
Système de photodétection CMOS pour microanalyses biochimiques

Patrick Pittet* — **Jean-Marc Galvan**** — **Guo-Neng Lu***
Loïc Blum*** — **Béatrice Leca-Bouvier*****

* Laboratoire d'Electronique, Nanotechnologies, Capteurs (LENAC) – EA 3730

** Département d'Electronique, Télécommunications et Informatique – UMR 5511
CPE-CNRS 43, bd du 11 Novembre 1918, F-69616 Villeurbanne

*** Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire (LGEB) – UMR 5013
UCB-CNRS Université Claude Bernard, 43 bd du 11 Novembre 1918, F-69622
Villeurbanne

Patrick.Pittet@lenac.univ-lyon1.fr – Galvan@cpe.fr – Guo-Neng.Lu@lenac.univ-lyon1.fr
Loic.Blum@univ-lyon1.fr – Beatrice.Leca@univ-lyon1.fr

RÉSUMÉ. Un système de photodétection CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) a été conçu pour des microanalyses biochimiques basées sur des mesures d'absorbance ou de fluorescence. Il comporte quatre modules principaux pour mettre en œuvre l'excitation, l'interface microfluidique/optique, la détection optique et le traitement des signaux. Des solutions technologiques sont proposées pour la réalisation de chacun de ces quatre modules. Ce système de photodétection offre une excellente sensibilité avec une limite de détection en fluorescence évaluée à $5 \cdot 10^{-19}$ moles d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) sur un échantillon de 5 nL. Ce système a été testé et validé pour des mesures de pH par détection de fluorescence et pour des mesures d'absorbance en électrophorèse capillaire. Pour ces applications, une très bonne corrélation a été observée entre les mesures réalisées avec le système proposé et les résultats obtenus sur les mêmes solutions avec des équipements conventionnels.

ABSTRACT. A photodetection CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) system has been designed for absorbance and fluorescence based biochemical microanalysis. It consists in four main blocks for the implementation of the excitation, the microfluidic/optical interface, the optical detection and the signal processing. Technological solutions are proposed for each block. A very high sensitivity is achieved by this photodetection system with an optical detection limit estimated for fluorescence at a level of $5 \cdot 10^{-19}$ moles of fluorescein isothiocyanate (FITC) with a 5 nL sample. This system has been tested and validated for pH measurements based on fluorescence detection and for capillary electrophoresis absorbance measurements. Results achieved by the proposed system are in a very good agreement with measurements performed with commercially available analysis systems.

MOTS-CLÉS: Photodétecteur CMOS, microanalyse, microfluidique, fluorescence, absorbance.

KEYWORDS: CMOS photodetector, microanalysis, microfluidic, fluorescence, absorbance.

1. Introduction

Depuis quelques années, de nombreux travaux de recherche dans les domaines biomédical et biochimique ont été réalisés pour développer des systèmes à faibles coûts de microanalyse opérants sur de très faibles volumes d'échantillons biologiques. Ces développements concernent de nombreuses applications biochimiques comme, par exemple, l'immunologie [WAN 99], la séparation des protéines, le séquençage de l'ADN [SMI 86] [CHE 02], la criminologie [TAG 98]. Ces applications nécessitent une grande sensibilité de détection et une bonne sélectivité. Afin d'obtenir ces performances, l'analyse de fluorescence ou d'absorbance utilise souvent comme systèmes de détection des tubes photomultiplicateurs ou des caméras CCD refroidies [HOO 90]. Malgré leur grande sensibilité, ces systèmes présentent l'inconvénient d'être très coûteux et peu intégrables.

Dans ce cadre, nous avons développé un système portable comprenant un module d'excitation et un module de détection. Ces modules sont couplés par des fibres optiques à un module d'interface microfluidique/optique contenant la solution fluorescente à détecter. Le système de détection utilise un photodétecteur à double jonction enterrée (« Buried Double p-n Junction » - BDJ) réalisé dans une technologie CMOS standard [LU 96], associé à une électronique permettant une pré-amplification faible bruit. Après conversion analogique/numérique, le signal est transmis à un PC portable où une démodulation synchrone numérique et d'autres fonctions de traitement du signal sont réalisées [PIT 04].

Ce dispositif est sensible à la fois à l'intensité du rayonnement transmis ou émis et à sa longueur d'onde. Cette propriété le rend particulièrement intéressant pour l'analyse de fluorescence et d'absorbance où il permet de déterminer à la fois la concentration et la nature des molécules fluorescentes présentes dans une solution.

Dans cet article, nous présentons le système de photodétection conçu, réalisé et testé pour différentes applications. Les principaux résultats en terme de limite de détection (LOD) en fluorescence, de mesures d'absorbance et de pH sont également présentés. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus avec des systèmes commerciaux d'analyse de fluorescence et d'absorbance.

2. Architecture

Le système de photodétection comprend quatre modules : un module d'excitation, un module d'interface microfluidique/optique, un module de détection et un module de traitement numérique du signal (figure 1).

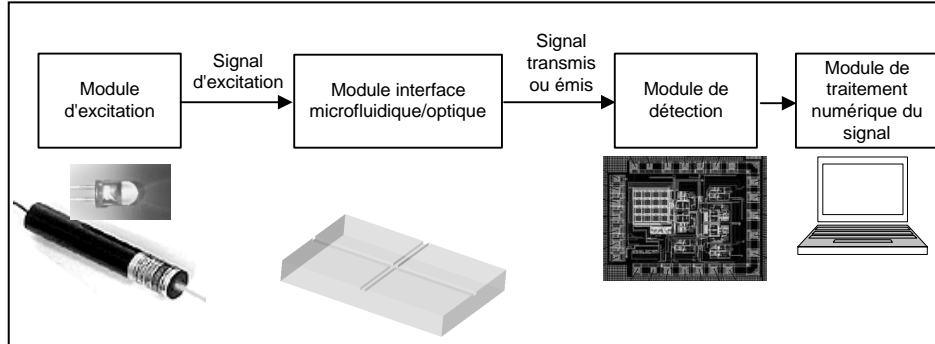


Figure 1. Architecture du système de photodétection

Selon qu'il s'agisse de mesures d'absorbance ou de fluorescence, le module de détection opère respectivement sur le signal transmis ou sur le signal émis par la solution [BER 96] [CHE_a 01] [WIL 93].

D'après la loi de Beer-Lambert, l'absorbance $A(\lambda)$ de la solution s'écrit sous la forme :

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) l C \quad [1]$$

avec $\varepsilon(\lambda)$ le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde λ , l la longueur du trajet optique et C la concentration de la solution. Pour les mesures d'absorbance, le signal transmis $\phi_{tr}(\lambda)$ est donné par :

$$\phi_{tr}(\lambda) = \phi_{ex}(\lambda) 10^{-A(\lambda)} \quad [2]$$

où $\phi_{ex}(\lambda)$ représente le signal d'excitation. Pour les mesures de fluorescence, le signal émis $\phi_{em}(\lambda)$ est donné par :

$$\phi_{em}(\lambda) = \eta \phi_{ex}(\lambda) (1 - 10^{-A(\lambda)}) \quad [3]$$

avec η le rendement de fluorescence de la molécule excitée.

Du fait des volumes (quelques nanolitres), des concentrations (quelques nanomolaires) de solution mis en jeu et des trajets optiques (quelques micromètres), une grande sensibilité de détection est requise pour mesurer les faibles variations du signal optique transmis ou les très faibles niveaux de signaux émis.

2.1. Module d'excitation

La longueur d'onde d'excitation est choisie en fonction du spectre d'absorption de la molécule étudiée. Le module d'excitation est connecté au module d'interface microfluidique par l'intermédiaire d'une fibre optique multimode en silice fondue.

La source d'excitation est modulée en ON/OFF pour être compatible avec les méthodes de traitement du signal mises en œuvre.

Nous avons utilisé soit une diode laser violette (modèle PPMT de Power Technology Inc.) à la longueur d'onde de 407 nm (pour évaluer la limite de détection en fluorescence), soit des diodes électroluminescentes (LED) à des longueurs d'onde de 405 nm, 470 nm et 660 nm (pour les mesures d'absorbance et de pH).

2.2. Module d'interface microfluidique/optique

Le module d'interface microfluidique/optique est constitué d'un microdispositif en polydiméthylsiloxane (PDMS) comportant un réseau de microcanaux. Les microcanaux de ce dispositif sont utilisés pour le guidage des fibres optiques, des microcapillaires et/ou directement comme canaux microfluidiques [ROS 04].

Les microdispositifs en PDMS sont fabriqués par moulage à partir d'une matrice de silicium gravée fournissant un profil inverse de la structure désirée (réseau de microcanaux).

