

Les microsystemes en chimie

Séverine Le Gac et Christian Rolando

Summary

Microsystems in chemistry

The development of microsystems or "Lab-on-a-Chip" for both biological and chemical applications is a fast growing field due to the ability of these devices to perform a complex set of successive operations at a scale not easily handled by human experimenter. If few of these systems have reached the market nowadays, there are many public and industrial researchers working together on worldwide research programs. In this paper we first present the two microsystem archetypes, the microarrays and the microfluidic systems and some of their applications in chemistry and biology (chemical microarrays, chemical microreactors, DNA chips, microseparation...). Then, we review the main detection techniques (optical techniques, electrochemistry, electrochemiluminescence, mass spectrometry) that may be used for such applications and some of the technological materials and processes (glass, silicon, ceramics, polymers, etching, molding...) used for the fabrication of the microsystems. Finally, we present our project in microfluidics, which is lead at the USTL by three teams working in biology, mass spectrometry and microtechnology. It consists of a silicon microfluidic system dedicated to biological sample preparation before their analysis by ESI-MS; this microfluidic device contains different elementary modules such as an elution column, a novel internal non electrophoretic pump and an integrated ESI-nanoemitter. In complement to literature references, links to dedicated web sites are included.

Mots-clés

miniaturisation, microfluidique, microarrays, microréacteurs.

Key-words

miniaturization, microfluidics, microarrays, microreactors.

Les premiers outils de laboratoire miniaturisés et intégrés sur microsystemes sont en train d'arriver sur le marché pour satisfaire à la demande en analyses rapides et à haut débit induite par le développement de la chimie combinatoire, par le marché du diagnostic dans le domaine de la santé et par la pression toujours forte tendant à diminuer le coût des analyses. Des dispositifs visant à la mise en oeuvre de réactions chimiques et basés sur des principes similaires sont en cours de développement mais ne sont pas encore commercialisés.

Le préfixe « micro » caractérise les objets issus de procédés et techniques développés pour la microélectronique, qui ont des dimensions typiques de l'ordre du micron. Ces technologies permettent de concevoir des « laboratoires-sur-puce » (« lab-on-a-chip » en anglais) qui apparaissent comme les outils du XXI^e siècle, tant pour l'analyse que pour l'étude et la mise en oeuvre de réactions chimiques. L'intérêt majeur des microsystemes réside dans leur capacité à intégrer une série d'opérations sur une plaque de faibles dimensions. Les opérations sont plus rapides et un même dispositif rassemble plusieurs procédés identiques en parallèle. De plus, un tel système prend en charge toute une suite réactionnelle sans

intervention extérieure entre les différentes étapes. Les volumes de solvants sont réduits ; il en résulte, d'une part, une diminution du coût en consommables et, d'autre part, une pollution moindre. Le coût de l'appareillage est également réduit, car ces microsystemes peuvent être produits en masse. Enfin, les échantillons analysés sur microsystemes sont de taille réduite ; ces derniers sont donc adaptés à des applications biologiques. De plus, les opérations s'enchaînent sans intervention humaine, ce qui limite les pertes et contaminations des échantillons.

Quelques exemples de programmes

Ces avantages expliquent l'apparition de nombreux programmes de recherche en microfluidique de par le monde. Une agence au sein du Département de la Défense des États-Unis, le DARPA (Defense Advanced Research Projects Agency) s'intéresse au développement de puces fluidiques automatisées ; cette thématique de recherche a été initiée avec le projet « Microflumes » (microfluidic molecular systems), qui est maintenant achevé, et elle est poursuivie à travers le projet finalisé Bioflip [1-2]. Ces programmes consistent en la transposition des

protocoles et opérations de nature fluide, telles que des réactions chimiques et biochimiques, le transport, des synthèses, de l'échelle du laboratoire à celle d'un microsysteme. Ceci est envisageable par (i) le développement d'une méthode fiable permettant la manipulation de fluides à l'échelle de la puce et (ii) l'intégration de différentes briques (systèmes d'injection, de préparation, d'analyse et de détection de l'échantillon) automatisées. Ainsi, un seul microsysteme serait-il autonome pour mener différentes opérations de réaction, préparation et analyse. Le point fort de ces systèmes est que le simple réseau de canaux sert à la fois aux opérations de pompage, de mélange, au chauffage et au procédé de séparation. La clé de la réussite de ce type de projets réside dans la possibilité de travailler à des dimensions microscopiques et dans l'intégration de différents niveaux de contrôle grâce aux techniques de microfabrication.

La société DuPont cofinance en collaboration avec le DARPA et la « National Science Foundation » un programme de recherche portant sur des micro-réacteurs chimiques qui sont réalisés au sein des laboratoires du Massachusetts Institute of Technology (MIT) [3-4]. Un des objectifs de ce programme est de développer des microréacteurs chimiques pour la production « à la demande » et sur leur lieu d'utilisation, de produits chimiques toxiques et « à risques », ce qui entraîne, d'une part, une amélioration des conditions de sécurité en supprimant les étapes de transport et de stockage et, d'autre part, une diminution des risques potentiels d'accident. Ces microréacteurs sont réalisés sur des plaquettes de silicium et présentent des canaux sub-millimétriques, un système de chauffage et des détecteurs de température et de débit intégrés. L'utilisation de ces dispositifs va de pair avec un contrôle aisé des procédés et des réactions, un temps de réponse plus court et une plus grande flexibilité des opérations.

En France, le ministère de la Recherche a également lancé un programme sur les micro- et nanotechnologies, appelé « Réseau des Micro- et NanoTechnologies » ou RMNT, qui vise à promouvoir des projets de recherche dans ce domaine. L'an dernier, notre projet de « protéomique intégrée », qui sera présenté en détails à la fin de cet article, a été labellisé par ce réseau. Il fait partie d'un projet plus vaste qui s'inscrit dans le cadre du programme GenHomme proposé par les ministères de la Recherche et de l'Industrie, et qui regroupe le LETI, une équipe de CEA-SDV (Grenoble), la PME Osmooze spécialisée en microfluidique, ainsi que le groupe pharmaceutique français Sanofi-Synthelabo. Récemment, deux projets à dominante chimie/biologie ont été présentés au réseau RMNT (voir le site <http://www.rmnt.org>) : un projet de « biopuces à peptides » qui consiste en la fabrication d'une biopuce à peptides pour la détection sérologique d'infections virales, et un projet nommé « BiotOp » d'études et de développement d'une nouvelle filière technologique de

réalisation de support pour biopuces et de son instrumentation associée.

Par ailleurs, plusieurs grands congrès français ou européens consacrés aux micro- et nanotechnologies ont émergé ces dernières années ; parmi eux, Miniotech, qui a eu lieu cette année pour sa deuxième édition à Grenoble, IMRET, congrès franco-allemand dédié au domaine de la chimie et IEEE-EMBS qui s'intéresse aux microtechnologies dans le domaine de la biologie et de la santé.

Présentation des deux familles de microsystemes : les microarrays et les systèmes microfluidiques

Les microsystemes se présentent sous forme soit de microarrays (terme pour lequel il n'existe pas d'équivalent en français), soit de systèmes microfluidiques. Les microarrays correspondent aux procédés utilisés pour la réalisation de dispositifs du type des puces à ADN, applications les plus connues des microsystemes [5]. Des molécules-sondes sont immobilisées sur une plaque de verre ou de silicium dans des puits de 1 à 10 μm de diamètre ; elles servent de cibles d'hybridation ou d'interaction à des molécules à tester. La détection est le plus souvent effectuée par une méthode de fluorescence. Ces microarrays ont également trouvé des applications en chimie pour l'étude à haut débit de molécules chirales, que nous présenterons ultérieurement.

L'autre famille de microsystemes est de nature microfluidique. Dans ce cas, des canaux de 5 à 200 μm de largeur, des réservoirs ou des cellules de réaction, où circulent les fluides, sont gravés dans le matériau par des techniques de microtechnologie. Ces microsystemes incluent différents éléments correspondant chacun à une opération précise : digestion enzymatique, réaction chimique, hybridation sur anticorps, filtration, séparation... Le déplacement des fluides est assuré par un mode de pompage interne au microsysteme. La détection est réalisée soit sur la puce par électrochimie, soit par un appareil externe connecté au canal de sortie (fluorescence, spectrométrie de masse). Ces « laboratoires-sur-puce » sont utiles en chimie (analyse à haut débit, synthèse) et en biologie (analyse en génomique ou protéomique, manipulation de cellules). Des microsystemes mixtes combinant les deux aspects, microarray et microfluidique, sont en cours de développement.

