Ecole Centrale de Lyon *Année 2007*
N° ordre 2007-08

THESE

Pour obtenir la grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE CENTRALE DE LYON

Préparé au sein de l'Ecole doctorale EEA

Discipline : Micro et Nanotechnologie

Présentée et soutenue par

BOU CHAKRA ELIE

Le 16 Mars 2007

NOUVEAUX PROCEDES D'ELABORATION A HAUTE RESOLUTION DE BIOMICROSYSTEMES POUR LA BIOTECHNOLOGIE ET LA MICROFLUIDIQUE

JURY

Rapporteur	CHEN Yang	Professeur (ENS - Paris)
Rapporteur	VIEU Christophe	Professeur (LAAS – CNRS – Toulouse)
	MORIN Pierre	Directeur de Recherche (CNRS – INL)
	ERRACHID A.	Docteur (Universitat de Barcelona – Espagne)
	CABRERA Michel	Chargé de recherche (CNRS – INL - ECL)
	GARRIGUES Michel	Directeur de Recherche (CNRS – INL - ECL)

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué à l'Ecole Centrale de Lyon au sein de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon. Je remercie Monsieur Guy Hollinger, en qualité de directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli Au sein de l'INL.

Je tiens à remercier M. Pierre MORIN pour avoir accepté de présider le jury de thèse, ainsi que M. Yang CHEN et M. Christophe VIEU pour l'intérêt et le temps qu'ils ont consacré à ma thèse en tant que rapporteurs. Je remercie M. A. ERRACHID d'avoir accepté de venir d'Espagne pour examiner mon travail et être membre du jury.

Je remercie mon directeur retraité Jean René MARTIN et je lui souhaite une longue et heureuse retraite auprès de sa famille, de son bateau et de son filet de pêche. Je remercie M. Michel GARRIGUES d'avoir accepté de remplacer M. MARTIN comme directeur de thèse et je le remercie aussi pour sa sympathie, sa gentillesse, son soutien et ses remarques instructives.

Je remercie tout particulièrement et très chaleureusement mon directeur de thèse Michel CABRERA auprès qui ce fut un plaisir de travailler. En effet, dès le début il a su me faire confiance et me rendre indépendant très rapidement. J'apprécie son implication, sa disponibilité et son recul sur le sujet. De plus je le remercie d'avoir été un bien courageux volontaire pour relire et corriger les fautes de ce manuscrit. Il était toujours disponible pendant les moments difficiles et stressants de la fin de ce travail de thèse, faisant sans cesse preuve de calme, de gentillesse et de patience. Il me mettait toujours de bonne humeur, élément essentiel pour la rédaction d'une thèse. Je n'oublie pas de remercier sa femme et ses enfants qui m'ont supporté longtemps d'avoir bloquer M. CABRERA surtout le soir. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus vive reconnaissance.

J'ai bénéficié d'une bourse d'étude pour cette thèse pendant trois ans du Ministère Français de l'Education et de la Recherche et j'en suis très reconnaissant.

Je tiens énormément à remercier Madame Thérèse MARTIN, notre aimable et très chère secrétaire pour sa sympathie, ses conseils et sa patience envers moi surtout quand je lui amenais un lot de commandes à me faire passer.

J'aimerais également remercier M. Roland DUBENT, le technicien de notre département pour sa disponibilité, son aide, ses conseils technique et sa grande gentillesse.

Remerciement à Hamid OMIDVAR qui avait son bureau en face du mien, pour son aide, sa gentillesse et tous les services qu'il m'a rendus surtout la semaine qui précède le jour de ma soutenance.

Je remercie tous les professeurs, doctorants, post-ATER, post-doctorants, ingénieurs et techniciens… de ce laboratoire. En particulier Mehdi JABER pour ses conseils et ses encouragements, Hannes Benjamin pour le travail que nous avons effectué ensemble, sans oublier Apoutou N'DJJIN et Pascale HAZOT qui m'ont appuyé dans les domaines où je ne me sentais pas trop à l'aise.

A la fin je tiens à remercier mes amis, ma famille pour leur soutien, leur amour, leur encouragement et surtout pour le temps sacrifié pour préparer un pot inoubliable pour ma soutenance.

Je n'oublie pas DIEU qui nous a créé pour qu'à notre tour nous créions…

TABLES DES MATIERES

Tables des matières I

Liste des symboles et des abréviations IV

Liste des figures V

Liste des tableaux VIII

Introduction 1

PARTIE A Etat de l'art 5

Chapitre I biopuces et microlaboratoires sur puce 7

I.1 Les biopuces 7
I.1.1 Les puces à ADN 8
I.1.2 Les puces à protéines 9
I.1.3 Intégration, densité et résolution 12
I.1.4 Classification des biopuces 14
I.1.5 Les difficultés propres aux puces à protéines 17
I.2 Méthodes d'élaboration de biopuces en fonction du mode d'adressage 18
I.2.1 Synthèse localisée par fluidique 18
I.2.2 Synthèse photochimique 19
1. Puces à ADN 19
2. Puces à oligopeptides 20
I.2.3 Microprojection 20
1. Elaboration in situ 20
2. Elaboration ex situ 21
I.2.4 Spotting 22
1. Elaboration ex situ 22
2. Elaboration in situ 23
I.2.5 Electropolymérisation 24
I.2.6 Dip-Pen Nanolihography (DPN) 25
I.2.7 Microtamponnage 25
1. Principe du microtamponnage 26
2. Application à la Biotechnologie 27
I.3 Les méthodes d'élaboration du LEOM 28
I.3.1 Synthèse in situ de puces à oligonucléotides par projection 28
1. Principe de base 28
2. Synthétiseur de puces à oligonucléotides basse intégration basse densité 31
3. Champ d'application du Synthétiseur de puces à oligonucléotides basse intégration basse densité 35
4. Comparaison du procédé LEOM avec les procédés Affymetrix et Agilent et Hood 36
5. Conclusion sur l'intérêt d'accroître la résolution des biopuces avec le procédé in situ du LEOM 37
I.3.2 Procédé LEOM de fabrication ex situ de biopuces par multiprojection 39
1. Principe de base 39
2. Intérêt d'accroître la résolution des puces ex situ 40
I.4 Les microlaboratoires sur puce 41
I.5 Les objectifs de ce travail 41

PARTIE B Elaboration de biopuces par projection au picolitre 43

Chapitre II Faisabilité de la synthèse peptidique in situ haute résolution 45

II.1 les difficultés à résoudre et la stratégie adoptée 46
II.2 Projection de réactifs avec une résolution de 4 picolitres 51
II.2.1 Description d'une tête de projection piézoélectrique 52

1. L'effet piézoélectrique 52
2. Principe de base d'une projection 54
3. Description d'un dispositif de projection "réaliste" 56
4. Modélisation simplifiée de la tête de projection avec des oscillateurs d'Helmholtz 58
II.2.2 Commande électronique 60
1. Architecture matérielle 60
2. Logiciel 64
3. Sélection des réactifs et des buses 65
4. Signaux logiques de synchronisations et d'alimentation TTL 66
II.3 Adaptation des paramètres de projection aux solvants 67
II.3.1 Banc d'observation des picoprojections 67
II.3.2 Description phénoménologique 68
1. Influence des constantes de temps du signal de projection 70
2. Influence des pentes du signal de projection 72
3. Influence des amplitudes du signal de projection 73
4. Conclusion 73
II.3.3 Paramétrages des moyens de projections pour différents solvants 74
1. Paramètres de projection de l'encre 74
2. Paramètres de projection de DMSO 75
3. Paramètres de projection de DMF 76
4. Projection de l'acétonitrile 79
5. Conclusion 81
II.4 Faisabilité de la synthèse peptidique macroscopique in situ sur support solide 81
II.4.1 Dispositif expérimental manuel 81
II.4.2 Tests de greffage d'une biotine sur support plan 82
II.4.3 Synthèse in situ macroscopique d'un d'oligopeptide 6 mères 86
II.5 Faisabilité de la synthèse peptidique par picroprojection 87
II.5.1 Banc de picoprojection avec motorisation 87
II.5.2 Géométrie des micropuits 88
II.5.3 Test de projections dans les micropuits 90
II.5.4 Protocole de fabrication 91
II.6 Conclusion 94

PARTIE C Elaboration de biomicrodispositifs par microtamponnage..... 97

Chapitre III Etat de l'art sur le microtamponnage 99

III.1 Qu'est-ce que le PDMS ? 99
III.1.1 les silicones 99
III.1.2 Fabrication des maitres modèles et des tampons 103
III.2 Les limitations du microtamponnage 104
III.2.1 Les déformations du tampon 104
III.2.2 La migration des réactifs 107
III.3 Les instruments de tamponnage 107
III.4 Applications à la Micro et Nanobiotechnologie 109
III.4.1 Elaboration de puces à ADN par microtamponnage. 109
1. Fabrication ex situ 109
2. Synthèse in situ 111
III.4.2 Elaboration de puces à protéines par microtamponnage. 112
III.5 Le microtamponnage au LEOM 113
III.5.1 Structuration des puces à ADN par double silanisation 113
1. Principe de base 113
2. Nécessité d'un banc de mini-tamponnage 114
III.5.2 Le banc de mini-tamponnage du LEOM 115
1. Tamponneur manuel 115
2. Mini-tamponneur semi-automatique à vérin pneumatique 117
III.6 Les objectifs de ce travail 119

Chapitre IV Banc de microtamponnage avec charge controlée par vérin..... 121

IV.1 Conception du banc de microtamponnage..... 121
IV.1.1 Principe de base..... 121
1. Pressage du tampon par un vérin pneumatique..... 121
2. Guidage du tampon par un rail linéaire de précision..... 123
3. Charge exercée sur le tampon en fonction de la pression du vérin..... 125
4. Conception de la tête de tamponnage..... 127
5. Conception du porte-substrat..... 129
IV.1.2 Encrage du tampon..... 131
1. Etat de l'art..... 131
2. Encrage automatique du tampon par pulvérisation..... 131
3. Compatibilité du système d'encrage avec les réactifs..... 133
IV.1.3 Contrôle qualité par caméra..... 133
1. Principe de base..... 133
2. Champ et résolution..... 134
3. Cas des substrats non transparents..... 134
IV.1.4 Vue globale de la machine..... 137
IV.1.5 Conclusion..... 140
IV.2 Mise en œuvre du procédé et caractérisation de l'instrument..... 141
IV.2.1 Fabrication des tampons..... 141
IV.2.2 Caractérisation du banc de microtamponnage..... 143
1. Reproductibilité mécanique du procédé..... 143
2. Résolution du réglage du parallélisme tampon-substrat..... 145
IV.3 Application à la gravure de circuits microfluidiques en verre..... 148
IV.3.1 Conclusion..... 151

Chapitre V Banc de microtamponnage avec charge contrôlée par rétroaction..... 153

V.1 Principe de base..... 154
V.2 Dispositif expérimental..... 156
V.3 microtamponnage de protéines au fond d'un canal microfluidique..... 160
V.4 Glissement possible du tampon, conclusion et perspectives..... 165

***Conclusion et perspective*.....171**

***PARTIE D Annexes*.....173**

Annexe 1 : Étude théorique du Synthétiseur in situ de puces haute densité par picoprojection..... 175
Annexe 2 : Conception mécanique du synthétiseur in situ de puces par picoprojection..... 181
Annexe 3 : Moyens de projection mixtes piézoélectriques-microélectrovannes..... 195
Annexe 4 : Electronique du banc de microtamponnage..... 199
Annexe 5 : Les déformations du tampon..... 203
Annexe 6 : Banc de microtamponnage avec rétroaction par actionneur piézoélectrique..... 209
Annexe 7 : Etching of glass patterned by microcontact printing with application to microfluidics and electrophoresis..... **Erreur ! Signet non défini.**

Bibliographie*..... *Erreur ! Signet non défini.

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

S	surface totale du tampon (cm²)
H	épaisseur de la base du tampon (mm)
L	épaisseur totale du tampon (mm)
2a	largeur des piliers du tampon (µm)
2w	largeur séparant les piliers du tampon (µm)
h	profondeur de gravure du tampon (µm)
R	rayon de courbure des motifs du tampon dû à l'énergie de surface du PDMS (µm)
E	module d'Young du PDMS (MPa)
ν	coefficient de Poisson du PDMS (sans unité)
γPDMS	énergie de surface du PDMS (?)
σ	charge exercée sur le tampon (MPa)
σc	valeur critique de la charge du tampon provoquant un effondrement (MPa)
T	temps de contact tampon/substrat (secondes)
ODT	octadécanethiol
OTS	octadécylthriclhorosilane
HDT	hexadécanethiol
ECT	Eicosanethiol
PDMS	polydiméthylsiloxane
Fmoc	9-fluorenylméthyl carbamate
µTP	microtamponnage
µfluidique	microfluidique
α	Défaut de parallélisme entre les plans du tampon et du substrat
δα	Défaut de parallélisme entre les plans du tampon et du substrat
Tg	température de transition vitreuse
r	retrait du PDMS
PZT	zirconium titanate de plomb
DMSO	diméthylsulfoxyde
DMF	diméthylformamide
CY3	cyanine3
cP	centipoise
µTP	microtamponnage
µfluidique	microfluidique

LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : Principe de l'hybridation/dénaturation des brins d'ADN. 8
Figure I-2 : Principe de la reconnaissance d'une cible pour une puce ADN. 9
Figure I-3 : Structure générale d'un acide aminé. 9
Figure I-4 : Principe d'une puce à protéines. 12
Figure I-5 : Classification des biopuces en fonction du degré d'intégration. 13
Figure I-6 : A droite : Synthèse sur microbilles d'oligonucléotides par la chimie des phosphoramidites. A gauche : Synthèse sur microbilles d'oligopeptides par la chimie des Fmoc (cycle simplifié). 15
Figure I-7 : Synthèse de peptide sur microbilles avec les étapes d'activation et de déprotection (cycle complet). 16
Figure I-8 : Potentiel d'intégration et de densité des biopuces en fonction du mode d'adressage des réactifs. 17
Figure I-9 : Principe de la synthèse photochimique in situ d'Affymetrix. 19
Figure I-10 : Système de spotting (gauche) et vue d'une "plume" de spotter (droite). 23
Figure I-11 : Synthèse de puces à oligopeptides sur membrane (procédé SPOT [54]). 24
Figure I-12 : Elaboration de biopuces par électropolymérisation. 25
Figure I-13 : Principe du µtamponnage. 26
Figure I-14 : Principe de la gravure du silicium localisée par µTP. 27
Figure I-15 : Synthèse in situ sur puce des sondes oligonucléotidiques par projection. 29
Figure I-16 : Réactions localisées (couplage) et non localisées (déprotection, fermeture et oxydation) pour la synthèse in situ de puces à oligonucléotides. 29
Figure I-17 : Réaction de couplage de la phosphoramidite d'après [22]. 31
Figure I-18 : Représentation d'une phosphoramidite utilisée pour la synthèse de l'ADN. 31
Figure I-19 : Vue du Synthétiseur de puces à oligonucléotides basse densité et basse intégration (résolution de la projection : 5 nanolitres) 32
Figure I-20 : Architecture interne du Synthétiseur de Puces basse densité. 33
Figure I-21 : Principe des micropuits et de la double projection base et tétrazole. 34
Figure I-22 : ½ Batterie avec 128 moyens de projection microélectrovannes indépendantes. 40
Figure I-23 : Principe de la fabrication ex situ de biopuces par multiprojection. 40
Figure II-1 : Géométrie de la tête de projection Epson Stylus Photo 870. 48
Figure II-2 : Micropuits de forme cylindrique avec une hauteur double du diamètre et un écart centre à centre égal à deux fois le diamètre. 50
Figure II-3 : Formes et modes de vibration d'un matériau piézoélectrique cylindrique. 54
Figure II-4 : Principe d'un système de projection piézoélectrique. 55
Figure II-5 : Cycle de projection d'une goutte à 6 temps. 55
Figure II-6 : Moyen de projection piézoélectrique d'après [128]. 56
Figure II-7 : Effet d'une variation du signal de commande sur la géométrie de la chambre. 57
Figure II-8 : Cycle de projection d'une tête piézoélectrique d'après [128]. 57
Figure II-9 : Schéma représentant une tête de projection avec 48 éléments de projection indépendants reliés à un seul réservoir d'encre à l'aide d'oscillateurs d'Helmholtz d'après [129]. 59
Figure II-10 : Représentation schématique d'un élément de projection à une seule buse pour le calcul de la fréquence d'Helmholtz. 59
Figure II-11 : Elaboration du signal de projection de la tête piézoélectrique. 61
Figure II-12 : Principe de l'attaque du piézoélectrique dans l'amplificateur de puissance. 62
Figure II-13 : Contrôle de la tête de projection piézoélectrique. 63
Figure II-14 : Bus 27 bit entre la carte M et puce électronique intégrée à la tête de projection. 64
Figure II-15 : Génération des signaux d'adressages, d'horloge, d'Enable et de Data pour le CAN. 65
Figure II-16 : Génération des signaux d'activation des buses piézoélectriques. 66
Figure II-17 : Signaux logiques de synchronisation. 66
Figure II-18 : Banc d'observation des picoprojections par caméra CCD. 68
Figure II-19 : Essais préliminaires de projection de DMF. 69
Figure II-20 : Augmentation de la taille des gouttes en fonction de la période du cycle de projection. 70
Figure II-21 : Etude pour 14 buses de la variation du diamètre des gouttes projetées en fonction de la période du signal de commande. 71
Figure II-22 : Diamètre moyen des gouttes en fonction de la période du signal de commande. 71
Figure II-23 : Influence des pentes de signal sur la qualité de projection. 72
Figure II-24 : Résumé des interactions observées entre propriétés physicochimiques du liquide à projeter et paramètres de cycle de projection. 74

Figure II-25 : Projection sur verre de 2 lignes d'encre (toutes les buses d'une ligne projettent simultanément).. 75
Figure II-26 : Projection sur verre de14 gouttes de DMSO simultanément sur chaque ligne verticale avec déplacement latéral de la tête de projection. 76
Figure II-27 : Projections uniques de 15 buses en déplaçant latéralement la tête de projection 77
Figure II-28 : Cinq projections superposées de 29 buses en déplaçant latéralement la tête de projection 77
Figure II-29 : Détection de la position des centres de 13 projections pour 5 séries de projection. 78
Figure II-30 : Décalage moyen et répétabilité d'une ligne de projection de 13 gouttes (projection unique à partir de 13 buses). 78
Figure II-31 : Chambre de saturation pour les projections d'acétonitrile. 80
Figure II-32 : Projection d'une ligne de gouttes d'acétonitrile. 81
Figure II-33 : Synthétiseur manuel d'oligopeptides. 82
Figure II-34 : Fonctionnalisation du substrat avec n≈20 d'après [133]. 83
Figure II-35 : Biotine 0SU (gauche) et HOBt (droite). 83
Figure II-36 : Formation d'une liaison peptidique entre la biotine et la fonction amine du support. 83
Figure II-37 : Plan de puce et signal de fluorescence après reconnaissance à la streptavidine-CY3. 85
Figure II-38 : Influence de la durée de couplage sur la fluorescence de la puce de la Figure II-37. 85
Figure II-39 : Synthétiseur automatique d'oligopeptides sur puce. 86
Figure II-40 : Synthèse in situ d'une sonde 6 mères synthétisées par la voie des Fmoc. 87
Figure II-41 : Influence du temps de couplage sur la fluorescence. 87
Figure II-42 : Banc de picoprojection sans l'enceinte de saturation. 88
Figure II-43 : Plan d'ensemble de la lame de test et géométrie du réseau de micropuits avec une densité de ~1200 µpuits/cm². 89
Figure II-44 : Image de puits rectangulaires vides (zoom Navitar x 2,2). 90
Figure II-45 : Projection de DMF dans les micropuits d'une lame de microscope. 91
Figure II-46 : Plan de puce. 92
Figure II-47 : Image de fluorescence de la puce après mise en présence avec de la streptavidine CY3. 92
Figure II-48 : Superposition du plan de puce et de l'image de fluorescence. 93
Figure II-49 : Profil d'intensité de fluorescence de la puce suivant une colonne. 94
Figure III-1 : Formule du polydiméthylsiloxane. 100
Figure III-2 : Réaction d'hydrosilylation. 101
Figure III-3 : Réticulation du Sylgard 184 d'après [137]. 102
Figure III-4 : Paramètres géométriques du tampon d'après [147]. 104
Figure III-5 : Les principaux modes de déformation du tampon. 105
Figure III-6 : Influence du retrait du PDMS sur la géométrie du motif. 107
Figure III-7 : Principe du µtamponnage par "wave printing" d'après [162]. 109
Figure III-8 : µtamponnage selon [26]. 114
Figure III-9 : Délimitation du réseau d'une puce à ADN par µTP selon [26]. 114
Figure III-10 : Tamponneur à fonctionnement manuel. 116
Figure III-11 : Vue du banc de mini-tamponnage semi-automatique. 117
Figure III-12 : Vue des principaux problèmes du banc de mini-tamponnage. 118
Figure IV-1 : Principe de l'automatisation du µTP. 122
Figure IV-2 : Accouplement flexible. 124
Figure IV-3 : Guidage du mouvement du tampon avec une architecture vérin/accouplement flexible/glissière. 125
Figure IV-4 : Charge exercée sur le tampon par transmission de la pression. 126
Figure IV-5 : Schéma simplifié de la tête de tamponnage (vue de dessus). 127
Figure IV-6 : Vue de face et de dessus de la tête de tamponnage. 128
Figure IV-7 : Résolution du réglage du parallélisme tampon/substrat (cas des petits angles). 129
Figure IV-8 : Vue du porte-substrat. 130
Figure IV-9 : Algorithme d'alignement des motifs du substrat et du tampon. 130
Figure IV-10 : Système automatique d'encrage du tampon par pulvérisation. 132
Figure IV-11 : Vue globale du banc de µTP avec trois têtes de pulvérisation. 137
Figure IV-12 : Représentation 3D du banc de µtamponnage. 139
Figure IV-13 : Vue de la partie centrale du banc de µTP placé dans sous une hotte à flux laminaire. 139
Figure IV-14 : Les différentes configurations du banc de µTP. 140
Figure IV-15 : Conception mécanique du tampon et du porte-tampon. 141
Figure IV-16 : Réalisations expérimentales porte-tampon/tampon. 142
Figure IV-17 : Principe de la presse pour mouler le tampon. 143
Figure IV-18 : Principe de la mesure de la reproductibilité mécanique du banc de µTP. 144
Figure IV-19 : Plan du tampon avec un motif à trois croix sortantes de hauteur 12 µm. 146
Figure IV-20 : µtamponnage avec motif à trois croix. 147

Figure IV-21 : Plaquage du tampon sur le substrat après rotation du tampon..... 147
Figure IV-22 : Ecrasement des motifs isolés du tampon..... 147
Figure IV-23 : Principe du procédé de gravure de circuits µfluidiques en verre avec masquage par µTP. 149
Figure IV-24 : Tamponnage et gravure humide d'une structure verre/chrome/argent..... 149
Figure IV-25 : Circuit en verre avec croix et réservoir gravés avec masquage par µTP..... 150
Figure IV-26 : Séparation de biomolécules par électrophorèse avec un µlaboratoire verre/PDMS..... 150
Figure V-1 : Contrôle de la charge sur le tampon par butées micrométriques..... 154
Figure V-2 : Bilan des forces sur le porte-tampon. 155
Figure V-3 : Avec les butées micrométriques, la charge sur le motif ne dépend pas du voisinage..... 156
Figure V-4 : Vue du banc de µTP avec les deux butées à vis micrométrique avant et après contact..... 157
Figure V-5 : Vue 3D du banc de µTP avec les deux butées réglables à vis micrométrique..... 158
Figure V-6 : Discrimination du contact d'une croix sur le substrat en fonction de la hauteur de butée..... 159
Figure V-7 : Vue du motif du tampon se décollant du substrat pour une hauteur de butée croissante (éclairage rasant)..... 159
Figure V-8 : Vue du substrat à tamponner. 160
Figure V-9 : Plan de tamponnage de la puce..... 161
Figure V-10 : Principe du dépôt d'anticorps par µTP au fond d'un canal µfluidique..... 162
Figure V-11 : Vue du tampon en contact avec le canal µfluidique (caméra du banc de µTP)..... 162
Figure V-12 : Cartographie de fluorescence du µlaboratoire sur puce après tamponnage des deux motifs..... 164
Figure V-13 : Principe d'une tête de tamponnage flexible..... 166
Figure V-14 : Principe du banc de nanotamponnage. 167
Figure V-15 : Réglage du banc du µTP avec un tampon à plusieurs niveaux..... 168
Figure V-16 : Nano-impression sans contact au 3ème niveau du tampon..... 170
Figure A-1.1 : Architecture générale du Synthétiseur de puces haute densité. 177
Figure A-1.2 : Principe de la configuration multi-chimie du Synthétiseur de puces haute densité (Phosphoramidites et Fmoc)..... 178
Figure A-1.3 : Configuration mono-chimie phosphoramidite du Synthétiseur in situ de biopuces haute densité. 180
Figure A-2.1 : Vue générale du Synthétiseur in situ haute de biopuces haute densité avec trois postes réactionnels non localisés. 182
Figure A-2.2 : Schéma montrant l'enceinte, le plateau, le rail, le porte substrat et le joint d'étanchéité en U..... 183
Figure A-2.3: Vue du plateau..... 185
Figure A-2.4 : Charge maximale appliquée sur le plateau. 185
Figure A-2.5 : Conception du porte-substrat avec wafer silicium Ø 200 mm..... 187
Figure A-2.6 : Module de projection..... 188
Figure A-2.7 : Dimensions du module de projection et vue 3D du support des têtes de projection..... 188
Figure A-2.8 : Schématisation du réglage en hauteur de la tête de projection et problème de parallélisme entre les têtes de projection et le substrat..... 189
Figure A-2.9 : Système de nettoyage d'une tête de projection piézoélectrique. 190
Figure A-2.10 : Poste non localisé 191
Figure A-2.11 : Vue CAO du capot fermant l'enceinte réactionnelle..... 192
Figure A-2.12 : Sas pour l'introduction et l'enlèvement du substrat. 193
Figure A-3.1 : Principe de la projection par microélectrovanne. 196
Figure A-3.2 : Vue CAO 3D d'une microélectrovanne miniature (Lee Compnay). 196
Figure A-3.3 : Signal électrique de commande d'une microélectrovanne. 197
Figure A-3.4 : Tête de projection assemblée avec les 6 microvannes d'alimentation..... 198
Figure A-4.1 : Commande électronique du banc de µtamponnage. 200
Figure A-4.2 : Organigramme du programme principal. 201
Figure A-5.1 : Paramètres géométriques du tampon d'après [147]..... 203
Figure A-5.2 : Approximation de l'énergie du tampon dans le cas du modèle faisant intervenir l'énergie de surface. 205
Figure A-6.1 : Platine de déplacement Melles Griot 17 DRV 517 intégrant une vis micrométrique manuelle et un actionneur piézoélectrique motorisé..... 209
Figure A-6.2 : Conception mécanique du banc de µtamponnage avec actionneur piézoélectrique. 210
Figure A-6.3 : Vue du banc de µtamponnage avec actionneur piézoélectrique..... 210

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 : Les vingt acides aminés naturels. 10
Tableau I-2 : Classification et propriétés des vingt acides aminés naturels d'après [18]. 11
Tableau II-1 : Historique des imprimantes Epson. 49
Tableau II-2 : Densité théorique des biopuces en fonction de la résolution des projections. 50
Tableau II-3 : Comparaison des propriétés physiques de différents solvants de projection. 52
Tableau II-4 : Quelques valeurs du coefficient de couplage piézoélectrique d'après [124]. 53
Tableau II-5 : Paramètres du cycle de projection pour l'encre à 25°C d'après [128]. 58
Tableau II-6 : Paramètres du signal de commande pour la projection d'encre. 75
Tableau II-7 : Paramètres du signal de commande pour la projection de DMSO. 75
Tableau II-8 : Paramètres du signal de commande pour la projection de DMF. 77
Tableau II-9 : Paramètres du signal de commande pour la projection de l'acétonitrile. 80
Tableau III-1 : Comparaison des PDMS d'après [142-145]. 103
Tableau IV-1 : Spécifications de la glissière pour le guidage du tampon. 124
Tableau IV-2 : Système de visualisation du banc du µTP 136
Tableau IV-3 : Reproductibilité mécanique du banc de µtamponnage 145
Tableau V-1 : Dimensions des motifs µfluidiques. 161

INTRODUCTION

L'objet de ce travail est de développer des procédés **d'adressage de produits chimiques ou biologiques** à très haute résolution**,** afin de développer de nouvelles méthodes d'élaboration de biomicrosystème, de biopuces et de microlaboratoires sur puce à haute densité et haute résolution. En effet ces procédés permettront :

- en diminuant la surface de travail, d'intégrer des biopuces dans des microlaboratoires sur puces et/ou d'accroître la sensibilité de ces biomicrodispositifs en augmentant le rapport quantité d'analyte par unité de surface ;
- à surface de travail inchangée, d'augmenter leur capacité d'analyse multiparamétrique, notamment dans le cas des biopuces en augmentant le nombre de plots de composition différente par unité de surface.

Ce mémoire est divisé en trois parties :

Dans la partie A, nous ferons une revue bibliographique sur les biopuces et microlaboratoires sur puce, en étudiant les procédés d'élaboration en fonction du mode d'adressage des réactifs (chapitre I).

Deux modes d'adressage seront particulièrement étudiés :

- **L'adressage par projection** pour la synthèse in situ de biopuces, pour lequel nous pourrons nous baser sur l'expérience du laboratoire, qui a développé un procédé de synthèse in situ de puces à ADN basse densité et basse résolution (projection : 5 nanolitres). Notre objectif sera d'accroître la résolution du procédé (projection : 4 picolitres) et de diversifier la chimie de synthèse vers les puces à oligopeptides. Nous envisagerons aussi l'application de ce procédé à la fabrication de biopuces à haute densité et à haute résolution pour la Génomique à la Protéomique.
- **L'adressage par µtamponnage**. Ce procédé, de faible coût, permet d'adresser des réactifs à plus haute résolution que par picoprojection, et ce avec un mode de fabrication collectif. Son potentiel d'application est donc très important à la fois pour la recherche et pour l'industrie, et ce pratiquement pour toutes les catégories de biopuces et microlaboratoires sur puce.

La partie B de ce travail, sera consacrée à l'adressage de réactifs par projection avec une résolution du picolitre pour la synthèse in situ de puces à oligopeptides. La synthèse de puces à oligonucléotides à haute densité par projection étant devenue une réalité industrielle,

nous avons opté pour une voie de recherche encore inexploitée : les puces à oligopeptides haute densité. Ce procédé est basé sur la synthèse des sondes par la voie des Fmoc et son principal intérêt sera de faciliter le développement de puces à protéines qui actuellement peut prendre de quelques mois à quelques années. En effet le recours à des sondes oligopeptidiques synthétisées chimiquement permettra d'automatiser la fabrication des puces, d'augmenter leur production, de diminuer les coûts, et surtout d'accroître la combinatoire des sondes.

Nous souhaitons commenter cet aspect combinatoire de manière explicite. La combinatoire des protéines est basée sur un codage à base 20 correspondant aux 20 acides aminés naturels, alors que le codage de l'ADN est à base 4. Ainsi pour disposer d'une puce à oligopeptides avec des sondes à 6 peptides, avec toutes les combinaisons possibles, il conviendrait de procéder à 20^6 soit 64 millions de synthèses différentes, sur une surface de quelques cm² ! Il est donc indispensable de recourir à des procédés d'adressage de réactifs aussi résolu que possible à la fois pour synthétiser autant de sondes différentes que possible et conserver des surfaces "gérables" de puces. Une difficulté supplémentaire est qu'il sera aussi indispensable d'obtenir le meilleur rendement de synthèse possible pour limiter la quantité de sondes comportant des erreurs de composition et rendre ces puces ″utilisables″.

Ces contraintes expliquent que nous nous sommes intéressés à la projection de réactifs en développant systématiquement une méthode d'adressage parfaitement compatible avec la chimie des Fmoc (Chapitre II). Pour ce faire, nous avons mis en œuvre des dispositifs de projection par effet piézoélectrique du commerce, qui permettent de concilier haute résolution, disponibilité et coût. Après avoir étudier leur architecture interne, nous montrerons comment nous pourrons adapter les protocoles de projection aux produits de synthèse des Fmoc. Ce travail sera validé par une synthèse chimique par picoprojection d'une puce modèle simplifiée.

Le laboratoire n'ayant pas développé à temps un modèle de puces à oligopeptides plus complexe, qui aurait permis de valider le développement d'un synthétiseur de puces haute densité, nous n'avons pas procédé au développement de cet instrument. Sa conception est toutefois rassemblée dans les Annexes 1, 2 et 3 pour des travaux futurs.

Dans la dernière partie de ce travail (Partie C), nous sommes passés à un autre procédé d'adressage de réactifs basé sur le µtamponnage. Moins flexible que le précédent, il présente l'avantage de concilier coût et très haute résolution (~1µm), à terme ultra haute résolution (10 - 100 nm) et ce avec une très grande diversité d'applications. En l'absence d'instrument permettant de "microtamponner" des réactifs de manière répétable, nous avons développé un

banc de µtamponnage intégrant de manière très compacte et économique toutes les fonctions nécessaires à ce procédé (fonctionnement automatique, encrage, alignement, contrôle de la charge,…). Ce banc de µtamponnage pourrait donc intéresser les chimistes et les biologistes désireux d'adapter ce procédé à leurs propres besoins.

Dans ce mémoire, après un état de l'art spécifique au µtamponnage (Chapitre III), nous passerons en revue les différentes générations d'instruments développés. Ils reposent sur une conception mécanique originale, avec un mode de contrôle de la charge sur le tampon de plus en plus "performant" :

- une première génération de banc de µtamponnage avec charge contrôlée par vérin (Chapitre IV) ; ce travail sera validé par une première application à la gravure de microlaboratoires sur puces en verre avec des motifs dessinés exclusivement par µtamponnage. Cette application pourrait constituer une solution originale permettant de fabriquer des propres circuits µfluidiques sans faire appel à des centrales de microtechnologie du type "salle blanche" ;
- une deuxième génération de banc de µtamponnage avec une charge contrôlée par rétroaction avec des butées à résolution micrométrique (Chapitre V) ; ce développement permet de greffer des protéines au fond d'un canal µfluidique, constituant ainsi un procédé d'élaboration original pour intégrer une biopuce dans un microlaboratoire sur puce.

Il convient de souligner que nos recherches sur la synthèse in situ de biopuces par microprojection font suite aux travaux du doctorant Mehdi Jaber sur la génération antérieure d'instrument [1]. Le travail effectué sur le µtamponnage repose sur une collaboration avec le doctorant Benjamin Hannes, chargé des aspects microtechnologiques et du développement des protocoles des fabrications [2], et avec le doctorant Julien Vieillard pour la partie biologie des applications du µtamponnage [3]. Apoutou N'Djinn a apporté une contribution importante à nos travaux sur les systèmes de projections piézoélectriques [4].

PARTIE A

ETAT DE L'ART

Chapitre I

BIOPUCES ET MICROLABORATOIRES SUR PUCE

Dans ce premier chapitre, nous commencerons par définir ce que sont les biopuces, avant de faire un point général sur leurs méthodes d'élaboration, puis de présenter la technologie du laboratoire au début de ce travail. Ensuite, après avoir introduit les microlaboratoires sur puce, nous montrerons l'intérêt d'augmenter la résolution des biopuces et aussi l'avantage qu'il y aurait à les intégrer dans les microlaboratoires sur puces. Cela nous permettra de mieux cerner nos objectifs qui seront présentés à la fin du chapitre.

La littérature sur toutes ces questions étant très abondante, nous procéderons dans ce chapitre à une revue bibliographique sur les notions essentielles. Un complément bibliographique sur la synthèse in situ de puces à oligopeptides et sur le µtamponnage est prévu dans les chapitres correspondants.

I.1 LES BIOPUCES

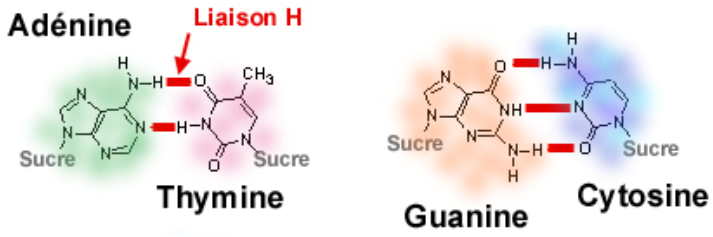
Les biopuces [5-9] sont à la conjonction de la Chimie et de la Biologie et de la microélectronique[1]. Elles permettent de procéder à une **analyse multiparamétrique** pour détecter simultanément (en parallèle) un grand nombre de séquences d'ADN ou de protéines. Elles répondent aussi à des enjeux de miniaturisation, de haut débit et de sensibilité. Le principe de l'analyse mise en œuvre dans une biopuce repose toujours sur une **reconnaissance entre deux catégories de biomolécules** : des **sondes (inconnues)** disséminées dans un milieu liquide et **des cibles** (connues) fixées sur un support solide (verre, silicium, polymère) qui constituent le **substrat** de la biopuce. La capacité à reconnaître simultanément des sondes de composition différente est obtenue en disposant, sur une surface de substrat de quelques mm² à cm², (presque) toutes les cibles potentiellement capables de

[1] Remarquons que pendant longtemps la Microélectronique n'est intervenue dans le domaine des biopuces que pour leur fabrication [6]. En effet la détection des interactions entre biomolécules sur une biopuce repose le plus souvent sur une détection de fluorescence (la cible est marquée par un fluorophore) car c'est une méthode qui s'est imposée par sa très haute sensibilité et par sa (relative) facilité d'utilisation [11]. La détection d'interactions par des méthodes reposant sur des composants susceptibles d'être intégrés transistors à effet de champ [10], électrochimie [12], impédance [13], plasmons de surface [14] est encore un domaine en émergence.

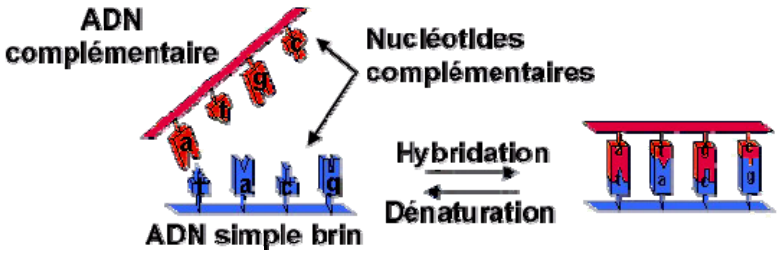
reconnaître les sondes. D'une manière générale, les premières biopuces étaient les puces à ADN utilisées dans le domaine de la génétique. Plus récemment sont apparues les puces à protéines dans le domaine de la protéomique.

I.1.1 LES PUCES A ADN

Les puces à ADN permettent d'analyser des échantillons biologiques sur une base génétique. Le principe de reconnaissance entre deux ADN est basé sur la complémentarité deux à deux des quatre bases (Adénine A, Thymine T, Guanine G, Cytosine C) constituant l'ADN sur le principe d'hybridation (Figure I-1), qui est réversible sous certaines conditions (température, salinité…).



Complémentarité des bases : A-T, C-G ➔ reconnaissance spécifique



Hybridation par appariement de deux brins complémentaires.

Figure I-1 : Principe de l'hybridation/dénaturation des brins d'ADN.

Une puce à ADN est constituée d'un substrat (verre, Si/SiO_2, polymère) d'une surface de l'ordre de 1 à 10 cm² comportant des plots disposés suivant un ordre déterminé, représentatifs chacun d'une composition connue d'une séquence sonde d'acide nucléique (cDNA, oligonucléotides, etc.). Sur chaque plot, sont disposées des sondes d'une composition (en théorie) identique[1] avec une densité de surface de l'ordre de 10^{10} à 10^{12} sondes/cm². Lorsque l'on envoie sur la puce, des molécules cibles d'ADN à analyser, marquées au préalable par des fluorophores, celles-ci viennent se fixer par hybridation sur les sondes complémentaires correspondantes du substrat. Il est possible, dès lors, en détectant par

[1] Dans la réalité, une partie des séquences sur un plot ne correspond pas à la composition théorique, ce qui dégrade la spécificité de la reconnaissance cible/sonde. Nous verrons que l'un des enjeux de la synthèse in situ sera d'avoir le rendement de synthèse le plus élevé possible pour diminuer le nombre de séquences ne correspondant pas à la composition théorique.

fluorescence, la position sur le substrat des couples cible/sonde hybridés, de déterminer la composition des cibles (Figure I-2).

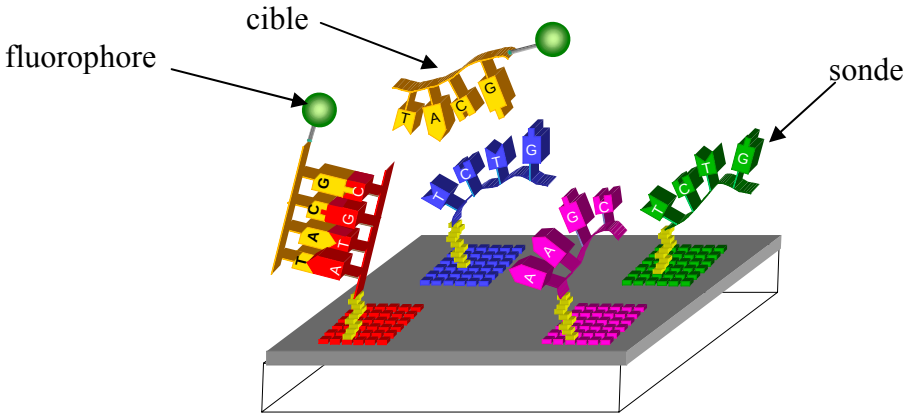


Figure I-2 : Principe de la reconnaissance d'une cible pour une puce ADN.

Les puces à ADN sont de nature très diverse, puisque cette notion recouvre aussi bien des dispositifs permettant l'analyse d'un faible nombre de gènes représentatifs par exemple d'une maladie (puce diagnostic pour des maladies génétiques ou pour des maladies multifactorielles comme le cancer [15]) que des dispositifs permettant de caractériser l'ensemble d'un génome, (pour analyser par exemple simultanément l'expression de tous les gènes du génome humain [16] ou de celui d'une levure [17]). On conçoit donc que les méthodes d'élaboration soient de nature diverse. Nous procéderons en section I.2 à une analyse détaillée de celles-ci.

I.1.2 LES PUCES A PROTEINES

Nous rappelons qu'une protéine est constituée d'acides aminés. La Figure I-3 montre la structure générale d'un acide aminé, qui possède toujours par définition une fonction amine et une fonction carboxylique. Il existe 20 acides aminés naturels[1], qui interviennent dans la composition des protéines et qui se différencient par le groupement R (Tableau II-1) avec donc une grande diversité en termes de dimension, forme, charge, capacité à former des liaisons hydrogène, hydrophobicité, et bien sûr réactivité chimique (Tableau I-2).

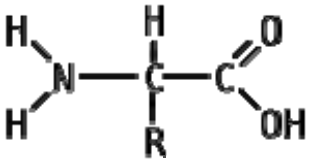


Figure I-3 : Structure générale d'un acide aminé.

[1] Au total il existe environ 400 acides aminés qui ont été identifiés mais qui n'interviennent pas tous dans la composition des protéines.

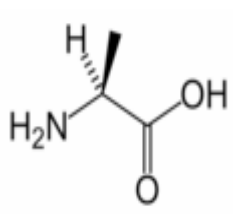
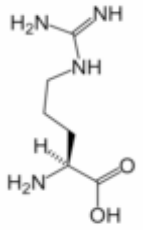
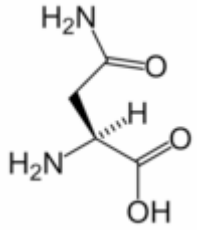
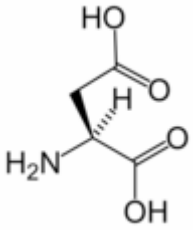
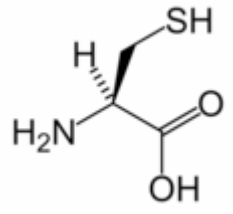
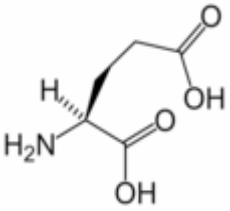
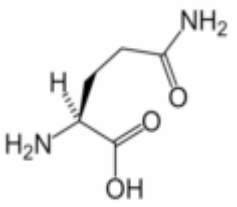
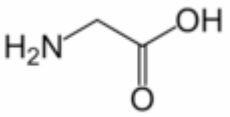
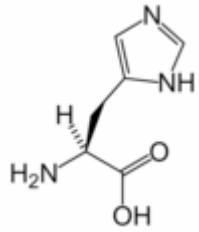
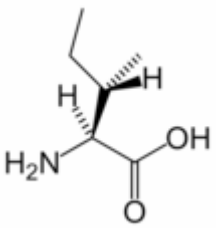
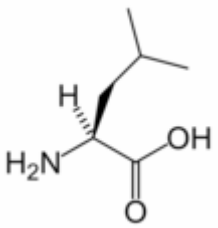
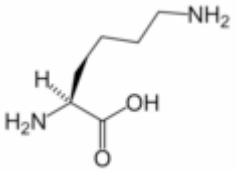
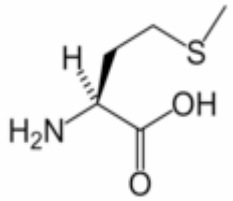
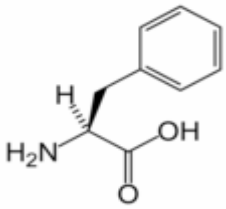
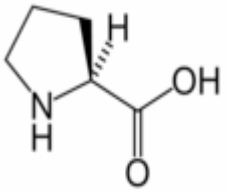
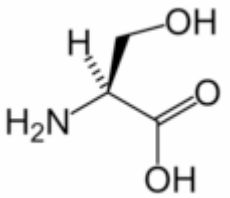
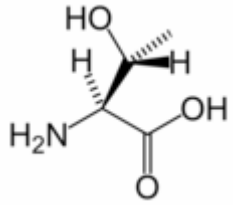
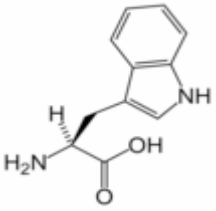
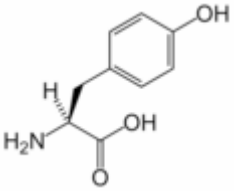
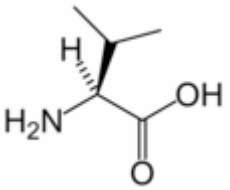
 L-Alanine (Ala / A)	 L-Arginine (Arg / R)	 L-Asparagine (Asn / N)	 L-Aspartate (Asp / D)
 L-Cystéine (Cys / C)	 L-Glutamate (Glu / E)	 L-Glutamine (Gln / Q)	 Glycine (Gly / G)
 L-Histidine (His / H)	 L-Isoleucine (Ile / I)	 L-Leucine (Leu / L)	 L-Lysine (Lys / K)
 L-Méthionine (Met / M)	 L-Phénylalanine (Phe / F)	 L-Proline (Pro / P)	 L-Sérine (Ser / S)
 L-Thréonine (Thr / T)	 L-Tryptophane (Trp / W)	 L-Tyrosine (Tyr / Y)	 L-Valine (Val / V)

Tableau I-1 : Les vingt acides aminés naturels.

