

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
3 juin 2004 (03.06.2004)

PCT

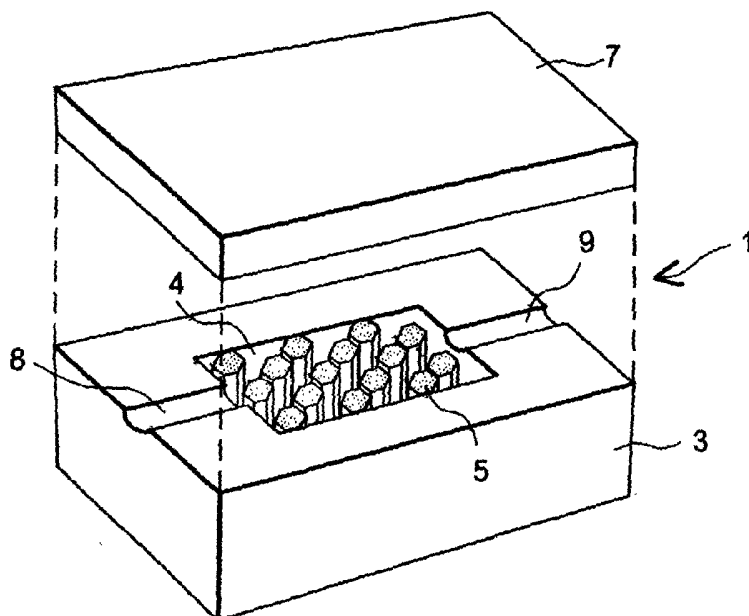
(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/046020 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : **B81B 7/00** (72) Inventeurs; et
(21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR2003/050117 (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **COM-
BETTE, Philippe** [FR/FR]; 130, impasse Caravelle, Bât.
A, F-34000 Montpellier (FR). **MITTLER, Frédérique**
[FR/FR]; 44, route de Grenoble, F-38120 Saint-Egreve
(FR). **CAILLAT, Patrice** [FR/FR]; 10, rue de Provence,
F-38130 Echirolles (FR).
(22) Date de dépôt international : 12 novembre 2003 (12.11.2003) (74) Mandataire : **POULIN, Gérard**; Brevatome, 3, rue du
Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).
(25) Langue de dépôt : français (81) État désigné (*national*) : US.
(26) Langue de publication : français (84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
(30) Données relatives à la priorité : 02/14177 13 novembre 2002 (13.11.2002) FR
(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE** [FR/FR];
31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR). Publiée :
— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport*

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: MICROBEAD-FILLED MICROSYSTEM AND PRODUCTION METHOD THEREOF

(54) Titre : MICRO-SYSTEME A REMPLISSAGE DE MICRO-BILLES ET PROCEDE D'OBTENTION



(57) Abstract: The invention relates to a microsystem which is intended to receive beads and to position said beads precisely at determined locations in the microsystem. The inventive microsystem consists of a container (3) comprising a cavity (4) which is equipped with blocking elements (5). According to the invention, the blocking elements are used to arrange and stack the beads in the spaces therebetween, said spaces forming the aforementioned determined locations. The invention also comprises a cover (7) which is hermetically fixed to the container (3) and inlet (8) and outlet (9) means which enable a fluid to flow into the cavity (4). The invention also relates to the production and use of said bead-filled microsystem.

[Suite sur la page suivante]

WO 2004/046020 A2



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : L'invention concerne un micro-système destiné à recevoir des billes et à obtenir une localisation précise desdites billes a des endroits déterminés dans le micro-système. Ce micro-système comporte un réservoir (3) présentant une cavité (4), ladite cavité (4) munie d'éléments bloquants (5) permettant d'ordonner et d'empiler les billes dans les interstices entre les éléments bloquants (5), les interstices constituant lesdits endroits déterminés. Il comporte également un capot (7) fixé hermétiquement au réservoir (3) et des moyens d'entrée (8) et des moyens de sortie (9) permettant la circulation d'un fluide dans la cavité (4). L'invention concerne également la réalisation et l'utilisation dudit micro-système remplie de billes.

MICRO-SYSTEME A REMPLISSAGE DE MICRO-BILLES
ET PROCEDE D'OBTENTION

DESCRIPTION

5

Domaine technique

La présente invention concerne un micro-système destiné à recevoir des billes de diamètre défini.

10

L'invention concerne également un procédé de fabrication ainsi qu'un procédé de remplissage d'un tel micro-système pour obtenir un micro-réacteur.

15

L'invention est enfin relative à un procédé pour réaliser une réaction biochimique ou biologique qui met en œuvre ledit micro-système rempli de billes.

Le domaine de l'invention peut être défini comme celui des systèmes miniaturisés ou micro-systèmes qui sont utilisés essentiellement pour l'analyse chimique et la synthèse.

20

L'intégration de billes dans des micro-systèmes est largement utilisée dans le cadre de l'analyse ou des réactions biochimiques : l'utilisation de ces billes pré-fonctionnalisées, dont le diamètre va de la dizaine de nanomètres jusqu'à la centaine de micromètres, permet de disposer de fonctions chimiques sans passer par des étapes de fonctionnalisation des différentes composantes d'un micro-système.

25

Ces billes sont également utilisées dans les systèmes de séparation de type chromatographique pour lesquels elles sont empilées dans des capillaires de différents diamètres.

30

Plusieurs autres applications mettent en jeu l'utilisation de billes dans des micro-systèmes

(dispositifs alors connus sous le terme de micro-réacteurs), notamment pour la pré-concentration de protéines, pour des réactions mettant en jeu des reconnaissances antigène-anticorps.... Leurs applications
5 peuvent être également étendues au domaine de la chimie.

Etat de la technique

Des exemples de micro-systèmes utilisant
10 ces billes sont plus précisément décrits dans les documents suivants.

Dans le document [1] cité à la fin de la présente description, les auteurs présentent un micro-système dédié à une séparation du type
15 chromatographique : deux barrières délimitent une cavité et permettent de capturer des billes présentant à leur surface une phase hydrophobe du type octadécylsilane. L'introduction des billes dans la cavité est réalisée par électro-osmose.

20 Une différence de dimension entre la profondeur de la cavité et la hauteur des barrières induit un blocage des billes dont le diamètre est supérieur à cette valeur. Dans ce dispositif, une fois les billes introduites dans la cavité, on peut
25 théoriquement les en retirer en utilisant un flux inverse à celui utilisé pendant l'introduction, soit par électro-osmose, soit par une pompe classique. Toutefois, après utilisation, il s'avère que l'extraction des billes de la cavité est compliquée.
30 Par ailleurs, bien que le remplissage soit homogène, les différentes images de la cavité en cours de remplissage laissent apparaître des zones présentant des hétérogénéités.

Dans le document [2] cité à la fin de la présente description, les auteurs utilisent un dispositif quasi identique pour réaliser une réaction enzymatique, suivi d'une analyse des produits issus de
5 cette réaction. Cette fois, des billes d'un diamètre compris entre 40 et 60 micromètres sont introduites dans une cavité à l'aide d'une pompe classique. Ici, compte tenu des différents diamètres des billes, leur empilement au sein de la cavité implique des
10 hétérogénéités.