La conception et la fabrication de la matrice de silicium sont réalisées à l'aide des outils et des technologies conventionnelles de la microélectronique. Les « layouts » sont générés à partir d'un logiciel de CAO microélectronique (Cadence Design Systems Inc., USA) et permettent la fabrication des masques nécessaires à la photolithographie de substrats de silicium oxydés. La gravure de ces substrats s'effectue par attaque ionique réactive profonde (Deep Reactive Ion Etching - DRIE) pour obtenir des structures avec des facteurs de forme élevés présentant des « parois » verticales (gravure fortement anisotrope). Les substrats ainsi gravés sont ensuite silanisés (dépôt d'une monocouche de tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl-trichlorosilane $C_8H_4Cl_3F_{13}Si$ par exposition aux vapeurs de ce silane dans un dessiccateur) pour faciliter le démoulage des microstructures en PDMS.

Le PDMS est obtenu par un mélange d'un pré-polymère et d'un catalyseur, dégazé pendant 30 minutes sous vide puis coulé sur la matrice de silicium et polymérisé à une température de 70°C pendant deux heures (figure 2). La réplique en PDMS démoulée est ensuite collée sur un substrat de verre fermant ainsi les canaux. Un collage permanent est obtenu par oxydation plasma préalable du PDMS.

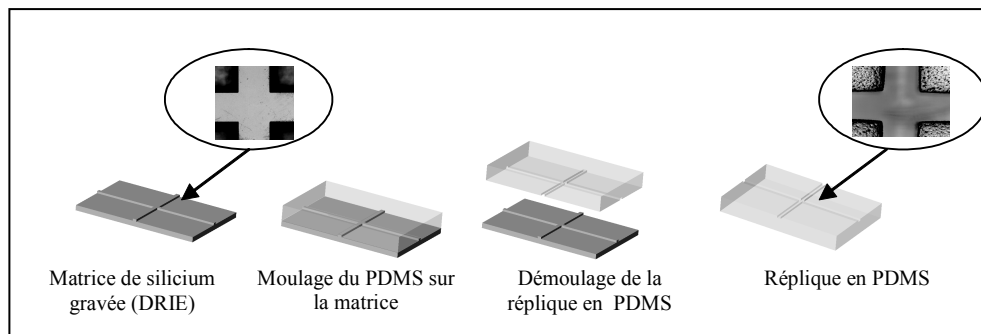


Figure 2. *Fabrication du microdispositif PDMS*

2.3. Module de détection CMOS

Le module de détection comprend un photodétecteur CMOS à double jonction enterrée BDJ associé à un étage électronique de préamplification faible bruit. Ce module est relié au module d'interface microfluidique par l'intermédiaire d'une fibre multimode en silice fondue.

2.3.1. Détecteur CMOS BDJ

Le détecteur BDJ est formé de deux jonctions p-n enterrées réalisées dans l'épaisseur du substrat de silicium permettant ainsi une réponse spectrale s'étalant du visible au proche-infrarouge [LU 96] [FIN 03]. Ce détecteur peut agir comme une simple photodiode, en utilisant la somme des photocourants générés par les deux jonctions, ce qui lui permet d'avoir une meilleure sensibilité qu'une jonction unique.

En exploitant le rapport des photocourants générés par les deux jonctions, il est possible d'obtenir une information spectrale sur le signal optique incident sans utiliser de dispositifs optiques (réseaux de diffraction). Cette sensibilité en longueur d'onde est particulièrement intéressante pour l'identification ou la discrimination des molécules en solution [GAL 03].

Les deux signaux issus des photodiodes polarisées en inverse sont deux photocourants notés I_1 et I_2 . Le photocourant I_1 provient de la jonction proche de la surface tandis que le photocourant I_2 est issu de la jonction la plus profonde. Le détecteur possède deux sorties A et B fournissant respectivement le photocourant I_1 et la somme des photocourants ($I_1 + I_2$), comme le montre la figure 3.

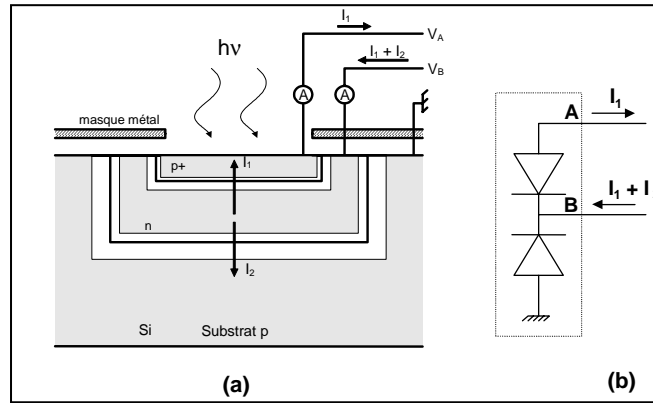


Figure 3. Détecteur CMOS BDJ (a) structure (b) Représentation symbolique

La caractéristique représentant le rapport des photocourants I_2/I_1 est une fonction monotone de la longueur d'onde (figure 4.a). Ce rapport peut s'écrire :

$$r(\lambda) = \frac{I_2(\lambda)}{I_1(\lambda)} = \frac{S_2(\lambda)}{S_1(\lambda)} \quad [4]$$

avec $S_1(\lambda)$ et $S_2(\lambda)$ représentant les réponses spectrales des deux photodiodes (figure 4.b).

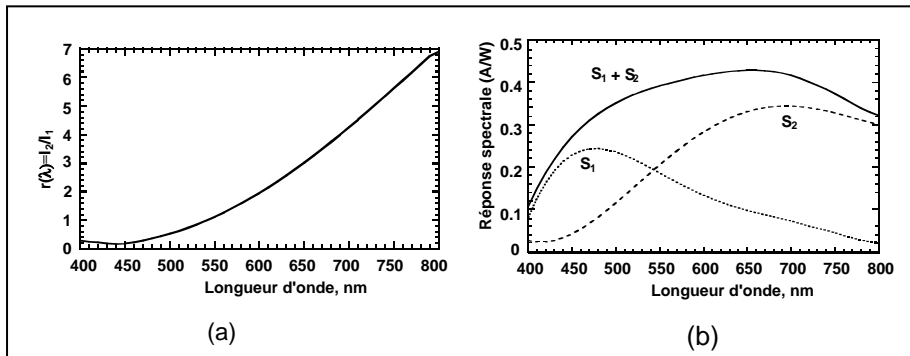


Figure 4. (a) Rapport des photocourants $r(\lambda)$; (b) Courbes de réponse spectrale $S_1(\lambda)$ et $S_2(\lambda)$ des deux jonctions; Réponse spectrale totale $S_1(\lambda) + S_2(\lambda)$.

Le rapport $r(\lambda)$ permet donc de déterminer la longueur d'onde de la lumière incidente lorsque celle-ci est monochromatique. Cependant, lorsque le signal

lumineux incident $\phi(\lambda)$ présente une certaine largeur spectrale, comme c'est souvent le cas en émission de fluorescence, le rapport des photocourants s'exprime sous la forme :

$$r(\phi(\lambda)) = \frac{I_2}{I_1} = \frac{\int \phi(\lambda) S_2(\lambda) d\lambda}{\int \phi(\lambda) S_1(\lambda) d\lambda} \quad [5]$$

Ce rapport est caractéristique de la répartition spectrale du flux lumineux reçu. Cette information sur le signal incident est exprimée sous la forme d'une longueur d'onde « équivalente » correspondant à un signal monochromatique qui génèrerait le même rapport de photocourants. A titre d'exemple, en appliquant l'équation 5 aux spectres d'émission de fluorescence d'indocarbocyanines, on obtient $\lambda_{\text{equ}} = 582 \text{ nm}$ pour Cy3 et $\lambda_{\text{equ}} = 670 \text{ nm}$ pour Cy5. (Il est à noter que ces longueurs d'onde équivalentes diffèrent légèrement des pics des spectres d'émission de fluorescence). Il est possible d'utiliser la longueur d'onde équivalente estimée sur le signal de fluorescence collecté pour discriminer ces deux fluorophores dans un mélange avec une résolution spectrale qui dépend des fluctuations du rapport des photocourants mesuré sur le détecteur BDJ. Celui-ci est directement lié au rapport signal à bruit et donc à l'intensité de fluorescence collectée. La résolution spectrale du système de détection pour ce cas spécifique est de l'ordre d'une vingtaine de nanomètres pour une intensité collectée de quelques femtowatt et une résolution de l'ordre du nanomètre pour des intensités supérieures à la dizaine de picowatt.

Pour déterminer l'intensité reçue par le détecteur avec une grande sensibilité et une large réponse spectrale, seul le signal ($I_1 + I_2$) issu de la voie B sera choisi. Alors que pour déterminer la longueur d'onde « équivalente » de la lumière incidente, une mesure des photocourants issus des deux voies sera nécessaire afin de déterminer le rapport des photocourants $r(\phi(\lambda))$.

Le détecteur BDJ est réalisé dans une technologie standard silicium CMOS 1 μm . Ce détecteur est constitué d'une matrice de 3 x 3 pixels (figure 5). Chaque pixel occupe une surface de 200 μm x 200 μm avec une surface sensible de 180 μm x 180 μm . Ainsi, la surface totale du détecteur est de 0,36 mm^2 dont 0,29 mm^2 de surface sensible. Tous les pixels sont connectés en parallèle afin de former une seule surface active et d'assurer un équipotentiel sur l'ensemble de cette surface.

