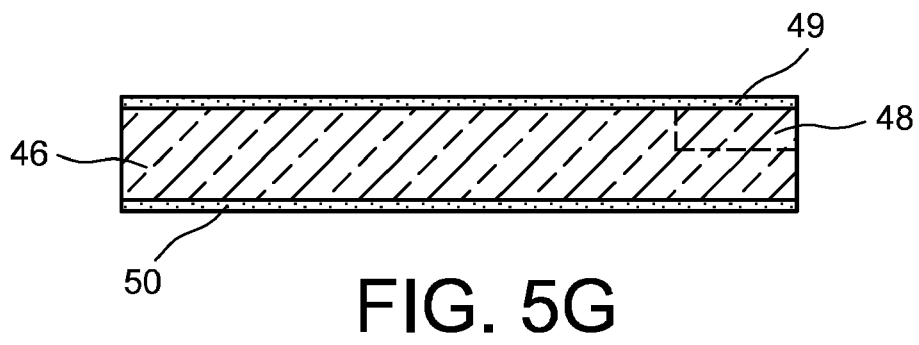
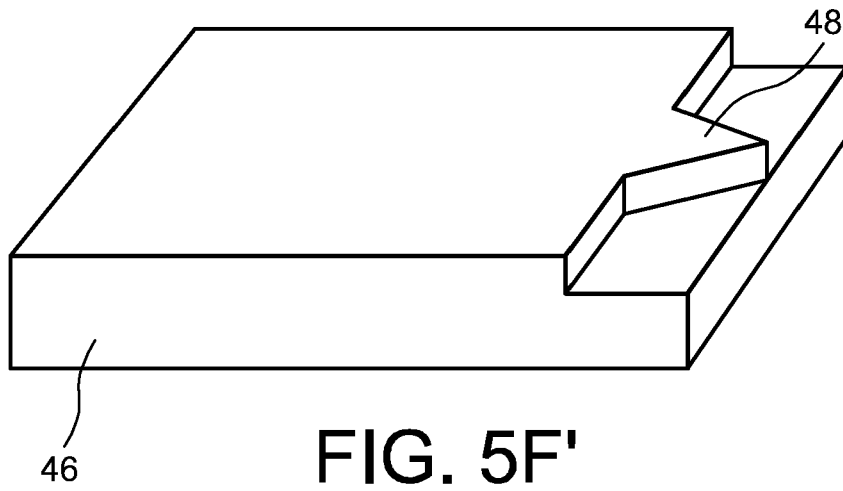