Dans le document [3] cité à la fin de la présente description, les auteurs présentent un autre système permettant le blocage de micro-sphères. Une chambre de réaction est constituée de barreaux réalisés
15 lors de la fabrication du dispositif et dont l'espacement est inférieur au diamètre des billes à bloquer. Une fois de plus, l'introduction des billes se fait une fois le système fermé. La solution apportée par cet ensemble de barrières ne permet pas, tout comme
20 dans les dispositifs précédents, de garantir un remplissage exempt de toutes hétérogénéités. Ici, la disposition de la chambre emprisonnant les billes permet de mieux les en extraire à l'aide d'un flux de liquide contraire à celui employé pour le remplissage.
25 Cependant, on peut craindre avec ce système que des amas globaux de billes viennent boucher les canaux et empêcher soit le remplissage, soit la vidange de la chambre. De plus, rien n'est prévu pour assurer un espacement constant entre les billes tout le long du
30 micro-système.

Les auteurs du document [4], cité à la fin de la présente description, présentent une méthode pour assembler, de façon locale, différents types de micro-

billes. Le principe repose sur la génération d'une matrice de disques séparés les uns des autres par une surface hydrophobe. La surface de chacun de ces disques est ensuite chimiquement modifiée par dépôt type
5 « micro-contact printing » qui utilise une matrice préalablement imbibée des produits à déposer. La puce munie de ces disques présentant des groupements réactionnels est ensuite trempée dans une solution contenant des micro-sphères en solution. Ces micro-
10 sphères vont s'adsorber à la surface des disques avec une affinité propre à la nature des groupements réactionnels présents à la surface des micro-sphères et à la surface des disques. Mais ici, du fait même du mode de réalisation du dispositif, on ne peut obtenir
15 qu'une seule couche de billes sur le micro-système.

Les travaux précédemment cités mettent en évidence les intérêts de ces micro-billes, tant sur le point de la facilité d'utilisation que sur le vaste choix des fonctions biochimiques qu'elles peuvent
20 apporter. Cependant, ces dispositifs présentent encore des inconvénients, notamment l'opération de remplissage des micro-systèmes à l'aide de billes fonctionnalisées qui demeure une opération délicate. Concernant ce point en particulier, il est important de noter que
25 l'intégration des micro-billes dans les dispositifs précédemment cités ne se fait qu'après fermeture des réservoirs avec un capot. Ceci implique notamment la réalisation d'un système bloquant les billes à un endroit précis, mais également une gestion, d'une part,
30 du fluide porteur des billes et d'autre part, du dispositif de pompage associé. Ces étapes pourraient être grandement simplifiées s'il était possible d'introduire les billes dans les réservoirs avant

fermeture de ces derniers. Dans ce cas, le remplissage des réservoirs par les micro-billes serait beaucoup plus aisé puisque l'accessibilité serait grandement augmentée. Parallèlement à ce mode de remplissage, il
5 faudrait définir une géométrie de réservoir telle qu'il puisse servir de micro-tamis et assurer un empilement régulier et une localisation précise des micro-billes. Une fois les micro-billes enchâssées dans le réservoir, la fermeture avec un capot permettrait d'assurer son
10 étanchéité. Par ailleurs, si l'on veut insérer des billes de fonctions différentes, il serait intéressant de pouvoir placer ces billes à des endroits déterminés et ainsi contrôler les endroits où doivent avoir lieu les réactions chimiques.

15 Il ressort de ce qui précède qu'il existe un besoin pour un micro-système dont le remplissage avec des micro-billes serait aisé et permettrait également d'obtenir une localisation précise et reproductible desdites billes au sein du micro-système.

20

Exposé de l'invention

Le but de la présente invention est de fournir un micro-système qui réponde, entre autres, à ces besoins.

25 Ce but et d'autres encore sont atteints, conformément à l'invention par un micro-système destiné à recevoir des billes et à obtenir une localisation précise desdites billes à des endroits déterminés dans le micro-système, caractérisé en ce qu'il comporte un
30 réservoir présentant une cavité, ladite cavité munie d'éléments bloquants permettant d'ordonner et d'empiler les billes dans les interstices entre les éléments bloquants, les interstices constituant lesdits endroits

déterminés, un capot fermant hermétiquement la cavité et des moyens d'entrée et des moyens de sortie permettant la circulation d'un fluide dans la cavité.

Avantageusement, les éléments bloquants dudit micro-système peuvent être constitués par des colonnes solidaires du fond de la cavité ou du capot. Le matériau des billes peut être choisi, selon l'application, parmi les matériaux minéraux, les métaux ou les composés organiques selon la fonction qu'elles doivent porter.

Si ledit micro-système est destiné à recevoir des billes ayant toutes le même diamètre, les éléments bloquants peuvent être régulièrement disposés selon un réseau bidimensionnel. Dans ce cas, le choix du réseau pour la disposition des éléments bloquants dans la cavité se fait en fonction du rapport volume de billes sur surface disponible que l'on veut obtenir dans le micro-système, ainsi que du diamètre des billes à y insérer. Les billes placées dans un même interstice ont le même diamètre.

Selon un premier mode de réalisation, le réseau bidimensionnel peut être une maille hexagonale.

Selon un deuxième mode de réalisation, le réseau bidimensionnel peut être une maille carrée.

Si ledit micro-système est destiné à recevoir des billes de diamètres différents, les éléments bloquants seront répartis de façon à obtenir une localisation des billes en fonction de leurs diamètres.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les éléments bloquants seront répartis de manière à constituer des puits destinés à recevoir des billes d'un premier diamètre déterminé et des espaces

entre les puits destinés à recevoir des billes d'un second diamètre déterminé.

Quels que soient les modes de réalisation, les éléments bloquants du micro-système selon
5 l'invention auront une section transversale de forme quelconque. Cependant, de manière avantageuse, leurs sections auront une forme choisie parmi les disques, les ellipses et les polygones.

Selon un mode particulier de réalisation,
10 les éléments bloquants auront une section transversale de la forme d'un hexagone.

Avantageusement, les éléments bloquants auront une hauteur permettant l'empilement d'au moins deux billes.

15 Un autre objet de l'invention consiste en un micro-réacteur.

Selon un premier mode de réalisation, ledit micro-réacteur peut comprendre un micro-système rempli de billes d'un même diamètre et fonctionnalisées de
20 manière identique, enchâssées entre les éléments bloquants.

Selon un autre mode de réalisation, ledit micro-réacteur comprendra un micro-système rempli de billes de même diamètre mais fonctionnalisées
25 différemment, lesdites billes étant enchâssées entre les éléments bloquants, le rapport entre les quantités de billes portant des fonctions différentes étant choisi en fonction de l'effet désiré.