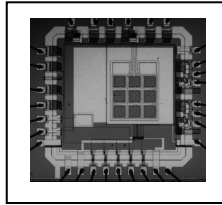


Figure 5. Détecteur matriciel BDJ CMOS

Le courant d'obscurité typique pour chacune des photodiodes est inférieur à 1 pA à la température ambiante. Il est nécessaire de tenir compte de leurs contributions de bruit car les niveaux de signaux en détection de fluorescence sont souvent très faibles.

Pour qualifier la sensibilité des photodétecteurs, il est d'usage d'évaluer la détectivité spécifique D^* du détecteur définie par l'équation suivante :

$$D^* = \frac{\sqrt{A}}{NEP} \quad [6]$$

où A représente la surface sensible du détecteur, et le NEP (Noise Equivalent Power) est la puissance équivalente au bruit qui dépend de la sortie choisie. Les détectivités spécifiques du BDJ sont estimées à $1,9 \cdot 10^{12} \text{ cm.Hz}^{1/2}\text{W}^{-1}$ pour la voie A et à $2,4 \cdot 10^{12} \text{ cm.Hz}^{1/2}\text{W}^{-1}$ pour la voie B [LU 02]. Les détectivités spécifiques obtenues sont tout à fait comparables avec celles des photodiodes sur silicium commercialisées.

2.3.2. *Electronique associée au détecteur BDJ*

L'électronique associée au détecteur BDJ a été conçue pour travailler dans des conditions de très faibles signaux. Elle est constituée de deux canaux identiques A et B directement reliés aux deux sorties du détecteur (figure 6). Chaque canal comporte un étage de préamplification faible bruit afin d'éviter une trop forte dégradation de la détectivité du détecteur. Cet étage est constitué d'un amplificateur transimpédance qui réalise une conversion courant/tension avec un gain de $5 \cdot 10^{10} \Omega$ [LU 03]. Cette configuration permet d'optimiser le rapport signal à bruit. Du fait de ce fort gain transimpédance, la bande passante de l'étage de préamplification est limitée à quelques Hertz.

2.4. **Module de traitement numérique du signal**

Ce module implémenté sur PC portable est connecté au module de détection par l'intermédiaire d'un système d'acquisition (ADC-216 Pico Technology Ltd) réalisant une amplification complémentaire ajustable entre 0 et 60 dB et une conversion analogique/numérique sur 16 bits de résolution, à une fréquence d'échantillonnage de 162,8 Hz.

L'étage de traitement numérique du signal comprend également deux voies. Chacune des voies est composée d'un filtre passe-bas qui limite la bande de bruit et d'une détection synchrone numérique. La démodulation est réalisée en phase et en quadrature par multiplication du signal avec des signaux sinusoïdaux synchrones de l'excitation. Cette démodulation en quadrature permet ainsi de s'affranchir du déphasage entre le signal d'excitation et le signal préamplifié. La sortie du démodulateur subit un filtrage passe-bas très sélectif (fréquence de coupure

inférieure à 1 Hertz). Chaque voie fournit une composante quasi-continue proportionnelle à l'amplitude du signal d'entrée modulé (I_1 pour le canal A et $I_1 + I_2$ pour le canal B). La détection synchrone permet de limiter l'impact des contributions du courant d'obscurité, du bruit en $1/f$ du capteur et de l'électronique associée (la fréquence de coin se situe à une centaine de milli Hertz) ainsi que des dérives lentes des tensions d'alimentation [LU 03].

L'étage de post-traitement permet d'extraire la longueur d'onde moyenne du signal optique et sa puissance.

L'ensemble du système est piloté par un logiciel avec une interface tableur, les données collectées étant sauvegardées sous forme de feuilles de calcul pour faciliter leur exploitation ultérieure.

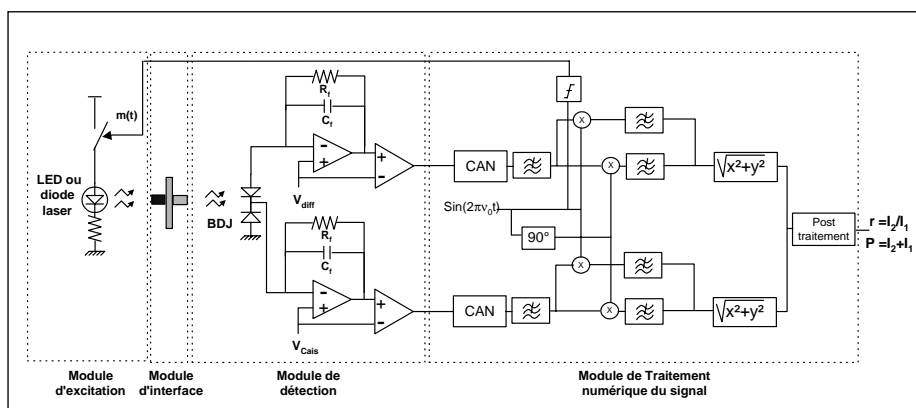


Figure 6. Système de photodétection

3. Configuration expérimentale

3.1. Limite de détection pour les mesures de fluorescence

3.1.1. Module d'excitation

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur des solutions d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) [PIT 04]. Ce fluorophore est très utilisé en biologie pour son coût relativement faible, et surtout pour sa faculté à se fixer sur la plupart des molécules comme les acides aminés, les protéines, l'ADN ou les anticorps, ouvrant ainsi un grand champ d'applications [BRI 88].

Le spectre d'absorption de la fluorescéine sous forme de FITC est centré sur une longueur d'onde de 494 nm et son spectre d'émission est centré sur 518 nm [SJO 95]. Du fait du recouvrement des spectres d'émission et d'absorption, nous avons

employé une excitation par diode laser à 407 nm. Malgré une absorption plus faible du FITC à 407 nm (environ 15% de sa valeur maximale à 494 nm), cette longueur d'onde d'excitation permet de réaliser un filtrage optique plus efficace. Le signal d'excitation est transmis au module d'interface microfluidique/optique au moyen d'une fibre optique multimode (diamètre cœur/gaine : 50/125 μm) possédant à son extrémité une microlentille de focalisation.

La solution à analyser est injectée dans un capillaire de silice fondue (Upchurch Scientific - diamètre interne/externe : 250/350 μm). Le signal d'excitation est envoyé perpendiculairement à l'axe du capillaire. Le volume de solution exposée au signal d'excitation est d'environ 5 nl.

3.1.2. Module de détection

Une fibre optique de collecte multimode (diamètre cœur/gaine : 62,5/200 μm) introduite à l'extrémité du capillaire, permet de recueillir le signal de fluorescence. La perpendicularité entre les directions d'excitation et de collecte du signal émis garantit un bon découplage optique et réduit le niveau de signal d'excitation présent dans le signal collecté (figure 7).

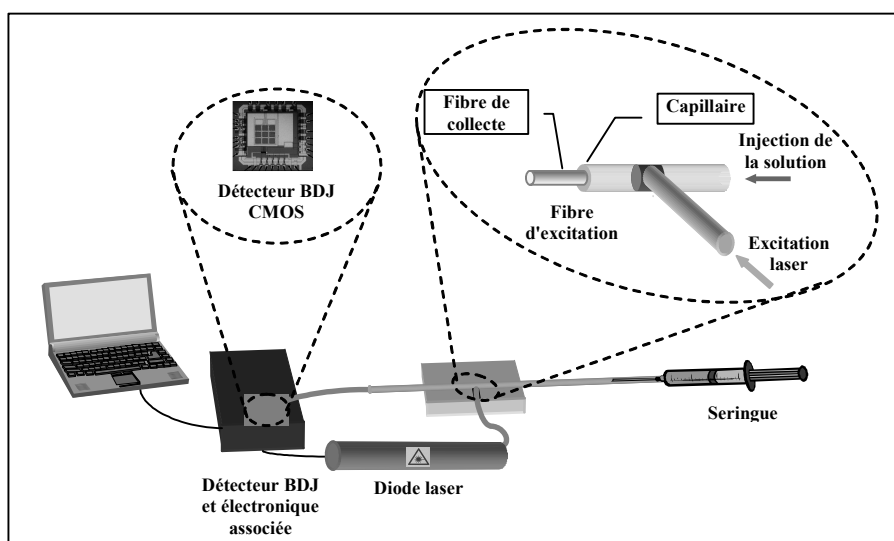


Figure 7. Montage expérimental pour déterminer la LOD dans les mesures de fluorescence

Cependant, il est nécessaire d'insérer des filtres optiques passe-haut (LEE Filters n°8) dans la partie de collecte afin d'atténuer de manière significative (environ -20dB) tout reliquat du signal d'excitation qui pourrait perturber la mesure de fluorescence.

La source d'excitation est modulée à 4 hertz et un filtre passe-bas de fréquence de coupure 0,25 Hz est utilisé en sortie de démodulation synchrone. La modulation permet également de réduire le temps d'exposition des molécules fluorescentes au laser et limite ainsi leur photodestruction. Cette photodestruction induit une diminution de l'intensité de fluorescence émise. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet de photoblanchiment (« photobleaching effect ») [CRI 97].