Les microarrays

L'utilisation des microsystemes permet de réaliser des analyses à haut débit, du criblage de molécules. Ces analyses concernent surtout le domaine de la biologie, avec des analyses d'oligonucléotides et de peptides ou de protéines, par électrophorèse capillaire ou sur microarrays. Cependant, quelques exemples de chimie sont décrits dans la bibliographie, en particulier

pour la détermination post-synthèse d'excès énantiomériques.

Application biologique

Le développement des systèmes miniaturisés a commencé avec l'apparition des puces à ADN – ou microarrays – consacrées à l'analyse d'oligonucléotides ; elles ont véritablement révolutionné le domaine biomédical en permettant d'analyser l'expression de nombreux gènes dans des situations normales et pathologiques, en tirant parti du décryptage de génome humain. Récemment, ce même concept de microarrays a été étendu aux analyses protéomiques ; en effet, ces outils aideraient à la détermination d'interactions moléculaires (protéine/protéine, protéine/ligand, protéine/oligonucléotide, anticorps/antigène...) [6-7]. Or, une des étapes-clés dans le développement de ces dispositifs est la mise au point d'une chimie de surface adaptée, fiable, facile à mettre en œuvre et compatible avec une haute densité spatiale en sondes, et ce, quelle que soit l'application visée.

Ces puces sont fabriquées selon trois procédés différents : soit par « spotting » sur une matrice, soit par synthèse *in situ* des brins d'oligonucléotides ou encore par adressage par chemisorption. Cependant, de nombreux problèmes subsistent avec ces méthodes ; si les brins oligonucléotidiques sont trop longs, ils se replient et ont plusieurs points de contact avec le substrat ; s'ils sont trop courts, la densité est trop importante et la méthode de détection optique n'a pas une résolution suffisante. Ainsi, de nombreuses équipes travaillent-elles à l'élaboration de méthodes de couplage de sondes sur le substrat, verre ou silicium le plus souvent, et à une amélioration éventuelle des premiers systèmes décrits dans la littérature et commercialisés par quelques sociétés : Affymetrix, Biomérieux, Agilent Technologies...

Au congrès Minatec 2001, une équipe du CEA-Grenoble/Biomérieux a montré qu'un traitement approprié de la surface de la plaque de verre peut, par exemple, améliorer les conditions de détection et de lecture de fluorescence de la plaque, sans pour autant détériorer les conditions d'hybridation des brins d'oligonucléotides entre eux [8]. Au même congrès, Pompon *et al.* ont présenté une nouvelle génération de puces à ADN qui visent à modifier la nature des interactions établies entre les brins d'oligonucléotides greffés (ou sondes oligonucléotidiques) et la surface [9]. Sur la surface, une double couche (membrane artificielle) mimant les membranes cellulaires est reproduite. Par l'intermédiaire d'un atome de nickel, une protéine d'oxydo-réduction interagit avec cette pseudo-membrane. La dernière étape est la fixation des brins d'oligonucléotides modifiés *via* un bras espaceur sur la protéine redox. Ces nano-assemblages dynamiques ADN-protéines sont illustrés sur la *figure 1*. Les densités de greffage en chaque espèce ont été déterminées par la

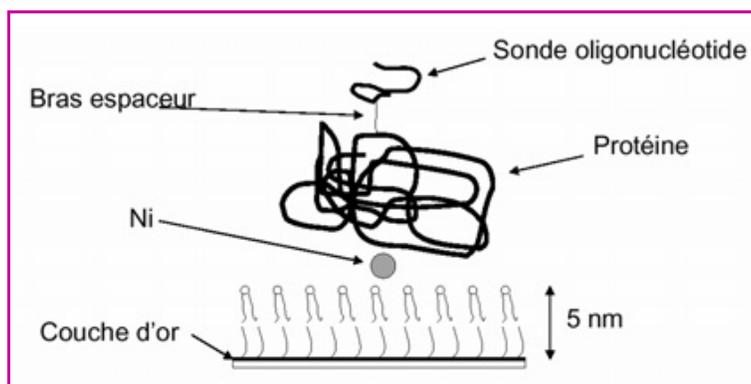


Figure 1 - Principe de nano-assemblages dynamiques ADN-protéine supportés sur membranes artificielles.

technique Biacore ; la densité en protéines (cytochrome c) est de 8 pmol/cm^2 de surface et ce couplage est réversible. Le taux de couverture en sondes d'oligonucléotides est de 1 pmol/cm^2 , ce qui limite les phénomènes de gêne stérique. La plaque est « lue » grâce à une technique de détection digitalisée ; une cellule se présente typiquement sous forme d'un carré de $10 \mu\text{m}$ de côté. Les avantages de ce système sont (i) le caractère réversible du couplage, (ii) la possibilité de contrôle de la densité en sondes, (iii) le mode de détection intrinsèque, (iv) la possibilité de réaliser plusieurs tests avec un seul dispositif et enfin, (v) la coopérativité thermodynamique qui apparaît lorsqu'un brin d'ADN est hybridé sur plusieurs sondes et qui interdit la dissociation du complexe Ni-protéine. Les puces sont recyclables par dissociation du complexe Ni-protéine par ajout d'une solution d'imidazole ou d'EDTA, puissants agents de complexation du nickel.

Gras Masse *et al.* (Institut Pasteur de Lille) se sont également intéressés à un nouveau procédé de fixation d'acides nucléiques sur un support *via* une liaison covalente [10]. Cette nouvelle technique de couplage conduit à l'obtention d'une liaison acide nucléique-support très stable, qui limite le clivage de la liaison établie entre l'acide nucléique et son support et qui permet la réalisation de puces à ADN réutilisables dans de nombreux cycles d'hybridation.

MacBeath *et al.* se sont intéressés à une méthode de couplage fiable pour des microarrays de détection d'interactions protéine/ligand (petites molécules organiques) [11]. La surface de verre est fonctionnalisée en deux étapes avec des groupements maléimide comme l'illustre la *figure 2*. Ces derniers sont ensuite exposés à de petites molécules organiques qui réagissent avec les fonctions maléimide *via* une réaction de Michael. Les groupements maléimide libres sont enfin bloqués au mercaptoéthanol ; la surface ainsi obtenue est ensuite testée avec différents échantillons de protéines couplées à un marqueur de fluorescence, qui sert lors de l'étape de détection. Ces dispositifs se présentent sous forme de plaques denses en spots de $200\text{-}250 \mu\text{m}$ de diamètre ; la densité spatiale est supérieure

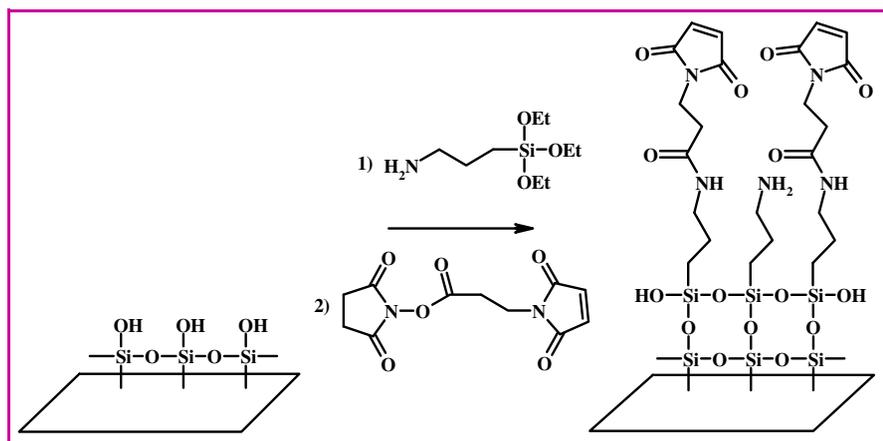


Figure 2 - Principe de la fonctionnalisation des plaques de verre avec des groupements maléimide.

à 1000 spots/cm². Les microarrays développés par MacBeath *et al.* présentent une distance inter-spots de 300 μm . Leur mise en œuvre nécessite des robots de haute précision capables de délivrer des volumes de l'ordre de 1 nL de solution.