Selon un autre mode de réalisation, ledit
30 micro-réacteur comprendra un micro-système rempli de billes de diamètres différents, chaque diamètre correspondant à une fonctionnalisation différente, lesdites billes étant enchâssées entre les éléments

bloquants ; dans ce dernier mode, les billes d'un même diamètre constituent des zones fonctionnalisées localisées. Par « billes fonctionnalisées », il faut entendre « billes portant une fonction ou plusieurs
5 fonctions différentes ».

Le but de l'invention est également de fournir un procédé de fabrication d'un micro-système selon l'invention, ledit procédé comportant les étapes suivantes :

- 10 - formation, par micro-usinage d'un substrat, du réservoir présentant la cavité munie des éléments bloquants,
- fourniture d'un capot destiné à fermer hermétiquement la cavité du réservoir,
- 15 - formation des moyens d'entrée et des moyens de sortie de fluide par micro-usinage du réservoir et/ou du capot.

Selon un mode de réalisation, ledit micro-usinage sera réalisé par procédé de gravure sèche ou
20 humide d'un matériau.

Selon un autre mode de réalisation, ledit micro-usinage sera réalisé par procédé de moulage d'une empreinte.

Selon un autre mode de réalisation, ledit
25 micro-usinage sera réalisé par procédé de photolithographie.

Un autre objet de l'invention concerne des procédés d'obtention de divers micro-réacteurs.

Tout d'abord, un procédé d'obtention d'un micro-
30 réacteur comprenant un micro-système rempli de billes d'un même diamètre et de même fonction, ledit procédé comportant une étape de remplissage par sédimentation

de billes fonctionnalisées en suspension dans un liquide.

En d'autres termes, le procédé comprend les étapes suivantes :

- 5 - placement du réservoir du micro-système au fond d'un récipient,
- introduction dans le récipient d'une solution contenant les billes fonctionnalisées en suspension et remplissage des interstices de la cavité
- 10 par sédimentation des billes,
- fermeture du réservoir par le capot.

L'invention concerne également un procédé d'obtention d'un micro-réacteur multi-fonctionnel par remplissage d'un micro-système avec des billes

15 fonctionnalisées d'un même diamètre mais de fonctions différentes, ledit procédé comprenant :

- pour les billes fonctionnalisées selon une première fonction, les étapes suivantes :
 - a) placement d'un cache sur le réservoir du
 - 20 micro-système laissant accessible la partie dans laquelle on veut placer les billes d'une première fonction,
 - b) remplissage par sédimentation,
 - c) retrait du cache,

- 25 - pour les billes fonctionnalisées selon une autre fonction, la répétition, autant de fois qu'il y a de fonctions restantes, des étapes a) à c) avec des billes de ladite autre fonction,
- fermeture du réservoir par le capot.

30 Enfin, le procédé d'obtention d'un micro-réacteur multi-fonctionnel par remplissage du micro-système avec des billes dont la fonction est reliée au diamètre desdites billes, ledit procédé comprenant au

moins deux étapes de remplissage, l'ordre des étapes de remplissage correspondant à l'ordre décroissant du diamètre des billes.

En d'autres termes, ledit procédé comprend :

5 - pour les billes de plus gros diamètre, les étapes suivantes :

 a) placement du réservoir du micro-système au fond d'un récipient,

 b) introduction dans le récipient d'une
10 solution contenant les billes et remplissage des interstices de la cavité par sédimentation des billes,

 - pour les billes de plus petit diamètre, la répétition, autant de fois que nécessaire et par ordre décroissant de diamètre, des étapes a) et b),

15 - fermeture du réservoir par le capot.

 Un micro-système à remplissage de billes fonctionnalisées conçu conformément à l'invention présente un certain nombre d'avantages.

 Le dispositif permet de développer une
20 surface de réaction très importante avec en plus une géométrie en trois dimensions.

 De plus, le micro-système selon l'invention et son mode de remplissage, puisqu'il permet d'empiler et de localiser précisément les billes à l'intérieur du
25 micro-système, permet également d'obtenir une multifonctionnalisation en volume par dépôts de micro-billes ayant des fonctions différentes. En effet, comme on l'a vu précédemment, on peut intégrer des micro-billes de natures différentes sur un même dispositif.

30 Par ailleurs, en garantissant un espace inter-billes contrôlé dans tout le micro-système, il n'y a plus de risque d'agrégat des billes conduisant à un bouchage du micro-système.

Ce dispositif permet également une étape de remplissage aisé.

De même, l'expulsion des micro-billes est facilitée. En effet, si le scellement du réacteur n'est pas définitif, le capot peut être enlevé. Dans ce cas, le passage du micro-réacteur dans une solution de rinçage couplé à une agitation par ultrasons permet d'expulser les micro-billes de leur logement. Il suffit ensuite de recommencer l'opération de remplissage pour pouvoir disposer à nouveau d'un dispositif. Ce procédé permet alors, soit de réactiver la fonction apportée par les billes qui peut se dégrader dans le temps, soit de changer la fonction réalisée par le micro-réacteur tout en gardant sa géométrie.

Par ailleurs, l'invention concerne également un procédé pour réaliser une réaction chimique, électrochimique, biochimique ou biologique dans lequel on fait circuler un courant de fluide dans un micro-réacteur selon l'invention, afin qu'au moins un constituant dudit courant de fluide réagisse avec les billes préfonctionnalisées susceptibles de produire une réaction chimique, électrochimique, biologique ou biochimique, et on recueille à la(les) sortie(s) du micro-réacteur un courant de fluide comprenant le(les) produit(s) de ladite réaction.

Selon un mode préféré de l'invention, ladite réaction est une réaction de type enzyme substrat et lesdites billes préfonctionnalisées susceptibles de produire une réaction biologique ou biochimique sont des enzymes, ledit constituant du courant de fluide est un substrat de l'enzyme, et les produits de la réaction sont les produits issus de la réaction dudit enzyme avec ledit substrat.

Selon un autre mode de l'invention, ladite réaction est une réaction de digestion enzymatique par une protéase, lesdites billes préfonctionnalisées susceptibles de produire une réaction biologique ou
5 biochimique sont des protéases et lesdits constituants du courant de fluide sont des peptides ou des protéines et les produits de la réaction sont des segments peptidiques.

Avantageusement, ladite enzyme est la
10 trypsine.

Ces modes de l'invention illustrent des applications dans le domaine biologique, mais bien d'autres applications peuvent être concernées dans les domaines de la chimie (par exemple de la chimie fine),
15 de l'électrochimie et de la biochimie, en particulier dans tous les cas où les réactions nécessitent l'utilisation de réactifs rares et/ou onéreux pour n'avoir à mettre en jeu que de petites quantités de réactifs.

20

Brève description des dessins

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

- la figure 1 est une vue de dessus en perspective du micro-système,
- la figure 2 est une vue de dessus
30 partielle du micro-système de la figure 1 rempli avec des billes et illustrant un des arrangements possibles des éléments bloquants et desdites billes,

- la figure 3 est une coupe de la figure 2 selon l'axe III/III,

- les figures 4, 5 et 6 sont des vues de dessus partielles du micro-système rempli de billes
5 illustrant divers arrangements possibles des éléments bloquants et desdites billes,

- les figures 7A à 7F illustrent la fabrication par procédé de gravure sèche d'un micro-système selon l'invention.