Acide aminé	Code	Taille	Caractère	pH
Alanine	ala		Apolaire	Neutre
Arginine	arg		Polaire	Fortement basique
Asparagine	asn		Polaire	Neutre
Aspartate	asp		Polaire	Acide
Cystéine	cys	Petite	Apolaire	Neutre
Glutamate	glu	Grande	Polaire	Acide
Glutamine	gln		Polaire	Neutre
Glycine	gly		Apolaire	Neutre
Histidine	his		Polaire	Fortement basique
Isoleucine	lie		Apolaire	Neutre
Leucine	leu		Apolaire	Neutre
Lysine	lys		Polaire	Basique
Méthionine	met		Apolaire	Neutre
Phénylalanine	phe		Apolaire	Neutre
Proline	pro		Apolaire	Neutre
Sérine	ser		Polaire	Neutre
Thréonine	thr	Petite	Polaire	Neutre
Tryptophane	trp		Apolaire	Neutre
Tyrosine	tyr		Polaire	Neutre
Valine	val	Grande	Apolaire	Neutre

Tableau I-2 : Classification et propriétés des vingt acides aminés naturels d'après [18].

Les puces à protéines sont des outils destinés à l'analyse d'interactions ligand/protéine. Leur principe est directement transposé des puces à ADN [19] : Les ligands sondes fixés sur le substrat peuvent être des oligopeptides, des anticorps, ou d'autres types de protéines selon l'application envisagée, à condition d'être capables de réagir spécifiquement avec des protéines cibles extraites d'un milieu biologique. La reconnaissance sonde/cible ne repose plus sur l'hybridation entre oligonucléotides mais sur des interactions protéines/protéines. Les puces à protéines comportent généralement de 100 à 1000 sondes et permettent de réaliser en quelques heures de manière simultanée une analyse multiparamétrique. Ces puces représentent un moyen puissant et nouveau pour le développement de la protéomique et par conséquent de la compréhension des mécanismes biologiques complexes. Des applications

importantes sont prévisibles dans le diagnostic médical et dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

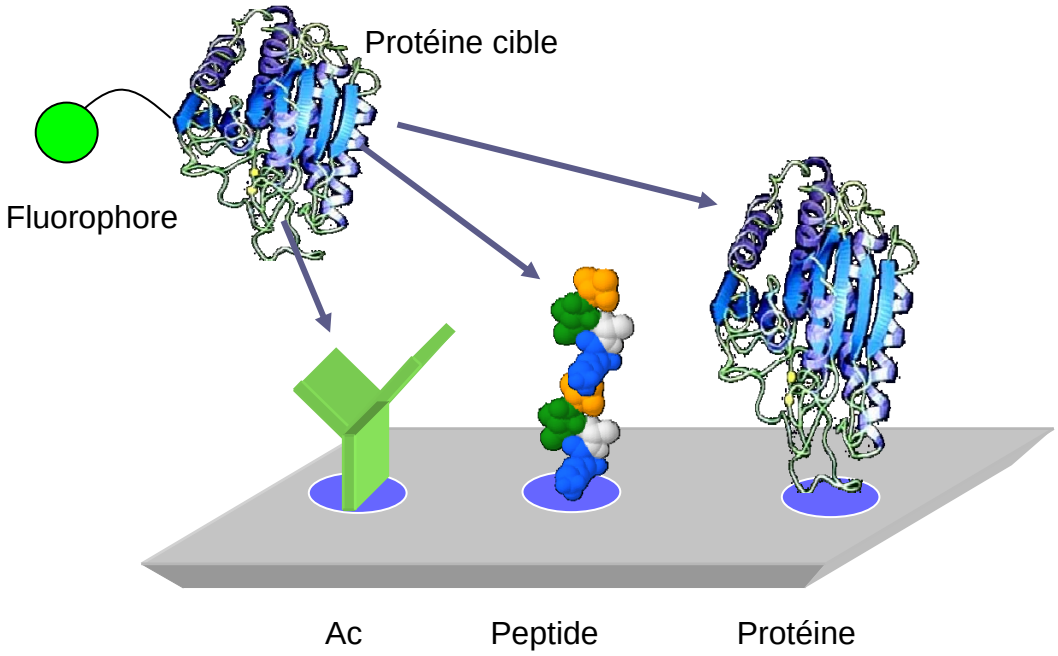


Figure I-4 : Principe d'une puce à protéines.

I.1.3 INTEGRATION, DENSITE ET RESOLUTION

Nous allons procéder à une classification fine des différentes catégories de biopuces. Nous définissons **le degré d'intégration** d'une biopuce comme étant le nombre de sondes de composition différente à la surface de la puce, qu'il faut différencier de la **densité** d'une biopuce qui correspond au nombre de plots par unité de surface[1]. Il est possible de distinguer [20] :

- les biopuces basse intégration qui comportent jusqu'à quelques centaines de sondes ;
- les biopuces moyenne intégration qui présentent de 500 à 10 000 sondes ;
- les biopuces haute intégration qui comportent jusqu'à 100 000 sondes ;
- au-delà, les biopuces à ultra haute intégration (qui n'existent pas encore).

Ces différents types de biopuces n'ont pas la même utilisation :

- Les puces basse intégration ont le domaine du diagnostic comme première application ; elles seront destinées à une production de masse à un coût faible.

[1] Le nombre de plots ne correspond en général pas au nombre de sondes car une même composition de sonde est répétée sur plusieurs plots pour fiabiliser les puces par redondance

- Les puces moyenne intégrations sont utilisées pour des études liées à des recherches ciblées, par exemple pour des études d'expression de gènes ; elles sont produites en quantité limitée avec un outillage très adaptatif (spotters : cf. I.2.4).

- Les puces haute intégration sont utilisées pour des études très complexes de génômes entier ou la pharmacogénomique dans un contexte de recherche académique et industrielle [21]. Elles nécessitent une préparation très importante et des installations conséquentes : les développements indispensables pour la mise au point de ces puces entraînent des frais élevés et limitent les applications à des études à haute valeur ajoutée (procédés Affymetrix ou Agilent : cf. I.2.2 et I.2.3).

La Figure I-5 résume une classification qui sera discutée tout au long de ce chapitre. Elle montre que l'on différentie les biopuces en fonction du mode de préparation des sondes (chimique ou biologique) et en fonction du moment où l'on adresse les sondes sur le substrat (ex situ : adressage des sondes sur le substrat après leur préparation ; in situ : synthèse des sondes directement sur le substrat). Ces différences sont importantes pour une bonne compréhension des enjeux.

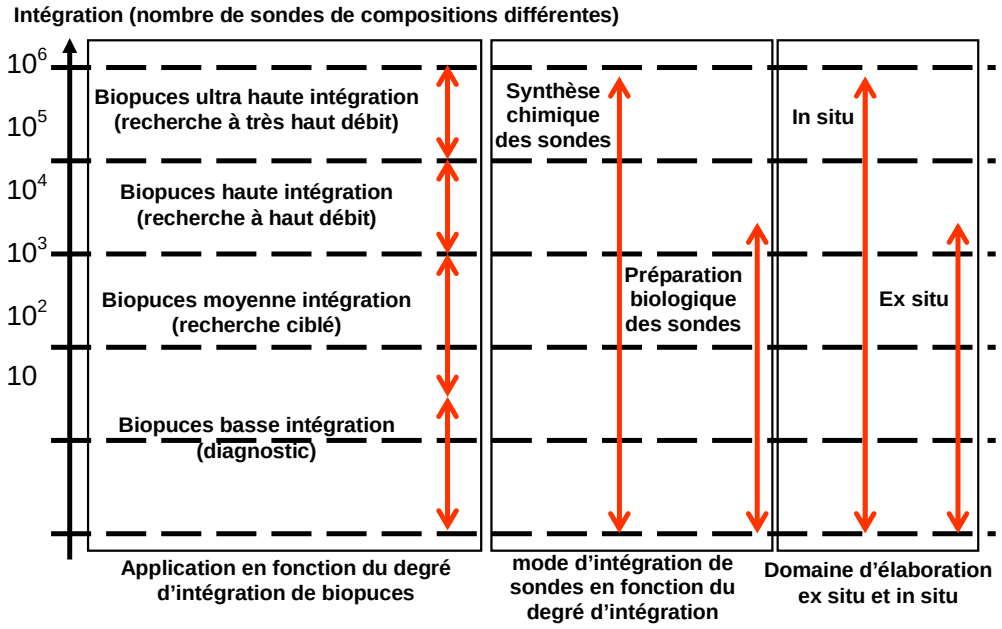


Figure I-5 : Classification des biopuces en fonction du degré d'intégration.

Dans tous les cas, pour élaborer ces biopuces, il est nécessaire de procéder à un **adressage** de réactifs chimiques ou de produits biologiques. Pour ce faire différents moyens d'adressage sont proposés dans la littérature, qui seront passé en revue dans la section I.2. L'une de leur caractéristique essentielle sera leur **résolution**, que nous définirons comme la quantité minimale de fluide que l'on peut manipuler et déposer sur un substrat. Il est clair

qu'augmenter la résolution d'une technique d'adressage permet d'influer sur la densité des biopuces et aussi, sous certaines conditions, d'augmenter leur intégration.

I.1.4 CLASSIFICATION DES BIOPUCES

Une classification importante repose, comme nous l'avons vu précédemment, sur le mode d'obtention des sondes (Figure I-5). On distingue :

- **les modes de préparation des sondes par des méthodes biologique**s. Celui-ci est prépondérant : (i) dans le cas des puces à protéines (ex : sondes à anticorps), (i) dans le cas des puces à ADN avec des sondes constituées d'ADN complémentaires (ADNc) obtenues par transcription inversion d'ARN extraits de cellules.

- **les modes de préparation des sondes par synthèse chimique**. Il est possible en effet de synthétiser chimiquement des sondes oligonucléotidiques dans le cas des puces à ADN et des sondes oligopeptidiques dans le cas des puces à protéines en suivant respectivement la voie de synthèse de la chimie des phosphoramidites pour les oligonucléotides [22, 23] (Figure I-6 gauche) et la chimie des Fmoc (Figure I-6 droite et Figure I-7) ou des tBOC pour les oligopeptides.

Le mode de préparation biologique est très laborieux car il nécessite la collection et le traitement de nombreux échantillons biologiques. De manière générale, la synthèse chimique a donc tendance à s'imposer, lorsque cela est possible. En effet la synthèse chimique est effectuée directement et simplement avec des machines de synthèse automatique (synthétiseurs) qui permettent de préparer des sondes d'une grande diversité, en grande quantité, de manière reproductible et à un faible coût [24]. Ces synthèses sont effectuées sur des microbilles pour obtenir des oligonucléotides ou des oligopeptides qui seront détachés à la fin de la synthèse. Le rendement final de la synthèse dépend du rendement par cycle[1] ρ qui est élevé pour les oligonucléotides (99 à 99,5%) par cycle et plus aléatoire avec les oligopeptides. La grande diversité des oligopeptides du point de vue physicochimique entraîne en effet des difficultés de synthèse qui explique les différences de rendement chimique.

[1] Soit φ le rendement global de synthèse qui est le rapport entre le nombre de sondes ayant la composition attendue par rapport au nombre total de sondes synthétisées. Par définition, la synthèse d'une sonde n mères avec un rendement de synthèse par cycle ρ aboutit au rendement global $\varphi = \rho^n$ [24].

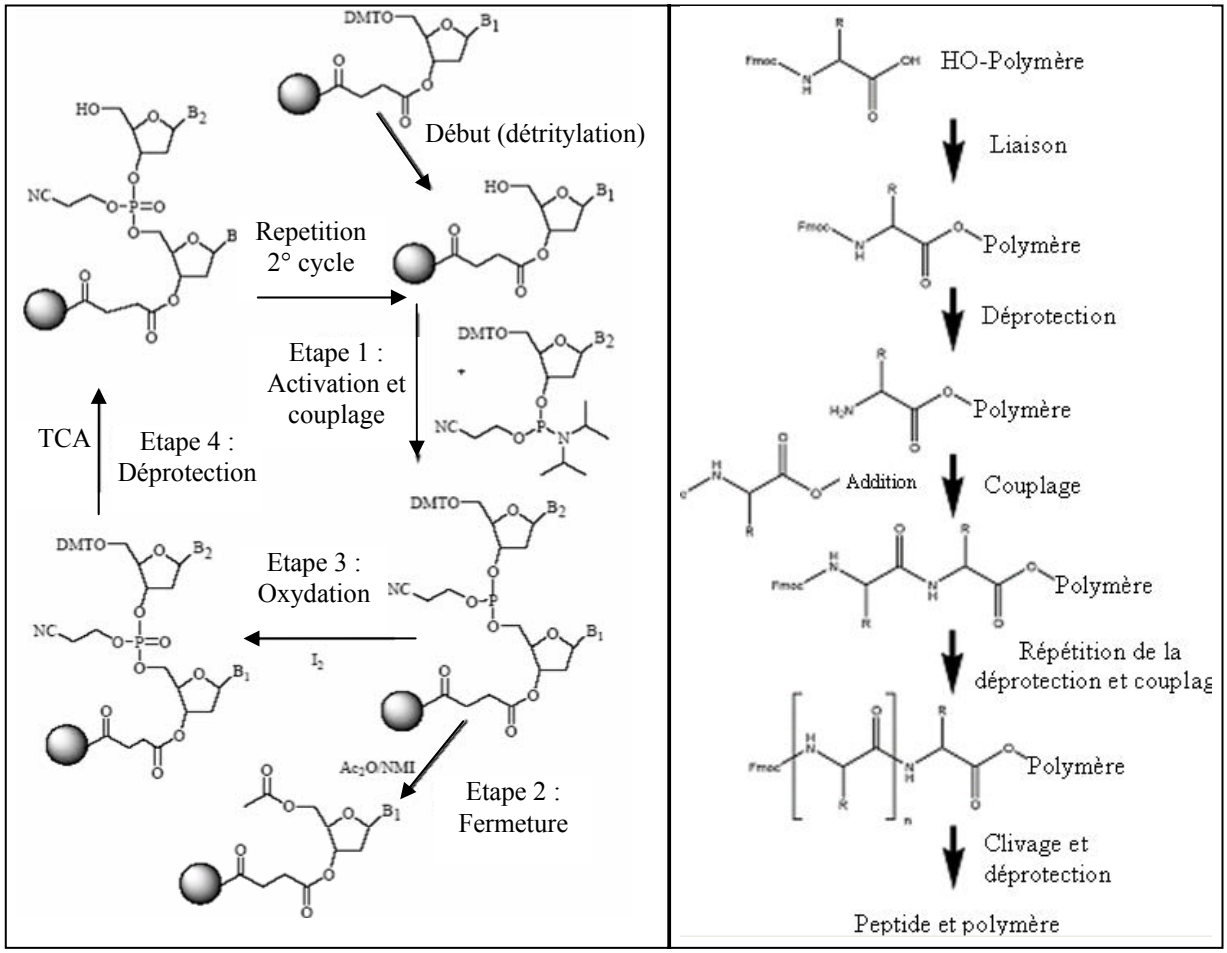


Figure I-6 : A droite : Synthèse sur microbilles d'oligonucléotides par la chimie des phosphoramidites. A gauche : Synthèse sur microbilles d'oligopeptides par la chimie des Fmoc (cycle simplifié).

Par ailleurs la préparation des sondes peut être intégrée à différentes étapes de la fabrication des biopuces, ce qui permet d'aboutir à la distinction fondamentale suivante (Figure I-5) :

- **Les procédés d'élaboration ex situ** qui consistent à préparer toutes les sondes puis à les adresser sélectivement sur les substrats des puces. Les sondes sont au préalable soit synthétisées chimiquement (oligonucléotides, oligopeptides), soit préparées par des méthodes biologiques (cDNA, anticorps, protéines,…).
- **Les procédés d'élaboration in situ** qui consistent à synthétiser les sondes directement sur les substrats des puces ; la synthèse chimique est alors la seule voie possible.

Notons que les biopuces ex situ sont limitées en intégration car il y a une barrière physique à manipuler un grand nombre de sondes différentes. **Les procédés in situ sont essentiels car ils constituent la seule voie d'obtention des puces haute intégration**.

Dans tous les cas, il est nécessaire de procéder à des apports localisés de réactifs ou de produits biologiques sur le substrat des puces. Une classification pertinente pour notre propos est donc de différentier les biopuces en fonction du principe utilisé pour cet adressage. Cette classification est résumée à la Figure I-8 avec une flèche pour chaque mode d'adressage, qui indique les extrêmes de l'aire couverte par chaque technologie. Les modes d'adressage seront passés en revue en I.2. Par exemple, le µtamponnage, qui sera étudié en I.2.7 et dans la partie C de ce mémoire, peut couvrir en théorie toute la gamme de quelques sondes à 1 millions de sondes avec des plots de diamètre 1 mm à 10 nm.

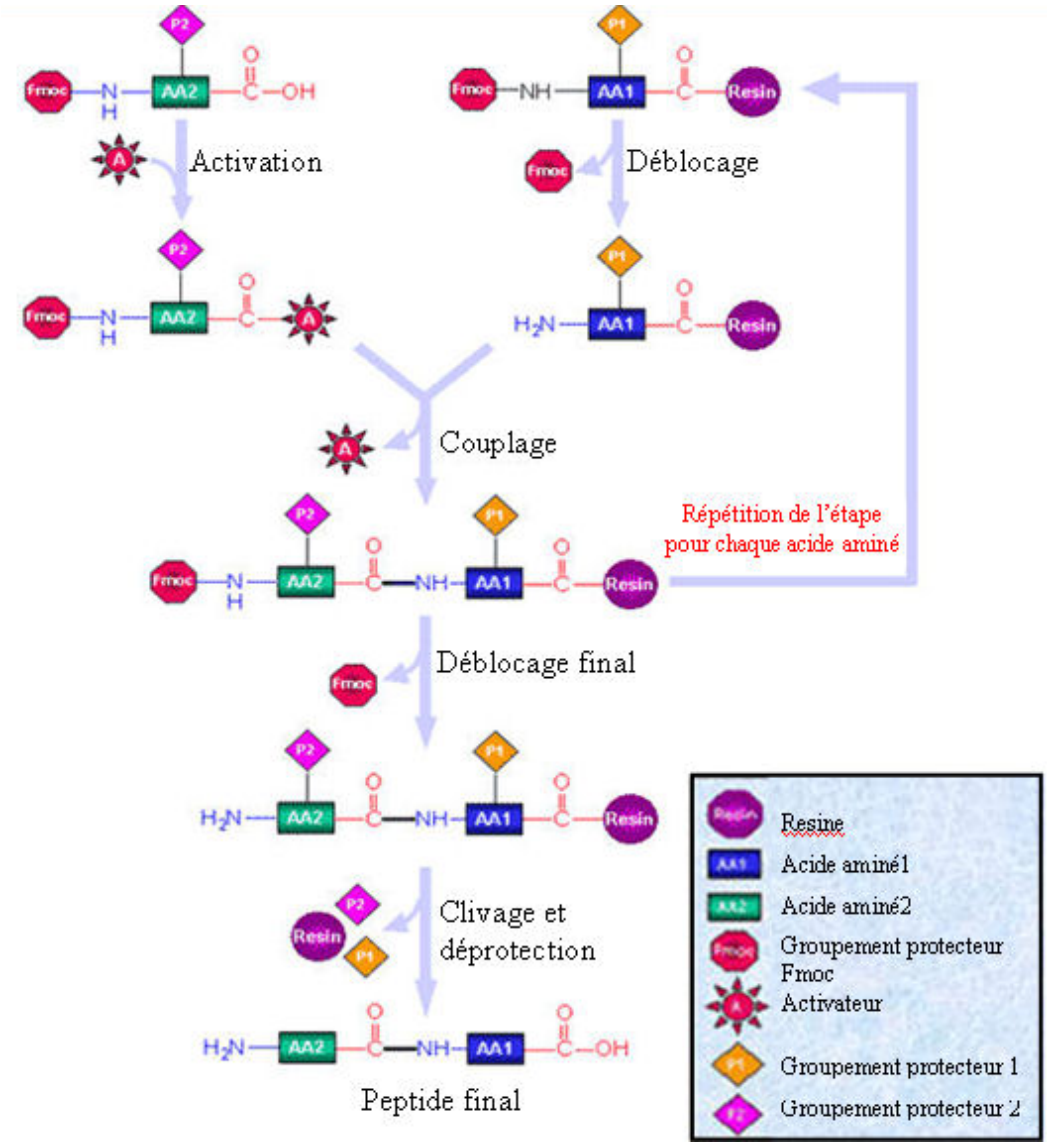


Figure I-7 : Synthèse de peptide sur microbilles avec les étapes d'activation et de déprotection (cycle complet).

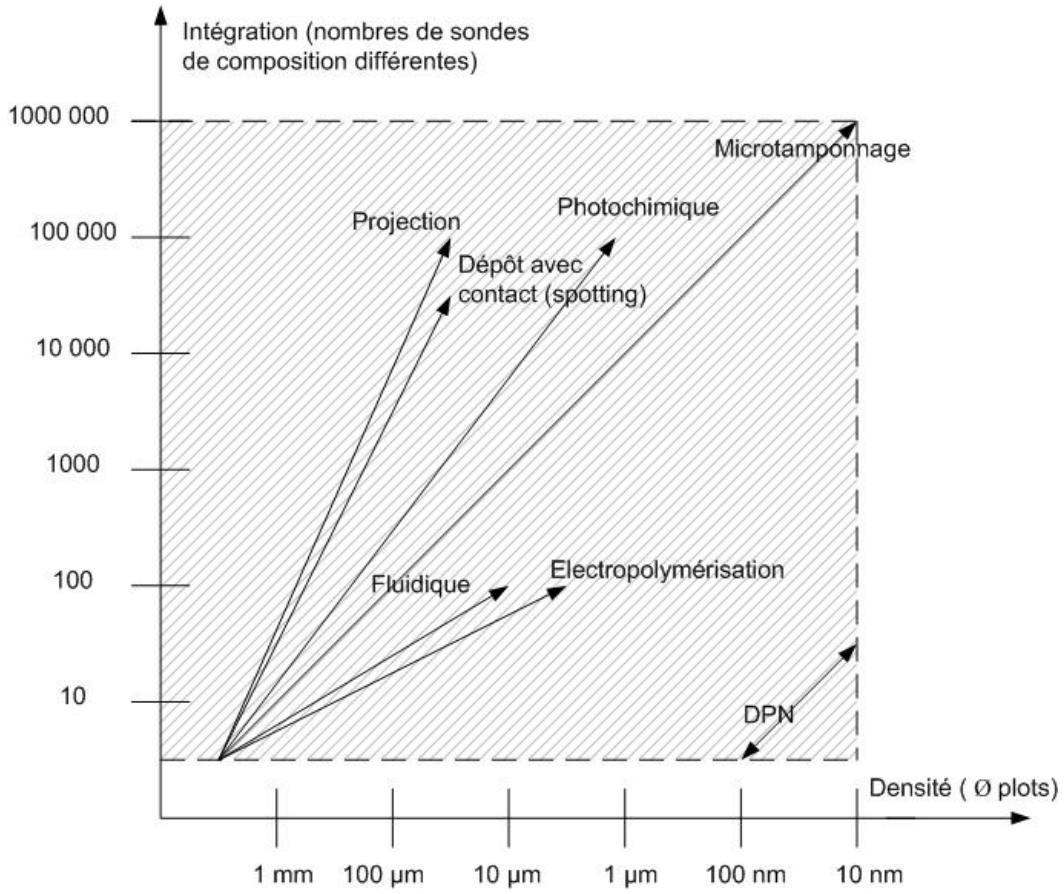


Figure I-8 : Potentiel d'intégration et de densité des biopuces en fonction du mode d'adressage des réactifs.

I.1.5 LES DIFFICULTES PROPRES AUX PUCES A PROTEINES

La technologie des puces à protéines est beaucoup plus "délicate" que celle des puces à ADN. En effet l'ADN est une biomolécule robuste et facile à produire, soit par des voies biologiques, soit par synthèse chimique, alors que les protéines "naturelles" sont souvent beaucoup plus difficiles à obtenir, et ce uniquement par des voies biologique. Il n'existe pas, pour les protéines, de méthode d'amplification comme la PCR et les outils bioinformatiques permettant de prédire les interactions cibles/sondes sont encore en développement. Passer des puces à ADN aux puces à protéines, pose des problèmes d'une complexité redoutable. En effet les protéines d'origine naturelle sont constituées à partir d'une combinatoire sur vingt acides aminés alors que l'ADN est codé selon une combinatoire sur les quatre bases A, C, T et G. Cette combinatoire très riche reflète la diversité des propriétés des protéines (hydrophile/hydrophobe-acide/basique) et de leurs interactions avec l'environnement (électrostatique, hydrogène, hydrophobe, Van der Waals) à laquelle s'ajoute leur structure tridimensionnelle complexe. L'une des difficultés, faisant l'objet de recherches approfondies, est que les protéines sont susceptibles d'être dénaturées lors de leur fixation sur le substrat.

Pour préserver la spécificité des réponses, les méthodes de liaison sondes/substrat font aussi l'objet d'importants développements.

A l'heure actuelle, la conception et la validation d'une puce à sondes protéiques peuvent donc prendre des années. Pour avoir accès plus aisément à l'analyse multiparamétrique, une solution intéressante qui sera étudiée dans le cadre de cette thèse repose sur la mise en œuvre de puces à sondes oligopeptidiques. Le recours à ces sondes permettra de réduire (partiellement) la complexité du problème. En effet elles sont constituées de courtes séquences (10 à 20 mères c'est-à-dire 10 à 20 acides aminés) et elles présentent des avantages déterminants : à la différence des protéines d'origine naturelle, elles sont obtenues par synthèse chimique et sont (relativement) faciles à produire, stables et non susceptibles d'être dénaturées. **Pour développer des puces à protéines, une approche avec des puces à sondes oligopeptidiques synthétiques pourrait être plus rapide qu'avec des sondes naturelles. L'un des objectifs de ce travail sera de contribuer au développement de cette approche d'un point de vue technologique**.

I.2 METHODES D'ELABORATION DE BIOPUCES EN FONCTION DU MODE D'ADRESSAGE

En reprenant les éléments de la Figure I-8, nous passerons en revue ci-dessous les méthodes d'élaboration de biopuces développées par la communauté scientifique en fonction du mode d'adressage des réactifs. Nous avons reporté à la section I.3, l'exposé concernant les technologies développées avant ce travail au laboratoire. Nous insisterons sur le procédé Affymetrix à cause de son importance historique et industrielle et sur le procédé Agilent car il a pris aussi une grande importance et il est basé sur un principe proche du procédé LEOM.

I.2.1 SYNTHESE LOCALISEE PAR FLUIDIQUE

Elle consiste à former un circuit fluidique amovible sur le substrat et (i) à faire circuler les réactifs, si l'on procède à la synthèse in situ, ou (ii) à faire circuler les sondes biomoléculaires en cas de greffage ex situ [8, 25, 26]. Bien que cette méthode soit historiquement l'une des plus anciennes, elle est (pour l'instant) peu utilisée, probablement parce qu'elle nécessite des compétences importantes en µfluidique. On imagine qu'elle se développera à l'avenir parallèlement aux progrès dans ce domaine [27].

I.2.2 SYNTHESE PHOTOCHIMIQUE

1. Puces à ADN

La fabrication ex situ de biopuces par voie photochimique étant peu pratiquée, cette méthode d'élaboration concerne essentiellement la synthèse in situ de puces à oligonucléotides, notamment la technologie de la société Affymetrix [6]. Cette technologie est présentée à la Figure I-9 dans son principe initial. La synthèse est effectuée en suivant un cycle comparable à celui de la Figure I-6 droite mais le groupement protecteur des phosphoramidites est un groupement photolabile. Celui-ci est clivable sous l'action de la lumière. La localisation des réactions est alors effectuée avec un photomasqueur lithographique (source étendue), les oligonucléotides sont déprotégés par utilisation successive de différents masques photolitographiques. Un choix judicieux dans la succession des zones illuminées permet une synthèse combinatoire.

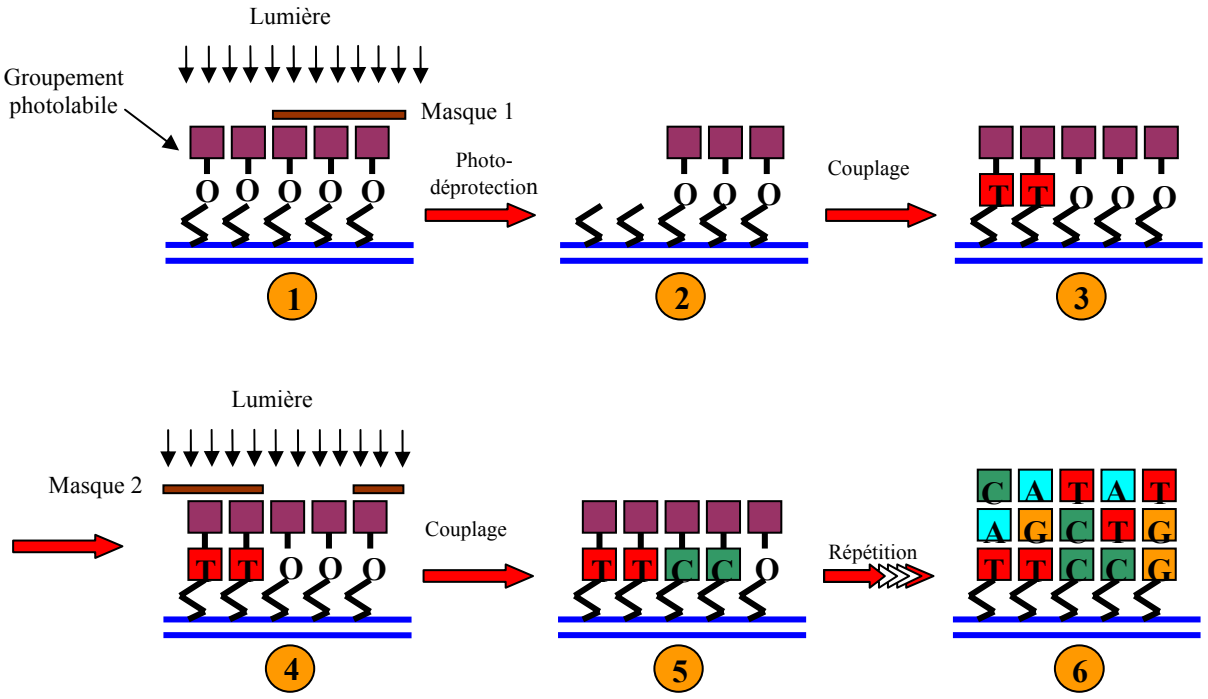


Figure I-9 : Principe de la synthèse photochimique in situ d'Affymetrix.

Le procédé Affymetrix permet d'obtenir des puces à oligonucléotides haute intégration haute densité, les puces pouvant contenir jusqu'à 100 000 plots/cm² de composition différente (souvent un génome entier). Il s'agit du procédé de fabrication le plus ancien et le plus important sur le plan industriel. Il sert de référence pour les comparaisons avec les autres méthodes d'élaboration [28-31].

Cependant, le procédé Affymetrix est très onéreux et d'une mise en œuvre lourde. Il est peu flexible parce qu'il requiert des jeux de masques lithographiques spécifiques pour

chaque plan de puce. Il est pratiquement impossible de juxtaposer des plots comportant des sondes totalement différentes : le principe même de la déprotection par masque impliquant d'effectuer des transitions de composition chimique d'un plot à l'autre[1]. Le rendement de la synthèse photochimique avec le procédé Affymetrix semble aussi être moins bon que la synthèse chimique. L'architecture redondante des puces Affymetrix combinée à des analyses statistiques semble toutefois avoir permis de pallier cet inconvénient.

La technologie Affymetrix ne répond que partiellement aux besoins de la communauté scientifique, qui souhaite plutôt une production avec une mise en œuvre très flexible et à un faible coût. Son champ d'application est celui des puces haute intégration, pour la recherche dans l'industrie pharmaceutique (pharmacogénomique).

Il existe aussi désormais des procédés de synthèse photochimique in situ basés sur l'illumination localisée avec une matrice de micromiroirs [32, 33], [34]. Ces procédés sont plus flexibles que le procédé Affymetrix et se développent rapidement.

2. Puces à oligopeptides

Le principe de la synthèse photochimique in situ de puces à oligopeptides avait été proposé antérieurement au procédé de synthèse in situ de puces à oligopeptides par la société Affymax, la maison mère d'Affymetrix. Celui-ci s'est révélé peu pratique, sans doute parce qu'il nécessite la mise en œuvre de vingt acides aminés avec des groupements photolabiles modifiés, ce qui s'avère très difficile à mettre en œuvre surtout si l'on recherche des rendements élevés. Récemment il a cependant été possible d'adapter la technologie des micromiroirs aux puces oligopeptides, en adaptant et en simplifiant aussi la chimie [33, 35, 36]. Pour l'instant l'on peut considérer que ce procédé prometteur est encore en cours de développement.

I.2.3 MICROPROJECTION

1. Elaboration in situ

De manière générale pour effectuer des réactions chimiques de manière localisée sur un substrat, une méthode, tout aussi importante que la voie photochimique, consiste à déposer sélectivement le réactif ou le produit biologique. L'intérêt est qu'il sera possible d'utiliser directement les réactifs commerciaux utilisés pour la synthèse par la voie des phosphoramidites ou des Fmoc, idéalement en se mettant dans les conditions de rendement chimique maximal. Le dépôt en lui-même peut être effectué par **projection sans contact**

[1] Ce qu'il sera possible de faire par projection.

entre le moyen de dépôt et le substrat ou avec contact mécanique. Nous réserverons à ce dernier cas, le vocable "**microdépôt**", qui correspondra à l'usage du terme anglais "**spotting**" ; cette technique sera étudiée en section I.2.4.

Nous allons aborder ici brièvement la question de la synthèse chimique in situ de puces à oligonucléotides localisée par microprojection. Historiquement cette approche avait été proposée initialement aux Etats-Unis par Hood et Blanchard de l'université de Washington [37], puis développée sous une forme différente au LEOM [38-40], notamment dans le cadre de la thèse de Mehdi Jaber [1]. Différentes sociétés ont essayé d'industrialiser ce procédé (Protogene [41] et Rosetta Inpharmatics aux Etats-Unis, Rosatech en France), mais finalement c'est la société Agilent [42] qui a établi un standard industriel d'importance comparable à celui d'Affymetrix. Le procédé Agilent est probablement issu des travaux de Rosetta Inpharmatics, Blanchard et Hood ; ce dernier continuant ses recherches dans un cadre universitaire sous la forme d'une plate-forme ouverte [43]. Nous ferons le point sur ces différents procédés en I.3.1.4 après la présentation du procédé LEOM. **De manière générale, ces procédés de synthèse in situ par projection présentent un grand intérêt en matière de souplesse d'utilisation, de coût (aussi avec probablement un avantage en terme de rendement chimique par rapport à la voie photochimique, bien que ce point n'ait jamais fait à notre connaissance l'objet d'une démonstration expérimentale)**. Par contre la résolution des moyens de projection étant inférieure à la photolithographie, la densité des puces photochimiques sera meilleure.

2. Elaboration ex situ

Les systèmes de projection permettent d'adresser sélectivement des biomolécules pour procéder à des greffages sur support solide. La faisabilité a été démontré notamment par la société Canon, qui a réalisé des puces à ADN par projection d'oligonucléotides avec un système propriétaire de microprojection pour imprimante [44]. Celui-ci est basé sur l'éjection d'une goutte par création d'une microbulle sous l'effet d'un chauffage rapide et localisé du solvant dans la tête d'impression (Technologie Bubble Jet). Citons aussi le système de multiprojection du LEOM[20] [38] [45] [46] [47] basée sur une projection de biomolécules contrôlée par microélectrovanne, qui sera présenté dans la section I.3.2. Dans les deux cas, il s'agit de puces basse intégration, avec une densité plus élevée dans le cas de Canon puisque la résolution de la projection est meilleure. Elles sont destinées à des applications industrielles pour le diagnostic, qui est un domaine encore en émergence. Pour les besoins de la recherche

dans les laboratoires de biologie. La technique du microdépôt, plus facile à mettre en œuvre, a été en général préférée à la microprojection. Nous allons la présenter ci-dessous.

I.2.4 SPOTTING

1. Elaboration ex situ

En effet, pour accéder à la technologie des biopuces, les biologistes ont développé des méthodes de fabrication ex situ basées sur la production du jeu de sondes (cDNA, oligonucléotides, anticorps, protéines) suivie par la fixation desdites sondes sur un substrat par microdépôt mécanique. Ces procédés sont souvent désignés dans la littérature par les termes "spotter" ou "arrayer" [9]. L'existence de spotter commerciaux a permis aux laboratoires de s'équiper de moyens internes pour le développement de leur propres biopuces : puces à ADN et puces à protéines.

Dans le cas le plus simple, un spotter est un robot qui déplace une matrice de pipettes ou de micro-pointes de façon à aspirer les sondes disposées dans une plaque à puits pour les déposer ensuite sur les substrats des puces. Ces matrices permettent d'obtenir des gouttes de l'ordre du nanolitre et selon le type de pointes utilisées, les tailles des plots varient de 50 à 250 µm. Les matrices de pipettes sont souvent constituées de 4 éléments, plus rarement 16 à 64, alors que le nombre de puits dans une plaque est de 128, voire 384. Il est donc impossible de déposer l'ensemble des sondes en une seule fois. Il faut procéder à plusieurs passes, ce qui implique à chaque fois de décontaminer et de rincer les pipettes. L'on constate dans la pratique qu'une bonne décontamination ne peut être effectuée qu'au prix d'un ralentissement considérable de la vitesse de fabrication. Le dépôt des sondes est obtenu par contact mécanique avec le substrat et sa qualité dépend de très nombreux facteurs difficiles à contrôler (usure des pointes, propreté de la surface des substrats, rang du dépôt lorsque l'on procède à plusieurs dépôts successifs, viscosité des sondes, etc...).

La fabrication de puces par spotting a connu toutefois un grand succès car c'est un procédé flexible, moins coûteux que le procédé Affymetrix, permettant d'obtenir rapidement un nombre limité de puces à ADN ou encore des puces à anticorps moyenne intégration.

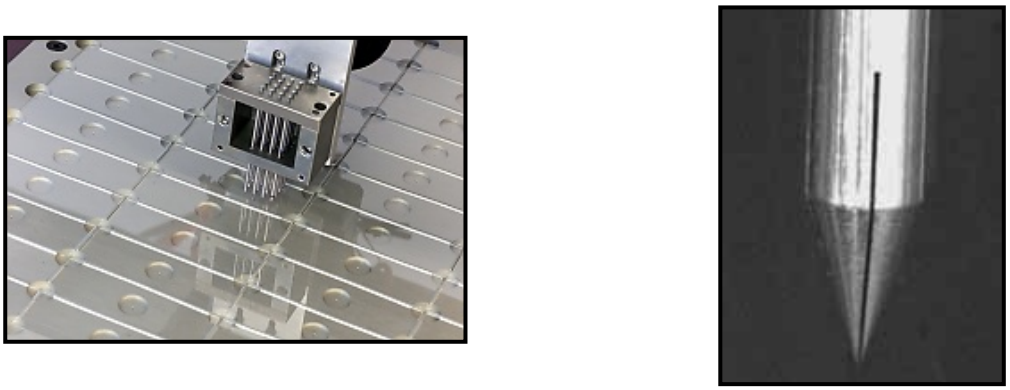


Figure I-10 : Système de spotting (gauche) et vue d'une "plume" de spotter (droite).

2. Elaboration in situ

A notre connaissance, il n'existe pas de procédé de synthèse in situ de puces à oligonucléotides localisé par spotting, sans doute parce que les spotters sont difficiles à mettre en œuvre dans une enceinte anhydre. Par contre les spotters ont été mis en œuvre "à ciel ouvert" dans la synthèse d'oligopeptides, selon un procédé connu sous le nom de technologie SPOT [48]. En effet le rendement de synthèse des Fmoc est moins sensible à l'humidité que celui des phosphoramidites et il est possible d'utiliser des solvants peu volatiles (DMF par exemple). La technologie SPOT repose sur le dépôt de solutions d'acides aminés activés sur une membrane poreuse à l'aide d'un système de pipetage automatisé porté par un robot avec un bras de déplacement XYZ.

A partir d'une membrane commerciale, portant des fonctions hydroxyles, le procédé (Figure I-11) consiste à convertir ces fonctions amines par couplage avec du Fmoc-ß-Ala-OH activé par de la diisopropylcarbodiimide [49] suivi par l'enlèvement des groupements Fmoc (étape I de la Figure I-11). L'on peut ainsi obtenir des charges en amines de 50 nmol/cm² à 500 nmol/cm² [50, 51] en fonction de la nature du support (membrane cellulose ou polypropylène) et de la fonctionnalisation initiale. Les spots circulaires, qui serviront de microréacteurs, seront formés par le dépôt d'une solution d'ester Fmoc-ß-Ala-pentafluorophenyl (étape II). Après enlèvement du groupement Fmoc, des esters activés Fmoc-ß-Ala ou d'autres groupements seront déposés pour former des espaceurs (étape III). L'élongation de la chaîne peptique sera ensuite poursuivie en suivant le cycle conventionnel (Figure I-7) [52, 53]. Chaque cycle démarre avec l'enlèvement du groupement protecteur N- terminal du peptide de tête (étape IV). Puis l'on procède au couplage du rang suivant en déposant un acide aminé pré-activé portant un groupement protecteur N-terminal et aussi des groupements protecteurs latéraux (qui permettent d'éviter des réactions parasites) (étape V). La chaîne croit donc du groupement carboxyle vers le groupement amine (étape VI). A la fin

de la synthèse, tous les groupements protecteurs des sondes sont enlevés (étapes VII). Les sondes deviennent alors fonctionnelles.

Les membranes à oligopeptides SPOT comportent des plots macroscopiques avec quelques centaines de sondes. Elles servent à la reconnaissance d'épitopes, à l'étude d'interactions protéines-protéines, ou encore à l'identification de peptides biologiquement actifs. Nous verrons en II.1 qu'une recherche active est menée actuellement pour accroître la résolution de ce procédé essentiellement pour augmenter la combinatoire par unité de surface. **L'un des objectifs de ce travail sera de développer la technologie nécessaire pour miniaturiser ce procédé de manière considérable**.

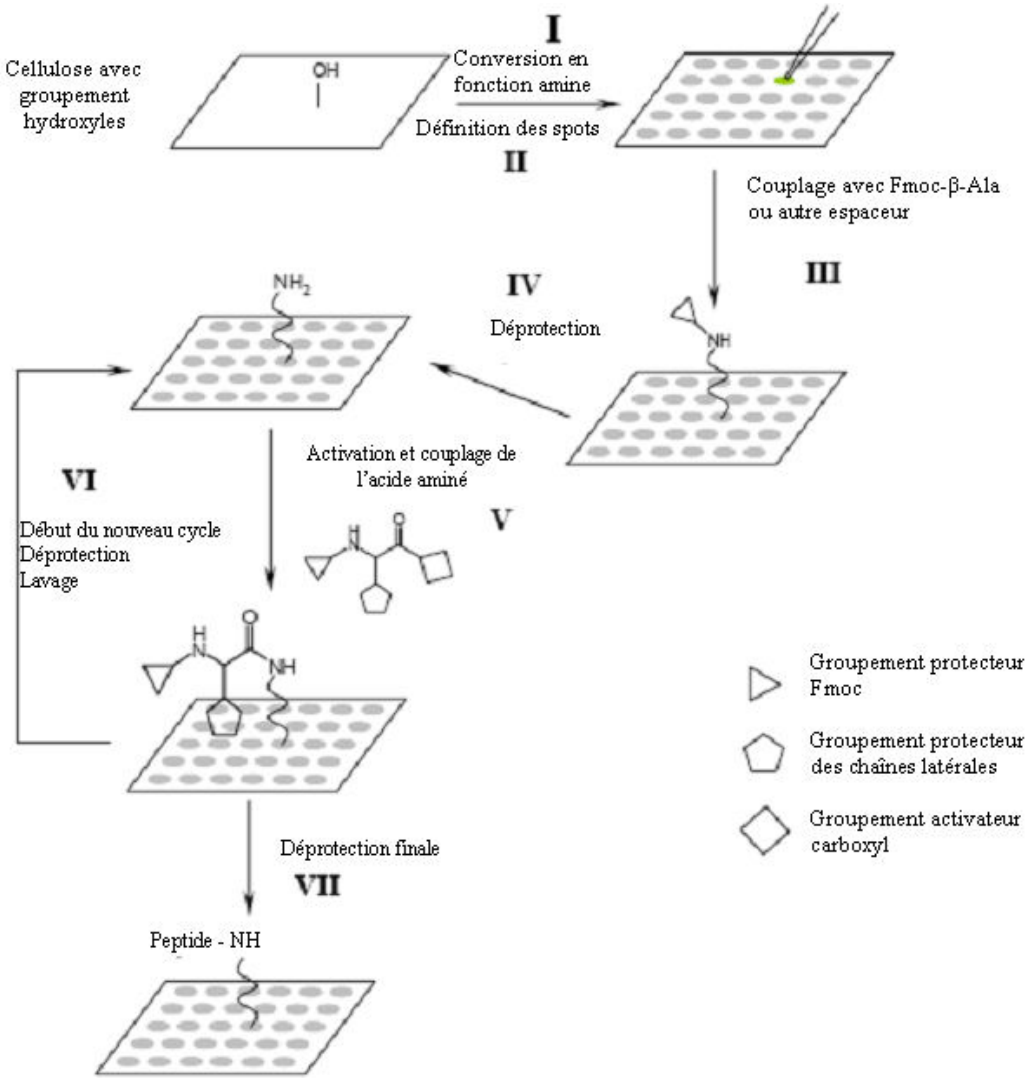


Figure I-11 : Synthèse de puces à oligopeptides sur membrane (procédé SPOT [54]).