Les mesures de fluorescence ont été effectuées sur différentes concentrations de FITC (FITC, Isomère I, Fluka). Ce fluorophore est dilué à des concentrations variant de 10^{-6} M à 10^{-10} M dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 8.

3.2. Mesure de pH par détection de fluorescence

La mesure de pH par fluorescence [SLA 97] dans les microsystèmes nécessite l'emploi de deux canaux microfluidiques séparés par une membrane perméable aux ions (figure 8) [OST 04]. La mesure s'effectue dans le canal microfluidique secondaire qui contient une solution titrée d'un fluorophore sensible au pH [SHI 04]. Le pH de cette solution est modifié pour atteindre un équilibre ionique avec le canal microfluidique principal.

Les travaux présentés ici ne portent pas sur l'ensemble du microsystème, en particulier la diffusion ionique, mais se limitent à la mesure de pH par détection de fluorescence d'une gamme de solutions titrées. Un seul canal microfluidique est nécessaire pour ces mesures. Il fait partie intégrante du module d'interface microfluidique/optique réalisé en PDMS.

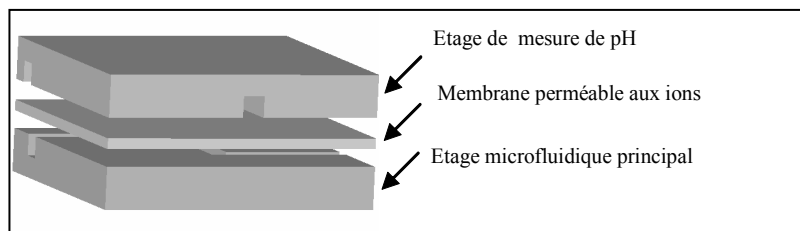


Figure 8. Microsystème avec mesure de pH par fluorescence

Pour les mesures de pH, l'isothiocyanate de fluorescéine est également utilisé [CHE 03]. Ce fluorophore présente l'avantage d'avoir son émission de fluorescence qui varie fortement avec le pH dans la plage étudiée [MAR 75]. L'excitation de la FITC est réalisée par une LED bleue de longueur d'onde 470 nm. L'utilisation d'une LED comme source d'excitation permet d'obtenir un système intégré à très faible coût.

La photodétection utilisant le dispositif BDJ présente des avantages par rapport à l'emploi d'une simple photodiode, d'une part il permet une meilleure réponse spectrale, grâce à un rendement de collecte des photopORTEURS plus élevé dans sa structure (structure équivalente à deux photodiodes empilées), et d'autre part il permet de qualifier le spectre du signal détecté pour déceler la pollution éventuelle du signal de fluorescence par des signaux parasites (en exploitant le rapport des photocourants).

Une série de solutions de FITC (0,02 g/l dans un tampon phosphate 0,1M) est préparée à différents pH variant de 4,5 à 8,5. L'ajout de KCl (0,1M) permet de maintenir la force ionique constante pour l'ensemble des solutions. Sur la plage de pH considérée, les formes ioniques HR^- (anion) et R^{2-} (dianion) de la FITC sont prédominantes avec une constante d'acidité donnée par :

$$K = \frac{[H^+][R^{2-}]}{[HR^-]} \approx 10^{-6,6} \quad [7]$$

A la longueur d'onde d'excitation utilisée (470 nm), chaque forme ionique possède un coefficient d'absorption ε et un rendement de fluorescence η spécifiques (figure 9). L'émission de fluorescence peut se mettre sous la forme :

$$F \approx \eta_{HR} \varepsilon_{HR} [HR^-] + \eta_{R2} \varepsilon_{R2} [R^{2-}] \quad [8]$$

avec $\eta_{HR} = 0,26$ et $\eta_{R2} = 0,92$. Cette équation permet de calculer la courbe d'étalonnage.

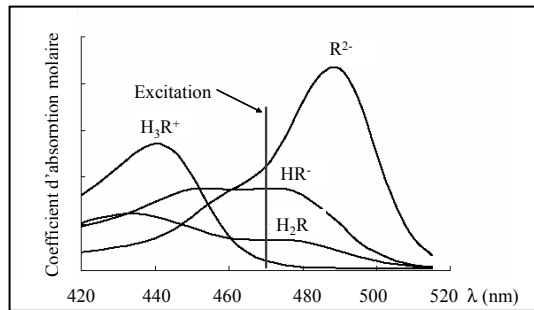


Figure 9. Spectre d'absorption des différentes formes ioniques de la FITC [d'après CHE 03]

Le canal microfluidique possède une section carrée de $380 \mu\text{m} \times 380 \mu\text{m}$. L'excitation et la collecte du signal optique sont réalisées par l'intermédiaire de fibres optiques multimodes en silice fondue (diamètres cœur/gaine : $300/375 \mu\text{m}$). Dans cette configuration, la mesure de fluorescence concerne 500 nl de solution.

3.3. Mesure d'absorbance en électrophorèse capillaire

Dans le cadre du développement de microsystèmes séparatifs, le système de photodétection CMOS a été testé pour des mesures d'absorbance en électrophorèse capillaire [TAG 98] [ALT 99].

Une méthode de mesure d'absorbance basée sur la sensibilité du détecteur à la longueur d'onde initialement proposée par [LU 99] est employée. Il s'agit d'utiliser une source d'excitation à deux longueurs d'onde. Ces deux longueurs d'onde de travail λ_A et λ_B sont choisies respectivement à un maxima et à un minima du spectre d'absorption de l'échantillon à analyser, λ_B constituant une longueur d'onde de référence. Lorsque l'échantillon est soumis à l'excitation à ces deux longueurs d'ondes avec deux flux respectivement ϕ_{λ_A} et ϕ_{λ_B} , le signal optique transmis et détecté par le photodétecteur BDJ génère un rapport de photocourants r_{dual} qui dépend de la concentration C . Il est donné par :

$$r_{dual}(C) = \frac{\phi_{\lambda_A} S_2(\lambda_A) + \phi_{\lambda_B} S_2(\lambda_B)}{\phi_{\lambda_A} S_1(\lambda_A) + \phi_{\lambda_B} S_1(\lambda_B)} = \frac{S_2(\lambda_A) + \alpha(C) S_2(\lambda_B)}{S_1(\lambda_A) + \alpha(C) S_1(\lambda_B)} \quad [9]$$

avec $\alpha(C) = \frac{\phi_{\lambda_B}}{\phi_{\lambda_A}} = \frac{\phi_{0\lambda_B}}{\phi_{0\lambda_A}} 10^{-[\varepsilon(\lambda_B) - \varepsilon(\lambda_A)]lC}$ et l représentant la longueur du trajet optique.

Pour de faibles concentrations et de petits trajets optiques, le rapport $\alpha(C)$ peut être approximé par :

$$\alpha(C) \approx \frac{\phi_{0\lambda_B}}{\phi_{0\lambda_A}} (1 - [\varepsilon(\lambda_B) - \varepsilon(\lambda_A)] \ln(10) l C) \quad [10]$$

Dans ces conditions, le rapport des photocourants peut s'exprimer comme une fonction linéaire de la concentration :

$$r_{dual}(C) \approx r_{dual}(0) + \frac{\frac{\phi_{0\lambda_B}}{\phi_{0\lambda_A}}}{S_1(\lambda_A) + \frac{\phi_{0\lambda_B}}{\phi_{0\lambda_A}} S_1(\lambda_B)} [r_{dual}(0) S_1(\lambda_B) - S_2(\lambda_B)] [\varepsilon(\lambda_B) - \varepsilon(\lambda_A)] \ln(10) l C \quad [11]$$

Il apparaît dans les expressions ci-dessus que le rapport des photocourants ne dépend que du rapport des flux lumineux reçus aux deux longueurs d'ondes de travail. Ce rapport n'est pas sensible aux variations de flux d'excitation qui affectent simultanément les deux composantes monochromatiques.

Des mesures ont été réalisées en électrophorèse sur un microcapillaire en silice fondue (diamètres interne/externe : 75/375 μm) avec une solution de coumarine 481 (Exciton) dans un tampon borate (2 mM - pH 9,3). Le module d'interface microfluidique, dont les dimensions externes sont d'environ 15mmx15mm, comporte un réseau de micro-canaux de section carrée de 380 μm de côté permettant l'insertion et le guidage du micro-capillaire et des fibres optiques d'excitation et de collecte (figure 10).

Le module d'excitation comprend deux LED : une LED violette émettant à la longueur d'onde de 405 nm (λ_A) et une LED rouge émettant à 660 nm (λ_B). Seul le signal émis par la diode violette est absorbé par la coumarine. Deux fibres multimodes en silice fondue (diamètres cœur/gaine : 300/375 μm pour la fibre d'excitation et de 66/50 μm pour la fibre de collecte) sont utilisées.