Application chimique

Korbel *et al.* décrivent une adaptation des microarrays initialement développés pour l'ADN. Le rôle de ce dispositif est la détermination d'excès énantiomériques obtenus en sortie de synthèse organique [12]. Cette méthode, adéquate pour des évaluations à haut débit d'excès énantiomériques, s'est révélée fiable, sûre et rapide. La première étude de la méthode concerne des mélanges L et D d'acides aminés de synthèse.

La préparation de ces microarrays est résumée sur la figure 3. Le substrat initial est une plaque de verre greffée avec des fonctions $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ commercialisée par la société Corning pour la préparation de microarrays. Les fonctions amine réagissent dans un premier temps avec les acides aminés d'un mélange issu de synthèse (étape 1) ; leur fonction amine libre est protégée par un groupement Boc. Ensuite, les fonctions amine libres restant sur le substrat sont acétylées (étape 2), puis les acides aminés sont déprotégés par hydrolyse acide du groupement Boc (étape 3). Enfin, les acides aminés sont exposés à un mélange équimolaire de deux réactifs chiraux portant chacun un marqueur de fluorescence différent, Cy3 (vert) et Cy5 (rouge) ; la réaction d'amidation de couplage de ces réactifs sur les fonctions amine des acides aminés est stéréosélective. Une mesure de fluorescence aux longueurs d'onde d'émission des marqueurs permet de déterminer le ratio de fluorescence et donc le ratio d'énantiomères. Cette méthode a été testée sur six acides aminés, Gly, Ala, Leu, Val, Pro, Ser et Cys, dans des mélanges allant de 100 % L à 100 % D par saut de 10 %. Une analyse à haut débit

a été réalisée avec la proline (analyse de 15 550 échantillons en moins de 48 h). Une plaque de verre 25x75 mm peut contenir jusqu'à 75 000 échantillons sur des spots de 140 μm de diamètre, qui sont analysés à haut débit en un temps comparable.

Microréacteurs chimiques

Outre des systèmes de séparation ou d'analyse chimiques, les applications fluidiques concernent également des microréacteurs chimiques pour la réalisation de réactions soit homogènes soit hétérogènes.

Réactions homogènes

A l'échelle microscopique, les processus de transfert de masse et de chaleur sont nettement améliorés, ce

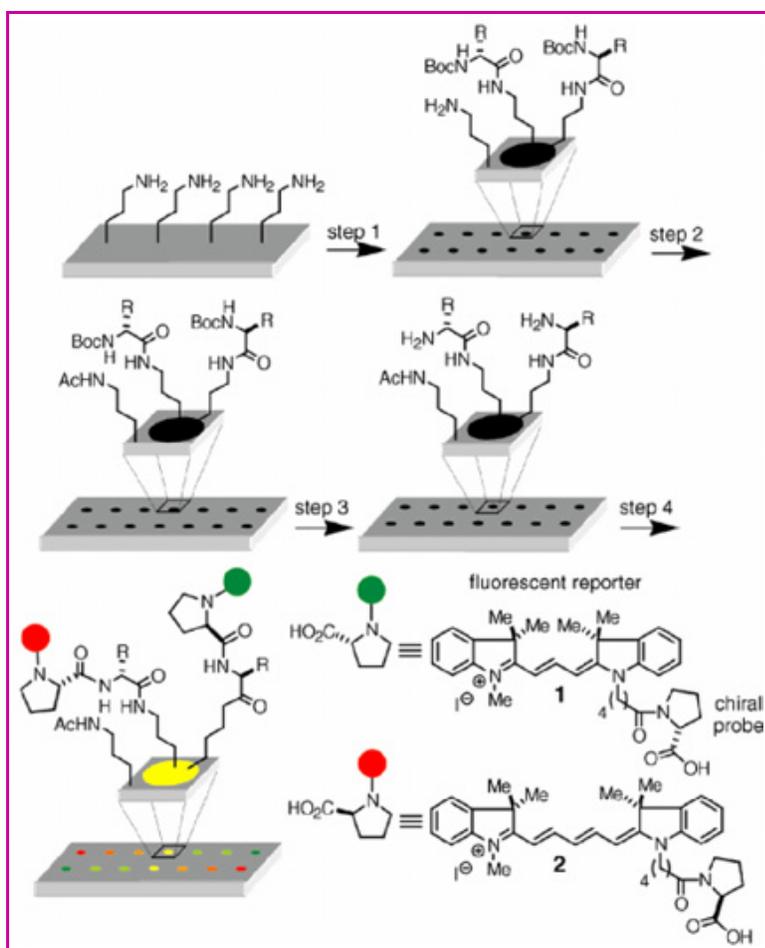


Figure 3 - Principe de réalisation des microarrays dédiés à la détermination d'excès énantiomériques, développés par Korbel *et al.* (d'après [12]).

Réactifs : a) BocHNCH(R)CO₂H, PyAOP, iPr₂NEt, DMF ; b) Ac₂O, pyridine ; c) 10 % CF₃CO₂H et 10 % Et₃SiH dans CH₂Cl₂, puis 3 % Et₃N dans CH₂Cl₂ ; d) pentafluorophényl, diphenylphosphinate, iPr₂NEt, 1:1 mélange de 1 et 2, DMF, -20 °C.

Reprinted with permission from *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, p. 361. Copyright 2001 American Chemical Society.

qui rend possible le contrôle des réactions chimiques par le contrôle aisé de la température au sein du réacteur. Cette caractéristique a conduit à une amélioration du rendement et des conditions expérimentales. Ainsi, Skelton *et al.* décrivent-ils l'optimisation de la réaction de Wittig dans un microsystème en borosilicate de verre, schématisé par la *figure 4* [13]. Le dispositif a été testé avec différents aldéhydes et deux protocoles opératoires : un excès d'aldéhyde ou une stoechiométrie 1:1 et une durée de réaction de 20 minutes (arrêt par ajout de HCl dilué). Les produits formés sont analysés en ligne par HPLC-MS. Pour les deux protocoles, la réaction sur microsystème présente un rendement de 10 % supérieur à celle menée en solution dans des conditions analogues. Par ailleurs, il apparaît qu'un excès d'aldéhyde n'est pas nécessaire sur un microsystème.

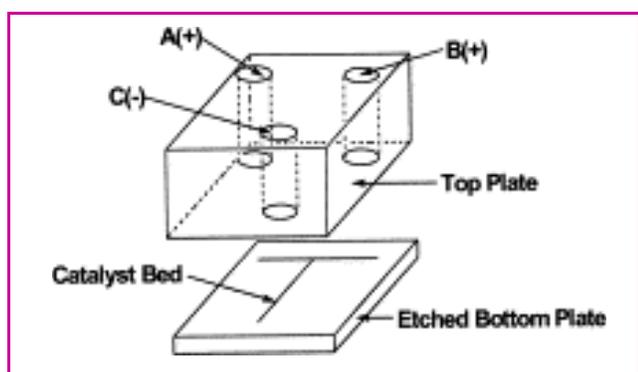


Figure 4 - Schéma de principe du microsystème incluant un réseau de canaux en forme de T utilisé pour la réaction de couplage de Suzuki et celle de Wittig (d'après [13-14]). A(+) et B(+) représentent les réservoirs pour les réactifs et C(-) le réservoir à solvant. Ils servent également à l'application des tensions d'électrophorèse selon les polarités indiquées.

Le même dispositif a été utilisé par Greenway *et al.* pour étudier une réaction organométallique catalysée dans un système microfluidique [14] ; contrairement aux conditions classiques homogènes, la réaction de Suzuki entre l'acide phénylboronique et le 4-bromobenzonitrile (*figure 5*) est catalysée par du palladium solide, immobilisé sur une structure de silice poreuse. Les produits formés sont analysés en sortie de microsystème par CPG-SM pour déterminer le rendement de la réaction et par ICP-SM pour quantifier le palladium dans les produits formés. L'utilisation d'un microsystème a conduit à des améliorations majeures. Tout d'abord, le palladium étant immobilisé, d'une part, il ne diffuse pas dans la solution et ne contamine pas les produits formés comme dans le cas d'une réaction menée en solution et, d'autre part, son activité est « durable ». Enfin, la quantité de catalyseur nécessaire est plus faible. Par ailleurs, la

réaction de Suzuki nécessite usuellement l'ajout d'une base inorganique, qui active la réaction entre l'acide boronique et le métal. Dans le microsystème utilisé mettant en jeu un pompage électrophorétique, l'eau associée au THF aqueux subit une ionisation partielle pour former des anions basiques hydroxyde ; il semblerait que ce phénomène conduise, sous l'action du fort champ électrique, à l'obtention d'une concentration élevée en base à la surface du catalyseur. Du fait de la formation *in situ* d'ions hydroxyde, l'ajout de base n'est alors plus nécessaire.