I.2.5 ELECTROPOLYMERISATION

Nous mentionnons pour mémoire, le procédé original développé par le CEA [55] pour le greffage ex situ de biomolécules (oligonucléotides, oligopeptides [56], protéines) ainsi que pour la synthèse in situ. Le substrat de départ en silicium est doté d'un réseau d'électrodes

d'or. Un adressage électrique permet de sélectionner une électrode sur laquelle est copolymérisé du polypyrrole (polymère conducteur) soit avec des biomolécules fonctionnalisés avec des groupements pyrroles, soit avec des phosphoramidites portant des groupements protecteurs électrolabiles (Figure I-12). Les plots de la biopuce sont ainsi formés par adressages successifs des produits sur les différentes électrodes. Ce procédé est potentiellement une méthode de production de masse.

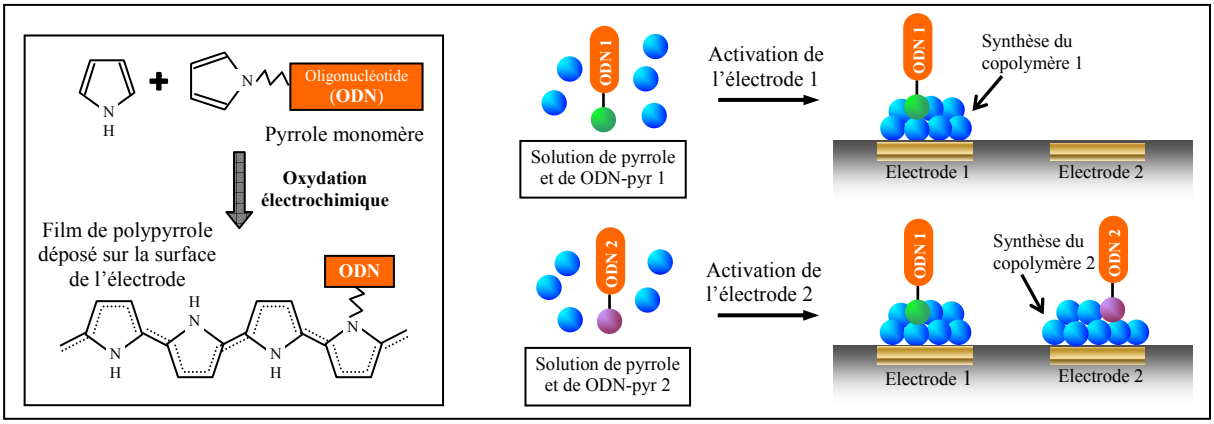


Figure I-12 : Elaboration de biopuces par électropolymérisation.

I.2.6 DIP-PEN NANOLIHOGRAPHY (DPN)

Le procédé DPN est basé sur le transfert par capillarité d'un produit chimique ou biologique sur un substrat à l'aide de la pointe d'un microscope à force atomique (AFM). Il permet d'obtenir des motifs de résolution submicrométrique [57]. Récemment des puces à ADN avec des plots de 100 nm à quelques µm, ont ainsi été fabriquées en transférant de l'ADN portant des groupements thiols sur de l'or [58]. De même des puces à protéines ont aussi été obtenues avec des motifs de 100 à 350 nm [59]. Ce procédé présente l'avantage d'une (relative) simplicité et d'une très haute résolution et connaît donc un développement important [60]. Il est par contre non collectif, ne permet d'adresser qu'une surface très réduite et il devient complexe dès que l'on veut adresser plusieurs produits différents. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à un autre procédé qui est aussi de très haute résolution mais plus adapté au dépôt de plusieurs produits : le µtamponnage.

I.2.7 MICROTAMPONNAGE

Le µtamponnage (µTP) faisant l'objet de développements importants dans la troisième partie de cette thèse, nous allons le présenter de manière détaillée.

1. Principe du microtamponnage

Proposé pour la première fois en 1993 par Whitesides [61, 62], ce procédé a été systématiquement étudié avec de très nombreuses variantes [63], des articles de revue étant régulièrement mis à jour sur cette question [64]. Le principe de base est montré à la Figure I-13. Le point de départ est un maître modèle en silicium sur lequel sont gravés les motifs que l'on veut transférer. Ce maître modèle est dupliqué en négatif par moulage avec un élastomère polydimethylsiloxane (PDMS), constituant ainsi le tampon qui est l'outil de base de ce procédé ; le PDMS présentant la propriété remarquable de reproduire les détails du maître modèle avec une très grande fidélité [65, 66]. Le tampon est ensuite encré avec le produit chimique ou biologique à transférer, puis après séchage, il est mis en contact avec le substrat. Le produit est ainsi transféré en constituant sur la surface du substrat un motif chimique ou biologique conforme à celui du maître-modèle.

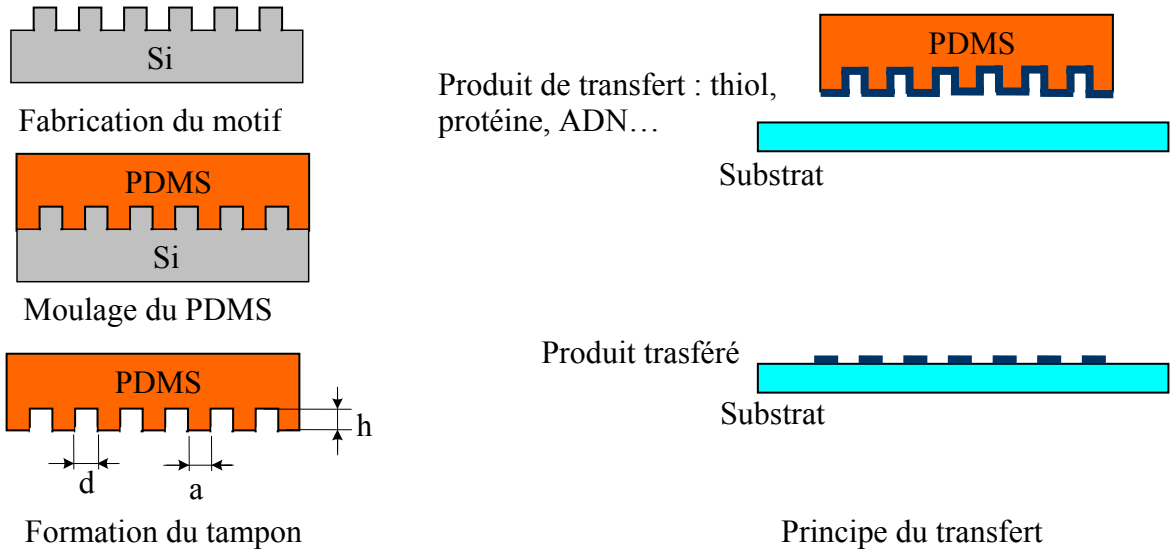


Figure I-13 : Principe du µtamponnage.

Le µTP avait été initialement proposé pour transférer des motifs d'hexadécanethiol (HDT) de formule $C_{16}H_{33}SH$, sur des wafers silicium recouverts d'une couche d'or [61, 62]. L'on constitue ainsi une monocouche organique autoassemblée d'une épaisseur d'environ 2 à 3 nanomètres, qui peut servir de masque pour une gravure ultérieure du substrat (Figure I-14). Par la suite, il a été possible de déposer des thiols sur de l'argent [67] et d'autres métaux (cuivre, palladium,…) ou encore de déposer des silanes sur de la silice [68, 69].

Le µTP permet aussi de transférer des motifs de produits chimiques autres que des thiols : silanes, produits biologiques. Il a ainsi été activement développé pour les besoins de la recherche dans de nombreux domaines comme l'électronique organique [70-73], la

microoptique [74-76], la chimie de surface [77-79], la médecine [80]… et pour ce qui nous concerne : la biotechnologie [81-89].

A l'origine, la faisabilité d'une résolution de 100 nm avait été démontrée [90] ce qui laissait espérer des applications industrielles importantes en microélectronique pour remplacer la photolithographie. Cependant, pour des raisons qui seront discutées dans la section III.2, il est apparu que la résolution de routine du µTP était limitée à 0,5 µm [91], ce qui a évidemment réduit l'intérêt immédiat de cette technologie en micro et nanoélectronique, bien que la recherche n'ai jamais véritablement cessée [65, 92-98]. Plus récemment nous notons un regain d'intérêt en micro et nanoélectronique car la résolution du procédé a été améliorée à 50 nm [99] puis 40 nm [100] en palliant progressivement les insuffisances initiales. Ces considérations sont importantes car elles montrent que le µTP est un procédé à haute résolution comme le DPN.

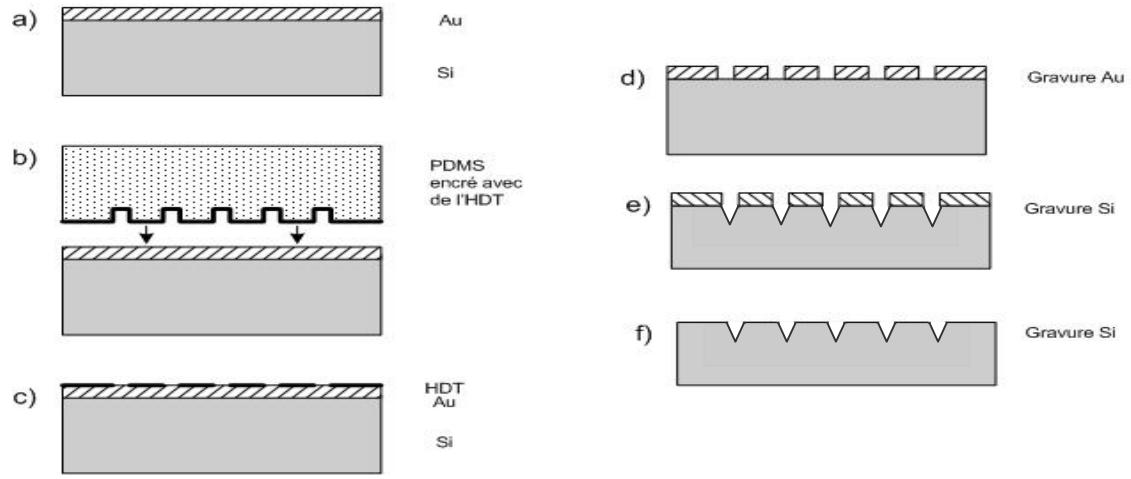


Figure I-14 : Principe de la gravure du silicium localisée par µTP.

La monocouche autoassemblée d'HDT protégeant le substrat du fait de ses propriétés hydrophobes, il est possible de graver les zones du substrat qui en sont dépourvues [92]. Nous verrons dans l'Annexe 7 comment nous avons transposé ce principe à la gravure de circuits µfluidiques en verre avec une opération de µTP effectuée avec le banc de µtamponnage.

2. Application à la Biotechnologie

Dans le domaine de la Biotechnologie, le µTP a été mis en œuvre pour la fabrication ex situ de puces à protéines [84, 85, 87, 89] et de puces à ADN [88, 101], ainsi que pour la synthèse in situ de puces à ADN [86]. **Même limitée à 0,5 µm, la résolution du µTP est considérée comme étant très élevée, très supérieure à la résolution du procédé Affymetrix par exemple**. Il a aussi une capacité de fabrication collective, ce qui le différentie nettement du procédé DPN. Les autres atouts du µTP sont le rapport résolution/coût et sa flexibilité dans le choix de produits à transférer. Si l'on dispose d'un maitre-modèle (dont la fabrication peut être coûteuse et/ou complexe), la fabrication d'un tampon par contre ne coûte

que quelques euros et ne nécessite que des moyens rudimentaires. Il est possible de préparer de nombreux tampons à partir du même maitre-modèle en prenant garde de ne pas l'abîmer au démoulage. Le même tampon peut servir à transférer le motif sur différents substrats à condition de l'encrer de nouveau, les limites provenant de l'usure du tampon et/ou du gonflement avec le solvant d'encrage. Il est envisageable aussi de tamponner de très grandes surfaces (wafers entiers de silicium ou plaques de verre de 50x50 cm), directement avec des tampons de très grande dimension ou avec des tampons plus petits avec un principe "Step and Repeat". Par ailleurs, l'opération de μTP est rapide, en général de l'ordre de la minute. Pour toutes ces raisons, il nous est apparu intéressant de développer le μTP et ce aussi bien pour la recherche fondamentale que pour de futures applications industrielles. Ce procédé sera étudié dans la partie C de ce mémoire.

Avant cela, il nous parait nécessaire de terminer notre tour d'horizon des procédés d'élaboration de biopuces en faisant le point sur la technologie développée au LEOM au début de ce travail.

I.3 LES METHODES D'ELABORATION DU LEOM

Le LEOM a développé depuis 1998 un procédé de synthèse in situ de puces à oligonucléotides [38-40] et un procédé ex situ de greffage d'oligonucléotides présynthétisés [38, 46, 47] basés sur un système de projection de réactifs par microélectrovanne d'une résolution de 5 nanolitres présenté dans l'Annexe 3 [38]. Nous allons étudier successivement ces deux procédés. Dans tous les cas, le substrat, qui est constitué de verre, de silicium ou de polymère est préalablement fonctionnalisé par des méthodes développées ou non au laboratoire [26, 102, 103].

I.3.1 SYNTHESE IN SITU DE PUCES A OLIGONUCLEOTIDES PAR PROJECTION

1. Principe de base

Le procédé de synthèse in situ est mis en œuvre dans un instrument, le Synthétiseur in situ de puces à oligonucléotides [1], qui permet de construire directement les sondes oligonucléotidiques sur le substrat, en déclenchant sélectivement les réactions chimiques par projection des réactifs (Figure I-15) en fonction du cycle de synthèse des phophoramidites (Figure I-6).

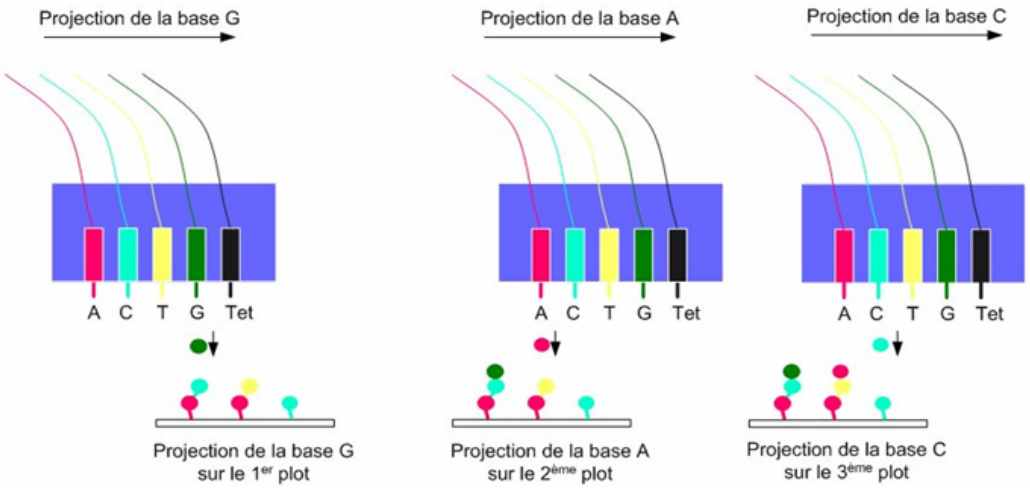


Figure I-15 : Synthèse in situ sur puce des sondes oligonucléotidiques par projection.

En fait, un examen attentif du cycle des phosphoramidites montre qu'il n'est pas nécessaire de projeter les réactifs à toutes les étapes du cycle (Figure I-16):

- L'étape 2 de couplage doit être impérativement réalisée par microprojection pour individualiser les plots de la puce ; pour ce faire, cette étape est réalisée dans un poste de la machine appelé **poste des réactions localisées**.
- Les autres étapes peuvent être réalisées de manière collective sur le substrat en faisant passer les réactifs sur toute sa surface par fluidique ; ces étapes sont regroupées dans un deuxième poste de la machine appelé **poste des réactions non localisées.**

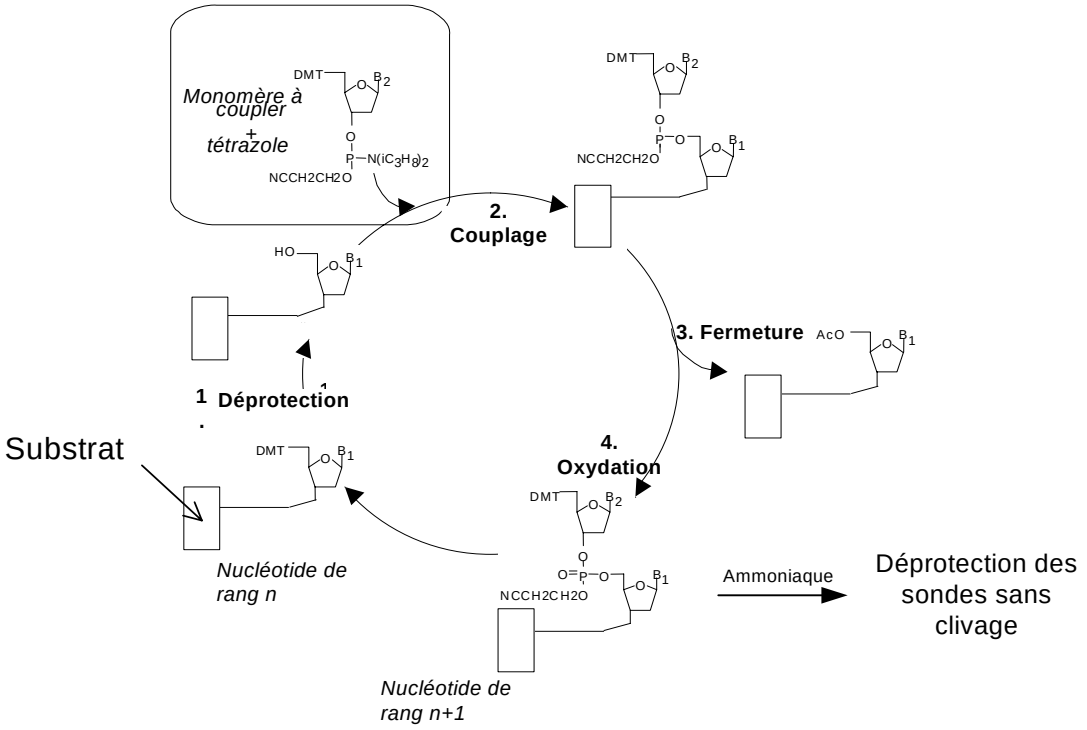


Figure I-16 : Réactions localisées (couplage) et non localisées (déprotection, fermeture et oxydation) pour la synthèse in situ de puces à oligonucléotides.

Le protocole de synthèse d'une sonde Figure I-16 consiste ainsi à additionner les nucléotides les uns après les autres pour réaliser une séquence dont le code est entièrement connu. Le cœur du cycle se décompose ainsi en quatre étapes distinctes [22] :

- une étape de déprotection du nucléotide de tête : dans ce nucléotide, l'extrémité de la chaîne est protégée par un groupement chimique diméthoxytrityl (DMT) qui empêche l'ajout d'un autre nucléotide ; la réaction de déprotection consiste à libérer l'extrémité de cette chaîne pour la rendre disponible : elle est effectuée de manière non localisée par action de l'acide trichloroacétique (TCA) en solution dans du dichlorométhane ;
- une étape de couplage (Figure I-17), la seule effectuée par projection qui consiste en la mise en présence du nucléotide de rang supérieur (protégé par un groupement DMT) avec du tétrazole afin d'activer le groupement diisopropylamino ; ce groupement est ensuite rapidement attiré au niveau de l'atome de phosphore par la fonction 5'-hydroxyle du nucléotide de tête, formant une liaison oxygène-phosphore et de ce fait créant une liaison phosphotriester ;
- une étape de fermeture non localisée : au cours de l'étape précédente, le rendement n'étant pas de 100 %, il reste des nucléotides déprotégés qui risqueraient de réagir par la suite avec d'autres nucléotides, en sautant un rang par exemple, créant des séquences de composition non contrôlée ; pour éviter cela, on procède à la fermeture de ces sites actifs par acétylation ;
- une étape non localisée d'oxydation par l'iode : elle consiste à stabiliser la liaison nouvellement crée entre les deux nucléotides par oxydation du phosphore trivalent à l'état pentavalent, en formant une fonction phosphodiester robuste.

Ces étapes, entrecoupées de lavages avec le solvant de synthèse (l'acétonitrile), sont répétées pour chaque unité monomérique que l'on veut ajouter, en projetant la base souhaitée et l'activateur sur les plots correspondants de la puce. Différents groupements protecteurs sont prévus en sus pour les bases A, C et G, pour éviter des ramifications pendant la synthèse, la base T n'en ayant pas besoin (Figure I-18).

La structure chimique finale des oligonucléotides est obtenue à la fin de la synthèse en déprotégeant les phosphates et les bases hétérocycliques par un traitement dans l'ammoniaque concentré. Notons qu'au début de la synthèse, le premier rang des sondes est formé par projection suivant ce même principe sur un substrat (verre ou Si/SiO2) fonctionnalisé avec des fonctions hydroxyles [1, 26, 103].

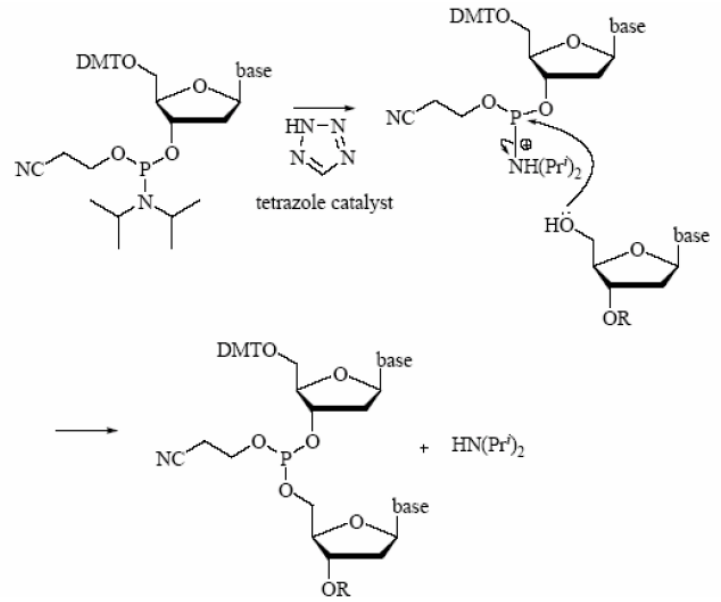


Figure I-17 : Réaction de couplage de la phosphoramidite d'après [22].

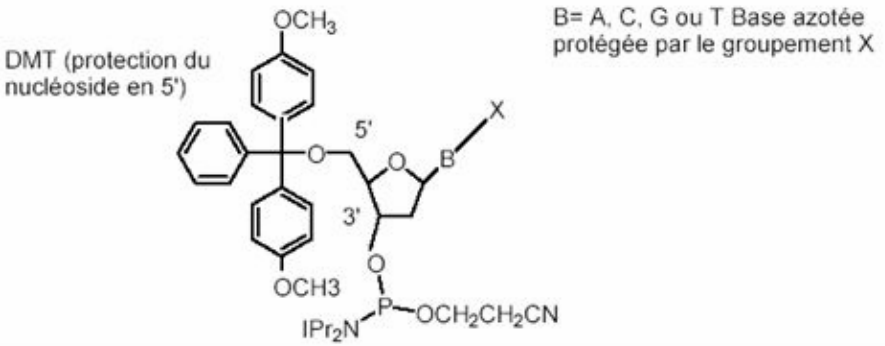


Figure I-18 : Représentation d'une phosphoramidite utilisée pour la synthèse de l'ADN.

La molécule comporte un groupement protecteur 4,4'-diméthoxy-trityl (DMT) acidolabile servant à la synthèse d'ADN et d'autres groupements protecteurs qui seront enlevés à la fin de la synthèse (notamment le groupement protecteur cyanoéthyle).

2. Synthétiseur de puces à oligonucléotides basse intégration basse densité

Pour développer le Synthétiseur de puces du LEOM, la démarche adoptée a été de respecter intégralement le schéma théorique de la Figure I-16, ce qui implique d'utiliser les mêmes réactifs que les synthétiseurs automatiques d'oligonucléotides, y compris l'acétonitrile comme solvant de base pour les lavages non localisés et les projections. L'avantage attendu est qu'il devrait être possible d'atteindre le même rendement que les synthétiseurs automatiques d'oligonucléotides qui peut être considéré comme le meilleur rendement limite possible. La difficulté est que l'acétonitrile est très volatile, inflammable, corrosif et hygroscopique. L'architecture de la machine a été conçue pour pallier ces inconvénients.

Le dispositif expérimental est montré à la Figure I-19 , tandis que son architecture est détaillée à la Figure I-20. Beaucoup de solutions techniques seront reprises dans le projet de

synthétiseur de biopuces haute densité, nous détaillons donc la première génération de machine. Elle comporte deux postes de traitement chimique : un premier pour les réactions chimiques localisées et un deuxième pour les non localisées. La puce est disposée sur un plateau tournant positionné à l'intérieur de l'enceinte réactionnelle et supporté par un axe rotatif. La rotation du plateau permet de faire passer la puce d'un poste à l'autre lors du parcours du cycle de synthèse. Concrètement pour faire synthétiser des sondes n mères, la puce effectue n rotations complètes en s'arrêtant à chaque fois sous les deux postes.

Figure I-19 : Vue du Synthétiseur de puces à oligonucléotides basse densité et basse intégration (résolution de la projection : 5 nanolitres)

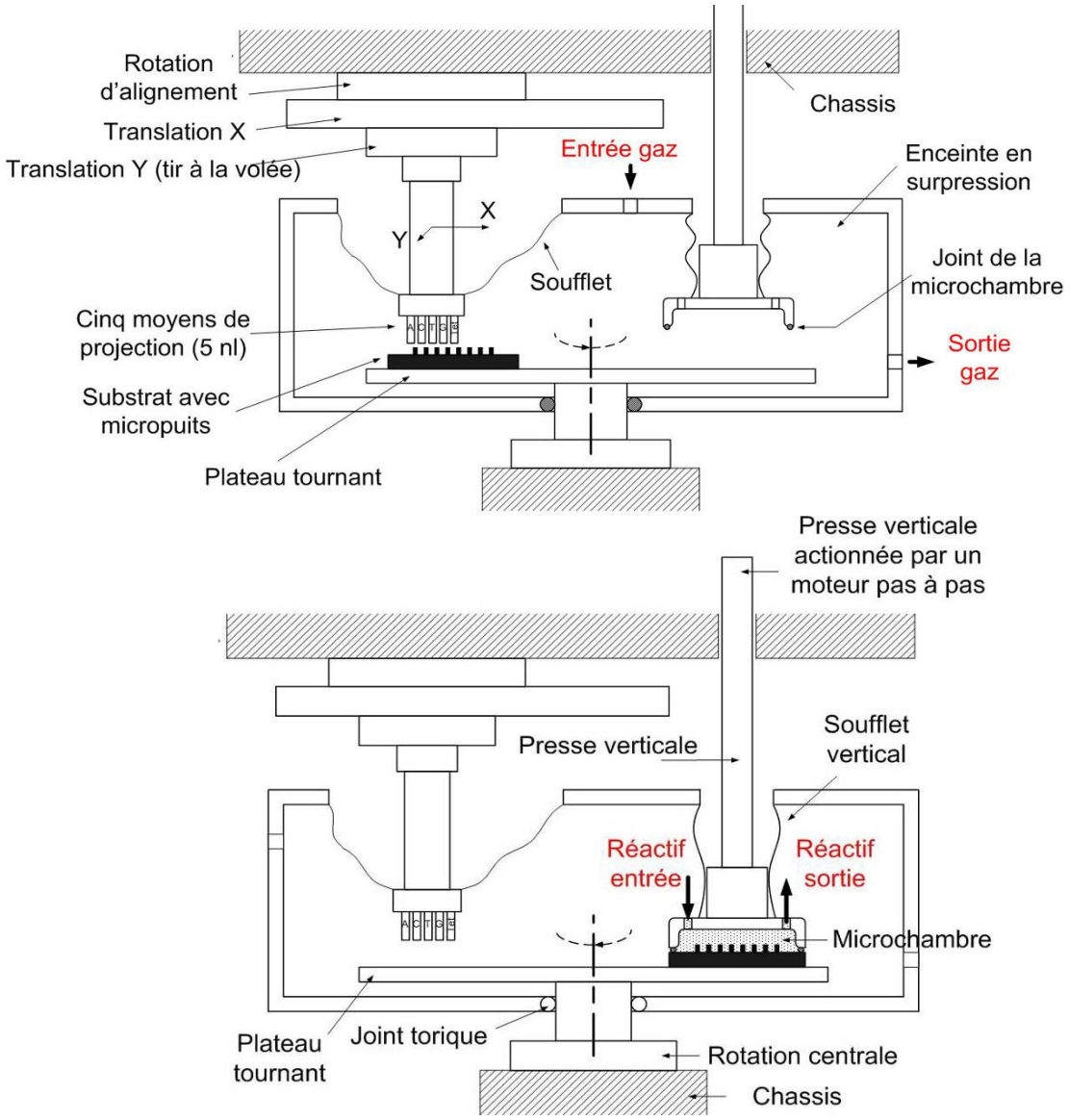


Figure I-20 : Architecture interne du Synthétiseur de Puces basse densité.

En haut, couplage des bases dans une enceinte saturée d'acétonitrile. En bas, après une rotation de 180° du plateau portant le substrat, formation d'une microchambre à l'aide d'une presse verticale pour procéder aux réactions chimiques non localisées par fluidique.

Le poste de traitement localisé est constitué d'une tête de projection déplacée en translation XY[1] avec cinq moyens de projection par microélectrovannes. Elle permet d'envoyer séparément et précisément sur les plots de la puce, par une première projection, les phosphoramidites des quatre bases A, C, T et G, et par une deuxième projection, l'activateur tétrazole nécessaire au couplage.

Le poste non localisé est constitué d'une presse permettant de fermer une demi-chambre µfluidique sur le substrat. La demi-chambre est dotée d'un joint torique de sorte que l'étanchéité est assurée par compression du joint avec la presse. Une électrovanne

[1] Avec une rotation pour l'alignement avec les micropuits.

gère l'écoulement des réactifs sur tous les plots de la puce afin de procéder de manière collective aux réactions de déprotection, fermeture, oxydation ainsi qu'à tous les lavages nécessaires à la synthèse.

Par ailleurs, le substrat n'est pas une surface nue. Il comporte des micropuits correspondants aux plots de la puce (Figure I-21) qui permettent de contenir les réactifs pendant le couplage. Il est impossible en effet de limiter à la résolution souhaitée, l'étalement de projections d'acétonitrile sur une lame de microscope hydroxylée. Ces micropuits sont obtenus après hydroxylation en constituant des murs verticaux sur le substrat par étalement et insolation d'une résine photosensible SU8 [104] ou par sérigraphie de silicone[1] [1].

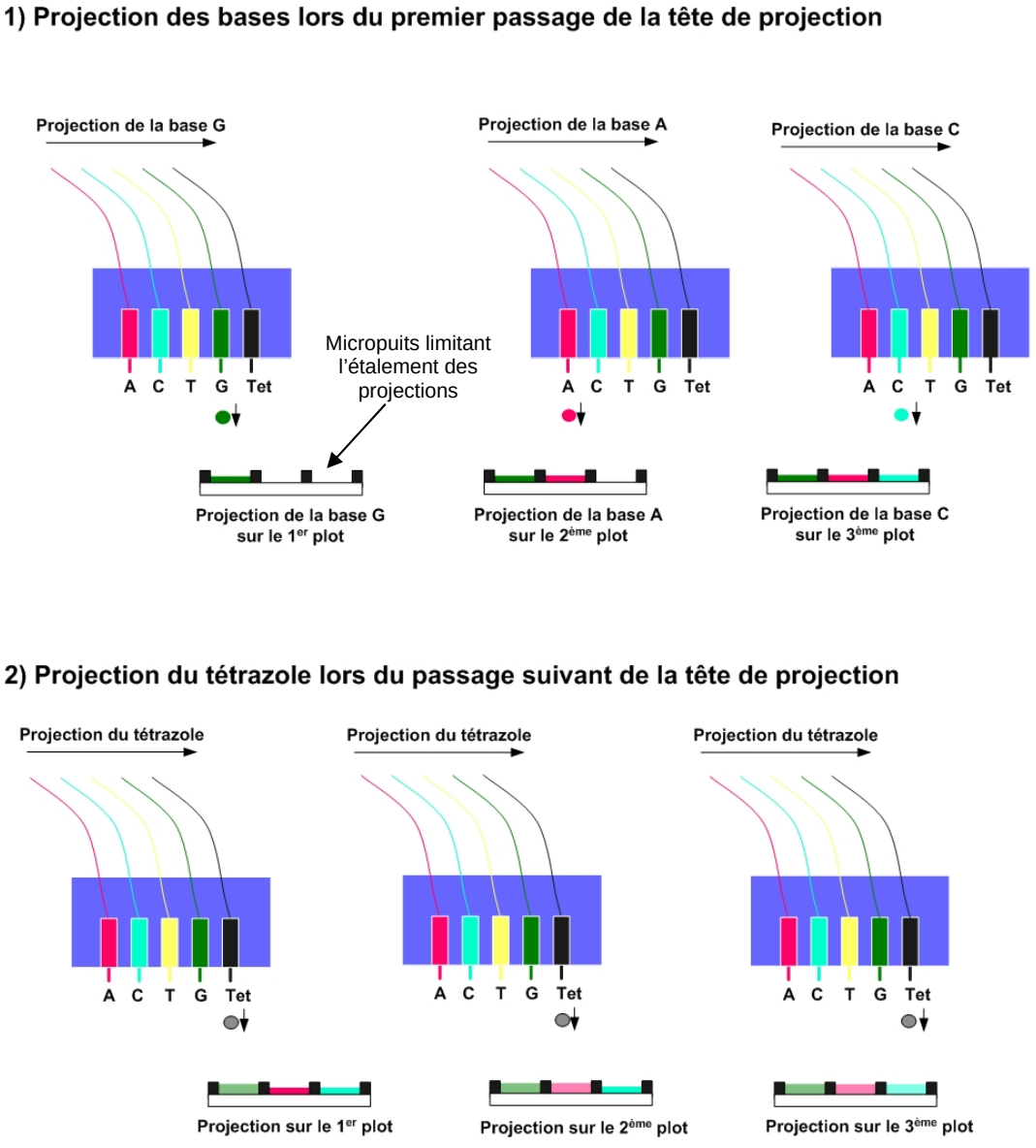


Figure I-21 : Principe des micropuits et de la double projection base et tétrazole.

[1] Une autre possibilité qui sera abordée plus loin en section Partie AII.5.2 sera de graver les puits dans le verre puis de fonctionnaliser le substrat

La réaction de couplage est très sensible à l'humidité. A titre de comparaison, dans les synthétiseurs automatiques d'oligonucléotides sur microbilles, un rendement supérieur à 99,5% par cycle n'est possible qu'avec des conditions d'extrême pureté des produits de synthèse et spécifiquement d'extrême anhydricité du solvant acétonitrile et le tétrazole [105-107]. Comme il est impossible de stopper la contamination par l'humidité après ouverture des bouteilles contenant des phosphoramidites, la durée de vie des réactifs dans ces instruments est limitée à deux semaines.

De plus, l'acétonitrile est extrêmement volatile. De sorte que pour aboutir à un couplage chimique en ralentissant suffisamment l'évaporation des projections dans les micropuits, la solution retenue a été de saturer l'enceinte réactionnelle avec ce solvant, tout en gardant l'enceinte aussi anhydre que possible. Pour ce faire l'enceinte réactionnelle est placée dans un flux d'azote anhydre saturé d'acétonitrile.

L'acétonitrile étant corrosif, il était impossible de disposer les moyens de déplacement et l'électronique à l'intérieur de l'enceinte. La machine a donc été conçue de façon à disposer tous ces éléments à l'extérieur de cette enceinte, et ce en permettant le contrôle des projections, des axes motorisés, etc. L'étanchéité du synthétiseur de puces a fait l'objet de développements spécifiques, notamment avec un joint torique dans la liaison enceinte/axe rotatif du plateau et avec des soufflets dans les postes localisés et non localisés.

L'une des limitations du Synthétiseur actuel provient du manque de résolution des moyens de projection par microélectrovanne qui ont une résolution de 5 nl, ce qui correspond à des micropuits espacés de 300 µm à 1 mm. La surface de synthèse est de l'ordre de 45 x 15 mm. Ce système est donc bien destiné aux puces à oligonucléotides basse densité basse intégration avec quelques centaines de sondes.

3. Champ d'application du Synthétiseur de puces à oligonucléotides basse intégration basse densité

La principale application du Synthétiseur est le développement de puces à oligonucléotides prototypes basse densité pour le diagnostic médical. En effet, le procédé in situ permet d'obtenir des puces en quelques heures (1 puce / 24 h) à un coût très intéressant en réactifs (environ 100 euros / puce), ce qui donne la possibilité de concevoir les différentes versions d'une puce et de les valider très rapidement. Il a permis par exemple de synthétiser des puces avec des sondes 24 mères pour la détection de polymorphismes nucléotidiques simples pour une application dans l'hématologie [108]. Il est donc possible de distinguer deux cibles d'ADN qui ne différent que par un seul nucléotide. Les puces sont donc très spécifiques

[1]. Après optimisation, la densité maximale pourrait atteindre 1000 plots mais pas au-delà à cause du manque de résolution des microélectrovannes.

4. Comparaison du procédé LEOM avec les procédés Affymetrix et Agilent et Hood

Nous pouvons maintenant comparer le procédé LEOM avec les procédés Affymetrix, Agilent et Hood. En l'absence de comparaison expérimentale directe, nous ne pouvons que souligner les différences entre les procédés et leurs possibles conséquences. Les puces Affymetrix et Agilent ont une densité largement supérieure à celle du LEOM ; pour des raisons techniques (non de principe), la faisabilité du procédé LEOM a été limitée aux puces basse intégration basse densité. Par contre, les puces Affymetrix et Agilent sont destinées à des recherches liées à l'expression des gènes, tandis que les puces du LEOM ont comme principale application le génotypage[1], ce qui donne une bonne indication sur la "robustesse" de ces dernières.

Par rapport à la synthèse in situ par voie photochimique d'Affymetrix, l'avantage théorique attendu du Synthétiseur de LEOM, concernant le rendement de synthèse n'a été ni démontré ni infirmé. Par contre il a été démontré les avantages suivants [109] :

- une grande souplesse dans le choix des séquences et dans l'organisation des sondes sur la puce qui permet, par exemple, de juxtaposer des sondes de longueur et de composition différentes pour un dépouillement beaucoup plus facile des résulats de lecture ;
- une très grande rapidité d'élaboration dans le cas d'une fabrication à l'unité (quelques heures à une journée) : la durée de la fabrication est pratiquement indépendante du nombre de plots et ne dépend que de la longueur des sondes et de la qualité de synthèse recherchée;
- un rendement de synthèse élevé (mais non encore quantifié), ce qui devrait permettre d'obtenir des oligonucléotides de plus grande longueur que dans le cas de la synthèse photochimique et/ou de plus grande pureté ;
- un coût de fabrication très faible (pas de masque lithographique, très faible consommation de réactifs) ;
- une mise en oeuvre d'une chimie "standard" avec des réactifs commerciaux ;
- une fabrication automatisée et flexible indépendante de la composition exacte des sondes d'ADN.

1 Pour simplifier, on peut considérer que les puces de génotypage sont des dispositifs "absolus", analysant directement la composition chimique de l'ADN (génotypage), tandis que les puces d'expression de gènes sont des dispositifs "relatifs" analysant les variations de la composition des ARN. Il est possible alors de procéder à une autocalibration du dispositif, ce qui n'est évidemment pas possible avec les puces de génotypage.

Si nous revenons au procédé Agilent, celui-ci est comme le procédé LEOM basé sur une synthèse in situ contrôlée par microprojection[1]. Les deux procédés sont proches l'un de l'autre mais le procédé Agilent (société issue de la compagnie Hewlett-Packard) bénéficie de moyens de projection d'une meilleure résolution. Une différence importante est que la localisation des projections est basée sur des puits de tension de surface, pour ce qui concerne Agilent, et non pas sur des micropuits comme pour ce qui concerne le LEOM. Cela se traduit par une autre différence importante en ce qui concerne le solvant de projection, qui est le propylène carbamate (faiblement volatile et peu mouillant) dans le cas d'Agilent, l'acétonitrile (très volatile et très mouillant) dans le cas du LEOM. Il semble aussi que dans les machines Agilent, la synthèse ne soit effectuée ni en milieu anhydre, ni en milieu saturé de solvant. Le procédé du LEOM devrait donc présenter un avantage spécifique en matière de rendement chimique. A un niveau de densité très élevé, l'utilisation de l'acétonitrile devrait faciliter les mélanges de réactifs lors du couplage dans les micropuits, ce qui .permettrait de procéder à des réactions plus homogènes. Une dernière différence est que le Synthétiseur de puce du LEOM pourrait être dupliqué pour être utilisé dans les laboratoires de biologie pratiquement comme un synthétiseur d'oligonucléotides, ce qui en ferait un outil de recherche très intéressant.

Cette démarche est d'ailleurs celle préconisée aussi par l'équipe de Hood [43], qui a publié un Synthétiseur sur puce, lui aussi basé sur l'utilisation de microélectrovannes avec un procédé proche d'Agilent. Hood étant l'un des inventeurs des synthétiseurs automatiques d'oligonucléotides, on peut simplement souligner qu'il s'agit là d'un argument supplémentaire pour démontrer l'intérêt de la démarche suivie par le LEOM.

5. Conclusion sur l'intérêt d'accroître la résolution des biopuces avec le procédé in situ du LEOM

Synthèse in situ de puces à oligonucléotides

La limitation actuelle du procédé LEOM en terme de densité provient des moyens de microprojection utilisés. Un passage à des moyens de projection plus résolutifs et le développement d'une nouvelle machine plus performante sur le plan mécanique permettraient d'aboutir à des puces à ADN haute densité sans changer le principe de base. Nous étudierons cette question dans la partie B de ce mémoire. Un synthétiseur in situ haute densité d'utilisation aussi flexible que le dispositif actuel présenterait un grand intérêt pour les laboratoires de biologie qui pourraient fabriquer ainsi à très bas coût des puces haute densité

[1] le procédé in situ du LEOM est original et protégé par un brevet français CNRS/ECL.

prototypes pour leurs propres applications. En effet la seule technologie qui est facilement accessible aux laboratoirs de recherche est la fabrication de puces par spotting qui est très laborieuse et beaucoup plus coûteuse en réactifs pour fabriquer des puces en quelques exemplaires.

Nous souhaitons développer explicitement cet argument importanct. Soit par exemple, un projet pour fabriquer par spotting une puce permettant d'étudier un génome entier avec environ 20 000 sondes. Le coût initial en sondes est de l'ordre de 10 € / sonde, soit une mise initiale nécessaire de 200 k€ ! Par principe, pour ce qui concerne les réactifs, le Synthétiseur permet de se passer de mise de fond initiale : le coût en réactifs est indépendant du nombre de sondes mais dépend uniquement de leur longueur d'une puce, soit de l'ordre de 100 € / puce pour des sondes 24 mères. Il est possible d'affiner les calculs de coût en faisant intervenir l'investissement en capital pour construire la machine, l'usure de celle-ci (les pièces à remplacer), le coût des opérateurs… Mais on peut estimer que dans un contexte académique, le principal facteur de coût provient des réactifs chimiques et du coût des substrats.

Sans entrer dans les détails techniques, concevoir une puce à ADN en procédant par différentes étapes de validation expérimentale présente aussi des avantages importants non seulement d'ordre économique, mais aussi d'ordre scientifique. En effet bien que la bioinformatique ait effectuée des progrès importants, il reste toujours des incertitudes sur le choix des sondes et sur le développement des protocoles d'hybridation et d'interprétation des résultats. Pouvoir pratiquer des itérations rapides peu couteuses et sans mise de fond initiale importante, est donc un avantage important. Notons que l'intérêt de cette stratégie a été validé avec des puces basse intégration sur une application biologique liée à l'Hématologie [108].

Synthèse in situ de puces à oligopeptides

Pour ce qui concerne les puces à oligopeptides, l'intérêt d'un Synthétiseur de puces basé sur des projections par microélectrovanne est faible puisque le nombre de plots sera réduit et donc la combinatoire très limitée. Pour envisager le développement d'un Synthétiseur in situ de puces à oligopeptides, "compétitif" par rapport au procédé spot, il apparaît donc indispensable de développer des moyens de projection à très haute résolution. Des questions importantes seront la compatibilité de ces moyens de projection avec les réactifs commerciaux de la chimie des Fmoc et aussi le respect du cycle de synthèse des Fmoc pour espérer aboutir, à terme, à un rendement de synthèse comparable à celui des synthétiseurs automatiques d'oligopeptides. Ces questions seront étudiées dans la partie B de ce mémoire.

I.3.2 PROCEDE LEOM DE FABRICATION EX SITU DE BIOPUCES PAR MULTIPROJECTION

1. Principe de base

Le LEOM a aussi développé aussi un procédé original d'élaboration ex situ de puces **par multiprojection** [1]. D'un point de vue chimique, ce procédé repose sur un accrochage covalent de sondes présynthétisées pourvues d'un espaceur et d'une fonction amine sur un substrat fonctionnalisé [110]. Pour greffer une sonde, le principe consiste simplement à la projeter sur le substrat : il s'agit bien d'une microprojection et non pas un microdépôt mécanique comme pour la plupart des spotters [38].

Afin d'éliminer tout risque de contamination inter sondes, chaque sonde possède son propre système de projection. Celui-ci est basé sur la même microélectrovanne que pour la synthèse in situ, avec un réservoir qui a fait l'objet d'une conception spécifique. Un dispositif original formé d'une batterie de 256 moyens de microprojection indépendants a été aussi développé, constituant ainsi un banc de multiprojection (Figure I-22).

Un point important est que la machine traite en parallèle les substrats. Pour fabriquer simultanément 32 puces, les substrats sont disposés en matrice de 4x8 lames de microscope sur un plateau, qui est porté par un mouvement croisé XY rapide de grande course. Pour fabriquer un lot de puces 256 sondes, on déplace rapidement le plateau sous les 256 buses d'éjection en activant successivement la projection des gouttes au passage des substrats (Figure I-23).