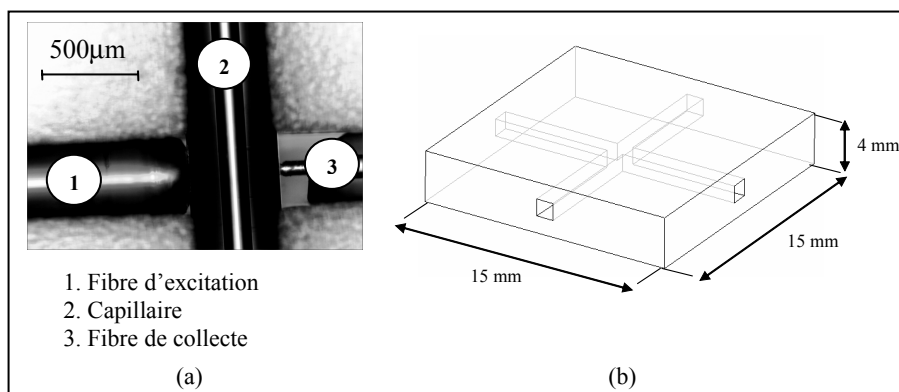


Figure 10. Module d'interface (a) avec microdispositif PDMS (b)

Pour cette application, nous avons opté pour une préamplification de charge associée à une détection synchrone à temps variable. Cette architecture permet d'optimiser le compromis entre la sensibilité de détection et la bande passante de mesure [PIT 03]. Elle est de ce fait bien adaptée à des mesures dynamiques sur un processus électrophorétique. Le gain de préamplification est ajusté automatiquement pour obtenir un rapport signal sur bruit suffisant (détection des pics de concentration) tout en conservant la bande passante de mesure maximale nécessaire à une bonne résolution spatio-temporelle (identification de ces pics). L'architecture du système de photodétection modifiée pour prendre en charge la détection synchrone à temps variable est présentée sur la figure 11.

4. Principaux résultats

Le système de photodétection CMOS proposé a été testé pour les différentes applications décrites précédemment. Pour valider les résultats correspondants, nous les avons comparés à ceux obtenus en utilisant les mêmes solutions avec des systèmes d'analyse disponibles dans le commerce.

Le premier appareil utilisé est un système d'analyse d'images fluorescentes intégrant une caméra CCD refroidie (LAS-1000 Plus, Fuji Film, Japan – Figure 12a). Ce système peut acquérir des images de fluorescence et de chimiluminescence [MAR 03]. Pour notre comparaison, les différentes concentrations de FITC ont été placées dans des micro-puits noirs Nunc standard, d'une contenance de 400 μl

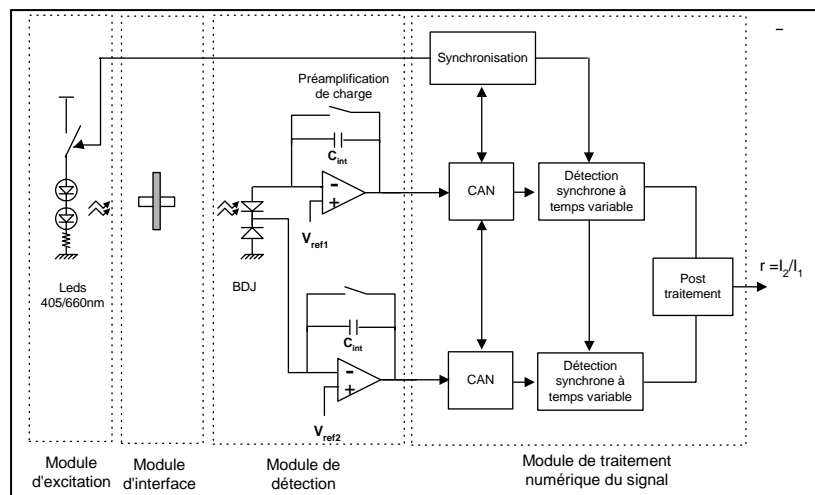


Figure 11. *Système de détection avec détection synchrone à temps variable.*

chacun. Les solutions sont excitées par un réseau de diodes électroluminescentes bleues (LED), émettant à la longueur d'onde de 470 nm. La caméra CCD enregistre l'image de fluorescence et un logiciel de traitement « Image Gauge V3.12 » (Fuji Film) permet d'analyser les résultats. Les mesures ont été optimisées en terme de temps d'exposition afin d'obtenir une linéarité qui s'étend sur une large gamme de concentrations. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un temps d'exposition de 5 s.

Le second appareil est un spectrofluorimètre (LS50B, Perkin-Elmer, USA – figure 12b), où la solution à analyser est placée dans une cellule en quartz parallélépipédique d'une contenance de 2 ml. La détection est réalisée par un tube photomultiplicateur (PM). La longueur d'onde d'excitation est ajustée à 407 nm pour permettre la comparaison avec notre système de photodétection CMOS.

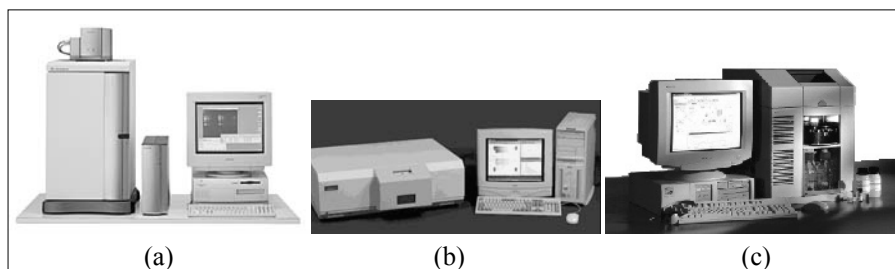


Figure 12. *Equipements utilisés (a) Analyseur d'images de luminescence LAS-1000 Plus, (b) Spectrofluorimètre LS50B, (c) Système d'électrophorèse capillaire HP-3D.*

Le troisième appareil est un système d'électrophorèse capillaire (HP-3D CE, Agilent Technologies, USA – figure 12c) qui intègre un module de mesure d'absorbance. Ce système utilise une source UV Deutérium pour l'excitation de l'échantillon. Il réalise une détection spectrale avec un réseau de diffraction associé à une barrette de photodiodes UV sur une plage de longueur d'onde allant de 190 nm à 600 nm (résolution de 1 nm). Le temps de réponse du système peut être ajusté entre 0,1 et 20 s. Les données sont traitées à l'aide du logiciel HP-Chemstation (Agilent Technologies).

4.1. Limite de détection pour les mesures de fluorescence

Deux types de mesures ont été effectuées : des mesures en mode statique et en mode dynamique. La procédure de mesure en mode statique s'effectue de la façon suivante : dans un premier temps, on injecte la solution dans le microcapillaire, puis, dans un second temps, on mesure l'émission de fluorescence. La procédure de mesure en mode dynamique consiste à injecter la solution en continu pendant toute la durée d'analyse. Ces deux types de mesures ont permis de déterminer l'intensité de fluorescence émise et la longueur d'onde associée.

La figure 13 montre les résultats obtenus en mode statique sur des concentrations de FITC allant de 10^{-7} M à 10^{-10} M. Les barres d'erreurs sur les courbes de la figure 13 représentent la dispersion expérimentale observée sur cinq mesures : la dispersion des points de mesure est plus importante sur les faibles concentrations. Elle est due d'une part à la dégradation du rapport signal à bruit lorsque l'intensité de fluorescence diminue et d'autre part à l'incidence plus importante du photoblanchiment sur les faibles concentrations comme on le verra dans la suite. Nous pouvons remarquer que l'intensité de fluorescence détectée est linéaire pour une large gamme de concentration. Cette relation peut être ainsi utilisée comme une calibration du système pour des analyses quantitatives. La limite de détection avec le système CMOS proposé est estimée à $5 \cdot 10^{-19}$ moles, ce qui montre sa grande sensibilité.

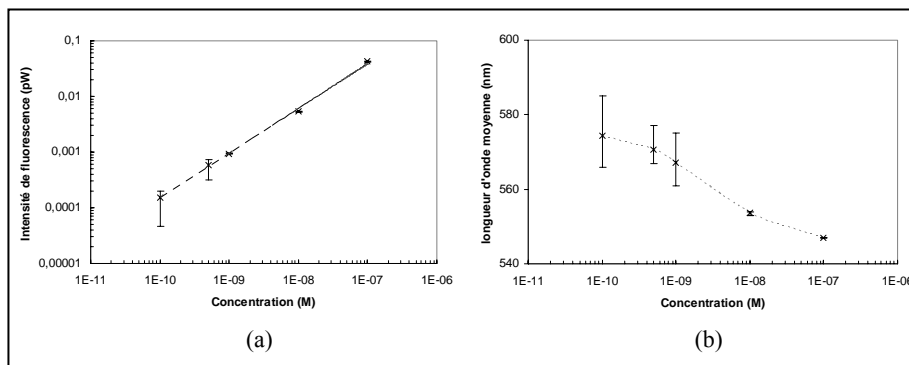


Figure 13. Puissance optique détectée (a) et longueur d'onde moyenne (b) en fonction de la concentration de FITC

De plus, le système de photodétection CMOS permet de déterminer la longueur d'onde associée au signal optique collecté. La figure 13b montre la variation de cette longueur d'onde en fonction de la concentration. Plus la concentration est élevée, plus la longueur d'onde détectée s'approche de 518 nm, longueur d'onde d'émission maximale de la FITC. Pour les concentrations faibles, la contribution des fluorescences parasites (notamment l'émission des filtres optiques) dans la longueur d'onde du signal incident devient significative et de ce fait la longueur d'onde estimée par le système de photodétection s'écarte de la longueur d'onde caractéristique de l'émission de fluorescence de la FITC.