Réactions hétérogènes

Les microsystèmes sont intéressants pour des réactions qui sont limitées par les transferts soit de masse, soit de chaleur ; par exemple, le temps de réponse thermique typique pour un microsystème est de 10 ms. La réaction de conversion de CO en présence d'eau en CO₂ et H₂ est exothermique et favorisée du point de vue thermodynamique à basse température ; il faut donc évacuer continûment la chaleur produite par la réaction. Cette réaction a été effectuée sur un microsystème comprenant un échangeur de chaleur [15] ; les produits formés sont analysés en ligne par chromatographie en phase gazeuse. Ces dispositifs ont conduit à des améliorations notables. Tout d'abord, la taille du réacteur est diminuée sans modification du débit de réaction. De plus, ces microréacteurs constituent une alternative peu onéreuse et aisément transportable. Les transferts de masse et de chaleur sont beaucoup plus rapides : les calories dégagées étant aussitôt évacuées, l'efficacité de la réaction est augmentée. Ainsi, tout risque de « point chaud » est-il supprimé. De plus, le catalyseur de type mousse de nickel utilisé dans ce dispositif, présente un temps de contact diminué, de 1 à 10 ms. Le taux de conversion de CO obtenu est de 99,8 % à 300 °C (l'équilibre de réaction étant atteint à 99,93 %), sans formation de produits secondaires.

La facilité de contrôle de réaction a été démontrée par Srinivasan *et al.* avec la réalisation d'une microcellule de réactions hétérogènes en phase gazeuse catalysées en phase solide [16-18]. Une photographie et deux vues latérales de ce dispositif sont présentées en *figure 6*. Le catalyseur est déposé, localement, en couche mince sur les parois internes du microsystème par des techniques de pulvérisation analogues à celles employées dans les imprimantes à jet d'encre. Le système a servi pour les réactions d'oxydation, partielle ou totale, de NH₃, H₂ et C₂H₆. Ces microréacteurs comportent des parois minces pour

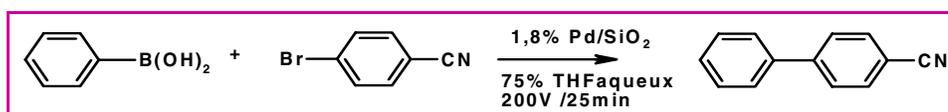


Figure 5 - Couplage entre le 4-bromobenzonitrile et l'acide phénylboronique réalisé dans un microréacteur sous flux électroosmotique.

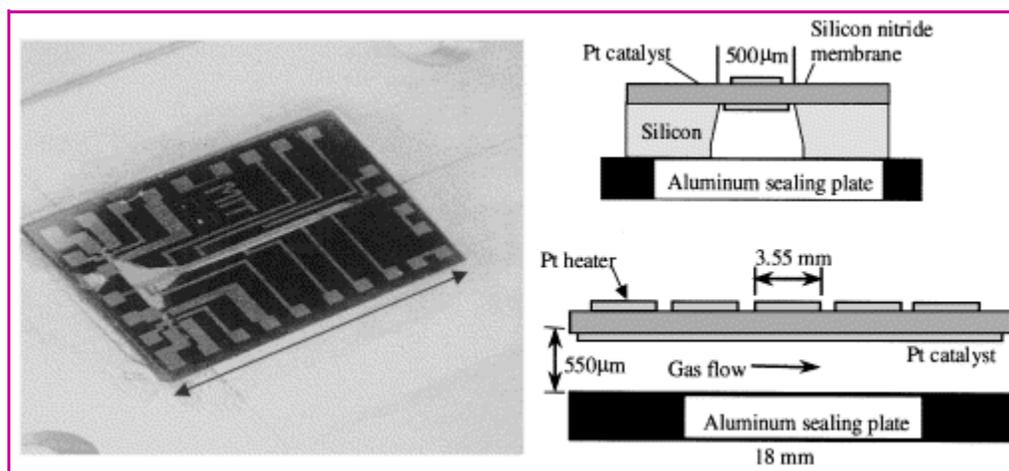


Figure 6 - Microréacteur en phase gazeuse. Photographie frontale du dispositif et schéma des vues latérales (d'après [18]).

Reprinted with permission from *Chemical Engineering Science*, 2001, 56, p. 293. Copyright 2001 Elsevier.

assurer un bon contact thermique, ainsi que des détecteurs de température et de flux intégrés. La dissipation de chaleur au sein du milieu réactionnel est contrôlée et ajustée par le choix des caractéristiques du couvercle (conductivité thermique, épaisseur), ce qui permet de stopper la réaction au stade de l'oxydation partielle. Par exemple, l'oxydation de NH_3 catalysée par le platine (en N_2 puis NO) peut être réalisée en mode adiabatique, ce qui conduit à une oxydation totale, ou en mode contrôlé, ce qui confère alors une certaine sélectivité à la réaction.

La grande efficacité des microsystèmes a été illustrée sur un autre type de réacteur, comprenant une membrane et combinant une réaction chimique avec une séparation ou purification. Franz *et al.* ont réalisé un microréacteur dédié à des réactions d'hydrogénation et de déhydrogénation [19-20] ; dans cet exemple, la membrane est utilisée pour une purification poussée de H_2 . Le dispositif consiste en une plaque de silicium dans laquelle est gravé un canal de réaction ($L = 12 \text{ mm}$), avec une membrane sub-micronique de palladium (épaisseur 200 nm , largeur $700 \mu\text{m}$), un système de chauffage intégré et un détecteur de température. La majeure partie de la membrane est chauffée, ce qui favorise le flux de H_2 à travers cette dernière et ce, sur une surface assez étendue. Les performances du microsystème ont été évaluées avec la mesure du flux de H_2 à travers la membrane portée à 500°C ; il atteint une valeur de $0,5$ à $1 \text{ cm}^3/\text{min}$. Les micromembranes en palladium s'avèrent donc plus efficaces que leurs analogues macroscopiques en raison de leur haute isolation thermique et de leur faible masse thermique.

Une des caractéristiques intrinsèques à ces objets de petite échelle est un rapport surface/volume élevé. Ceci est intéressant pour des réactions catalysées en phase solide, car la surface d'échange entre les réactifs circulant dans les canaux et le catalyseur solide déposé, voire immobilisé, sur les parois est hautement développée, ce qui favorise le processus catalytique. De plus, si le catalyseur est immobilisé sur

les parois, il s'avère avoir un meilleur « turn-over », son efficacité ne diminue pas après une utilisation répétée et il ne contamine pas les produits formés, comme nous l'avons vu précédemment. De nombreuses équipes s'attachent à l'heure actuelle à développer de nouvelles structures dans le but d'optimiser la surface d'interaction entre les réactifs et le catalyseur. Wiessmeier et Hoenicke ont ainsi mis au point un procédé de traitement de surface qui optimise les sites actifs du catalyseur [21]. Le matériau subit une oxydation anodique, ce qui conduit à l'obtention d'une double couche : une première couche d'aluminium poreux, d'épaisseur inférieure à 1 micron , et d'une deuxième couche d'oxyde poreux, constituée de cellules hexagonales régulières. L'adhésion de ce système est améliorée comparé à un système classique, l'épaisseur de la couche de catalyse est mieux contrôlée, l'aire de la surface active est accrue (140 fois plus grande que celles des poumons) et le système de pores est régulier. La distribution de catalyseur (le palladium ici) est donc plus régulière. Ce système, qui a été testé dans le cadre d'une réaction d'hydrogénation, présente une meilleure efficacité catalytique.