FIG. 5D





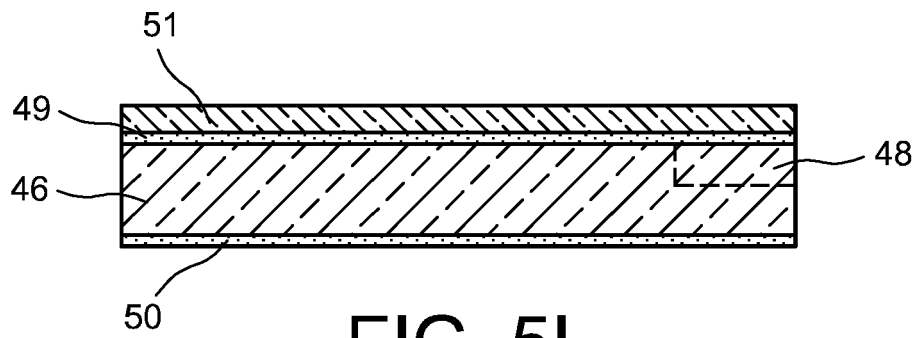


FIG. 5I

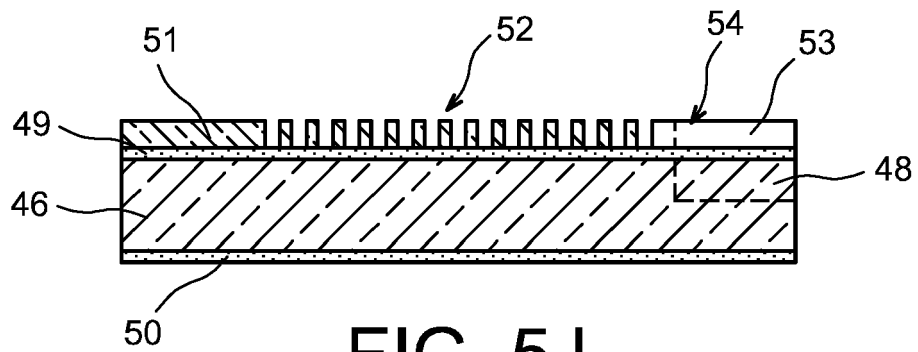


FIG. 5J

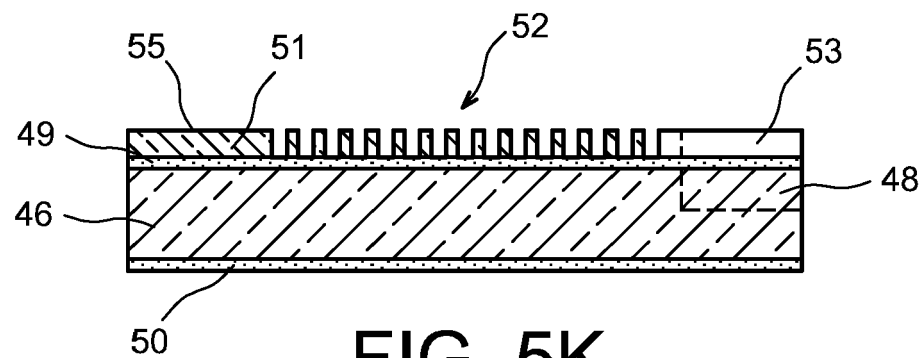


FIG. 5K

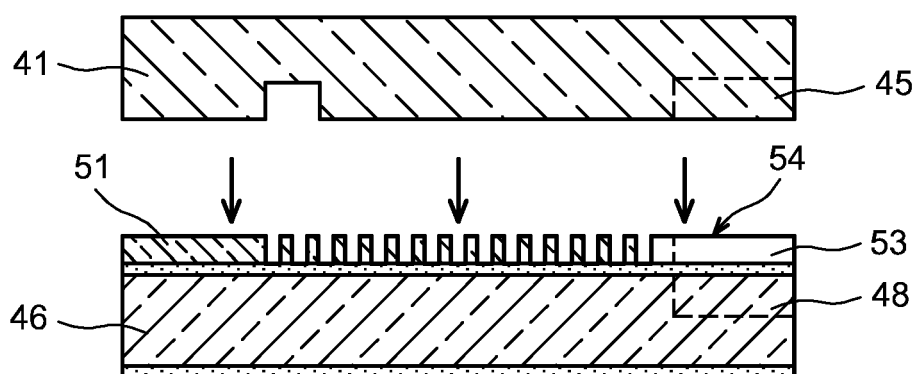


FIG. 5L

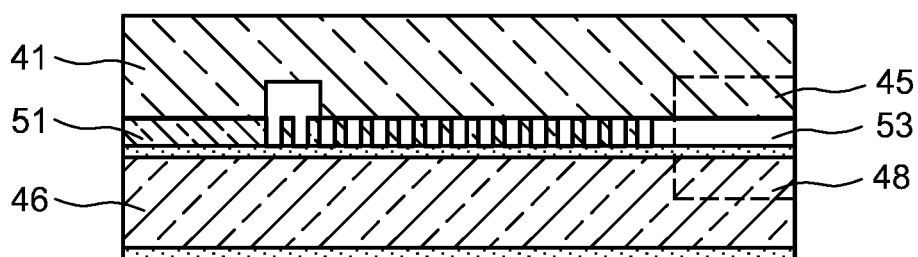


FIG. 5M

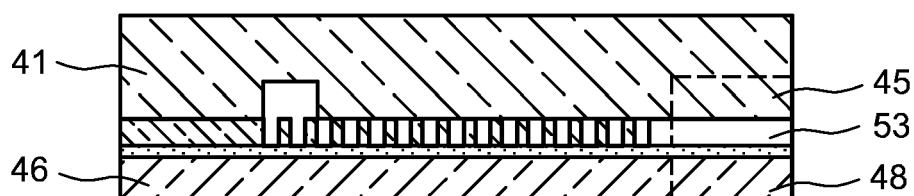


FIG. 5N

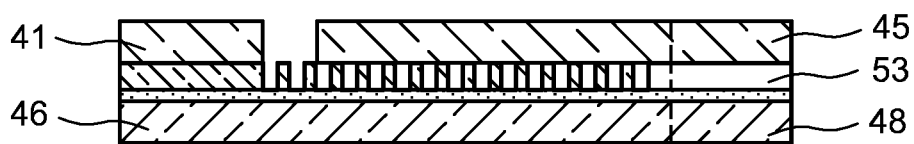


FIG. 50

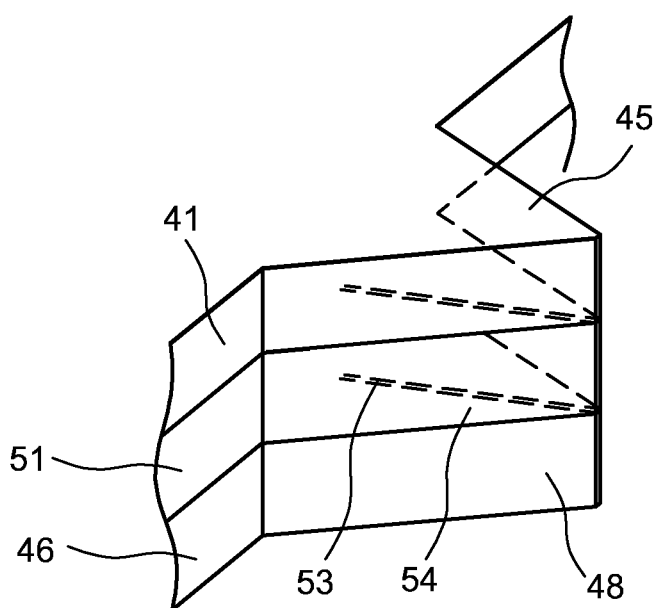


FIG. 6

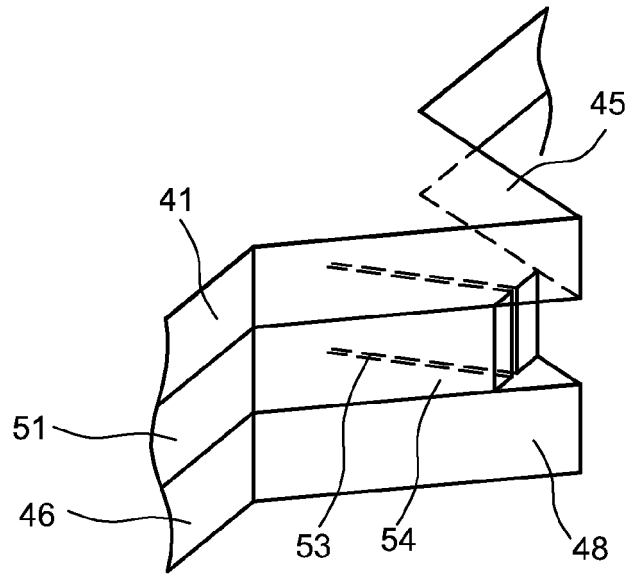


FIG. 7

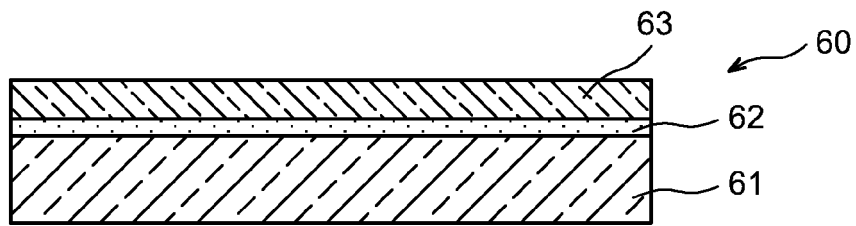


FIG. 8A

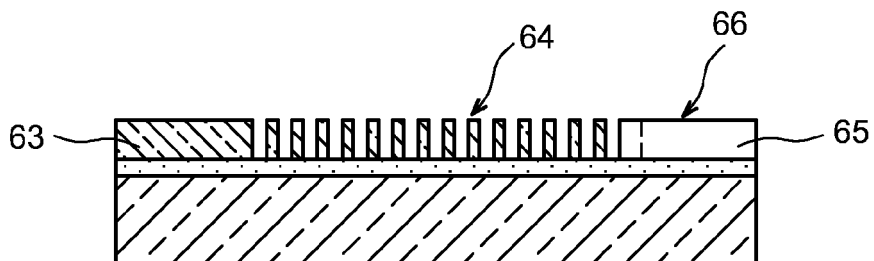


FIG. 8B

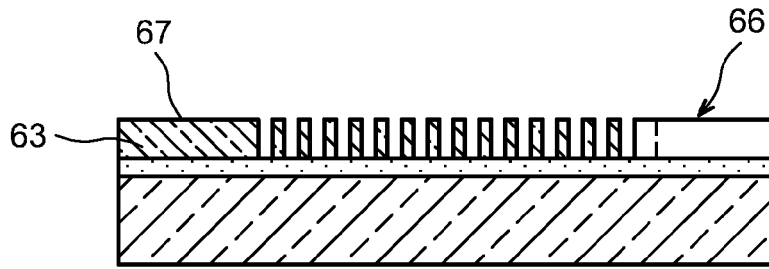


FIG. 8C

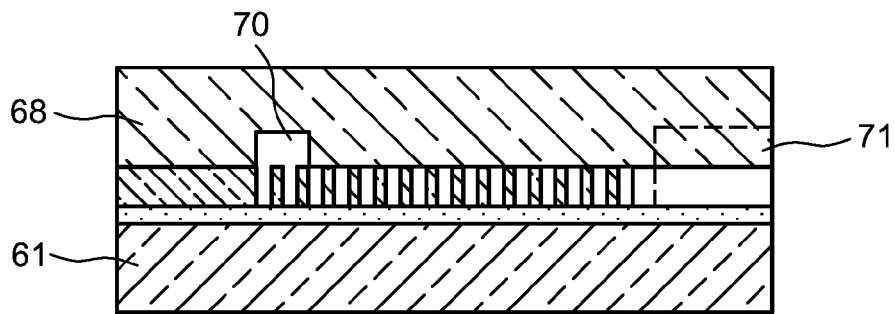


FIG. 8D

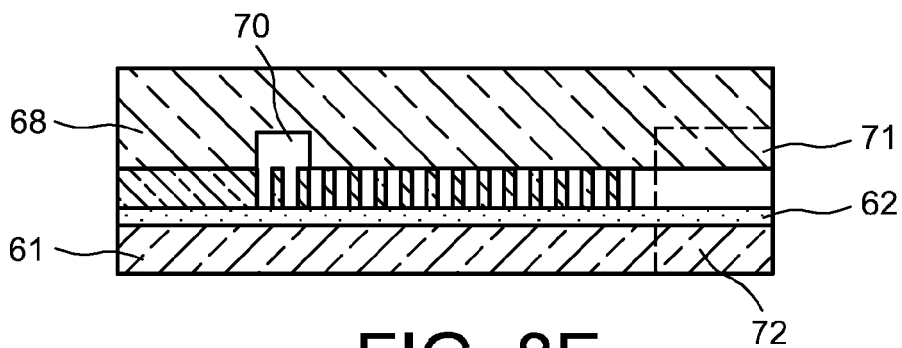


FIG. 8E



RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 09 16 5545

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X	FR 2 865 806 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 5 août 2005 (2005-08-05) * le document en entier *	1-9	INV. B01L3/00 H01J49/04