La reproductibilité des résultats a pu également être estimée en répétant jusqu'à six fois les mesures sur les mêmes solutions. Des fluctuations de 27,9 % pour 10^{-10} M à 5,5 % pour 10^{-7} M ont été observées. Ces erreurs, dues en partie au photoblanchiment, peuvent être réduites par des mesures en mode dynamique. Ainsi, en maintenant l'injection en continu de la solution avec une vitesse d'écoulement d'environ 10 nl.s^{-1} , nous obtenons des fluctuations inférieures à 5% sur toute la plage de mesures [GAL 03].

Les premières mesures en mode statique mettent en évidence le photoblanchiment des molécules de fluorophore pendant la durée de l'analyse. L'effet est plus marqué pour les très faibles concentrations (figure 14a). Comme le montre la figure 14b, réalisée avec une concentration de FITC de 10^{-9} M, l'injection en continu de la solution dans le capillaire permet de limiter cet effet.

Afin de vérifier ces résultats expérimentaux, des mesures de fluorescence ont été réalisées sur les mêmes échantillons avec une caméra CDD refroidie et un spectrofluorimètre.

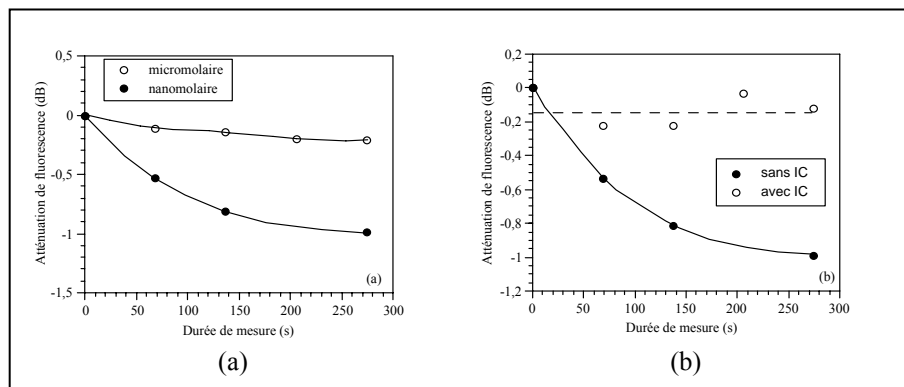


Figure 14. (a) Atténuation de l'intensité de fluorescence due au photoblanchiment sur des solutions micromolaire et nanomolaire; (b) effet de l'injection continue (IC) sur l'atténuation de fluorescence d'une solution nanomolaire de FITC

Le tableau 1 résume les principales caractéristiques des systèmes de détection mis en œuvre.

Equipement	Source d'excitation	Technologie de détection	Volume d'échantillon
LAS-1000 Plus Fuji Film	LED bleue $\lambda=470\text{nm}$ $P=5\text{mW}$	Caméra CCD refroidie	400 μl
LS-50B Perkin-Elmer	Lampe à décharge au Xénon pulsée ($P_{\text{moy}}=7,3\text{mW}$) associée à un monochromateur $\lambda=407\text{nm}$	Photomultiplicateur avec détection de type Boxcar	2 ml
Système de photodétection CMOS	Diode laser violette 407nm $P=3\text{mW}$	CMOS BDI avec détection synchrone	5 nl

Tableau 1. Systèmes mis en œuvre en détection de fluorescence

La figure 15 montre l'évolution relative de la fluorescence mesurée en fonction de la concentration de fluorophore. Une très bonne linéarité est obtenue sur toute la plage de mesures. Les résultats obtenus avec les trois systèmes sont tout à fait cohérents. Le système de photodétection CMOS proposé permet de détecter une concentration de l'ordre de 10^{-10} M, ce qui est comparable aux sensibilités obtenues avec les systèmes commercialisés. De plus, il offre un avantage significatif par rapport à ces systèmes en n'utilisant qu'un très faible volume d'échantillon.

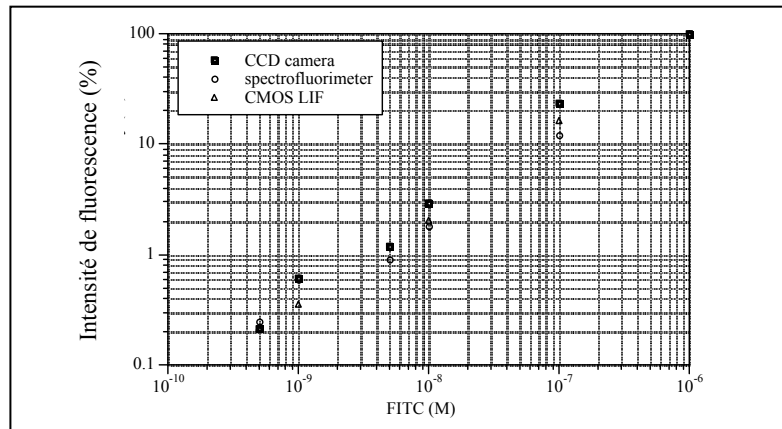


Figure 15. Comparaison des mesures de fluorescence obtenues sur des solutions de FITC à l'aide du système BDJ CMOS, du spectrofluorimètre et de la caméra CDD refroidie

4.2. Mesures de pH par détection de fluorescence

Les mesures sont réalisées en injectant dans des microcanaux les solutions titrées successivement, par ordre de pH croissants. Entre deux solutions de pH différents, le canal microfluidique est rincé par une solution contenant uniquement le tampon au pH considéré. La figure 16 présente en détail le module d'interface microfluidique/optique mis en œuvre pour la mesure de pH par fluorescence.

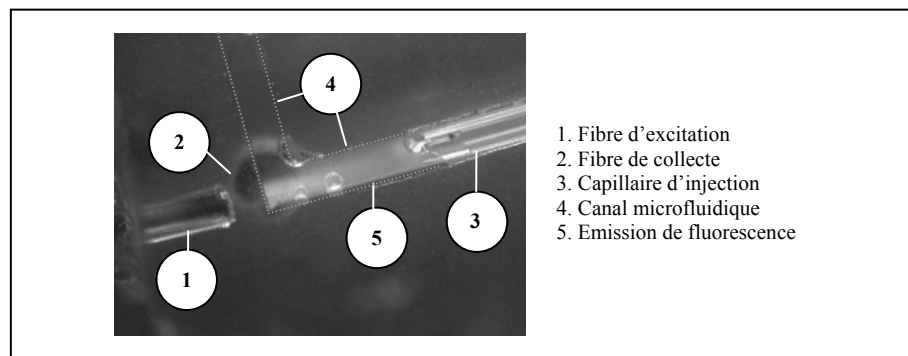


Figure 16. Module d'interface microfluidique/optique pour la mesure de pH

La figure 17 présente les résultats obtenus avec le système de photodétection proposé et avec une détection par caméra CCD refroidie (LAS-1000 Plus, Fuji Film, Tokyo, Japan). On observe une très bonne corrélation entre les deux séries de mesures. Ces résultats confirment la possibilité de déterminer le pH par mesure de fluorescence avec une bonne résolution dans une gamme de pH légèrement acide, comprise entre 5 et 7. Cette gamme de pH se situe au voisinage du pKa des formes ioniques HR^- (anion) et R^{2-} (dianion) du FITC.

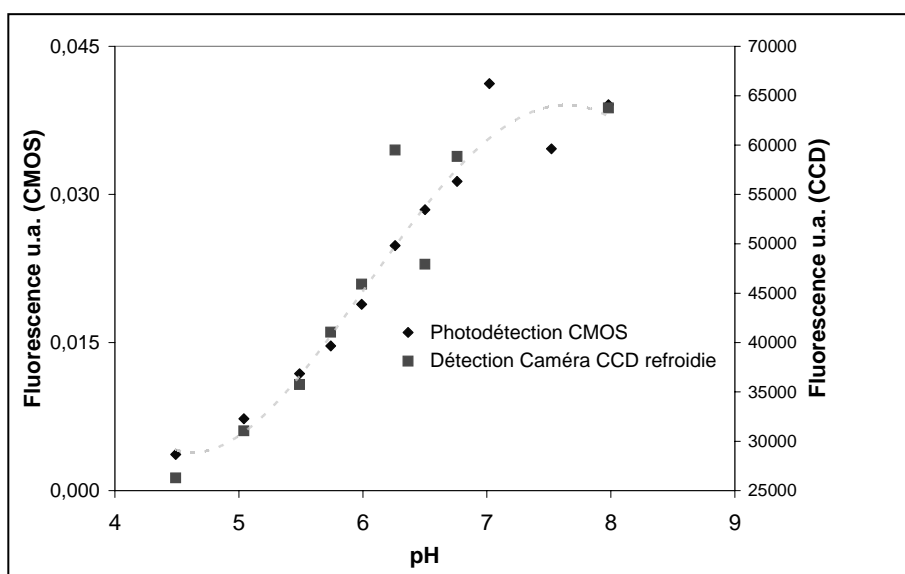


Figure 17. *Variation de fluorescence du FITC en fonction du pH*

4. 3. Mesure d'absorbance en électrophorèse capillaire

Le système de détection développé a été testé et validé pour des mesures d'absorbance en électrophorèse capillaire. La détection est réalisée sur de très faibles volumes d'échantillon (de l'ordre du nanolitre) et avec un trajet optique réduit (moins de 50 μm). La résolution spatiale (fenêtre de détection) est de 120 μm .