Microsystèmes de séparation

Le champ de prédilection des microsystèmes reste cependant à l'heure actuelle le domaine analytique, en particulier en ce qui concerne les applications biologiques. Un exemple d'application chimique est fourni par les travaux de Reetz *et al.*, qui ont développé une méthode de détermination d'excès énantiomériques basée sur un système microfluidique et applicable à des analyses à haut débit [22]. Cette méthode utilise une séparation de type électrophorétique sur phase chirale (à base de composés dérivés de cyclodextrines) réalisée dans un réseau de capillaires du type de ceux utilisés en routine dans les appareillages de séquençage d'ADN. Ce réseau de capillaires a été transposé à un réseau de canaux micrométriques

gravés dans des plaques de verre. La technique a été appliquée pour des séparations de mélanges énantiomériques ; les composés sont couplés *via* une fonction amine à un marqueur de fluorescence, qui intervient dans la détection post-séparation. La séparation est réalisée en moins de deux minutes, mais une optimisation du processus d'électrophorèse (augmentation de la tension appliquée, traitement adéquat des parois internes du canal) pourrait conduire à des séparations plus rapides. La réaction de dérivation (couplage de l'amine avec le marqueur de fluorescence) pourrait, de plus, être incluse sur le microsysteme dans une cellule de réaction placée en amont du canal de séparation. La détermination d'excès énantiomériques trouve une application dans des études de catalyseurs asymétriques à base de métaux de transition ou des études d'enzymes énantiosélectives.

Deux systèmes miniaturisés sont donc envisageables pour la détermination à haut débit d'excès énantiomériques : une technique microfluidique basée sur une séparation électrophoretique et une technique de microarrays. Dans les deux cas, une optimisation est nécessaire pour parvenir à un système fiable, rapide et robuste et, par ailleurs, une étape de couplage des analytes avec un groupement fluorophore est indispensable. D'autre part, l'évaluation de ces techniques n'a porté que sur un seul type de molécules. Cependant, la technique microarray a une chimie plus délicate à mettre en œuvre et la densité de greffage est limitée par la technique de détection optique. Elle apparaît, de plus, plus longue ; 48 heures sont nécessaires pour l'élaboration d'une plaque et la réalisation du test proprement dit. Enfin, si la nature de l'échantillon est modifiée (i.e. solution autre qu'une solution d'acides aminés), la modification de deux étapes est à prévoir dans le protocole, la nature de la fonctionnalisation sur le substrat et le couplage avec le fluorophore. La méthode électrophoretique semble, elle, plus universelle ; elle conduit à un débit d'analyse plus intéressant, supérieur à 7 000 échantillons par jour. Ce caractère universel pourrait être augmenté avec l'utilisation d'une autre méthode de détection, telle que la spectrométrie de masse ou l'électrochimie, qui permettrait de s'affranchir de l'étape de couplage avec un fluorophore. De même, les paramètres d'analyse et de détection sont à adapter en fonction de la nature des analytes.

Détection

Les performances des microsystemes sont en général limitées au niveau de la détection ; pour les applications de microfluidique, cette limitation concerne la sensibilité de la méthode utilisée qui doit être compatible avec de très faibles concentrations en analyte, alors que dans le cas des microarrays, elle influence également la densité spatiale en spots.

Sur les microarrays, la détection utilise des techniques de fluorescence. En revanche, différentes méthodes sont envisageables pour la détection en sortie de microsysteme fluidique ; elles sont soit intégrées sur la puce, soit extérieures et connectées au canal de sortie. On recense principalement les techniques optiques, électrochimiques et la spectrométrie de masse.

Techniques optiques

La détection optique par mesure d'absorbance UV est utilisée pour toute molécule absorbant dans cette gamme de longueurs d'onde ; elle sert communément en sortie de colonne chromatographique, mais permet également la détection post-synthèse de produits [23]. Cette technique impose le choix d'un matériau transparent en UV pour le microsysteme ou pour son couvercle.

L'autre technique optique est la fluorescence et tout particulièrement la fluorescence induite par irradiation laser (LIF). Cette méthode, très sensible, permet de détecter des analytes en très faibles concentrations dans des échantillons de l'ordre du femtolitre. Récemment, l'utilisation de fibres optiques a contribué à l'amélioration de cette technique. Cependant, elle implique que les espèces à détecter soient fluorescentes ou couplées à un groupement fluorescent, ce qui impose fréquemment une étape supplémentaire de traitement des échantillons. De plus, les méthodes optiques nécessitent un appareillage lourd : laser, photomultiplicateur, lentille de focalisation. Une amélioration notable est à attendre de l'émergence de détecteurs de fluorescence intégrés sur le système [24].

Électrochemiluminescence

Récemment, de nouvelles techniques de détection ont été intégrées sur microsysteme ; elles sont basées sur la formation et la détection d'une espèce électrochemiluminescente (ECL) dans une cellule électrochimique intégrée dans le système. Cette technique a tout d'abord été utilisée pour la détection d'ions métalliques et dans le cadre d'« immunoassays » ; en effet, ces avantages majeurs sont l'absence de source lumineuse et l'utilisation d'un appareillage moins lourd que celui des techniques purement optiques. Arora *et al.* décrivent un système de détection par électrochemiluminescence utilisant le complexe tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II) comme espèce électrochemiluminescente [25]. Ce composé est oxydé, passe dans un état excité ; son retour à la forme initiale s'accompagne de l'émission d'un photon. La sensibilité de la méthode ne dépend que de la concentration en tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II), elle est indépendante du volume concerné. Cependant, une mise au point plus poussée s'avère indispensable pour augmenter la robustesse de la méthode et étendre ses domaines d'application.

Détection électrochimique

Une variante de cette technique est la détection électrochimique, réalisée sur des électrodes implantées dans les canaux des microsystèmes [26]. Cette technique a une sensibilité et une sélectivité comparables à celles obtenues par fluorescence, elle est utilisable pour des échantillons de faible volume et ne requiert pas que le matériau soit transparent. Par ailleurs, les électrodes sont aisément miniaturisables et sont le siège à la fois de la réaction et de la détection. Enfin, ce type de détection est entièrement intégré sur le microsystème, sans appareillage extérieur. Mathies *et al.* ont été les premiers à intégrer un tel système de détection sur un dispositif miniaturisé d'électrophorèse capillaire [27]. Depuis, de nombreux progrès ont été réalisés avec le développement de (i) détecteurs électrochimiques sous forme de films épais [28] qui ont permis d'atteindre une limite de détection plus basse, (ii) d'électrodes modifiées en « polymère » [29] et enfin (iii) d'électrodes duales intégrées sur un système en PDMS (polydiméthylsiloxane) [30].

Spectrométrie de masse

Un autre mode de détection est la spectrométrie de masse, technique particulièrement adaptée aux composés biologiques : les techniques d'ionisation ESI et MALDI sont appropriées à l'analyse de polymères biologiques, tels que les protéines, les ADN et les polysaccharides [31]. Ces techniques d'ionisation douce confèrent à la molécule assez d'énergie pour son ionisation et sa vaporisation, sans induire de fragmentations. Par ailleurs, cette technique apparaît intéressante car elle fournit la masse moléculaire des composés étudiés ainsi que des informations structurales. Les expériences de MS/MS ou spectrométrie de masse en tandem conduisent à la séquence des peptides analysés [32]. Ainsi, après confrontation de ces données à celles présentes dans les banques de données, ces résultats aident à l'identification des protéines initialement présentes. Les deux méthodes d'ionisation, MALDI et ESI, présentent des avantages différents. Le mode electrospray ou ESI fournit plus d'informations, mais le débit d'analyse est plus faible. Un avantage de la technique ESI est la possibilité de connecter la source d'ionisation à un autre système chromatographique, HPLC, CE... [33]. Cette technique d'ionisation est donc particulièrement intéressante dans le cadre d'un couplage avec un microsystème ; de plus, les nanosources d'électronébulisation et les microsystèmes fluidiques présentent des débits du même ordre de grandeur. Dans ce cas, le raccord microsystème/source d'électronébulisation est assuré le plus souvent par un capillaire en silice fondue. Cet « outil-composé » exhibe de bonnes performances analytiques et permet une analyse en ligne des échantillons après leur préparation.

Technologie

Différents matériaux sont utilisables pour la fabrication de microsystèmes : silicium, quartz, verre, céramiques, plastiques et élastomères. Les critères de choix d'un matériau sont son coût intrinsèque et celui de fabrication, ses propriétés, son adéquation avec l'application visée, la compatibilité des processus technologiques.