A	FR 2 862 007 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 13 mai 2005 (2005-05-13) * le document en entier *	1-9	
A	LICKLIDER L ET AL: "A MICROMACHINED CHIP-BASED ELECTROSPRAY SOURCE FOR MASS SPECTROMETRY" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 72, no. 2, 15 janvier 2000 (2000-01-15), pages 367-375, XP000954974 ISSN: 0003-2700 * le document en entier *	1-9	
A	ARSCOTT S ET AL: "Micromachined 2D nanoelectrospray emitter" ELECTRONICS LETTERS, IEE STEVENAGE, GB, vol. 39, no. 24, 27 novembre 2003 (2003-11-27), pages 1702-1703, XP006024462 ISSN: 0013-5194 * le document en entier *	1-9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) B01L H01J
A	XUAN-QI WANG ET AL: "Polymer-based electrospray chips for mass spectrometry" MICRO ELECTRO MECHANICAL SYSTEMS, 1999. MEMS '99. TWELFTH IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON ORLANDO, FL, USA 17-21 JAN. 1999, PISCATAWAY, NJ, USA, IEEE, US, 17 janvier 1999 (1999-01-17), pages 523-528, XP010321772 ISBN: 978-0-7803-5194-3 * le document en entier *	1-9	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche Munich		Date d'achèvement de la recherche 10 septembre 2009	Examineur Skowronski, Maik