10

Description détaillée de modes de réalisation de l'invention

En se reportant à la figure 1, on peut voir le micro-système 1 selon l'invention destiné à recevoir
15 des billes et qui comporte :

- un réservoir 3 présentant une cavité 4, ladite cavité 4 étant munie d'éléments bloquants 5 permettant d'ordonner et d'empiler les billes dans les interstices entre les éléments bloquants 5,

20 - un capot 7 fixé hermétiquement au réservoir 3,

- et un moyen d'entrée 8 et un moyen de sortie 9 permettant la circulation d'un fluide dans la cavité.

25 Selon la manière dont les éléments bloquants vont être distribués dans le réservoir, on n'aura pas la même densité de billes. C'est l'arrangement spatial et la hauteur des éléments bloquants qui vont définir respectivement la surface d'accessibilité et le volume
30 à occuper par les billes.

Dans un mode de réalisation particulier où l'on veut insérer des billes d'un même diamètre, les éléments bloquants sont régulièrement disposés selon un

réseau bidimensionnel particulier. Ainsi, à partir d'un arrangement de colonnes hexagonales disposées selon une maille hexagonale, on obtient un empilement des micro-billes 2 dans les interstices 6 entre les colonnes 5 tel que celui représenté dans la figure 2. On voit sur cette figure que les billes 2 sont localisées dans les parties des interstices 6 délimitées par les arêtes de trois colonnes adjacentes.

La vue en coupe de la figure 2 selon l'axe III/III (figure 3) permet de bien visualiser l'empilement des micro-billes 2 entre les colonnes 5.

Sur la figure 4, les colonnes 15 sont aussi disposées selon une maille hexagonale mais l'écartement entre celles ci a été volontairement choisi plus petit : seules des billes 12 de plus petits diamètres que les billes des figures 2 ou 3 peuvent être insérées dans les interstices 16.

A partir du même raisonnement, plusieurs types de matriçage peuvent être envisagés dès lors que l'on peut modifier l'arrangement spatial des colonnes. Ainsi, en disposant les colonnes 25, de section hexagonale, selon un réseau carré, on obtient l'arrangement décrit sur la figure 5 : des billes 22 d'un diamètre déterminé sont insérées dans les parties des interstices 26 délimitées par les faces de quatre colonnes adjacentes.

On peut également insérer des billes de diamètres différents à l'intérieur du micro-système. Dans la figure 6, les éléments bloquants 35 sont répartis de manière à constituer des puits destinés à recevoir les billes de gros diamètre 32a et les billes de petit diamètre 32b vont se loger dans les espaces 36 entre les puits. On voit qu'ici ce ne sont pas les

éléments bloquants en eux même mais bien un ensemble d'éléments bloquants (les puits) qui sont répartis selon un réseau bidimensionnel particulier, qui est ici hexagonal. Ces puits peuvent aussi être constitués par des colonnes creuses dont l'enveloppe remplace les éléments bloquants 35.

Dans la réalisation du micro-réacteur, on peut distinguer deux étapes :

- la première étape consiste à réaliser le micro-système en lui-même, c'est à dire disposer l'ensemble des éléments servant à bloquer les billes à l'intérieur du réservoir,
- la deuxième étape se rapporte à l'implantation desdites billes entre lesdits éléments bloquants.

La première étape, c'est à dire l'étape de micro-usinage du micro-système, peut être obtenue de plusieurs façons distinctes : soit par gravure sèche ou humide d'un matériau, soit par moulage d'une empreinte, soit par photolithographie.

Comme exemple non limitatif et illustratif d'une méthode de micro-usinage, on choisit d'explicitement la fabrication d'un micro-réacteur en silicium par gravure sèche, en référence aux figures 7A à 7F jointes. Mais d'autres matériaux sont utilisables : par exemple, le verre, la silice, les résines, les polymères, voire même les métaux. Le matériau sera choisi selon l'application.

Tout d'abord, on dépose sur un substrat en silicium de quatre pouces (soit 10,16 cm), de type <100> et d'épaisseur 525 µm, une couche de résine photosensible positive 40 par « spin-coating » (dépôt à la tournette) et en utilisant comme promoteur

d'adhérence le produit HMDS que l'on fait chauffer à 150°C pendant 60 secondes (voir la figure 7A). On étale la résine à une vitesse de 4000 tr/min pendant 30 secondes et pour une accélération de 1500 tr/min/s.

5 Puis on fait sécher le substrat recouvert de résine pendant 60 secondes à 115°C.

On procède ensuite à une lithographie à l'aide d'un faisceau insolateur UV 42 qui passe au travers d'un masque 43 pourvu de n motifs définissant la géométrie du réservoir du micro-système (voir la figure 7B).

Selon la figure 7C, on procède ensuite à un développement sur track (SHIPLEY® MF 319) pendant 60 secondes, puis on recuit le substrat muni de sa résine à 115°C pendant 2 minutes. Après, le motif est soumis à une désoxydation des fonds de motif à l'aide d'un appareil RIE Nextral NE110 dans une atmosphère de CHF₃/O₂ à un rapport de débit de 50/10 cm³ normaux/minutes (50/10 sccm), sous une pression de 13,332 Pa (100 mT), avec une puissance de 30 W, pendant 1 minute.

Ensuite, selon la figure 7D, on grave les zones non protégées par la résine à l'aide d'un appareil de gravure profonde du type DRIE ICP. On obtient ainsi les éléments bloquants 45. Pour les cycles de gravure, on utilise du SF₆ et les paramètres suivants : 129 cm³ normaux/minutes (129 sccm), 5,133 Pa (38,5 mT) et 600 W. Pour les cycles de passivation, on utilise du C₄F₈ et les paramètres suivants : 85 cm³ normaux/minutes (85 sccm), 3,733 Pa (28 mT) et 600 W. On précise que le rapport des temps de gravure par rapport aux temps de passivation est ajusté pour obtenir des flancs droits.

L'étape suivante consiste à décaper le masque de résine à l'aide d'acide nitrique HNO_3 fumant sous ultrasons pendant 5 minutes.

Les flancs de la gravure sont alors
5 nettoyés par oxydation en four à tube sous oxygène pendant 50 minutes à $1\,000^\circ\text{C}$ et puis par désoxydation chimique à l'aide de HF pendant quelques secondes (figure 7E).

On réalise ensuite une oxydation 44 épaisse
10 des motifs sur une épaisseur de $3\,\mu\text{m}$ dans un four à tube sous vapeur d'eau à $1\,000^\circ\text{C}$ pendant 18 heures et 50 minutes (figure 7F).

En utilisant une de ces méthodes de micro-usinage, il faut également creuser les moyens d'entrée
15 et les moyens de sortie d'un fluide dans le micro-système. Ces moyens d'entrée et de sortie de fluide peuvent être faits dans le réservoir et/ou dans le capot.