Par principe, la vitesse de fabrication d'un tel procédé est très grande (50 à 500 biopuces/h) avec une consommation en sondes très faible. Par contre, là encore, la résolution des microélectrovannes limite la résolution et la densité des sondes (100 à 1000 sondes par lame de microscope), ce qui convient pour des puces à ADN pour le diagnostic. Ce procédé n'est pas destiné à la recherche mais pourrait constituer un technologie performante, en termes de capacité et coût de production (1 à 10 euros / puce) pour **une production de masse** de puces à ADN pour le diagnostic [45].

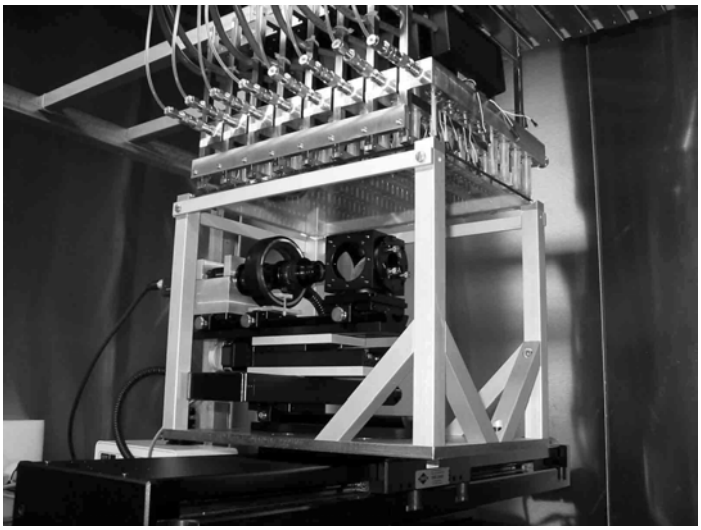


Figure I-22 : ½ Batterie avec 128 moyens de projection microélectrovannes indépendantes.

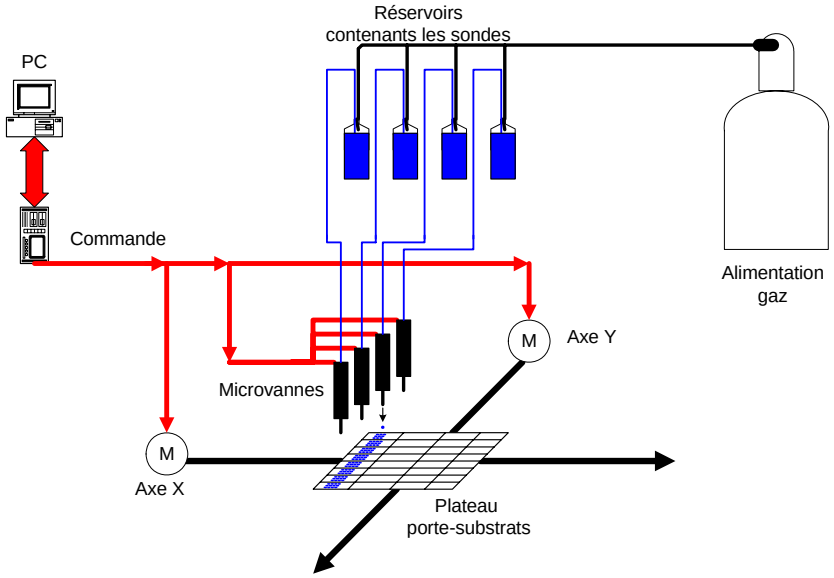


Figure I-23 : Principe de la fabrication ex situ de biopuces par multiprojection.

2. Intérêt d'accroître la résolution des puces ex situ

Augmenter l'intégration des biopuces pour le diagnostic présente peu d'intérêt car 100 à 1000 sondes suffisent en général. Par contre augmenter leur résolution permet d'accroître leur sensibilité en augmentant de manière considérable le rapport quantité de cibles par unité de surface de la puce[1], (comme nous allons le voir ci-dessous, il sera aussi intéressant d'accroître la résolution des biopuces ex situ de façon à pouvoir les disposer dans les microlaboratoires sur puce.

[1] Nous aurions pu utiliser le dispositif du chapitre 2 pour fabriquer des puces ex situ très haute densité. Cette approche a été écartée faute de temps.

I.4 LES MICROLABORATOIRES SUR PUCE

L'intégration des biopuces dans les microlaboratoires sur puce présente en effet un très grand intérêt dans le domaine du diagnostic au sens large : diagnostic médical, mais aussi médecine légale, biodéfense...

La mise en œuvre de biopuces requiert toujours la manipulation de fluides pour traiter le matériel biologique que l'on veut analyser. Dans le cas d'une puce à ADN par exemple, il faut traiter le matériel biologique d'intérêt de l'organisme (animal, plante, bactérie, virus,…) que l'on veut analyser pour en extraire l'ADN, l'amplifier et le marquer avec un fluorophore avant de le mettre en contact avec la puce à ADN pour procéder à l'hybridation. Toutes ces opérations sont basées sur des tris, des mélanges et des séparations que l'on peut chercher à intégrer dans des microlaboratoires d'analyse sur puce. Ces opérations sont effectuées jusqu'à présent sur des postes séparés par du personnel très qualifié avec du matériel coûteux. **La miniaturisation de ces fonctions et leur intégration dans un microdispositif unique permettront d'automatiser les procédures, de les accélérer et de réduire les coûts en réactifs. Un aspect essentiel sera la standardisation des protocoles.** Cela sera vrai y compris dans le domaine de la recherche puisqu'il sera beaucoup plus facile aux laboratoires de recherche de comparer leurs résultats en standardisant l'ensemble des protocoles.

Pour l'intégration biopuce/microlaboratoire sur puce, étant donnée la largeur des canaux (10 à 100 µm) habituellement utilisés en µfluidique et leur hauteur, nous verrons que l'apport de réactifs par µtamponnage présente un grand intérêt par rapport à la projection (partie C).

I.5 LES OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

L'objectif de cette thèse est de développer deux procédés d'adressage de réactif à très haute résolution : la projection de volumes de l'ordre du picolitre (picoprojection) par effet piézoélectrique et le µtamponnage. Ces procédés permettront :

- D'augmenter la densité des biopuces et donc d'améliorer leur sensibilité.
- D'augmenter la capacité d'analyse paramétrique des biopuces en accroissant le nombre de plots de compositions différentes par unité de surface.
- D'autoriser le développement de procédés de synthèse in situ de biopuces à très haute résolution. La synthèse in situ de puces à oligonucléotides étant maintenant bien établie sur le plan industriel, nous nous intéresserons principalement par la suite à la synthèse de puces

à oligopeptides. La démarche adoptée sera toutefois de trouver systématiquement des solutions communes pour les puces à oligopeptides et à oligonucléotides.

La très haute résolution du µTP permettra d'envisager l'incorporation des biopuces dans les µlaboratoires sur puce avec les conséquences décrites précédemment en termes de sensibilité mais surtout en termes d'automatisation et de standardisation des protocoles, ainsi que de réduction des coûts.

Nous aborderons ces questions du point de vue du procédé et de l'instrumentation et non pas du point de vue de la chimie ou de la biologie. Nous nous focaliserons sur les étapes de faisabilité et non pas sur le développement de protocoles aboutissant à des applications concrètes, qui devront faire l'objet de travaux ultérieurs.

PARTIE B

ELABORATION DE BIOPUCES PAR PROJECTION AU PICOLITRE

Chapitre II

FAISABILITE DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE IN SITU HAUTE RESOLUTION

Nous rappelons que les procédés développés par d'autres équipes pour élaborer des puces à oligopeptides par synthèse in situ sont basés sur soit une synthèse photochimique (cf. I.2.2) soit sur le procédé Spot, qui est une synthèse à l'échelle macroscopique sur membranes (cf. I.2.4).

Le procédé Spot est de loin le mieux établi avec des applications biologiques concernant notamment la recherche d'épitopes à haut débit (recherche de nouvelles cibles pour les médicaments, détection de signatures protéomiques complexes pour le diagnostic précoce du cancer, etc…). Ces inventeurs ont récemment tenter d'augmenter la densité des puces en développant une machine avec des moyens de projection par microélectrovannes analogues à ceux intégrés dans le Synthétiseur in situ de puces actuel du LEOM [111]. Ce dispositif parait pour l'instant à l'état de développement initial : le format du substrat utilisé (CD ROM en polypropylène) n'est absolument pas standard pour les biologistes (alors que nous resterons compatibles avec les lames de microscope) et les réactions de synthèse ont lieu en milieu ouvert. Il sera donc difficile de réduire le volume des projections et d'augmenter de manière importante le nombre de plots.

Nous préférons donc nous intéresser directement à un procédé avec une très haute résolution de projection. Cette stratégie est directement transposée du travail effectué au LEOM sur la synthèse in situ de puces à oligonucléotides basse densité. L'un des points importants est que la combinatoire des peptides est à base 20 au lieu de 4 pour les oligonucléotides. Cela implique d'une part de développer un dispositif de fabrication permettant de projeter les 20 bases peptidiques et l'activateur, et d'autre part d'adresser des surfaces aussi importantes que possible avec des plots aussi petits que possible, de façon à aboutir à avoir une combinatoire importante.

Notre objectif sera de démontrer la faisabilité de la synthèse des Fmoc sur support solide, avec des apports de réactifs correspondant à une résolution du picolitre. La stratégie choisie est (i) de respecter rigoureusement la chimie des Fmoc en conservant le DMF comme solvant de base de la synthèse et comme solvant de projection et (ii) de travailler en milieu anhydre et saturé. Pour ce faire, nous avons choisi de mettre en place un système de projection, basé sur des moyens de projection piézoélectriques, qui seront suffisamment économiques et compacts pour pouvoir être intégrés dans le cadre d'un projet de Synthétiseur de puces à haute densité. La solution retenue consiste à synthétiser les sondes en projetant les réactifs avec des moyens de projection piézoélectriques très résolutifs (4 picolitres dans le cadre de ce travail et à terme jusqu'à 1,5 picolitres, au lieu de 5 nanolitres pour le dispositif précédent). Les substrats verre ou silicium/silice fonctionnalisés seront gravés de façon à disposer les plots de la puce dans des micropuits et à contenir les projections.

Nous avons conscience que la synthèse d'oligopeptides est plus délicate que celle des oligonucléotides : la synthèse de chaînes oligopeptidiques présentent des difficultés très importantes car elles présentent des propriétés très diverses. Le projet du laboratoire de développer un Synthétiseur in situ de biopuces haute densité, est une tentative audacieuse, mais qui en cas de succès, permettrait de réaliser des réactions de synthèse en milieu contrôlé. Dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pas procédé à la construction effective de cet instrument, aussi avons nous renvoyé certaines questions en annexe

Le plan de ce chapitre est le suivant. Nous allons tout d'abord sélectionné un moyen de projection piézoélectrique (II.1), qu'il faudra faire travailler dans des conditions inhabituelles. Pour ce faire, à partir d'une étude bibliographique (II.2.1), nous nous sommes penchés sur le fonctionnement de ce dispositif pour procéder à des développements instrumentaux (II.2.2) qui nous ont permis d'adapter le signal de projection aux solvants de synthèse (II.3). Puis nous montrerons comment, après une validation chimique à l'échelle macroscopique (II.4), nous avons élaboré pas à pas un dispositif expérimental, qui nous a permis finalement de procéder à une picoréaction chimique sur une réaction modèle et de valider ainsi le principe de la synthèse des Fmoc par picoprojection (II.5).

II.1 LES DIFFICULTES A RESOUDRE ET LA STRATEGIE ADOPTEE

L'objectif étant de démontrer la faisabilité de la synthèse peptidique in situ haute résolution, les difficultés à traiter sont les suivantes :

- La maîtrise de la projection à très haute résolution de réactifs dissous dans le DMF[1].
- La préparation de substrats adaptés à la synthèse in situ de Fmoc avec deux points importants à régler : la fabrication des micropuits avec une géométrie compatible avec la haute résolution et la fonctionnalisation des substrats.
- La maîtrise des réactions chimiques à une échelle aussi réduite dans les micropuits. D'un point de vue cinétique sera-t-il possible de ralentir la vitesse d'évaporation du solvant de façon à pouvoir procéder à une réaction chimique ?

Nous nous focaliserons d'abord sur la maîtrise des projections de solvant ; les autres questions seront abordées ultérieurement. **La démarche adoptée a été** non pas de travailler avec des moyens de projection pour l'instrumentation scientifique (Gesim GmbH, Mikrodrop GmbH, etc.) mais **d'utiliser les dispositifs les plus performants disponibles sur le marché en terme de résolution, de compacité et de coût**, c'est-à-dire les moyens de **projection mis en œuvre dans les imprimantes bureautiques.**

En effet avec les accéléromètres pour airbag, les moyens de projection pour imprimantes constituent l'essentiel de la production industrielle de MEMS et font l'objet d'une optimisation continue depuis 40 ans. Ces dispositifs sont très performants : les têtes de projection les plus récentes permettent en effet de gérer jusqu'à huit réactifs différents avec une résolution de l'ordre de 1,5 picolitres, à un coût inférieur à 10 € par réactif, et ce sous une forme très compacte. Il est donc possible d'envisager la mise en parallèle de toutes les têtes de projection nécessaires pour projeter l'ensemble des Fmoc.

Par contre, les moyens de projection pour l'instrumentation scientifique sont limités pour l'instant à une résolution de l'ordre de 30 picolitres, sont relativement encombrants et coûtent de l'ordre de 1000 € par réactif. Pour pouvoir projeter 21 réactifs différents, Il était donc tout simplement inenvisageable de procéder autrement qu'avec des moyens de projection d'imprimantes bureautiques.

Les moyens de projection d'imprimantes bureautiques sont basés sur différents principes avec de très nombreuses variantes. Parmi le foisonnement des technologies commercialisées, on peut distinguer [112-116] :

- les dispositifs de projection à la demande "drop on demand" déclenchés :
  a) par la déformation d'une membrane piézoélectrique en PZT (Epson pour la bureautique et Modular Ink Technology ou Xaar pour l'impression industrielle) ;

[1] Ainsi que dans l'acétonitrile pour les puces à ADN conformément à la stratégie définie en Partie AI.5.

b) par effet thermique par création d'une microbulle (Canon et Hewlett-Packard pour la bureautique) ;

c) ou encore par déformation d'une membrane en élastomère sous l'action d'un solénoïde (Lee Company) ;

- les dispositifs à projection continue "Continuous Ink Jet" c'est-à-dire avec un jet continu rompu en gouttelettes dont la trajectoire et l'impact sont contrôlés par effet électrostatique (ex : Image pour l'impression industrielle).

Dans la pratique, nous avons choisi de mettre en œuvre exclusivement des têtes d'impression Epson. En effet comme le montre la Figure II-1, ces têtes d'impression sont compactes. **Elles sont (relativement) faciles à** mettre **en œuvre du point de vue de la fluidique, puisque la tête de projection et le réservoir d'encre sont distincts,** ce qui n'est pas le cas, par exemple, des moyens de projection Hewlett-Packard. Nous savons de plus par expérience au laboratoire qu'elles sont compatibles avec un grand nombre de solvant.

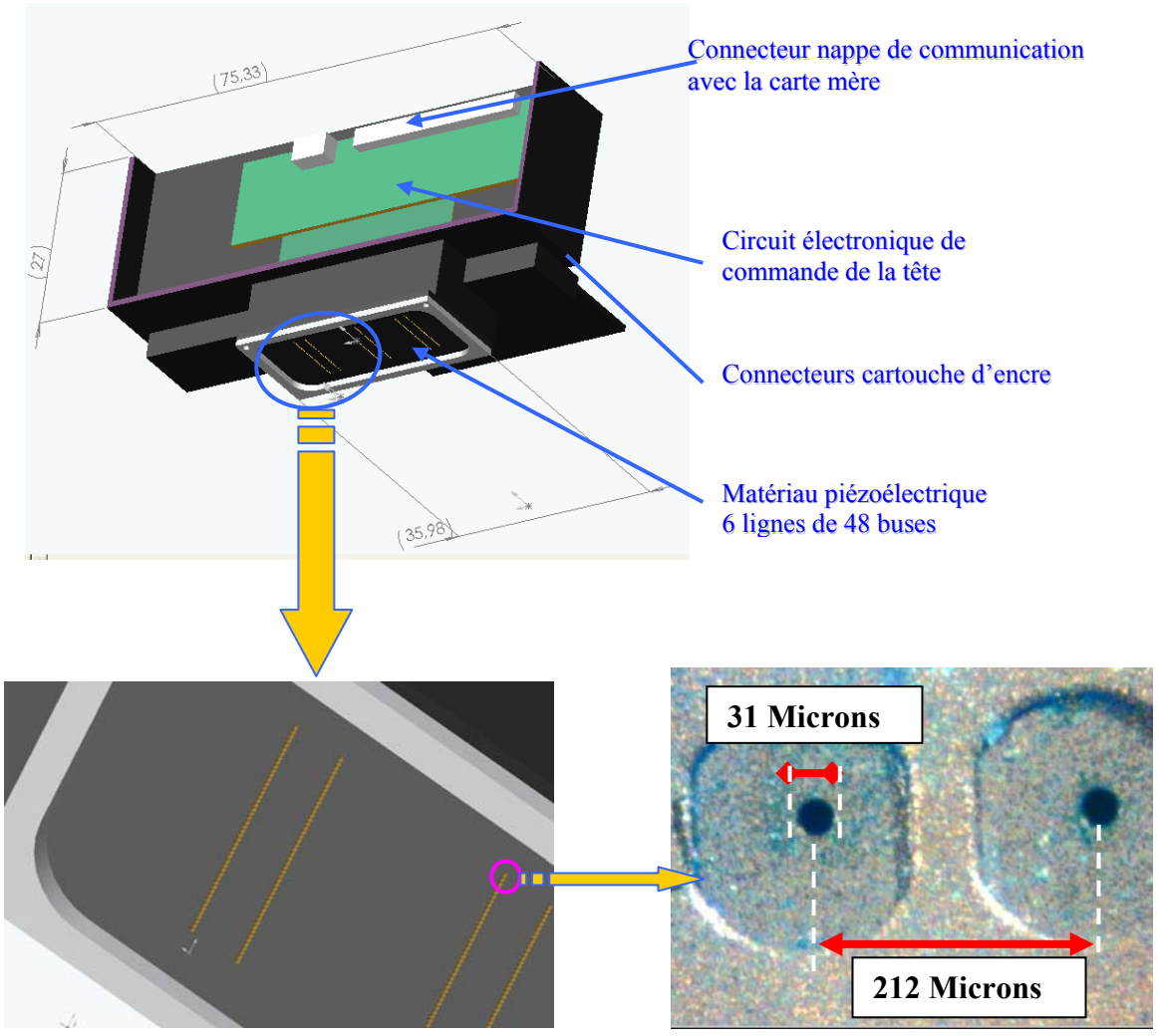


Figure II-1 : Géométrie de la tête de projection Epson Stylus Photo 870.

Pour ce qui nous concerne, la spécification technique la plus importante est la **résolution fluidique**, qui correspond à la quantité minimale d'encre projetée en picolitre, et non pas directement à la résolution en dpi (dot per inch). Cette dernière prend en compte la résolution des déplacements des axes et le recouvrement des gouttes projetées pour constituer une image. En effet c'est bien la quantité de fluide minimale "projetable" de manière contrôlée dans les micropuits du substrat qui définira l'intégration de la puce. Celle-ci est passée progressivement de 30 à 1,5 picolitres (Tableau II-1); cette dernière valeur semblant constituer une barrière technologique.

Au début de ce travail, nous avions commencé à travailler avec une tête Epson Stylus Photo 870 de résolution 4 picolitres, que nous avons conservé par la suite. Cette tête peut gérer de manière indépendante jusqu'à 6 réactifs en effectuant simultanément 48 projections à la demande par réactif (Figure II-1). Elle est constituée de 6 lignes de 48 buses de 31 μm de diamètre avec un écart centre à centre de 212 μm ; chaque buse est déclenchée indépendamment tandis que chaque ligne est reliée à un réservoir d'encre différent (6 réservoirs au total). Avec une seule tête d'impression, il est donc possible d'envisager de projeter les 4 phosphoramidites et l'activateur nécessaires à la synthèse d'oligonucléotide. Elle est aussi suffisamment compacte pour envisager de mettre plusieurs têtes en parallèle pour l'ensemble des Fmoc.

Année	Imprimante	Résolution fluidique	Résolution (dpi)	Commentaire
1993	Epson Stylus 800	30 picolitres	360	4 x 12 buses pour le noir
1994	Epson Stylus Color		720	1 x 64 buses pour le noir et 3 x 16 buses pour les couleurs
1997	Epson Stylus Photo		720	1 x 32 buses pour le noir et 5 x 32 buses pour les couleurs
2004	Epson Stylus Photo 870	4 picolitres	1440 x 720	1 x 48 buses pour le noir et 5 x 48 buses pour les couleurs (6 cartouches indépendantes)
2005	Epson Stylus Photo R800	1,5 picolitres	5760 x 1440	8 cartouches indépendantes

Tableau II-1 : Historique des imprimantes Epson.

Pour fixer les idées, le Tableau II-2 donne l'ordre de grandeur de la densité des puces, qu'il est possible théoriquement d'atteindre, en supposant que la réaction sera déclenchée par projection de deux gouttes (Fmoc ou phosphoramidite + activateur) dans les micropuits. On suppose aussi que les micropuits ont une forme géométrique cylindrique simple, facile à fabriquer avec un facteur de forme de 2 (Figure II-2) avec un écart centre à centre entre les

µpuits fixé à deux diamètres. Cet écart permet de constituer une distance de sécurité suffisante entre les puits afin d'éviter toute erreur de projection ou mélange de réactifs. Il apparaît donc qu'une haute densité est possible jusqu'à 80 000 plots/cm².

Résolution des projections (picolitre)	Ecart centre à centre des µpuits (µm)	Diamètre des µpuits (µm)	Hauteur des µpuits (µm)	Volume interne des µpuits (picolitre)	Densité des biopuces (plots/cm²)	Précision requise pour la machine (µm)
30	106	53	106	117	~ 9 000	5
6	70,7	35	70	34	~ 20 000	3,5
4	53	26	53	14	~ 35 000	2,5
1,5	35,3	18	36	5	~ 80 000	~ 2

Tableau II-2 : Densité théorique des biopuces en fonction de la résolution des projections.

Le tableau a été établi en prenant un écart centre à centre entre les micropuits commensurable avec l'écart centre à centre entre les buses (212µm).

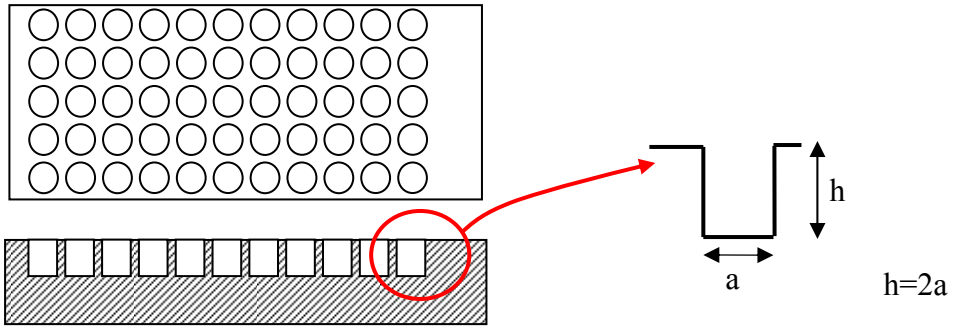


Figure II-2 : Micropuits de forme cylindrique avec une hauteur double du diamètre et un écart centre à centre égal à deux fois le diamètre.

L'une des questions clefs sera la maîtrise effective des projections puisque d'une part les réactifs ont des propriétés différentes des encres d'impression et que d'autre part, il y aura de nombreuses passes d'impression à superposer avec précision afin de procéder à la synthèse in situ. En effet l'impression d'une page de document est réalisée en un seule passe avec projection séquentielle des couleurs. La synthèse d'oligopeptides 12 mères avec 20 acides aminés différents, par projection avec 4 têtes de projection piézoélectrique à 6 réactifs[1] nécessitera au minimum la superposition de 12 x 4, soit 48 passes. Un corollaire sera d'assurer que la précision mécanique du Synthétiseur sera compatible avec la résolution visée. On peut estimer que cette précision devra être globalement égale à 1/10 du diamètre des

[1] Et ce sans doute tenir des projections supplémentaires nécessaires pour compenser l'évaporation des gouttes et/ou améliorer le rendement chimique [1].

micropuits, soit tout de même de l'ordre de 2 µm sur l'ensemble de la surface de la puce (Tableau II-2).

Au vu de caractéristiques annoncées par le constructeur, la tête piézoélectrique Epson choisie s'avère être aussi un système de projection rapide. Dans le cas d'une impression papier, la vitesse de déplacement atteint près de 50 cm/s. L'on peut remarquer que la vitesse de déplacement des axes du Synthétiseur pourra être sans inconvénient du même ordre de grandeur et que cela ne constituera pas une limite technologique, à condition (i) de prévoir des règles optiques d'une précision de 1 µm pour contrôler la position exacte des têtes d'impression et (ii) de développer un mode de contrôle des tirs à la volée inspiré de celui développé par [1] avec une électronique rapide. Avec cette technologie, la vitesse de passe sur les micropuits sera du même ordre de grandeur que la vitesse d'impression sur papier. Globalement, nous retrouvons un résultat déjà démontré avec le Synthétiseur de puces à ADN basse densité, la durée de fabrication d'une puce sera proportionnelle à la longueur des sondes. Le facteur de proportionnalité dépendra essentiellement des paramètres chimiques (durée du couplage, nombre de lavages, etc…) mais peu de la durée des passes de projection.

II.2 PROJECTION DE REACTIFS AVEC UNE RESOLUTION DE 4 PICOLITRES

Nous allons étudier ci-dessous les moyens de projection à la demande basés sur des piézoélectriques. Ceux-ci ont été inventés dans les années 1970 par les sociétés Clevite [117] et Silonic [118, 119] puis améliorés à partir de 1980 notamment par IBM [120] et Epson Seiko. Pour mettre ces dispositifs en œuvre avec des réactifs autres que des encres, il est en effet nécessaire de comprendre leur fonctionnement en revenant au principe de base.

De manière générale projeter avec des moyens commerciaux des réactifs de synthèse dans des solvants comme le DMF ou l'acétonitrile, n'a rien d'évident. Outre les problèmes éventuels de compatibilité chimique, il est bien connu que la viscosité et l'énergie de surface du produit à projeter sont des paramètres importants pour la projection [121]. Le Tableau II-3 permet de comparer les propriétés physiques de différents solvants de projection qui seront utilisés par la suite. Nous étudierons les projections de DMF et d'acétonitrile en prenant comme référence l'encre et le DMSO, qui est faiblement volatile et dont la viscosité est intermédiaire entre l'encre et les deux autres solvants.

	Acétonitrile	DMF	DMSO	Encre d'impression [122]
Densité	0,78	0,9445	1,104	~ 1
Tension de surface	0,019 N/m (20°C)	0,036 N/m (20°C)	0,043 N/m	0,027-0,045 N/m
Viscosité	0.345 cP à 25°C	0.8 cP à 20°C	1,996 cP à 20°C	2 à 20 cP à 20°C

Tableau II-3 : Comparaison des propriétés physiques de différents solvants de projection.

Par ailleurs, se pose le problème d'absence d'interface facile à utiliser entre la tête de projection et un ordinateur. Il apparaît difficile de se contenter de contrôler celle-ci avec un simple logiciel d'impression (driver d'imprimante) car il faut modifier les paramètres de projection. De plus nous avons prévu à terme d'intégrer ces têtes de projection dans une machine complexe, qui sera pilotée par le logiciel LabView. Le développement d'un sous-logiciel de commande sous LabView des moyens d'impression est donc nécessaire. Pour ce faire, nous avons dû étudier comment "détourner" une tête de projection de son fonctionnement normal. Comme nous allons le voir ci-dessous, nous avons adapté la tête piézoélectrique sur un banc instrumental (banc de picoprojection) pour tester les projections avec les différent produits et sur d'autres substrats que le papier, avec une électronique et un logiciel développés par nos soins.

II.2.1 DESCRIPTION D'UNE TETE DE PROJECTION PIEZOELECTRIQUE

1. L'effet piézoélectrique

La piézoélectricité fut découverte en 1880 par les frères Curie[123]. Le terme *piezein* vient du mot grec qui signifie presser. Ce phénomène se traduit par la naissance d'une polarisation électrique au sein d'un matériau (quartz par exemple) lorsque celui-ci est soumis à une contrainte mécanique : cette polarisation est directement proportionnelle en intensité à la déformation appliquée et son sens s'inverse lorsque la contrainte s'inverse. L'effet piézoélectrique s'explique par le déplacement des ions à l'intérieur d'un cristal asymétrique sous l'effet de la contrainte mécanique : les polarisations locales ne se compensent pas et un champ total apparaît. En 1881, Lipmann avait prédit que l'effet inverse existait mais ce furent les frères Curie qui purent le mettre en évidence. Ainsi, un cristal piézoélectrique soumis à une polarisation voit sa structure géométrique modifiée avec apparition de déformations induites.

On distingue les matériaux piézoélectriques suivants :

- Les cristaux naturels avec des propriétés piézoélectriques faibles : quartz, topaze, berlinite (AlPO4), orthophosphate de gallium (GaPO4), arséniate de gallium (GaAsO4). Ils sont souvent utilisés comme capteurs étalons (ex : accéléromètre sismique) :
- Les polymères qui sont flexibles, légers, peu coûteux mais d'une raideur insuffisante pour être utilisés comme contrôleurs actifs de structures ou actionneurs. On distingue les polymères piézoélectriques naturels (fibres de caoutchouc, laine, cheveux, bois et soie) des synthétiques, notamment polyfluorure de vinylidene fluoride (PVDF) de formle générale $(-CH_2-CF_2-)_n$ qui a une piézoélectricité dépassant plusieurs fois celle du quartz.
- Les céramiques avec en particulier le Zirconium Titanate de Plomb (PZT) apparu en 1954 (mais aussi ($BaTiO_3$, $KNbO_3$, $LiNbO_3$, $LiTaO_3$, $BiFeO_3$, Na_xWO_3, $Ba_2NaNb_5O_5$, $Pb_2KNb_5O_{15}$…). Elles sont depuis cette époque très largement utilisées tant pour les capteurs que pour les actionneurs car leurs propriétés piézoélectriques dépassent celles de tous les autres matériaux.

Les deux principaux paramètres qui caractérisent un matériau piézoélectrique sont en effet : le coefficient de couplage piézoélectrique K et la fréquence de résonance F_R de la déformation.

Le coefficient de couplage piézoélectrique K détermine l'aptitude du matériau à transformer l'énergie électrique en énergie mécanique et réciproquement. Il s'agit d'un rendement énergétique bidirectionnel, qui varie suivant la nature du matériau (Tableau II-4), sa forme et la direction de sa déformation.

$$K = \frac{Energie\ transformée}{Energie\ \ fournie}$$

Matériau	Quartz	LiNbO3	PVDF	PZT
K (%)	10	10	14	40 à 70

Tableau II-4 : Quelques valeurs du coefficient de couplage piézoélectrique d'après [124].

La fréquence de résonance F_R d'un matériau piézoélectrique dépend de sa taille, de son épaisseur et du matériau qui le compose. Pour un même matériau, la fréquence sera généralement d'autant plus basse que le composant est épais. En règle générale, l'ordre de grandeur des fréquences de résonance peut aller de plusieurs centaines de kHz à plusieurs centaines de MHz. Le mode de vibration d'un piézoélectrique sera déterminé par la géométrie du composant (Figure II-3). Par exemple dans le cas d'un matériau cylindrique, l'on distingue :

- **le mode de résonance radial** aux fréquences faibles (quelques centaines de kHz) décrit par une constante N_P (kHz.mm) égale à F_R **x** Ø ;

- **le mode de résonance axial** aux fréquences plus élevées faibles (MkHz) décrit par une constante N_T (kHz.mm) égale à F_R **x** δ avec :

  F_R : fréquence de résonance du matériau piézoélectrique (kHz) ;

  Ø : diamètre du matériau piézoélectrique (mm) ;

  δ : épaisseur du matériau piézoélectrique (mm).

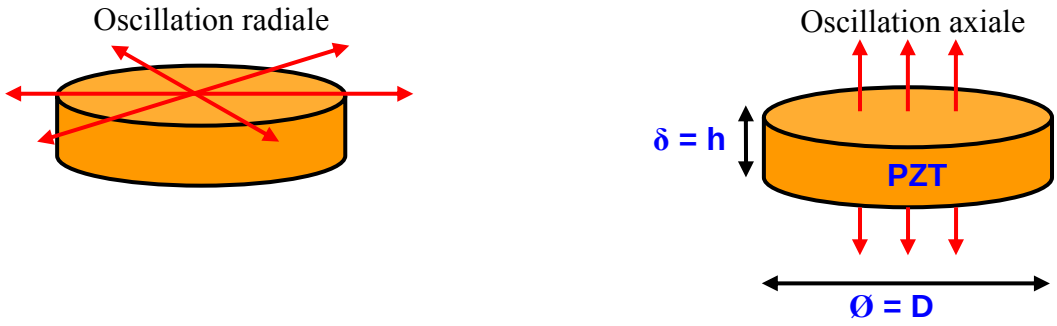


Figure II-3 : Formes et modes de vibration d'un matériau piézoélectrique cylindrique.

2. Principe de base d'une projection

Voyons maintenant de quelle façon la piézoélectricité peut être utilisée pour former et projeter une goutte. Les recherches menées dans les années 1960-1970 ont permis d'identifier des processus plus ou moins complexes capables de former des gouttes à petite échelle par effet piézoélectrique [112]. Cela a donné naissance à de nombreux articles et surtout brevets, notamment aux Etats-Unis et au Japon avec toutefois un principe commun que nous allons exposé ci-dessous [125-128]. En effet un système de projection peut être schématisé comme étant la réunion des trois éléments suivants (Figure II-4) :

- une chambre de compression formée dans du PZT ;
- l'entrée de la chambre de compression reliée au réservoir d'encre ;
- la sortie de la chambre de compression, qui sert de buse d'éjection.

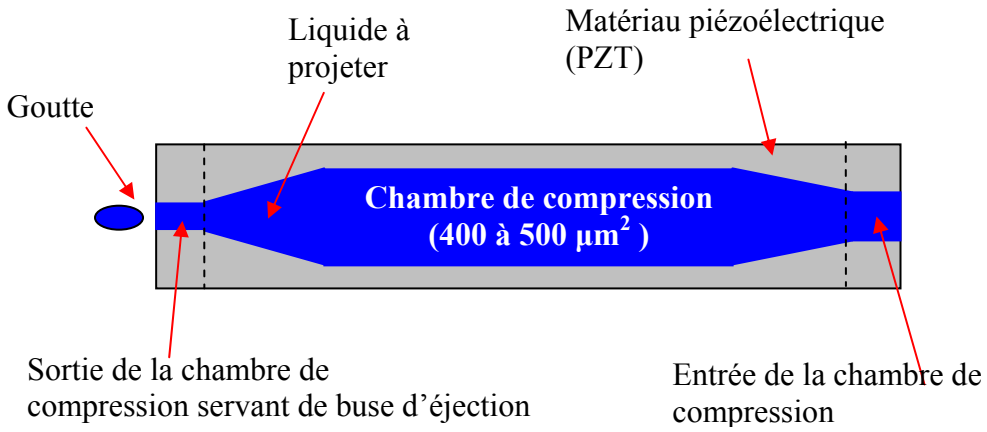


Figure II-4 : Principe d'un système de projection piézoélectrique.

Afin de créer une dynamique au sein du liquide, le processus de projection d'une goutte est effectué suivant un cycle (appelé **cycle de projection**) dont chaque transition est caractérisée par une variation du volume de la chambre de compression par effet piézoélectrique (cf. Figure II-5 qui montre le voisinage de la buse d'éjection) :

- une dépression 1, qui aspire le liquide par augmentation du volume de la chambre ;
- une compression 1, qui fait émerger le liquide à l'extérieur de la buse, par diminution du volume de la chambre, sans qu'une goutte ne soit éjectée ;
- une dépression 2, qui permet d'éjecter une goutte en séparant le liquide émergant de la buse de celui restant dans le cœur de la chambre : pour ce faire on crée au sein du liquide des forces de cisaillement qui vont permettre de "couper le liquide" et de former la goutte. La création d'une goutte est donc essentiellement le résultat de la transformation d'une énergie de surface en énergie cinétique.

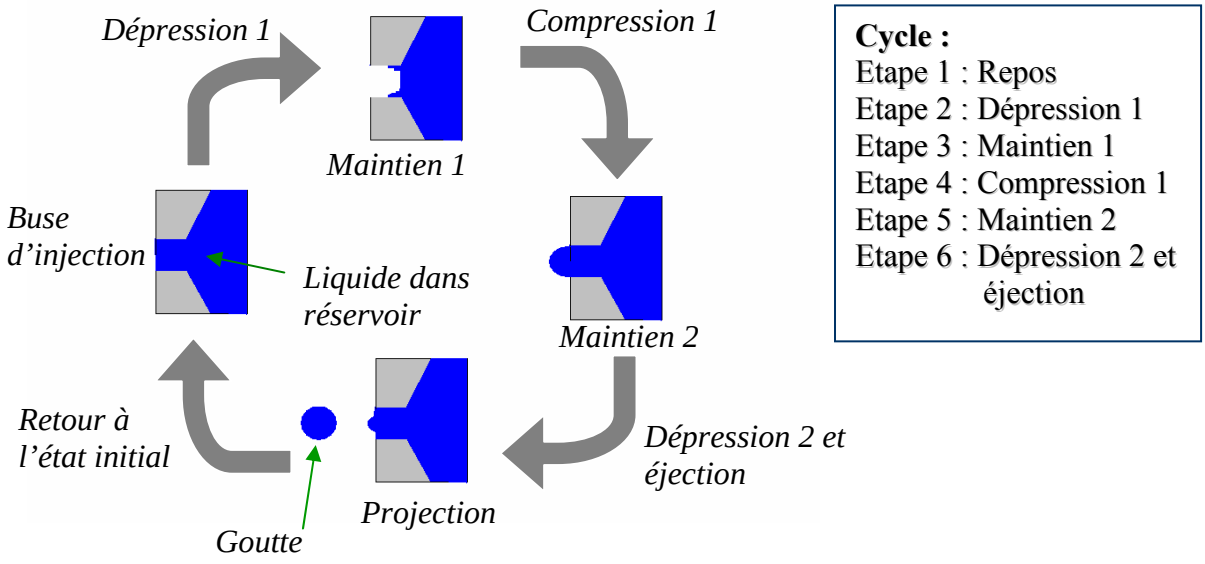


Figure II-5 : Cycle de projection d'une goutte à 6 temps.

3. Description d'un dispositif de projection "réaliste"

Par rapport à ce schéma théorique, un système de projection formé par empilement de couches, qui nous est apparu proche de notre système expérimental, est décrit dans le brevet [128]. La chambre de compression n'est pas directement réalisée en PZT comme nous l'avions schématisée auparavant mais dans un bloc de céramique ZrO_2. Celui-ci est fermé d'un coté par un couvercle élastique constitué de la même céramique, sur lequel est collée une plaque PZT. De l'autre coté, le bloc de ZrO_2 est relié d'une part à une chambre d'alimentation en liquide constituée de couches de céramiques et d'acier inox usiné, d'autre part à une buse d'éjection via un canal. La chambre de compression est soumise aux vibrations du couvercle actionnées par le PZT[1].

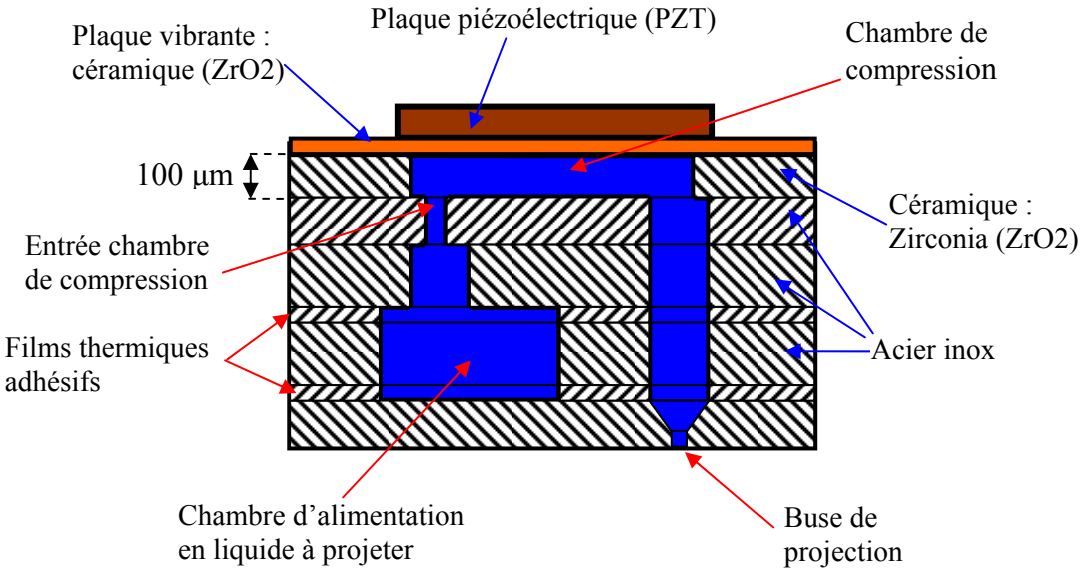
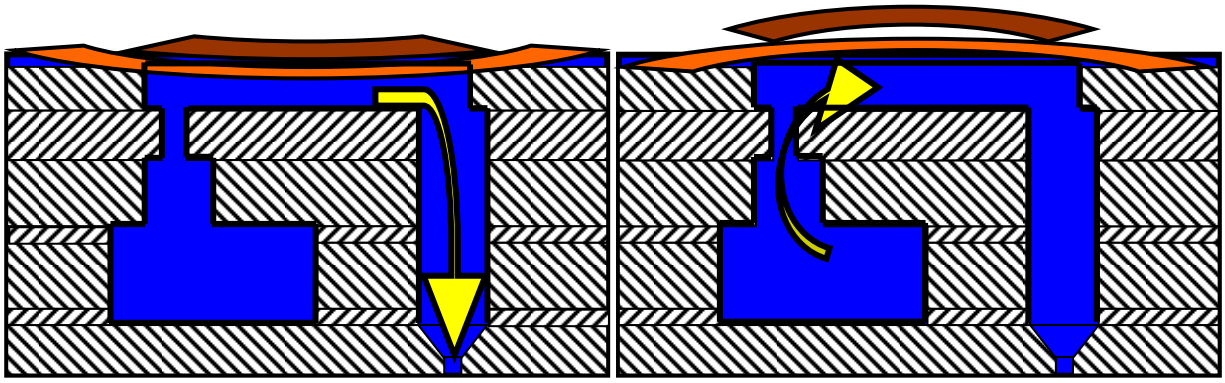


Figure II-6 : Moyen de projection piézoélectrique d'après [128].

La géométrie du dispositif est dissymétrique. Ainsi lorsque le signal de commande appliqué au PZT augmente, la plaque piézoélectrique comprime la chambre de compression et crée une surpression : un volume de liquide circule alors de la chambre de compression vers la buse d'éjection. A l'inverse, lorsque le signal de commande diminue, la plaque piézoélectrique se déforme dans l'autre sens, le volume de la chambre de compression augmente créant ainsi une dépression : un volume de liquide circule de la chambre d'alimentation jusqu'à la chambre de compression (Figure II-7).

[1] L'ensemble des couches de matériaux est assemblé après usinage, soit par collage, soit par l'intermédiaire d'un film thermique adhésif (notamment autour du réservoir fluidique en acier), ce qui aurait pu poser un problème pour la projection de solvants. Mais cela n'a pas été le cas.



a) Augmentation du signal de commande : compression de la chambre.

b) Diminution du signal de commande : dépression de la chambre.

Figure II-7 : Effet d'une variation du signal de commande sur la géométrie de la chambre.

Un signal électrique bien choisi permettra d'induire les déformations mécaniques afin de constituer les étapes du cycle de projection. Plus précisément, la qualité de la projection dépendra des paramètres du signal de projection définis à la Figure II-8 et qui sont listés dans le Tableau II-5 (nous confirmerons l'intérêt de ce modèle en étudiant les signaux électriques de la tête de projection d'une l'imprimante Epson en II.2.2).

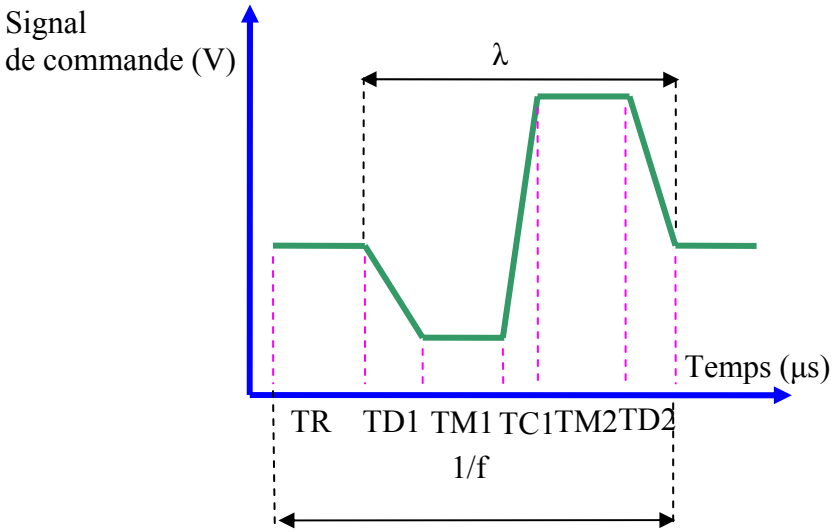


Figure II-8 : Cycle de projection d'une tête piézoélectrique d'après [128].

Un paramètre essentiel est la durée totale du signal de projection 1/f (µs). La période de repos T_R n'a pas de valeur fixe et représente simplement la différence entre le temps qui s'écoule entre deux projections et les autres constantes de temps qui elles sont liées aux propriétés du solvant et aux paramètres de projection (volume projeté, précision des tirs...) de sorte que : $T_R = 1/f - \lambda$ avec $\lambda = T_{D1}+T_{M1}+T_{C1}+T_{M2}+T_{D2}$.