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

2

EPO FORM 1503 03.82 (P04C02)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 09 16 5545

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche européenne visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

10-09-2009

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2865806	A	05-08-2005	EP	1711955 A1	18-10-2006
			WO	2005076311 A1	18-08-2005
			JP	2007519914 T	19-07-2007
			US	2007128078 A1	07-06-2007

FR 2862007	A	13-05-2005	EP	1714300 A1	25-10-2006
			WO	2005048291 A1	26-05-2005
			JP	2007510920 T	26-04-2007
			US	2007114385 A1	24-05-2007

EPO FORM P0480

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Documents brevets cités dans la description

- WO 9835376 A [0006]
- WO 0030167 A [0007]
- WO 2005076311 A [0011] [0013] [0014] [0039] [0041]
- FR 2818662 A [0029]

Littérature non-brevet citée dans la description

- **Lian Ji Jin.** A microchip-based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping. *Lab Chip*, 2003, vol. 3, 11-18 [0003]
- **B. Zhang et al.** Microfabricated Devices for Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 1999, vol. 71 (15), 3259-3264 [0003]
- **J.D. Ramsey.** High-efficiency Two dimensional Separations of Protein Digests on Microfluidic Devices. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, 3758-3764 [0003]
- **N. Gottschlich et al.** Two-Dimensional Electrochromatography / Capillary Electrophoresis on a Microchip. *Anal. Chem.*, 2001, vol. 73, 2669-2674 [0003]
- **M.Svederberg et al.** Sheathless Electrospray from Polymer Microchips. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, 3934-3940 [0009]
- **R.B. Cole.** Electrospray ionization mass spectrometry : fundamentals, instrumentation and applications. John Wiley & Sons, 1997 [0009]
- **Bing He et al.** Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 1998, vol. 70, 3790-3797 [0023]