Après cette succession d'étapes, nous
20 obtenons un dispositif semblable à celui montré sur la figure 1, où les moyens d'entrée et de sortie de fluide ont été creusés dans le réservoir.

Selon une variante non illustrée, les moyens d'entrée et de sortie peuvent être dans le
25 capot, ou indifféremment dans le capot et dans le réservoir.

Il faut à présent commencer la deuxième étape : l'étape d'implantation des billes au sein du
30 micro-système.

La voie d'accès la plus aisée pour le remplissage avec les micro-billes est par-dessus les éléments bloquants. Ceci peut être aisément réalisé en

plaçant le micro-système à remplir au fond d'un récipient. Une certaine quantité de micro-billes d'un diamètre déterminé est mise en suspension dans un liquide dont la viscosité et la densité sont connues.

5 L'homogénéité de la solution peut être augmentée si l'on utilise des ultrasons afin d'éviter tout agrégat de micro-billes ou bien si l'on ajoute du surfactant à la solution. Cette suspension est ensuite versée dans le récipient contenant le dispositif à remplir. Les

10 micro-billes en suspension sédimentent et viennent remplir les espaces libres ou interstices entre les éléments bloquants.

Le temps minimal au bout duquel le

15 dispositif peut être retiré de la suspension est relié à la loi de Stokes déterminant le temps de sédimentation d'une sphère dans un milieu liquide selon l'équation :

$$t_{\text{sédimentation}} = \frac{9n}{2 \times g \times a^2 \times (\rho_1 - \rho_2)} \times d$$

20 Avec,

n : coefficient de viscosité du milieu liquide (g/cm.s),

d : hauteur maximale de liquide (cm),

g : constante (cm/s²),

25 a : rayon des micro-sphères (cm),

ρ_1 : masse volumique des micro-sphères (g/cm³),

ρ_2 : masse volumique du milieu liquide (g/cm³).

30

Par exemple, le temps de sédimentation d'une bille en polystyrène de 5 micromètres de diamètre et pour une hauteur de 1 cm est de l'ordre de 4 heures.

Enfin, il faut empêcher les billes de
5 sortir du micro-système. Pour cela, on fixe hermétiquement le capot 7 sur le réservoir 3 (voir figure 1).

Il y a plusieurs manières de fixer ce capot. Par exemple, le réservoir du micro-réacteur peut
10 être capoté par une plaque en PDMS (polydiméthylsiloxane), comportant ou non des moyens d'entrée et/ou de sortie, après traitement dudit capot et du réservoir par un plasma d'oxygène, tel que décrit dans la littérature. Dans ce cas, le PDMS est connu
15 pour avoir des propriétés d'adhésion spontanée sur la plupart des supports solides. Dans le cas d'un micro-réacteur à capot amovible, la plaque de PDMS est simplement pressée sur le réservoir, cela suffit à obtenir une bonne étanchéité tout en préservant la
20 possibilité de réouverture du micro-réacteur ultérieurement après utilisation par un simple retrait de la plaque de PDMS. Le PDMS est cité à titre d'exemple mais d'autres matériaux polymères sont possibles.

25 Le réservoir du micro-réacteur peut être aussi, par exemple, capoté par scellement moléculaire d'une plaque de silice ou d'une plaque de verre, comportant ou pas des moyens d'entrée et/ou de sortie, après nettoyage et préparation chimique des deux
30 substrats hydroxylés (substrat SiO_2 sur silicium/capot verre ou silice). La présence de sites silanols (SiOH) en surface attire spontanément les molécules d'eau, et les deux pièces du micro-composant, à savoir le capot 7

et le réservoir 3, collent l'une à l'autre par l'intermédiaire de molécules d'eau. Par chauffage, une partie de l'eau contenue entre les deux surfaces est éliminée jusqu'à l'obtention d'environ trois couches de
5 molécules d'eau qui rendent possible l'adhésion.

Ou bien le réservoir du micro-réacteur peut être, par exemple, capoté par scellement anodique d'une plaque de verre, comportant ou pas des moyens d'entrée et/ou de sortie.

10 Ou bien le réservoir du micro-réacteur peut être, par exemple, capoté par collage d'une plaque polymère choisie par l'utilisateur, comportant ou pas des moyens d'entrée et/ou de sortie, en utilisant, par exemple, un procédé de dépôt de colle par sérigraphie.

15 Ce type de collage est constitué de trois étapes principales : la sérigraphie, qui consiste à appliquer de la colle uniquement sur certaines zones du substrat, le collage qui consiste à mettre en contact le substrat enduit localement de colle et le capot, et,
20 enfin, le chauffage qui induit la polymérisation de la colle. La polymérisation peut s'effectuer par voie photochimique si la colle est polymérisable sous UV.

Enfin, le réservoir du micro-réacteur peut être, par exemple, capoté par scellement direct
25 silicium/silicium (SDB : Silicon Direct Bonding, en anglais) à une plaque de silicium, comportant ou pas des moyens d'entrée et/ou de sortie.

Selon l'invention, on peut également réaliser un micro-réacteur multi-fonctionnel en volume
30 en déposant, dans le réservoir du micro-système, des micro-billes ayant des fonctions différentes. En effet, sur un même dispositif, on peut intégrer des micro-billes de natures différentes selon plusieurs méthodes.

La première méthode nécessite l'emploi de billes fonctionnalisées d'un même diamètre mais ayant des fonctions différentes et fait intervenir un masquage de la zone à ne pas remplir par sédimentation.

5 La deuxième façon d'obtenir des micro-billes présentant des fonctions différentes dans un même micro-système peut se faire en disposant les éléments bloquants dans le réservoir avec des écartements différents. La sélectivité des zones de la
10 cavité ayant différentes fonctions est alors liée au diamètre des différentes micro-sphères comportant ces fonctions. Le remplissage par sédimentation doit alors toujours débiter par les micro-sphères les plus grosses.

15 Un exemple du résultat obtenu est visible dans la figure 6, où l'on a utilisé deux diamètres de billes 32a et 32b et des éléments bloquants 35 répartis de manière à constituer des puits.

20 Quelques exemples d'application :

Le micro-réacteur selon l'invention peut être utilisé dans plusieurs applications différentes dans le domaine des réactions chimiques, électrochimiques, biochimiques ou biologiques.

25 Le micro-réacteur selon l'invention peut ainsi être utilisé dans le domaine de la biochimie, notamment, par exemple, dans une réaction de digestion enzymatique. Pour cela, on peut utiliser des micro-billes, poreuses ou non, fonctionnalisées avec de la
30 trypsine, puis introduites dans le micro-système selon l'invention. On va alors faire circuler un courant de fluide dans ledit micro-réacteur de sorte qu'au moins un constituant dudit courant de fluide réagisse avec

les billes préfonctionnalisées susceptibles de produire une réaction biologique ou biochimique, et on recueille à la(les) sortie(s) 9 du micro-réacteur un courant de fluide comprenant le(les) produit(s) de ladite
5 réaction.

Le micro-réacteur selon l'invention peut également être utilisé en analyse.