Le silicium est utilisé de façon prépondérante : du fait de ses antécédents dans le domaine de la micro-électronique [34], il est bien connu et maîtrisé par les technologues. Ses propriétés sont compatibles et intéressantes pour ce type d'application : propriétés mécaniques remarquables, conductivité non nulle, réactivité à haute température, oxydation et traitement de surface aisés. Du fait de sa versatilité, ce matériau peut être usiné à l'aide de différentes techniques, gravure isotrope, anisotrope, chimique ; la réalisation de structures complexes tridimensionnelles présentant un rapport d'aspect élevé est envisageable par DRIE-ICP (deep reactive ion etching-ion coupling plasma).

Le verre est utilisé pour ses propriétés de transparence autorisant un mode de détection optique, son aptitude à véhiculer un flux électroosmotique (EOF) et sa bonne conductivité thermique. Cependant, ce matériau est fragile et assez onéreux pour une production en masse. De plus, il ne peut être usiné à aussi basse échelle que le silicium, car la gravure chimique du verre génère des parois non parallèles ; la gravure d'objets avec un rapport d'aspect élevé n'est pas envisageable [35]. Enfin, ce matériau pose des problèmes de collage.

Depuis peu, d'autres matériaux sont utilisés, des matériaux plastiques ou élastomères [36]. Cette alternative est particulièrement intéressante pour la production d'objets jetables à usage unique ; ces matériaux sont moins chers et moins fragiles, ils peuvent être transparents et présentent des propriétés d'adhésion intéressantes. Par contre, leur conductivité thermique est plus faible et, par ailleurs, ils se dissolvent aisément dans les solvants organiques, c'est pourquoi leur utilisation concerne essentiellement des applications biologiques et non purement chimiques. Les procédés technologiques de fabrication sont des techniques de moulage, d'ablation laser...

Le dernier type de matériau est de type céramique [37] ; ces matériaux, peu chers, sont adaptés à un flux électroosmotique et présentent de bonnes propriétés d'adhésion. Ils ne sont pas transparents, la détection est effectuée par électrochimie. Enfin, leur avantage majeur réside dans la non-nécessité de salle blanche pour leur usinage. La réalisation de microsystèmes en matériaux céramiques utilise les techniques de fraisage, d'ablation laser et l'assemblage est opéré à haute température.

Notre projet de protéomique intégrée

Au laboratoire, nous nous intéressons à des applications protéomiques de microsystèmes

fluidiques. En biologie, l'intérêt de ces microsystèmes réside dans leur adéquation aux volumes d'échantillon à analyser et, de plus, comme les différentes étapes du traitement s'enchaînent sans intervention extérieure ou manipulation, les contaminations et pertes sont diminuées. Enfin, la suite logique du décryptage du génome humain est l'étude des protéines ou produits d'expression des gènes. Cette étude requiert des procédés analytiques sensibles et utilisables à haut débit, tels que des microsystèmes. En général, la détection en sortie de microsystème est effectuée par des techniques de spectrométrie de masse par électronébulisation. Les performances en matière d'ionisation sont nettement améliorées lorsque le débit d'introduction de l'échantillon diminue. Récemment, une nouvelle génération de sources miniatures ou « nanosprays » est apparue, avec des caractéristiques d'électronebulisation améliorées [38] : une sensibilité accrue, une limite de détection plus faible et un meilleur rendement d'ionisation (10^{-4} pour une nanosource contre 10^{-9} pour une source classique). Coupler un microsystème fluide à une nanosource d'électronebulisation apparaît intéressant, comme ils requièrent tous deux des débits du même ordre de grandeur. La connexion avec la source d'ionisation qui doit minimiser le volume mort afin de limiter l'élargissement des pics [39-40] est réalisée avec un capillaire en silice fondue. Par ailleurs, ces microsystèmes fluidiques comprennent le plus souvent une colonne d'élution.

Notre projet de protéomique intégrée, fruit de la collaboration entre l'Institut d'électronique et de microélectronique du Nord, le centre commun de spectrométrie de masse et la société MGP Instruments, concerne le développement d'un système de microfluidique en silicium dédié à la préparation d'échantillons protéiques avant leur analyse en spectrométrie de masse (électronebulisation) [41]. La *figure 7* illustre le schéma de principe de notre système microfluidique. Il est constitué de plusieurs briques technologiques : (i) un mode de pompage original non électrophoretique reposant sur des effets thermiques et géométriques, sans valve, (ii) une microcolonne d'élution type SPE

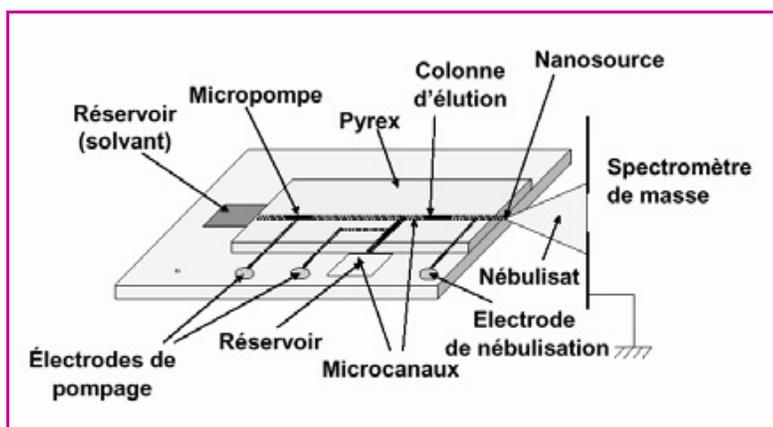


Figure 7 - Schéma de principe du prototype microfluidique final.

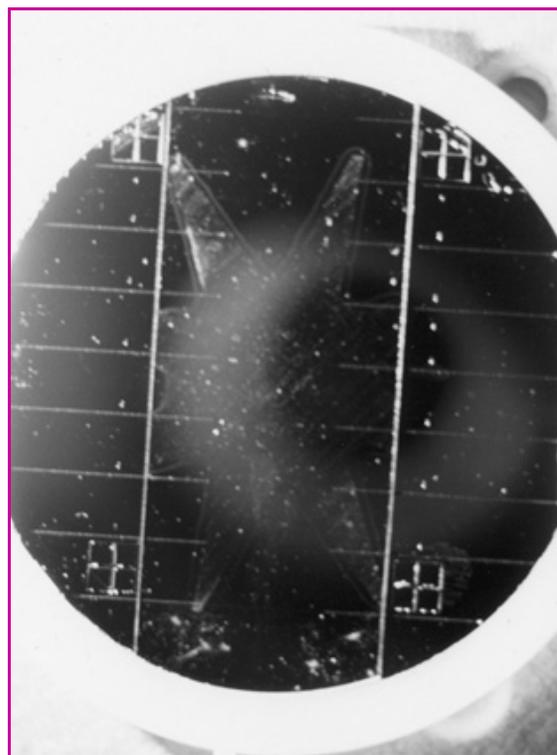


Figure 8 - Photographie des microsystèmes de première génération réalisés sur des plaquettes de silicium de 2 pouces et présentant 9 canaux.

(extraction sur phase solide), (iii) une nanosource intégrée. Des canaux sont gravés dans le silicium par des techniques classiques de microtechnologie ; ils servent de « tuyauterie » pour l'écoulement du fluide et de support pour la réalisation de la colonne d'élution. Un couvercle en Pyrex est collé par des techniques d'« anodic bonding » sur l'ensemble pour assurer l'étanchéité du dispositif. L'intégration de la source sur le système vise à optimiser ses caractéristiques et celles du processus d'électronebulisation.