La phase mobile hydroorganique est préparée par mélange d'acétonitrile avec un tampon borate (2 mM - pH 9,3). La concentration de coumarine de l'échantillon est de 0,6 mM dans le tampon. Différentes injections hydrodynamiques et électrocinétiques sont réalisées avec différents paramètres d'injection. Une tension de 20 ou 30 kV est appliquée pour l'électrophorèse capillaire (HP-3D CE, Agilent Technologies).

La figure 18 présente un électrophérogramme obtenu avec cette configuration expérimentale. Cet électrophérogramme correspond à l'évolution temporelle du rapport des photocourants avec une mesure d'absorbance par la méthode à deux longueurs d'onde précédemment décrite.

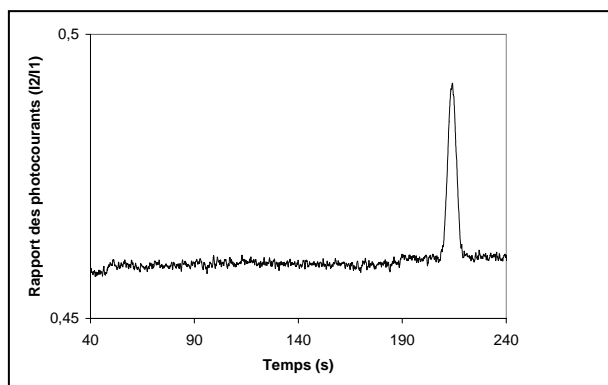


Figure 18. Exemple d'électrophérogramme obtenu

L'ajustement des différents paramètres d'électrophorèse a permis d'obtenir différentes résolutions spatio-temporelles (nombres de plateaux) et différentes concentrations de coumarine au niveau des pics de détection.

Dans un premier temps, nous avons vérifié la validité et la linéarité de la méthode proposée de détection à deux longueurs d'onde sur une plage de concentrations allant jusqu'à 1,5 mM (figure 19).

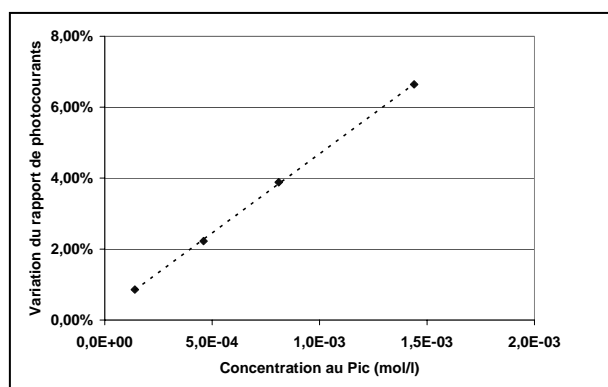


Figure 19. Variation du rapport des photocourants en fonction de la concentration

Nous avons également évalué les performances des méthodes de traitement du

signal associées à notre détecteur en terme de gain en rapport signal à bruit. Les résultats sont présentés sur la figure 20 en fonction de la concentration en Coumarine estimée au pic de détection.

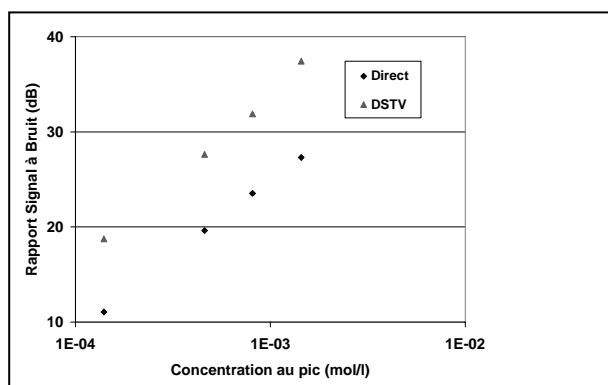


Figure 20. Apport de la détection synchrone à temps variable (DSTV)

La détection synchrone à temps variable offre un gain de 8 à 10 dB en rapport signal à bruit par rapport à l'exploitation directe des sorties de l'étage de préamplification faible bruit.

Cet apport en rapport signal à bruit s'effectue au détriment de la bande passante de mesure. Pour quantifier l'incidence de cette réduction de bande passante sur le pouvoir séparatif du système électrophorétique, nous avons calculé le nombre de plateaux obtenus pour des « runs » avec différents paramètres d'électrophorèse. Ce nombre de plateaux est estimé directement sur les données numérisées et sur les données après détection synchrone à temps variable. Nous avons également déterminé le nombre de plateaux obtenus avec le système d'excitation et de détection intégré au système d'électrophorèse capillaire (HP-3D, Agilent Technologies). Les résultats sont présentés sur la figure 21.

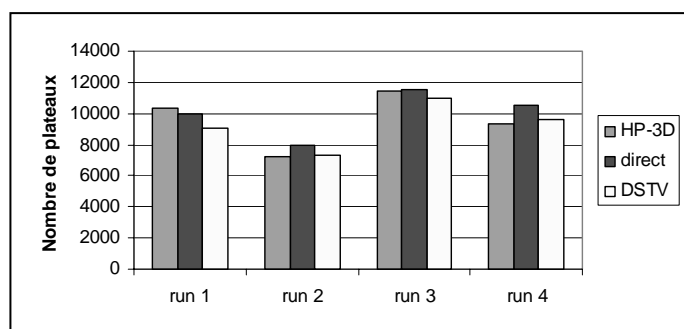


Figure 21. Nombres de plateaux obtenus avec et sans traitement du signal

La méthode de traitement du signal proposée avec les paramètres utilisés (fréquence de coupure des filtres) n'introduit pas de réduction significative du nombre de plateaux. Cependant, du fait du gain en rapport signal à bruit, elle permet une meilleure identification de ces derniers, en particulier à très faible concentration.

Conclusion et perspectives

Un système de photodétection CMOS a été conçu pour des microanalyses biochimiques basées sur des mesures d'absorbance ou de fluorescence. Il comporte quatre modules principaux pour mettre en œuvre l'excitation, l'interface microfluidique/optique, la détection et le traitement des signaux.

Nous avons montré qu'avec ce système intégrant un photodétecteur à double jonction enterrée BDJ, il est possible de mesurer indépendamment la puissance et les caractéristiques spectrales du signal optique collecté. Cette information spectrale peut être exploitée pour identifier ou discriminer les molécules en solution. Elle peut être également utilisée pour mettre en œuvre une méthode de mesure d'absorbance à deux longueurs d'onde, plus robuste aux fluctuations éventuelles du signal d'excitation.

Ce système de photodétection offre une excellente sensibilité avec une limite de détection en fluorescence évaluée, pour le FITC, à $5 \cdot 10^{-19}$ moles. Des effets de photoblanchiment ont été mis en évidence et des méthodes de mesures en mode dynamique ont permis de minimiser ces effets.

Ce dispositif expérimental a également été testé et validé pour la mesure de pH par détection de fluorescence et pour la mesure d'absorbance en électrophorèse capillaire. Pour chaque application, une très bonne corrélation a été observée entre les mesures réalisées avec le système proposé et les résultats obtenus sur les mêmes solutions avec des équipements conventionnels.

Des solutions technologiques sont proposées pour la réalisation de chacun des quatre modules composant le système de photodétection. Ces technologies sont compatibles avec un faible coût de mise en œuvre, un haut niveau d'intégration et une production en série.

Les microstructures en PDMS réalisant le module d'interface microfluidique/optique peuvent être enrichies par d'autres fonctions telles que le « labelling in situ », l'électrophorèse « on chip » pour constituer un microsystème complet d'analyse (figure 22) [REN 04] [CHE₀ 01] [NAT 01].

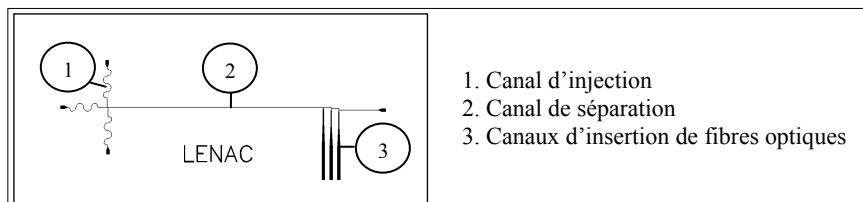


Figure 22. Dessin du masque d'un microsystème séparatif réalisé en PDMS [d'après Renaud, 2004]

En parallèle, nous travaillons également à l'intégration sur la même puce CMOS du photodétecteur BDJ et de son électronique associée (préamplification et détection synchrone), sous forme d'un imageur matriciel ou linéaire faible résolution (figure 23). Des applications comme la micro-spectro-photométrie « on chip », la chimiluminescence sont en cours de développement.