D'un point de vue expérimental, nous agirons sur T_R de façon à modifier la fréquence des projections sans modifier les autres paramètres, notamment les pentes, une fois que celles-ci seront adaptées au réactif à projeter.

Etape du cycle	Symbole	Durée du signal (µs)	Pente (V/µs)
Repos	T_R	1/f -λ	0
Dépression 1	T_{D1}	6	-2
Maintien 1	T_{M1}	2	0
Compression 1	T_{C1}	2	+15
Maintien 2 (à 25°C)	T_{M2}	5	0
Dépression 2 et éjection	T_{D2}	3	-6

Tableau II-5 : Paramètres du cycle de projection pour l'encre à 25°C d'après [128].

En fonction de la cadence de projection, la température θ du dispositif augmente par effet Joule, ce qui réduit notamment la viscosité de l'encre et sa tension de surface et a une forte influence sur la projection [128]. Un capteur de température est intégré à la tête de projection de façon à ajuster T_{M2} (µs) en fonction de θ[1]. Nous avons vérifié expérimentalement qu'avec une tête de projection Epson, le temps de maintien T_{M2} est bien de 6,2 µs lorsque la température de l'encre est de 22°C, ce qui correspond à λ = 19,2 µs.

4. Modélisation simplifiée de la tête de projection avec des oscillateurs d'Helmholtz

De manière générale, 1/λ correspond à l'ordre de grandeur de la fréquence maximale des projections, soit environ 50 kHz, ce qui n'est pas la fréquence de résonance d'un cristal piézoélectrique PZT. Pour expliquer cette différence, il convient d'estimer la fréquence de résonance d'un système de projection constitué d'un réservoir d'encre unique relié à 48 chambres de compression et buses d'éjection. Si nous négligeons pour l'instant l'influence de l'encre, ce système peut être comparé à un ensemble de pistons dans desquels l'air oscille. Un tel dispositif peut être modélisé (Figure II-9) par un ensemble d'oscillateurs d'Helmholtz identiques, chaque oscillateur permettant de décrire le comportement d'un élément de projection élémentaire constitué de l'arrivée d'encre, de la chambre de compression et la buse d'éjection [129].

[1] Soit :
- pour 25°C < θ < 40°C, TM2 = 5 µs
- pour 15°C < θ < 25°C, TM2 = 5 + (50-2θ) µs
- pour θ < 15°C, TM2 = 9 µs

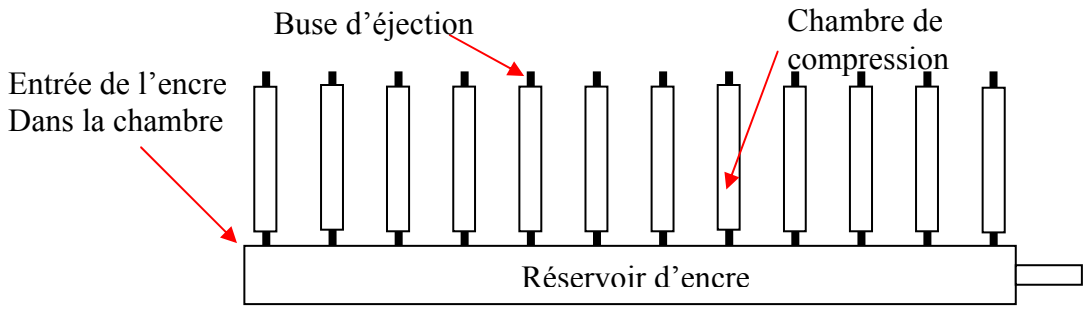


Figure II-9 : Schéma représentant une tête de projection avec 48 éléments de projection indépendants reliés à un seul réservoir d'encre à l'aide d'oscillateurs d'Helmholtz d'après [129].

Les oscillateurs d'Helmholtz décrivent des modes de résonances acoustiques liés à des écoulements d'air d'instruments de musique comme l'ocarina. Le mode de résonances d'Helmholtz est en général beaucoup plus bas en fréquence que les modes propagatifs, pour lesquels l'oscillation de l'air prend la forme d'une onde de compression qui se réfléchit sur les parois du récipient [130].

D'après [129], il est possible d'estimer la fréquence de résonance d'Helmholtz f_H, d'un élément de projection piézoélectrique à partir d'une description simplifiée de sa géométrie (Figure II-10), soit :

$$f_H = \frac{c}{2\pi}\sqrt{\frac{1}{V_c}\left(\frac{A_1}{L_1}+\frac{A_2}{L_2}\right)}$$

Équation II-1: Fréquence d'oscillation d'une buse piézoélectrique sur le mode d'Helmholtz.

Avec :
Vc le volume de la chambre de compression ;
L1 et A1 la longueur et la section de la buse d'éjection ;
L2 et A2 la longueur et la section de l'entrée de la chambre ;
c la vitesse du son.

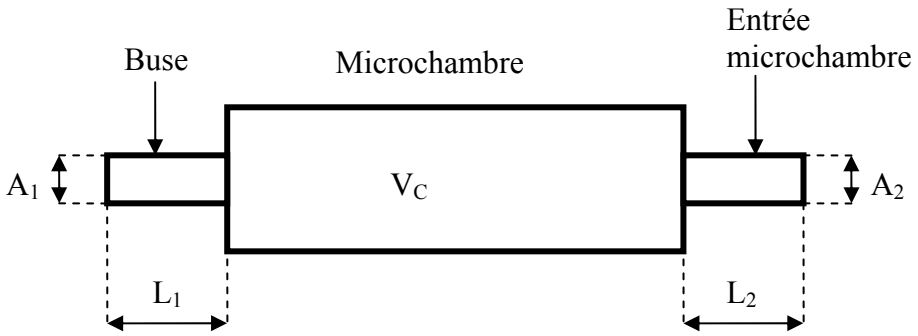


Figure II-10 : Représentation schématique d'un élément de projection à une seule buse pour le calcul de la fréquence d'Helmholtz.

Le diamètre des buses d'éjection de la tête Epson est de 31 µm (Figure II-1). Les autres paramètres ne sont pas donnés par le constructeur de l'imprimante. Par contre l'on peut

trouver dans [129] des informations précises sur les longueurs et les volumes sur des têtes piézoélectriques du même type, de sorte que :

A_1 = 706,86 µm^2 et L_1= 50 µm ;

A_2= 3000 µm^2 et L_2= 0,5 mm ;

V_c= 0,36 mm^3 ;

c= 1200 m/s.

On trouve alors que la fréquence d'Helmholtz de la tête de projection est f_H = 45170Hz soit une période de 22 µs, ce qui correspond bien à l'ordre de grandeur trouvé précédemment. Les têtes de piézoélectriques fonctionnent donc bien sur le mode d'Helmholtz.

Il est possible maintenant d'étudier ce qui ce passe juste après une projection. Après l'envoi de la goutte, l'élément de projection subit des vibrations résiduelles à la fréquence f_H, qui peuvent modifier les projections suivantes si elles sont trop rapprochées ou encore provoquer la projection de gouttes parasites appelées gouttes satellites. Il existe ainsi différentes conditions d'accord entre les temps caractéristiques du cycle de projection et la période d'Helmoltz, qui seront d'autant plus importante à respecter qu'il sera recherché une grande résolution et une grande répétabilité dans la précision géométrique des tirs [128, 131]. Notamment, au lieu de donner naissance à deux gouttes distinctes, deux signaux trop rapprochés pourront créer une seule et unique goutte de volume plus gros. Pour éviter cela, on considèrera que les oscillations résiduelles du piézoélectrique seront négligeables au bout d'un temps de repos correspondant à 5 périodes d'Helmoltz, ce qui correspond à 5 x 22 µs, soit 110 µs, ou encore 9090 Hz. Cette nouvelle fréquence correspond ainsi à la fréquence maximale des tirs dans la pratique. Cette valeur est intéressante car elle donnera l'ordre de grandeur de la vitesse maximale de renouvellement des réactifs de synthèse dans les micropuits.

II.2.2 COMMANDE ELECTRONIQUE

Notre objectif général est de commander directement les projections en sélectionnant la ligne de buses et le numéro des buses et ce réactif par réactif. Il est de plus nécessaire de pouvoir optimiser les paramètres en fonction de la nature du produit à projeter.

1. Architecture matérielle

Dans la mesure où nous ne disposions pas des données du constructeur pour la commande électronique de la tête d'impression, nous avons étudié le fonctionnement du

dispositif par reverse engineering. Puis nous avons extrait de la carte mère de l'imprimante les composants, qui sont absolument nécessaires à la commande de la tête et sont non disponibles dans le commerce. Ils ont été regroupés dans une carte spécifique appelée carte M (Figure II-11), afin de ne pas la confondre avec la carte mère du PC. Ces composants sont :

- un convertisseur numérique analogique (CAN) qui permet de créer un signal de sortie analogique $\mathbf{V_{OUT}}$ à partir du signal d'entrée **Data** définissant le cycle de projection de la tête piézoélectrique qui est au format TTL ;
- un amplificateur de tension, pour faire passer ce signal analogique à 42V et créer le signal **FB** (ainsi que les signaux auxiliaires **NPNB** et **PNPB**) ;
- un amplificateur de courant pour fournir le signal d'attaque **COM** du piézoélectrique.

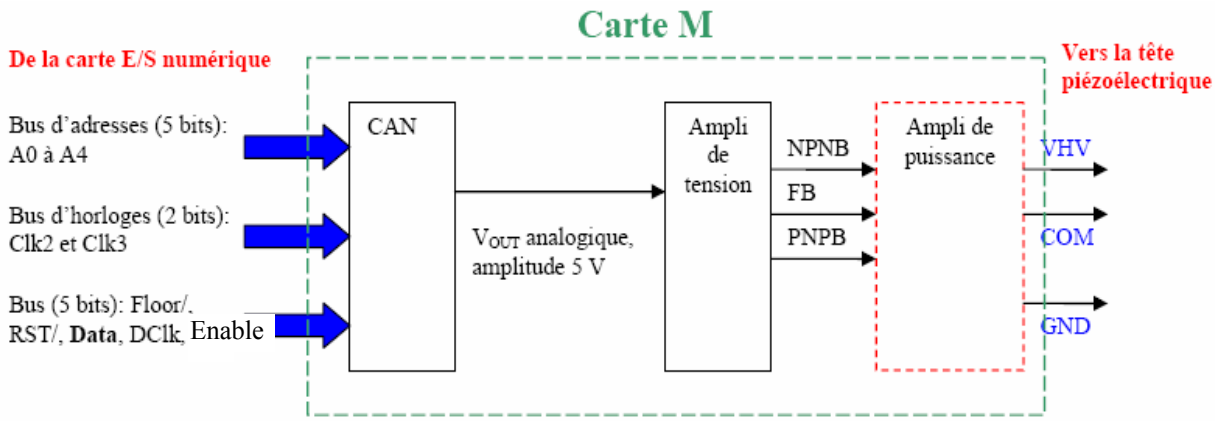


Figure II-11 : Elaboration du signal de projection de la tête piézoélectrique.

Data : paramètres (TTL) du cycle de projection.

A0 à **A3** : adresse de codage sur 4 bits dans le CAN des paramètres du cycle de projection (**A4** à la masse).

Enable/ : Mise en mémoire des paramètres du cycle de projection et élaboration du signal $\mathbf{V_{OUT}}$. Sur chaque front descendant du signal **Enable**/, les paramètres (**Data**) sont enregistrées aux adresses **A0** à **A3** (mode mémoire du CAN). Lorsque le signal **Enable**/ est constant à un niveau haut, le CAN est alors configuré en mode "action", les données sont lues aux adresses précédentes et la sortie analogique $\mathbf{V_{OUT}}$ est créée.

Dclk (3 MHz) : signal d'entrée servant d'horloge au CAN

Clk2 et **Clk3** sont deux signaux d'horloges qui synchronisent les différents cycles qui se déroulent au sein du CAN.
RST/ et **Floor**/ sont des signaux d'autorisation pour la validation des cycles du CAN. Ils sont fixés au niveau haut pour confirmer l'autorisation d'effectuer les actions au sein du CAN.

Le signal **COM** est formé à partir des informations contenues dans le signal **Data** de façon à constituer le signal de projection de la Figure II-8. Pour ce faire, le CAN lit le signal **Data** et génère un signal analogique en sortie d'amplitude 5V. Le signal de commande est alors envoyé vers l'amplificateur de tension alimenté sous 42V. La sortie de la carte M est

finalement adaptée en puissance pour attaquer la tête piézoélectrique sous un courant de 0,5 A avec une amplitude de tension entre 4,9 et 37,1 V. L'amplificateur de puissance est proche des circuits de commande de tête piézoélectrique décrits dans le brevet [132] : il s'agit pratiquement d'un amplificateur de courant push pull (Figure II-12).

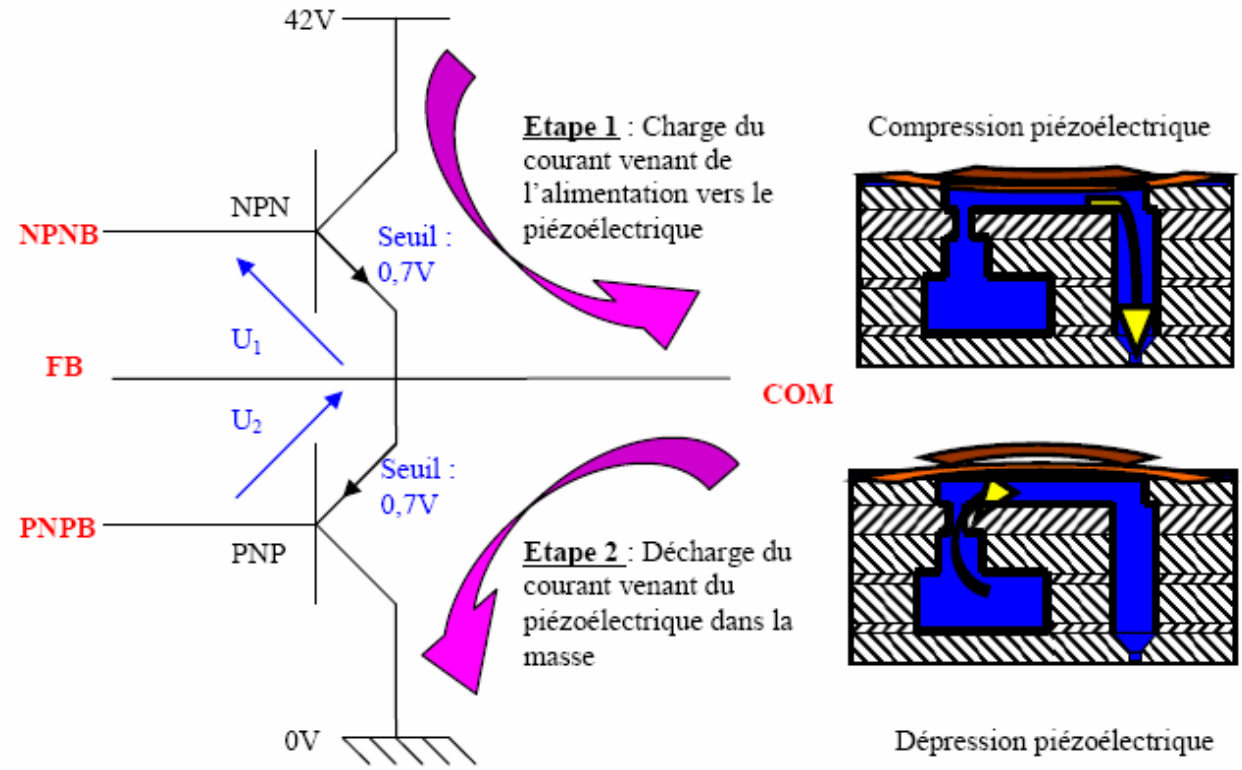


Figure II-12 : Principe de l'attaque du piézoélectrique dans l'amplificateur de puissance.

Les circuits push pull permettent en effet de contrôler en puissance les systèmes de faible impédance (ex : haut parleur) en augmentant le courant du signal de commande. Les transistors sont mis à contribution alternativement : le NPN est bloqué lorsque le PNP est passant et vice versa. Au départ, la tension FB est nulle : NPNB et PNPB délivrent le même signal analogique. Lorsque NPNB augmente et que la tension U1 dépasse 0,7 V, le transistor NPN est passant et le courant de l'alimentation charge le piézoélectrique. Lorsque PNPB diminue et que la tension U2 > 0,7 V, le transistor PNP devient passant, simultanément U1 < 0,7 V donc le transistor NPN devient bloquant : le courant se décharge dans la masse.

Pour sélectionner (i) le réactif à projeter, (ii) les buses qui vont tirer et (iii) élaborer tous les signaux de synchronisation qui sont nécessaires aux projections, nous avons développé un ensemble électronique entièrement pilotable par ordinateur sous LabView. Cet ensemble comprend, outre la carte M, les composants suivants (Figure II-13) :

- un PC avec une carte National Instrument 32HS, qui assure l'acheminement des signaux de commande entre le PC et la carte M en passant par une carte externe d'entrées/sorties numériques CB-68 LP NI ;
- une puce électronique intégrée à la tête de projection et non démontable qui assure l'interface entre la carte M et la structure physique en PZT ;

- une alimentation double : 5 V pour les signaux TTL et 42 V pour le cycle de projection de la tête piézoélectrique.

Les signaux de commande TTL sont visualisés sur un oscilloscope numérique de fréquence d'échantillonnage maximale 100 MHz. La carte 32 HS pouvant fonctionner jusqu'à 8 MHz, la lecture et l'affichage des signaux microprocesseurs (horloges…) seront donc assurés par l'oscilloscope.

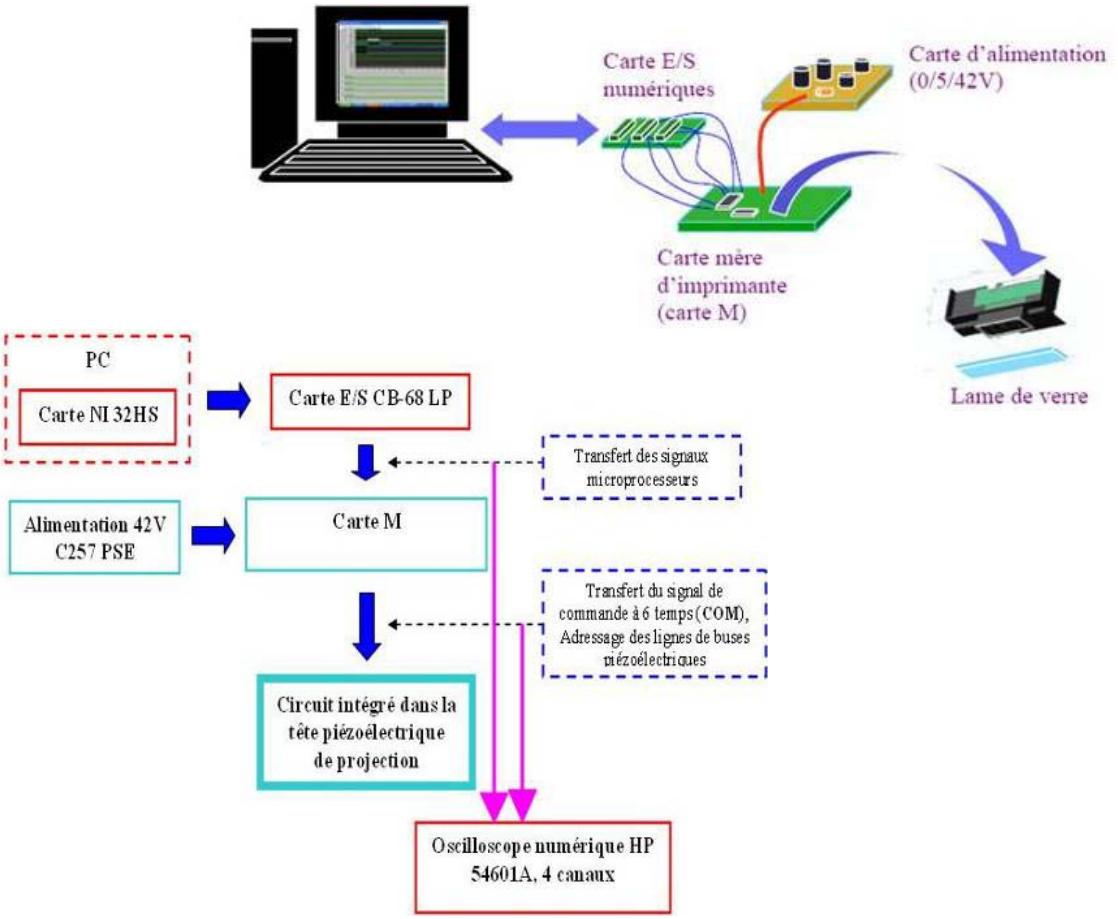


Figure II-13 : Contrôle de la tête de projection piézoélectrique.

Le circuit électronique incorporé à la tête de projection est alimenté par une nappe dans laquelle sont acheminés via un bus 27 bits (Figure II-14) :

- directement le signal de la carte M , soit :
  - le signal de projection **COM** ;
  - le signal d'horloge **Clk**.
- indirectement les autres signaux venant du PC, notamment :
  - les signaux logiques **S1** à **S6** permettant de sélectionner les buses qui vont projeter ;

- le signal **Latch**, qui déclenche les masques de sélection des buses ;
- le signal **NCHG**, qui synchronise toutes les lignes de buses.

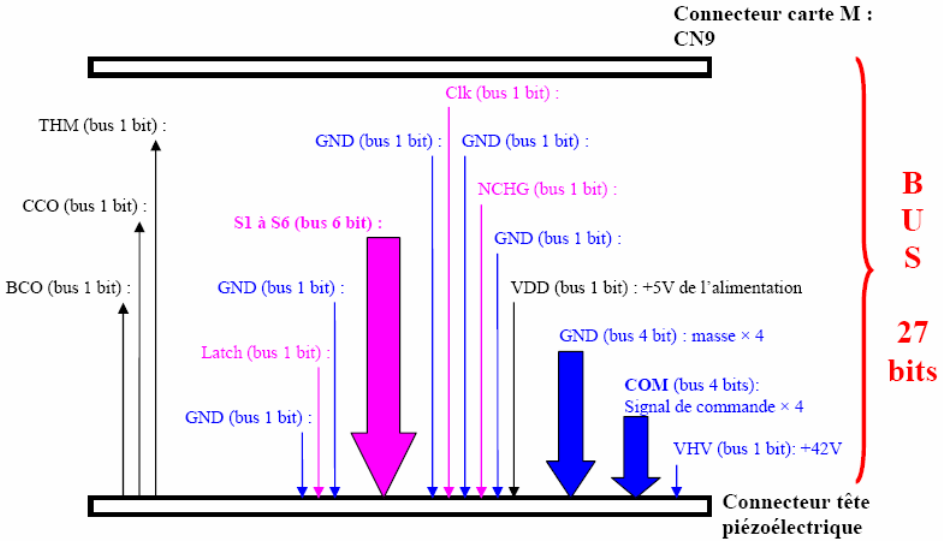


Figure II-14 : Bus 27 bit entre la carte M[1] et puce électronique intégrée à la tête de projection.

Pour créer des signaux d'horloges compatibles avec un signal de commande de l'ordre de 30 µs, la carte NI 32 HS fonctionne à 3 MHz : le signal **Dclk** ainsi généré sert d'horloge au CAN pour la création du signal de commande de la tête piézoélectrique. Cela laisse une bonne marge de manœuvre au niveau de l'échantillonnage du signal. En effet, plus la fréquence de travail de la carte 32 HS sera grande (donc celle du CAN), plus il sera possible de fabriquer des pentes de compressions ou de dépressions élevées en pratique avec la carte M. Ce point est important car cette fréquence gouverne in fine la taille des gouttes.

2. Logiciel

Un programme développé sous LabView permet à un utilisateur de commander la tête de projection de façon à :

- générer le signal de projection avec le paramétrage souhaité ;
- sélectionner la ligne de buse (c'est-à-dire le réactif) et le numéro de buse qui va tirer ;
- créer les signaux de synchronisation et les horloges ;
- générer le signal de projection ;
- déclencher la projection.

[1] Nous noterons que 3 signaux sont émis de la tête de projection vers la carte M et ne seront pas utilisés dans notre étude, mais pourront être utiles ultérieurement :
- THM : signal provenant d'un capteur thermique positionné sur la tête
- CCO et BCO : signaux qui détectent respectivement la présence des cartouches d'encre de couleur et d'encre noir.

L'opérateur défini les coordonnées des points de la courbe théorique (signal à 6 temps d'amplitude 1V). Le logiciel en déduit le signal théorique, puis génère le signal **Data** contenant les valeurs des pentes de compressions, de dépressions et les pentes constantes du cycle. Les données seront enregistrées dans le CAN aux adresses **A0 à A3**. Lorsque le signal **Enable/** passe au niveau haut, le CAN est alors configuré en mode actif : les données sont lues aux adresses **A0** à **A3** et les pentes du signal de commande sont créées (Figure II-15).

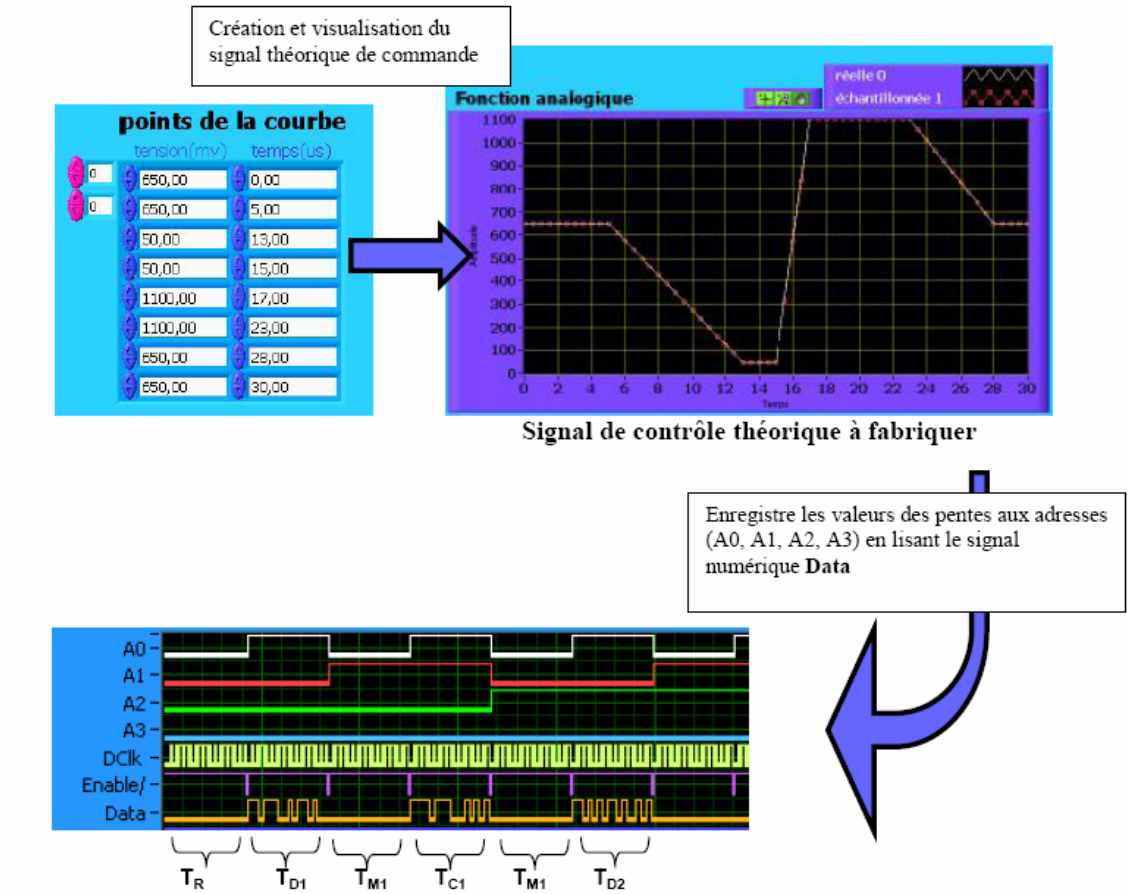


Figure II-15 : Génération des signaux d'adressages, d'horloge, d'Enable et de Data pour le CAN.

3. Sélection des réactifs et des buses

Dans le logiciel, une matrice à 6 lignes et 48 colonnes permet de définir respectivement les réactifs (lignes 1 à 6) et les buses (colonnes 1 à 48) qui vont tirer. Les signaux S1 à S6 sont ensuite générés par le programme (Figure I-17). A terme, lorsque le procédé de synthèse sera intégré dans un protocole complet de fabrication des puces, un programme indépendant permettra d'activer et de désactiver automatiquement les buses en fonction du plan de fabrication de la puce.

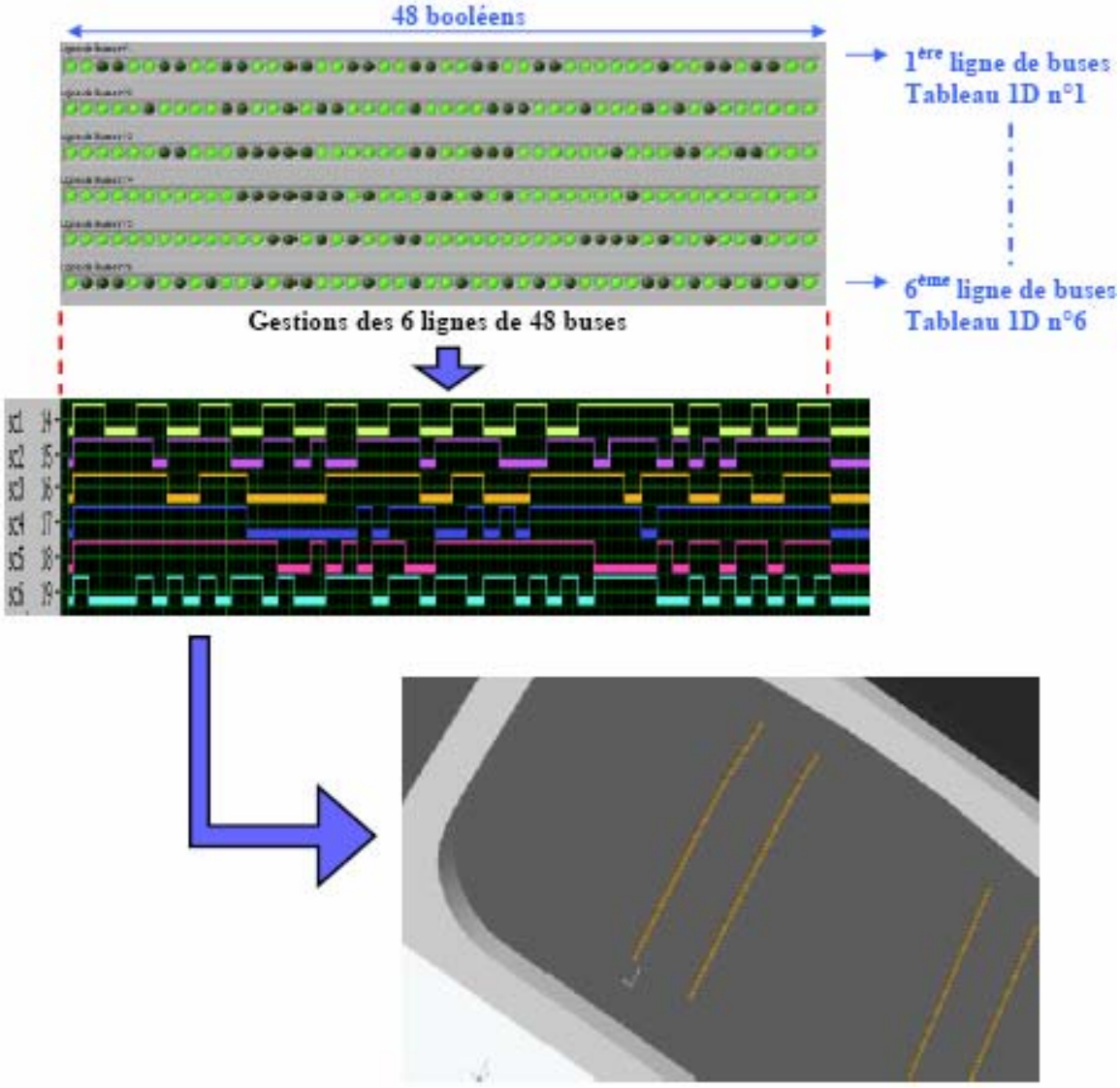


Figure II-16 : Génération des signaux d'activation des buses piézoélectriques.

4. Signaux logiques de synchronisations et d'alimentation TTL

Il s'agit des signaux logiques de synchronisations et d'alimentation TTL (**masse, 5V, Clk2, Clk3, Reset, Floor, Clk, NCHG et Latch**). Ils sont nécessaires au fonctionnement du CAN et du circuit intégré à la tête de projection. Ils ont été déterminés par ingénierie inverse par M. Jaber et sont reproduits à l'identique par le logiciel (Figure I-18).

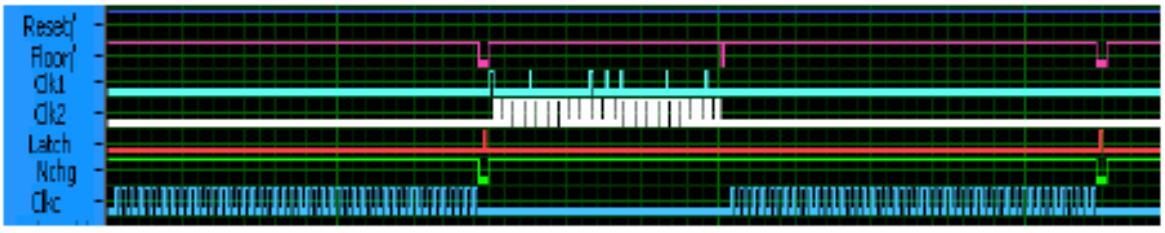


Figure II-17 : Signaux logiques de synchronisation.

Le développement effectué nous permet maintenant de passer à la projection des réactifs de synthèse.

II.3 ADAPTATION DES PARAMETRES DE PROJECTION AUX SOLVANTS

Afin de pouvoir procéder à des picoréactions chimiques, il sera nécessaire de prendre en considération la nature physicochimique des solvants mis en jeu en adaptant les paramètres de projection. Cette adaptation sera effectuée en observant les projections.

II.3.1 BANC D'OBSERVATION DES PICOPROJECTIONS

Nous avons développé un premier banc d'observation (Figure II-18) pour caractériser les picoprojections. Une difficulté était de visualiser des projections de picolitre de solvants qui sont incolores et qui s'évaporent pratiquement instantanément à l'échelle considérée, contrairement aux encres d'imprimante qui ont des pigments "rémanents".

Pour contourner ces difficultés, nous avons constitué un banc d'observation avec une caméra CCD Kappa équipée d'un zoom Navitar et un système d'éclairage. Ce dispositif, proche de celui qui de la section IV.1.3, permet d'observer directement les projections ainsi que de suivre l'évaporation des gouttes. Le logiciel de la caméra Kappa ne fonctionnant pas en mode automatique d'enregistrement d'image, nous avons enregistré manuellement les images obtenues. Un programme simple de détection d'objet a été développé pour analyser ces images. Une difficulté était que les images de projections peuvent avoir des aspects très différents en terme de contenu d'information (discontinuités de l'intensité des pixels peu visibles). Pour résoudre ce problème, nous avons joué sur l'éclairage des projections, qui est un paramètre déterminant dans la qualité des images ainsi que pour l'efficacité du traitement informatique. Nous disposons de deux formes d'éclairage différentes suivant le type d'information souhaité :

- un éclairage circulaire rasant à LEDs, qui sera privilégié pour donner un maximum de renseignement sur les contours des gouttes (calcul de diamètre) ;
- un éclairage avec deux sources ponctuelles à fibres optiques placés sous deux angles différents (proches de 45°), qui favorisera un rendu volumique des gouttes.

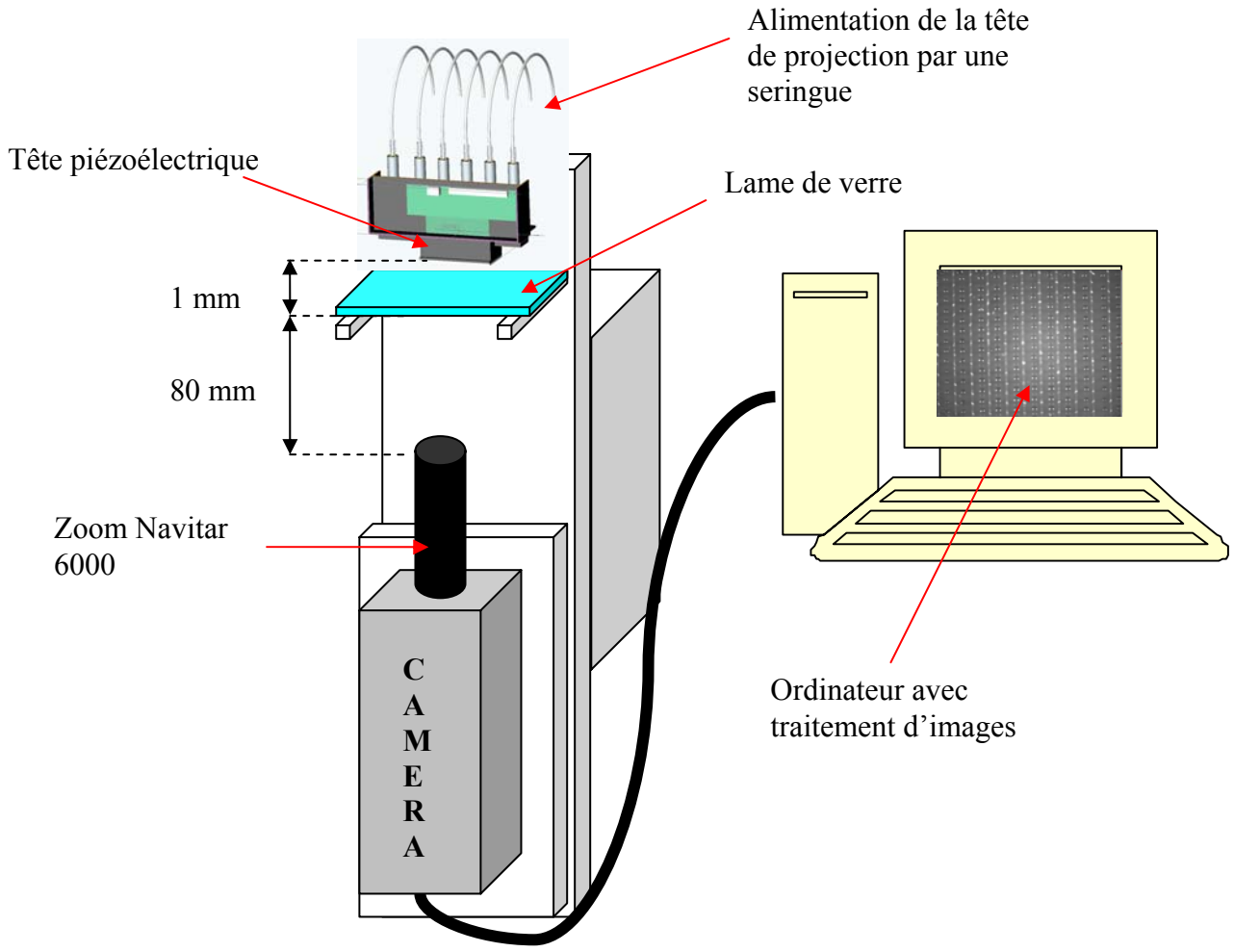


Figure II-18 : Banc d'observation des picoprojections par caméra CCD.

II.3.2 DESCRIPTION PHENOMENOLOGIQUE

Avec les paramètres de projection définis par le signal de projection de l'encre (Figure II-8), les premiers résultats obtenus dans la projection de DMF étaient très mauvais. L'observation visuelle révélait les problèmes suivants (Figure II-19) :

- un désalignement important de gouttes provenant d'une même ligne de buses ;
- la projection de gouttes de forme non homogène dépassant 100 µm ;
- la présence de gouttes satellites parasitant la figure de projection et pouvant provoquer des contaminations croisées dans les micropuits ;
- de manière générale une évaporation rapide (quelques secondes) de gouttes très petites à une vitesse qui pouvait être incompatible avec le cinétique réactionnelle.

La question de fond était donc la suivante : quels réactifs pourraient être réellement projetés avec précision avec ce dispositif ?

a) b)

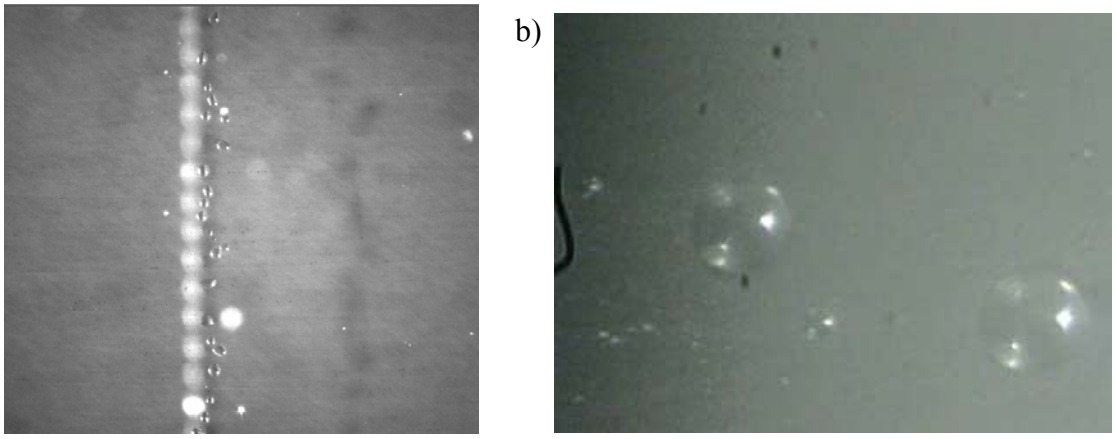


Figure II-19 : Essais préliminaires de projection de DMF.

a) En arrière plan : 14 buses alignées. Au premier plan : une ligne non uniforme de 14 gouttes de DMF.
b) deux gouttes de DMF (diamètre 60 µm) avec présence d'une goutte satellite entre les deux.

Nous avons donc réalisé une étude sur la forme du signal de commande. Afin d'améliorer notre maîtrise des projections, nous avons procédé par comparaison avec des produits de projection différent :

- l'encre afin de visualiser facilement les gouttes et de définir les paramètres de projection standard ;
- le DMSO : solvant modèle moins éloigné de l'encre que les autres réactifs en terme de viscosité et de densité ;
- le DMF solvant de base pour la synthèse de peptides ;
- l'acétonitrile solvant de base pour les puces à ADN.

Toutes les observations suivantes ont été réalisées dans les mêmes conditions de température et sur une dizaine de lames de verre non traitées de même marque. La température et l'état de la surface de la lame de verre sont des facteurs influençant la forme des gouttes obtenues. Nous n'insisterons donc pas sur l'étude des liens entre la forme, la position des gouttes et la nature du substrat car de toute façon, à terme, les substrats seront dotés de micropuits. Les paramètres suivants du signal de commande ont été étudiés pour déterminer leur rôle au niveau de la qualité de projection :

- les différentes constantes de temps ;
- les pentes ;
- les amplitudes.

Les valeurs numériques de diamètres de gouttes et les écarts, illustrées dans les prochains graphiques, ont été obtenues par traitement d'image. Pour certains paramètres pour lesquels les influences sont difficiles à quantifier, nous avons procédé seulement à une étude qualitative.

1. Influence des constantes de temps du signal de projection

Dans le cas de l'encre, le signal de commande de base a une période de 30 µs et les gouttes un diamètre d'environ 30 µm sur papier d'après Epson. Si le cycle de dépression / compression subit une variation temporelle (liée à une variation de la fréquence d'horloge de l'électronique), la taille des gouttes projetées va varier. Précisément, plus la période du cycle sera petite, plus les gouttes seront petites.

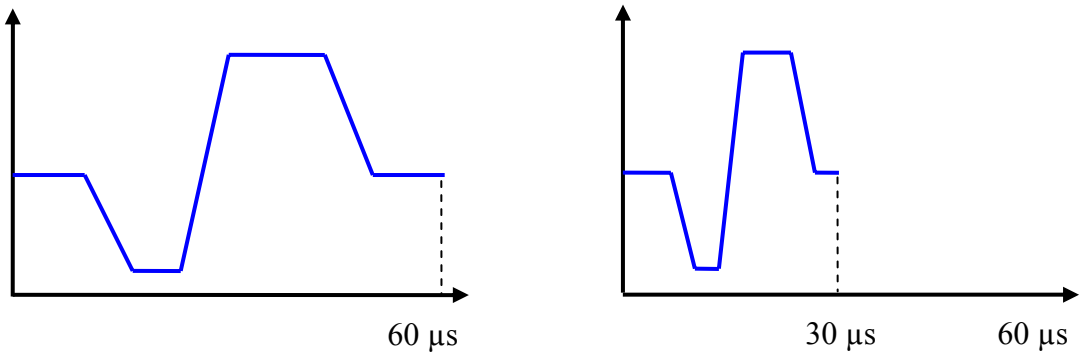


Figure II-20 : Augmentation de la taille des gouttes en fonction de la période du cycle de projection.

Dans le cas particulier du DMF, l'on montre, sur la Figure II-21, le diamètre des gouttes projetées par 14 buses sur du verre pour quatre valeurs de la période du signal de commande envoyé au piézoélectrique : 60 µs, 120 µs, 180 µs et 600 µs. A partir d'une période de 120 µs, certaines gouttes se lient par deux pour former une goutte plus grosse (ex : à 120 µs, les gouttes 5 et 6). Plus on augmente la période, plus ce phénomène est accentué avec la création de complexes à trois gouttes.