Par exemple, le micro-système rempli de billes selon l'invention peut être utilisé pour les
10 chromatographies de partage. On utilise pour cela des micro-billes, poreuses ou non, supportant des phases greffées polaires (-CN, -NH₂) que l'on introduit dans le micro-système.

On peut également utiliser des micro-
15 billes, poreuses ou non, supportant des phases greffées apolaires que l'on introduit dans le micro-système pour réaliser une chromatographie type échangeuse d'ions.

Le micro-système rempli de billes selon l'invention peut également être utilisé pour réaliser
20 des chromatographies d'exclusion.

Dans ce but, on utilisera des billes poreuses dont les diamètres des pores seront adaptés au degré d'exclusion désiré.

Le micro-système rempli de billes selon
25 l'invention peut aussi être utilisé pour réaliser des chromatographies d'affinité. On utilisera alors des micro-billes, poreuses ou non, supportant un effecteur présentant une affinité biologique (enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps) pour un soluté
30 d'un échantillon à analyser.

Pour effectuer une chromatographie d'affinité enzyme-substrat, on pourra notamment prendre comme effecteurs des substrats ou analogues, des

inhibiteurs réversibles, des effecteurs allostériques ou des coenzymes.

Ou encore, pour effectuer une chromatographie d'affinité ligand-récepteur, on
5 utilisera des haptènes, des antigènes ou des anticorps.

Pour effectuer une chromatographie d'affinité antigène-anticorps, on prendra par exemple des hormones, des peptides ou des analogues peptidiques.

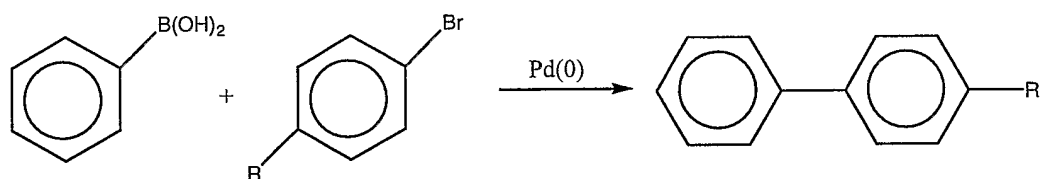
10 Le micro-réacteur selon l'invention peut aussi être utilisé dans des réactions chimiques.

Le micro-réacteur permet en effet de créer un système générant un parfait support catalytique en permettant l'ordonnancement de micro-billes poreuses
15 imprégnées de catalyseur. Cet ordonnancement géométrique des micro-billes permet, d'une part, d'augmenter très sensiblement le rapport surface sur volume et, d'autre part, d'obtenir une distribution homogène du flux à l'intérieur du réacteur.

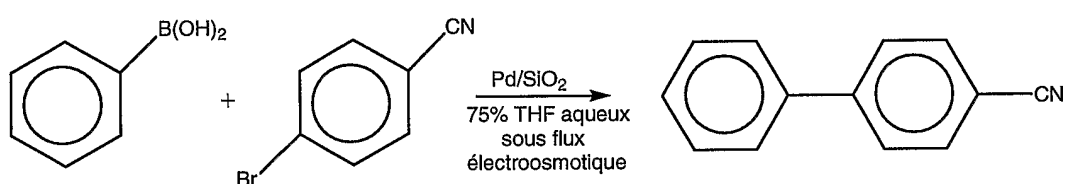
20 De plus, les billes poreuses utilisées peuvent être un mélange de billes portant différents types de catalyseurs (par exemple : Pd, Pt, Rh...).

La surface interne du micro-réacteur peut elle-même être recouverte d'une couche catalytique,
25 notamment par traitement chimique de surface, par sputtering ou par co-évaporation.

Un nombre important de réactions catalytiques en phase liquide peuvent être transposées dans un micro-réacteur, comme par exemple la réaction
30 de couplage de Suzuki :



On peut citer également le couplage entre
le 4-bromobenzonitrile et l'acide phénylboronique qui
5 peut être réalisé sous flux électro-osmotique :



10 L'efficacité des micro-réacteur concernant
l'augmentation des rendements réactionnels à l'échelle
microscopique a été démontrée dans le document [5].

REFERENCES

- [1] R.D. OLESCHUK, L.L. SHULTZ-LOCKYEAR, Y. NING, D.J. HARRISON, *Analytical Chemistry* 72, 585-590 (2000).
- 5 [2] C. WANG, R. OLESCHUK, F. OUCHEN, J. LI, P. THIBAUT, D.J. HARRISON, *Rapid Communications In Mass Spectrometry* 14, 1377-1383 (2000).
- 10 [3] H. ANDERSSON, W. van der WIJNGAART, P. ENOKSSON, G. STEMME, *Sensors and Actuators B* 67, 203-208 (2000).
- 15 [4] H. ANDERSSON, C. JONSSON, C. MOBERG, G. STEMME, *Micro Total Analysis Systems*, J.M. RAMSEY and Van den BERG (eds.), (Kluwer academic Publishers, 2001).
- 20 [5] G.M. GREENWAY, S.J. HASWELL, D.O. MORGAN, V. SKELTON and P. STYRING, *Sensors & Actuators B* 63, 153 (2000).

REVENDICATIONS

1. Micro-système destiné à recevoir des billes et à obtenir une localisation précise desdites
5 billes à des endroits déterminés dans le micro-système, caractérisé en ce qu'il comporte :

- un réservoir (3) présentant une cavité (4), ladite cavité (4) munie d'éléments bloquants (5,15,25,35) permettant d'ordonner et d'empiler les
10 billes (2,12,22,32a,32b) dans les interstices (6,16,26,36) entre les éléments bloquants (5,15,25,35), les interstices (6,16,26,36) constituant lesdits endroits déterminés,

- un capot (7) fixé hermétiquement au
15 réservoir (3),

- et des moyens d'entrée (8) et des moyens de sortie (9) permettant la circulation d'un fluide dans la cavité (4).

20 2. Micro-système selon la revendication 1 caractérisé en ce que les éléments bloquants (5,15,25,35) sont constitués par des colonnes solidaires du fond de la cavité ou du capot.

25 3. Micro-système selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que, les billes (2,12,22) ayant toutes le même diamètre, les éléments bloquants (5,15,25) sont régulièrement disposés selon un réseau bidimensionnel.

30

4. Micro-système selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que, le micro-système (1) devant recevoir des billes (32a,32b) de diamètres différents,

les éléments bloquants (35) sont répartis de façon à obtenir une localisation des billes (32a,32b) en fonction de leurs diamètres.

5 5. Micro-système selon la revendication 4 caractérisé en ce que les éléments bloquants (35) sont répartis pour constituer des puits destinés à recevoir des billes (32a) d'un premier diamètre déterminé et des
10 (32b) d'un second diamètre déterminé.

 6. Micro-système selon la revendication 3 caractérisé en ce que le réseau bidimensionnel est une maille hexagonale.

15

 7. Micro-système selon la revendication 3 caractérisé en ce que le réseau bidimensionnel est une maille carrée.

20 8. Micro-système selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les éléments bloquants (5,15,25,35) ont une section transversale de forme choisie parmi les disques, ellipses, et polygones.