Un premier prototype nous a permis de vérifier la faisabilité de ces dispositifs ; neuf canaux identiques ont été gravés par voie humide (ou chimique) sur une plaque de silicium de 2 pouces. La *figure 8* correspond à une photographie de ce prototype et la *figure 9* représente une vue agrandie, obtenue par des techniques de microscopie électronique, d'un canal. La largeur des canaux est de $10\ \mu\text{m}$ en leur centre contre $100\ \mu\text{m}$ de part et d'autre, pour permettre la connexion *via* des capillaires à un pousse-seringue en amont et à une nanosource d'électronebulisation en aval. Un couvercle en Pyrex scelle les canaux. La photographie de la *figure 10* illustre le principe du montage du microsystème à un pousse-seringue et à une nanosource d'électronebulisation. La rétention sur les parois a été évaluée sur ce premier prototype ; une solution peptidique a été injectée dans le microsystème et analysée en sortie par spectrométrie de masse. Le spectre de masse obtenu révèle

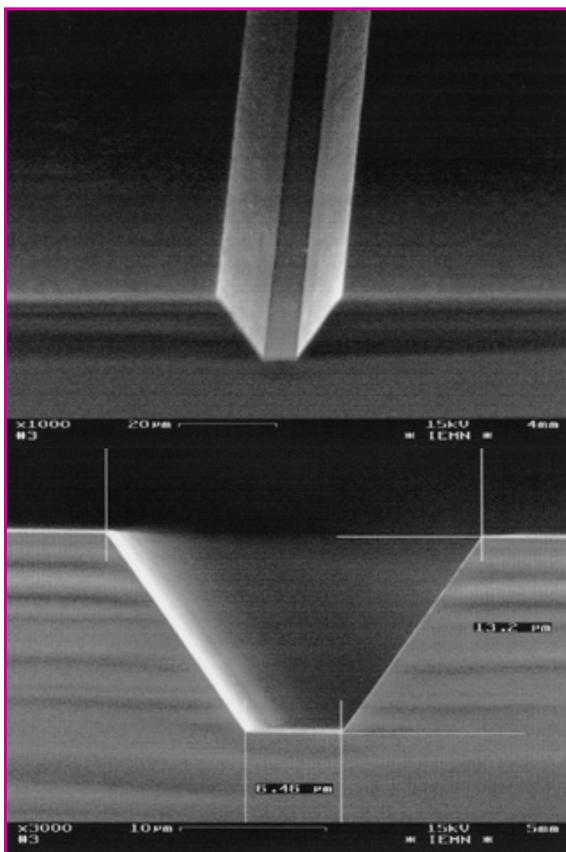


Figure 9 - Photographie obtenue par microscopie électronique d'un microcanal (10 μm).

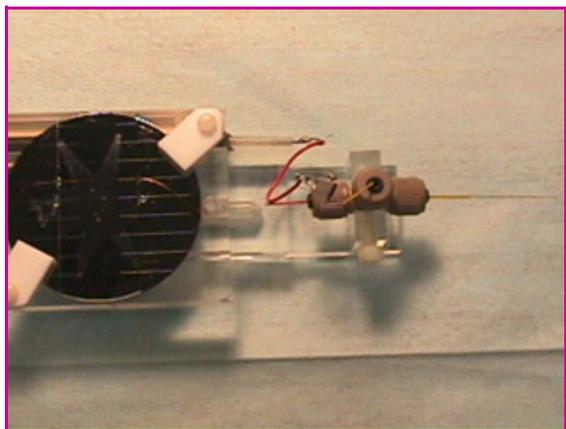


Figure 10 - Principe du montage du microsystème sur une nanosource d'électronébulisation en vue de son couplage avec un spectromètre de masse.

que l'adsorption sur les parois est très faible. Un deuxième prototype, en cours de réalisation, vise à développer le moteur de pompage.

Enfin, parallèlement, nous nous intéressons à la colonne d'éluion ; une étude bibliographique des différentes solutions envisageables nous a orientés vers une phase stationnaire de type monolithique [42]. Ces phases présentent de nombreux avantages par rapport à des alternatives plus classiques telles que des billes de silice : (i) elle est réalisée dans les canaux

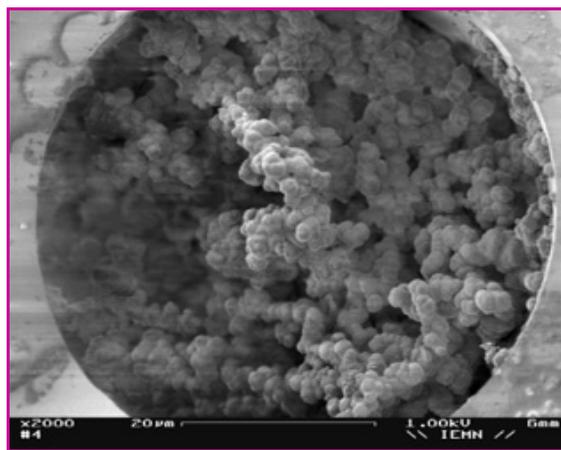


Figure 11 - Photographie MEB d'une section de phase stationnaire monolithique réalisée dans un capillaire (d.i. 52 μm).

par polymérisation *in situ* initiée par irradiation UV (contrôle spatial), (ii) elle ne nécessite pas la présence de frittés, (iii) elle évite tout problème lié au « package » de particules dans une portion de canal, (iv) la porosité et les propriétés chromatographiques du matériau sont ajustables par choix de la composition du mélange réactionnel de polymérisation, et enfin, (v) la résistance au transfert de masse est plus faible.

Des premiers essais d'élaboration de colonnes monolithiques ont été réalisés dans des capillaires (50-100 μm de diamètre interne), à partir du protocole développé par Svec et Fréchet [42] ; le mélange réactionnel utilisé se compose de trois monomères (EGDMA, BMA, AMPS), d'un porogène ternaire (propan-1-ol, 1,4-butanediol et H_2O) et d'un amorceur photochimique, l'AIBN ou le Darocur 1173[®]. Ces essais préliminaires ont permis une étude qualitative de la morphologie et de la porosité des phases obtenues ; la figure 11 correspond à une photographie obtenue par des techniques de microscopie électronique d'une section de capillaire contenant une phase monolithique. En effet, l'observation des phases obtenues par des techniques de microscopie électronique a mis en évidence l'influence directe de la composition du mélange réactionnel sur la morphologie et la porosité du milieu. Plus la teneur en propanol dans le porogène est élevée, moins la phase est poreuse. Par ailleurs, la suppression du monomère ionique, AMPS, du mélange réactionnel conduit à l'obtention d'une phase constituée de nodules de plus petite taille.

Conclusion

L'introduction des techniques de la microélectronique dans le domaine de la chimie en est à sa phase de démarrage. A l'heure actuelle, seuls quelques microsystèmes commerciaux ont vu le jour ; il s'agit principalement d'outils d'électrophorèse capillaire dédiés à l'analyse d'échantillons biologiques, ADN, ARNm, protéines et peptides.

Dans le domaine purement chimique, le développement des « laboratoires-sur-puce » n'en est qu'à ses premiers balbutiements ; malgré un engouement massif, peu de projets se concrétisent réellement et les applications citées ci-dessus appartiennent encore au domaine du laboratoire. Par ailleurs, cette tendance est modulée par un facteur géographique. En effet, aux États-Unis et au Canada, de nombreux laboratoires et industriels s'intéressent depuis plusieurs années à la miniaturisation des procédés alors qu'en Europe, seules quelques équipes travaillent depuis peu en ce sens. Des pôles de recherche qui leur sont consacrés apparaissent, en Allemagne dans le domaine de la chimie, en Suisse (Neufchâtel) pour la microtechnologie en général, en France (Grenoble) pour les puces à ADN.

Cet intérêt mondial s'explique par les aspects prometteurs présentés par les microsystèmes, qui laissent espérer des améliorations majeures, notamment dans le domaine de la chimie. Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation de tels dispositifs conduit à une amélioration des rendements de réaction et à une « accélération » des réactions, à une réduction de la taille de l'appareillage nécessaire, ce qui permet une utilisation *in situ*, à une diminution globale des coûts, tout en limitant certains aspects néfastes de la chimie, pollution, caractère dangereux... Les exemples détaillés dans cette courte présentation révèlent d'autres avantages inattendus encore, au niveau du phénomène de catalyse notamment.

Les prochaines années devraient donc voir l'arrivée sur le marché de microsystèmes comportant de nombreuses fonctions intégrées.

Remerciements

Nous tenons tout particulièrement à remercier l'équipe de l'Institut d'électronique et de microélectronique du Nord (Pr Christian Druon, Pr Pierre Tabourier, Patricia

Lefebvre, Christophe Boyaval) avec laquelle le projet *Protéomique intégrée* a été initié depuis deux ans, les équipes du Pr Michel Morcellet et du Pr Xavier Coqueret pour le développement des phases monolithiques et les partenaires des projets *Protéomique intégrée* (Claude Beaugrand, MGP Instruments) et *BioChipLab* (Patrice Caillat, Claude Vauchier, CEA-LETI Grenoble ; Dr Jérôme Garin, CEA-DSV Grenoble ; Jean-Pierre Le Pesant, Osmooze ; Denis Loyaux, Claudine Picard, Patrick Tricoli, Sanofi-Synthélabo) pour les nombreux échanges scientifiques occasionnés par ce travail en commun.