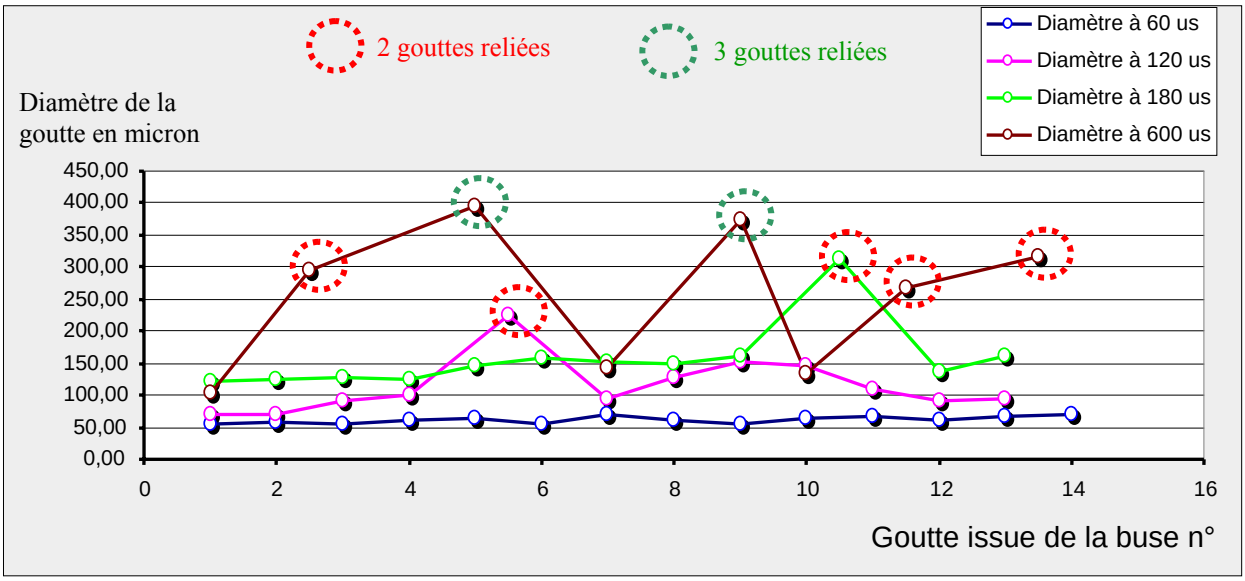


Figure II-21 : Etude pour 14 buses de la variation du diamètre des gouttes projetées en fonction de la période du signal de commande.

Pour fabriquer des biopuces, toutes les gouttes déposées sur le substrat doivent être parfaitement contrôlées et séparées entre elles afin de ne pas contaminer les plots voisins. Il existe donc une limite de fonctionnement au dessus de laquelle la qualité des projections n'est plus satisfaisante, soit entre T = 120 µs et 180 µs, pour le DMF (Figure II-22).

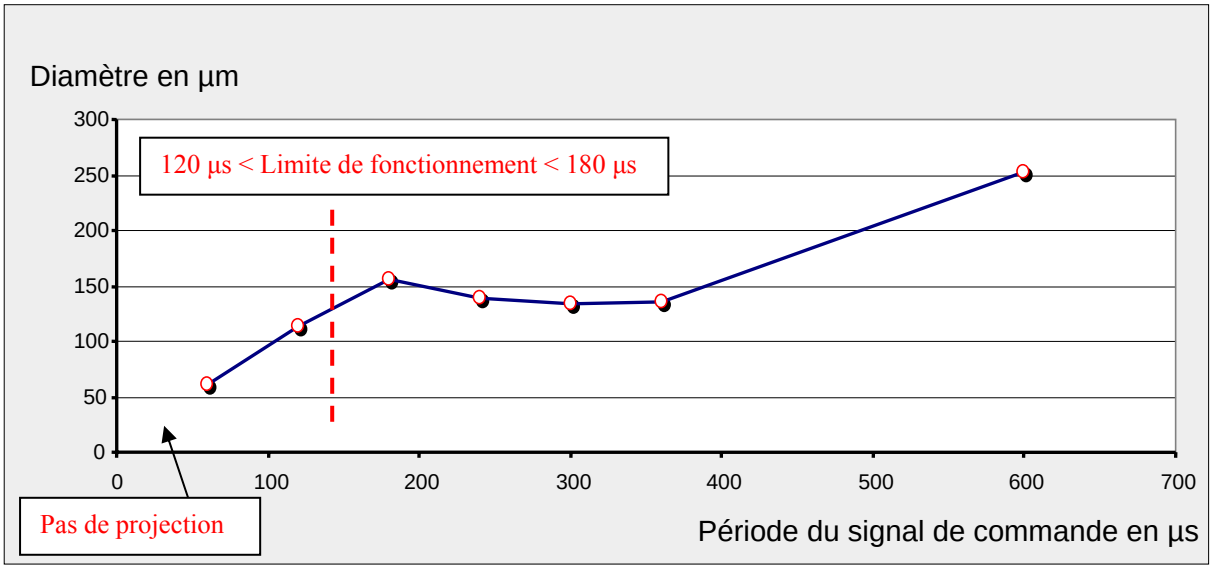


Figure II-22 : Diamètre moyen des gouttes en fonction de la période du signal de commande.

Il existe une limite inférieure et une limite supérieure de la période au-delà desquelles, les projections ne s'effectuent plus du tout. Ces limites dépendent de la nature et des propriétés du réactif utilisé, en particulier de sa viscosité : moins le produit est visqueux, plus il sera possible de projeter à une fréquence élevée. L'étude réalisée ici ne concerne que la variation de la période des projections, en considérant que l'allure globale du signal reste

inchangée (amplitudes constantes, pentes ajustées). Lorsque les autres paramètres sont aussi modifiés, il devient alors difficile de prévoir la taille exacte des projections.

2. Influence des pentes du signal de projection

Expérimentalement, il apparaît que la valeur des pentes joue un rôle prépondérant en ce qui concerne la qualité de projection.

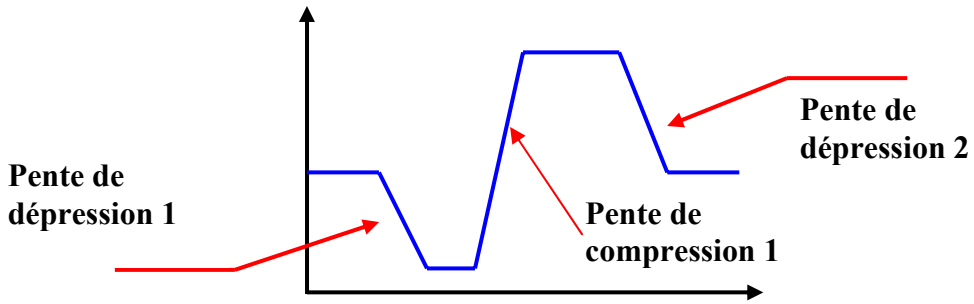


Figure II-23 : Influence des pentes de signal sur la qualité de projection.

Pour la dépression 1, il existe une limite inférieure de pente pour laquelle il n'y a plus de projection. Pour des pentes supérieures à cette limite, il y a systématiquement projection et la valeur intrinsèque du coefficient directeur de ce segment de droite ne joue plus sur la qualité de projection. On peut alors utiliser ce paramètre pour ajuster la période totale du cycle.

La pente de compression 1 permet de pousser le liquide hors de la buse d'éjection. Lorsqu'elle est trop importante (limite supérieure), les gouttes sont projetées très violemment, ce qui entraîne l'apparition de gouttes satellites. Par contre, de même que pour la pente de dépression 1, il faut se fixer une pente suffisamment forte pour qu'il y ait projection (limite inférieure). Ces limites dépendent encore du liquide utilisé.

La pente de dépression 2 correspond à une étape de cisaillement du liquide de façon à l'expulser pour créer la goutte. Une pente trop accentuée aura le même effet que précédemment, à savoir la création de gouttes satellites, voir dans les cas limites, l'éclatement complet de la goutte sans conservation de la direction des tirs. Sa valeur varie beaucoup avec la viscosité du liquide projeté : un liquide visqueux a nécessairement besoin d'une dépression importante car les forces de cisaillements requises pour séparer le liquide sont plus grandes que pour un liquide très fluide. Par contre, à l'inverse, cette pente peut aussi, en étant choisie très lente, permettre d'éliminer complètement les gouttes satellites causées par les étapes précédentes. Ainsi, on pourra jouer avec plus de liberté sur ce dernier paramètre dont le rôle est très important dans le résultat de la projection.

3. Influence des amplitudes du signal de projection

Les paramètres d'amplitude donnent naissance à deux effets :

- les faibles amplitudes favorisent la création de gouttes satellites en très grand nombre, en particulier lorsque le produit à projeter a une faible viscosité ;
- les fortes amplitudes permettent des projection "précises" en favorisant un bon alignement des gouttes projetées simultanément par une ligne de buses.

Il faut donc trouver un compromis entre la précision pour l'alignement des projections et la création de gouttes satellites, en jouant sur les paramètres vus précédemment, en particulier en diminuant la pente de décompression 2.

Les amplitudes influencent aussi le diamètre des gouttes : les gouttes deviendront plus petites à mesure que l'amplitude diminuera jusqu'à ce qu'il n'y ait plus du tout de projection. Cette limite dépend aussi de la viscosité du liquide : un produit de forte viscosité comme l'encre aura une amplitude limite de projection beaucoup plus haute que le DMF.

4. Conclusion

Tous les paramètres que nous venons d'énoncer sont liés à la nature physicochimique du produit à projeter. La caractéristique la plus importante dans le choix de la forme du signal de commande est la viscosité du réactif. Dans une moindre mesure, la tension de surface du liquide joue aussi un rôle dans la prédisposition de la goutte à éclater ou non lors de la projection.

Nous avons vu précédemment que d'autres paramètres ont aussi une influence sur la qualité de la projection (fréquence de résonance du système, amortissements oscillatoires). Pris séparément, chacun de ces paramètres peuvent être expliqués plus ou moins simplement par la théorie mais leurs actions regroupées est difficile à prévoir. Nous avons tenté d'expliquer ces interactions dans la Figure II-24.

Nous retiendrons de cette étude qu'il nous a été possible de procéder à des projections de qualité raisonnable pour tous les solvants étudiés avec un choix judicieux des paramètres de projection.

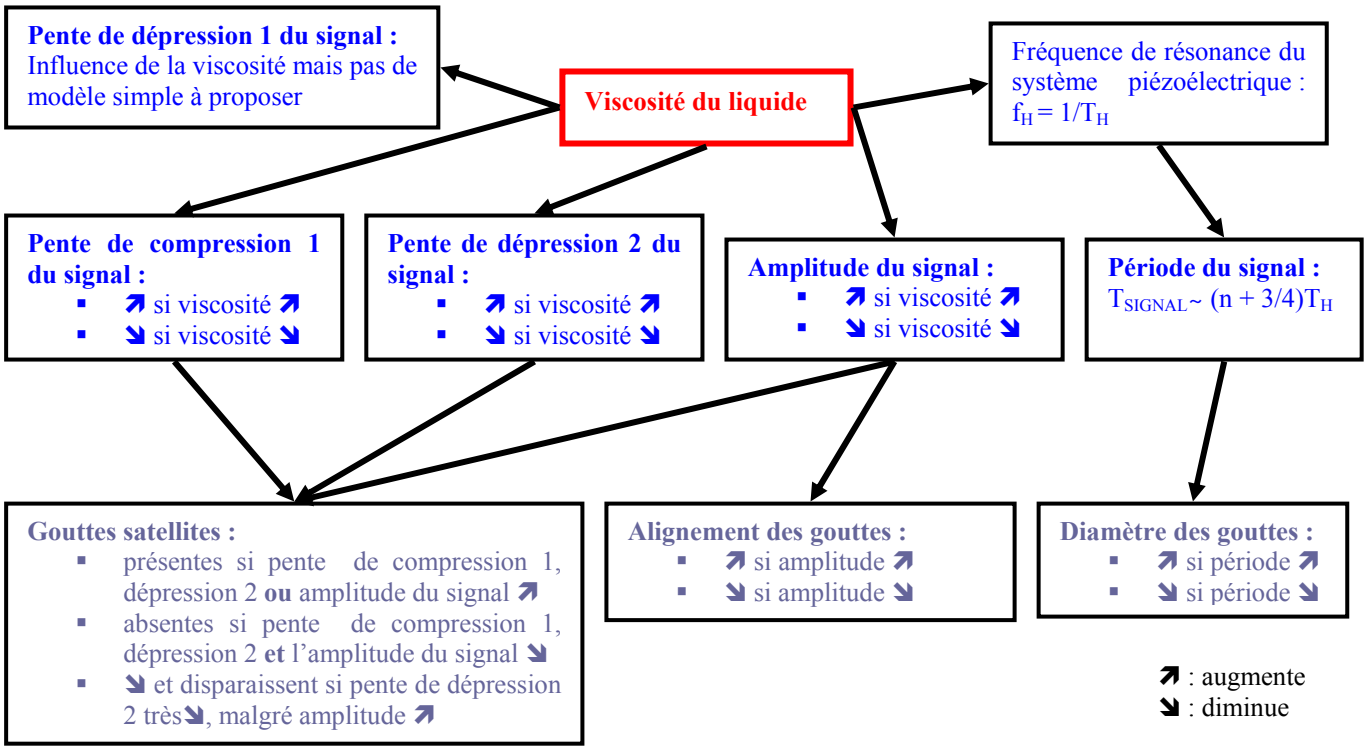


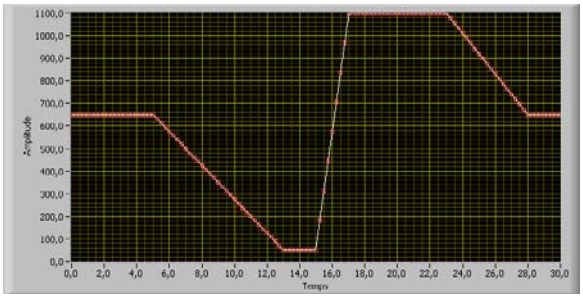
Figure II-24 : Résumé des interactions observées entre propriétés physicochimiques du liquide à projeter et paramètres de cycle de projection.

II.3.3 PARAMETRAGES DES MOYENS DE PROJECTIONS POUR DIFFERENTS SOLVANTS

Nous allons appliquer ce qui précède aux paramétrages des moyens de projection pour les produits suivants : encre d'imprimante, DMSO, DMF et acétonitrile. Les observations faites sur l'encre ont été effectuées à l'aide d'un microscope avec des mesures très précises en temps différé. Par contre pour les autres produits, qui ne laissent que peu ou pas de trace sur le verre, les résultats statistiques concernant l'alignement des gouttes sont obtenus par traitement d'image. Les substrats sont des lames de microscope.

1. Paramètres de projection de l'encre

On observe au microscope une ligne de projection de 48 gouttes issues en un seul tir d'une seule ligne de buses : le signal de commande a une période de 60 µs. Son allure et les caractéristiques de ses pentes sont données dans le tableau suivant :



Etape de cycle	Temps	Pente
TR	14 µs	0V/µs
TD1	16 µs	- 1,4V/µs
TM1	4 µs	0V/µs
TC1	4 µs	+10V/µs
TM2	12 µs	0V/µs
TD2	4 µs	- 1,7V/µs

Tableau II-6 : Paramètres du signal de commande pour la projection d'encre.

Le diamètre moyen des 48 gouttes obtenues est de 50,8 +/- 4 ,2 µm et la distance moyenne inter gouttes centre à centre est de 210,2 +/- 10 ,5 µm (Figure II-25).

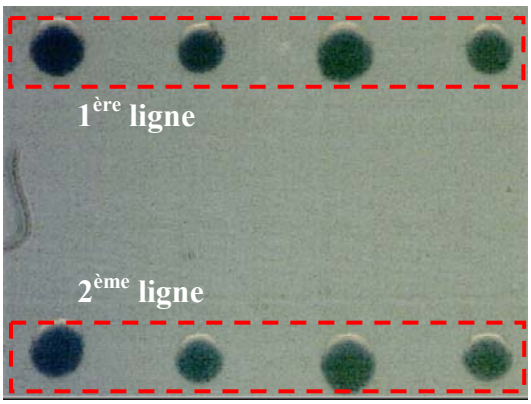
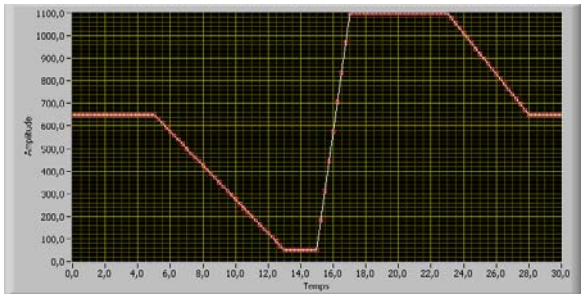


Figure II-25 : Projection sur verre de 2 lignes d'encre (toutes les buses d'une ligne projettent simultanément).

2. Paramètres de projection de DMSO

Les propriétés physicochimiques du DMSO sont très favorables aux projections. En particulier, ce produit est peu volatile. Les paramètres du signal de commande que nous avons utilisé sont les mêmes que pour l'encre et sont données dans le tableau suivant :



Etape de cycle	Temps	Pente
TR	14 µs	0V/µs
TD1	16 µs	- 1,4V/µs
TM1	4 µs	0V/µs
TC1	4 µs	+ 10V/µs
TM2	12 µs	0V/µs
TD2	4 µs	- 1,7V/µs

Tableau II-7 : Paramètres du signal de commande pour la projection de DMSO.

La Figure II-26 montre des colonnes de 14 gouttes vus par en dessous. Chaque colonne est projetée en seul tir et nous déplaçons latéralement la tête piézoélectrique à chaque tir. On obtient des gouttes de 50 µm. L'alignement est maximal pour ce signal de commande (y compris avec des défauts répétables). Une amplitude plus basse ne réduit plus suffisamment le diamètre des gouttes pour compenser la perte d'alignement qui est alors occasionnée. Les paramètres de projection trouvés constituent donc un bon réglage pour ce solvant.

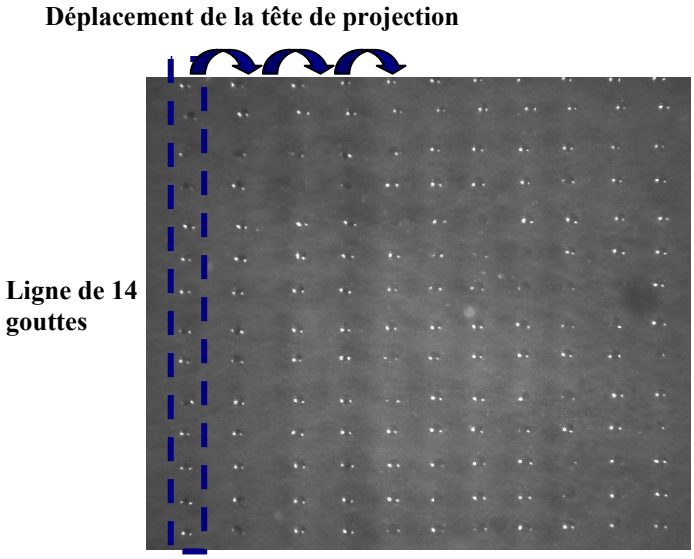


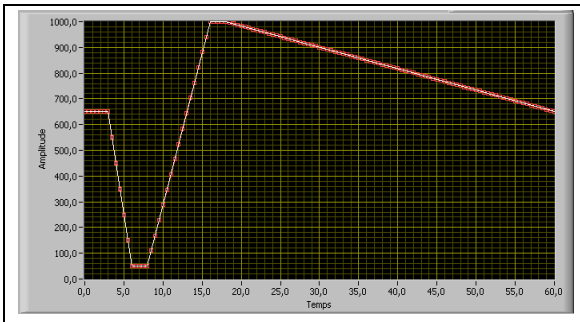
Figure II-26 : Projection sur verre de14 gouttes de DMSO simultanément sur chaque ligne verticale avec déplacement latéral de la tête de projection.

3. Paramètres de projection de DMF

A l'échelle du picolitre, l'une des difficultés est le caractère volatile du DMF. Néanmoins, les gouttes subsistent suffisamment longtemps (quelques secondes) pour effectuer les prises caméra. Les caractéristiques retenues du signal de commande sont réunies dans le Tableau II-8.

La viscosité du DMF étant faible, l'amplitude totale du signal de commande est aussi plus faible que pour l'encre ou le DMSO. Les pentes de compression 1 et de dépression 2 sont beaucoup plus faibles que pour la projection d'encre (respectivement 2 fois et 5 fois moins importantes). En effet, les faibles viscosité et tension de surface du DMF nécessitent de ne pas commander le piézoélectrique de manière violente afin d'éviter la formation de gouttes satellites. Pour conserver les avantages d'une forte amplitude de signal (amélioration de l'alignement des gouttes) et pour contrer son effet parasite (création de gouttes satellites), la

pente de décompression 2 est choisie très lente. Ainsi le DMF sort de la buse avec une grande amplitude mais la dernière dépression, très lente, crée des forces de cisaillement faibles.



Etape de cycle	Temps	Pente
TR	3 µs	0V/µs
TD1	3 µs	- 5,6V/µs
TM1	2 µs	0V/µs
TC1	8 µs	+ 3,5V/µs
TM2	2 µs	0V/µs
TD2	42 µs	- 0,3V/µs

Tableau II-8 : Paramètres du signal de commande pour la projection de DMF.

Nous montrons deux exemples de figure de projections de DMF obtenues avec ces paramètres :

- Figure II-27 : colonnes de 15 gouttes sur verre issues en un seul tir d'une seule ligne de buses, avec 200 µm de déplacement latéral de la tête de projection entre chaque projection. Le signal de commande a permis de réaliser des figures de projections sans aucune goutte satellite avec un diamètre de goutte moyen de 35 µm : nous sommes donc proches des performances obtenues avec l'encre projetée sur du papier.

- Figure II-28 : colonnes de projection de 29 gouttes sur verre issues d'une seule ligne de buses avec 5 projections par goutte. La tête de projection est déplacée latéralement de 200 µm après projection de chaque colonne. La superposition des gouttes est remarquable.

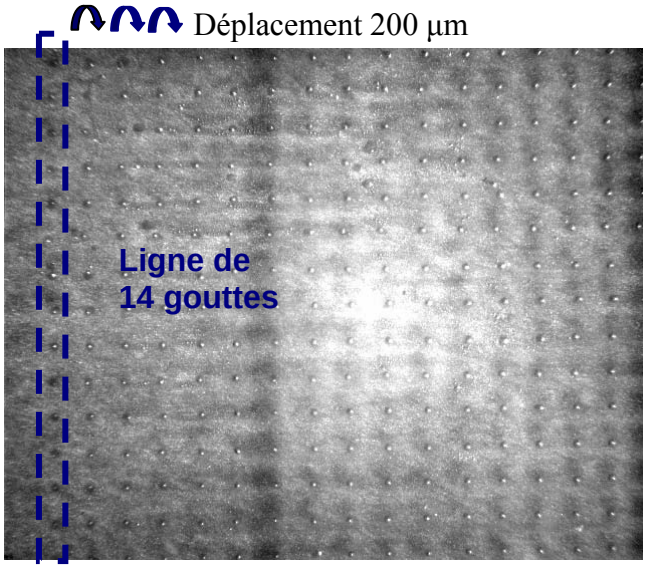


Figure II-27 : Projections uniques de 15 buses en déplaçant latéralement la tête de projection (zoom x 2,25, diamètre gouttes : 35 µm)

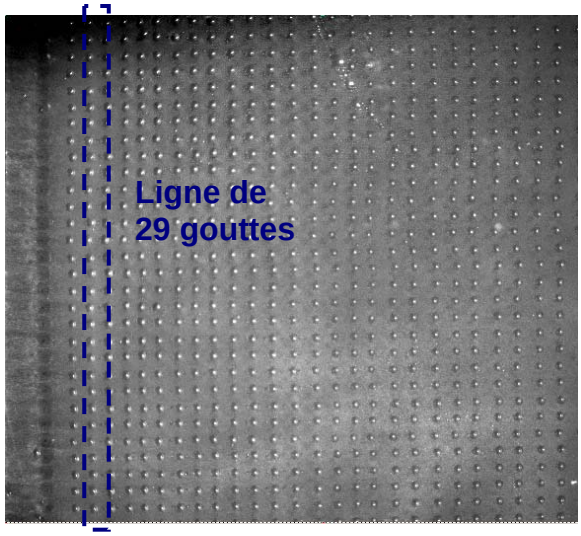


Figure II-28 : Cinq projections superposées de 29 buses en déplaçant latéralement la tête de projection (diamètre gouttes : 90 µm)

La Figure II-29 suivante montre la position du centre des gouttes calculé à partir de la Figure II-27 pour 5 séries de projection (les gouttes initialement projetées en colonne sont représentées horizontalement sur ce graphique). En prenant comme référence la position centrale d'une ligne et en faisant une étude statistique sur les 5 lignes, la Figure II-30 montre que le décalage moyen des gouttes est au maximum de 20 µm avec un écart type au maximum de 10 µm.

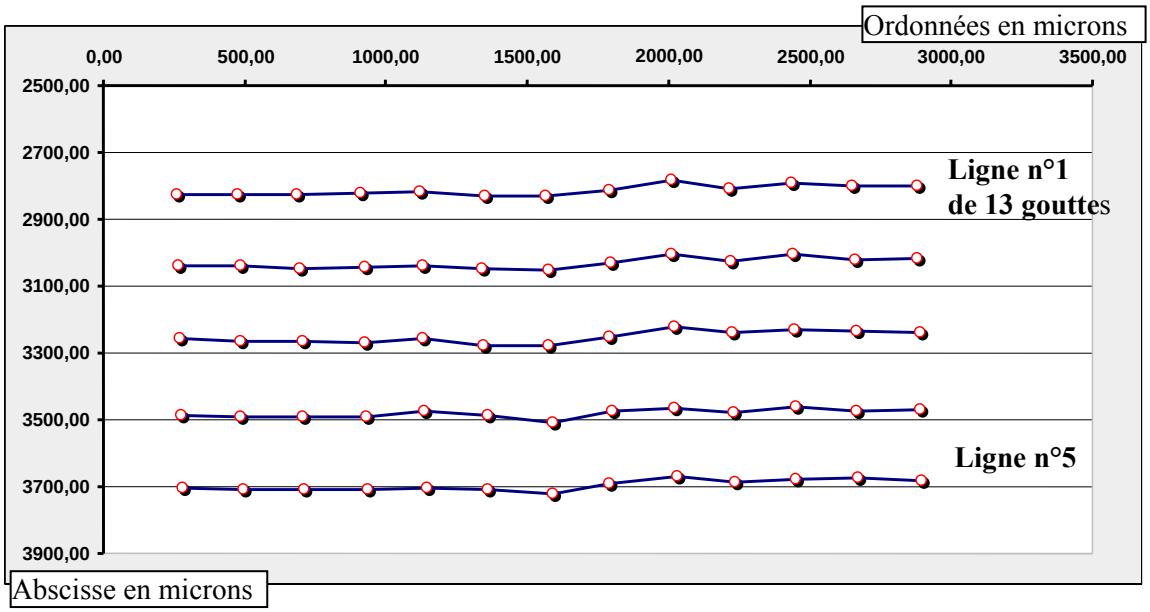


Figure II-29 : Détection de la position des centres de 13 projections pour 5 séries de projection.

Si l'on tient compte maintenant du diamètre des gouttes (qui rappelons le dépend de la surface du substrat), on peut estimer que des micropuits de diamètre 90-100 µm avec un écart centre à centre de l'ordre de 200 µm permettront de collecter de manière satisfaisante les projections de DMF en palliant toutes les irrégularités de projection. Etant donné la répétabilité observée au niveau des projections de chaque base, une optimisation poussée du procédé devrait permettre d'améliorer sensiblement ces résultats.

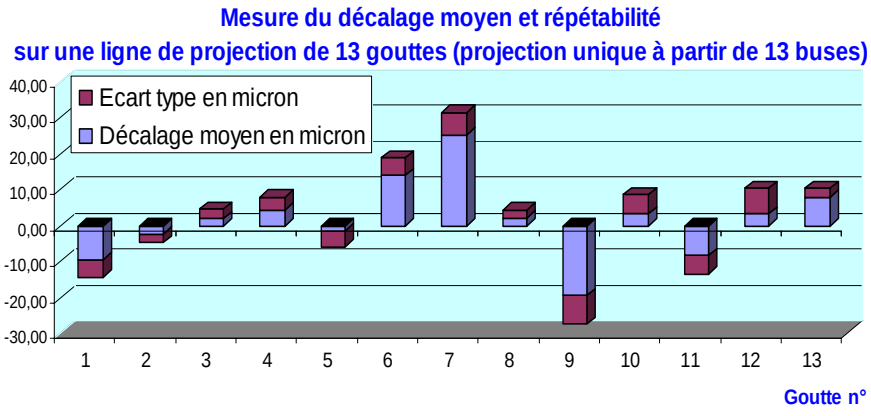


Figure II-30 : Décalage moyen et répétabilité d'une ligne de projection de 13 gouttes (projection unique à partir de 13 buses).

4. Projection de l'acétonitrile

La grande difficulté dans la manipulation de l'acétonitrile est due au fait que lorsqu'il est projeté à l'air libre à l'échelle du picolitre, il passe immédiatement en phase gazeuse. Avec la caméra, lors des premiers tests de projections nous ne distinguions qu'un léger brouillard au niveau des buses, mais aucune goutte déposée sur la lame de microscope.

Pour résoudre ce problème, nous avons donc confectionné une chambre de saturation "artisanale" en fermant le volume de travail avec un sac plastique résistant à l'acétonitrile. Une cuve placée à l'intérieur de la chambre est remplie de quelques millilitres d'acétonitrile ce qui permet d'établir un premier niveau de saturation (saturation globale). Cette chambre de saturation est beaucoup moins perfectionnée que celle du synthétiseur de puces basse densité, mais elle est simple à mettre en place. Le volume interne de la chambre est faible et il épouse la forme du banc : le plastique recouvre uniquement l'extrémité du zoom Navitar et le système porte lame/ lame de verre. La tête piézoélectrique se positionne au dessus de la lame en passant par un orifice découpé dans le plastique. Les différentes liaisons de la chambre de saturation avec l'extérieur (caméra et tête de projection) sont recouvertes de parafilm pour conserver la saturation. Les mouvements des axes motorisés ont donc un débattement limité.

Pour créer une saturation localisée entre la tête de projection et la lame, une goutte de quelques microlitres est déposée par projection au centre de la lame. La saturation globale (cuve remplie d'acétonitrile) permet de maintenir la saturation locale (goutte de quelques microlitres au niveau du support en verre) et les projections de picogouttelettes deviennent alors visibles durant plusieurs secondes (Figure II-31).

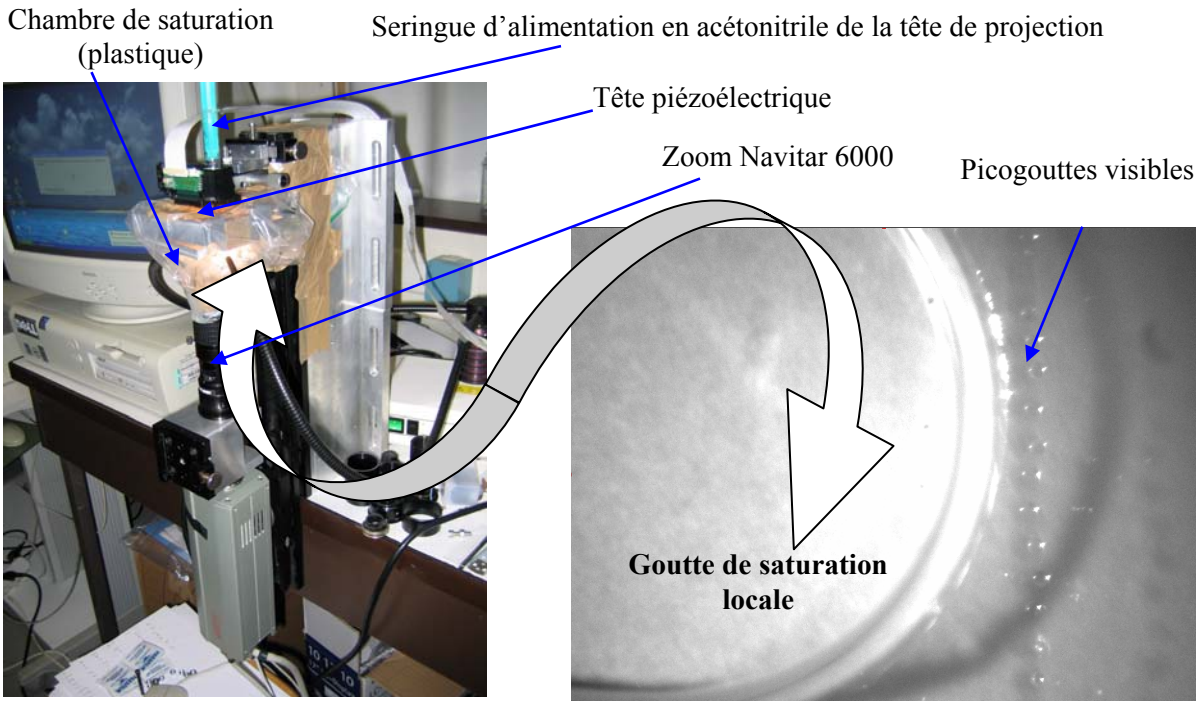
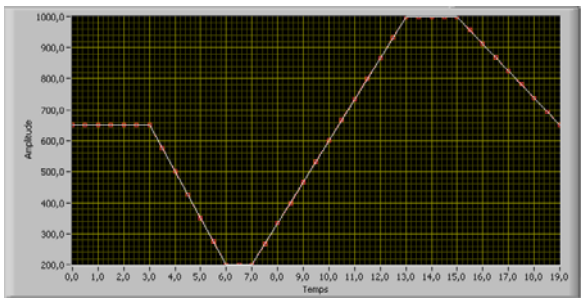


Figure II-31 : Chambre de saturation pour les projections d'acétonitrile.

A gauche : chambre de saturation intégrée au banc de picoprojection.
A droite : visualisation de projections d'acétonitrile de l'ordre de quelques picolitres

Les paramètres du signal de projection utilisé pour projeter l'acétonitrile sont résumés au Tableau II-9 : les amplitudes et les pentes sont globalement plus faibles que pour l'encre.



Etape de cycle	Temps	Pente
TR	3 µs	0V/µs
TD1	3 µs	- 5,0V/µs
TM1	1 µs	0V/µs
TC1	6 µs	+ 4,4V/µs
TM2	2 µs	0V/µs
TD2	4 µs	- 2,91V/µs

Tableau II-9 : Paramètres du signal de commande pour la projection de l'acétonitrile.

Un signal de même amplitude que celui utilisé pour l'encre ne convient pas à la projection d'acétonitrile à cause des gouttes satellites (Figure II-32 gauche). En appliquant un signal de commande d'amplitude plus modéré, les gouttes satellites disparaissent (Figure II-32 droite). L'acétonitrile se démarque donc du DMSO ou de l'encre.

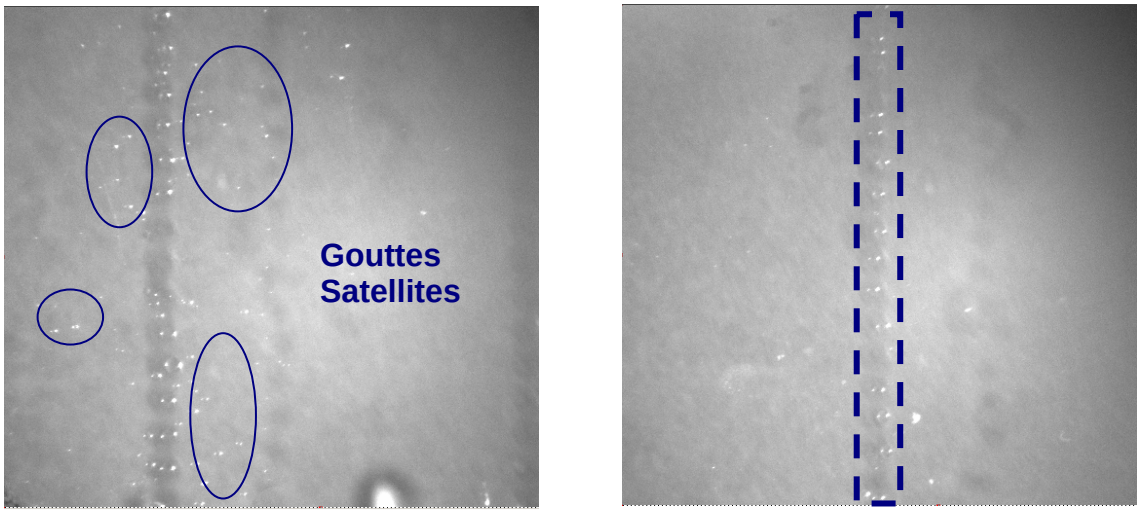


Figure II-32 : Projection d'une ligne de gouttes d'acétonitrile.

A gauche : Signal de commande de 17 µs, Amplitude : 37 V, Pente de compression : TC_1=8,75V/ µs. A droite : Signal de commande de 19 µs, Amplitude : 24 V, Pente de compression : TC_1=4V/ µs

5. Conclusion

Les différents essais présentés avec le DMF et l'acétonitrile confirment que le système de projection piézoélectrique peut être adapté à la projection des solvants intervenant dans la synthèse in situ de puces à oligopeptides et oligonucléotides à haute densité. L'étape suivante de notre travail consistera à procéder à des réactions chimiques à cette échelle.

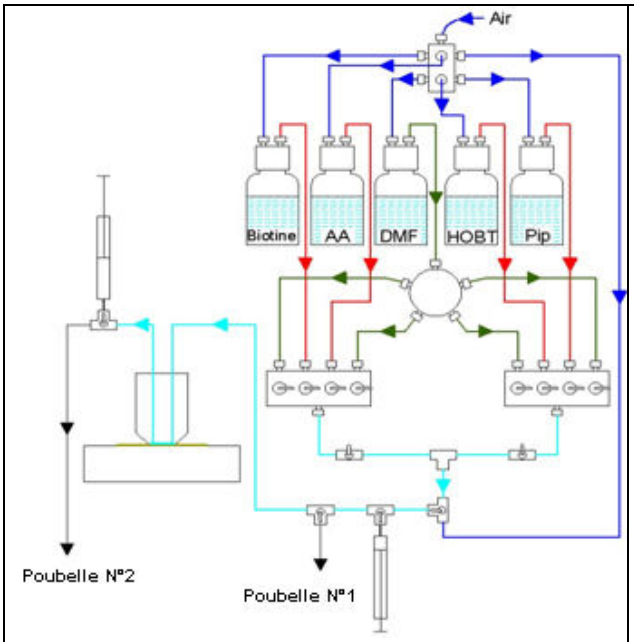
II.4 FAISABILITE DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE MACROSCOPIQUE IN SITU SUR SUPPORT SOLIDE

Avant d'étudier la faisabilité d'une synthèse peptidique par picoprojection, l'objectif de cette partie est de valider la fonctionnalisation des substrats ainsi que le protocole de synthèse chimique des sondes et de lecture à l'échelle macroscopique. Les apports de réactifs seront effectués non pas projection mais par fluidique.

II.4.1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL MANUEL

Nous avons développé un synthétiseur manuel d'oligopeptides sur lame de verre avec des plots de puces macroscopique (Figure II-33). Le principe est le suivant : une chambre en PTFE de diamètre 1 cm et de hauteur de 2 mm est pressée sur la surface de la lame de façon à obtenir une étanchéité fluidique par serrage. Cette chambre dispose d'une sortie fluidique et d'une entrée alimentée par un distributeur, qui permet de sélectionner un fluide réactif parmi 6 réservoirs sous pression positif d'azote. Le fluide est mis en mouvement par la pression

d'azote dès l'ouverture d'une vanne manuelle ; une première seringue permet de prélever la quantité de fluide nécessaire pour remplir la chambre et de procéder à une agitation avec un mouvement de va-et-vient avec une deuxième seringue. Après synthèse d'un plot, la synthèse du peptide est effectuée en faisant passer tous les réactifs de la Figure I-6 droite, il est possible de disposer la chambre sur une autre partie de substrat pour former jusqu'à trois 3 plots macroscopiques par lame.



Le système est composé de :
- un connecteur 1 entrée et 8 sorties ;
- 5 bouteilles contenant les réactifs : biotine, acide aminé (AA), solvant DMF, activateur HOBt, et pipéridine Pip ;
- 2 vannes avec 4 entrées et une sortie ;
- 2 vannes une entrée/sortie ;
- 4 vannes à bascule ;
- 2 seringues qui servent à doser et à mélanger les réactifs ;
- une chambre en téflon qui est plaquée sur la lame pour constituer une microchambre.

Figure II-33 : Synthétiseur manuel d'oligopeptides.

II.4.2 TESTS DE GREFFAGE D'UNE BIOTINE SUR SUPPORT PLAN

Les substrats (lames de microscope) ont été fonctionnalisés par la société Rosatech avec une chaine polyéthylèneglycol (PEG) portant une fonction amine (Figure II-34) suivant le protocole défini en [133]. Pour simuler le premier rang d'une synthèse peptidique, une biotine 0SU (N-Biotinyloxysuccinimide : Figure II-35) est activée avec de l'HOBt (1-hydroxybenzotriazole : Figure II-35) de façon à procéder à l'addition de la biotine sur la fonction amine du support conformément à la Figure II-36.

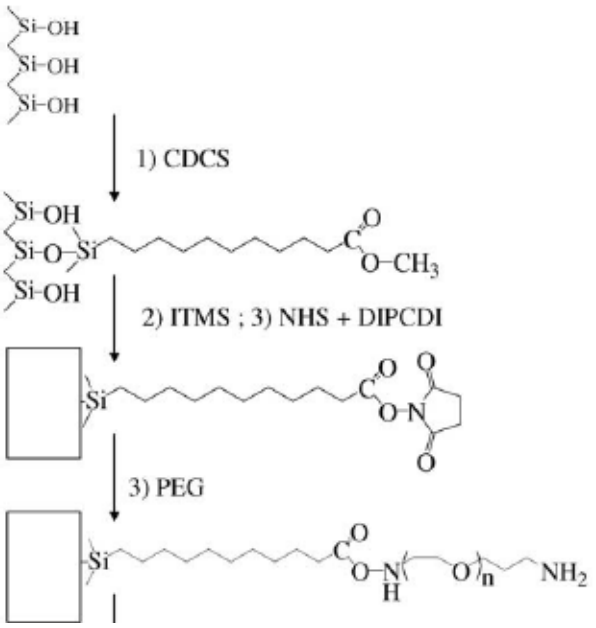


Figure II-34 : Fonctionnalisation du substrat avec n≈20 d'après [133].

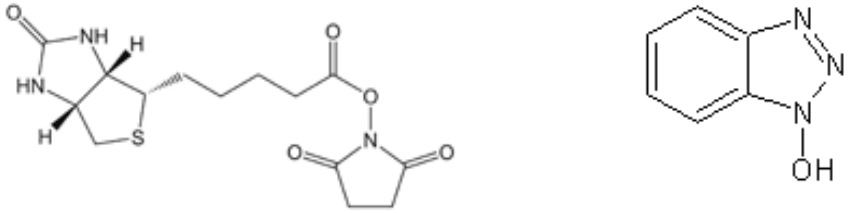


Figure II-35 : Biotine 0SU (gauche) et HOBt (droite).

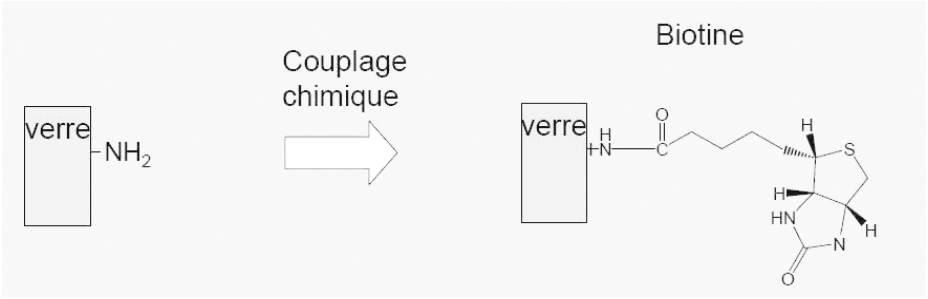


Figure II-36 : Formation d'une liaison peptidique entre la biotine et la fonction amine du support.

Puis la puce est mise en incubation avec de la streptavidine marquée avec une cyanine fluorescente CY3. Avec un scanner de fluorescence, la détection de la fluorescence du CY3 sur les plots macroscopiques de la puce permet d'évaluer si la liaison entre la biotine et la fonction amine a bien été constituée car la reconnaissance biotine/streptavidine est très spécifique. Toutefois pour réduire l'adsorption non spécifique de la streptavidine, l'on procède au lavage de la puce.

Pour résumer, le protocole de synthèse est le suivant :

- Etape 1 : nettoyage du circuit d'entrée et des seringues en faisant circuler du DMF vers la poubelle n°1 ; le liquide est vidé du circuit en le remplaçant avec du gaz ;
- Etape 2 : Insertion de la lame et prélèvement de la biotine avec la première seringue (2 x 0.5 ml) avec envoi vers la poubelle 1. Puis on prélève 0.4 ml de Biotine pour l'envoyer vers la lame. Ensuite on prélève 0,4 ml d'activateur pour l'envoyer vers la lame. On procède au mélange rapide des réactifs sur la puce en faisant un mouvement de va-et-vient avec les seringues.
- Etape 3 : couplage pendant environ deux heures en effectuant un mélange des réactifs toutes les 15 minutes à l'aide des deux seringues.
- Etape 4 : lavage du circuit d'entrée avec du DMF et envoi vers la poubelle n°1 (2 x 1 ml) puis sur la lame et la poubelle n°2 (2 x 1 ml).
- Etape 5 : enlèvement de la lame puis lavage de la lame au méthanol, dichlorométane et éthanol avec une pipette.
- Etape 6 : mise en reconnaissance pendant une nuit : avec la streptavidine marquée CY3.
- Etape 7 : lavage de la lame au SDS (1h) et Triton (5 minutes et 1h 80°C).
- Etape 8 : lecture au un scanner de fluorescence

Nous avons ainsi greffé 3 plots différents sur la même lame :

- un plot où nous n'avons envoyé que du solvant,
- un plot de biotine non activée
- un plot de biotine activée(Biot+HOBt.)

Comme prévu le signal de fluorescence (Figure II-37) est nul dans le plot sur lequel il n'y a eu que du solvant. Cela valide le protocole de lavage de la puce. La streptavidine CY3 absorbée sur cette partie du substrat a été enlevée. Le signal de fluorescence est deux fois plus élevé pour le plot correspondant à la biotine activée que pour la biotine non activé, ce qui est logique de point de vue chimique. Ce résultat valide donc l'ensemble du protocole de fabrication sur le plan chimique à l'échelle macroscopique.