25

 9. Micro-système selon la revendication 8 caractérisé en ce que les éléments bloquants (5,15,25,35) ont une section transversale de la forme d'un hexagone.

30

 10. Micro-système selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que

les éléments bloquants (5,15,25,35) ont une hauteur permettant l'empilement d'au moins deux billes.

11. Micro-réacteur comprenant un micro-
5 système selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3, 6 à 10 et des billes (2,12,22), d'un même diamètre et de même fonction, enchâssées entre les éléments bloquants (5,15,25).

10 12. Micro-réacteur comprenant un micro-système selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3, 6 à 10 et des billes (2,12,22), de même diamètre mais fonctionnalisées différemment, enchâssées entre les éléments bloquants (5,15,25).

15 13. Micro-réacteur comprenant un micro-système selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 4, 5, 8 à 10 et des billes (32a,32b), de même fonction mais de diamètres différents, enchâssées entre les
20 éléments bloquants (5,15,25,35).

14. Micro-réacteur comprenant un micro-système selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 4, 5, 8 à 10 et des billes (32a,32b), de diamètres et
25 de fonctions différents, enchâssées entre les éléments bloquants (5,15,25,35).

15. Procédé de fabrication d'un micro-système selon l'une quelconque des revendications 1 à
30 10, ledit procédé comportant les étapes suivantes :

- formation, par micro-usinage d'un substrat (41), du réservoir présentant la cavité munie des éléments bloquants (45),

- fourniture d'un capot (7) destiné à fermer hermétiquement la cavité (4) du réservoir (3),
 - formation des moyens d'entrée (8) et des moyens de sortie (9) de fluide par micro-usinage du
- 5 réservoir (3) et/ou du capot (7).

16. Procédé selon la revendication 15, dans lequel le micro-usinage est réalisé par procédé de gravure sèche ou humide d'un matériau.

10

17. Procédé selon la revendication 15, dans lequel le micro-usinage est réalisé par procédé de moulage d'une empreinte.

15

18. Procédé selon la revendication 15, dans lequel le micro-usinage est réalisé par procédé de photolithographie.

19. Procédé d'obtention du micro-réacteur

20 selon la revendication 11, ledit procédé comportant une étape de remplissage par sédimentation de billes fonctionnalisées en suspension dans un liquide.

20. Procédé d'obtention d'un micro-réacteur

25 multi-fonctionnel par remplissage du micro-système, selon la revendication 3, avec des billes fonctionnalisées d'un même diamètre mais de fonctions différentes, caractérisé en ce que ledit procédé comprend :

30 - pour les billes fonctionnalisées selon une première fonction, les étapes suivantes :

a) placement d'un cache sur le réservoir (3) du micro-système laissant accessible la partie dans

laquelle on veut placer les billes d'une première fonction,

b) remplissage par sédimentation,

c) retrait du cache (7),

5 - pour les billes fonctionnalisées selon une autre fonction, la répétition, autant de fois qu'il y a de fonctions restantes, des étapes a) à c) avec des billes de ladite autre fonction,

10 - fermeture du réservoir (3) par le capot (7).

21. Procédé d'obtention d'un micro-réacteur multi-fonctionnel par remplissage du micro-système selon l'une des revendications 4 ou 5 avec des billes
15 dont la fonction est reliée au diamètre desdites billes, caractérisé en ce que ledit procédé comprend au moins deux étapes de remplissage, l'ordre des étapes de remplissage correspondant à l'ordre décroissant du diamètre des billes.

20

22. Procédé pour réaliser une réaction biochimique ou biologique dans lequel on fait circuler un courant de fluide dans un micro-réacteur selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, afin qu'au moins
25 un constituant dudit courant de fluide réagisse avec les billes (2,12,22,32a,32b) préfonctionnalisées susceptibles de produire une réaction chimique, électrochimique, biologique ou biochimique, et on recueille à la(les) sortie(s) (9) du micro-réacteur un
30 courant de fluide comprenant le(les) produit(s) de ladite réaction.

23. Procédé selon la revendication 22, dans lequel ladite réaction est une réaction de type enzyme substrat, lesdites billes (2,12,22,32a,32b) préfonctionnalisées susceptibles de produire une
5 réaction biologique ou biochimique sont des enzymes, ledit constituant du courant de fluide est un substrat de l'enzyme, et les produits de la réaction sont les produits issus de la réaction dudit enzyme avec ledit substrat.

10

24. Procédé selon la revendication 22, dans lequel ladite réaction est une réaction de digestion enzymatique par une protéase, lesdites billes (2,12,22,32a,32b) préfonctionnalisées susceptibles de
15 produire une réaction biologique ou biochimique sont des protéases et lesdits constituants du courant de fluide sont des peptides ou des protéines et les produits de la réaction sont des segments peptidiques.