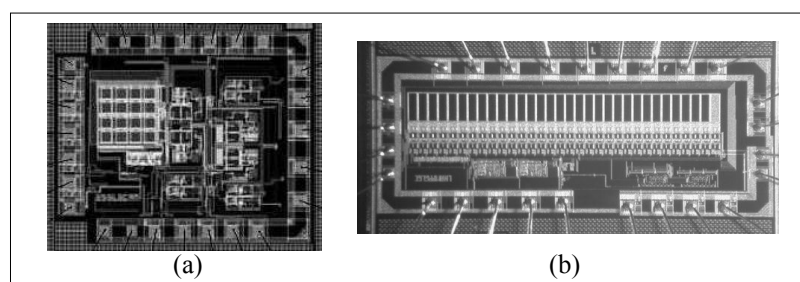


Figure 23. Imageur CMOS BDJ avec électronique embarquée (a) matriciel (b) linéaire.

L'objectif à terme est de réaliser un laboratoire sur puce (« lab-on-a-chip ») prenant en charge sur un seul composant toutes les étapes de la microanalyse biochimique.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Nathalie Bertoncini et Jean-Louis Rocca du laboratoire des sciences analytiques (LSA - UMR5180 UCB-CNRS) pour leur support lors des expérimentations d'électrophorèse capillaire. Ils remercient également Amandine Geindre pour la mise en œuvre du système de photodétection dans le cadre des mesures de pH.

5. Bibliographie

- [ALT 99] Altria KD., « Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography », *J Chromatogr A.*, vol. 856, 1999, p. 443-63.
- [BER 96] Bergquist J., Vona M., Stiller C., O'Connor W., Falkenberg T., Ekman R., « Capillary Electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: a sensitive method for monitoring extracellular concentration of amino acids in the periaqueductal grey matter », *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 65, 1996, p. 33-42.
- [CHE_a 01] Chen YL, Xu Y., « Determination of lysophosphatidic acids by capillary electrophoresis with indirect ultraviolet detection », *Journal of Chromatography B*, vol. 753, 2001, p. 355-363.
- [CHE_b 01] Cheng SB, Skinner CD, Taylor J, Attiya S, Lee WE, Picelli G, Harrison DJ I., Farhat J., « Development of a multichannel microfluidic analysis system employing affinity capillary electrophoresis for immunoassay », *Anal. Chem.*, vol. 73, n° 7, 2001, p. 1472-1479.
- [CHE 02] Chen J.-F., Jin Q.-H., Zhao J.-L., Xu Y.-S., « A signal process method for DNA segments separation in micro-channel electrophoresis », *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 17, 2002, p. 619-623
- [CHE 03] Chedlov-Petrosyan N., Isaenko Y., Vodolazkaya N., Goga S., « Acid-Base Behavior of Fluorescein Isothiocyanate in Aqueous Media and in Micellar Surfactant Solutions », *CPS Physchem 0309005*
www.multid.se/references/cps%20physchem%200309005.pdf, 2003
- [FIN 03] Findlater K.M., Renshaw D., Hurwitz J.E.D., Henderson R.K., Purcell M.D., Smith S.G., Bailey T.E.R., « A CMOS image sensor with a double-junction active pixel », *IEEE-Transactions-on-Electron-Devices*, vol. 50, 2003, p. 32-42.
- [GAL 03] Galvan J., Lu G. N., Pittet P., Leca-Bouvier B., Blum L., CMOS optical detector system for capillary fluorescence measurements, *Actes de la conférence OSD 2003, Conference on Detectors and Associated Signal Processing*, SPIE vol. 5251, 2003.
- [HIR 04] Hirofumi Tani, Koji Maehana, Tamio Kamidate « Chip-Based Bioassay Using Bacterial Sensor Strains Immobilized in Three-Dimensional Microfluidic Network », *Anal. Chem.*, vol. 76, n°4, 2004, p. 6693-6697.
- [HOO 90] Hooper C.E., Ansorge R.E., « Quantitative luminescence imaging in the biosciences using the CCD camera: analysis of macro and micro samples », *Trends in Anal. Chem.*, vol. 9, n°8, 1990, p. 269-277.
- [LU 96] Lu G.N., Ben Chouikha M., Sou G., Sedjil M., « Colour detection using a buried double P-N junction structure implemented on a CMOS process », *Electronics letters*, vol.32, n°6, 1996, p. 594-596.

- [LU 99] Lu G.N., « A dual-wavelength method using the BDJ detector and its application to iron concentration measurement », *Meas. Sci. Technol.*, vol. 10, 1999, p. 312-315.
- [LU 01] Lu G.N., Sou G., Devigny F., Guillaud G., « Design and testing of a CMOS BDJ detector for integrated micro-analysis systems », *Microelectronics J.*, vol. 32, 2001, p. 227-234.
- [LU 02] Lu G. N., Galvan J.M., Jeloyan C., Goumy G., Marcoux V., Sensitivity Estimation of CMOS Optical BDJ Detector, *Materials Science and Engineering*, vol. 21 ,p.203-210, 2002
- [LU 03] Lu G.-N., Pittet P., Carrillo G., El Mourabit A., «A novel approach to implementing on-chip synchronous detection for CMOS optical detector systems », *Analog Integrated Circuits and Signal Processing*, vol. 37, 2003 , p. 57-66,
- [MAR 75] Martin MM., Lindqvist L., « The pH dependence of fluorescein fluorescence », *Journal of Luminescence* vol. 10, 1975, p. 381-390.
- [MUN 98] Munsterer T., Jahne B., « LIF measurements of concentration profiles in the aqueous mass boundary layer », *Experiments in Fluids*, vol. 25, 1998, p. 190-196.
- [NAT 01] Nathan A. Lacher, Kenneth E. Garrison, R. Scott Martin, Susan M. Lunte, « Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry», *Electrophoresis.*, vol. 22, 2001, p. 2526–2536.
- [OST 04] Ostrovidov S, Jiang J, Sakai Y, Fujii T., « Membrane-Based PDMS Microbioreactor for Perfused 3D Primary Rat Hepatocyte Cultures», *Biomed Microdevices.*, vol. 6, n°4, 2004, p. 279-287.
- [PIT 03] Pittet P., Lu G.N., Pitaval M, Quiquerez L, « Variable Time Synchronous Detection Method for Sensitive Optical Detection », *Electronics Letters*, vol. 39, 2003, p. 860-862.
- [PIT 04] Pittet P, Galvan J-M., Lu G-N., Blum L-J., Leca-Bouvier B. « CMOS LIF detection for capillary analysis », *Sensors and Actuators B*, vol. 97, n°2-3, 2004, p. 355-361.
- [REN 04] Renaud L., Etudes de systèmes microfluidiques : Application à l'électrophorèse sur puces polymères, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard, 2004
- [ROS 04] Ros A., Hellmich W., Duong T., Anselmetti D., « Towards single molecule analysis in PDMS microdevices: from the detection of ultra low dye concentrations to single DNA molecule studies», *Journal of Biotechnology.*, vol. 112, 2004, p. 65-72.
- [SHI 04] Shinohara1 K. , Sugii Y., Okamoto K., Madarame H., Hibara A., Tokeshi M., Kitamori T., « Measurement of pH field of chemically reacting flow in microfluidic devices by laser-induced fluorescence», *Measurement Science and Technology*, vol. 15, 2004, p. 955-960.
- [SJO 95] Sjöback R., Nygren J., Kubista m., « Absorption and Fluorescence properties of Fluorescein », *Spectrochimica Acta Part A*, vol. 51, 1995, p. 7-21.

[SLA 97] Slavik J., « Applications of fluorescent probes in cellular biology : Measurement of intracellular pH », *Journal of Luminescence*, vol. 72, 1997, p. 575-577.

[SMI 86] Smith L. M., Sanders J. Z., Kaiser R. J., Hughes P., Dodd P., Connell C. R., Heiner C., Kent S. B. H., Hood L. E., Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis, *Nature*, vol. 321, pp. 674-679, 1986

[TAG 98] Tagliaro F., Manetto G., Crivellente F., Smith F.P., « A brief introduction to capillary electrophoresis », *Forensic Science International*, vol. 92, 1998, p. 75-88.

[WAN 99] Wan Q.H., Le X.C., « Capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence polarization as a hybrid approach to ultrasensitive immunoassays », *J. Chromatogr. A*, vol. 853, 1999, p. 555-562.

[WIL 93] Williams S. J., Bergström E.T., Goodall D. M., « Diode laser-based indirect absorbance detector for capillary electrophoresis », *Journal of Chromatography A*, vol. 636, pp. 39-45, 1993.