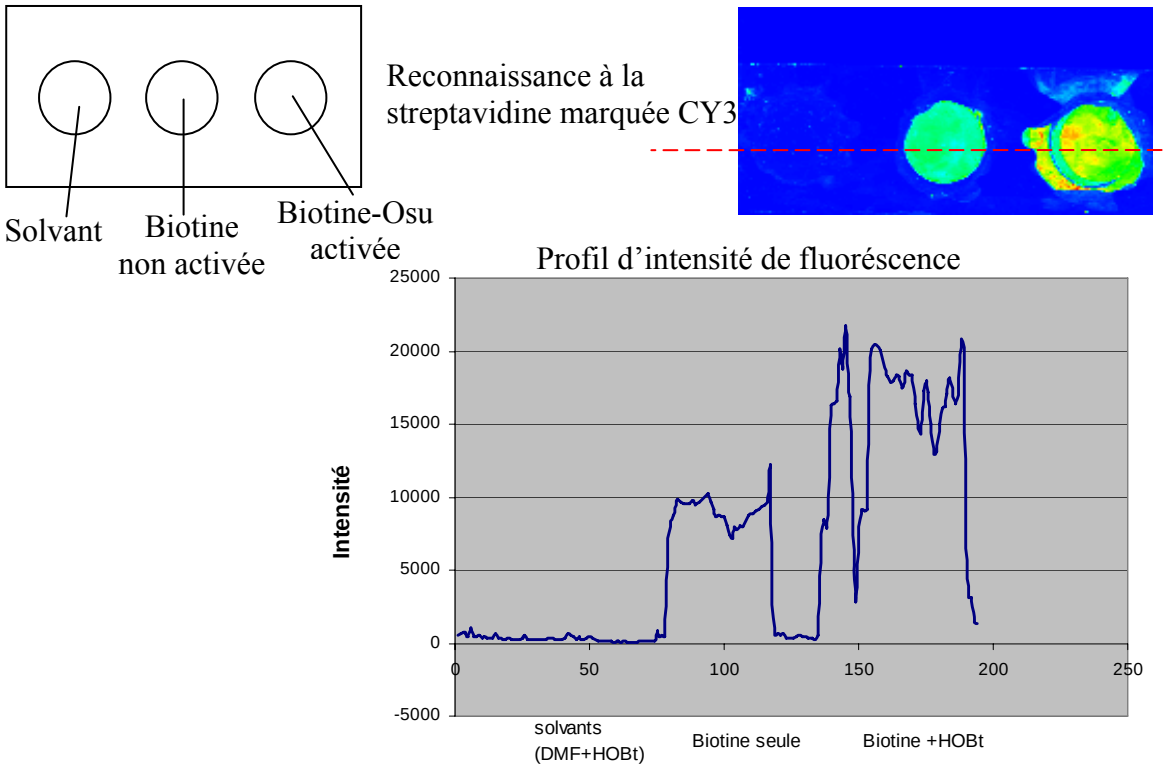


Figure II-37 : Plan de puce et signal de fluorescence après reconnaissance à la streptavidine-CY3.

Le synthétiseur manuel d'oligopeptides sur puce permet d'étudier les paramètres du protocole en fonction de la surface du plot, du volume de la chambre fluidique, de la quantité des produits, de la durée des différentes phases réactionnelles et du nombre de lavages. A titre d'exemple la Figure II-38 montre, dans le cadre du protocole précédent, l'influence de la durée du couplage sur le signal de fluorescence. Celui-ci passe par un maximum pour une durée de couplage de 60 minutes pour le plot de biotine Osu activée par HOBt. Etant donnée la durée très longue des synthèses, il est difficile de procéder à de nombreux essais, aussi avons nous automatisé le système.

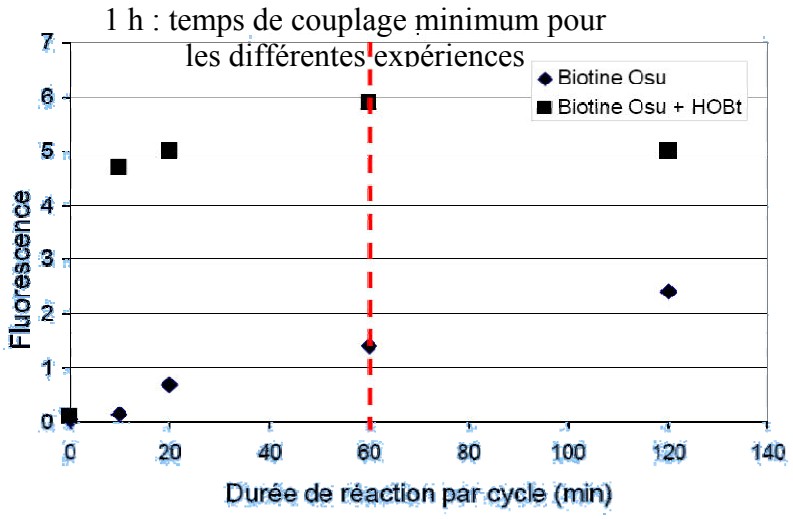


Figure II-38 : Influence de la durée de couplage sur la fluorescence de la puce de la Figure II-37.

II.4.3 SYNTHESE IN SITU MACROSCOPIQUE D'UN D'OLIGOPEPTIDE 6 MERES

La Figure II-39 montre le principe du synthétiseur de puces oligopeptidiques macroscopiques que nous avons mis en place. Il est basé sur :

- Un système de seringues actionnées par deux verins pneumatiques commandés électriquement ;
- Un ensemble de microélectrovannes en PTFE commandées electriquement, qui remplacent les vannes manuelles de Figure II-33;
- Un ensemble de réservoirs de réactifs identiques à celui de la Figure II-33;

L'ensemble est piloté par un automate programmable de sorte qu'il est possible de procéder à une synthèse macroscopique sur un plot de manière totalement automatique.

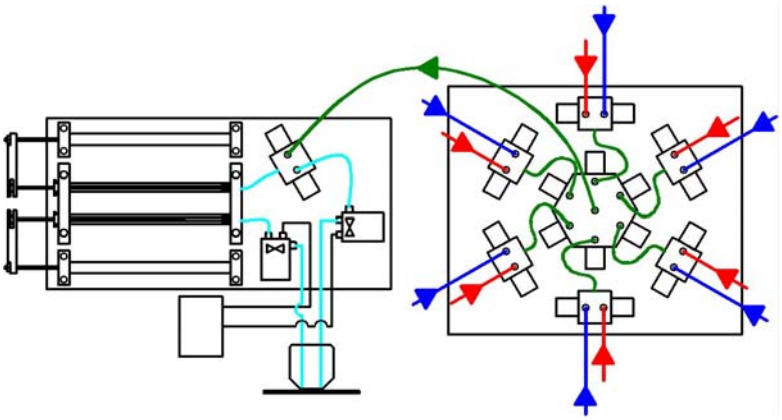


Figure II-39 : Synthétiseur automatique d'oligopeptides sur puce.

La Figure II-40 montre un exemple de synthèse in situ effectuée avec le dispositif : une sonde 6 mères synthétisées par la voie des Fmoc en terminant par l'addition in situ d'une biotine. Cette puce a été incubée avec de la streptavidine CY3 comme indiqué précédemment avec le même protocole de lecture. La Figure II-41, montre l'influence de la durée de couplage sur la fluorescence du plot. Avec une durée de couplage par 2 heures, la synthèse a duré 39 heures au total[1].

Ce synthétiseur automatique aurait certainement permis d'étudier les paramètres du protocole de synthèse in situ de Fmoc et de protocole de lavage. Malheureusement il nous manquait le modèle biologique nécessaire pour caractériser la synthèse (c'est-à-dire, une cible parfaitement spécifique à la sonde de la (Figure II-40). Ce modèle était en cours de développement au laboratoire mais sa validation n'a pas été terminée à temps pour cette thèse. Nous avons donc été obligés d'arrêter l'optimisation des protocoles à l'échelle macroscopique.

[1] Ce qui impliquera une saturation soignée du synthétiseur de puces hautes densité.

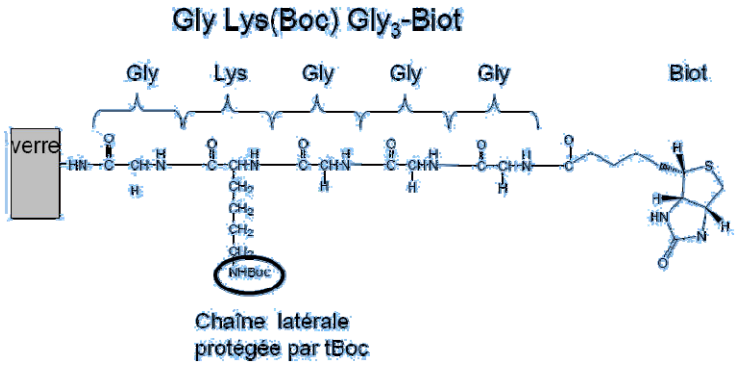


Figure II-40 : Synthèse in situ d'une sonde 6 mères synthétisées par la voie des Fmoc.

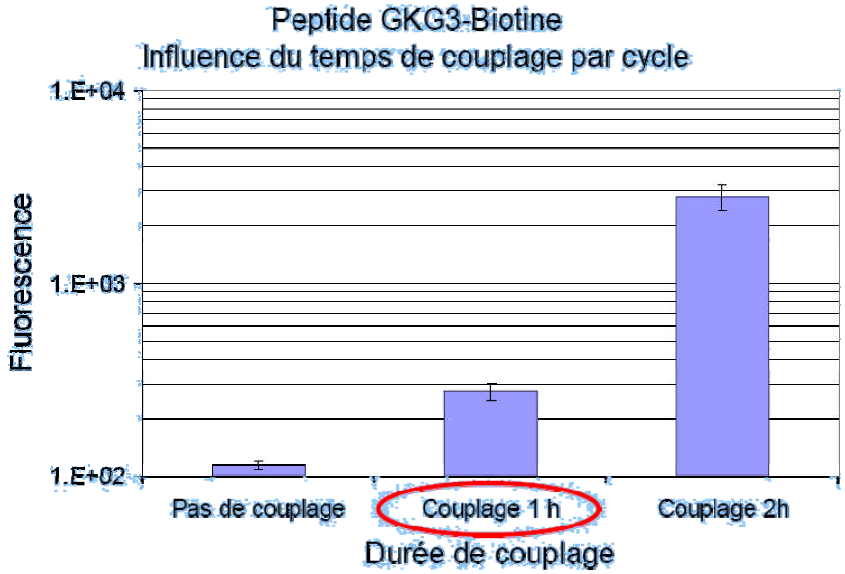


Figure II-41 : Influence du temps de couplage sur la fluorescence.

II.5 FAISABILITE DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE PAR PICROPROJECTION

Nous avons souhaité tout de même procéder à une réaction chimique localisée par picoprojection avec la réaction de la Figure II-36 (c.à.d. l'addition de la biotine-Osu).

II.5.1 BANC DE PICOPROJECTION AVEC MOTORISATION

Nous avons modifié le banc de Figure II-18 pour pouvoir déplacer et aligner la tête de projection par rapport au substrat de la puce tout en observant les projections (Figure II-42). Notre objectif était simplement de pouvoir adresser une partie du substrat pour démontrer la faisabilité des picoréactions sur puce, sur une petite surface, mais pas de constituer un synthétiseur in situ sur puce complet. Pour ce faire, la tête de projection piézoélectrique est incluse dans un fût porté par deux axes de translation XY motorisés avec des moteurs pas à pas d'une résolution de 5 µm. Ces deux axes permettent de constituer le réseau de la puce en déplaçant la tête de projection par rapport au substrat de la puce qui est immobile. La puce au

format lame de microscope est fixée sur un porte-lame doté d'une ouverture, sous lequel est disposé un miroir à 45°. L'ensemble (puce et miroir) peut être déplacé dans le sens vertical par un axe Z et orienté angulairement autour d'un axe vertical. Ces mouvements sont motorisés avec des moteurs pas à pas avec une résolution de 5 µm et 1°. Avant toute projection, ils permettent de procéder respectivement au réglage de la distance buse d'éjection/substrat (environ 1 mm) et à l'alignement du réseau des micropuits avec les lignes de buses de projection.

Une caméra CCD est disposée en regard du miroir pour observer les projections sur le substrat. L'ensemble du banc de picoprojection (avec les motorisations et l'électronique de commande de la section II.2.2 est piloté par ordinateur avec un logiciel sous LabView. Un sac en plastique transparent permet d'inclure "grossièrement" l'ensemble du banc dans un volume sous pression positive de gaz He anhydre avec un volume de saturation de solvant, qui permet de ralentir l'évaporation des gouttes.

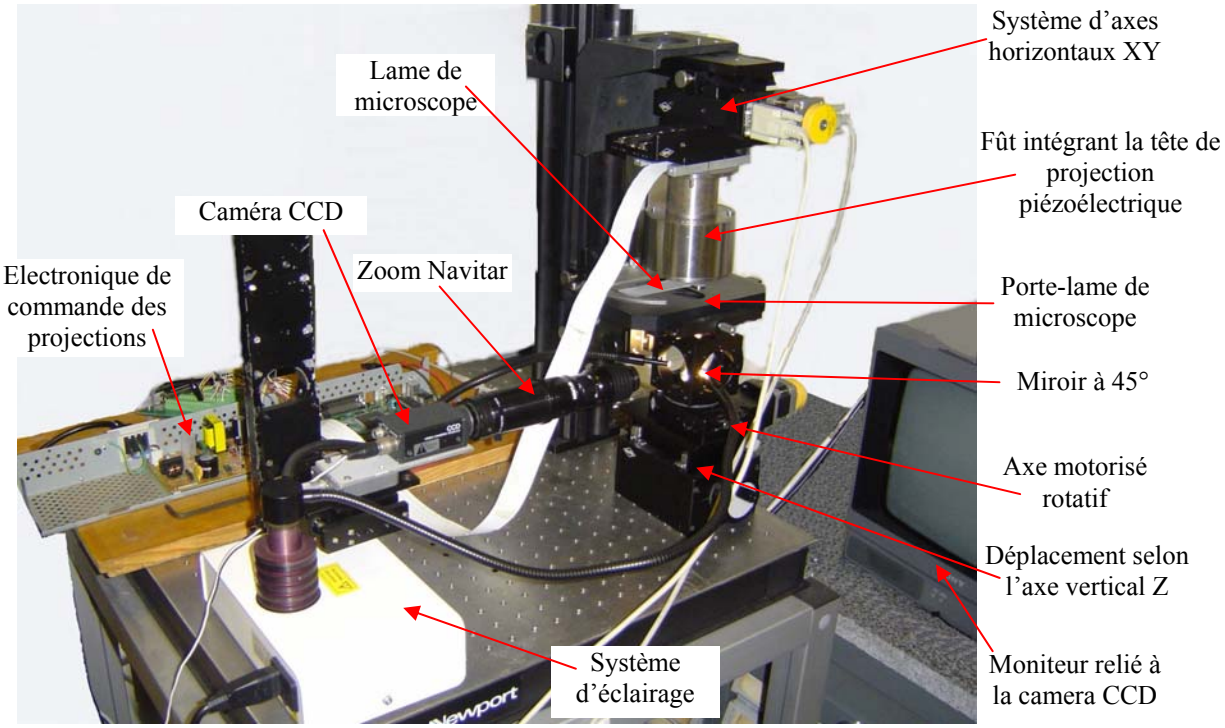


Figure II-42 : Banc de picoprojection sans l'enceinte de saturation.

II.5.2 GEOMETRIE DES MICROPUITS

Les micropuits ont été obtenus par gravure chimique du verre avec un procédé de gravure chimique par voie humide développé par le doctorant Benjamin Hannes [2]. Les lames de microscope comportent :

- un réseau de micropuits ;

- un macropuits central disposé entre ces deux parties ;
- un canal microfluidique faisant le tour de la lame.

Le macropuit et le canal permettent de contenir du solvant en quantité importante (plusieurs microlitres) et de créer une saturation locale sur toute la surface de la lame.

Nous avons testé des puits de forme rectangulaire de 320 x 160 µm² et de profondeur 20 µm (Figure II-43). L'espacement vertical entre deux puits a été fixé à 212 µm de façon à correspondre à l'écartement entre les buses d'une même colonne de projection. Chaque buse de projection aura donc un micropuits en regard après alignement en rotation du substrat.. L'espacement horizontal entre deux puits a été fixé à 360 µm. Le passage d'une colonne de micropuits à l'autre correspondra au déplacement de la tête de projection.

La largeur des puits est relativement grande par rapport aux études d'alignement de la section II.3.3 qui conduisait à une densité de 90 à 100 µm pour une ligne de gouttes mais il s'agit d'une première approche avec une marge de sécurité importante. Avec cette géométrie, une lame de test possèdent près de 10 000 micropuits sur une surface de 7,5 cm² c'est-à-dire 20 fois que les puces actuellement utilisés avec le Synthétiseur de puces basse densité.

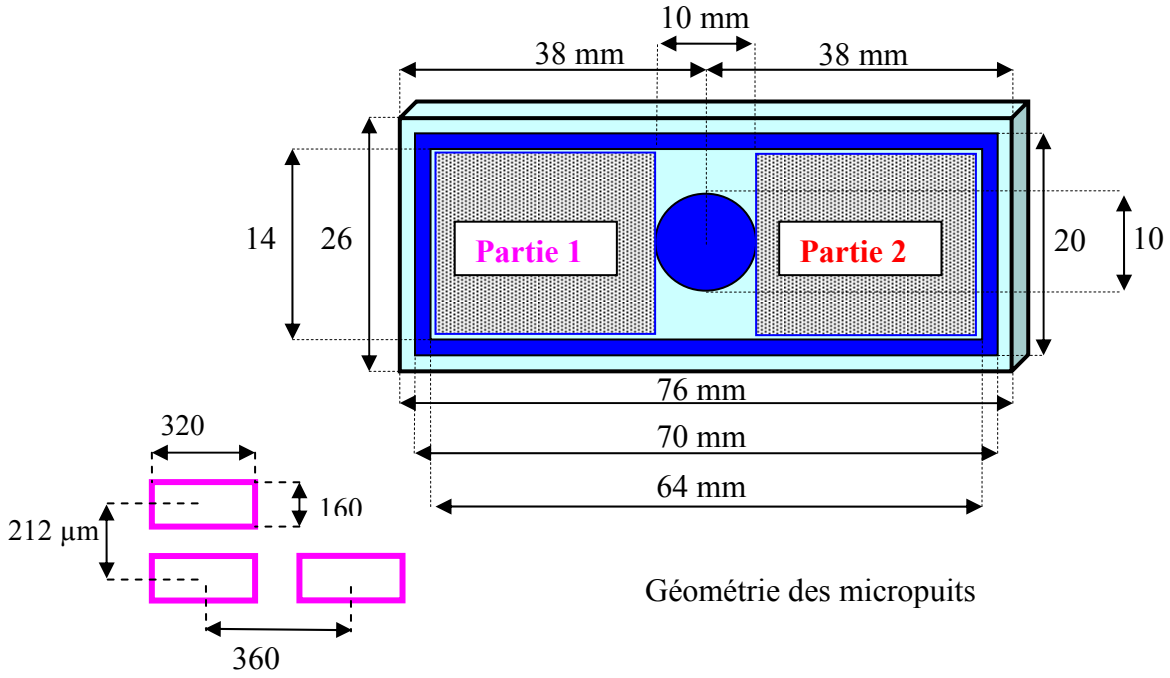


Figure II-43 : Plan d'ensemble de la lame de test et géométrie du réseau de micropuits avec une densité de ~1200 µpuits/cm².

La Figure II-44 montre une vue, obtenue avec le banc de picoprojection, d'une partie du réseau de micropuits rectangulaires vides avec le pas de 320 µm x 160 µm.

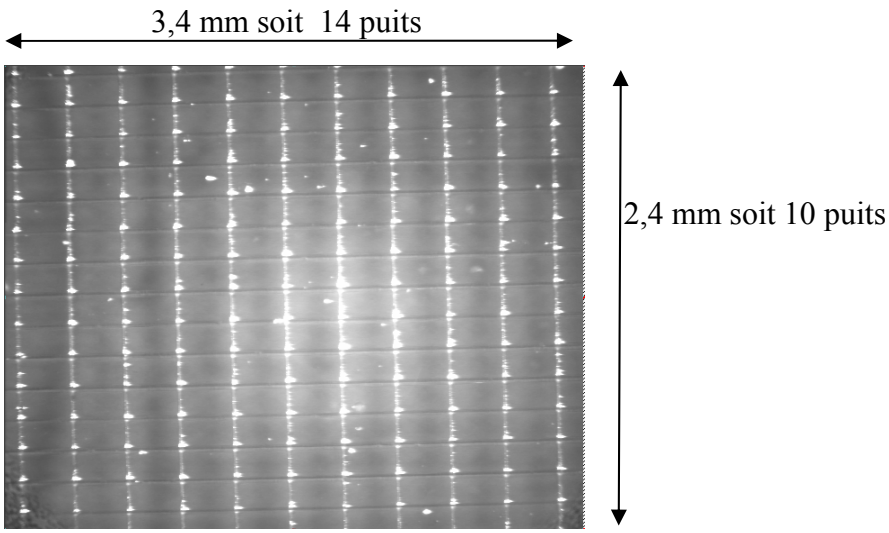


Figure II-44 : Image de puits rectangulaires vides (zoom Navitar x 2,2).

II.5.3 TEST DE PROJECTIONS DANS LES MICROPUITS

Après gravure par voie humide, la surface du verre étant hydrophile, les projections de DMF s'étalent au fond des micropuits. La Figure II-45 gauche, montre une vue prise d'une seule projection de DMF avec la caméra du banc. Cet effet d'étalement favorable au cours d'une synthèse chimique rend l'observation très difficile au cours des réglages. Nous avons donc rendu cette lame hydrophobe par chauffage à 100 °C durant deux heures : des zones hydrophobes apparaissent alors et les projections ne s'étalent plus après le contact. Il est alors possible d'enregistrer des images qui nous informent sur la précision des tirs. La Figure II-45 droite, montre le remplissage des micropuits après 15 projections de DMF : les gouttes grossissent mais ne s'étalent pas et la régularité des positions montrent la précision des tirs et la précision des mouvements des axes. Le diamètre des 15 gouttes cumulées correspond à 90 µm. Le volume interne des micropuits est suffisant pour contenir ces projections.

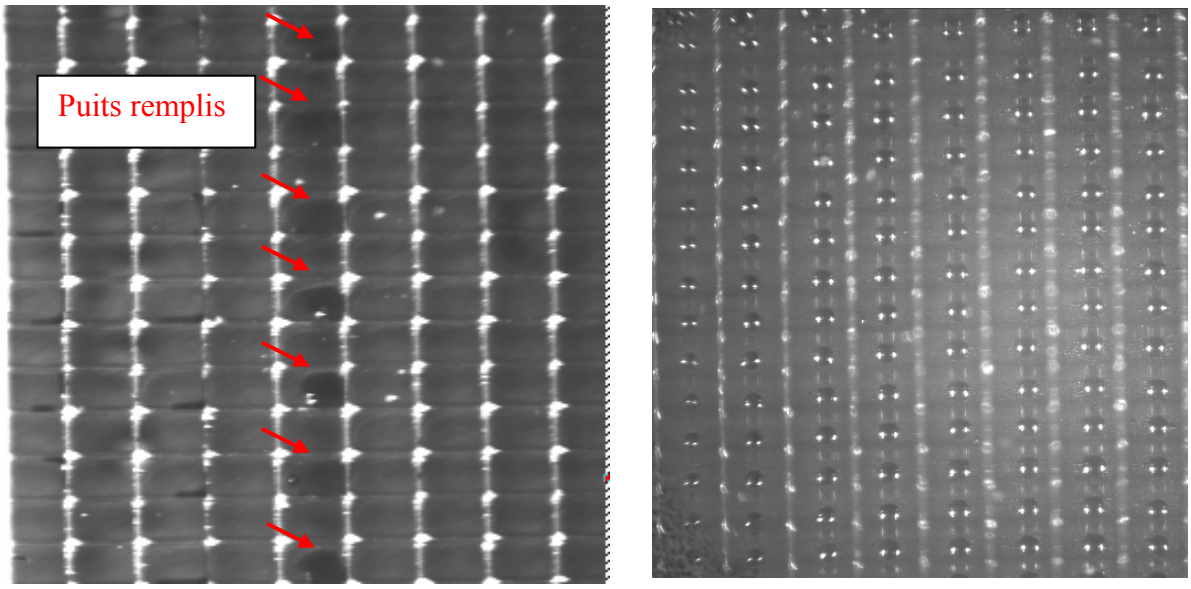


Figure II-45 : Projection de DMF dans les micropuits d'une lame de microscope.

A gauche : image d'une colonne de micropuits remplis avec une seule projection (substrat hydrophile).
A droite : réseau de micropuits avec 15 projections successives de DMF (substrat hydrophobe).

II.5.4 PROTOCOLE DE FABRICATION

Le substrat est constitué du même réseau de micropuits que précédemment (pas de 320 x 160 µm) mais avec des micropuits circulaires de 100 µm pour favoriser l'étalement des projections. Après la gravure chimique des micropuits, le substrat avec les micropuits a été fonctionnalisé sur toute sa surface par la société Rosatech comme décrit en section II.4.2.

Le plan de puce (Figure II-46) montre la composition des sondes prévue pour chaque plot. Il est constitué d'une matrice 17 x 18 avec des lignes de composition identique mais différente d'une colonne à l'autre. Sur une même ligne, il est possible ainsi d'évaluer la répétabilité de la synthèse. Ligne par ligne, le code de synthèse correspond à :

- BNA : biotine non activée
- RAS : pas de projection ;
- BA : biotine activée ;
- BA$^-$: biotine activée mais avec un renouvellement des réactifs moindres que pour BA ;
- DMF : projection de solvant DMF uniquement.

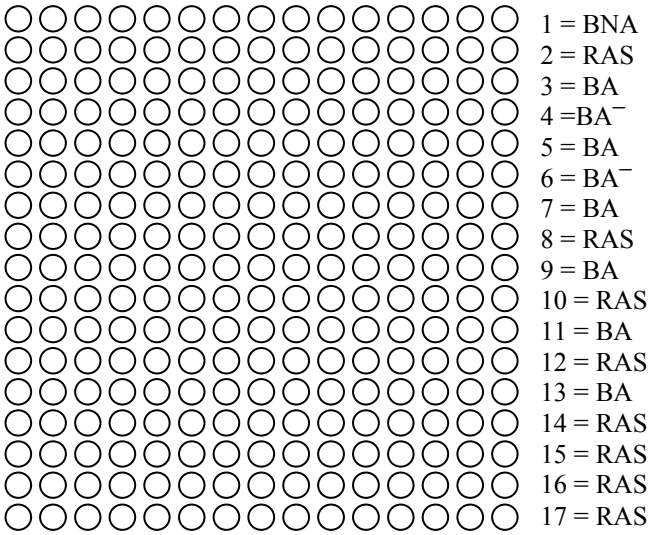


Figure II-46 : Plan de puce.

Les micropuits sont remplis en 15 secondes par une série de projections de 15 gouttes. Cette opération est répétée toutes les 15 minutes pendant 2 heures, ce qui correspond au temps de couplage de la synthèse des Fmoc. Cette répétition permet de compenser la saturation imparfaite du banc de picoprojection et d'assurer le renouvellement des réactifs à la surface des micropuits. Après la synthèse, la puce est mise contact pendant une nuit avec de la streptavidine marquée avec le fluorophore CY3. Suivant le protocole suivie en section II.4.2. Puis sa fluorescence est détectée avec un scanner de fluorescence. La Figure II-47 montre une vue de la fluorescence de la puce. On reconnaît la structure du plan de puce ligne par ligne.

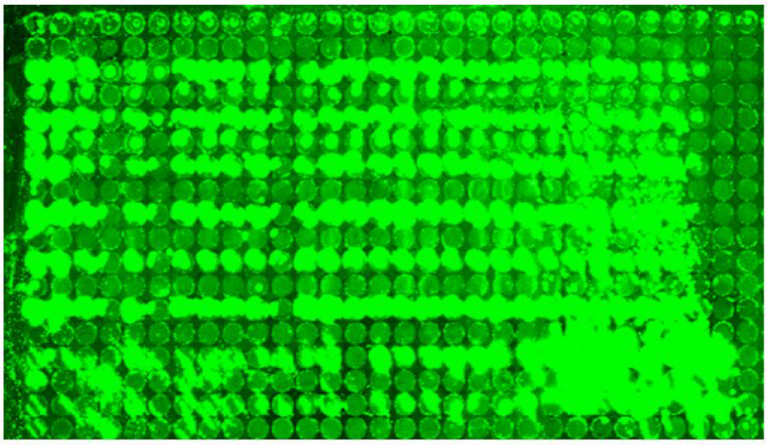


Figure II-47 : Image de fluorescence de la puce après mise en présence avec de la streptavidine CY3.

Le résultat expérimental correspond donc bien à ce qui était attendu comme le montre la Figure II-48 : la réponse attendue se superpose avec l'image de fluorescence aux défauts près discutés ci-dessous.

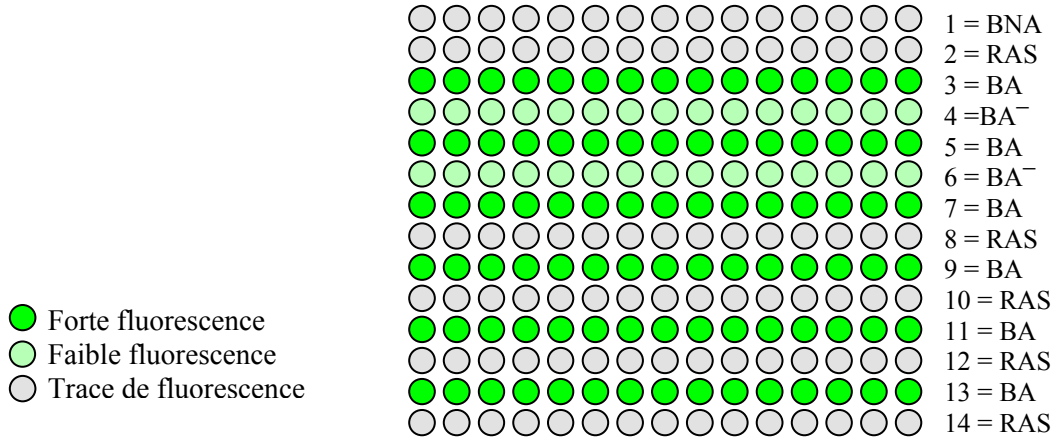


Figure II-48 : Superposition du plan de puce et de l'image de fluorescence.

Les lignes vides sont bien délimitées et n'ont pas réagi, sauf le coin inférieur droit de la puce. Nous attribuerons cela à un défaut de lavage de la puce, qui n'a pas permis d'enlever toute la streptavidine fluorescente sur cette partie.

Comme attendu, la ligne de BNA n'a pas ou très peu réagi.

Les lignes de BA ressortent bien du bruit de fond et sont très visibles (toutes les buses n'ont pas été activées pour projeter).

Les 2 lignes L4 et L6 de BA^- correspondent à un remplissage initial des puits non réitéré durant les 2 h de synthèse : la fluorescence est nettement plus faible que celle des lignes de BA, qui elles ont été, constamment remplies pendant toute la durée du couplage.

Les deux lignes ne contenant que du DMF sont fluorescentes mais avec une faible intensité comme le montre le profil d'intensité de la Figure II-49. Il s'agit donc du même défaut de lavage du bas de la puce qu'avec les lignes RAS.

Cette analyse est confirmée par les valeurs numériques. Globalement le signal de florescence de BA correspond en moyenne à 5000 u.a. tandis que les signaux de florescence de BNA et du DMF correspondent en moyenne respectivement à 1000 u.a. et 1700 u.a. Compte tenu du bruit de fond de la puce, le rapport des signaux $RSB_{BA/BNA}$ et $RSB_{BA/DMF}$ sont respectivement de 5 et de 2,95. **La faisabilité de cette picoréaction a donc été démontrée d'un point expérimental**.

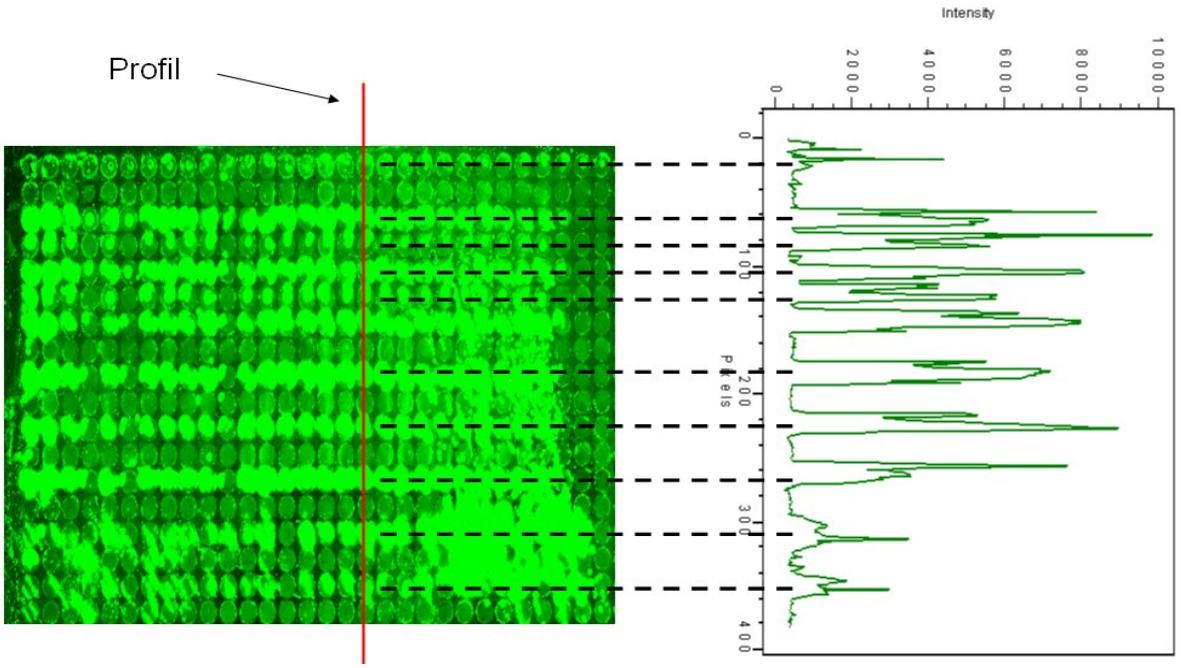


Figure II-49 : Profil d'intensité de fluorescence de la puce suivant une colonne.

II.6 CONCLUSION

Nous avons mis en place un banc de picoprojection, qui nous a permis de démontrer la faisabilité d'une synthèse peptidique à un seul rang au fond d'un micropuits. Cela nous a permis de valider aussi la méthode de fabrication des micropuits ainsi que la fonctionnalisation de substrat.

Les apports de réactifs sont effectués par des projections parfaitement contrôlées de quelques picolitres avec une matrice piézoélectrique permettant de gérer 6 réactifs de manière indépendante avec 48 buses de projection par réactif. D'un point de vue technique, nous maîtrisons ces projections, réactif par réactif et buse par buse. Nous avons appris aussi à adapter les paramètres de projection au solvant. Il est donc possible d'envisager des synthèses en parallèle effectuées par projection à la volée à la vitesse d'une imprimante bureautique, sur de grandes surfaces de substrat, avec une combinatoire importante. Tout cela ouvre des perspectives intéressantes pour la synthèse in situ de puces à oligopeptides vu à oligonucléotides haute densité.

Dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pas poursuivi ce travail jusqu'au développement effectif d'un Synthétiseur de puces à haute densité. L'une des raisons était notamment que l'équipe de recherche n'avait pas terminé le développement du modèle sondes/cibles oligopeptidiques complexes qui était nécessaire pour caractériser les synthèses.

Il nous est donc apparu prématuré de construire cet instrument avant de pouvoir le caractériser.

Par contre, nous avons procédé à la définition de l'architecture d'un Synthétiseur de puces à haute densité compatible tant avec la chimie des Fmoc qu'avec celle des phosphoramidite (Annexe 1) et à sa conception (Annexe 2). Cet instrument permet en théorie d'effectuer des synthèses de biopuces d'une densité de 80 000 plots/cm² sur des surfaces très importantes (wafer silicium ou verre de diamètre de 20 cm). Le coût de cet instrument hors main d'œuvre a ainsi été estimé à 200 k€. Ses dimensions sont de l'ordre de 1500 x 1400 x 1200 m^3 et sont imposées par la très grande précision mécanique nécessaire à la haute densité.

Par ailleurs, l'un des acquis de ce travail est un système de projection mixte piézoélectrique/microélectrovanne, décrit à l'Annexe 3, qui permet de conserver les réactifs de projection (phosphoramidites et Fmoc) en milieu anhydre, ce qui se révélera très important à la fois pour des questions de rendement chimique et de coût de revient de synthèse. Ces travaux pourront par contre être intégralement repris par la suite.

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes intéressés au transfert de réactifs par µtamponnage. C'est un procédé d'utilisation moins souple que la picoprojection, mais il permet d'atteindre une résolution beaucoup plus élevée avec un instrument très compact et peu coûteux.

PARTIE C

ELABORATION DE BIOMICRODISPOSITIFS PAR MICROTAMPONNAGE

Chapitre III

ETAT DE L'ART SUR LE MICROTAMPONNAGE

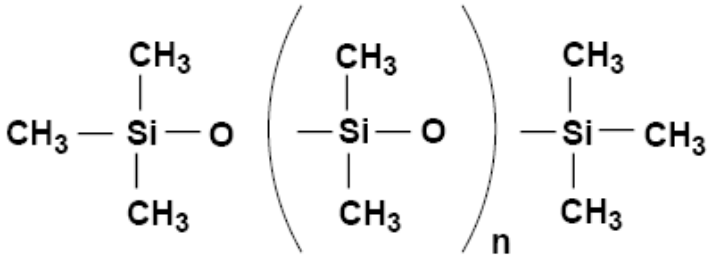
Le principe du µtamponnage (µTP) a été exposé précédemment en section (I.2.7). Dans ce chapitre consacré à l'état de l'art sur cette question, nous commençons par présenter une bibliographie succincte sur le PDMS (III.1) qui nous sera utile pour comprendre les limitations du procédé (III.2). Nous ferons ensuite le point sur les instruments de tamponnage (III.3), avant de discuter les applications liées à la Micro et Nanobiotechnologie (III.4). Pour terminer, nous présenterons les réalisations du laboratoire antérieures à ce travail (III.5), ce qui nous permettra de préciser nos objectifs (III.6).

III.1 QU'EST-CE QUE LE PDMS ?

III.1.1 LES SILICONES

Les Silicones, ou polysiloxanes, sont des polymères inorganiques formés à partir de chaînes silicium-oxygène (...-Si-O-Si-O-Si-O-...). En jouant sur la longueur des chaînes Si-O-, les groupements fixés par substitution, ainsi que les liaisons entre chaînes avec ou sans réticulation, il est possible de faire varier les propriétés physicochimiques des silicones, qui peuvent présenter une consistance du liquide au solide en passant par le gel et la gomme. Notons que le terme silicone, formé par analogie avec les cétones, est impropre sur le plan chimique mais imposé par l'histoire et l'usage [134].

La famille de silicone la plus simple et la plus courante est constituée par les polymères linéaires du type polydiméthylsiloxane ou PDMS dont la formule de base est donnée à la Figure III-1.



$3 \leq n \leq$ plusieurs milliers d'unités

Figure III-1 : Formule du polydiméthylsiloxane.

Les liaisons Si-O, plus fortes que les liaisons Si-C, assurent une très bonne stabilité thermique (250/300°C) aux macromolécules. Mais elles sont sensibles aux acides et aux bases ; les PDMS ne sont stables qu'aux pH neutres. Ce sont des molécules flexibles avec des interactions intermoléculaires extrêmement faibles, d'une très grande mobilité, constituant pratiquement des liquides macromoléculaires [135]. Les conséquences de cette très grande mobilité sont les suivantes :

- températures critiques très basses : parmi les différentes classes de polymères, la famille des PDMS est celle qui a la température de transition Tg vitreuse la plus basse (~ –120°C) ;
- faible viscosité ;
- faible tension superficielle ;
- perméabilité à la vapeur d'eau mais pas à l'eau sous forme liquide (propriété très utile pour la µfluidique) : l'eau liquide ne pénètre pas dans le PDMS à cause de son caractère hydrophobe (groupements méthyles), mais la vapeur d'eau, moins dense que l'eau liquide, passe grâce à la mobilité conformationnelle des macromolécules [135] ;
- propriétés mécaniques médiocres, mais bonne déformabilité en traction ou en compression : ce sont des élastomères[1].

Dans beaucoup d'applications, le PDMS est réticulé pour améliorer ses propriétés mécaniques. Cette réticulation est rendue possible par la fixation de fonctions réactives sur les chaînes de PDMS. Nous mentionnons pour mémoire que la réticulation peut se faire (i) à chaud par voie radicalaire par incorporation de peroxydes, ou encore (ii) à froid, soit par action de l'humidité atmosphérique, soit encore par incorporation d'eau. En fait nous

[1] Un élastomère est un matériau qui peut subir de grandes déformations sous un effort donné en revenant quasi instantanément à sa forme originale, lorsque cette contrainte est supprimée, et cela sans modification permanente de ses caractéristiques macroscopiques.

utiliserons une 3ème méthode de réticulation (iii) dont le principe est basé sur une réaction d'hydrosilylation catalysée (Figure III-2).

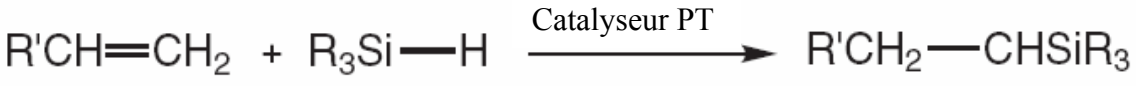


Figure III-2 : Réaction d'hydrosilylation.

Il existe différents fabricants de PDMS (Dow Corning, Rhodia Silicones, Geltest,…), qui fournissent des kits avec deux composants à mélanger (famille des RTV2) :

- un composant A constitué d'un oligomère (pré-polymère) et du catalyseur ;
- un composant B qui est un oligomère réticulant.

Par convention, le catalyseur de platine est présent uniquement dans le composant A. La préparation du polymère final consiste simplement à mélanger les deux constituants A et B et à procéder à un dégazage dans une cloche en faible dépression. Le mélange est utilisable pour un moulage par coulée pendant 30 minutes à 2 heures selon la formulation avant d'atteindre son point de gel. La réticulation est déclenchée par addition du catalyseur et de l'oligomère siloxane, qui contient des groupements vinyliques, avec l'oligomère hydrogéné qui servira d'agent réticulant. La réaction continue pendant 48 heures en général à température ambiante ; un passage à l'étuve permettant le cas échéant de l'accélérer.

Le PDMS réticulé le plus utilisé en µTP (mais aussi lithographie flexible et µfluidique) est le Sylgard 184 de la société Dow Corning [136] dont la réaction de réticulation est donnée à la Figure III-3. Il faut noter que la composition chimique exacte du Sylgard 184 n'est pas connue, notamment les longueurs de chaînes (ce qui est le cas de manière générale de toutes les formulations RTV2). Pour le Sylgard 184, la proportion la plus utilisée est A:B 10:1 mais l'on peut aussi utiliser 5:1 et 20:1, ce qui permet de faire varier la viscosité de départ et les propriétés mécaniques (dans une faible mesure seulement). Dans notre gamme de travail, les constantes physiques de ce matériau varient très peu avec la température.

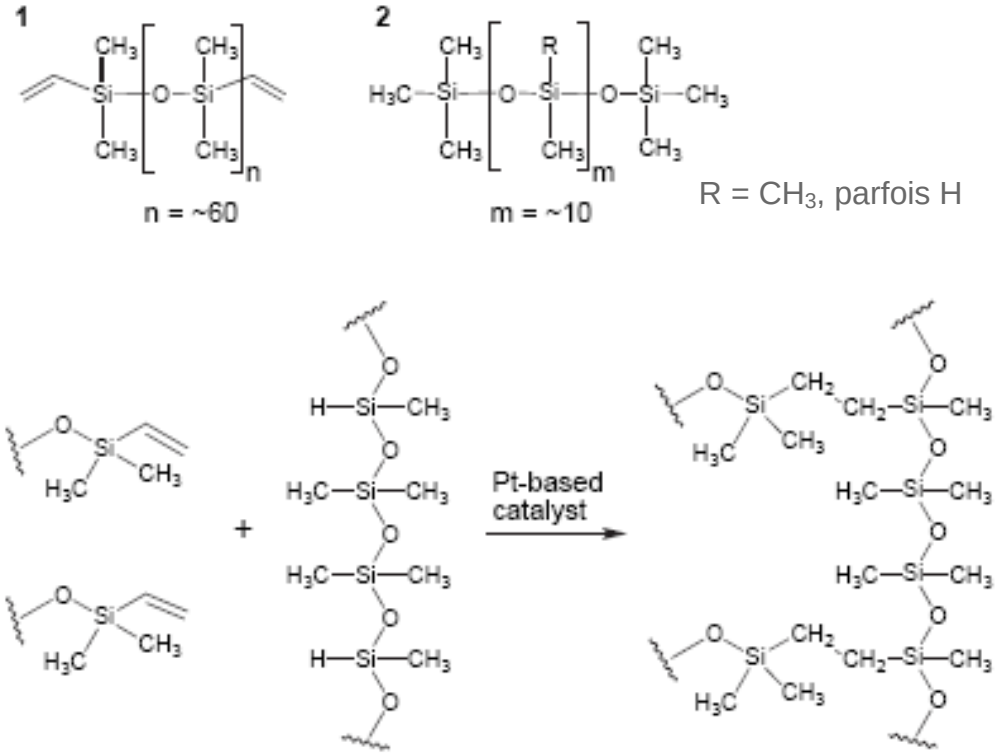


Figure III-3 : Réticulation du Sylgard 184 d'après [137].

Selon [96], pour obtenir un µTP fiable et répétable, il est essentiel que le tampon ait un module d'Young faible afin de pouvoir plaquer toute la surface du tampon sur le substrat malgré la présence de défauts (non planéité du tampon,…) et assurer le transfert. Comme nous le verrons en III.2.1, l'une des limitations du µTP provient des déformations du tampon : celles-ci sont d'autant plus importantes que le module d'Young est élevé. Ces déformations interviennent à la fois au démoulage du maître-modèle et lors du contact tampon/substrat. Un compromis est donc souhaitable. Par ailleurs, le travail d'adhésion du tampon sur le substrat doit être faible afin de pouvoir séparer facilement le tampon du substrat et éviter aussi que des morceaux du tampon ne restent accrochés sur le substrat.