20

25. Procédé selon la revendication 24, dans lequel l'enzyme est la trypsine.

1 / 4

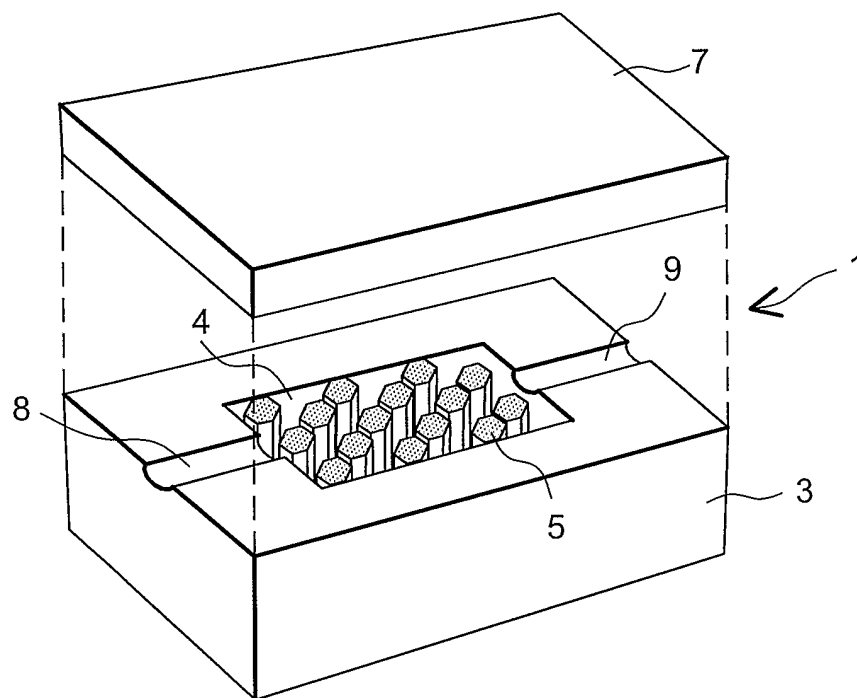


FIG. 1

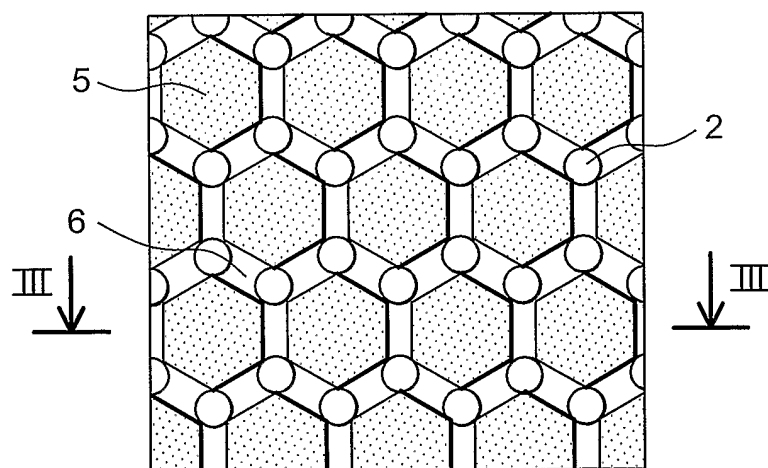


FIG. 2

2 / 4

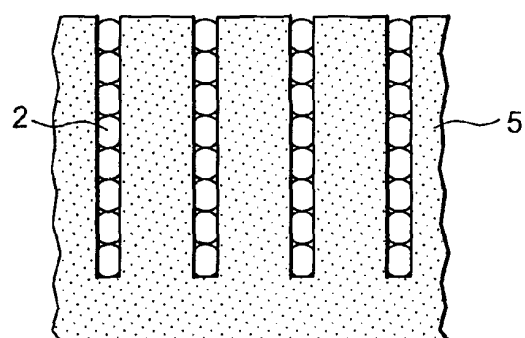


FIG. 3

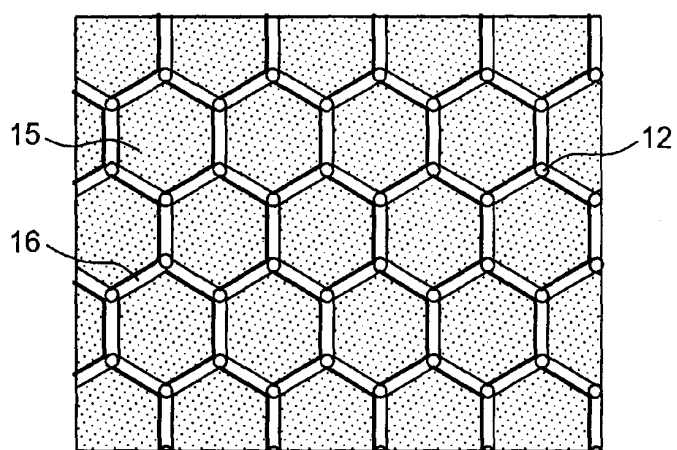


FIG. 4

3 / 4

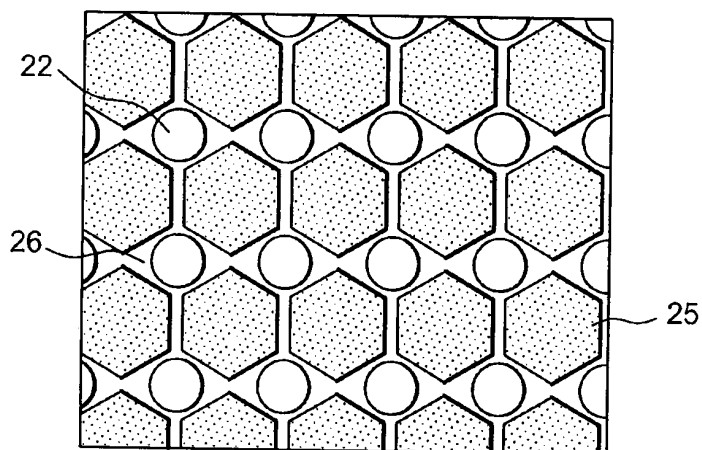


FIG. 5

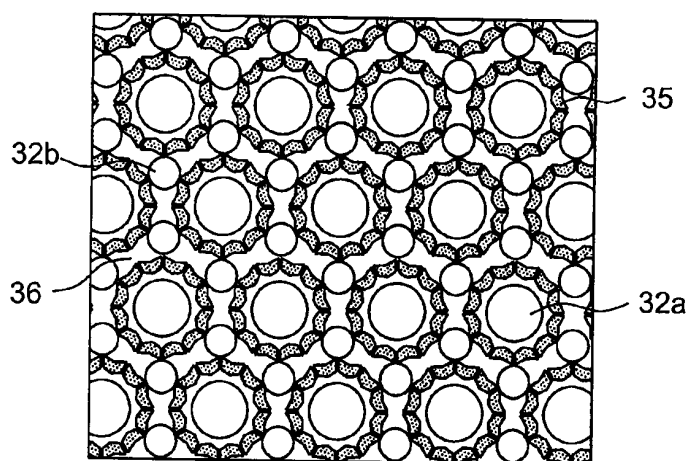


FIG. 6

FIG. 7A

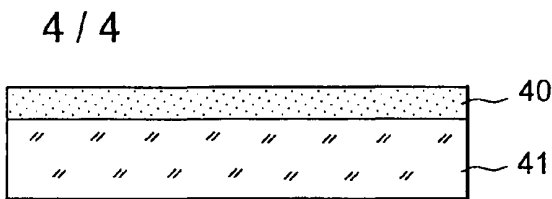


FIG. 7B

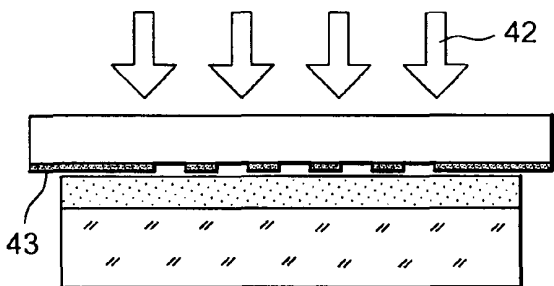


FIG. 7C

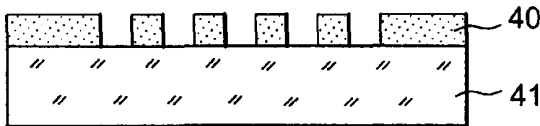


FIG. 7D

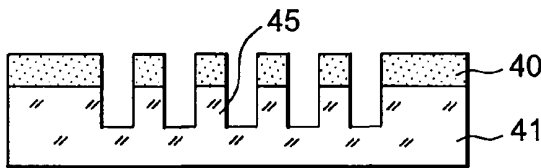


FIG. 7E

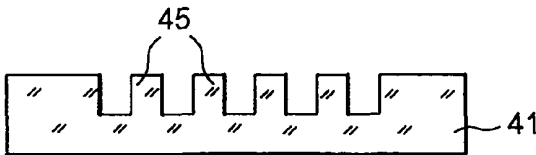


FIG. 7F