Références

- [1] Harrison D.J., Chiem N., Microship Lab for Biochemical analysis, *Proceedings of Micro-Total analysis systems '96*, **1996**, p. 31.
- [2] Harrison D.J., Fluri K., Chiem N., Tang T., Fan Z., *Sensors and Actuators B*, **1996**, 33, p. 105.
- [3] Srinivasan R., Hsing I.M., Berger P.E., Firebaugh S.L., Harold M.P., Ryley J.F., Lerou J.J., Jensen J.K., Schmidt M.A., *AIChE Journal*, **1997**, 43, p. 11.
- [4] Srinivasan R., Firebaugh S.L., Hsing I.M., Ryley J.F., Harold M.P., Jensen J.K., Schmidt M.A., Chemical performance and high temperature characterization of micromachined chemical reactors, *Technical Digest, International Conf. On Solid State Sensors and Actuators, IEEE*, **1997**, p. 163.
- [5] Cuzin M., *Transfus. Clin. Biol.*, **2001**, 8, p. 291.
- [6] Kodadek T., *Chemistry & Biology*, **2001**, 8, p. 105.
- [7] Walter G., Büssov K., Cahill D., Lueking A., Lehrach H., *Current Opinion in Microbiology*, **2000**, 3, p. 298.
- [8] Perraut *et al.*, Microscanner pour les puces à ADN, *Miniatech 2001*, **2001**.
- [9] Pompon *et al.*, Nano-assemblages dynamiques ADN-protéine supportés sur membranes artificielles, *Miniatech 2001*, **2001**.
- [10] Produits comprenant un support sur lequel sont fixés des acides nucléiques et leur utilisation comme puce à ADN, Gras Masse H., Lemoine Y., Melnyk O., brevet d'invention français de numéro de publication 2 801 904 et de numéro d'enregistrement national 99 15392, **1999**.
- [11] MacBeath G., Koehler A.N., Schreiber S.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, p. 7967.
- [12] Korbel G.A., Lalic G., Shair M.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, p. 361.
- [13] Skelton V., Greenway G.M., Haswell S.J., Morgan D.O., Styring P., Warrington B.H., Wong S.Y.F., Preliminary results: the development of a continuous flow injection microreactor for organic synthesis and combinatorial applications using Wittig Chemistry, *Third International Electronic Conference on synthetic Organic Chemistry (ECSOC-3)*, 1-30 septembre **1999**.
- [14] Greenway G.M., Haswell S.J., Morgan D.O., Skelton V., Styring P., *Sensors and Actuators B*, **2000**, 63, p. 153.
- [15] Tonkovich A.Y., Zilka J.L., LaMont M.J., Wang Y., Wegeng R.S., *Chemical Engineering Science*, **1999**, 54, p. 2947.

Quelques sites Web dédiés aux microsystèmes

Site de discussion, d'annonces, de pages jaunes
<http://mems.isi.edu/>

Quelques compagnies spécialisées en microfluidique
<http://www.aclara.com/>
<http://www.calipertech.com/>
<http://www.osmooze.com/osmooze/fr/technologies/micromoteur/>

Programmes

<http://www.darpa.mil/mto/index.html>
<http://www.me.orst.edu/research/mecs/projects/index.html>
<http://www.rmnt.org/> (France, ministère de la Recherche)

Centres de recherche et de transfert

<http://www.imm-mainz.de/>
<http://www.pnl.gov/microcats/>
<http://www.ca.sandia.gov/microchem/>
<http://www.mic.dtu.dk/>

Quelques congrès récents en France

- First International IEEE EMBS Special Topic Conference on Microtechnology in Medicine and Biology, 12-14 octobre 2000, Lyon.
<http://mrel.beckman.uiuc.edu/mmb/>
 - Deuxièmes rencontres internationales des micro et nanotechnologies, MINATEC 2001, 2-6 avril 2001, Grenoble.
<http://www.minatec.com/minatec2001/>
 - 5th International Conference on Microreaction Technology (IMRET 5), 27-30 mai 2001, Strasbourg.
<http://www.imm-mainz.de/imret/>

- [16] Hsing I.M., Srinivasan R., Harold M.P., Jensen K.F., Schmidt M.A., *Chemical Engineering Science*, **2000**, *55*, p. 3.
- [17] Srinivasan R., Hsing I.M., Berger P.E., Jensen K.F., Firebaugh S.L., Schmidt M.A., Harold M.P., Lerou J.J., Ryley J.F., *AIChE Journal*, **1997**, *43*, p. 3059.
- [18] Jensen K.F., *Chemical Engineering Science*, **2001**, *56*, p. 293.
- [19] Franz A.J., Jensen K.F., Schmidt M.A., *Palladium based micromembranes for hydrogen separation and hydrogenation/dehydrogenation reactions*, *Microreaction technology: industrial prospects*, **2000**, W. Ehrfeld (Ed.), Berlin, Springer, p. 267.
- [20] Quiram D.J., Hsing I.M., Franz A.J., Jensen K.F., Schmidt M.A., *Chemical Engineering Science*, **2000**, *55*, p. 3065.
- [21] Wiessmeier G., Hoenicke D., *J. Micromech. Microeng.*, **1996**, *6*, p. 285.
- [22] Reetz M.T., Kühling K.M., Deege A., Hinrichs H., Belder D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, p. 3891.
- [23] Salimi-Moosavi H., Tang T., Harrison D.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, p. 8716.
- [24] Brahamansandra S.N., Webster J.R., Burke D.T., Mastrangelo C.H., Burns M.A., *Proc SPIE*, **1998**, *3515*, p. 242.
- [25] Arora A., de Mello A.J., Manz A., *Anal. Commun.*, **1997**, *34*, p. 393.
- [26] Gavin P.F., Ewing A.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, p. 8932.
- [27] Wooley A.T., Lao K.Q., Glazer A.N., Mathies R.A., *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, p. 684.
- [28] Wang J., Tian B.M., Sahlin E., *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, p. 5436.
- [29] Ontko A.C., Armistead P.M., Kiorcus S.R., Thorp H.H., *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, p. 1842.
- [30] Martin R.S., Gawron A.J., Lunte S.M., *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, p. 3196.
- [31] Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M., *Science*, **1989**, *246*, p. 64.
- [32] Haynes P.A., Gygi S.P., Figeys D., Aebersold R., *Electrophoresis*, **1998**, *19*, p. 1862.
- [33] Tomer B.T., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, p. 297.
- [34] McCreedy T., *Trends in analytical chemistry*, **2000**, *19*, p. 396.
- [35] Fister J.C., Jacobson S.C., Davis L.M., Ramsey J.M., *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, p. 431.
- [36] Effenhauser C.S., Bruin G.J.M., Paulus A., Ehrat M., *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, p. 3451.
- [37] Henry C.S., Zhong M., Lunte S.M., Kim M., Bau H., Santiago J.J., *Anal. Commun.*, **1999**, *36*, p. 305.
- [38] Wilm M., Mann M., *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, p. 1.
- [39] Bings N.H., Wang C., Skinner C.D., Colyer C.L., Thibeault P., Harrison D.J., *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, p. 3292.
- [40] Li J., Thibeault P., Bings N.H., Wang C., Skinner C.D., Colyer C.L., Harrison D.J., *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, p. 3036.
- [41] Tabourier P., Druon C., Rolando C., Lefebvre P., *On-Chip Microfluidics for Proteomic Analysis by ESI/Mass Spectrometry*, 1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference in Medicine & Biology, **2000**.
- [42] Yu C., Svec F., Fréchet J.M.J., *Electrophoresis*, **2000**, *21*, p. 120.



S. Le Gac

Séverine Le Gac

est doctorante au Laboratoire de chimie organique et macromoléculaire de l'université Lille I*.



C. Rolando

Christian Rolando

est directeur de recherche CNRS dans ce même laboratoire*.

* Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille I), UFR de Chimie, bâtiment C4, UPRESA CNRS 8009, Chimie organique et macromoléculaire, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex.
Tél. : 03 20 43 49 77. Fax : 03 20 33 61 36.
E-mail : Severine.Le-Gac@ed.univ-lille1.fr
Christian.Rolando@univ-lille1.fr