Le Sylgard 184 peut être considéré comme une première génération de matériau bien adapté au µTP avec un comportement élastique linéaire jusqu'à une déformation de 8% ; son énergie de surface est aussi relativement faible de 22 mN/m [138].

Au laboratoire, nous préférons toutefois au Sylgard 184 un autre PDMS réticulé : le Rhodorsil 3255 de la société Rhodia Silicones, coloré en rouge au lieu d'être transparent comme le Sylgard 184, qui présente un module d'Young double, soit 4.4 MPa [139].

Il est possible aussi de préparer sa propre formulation de PDMS. Une formulation désignée par PDMS-h, avec un module d'Young encore plus élevé de 9 MPa, a ainsi été constituée par [140] à partir de composants commerciaux. La longueur des chaînes entre les points de réticulation est plus courte qu'avec le Sylgard 184, ce qui augmente le module d'Young mais diminue l'élongation à la rupture, rendant plus difficile le démoulage du maître-modèle. Pour favoriser le plaquage du tampon sur le substrat, le PDMS-h n'est pas mis en œuvre directement, mais dans une structure sandwich constituée d'une couche de PDMS-h de 30 µm d'épaisseur fixée sur un support flexible en verre d'épaisseur 10 µm par l'intermédiaire d'une couche de Sylgard 184 de 75 µm d'épaisseur [140]. Il a été possible ainsi d'atteindre une résolution de moulage et de transfert par µTP de 100 nm. Une variante consiste à disposer une couche de 30 µm de PDMS-h directement sur une couche de 2-3 mm de Sylgard 184 [141]. **Des travaux plus récents ont permis d'atteindre une résolution par µTP de 50 nm [99] puis de 40 nm [100]**.

Pour pallier les défauts du PDMS-h, il existe des formulations plus complexes, notamment le PDMS-hν photopolymérisable, qui présente des propriétés mécaniques intermédiaires [142].

Les progrès effectués ces dernières années dans les différentes formulations de PDMS ont donc permis d'améliorer de manière significative la résolution du µTP. Nous avons rassemblé dans le Tableau III-1 les données disponibles pour comparaison.

	Sylgard 184	Rhodorsil 3255	PDMS-h	PDMS-hν
Module d'Young (MPa)	1,8	4,4	8,2	3,4
Allongement à la rupture (%)	160	100	7	54
Physical touphness (MPa)	4,77		0,02	0,41
Retrait (%)	1,1	0,8	1,6	0,6

Tableau III-1 : Comparaison des PDMS d'après [142-145].

III.1.2 FABRICATION DES MAITRES MODELES ET DES TAMPONS

Tous les maitres-modèles utilisés dans ce travail ont été fabriqués en silicium par gravure RIE. La fabrication du maitre modèle sera traitée dans la thèse de Benjamin Hannes [2], l'exposé ci-dessous sera succinct. Le substrat du maître-modèle est un wafer silicium avec une couche d'oxyde thermique SiO_2 d'épaisseur 1,5 µm, sur lequel les motifs du tampon sont définis par résine photolithographique. La couche d'oxyde est ensuite gravée en voie

humide par du BOE 7 :1, puis le silicium lui-même est gravé par voie sèche par RIE (Reactive Ion Etching). La silice restante est ensuite enlevée par du BOE. Ce protocole est adapté à des motifs de quelques µm avec une hauteur de 10 à 20 µm. Pour améliorer la résolution latérale, il conviendrait d'utiliser des procédés de gravure FIB ou par faisceau d'électrons [146].

Pour ce qui concerne le moulage des tampons sur le maître-modèle, l'on peut procéder par dépôt des composants du PDMS à la tournette ou par simple coulée des composants. Cette méthode sera celle utilisée dans ce travail. Une presse de moulage sera mise en place pour faciliter cette opération (IV.2.1). Pour faciliter l'opération de démoulage, le maitre-modèle sera systématiquement fonctionnalisé par trempage pendant 20 minutes dans de l'octadecyltrichlorosilane (OTS) 10^{-3} M dans l'heptane.

III.2 LES LIMITATIONS DU MICROTAMPONNAGE

III.2.1 LES DEFORMATIONS DU TAMPON

Dans cette section, nous allons rappeler brièvement l'état de l'art sur cette question afin de faciliter la compréhension de la conception du banc de µTP. La Figure III-4 reprend la géométrie définie par [147] dans le cas d'un tampon très allongé suivant l'axe z et comportant un réseau de canaux parallèles à z, de largeur 2w, séparés par des piliers de largeur 2a. Les canaux ont une profondeur h tandis que la base du tampon à une épaisseur H.

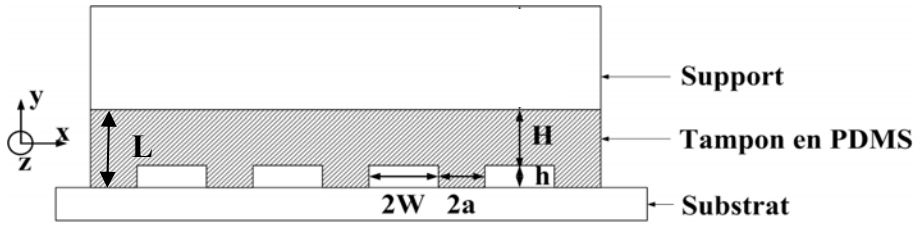


Figure III-4 : Paramètres géométriques du tampon d'après [147].

Le facteur de forme h/2a est l'un des paramètres les plus importants du procédé. En effet d'après [95, 148], s'il est trop élevé, les motifs du tampon peuvent se déformer à cause des forces capillaires mises en jeu pendant l'encrage. S'il est trop faible, deux effets peuvent intervenir. Tout d'abord, sous l'action de la charge externe nécessaire pour plaquer l'ensemble du tampon sur le substrat, le relief peut s'affaisser en formant des zones de contacts non désirées avec le substrat. Ensuite, même en l'absence de charge externe, le relief du tampon peut s'avérer insuffisant pour marquer des contours nets pendant le contact

mécanique à cause des forces d'adhésion de surfaces entre le tampon et le substrat ; à la limite toute la surface du tampon peut adhérer au substrat.

Les déformations classiques correspondant à la pratique ont été répertoriées dans la Figure III-5 d'après [147, 149, 150]. On distingue :

- le voilage (buckling) lorsque les motifs sont trop hauts et se déforment en touchant le substrat ;
- l'affaissement de la base du tampon (roof collapse) au cours du contact du tampon substrat ;
- l'adhésion des motifs entre eux, qui peut intervenir au cours de la séparation du tampon et du maître-modèle ou encore pendant l'encrage (lateral collapse) ;
- l'arrondissement des angles imposé par l'énergie de surface du PDMS.

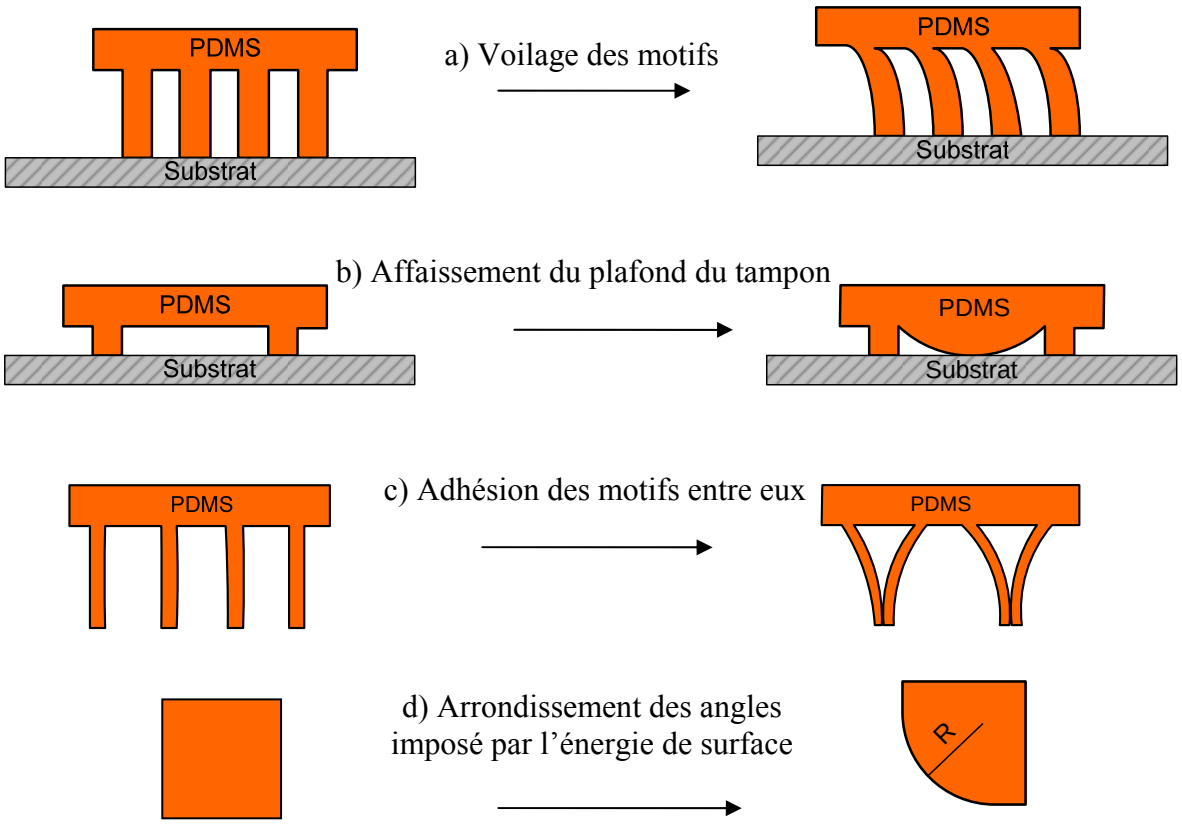


Figure III-5 : Les principaux modes de déformation du tampon.

Les réf [143, 151] proposent un critère de stabilité pour la géométrie du tampon, que nous rapportons ici pour sa simplicité. D'après leurs résultats, le rapport h/2a doit être

compris entre 0.2 et 2. Un rapport inférieur à 0.2 engendrerait un affaissement du tampon sur le substrat, tandis qu'un rapport supérieur à 2 provoquerait une instabilité latérale du tampon[1].

D'autres critères théoriques de déformation plus "sophistiqués", fonction de la géométrie du tampon, de ses caractéristiques mécaniques, et des énergies de surface ont été récemment publiés et seront discutés dans l'Annexe 5.

Dans notre cas, la profondeur h des motifs varie de 15 à 20 µm tandis que les motifs ont une largeur 2a de 30 à 500 µm avec un écart 2w entre eux de 30 µm à l'infini. Une déformation importante voir un affaissement complet du tampon est donc possible.

Par ailleurs, la réticulation du PDMS étant une réaction exothermique impliquant une transition liquide/solide, il faut tenir compte des déformations du tampon provenant de deux effets contraires : la dilatation thermique et le retrait chimique.

La dilatation thermique du PDMS est importante, comme pour tous les polymères, avec un coefficient de dilatation thermique de l'ordre de 3×10^{-4} mm/mm/°C. Pour réduire cet effet, nous procéderons toujours à une réticulation à température ambiante pendant 48 h.

La réticulation du PDMS s'accompagne d'un retrait chimique, qui peut atteindre 1 à 2 % en valeur linéaire [152]. Ce retrait dépend de la formulation du PDMS et des conditions expérimentales, notamment le degré de polymérisation final. Le retrait introduit des contraintes, qui entraîneront des déformations d'autant plus importantes que le module d'Young sera faible. Il n'est donc pas négligeable pour la reproduction des motifs à haute résolution ou sur de grande surface [152]. Au premier ordre, on peut toutefois considérer que le retrait est homogène et que les motifs ont simplement une dimension inférieure à celle souhaitée avec un facteur de proportionnalité "r" (Figure I-4). A haute précision il conviendra donc de compenser cet effet en surdimensionnant le maitre-modèle.

[1] A titre d'illustration d'après [148], pour un tampon en forme de réseau au pas de 2 µm constitué de lignes de largeur 1,2 µm séparées par un espace de 0,8 µm :
- pour une hauteur de motif supérieure à 2 µm : il y a effondrement des motifs à la séparation du tampon avec le maître-modèle,
- pour une hauteur de motif inférieure à 2 µm : il n'y a pas effondrement des motifs à la séparation avec le maître-modèle mais :
  - si la hauteur est supérieure 1,2 µm, il y a adhésion partielle des motifs pendant l'encrage du tampon ou son nettoyage avec un solvant.
  - si la hauteur est supérieure à 0.7 µm, l'arrondissement des angles du motif commence à être notable.

La hauteur de motif permettant de reproduire le réseau par µTP est comprise entre 0,3 à 0,7 µm.

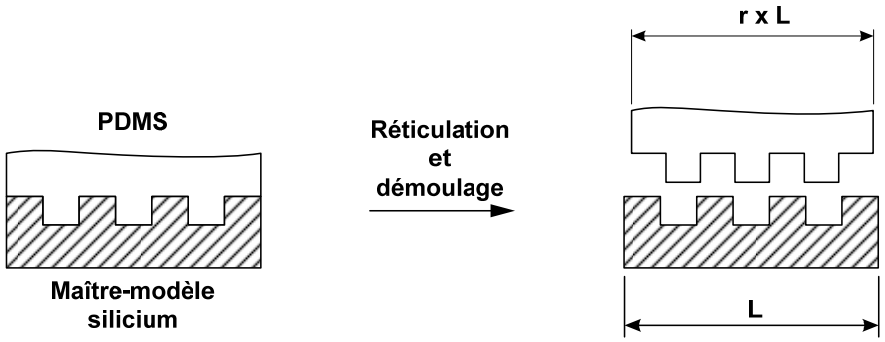


Figure III-6 : Influence du retrait du PDMS sur la géométrie du motif.

III.2.2 LA MIGRATION DES REACTIFS

La diffusion du produit de transfert, pendant et après le contact tampon/substrat, limite la résolution du µTP. Ce problème a été très étudié notamment dans le cas des alkanethiols $HS-(CH_2)_n-CH_3$ déposés sur or pour définir des masques de gravure [96]. Pour limiter cette diffusion, l'utilisation de produits de transfert avec des longueurs de chaînes croissantes a été envisagé : hexadécanethiol (HDT, n = 15), octadécanethiol (ODT, n = 17) et eicosanethiol (ECT, n = 19) [153]. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes limités à l'HDT, qui sert de référence. En fait lorsque l'on s'intéresse aux limitations du µTP liées à la nature chimique du produit de transfert, il convient de tenir compte d'autres facteurs non liés à la diffusion : taux de couverture du substrat par la couche autoassemblée (qui dépend du mode de formation de la couche et de la présence de défauts) et résistance de la structure SAMs/métal/substrat à une opération de gravure. La référence [154] indique que l'ODT pourrait constituer un compromis car il diffuse plus lentement que l'HDT tout en ayant une résistance à la gravure chimique supérieure à l'ECT. Cependant, l'ECT reste le thiol le plus largement utilisé à haute résolution [91, 96, 155].

III.3 LES INSTRUMENTS DE TAMPONNAGE

En dépit de l'intérêt croissant porté au µTP, dans la littérature, le tamponnage est le plus souvent effectué manuellement [89]. Des instruments ont cependant été décrits.

L'un des premiers était basé sur un encrage/tamponnage effectué avec un rouleau cylindrique [156]. Cette solution, proche des machines d'imprimerie n'a pas été développée à son terme, sans doute à cause de sa complexité mécanique.

Par ailleurs des instruments ont été crées spécifiquement pour les puces à neurones. Celles-ci sont formées de cellules fixées sur des substrats, qui peuvent être silanisés par µTP. L'activité des neurones est suivie par un réseau de microélectrodes intégrés au substrat [157].

C'est ainsi que deux instruments de µTP basés sur des châssis de microscopes ont été décrits pour pouvoir tamponner des motifs de silane alignés sur le réseau sous-jacent d'électrodes [158, 159]. Ces instruments ont une surface de tamponnage réduite, une charge sur le tampon contrôlée par un simple poids et aucun système d'encrage. Toutes les opérations sont effectuées manuellement, en particulier l'approche du tampon vers le substrat. Il s'agit donc essentiellement "d'aligneurs" et non pas de "tamponneurs" au sens où nous l'entendrons dans la section III.6.

Il existe aussi des bancs de wafer bonding modifiés pour porter un tampon et le plaquer sur un substrat, mais ce sont des instruments de microélectronique très coûteux et insuffisamment adaptés au procédé. Par exemple, l'instrument EVG520 de la société EVB [160] coûte environ 180 k€ avec son kit de µTP. Il permet de tamponner des substrats jusqu'à 150 mm de diamètre mais avec des tampons de 1" à 150 mm de diamètre ; la résolution de l'alignement est de l'ordre de 1 µm. La charge exercée est comprise entre 1 à 40 N. Cet instrument ne dispose pas de système d'encrage intégré : l'encrage du tampon est effectué par contact avec un wafer en silicium mis provisoirement à la place du substrat et encré lui-même à la tournette. Vu les dimensions de cet instrument et la nécessité (ou l'habitude) de le mettre en œuvre dans une salle blanche, il parait peu probable que cet appareil puisse être facilement utilisé par des chimistes ou par des biologistes.

D'autres instruments ont aussi été proposés pour le tamponnage de wafer silicium 3" [161] ou de substrats en verre pour les écrans à cristaux liquides (technologie de la société Philips) [97, 162, 163]. Dans tous les cas, le tampon de faible épaisseur est fixé sur un support en verre. Il est placé à une distance constante du substrat (~100 µm) puis pressé sur celui-ci en créant un changement de pression. Lorsque la surface de contact tampon/substrat est importante, il convient alors de procéder à un réglage mécanique soigné, ce qui peut s'avérer difficile. Pour contourner cette contrainte, Philips [162] a développé une technique de µTP basée sur un contact tampon/substrat constitué sur une faible aire et dont la position est contrôlée dans le plan de travail par un changement de pression ("wave printing"). Un plateau usiné disposé à l'arrière du support en verre permet d'adresser localement ce changement de pression et de déformer l'ensemble tampon/support en verre jusqu'au plaquage sur le substrat. Il est possible ainsi de proche en proche de tamponner une grande surface de substrat (Figure III-7). Récemment pour les besoins des écrans LCD, des électrodes de commandes de transistors TFT avec des motifs conducteurs de 1,2 µm ont été fabriquées sans défaut, en suivant ce principe, sur des surfaces couvrant 10 x 15 cm² [97].

De manière générale, le mode de fonctionnement des appareils décrit ci-dessus nécessite l'alignement du tampon à chaque changement de substrat et/ou de tampon. Le cas des puces à neurones mis à part, ce principe est conforme au mode de production de masse de la microélectronique basé sur une fabrication collective sur de grands substrats, qui sont ensuite divisés en composants individuels. Il parait cependant mal adapté aux biopuces ou aux microlaboratoires sur puces, qui sont souvent au format lame de microscope avec beaucoup de surface inoccupée, ou lorsqu'il faut procéder au tamponnage de multiple produits (puces à protéines par exemple). Nous verrons plus loin les fonctions que devrait avoir selon nous un instrument de µTP conçu pour les besoins des chimistes ou des biologistes dans un cadre de recherche. Avant cela, il nous parait nécessaire de poursuivre cette étude bibliographique et de passer en revue les applications potentielles de cet instrument en micro et nanobiotechnologie.

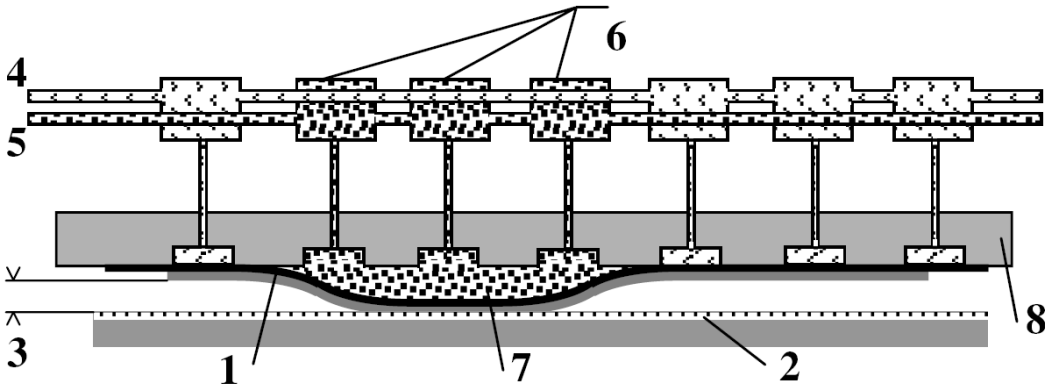


Figure III-7 : Principe du µtamponnage par "wave printing" d'après [162].

(1) : Tampon et support en verre. (2) : substrat. (3) : gap (~100 µm). (5) : Pression d'alimentation. (6) : Electrovannes de contrôle de la pression commutées pour créer et déformer localement. (7) le tampon et son support en verre. (8) : Plateau avec des sillons permettant de tenir (1) par aspiration.

Par défaut le tampon est maintenu par le vide. L'application locale d'une pression modérée permet de le déformer localement jusqu'au contact avec le substrat.

III.4 APPLICATIONS A LA MICRO ET NANOBIOTECHNOLOGIE

Dans cette partie, nous commencerons par les applications du µTP à la fabrication de puces à ADN puis nous passerons aux puces à protéines.

III.4.1 ELABORATION DE PUCES A ADN PAR MICROTAMPONNAGE.

1. Fabrication ex situ

A notre connaissance, il n'y a pour l'instant que deux articles qui traitent de la fabrication ex situ de puces ADN par µTP d'oligonucléotides ou de produits PCR [88, 101].

Ces articles établissent la faisabilité du concept avec le greffage de motifs d'ADN fonctionnels (hybridables) avec une résolution submicronique.

Par ailleurs les auteurs étudient l'encrage du tampon et le nombre de contacts successifs tampon/substrat que l'on peut effectuer sans avoir à ré-encrer le tampon. Pour cela ils étudient la nature des interactions entre ADN et substrat.

En effet d'après [88], les interactions électrostatiques jouent un rôle majeur dans les processus d'adsorption et de transfert impliqués dans le µTP, à cause du squelette à base de phosphates chargés négativement de la molécule d'ADN. La portée de ces forces est de quelques nanomètres, ce qui facilite une adsorption de multicouches. Différents régimes de transfert des ADN lors du µTP ont ainsi mis en évidence en fonction de la longueur des chaînes. Il semble donc particulièrement important de contrôler les charges de surface du tampon et du substrat.

Cette théorie est battue en brèche par [101], qui a réussi à fabriquer une puce à ADN en mettant en œuvre un PDMS hydrophobe sans recourir à une fonctionnalisation du tampon. Lors d'un encrage par dépôt d'une goutte, le tampon adsorbe en 30 secondes suffisamment de sondes pour permettre jusqu'à 4 transferts effectifs sur des substrats avec un temps de contact de 15 secondes. Deux substrats différents ont été testés : des lames de verre commerciales avec des groupements NH_2^+ et des lames préparées en interne avec des dendrimères portant des fonctions aldéhydes (les sondes comportent des fonctions 5'-NH_2). Le transfert de l'ADN a eu lieu entre le PDMS et les deux types de lames bien que la surface des substrats soit de nature différente : chargée positivement dans le premier cas et hydrophobe dans le deuxième cas.

Un autre résultat important des ces travaux est qu'après hybridation avec des cibles fluorescentes, le signal obtenu avec une puce fabriquée par µTP est d'un ordre de grandeur plus élevé que celui obtenu avec une puce fabriquée par spotting, et ce à géométrie et à concentration en sonde équivalentes [101]. La surface des motifs formée par µTP est aussi beaucoup plus régulière que par spotting : il n'y a pas d'effet de bord. Dans la fabrication par spotting, cet effet est dû la variation de concentration des sondes pendant l'évaporation des gouttes, qu'il est difficile de contrôler. **Le µTP semble donc autoriser un mode de transfert moins sensible à l'évaporation, que la projection ou le spotting. Il est susceptible de fournir des motifs à très haute résolution avec une forte densité de greffage. La sensibilité des puces, c'est-à-dire leur capacité à réagir à une faible quantité de cible, devrait donc s'améliorer à l'avenir grâce à ce procédé**.

2. Synthèse in situ

A notre connaissance, il existe une seule équipe qui a travaillé sur la synthèse in situ de puces à ADN par µTP en suivant la chimie des phosphoramidites [86, 164, 165]. L'encrage et le tamponnage sont effectués dans une boîte à gants fermée pour réduire la teneur en eau ambiante, qui a une influence directe sur le rendement de synthèse[1], ainsi que l'oxygène. Pour le solvant de synthèse, un mélange 2/8 en volume d'adiponitrile (1,4-dicyanobutane : $NC(CH_2)_4CN$) et d'acétonitrile est préféré à l'acétonitrile seul pour améliorer la forme des motifs tamponnés. L'adiponitrile (point d'ébullition : 295°C) est en effet beaucoup moins volatil que l'acétonitrile (point d'ébullition : 82°C). Notons que la surface du tampon a été rendu hydrophile et modifiée chimiquement en greffant de l'acrylonitrile [167].

Pour le couplage d'un rang, un mélange constitué d'une phosphoramidite et de tétrazole est déposé sur le tampon[2] puis transféré sur un substrat en verre à l'aide d'un système d'alignement XYZ portant le tampon. Quatre tampons sont ainsi utilisés successivement pour coupler les bases. Un premier lavage pour enlever les réactifs de couplage est effectué avec de l'éthanol (plutôt que l'eau) pour désactiver les phosphoramidites. L'oxydation, la fermeture, la déprotection ainsi que les lavages du rang sont ensuite effectués de manière collective dans une cellule fluidique disposée sur le substrat.

Ces opérations sont répétées pour les rangs suivants de sorte que pour synthétiser des oligonucléotides n-mères, il est nécessaire de mettre en œuvre 4 x n tampons.

Une synthèse de sondes 20 mères a ainsi été effectuée sur des lames de verre fonctionnalisées à l'aminopropyltriméthoxysilane sur une surface de 1 cm² avec 2 500 plots de 90 µm. Une hybridation avec une cible synthétique 20 mères a permis de distinguer les sondes totalement complémentaires des sondes comportant un mésappariement central de 1, 2 et 3 bases. Xiao et al.[86] font mention d'un rendement de synthèse de 97% par couplage, ce qui parait sujet à discussion car la méthode utilisée peut conduire à des artefacts importants [1, 168].

Quoiqu'il en soit, l'étude menée par [86] a permis de démontrer pour la première fois la faisabilité de la synthèse in situ d'ADN localisée par µTP. L'une des faiblesses de ce travail réside selon nous dans l'adaptation insuffisante de l'instrumentation au procédé, ce qui nous a motivé pour développer un banc de µTP susceptible d'évoluer vers cette application,

[1] Une contamination avec 1% d'eau conduit à une chute du rendement de couplage de 2% d'après [166]. D'après [86, 165], la boîte à gants servant d'enceinte réactionnelle contient respectivement moins de $1,5\ 10^{-4}$ % et $2\ 10^{-4}$ % d'eau et d'oxygène.

[2] Ce qui d'après l'expérience du LEOM n'est pas optimum, malgré [86, 165]. Il vaut mieux activer la phosphoramidite avec le tétrazole pendant le couplage sur la surface et non pas avant.

notamment avec (i) un instrument permettant un changement facile des tampons et une superposition précise des "différents coups" du tampon, avec (ii) un fonctionnement automatique qui sera indispensable en milieu saturé de solvant. Nous verrons aussi que le banc de µTP du LEOM est compact, ce qui permettra une intégration facile dans une enceinte.

III.4.2 ELABORATION DE PUCES A PROTEINES PAR MICROTAMPONNAGE.

A notre connaissance, aucune synthèse in situ par µTP de puces à oligopeptides n'a été décrite dans la littérature. Par contre la fabrication ex situ par µTP de puces à protéines a fait l'objet d'une littérature abondante [84, 85, 169-171] avec de nombreuses variantes [89]. Le principe de base consiste à adsorber les protéines à la surface du tampon en PDMS puis à les transférer lors du contact tampon/substrat. En fonction des conditions expérimentales et de la nature des protéines, une proportion plus ou moins importante des protéines déposées conserve une activité biologique. Le transfert dépend aussi des propriétés de surface du substrat, plus précisément de la différence de mouillabilité entre le substrat et le PDMS du tampon [172]. Il est d'autant plus efficace que le substrat est plus mouillant et le tampon moins mouillant. Notons qu'avec une solution d'encrage très diluée, il a été possible de constituer des plots (~ 100 nm) contenant de 1 à 5 anticorps (immunoglobulines) caractérisés par AFM [87]. **Le transfert par µTP de protéines uniques est donc possible**.

L'encrage lui-même du tampon est un processus comparable à un isotherme de Langmuir [89, 173], dont la cinétique dépend de la concentration de la solution d'encrage [87]. Les protéines sont adsorbées sur la surface hydrophobe du PDMS jusqu'à ce que la quantité de biomolécules adsorbée limite le processus. Les protéines à caractère hydrophobe sont celles qui ont la plus forte interaction avec le PDMS natif. La portée subnanométrique de cette interaction explique la formation des monocouches [174, 175].

Il est possible aussi de rendre la surface du PDMS hydrophile en oxydant sa surface avec un plasma O_2. Après ce traitement, l'on peut de plus fonctionnaliser la surface du tampon avec un silane puis greffer des anticorps. Ceux-ci permettront d'encrer le tampon avec des protéines réagissant spécifiquement aux anticorps [176].

Le PDMS peut aussi être remplacé par des matériaux hydrophiles poreux et perméables aux protéines, constituant ainsi un réservoir : hydrogel d'acrylamide [177], gel d'agarose [178] ou polyoléfines [179]. Les protéines restant dans un tampon biologique, le risque de dénaturation est réduit.

Pour conclure cette partie, l'on peut remarquer le manque de flexibilité des protocoles expérimentaux décrits dès qu'il s'agit de déposer des protéines différentes, ce qui limite leur

intérêt pratique. Les solutions proposées consistent soit à procéder à des tamponnages multiples en décalant un tampon [85, 171] soit à mettre en œuvre un tampon avec des hauteurs différentes de motif [180]. Le succès même, du procédé de fabrication de puces à protéines par µTP nous a motivé pour développer une instrumentation plus adaptée.

III.5 LE MICROTAMPONNAGE AU LEOM

Pour conclure cet état de l'art, nous terminerons le chapitre en présentant les réalisations du laboratoire dans le domaine du µTP antérieures à ce travail. Ces réalisations concernaient d'une part une méthode particulière de structuration de puces à ADN par deux silanisation successives et d'autre part un banc de mini-tamponnage.

III.5.1 STRUCTURATION DES PUCES A ADN PAR DOUBLE SILANISATION

1. Principe de base

Le µTP a été introduite au laboratoire dans le cadre de la thèse de F. Bessueille [26]. L'objectif initial était de combiner le µCP au procédé de fabrication ex situ de puces à ADN du LEOM (I.3.2) pour structurer les substrats afin d'améliorer la qualité des puces. En effet l'une des difficultés liées à l'utilisation d'un procédé de projection de gouttes est de garantir une bonne définition de la position, de la forme et de la dimension des plots [109]. Pour résoudre ce problème, il a été proposé de jouer sur les propriétés de surface du support (lame de microscope) en procédant à une double silanisation (Figure III-8). Un silane hydrophobe inerte chimiquement (OTS) est déposé par µTP sur la surface de la puce en réservant un réseau de plots circulaires destinés à recevoir ultérieurement les oligonucléotides. Puis une deuxième silanisation est réalisée en phase liquide ou vapeur, de façon à fonctionnaliser l'intérieur des plots avec des fonctions chimiques d'accrochage pour les oligonucléotides. Les sondes sont projetées sur les plots avec le banc de multiprojection : les gouttes sont recentrées et maintenues sur les plots de manière parfaitement définie améliorant ainsi la définition géométrique du réseau de plots et l'uniformité de la distribution des sondes à l'intérieur des plots. (Figure III-9) De plus, lors de l'étape d'hybridation des puces, la surface hydrophobe de la puce à l'extérieur des plots limite l'adsorption des brins d'ADN et donc le bruit de fond.

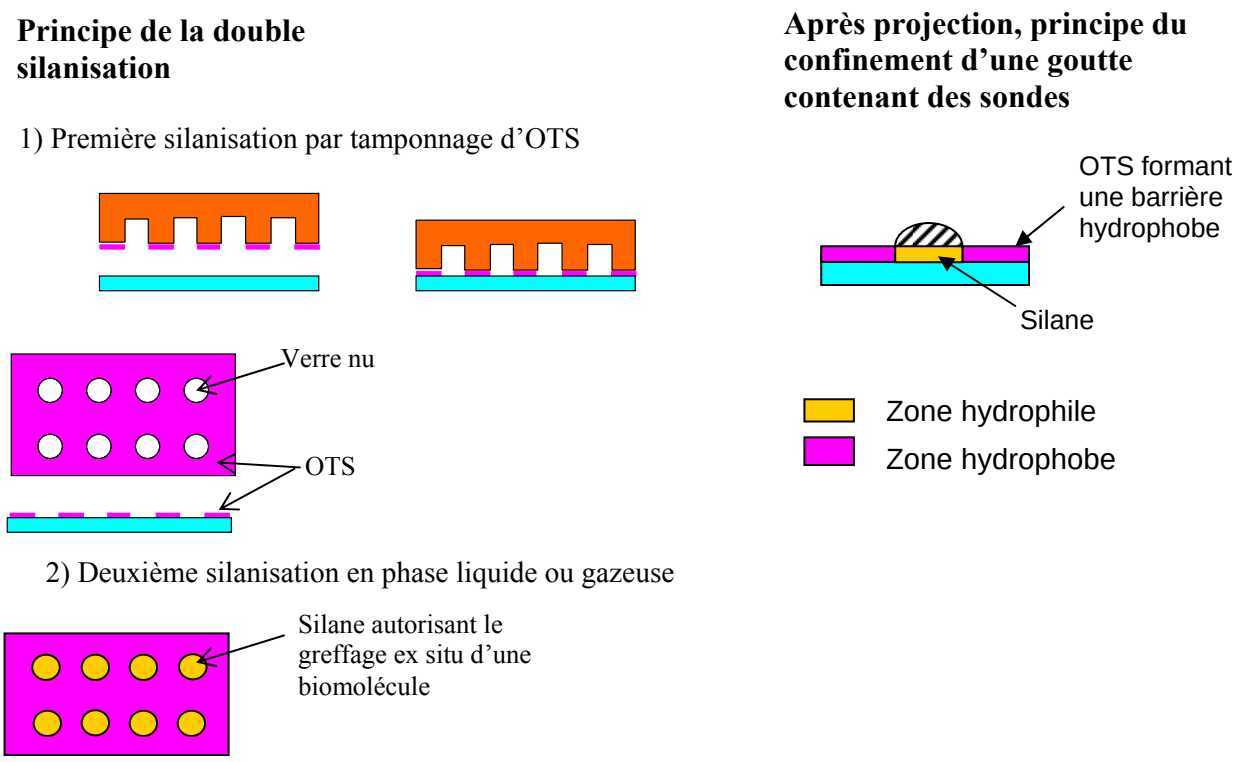


Figure III-8 : µtamponnage selon [26].

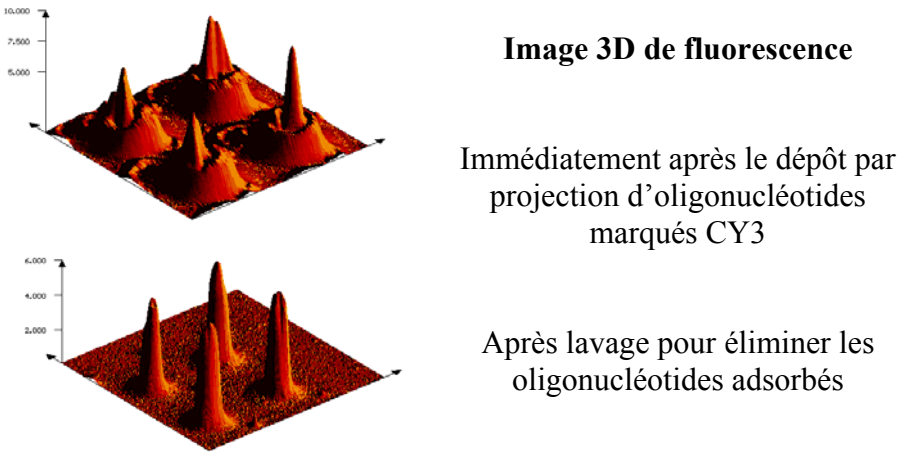


Figure III-9 : Délimitation du réseau d'une puce à ADN par µTP selon [26].

2. Nécessité d'un banc de mini-tamponnage

Dans la phase de faisabilité, pour procéder à la première silanisation à l'OTS du substrat de la Figure III-9, le tamponnage était réalisé manuellement. Pour passer à la fabrication d'une série de puces à ADN, le laboratoire a cherché à développer une méthode permettant un positionnement précis des motifs d'OTS par rapport à une référence commune à tous les substrats : en l'occurrence, deux bords et un coin communs à toutes les lames de microscope. L'objectif était de pouvoir remplir le plateau de la machine de multiprojection

avec des substrats en connaissant par avance l'emplacement de chaque plot (Figure I-23). Cela facilitait le traitement en parallèle des substrats (projection des sondes) à faible vitesse de production (50 puces/h en mode pas à pas) et était absolument indispensable à grande vitesse de production (500 puces/h en mode tir à la volée)[1].

En l'absence d'appareil commercial dédié au µtamponnage, il est apparu nécessaire de développer un instrument spécifique, que nous appellerons **banc de mini-tamponnage** permettant de fonctionnaliser à l'OTS de manière reproductible de petites séries de lames de microscope. A l'origine, la précision de la position des motifs par rapport à la référence commune devait être de l'ordre de +/-25 µm, ce qui suffisait pour structurer des puces avec des plots de diamètre 300 à 500 µm, espacés centre à centre de 500 à 750 µm. Un fonctionnement semi-automatique du banc paraissait aussi utile pour assurer facilement une petite production.

III.5.2 LE BANC DE MINI-TAMPONNAGE DU LEOM

Un premier projet d'instrument a été mené au laboratoire par G. Dilosquer, ingénieur instrumentation, sous la conduite de M. Cabrera. Le premier prototype s'est révélé prometteur mais insuffisant. Ce travail a donc été repris dans le cadre de cette thèse d'un point du vue instrumentation et dans le cadre de la thèse Benjamin Hannes d'un point de vue procédé. Nous verrons aux chapitres suivants que nous avons abouti au développement d'un instrument de 2ème génération, un **banc de µtamponnage**, d'une précision bien supérieure à l'objectif initial, qui d'ouvre d'intéressantes perspectives au-delà de la première application envisagée.

1. Tamponneur manuel

Une première maquette avec un fonctionnement manuel a été développée au laboratoire pour étudier comment l'on pourrait :

- postionner de manière reproductible un tampon sur un substrat ;
- assurer par construction le paralléllisme du tampon et du substrat pendant le contact ;
- exercer une charge sur le tampon de manière reproductible.

[1] Le mode pas à pas correspond à l'arrêt du plateau à chaque projection de sonde. Le mode tir à la volée correspond à la projection des sondes avec un plateau à vitesse constante suivant l'axe y de la Figure I-23 ; les plots de toutes les puces du plateau doivent alors être alignés pour éviter des projections en dehors des plots [20, 38, 45, 181].

Cette maquette (Figure III-10.) était basée sur un guidage par rail avec :

- à une extrémité du rail, un premier chariot fixe constituant un **porte-substrat** ;
- à l'autre extrémité du rail, un deuxième chariot mobile constituant une **tête de tamponnage**.

La tête de tamponnage, portant le tampon en PDMS, était actionnée manuellement en la faisant coulisser sur le rail jusqu'au plaquage sur le substrat (une lame de microscope).

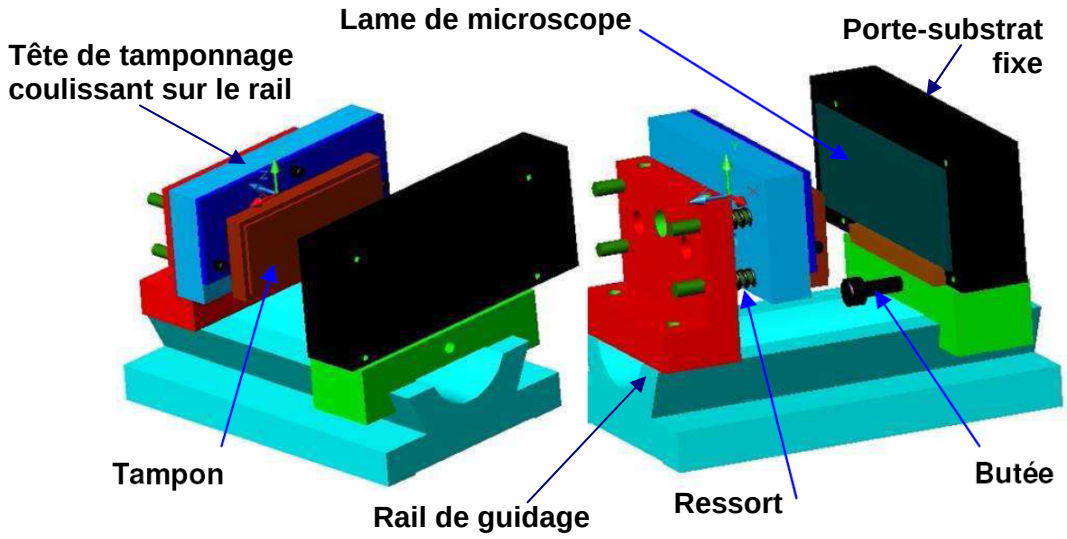


Figure III-10 : Tamponneur à fonctionnement manuel.

Pour plaquer toute la surface avec une charge contrôlée, la tête de tamponnage était constituée de deux plaques reliées par **quatre ressorts de compression.** L'une des plaques était fixée au chariot mobile tandis que l'autre, portant le tampon, était mobile et portée par les ressorts. Deux butées réglables disposées dans le porte-substrat permettaient de limiter la compression des ressorts pendant le tamponnage, celle-ci devrait assurer la charge.

En poussant à la main le tampon vers le substrat, les ressorts devaient permettre: (1) de laisser "flotter" le tampon pour le présenter de manière parallèle au substrat, (2) de rattraper tout déséquilibre de l'angle d'attaque pendant le contact et de plaquer l'ensemble du tampon sur le substrat et (3) de limiter la force exercée lors du contact.

En fait, ce dispositif s'est révélé d'un fonctionnement irreproductible : les ressorts supportés par de simples vis filetées pouvaient provoquer à tout moment le blocage du mouvement. Cependant il a constitué une étape importante en nous donnant l'idée de passer à un fonctionnement semi-automatique en adjoignant un actionneur linéaire pour pousser le tampon.

2. Mini-tamponneur semi-automatique à vérin pneumatique

Par la suite, G. Dilosquer a conçu et réalisé un banc de mini-tamponnage automatisé, commandé par PC avec un logiciel développé sous LabView (Figure III-11). L'instrument est basé sur les principes suivants qui seront conservés et améliorés par la suite :

- Actionnement du mouvement du tampon par un vérin pneumatique ;
- Guidage du mouvement de la tête de tamponnage par un glissière linéaire de haute précision ;
- Encrage automatique du tampon avec une buse de pulvérisation
- Contrôle du procédé via des caméras CCD.

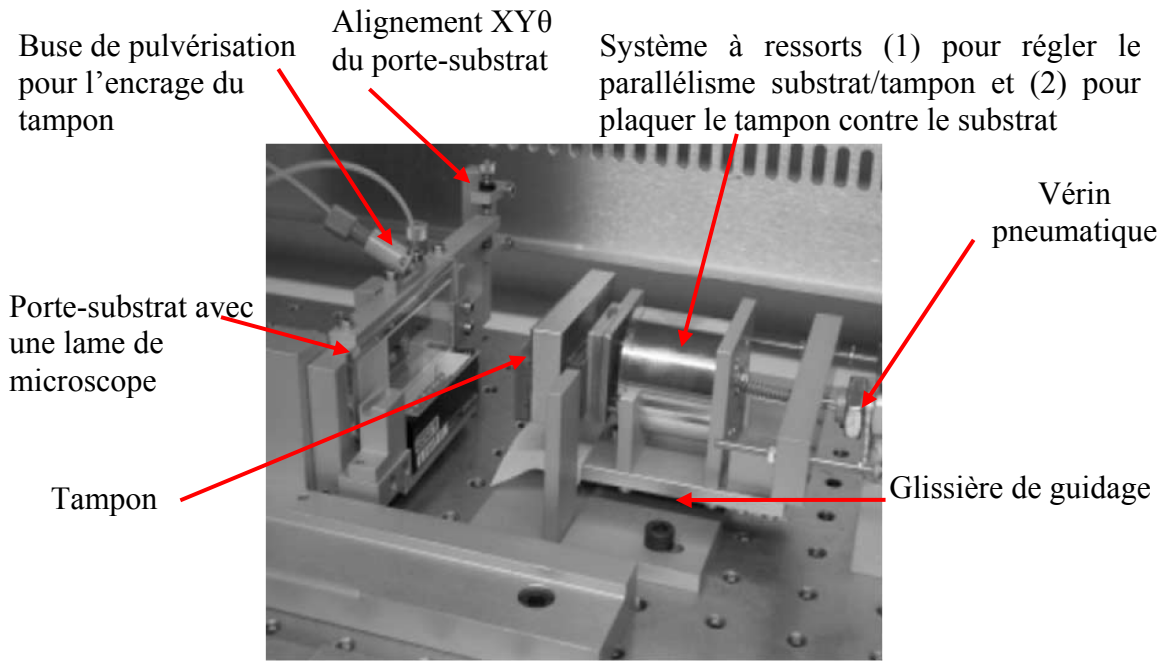


Figure III-11 : Vue du banc de mini-tamponnage semi-automatique.

Par ailleurs d'autres fonctions ont été aussi prévues mais ont dues faire l'objet d'une redéfinition dans le cadre de cette thèse pour être opérationnelles :

- l'alignement du porte-substrat selon trois degrés de liberté par rapport au tampon ;
- le plaquage du tampon sur le substrat par un système de ressorts ;
- le réglage du parallélisme tampon-substrat indépendement des ressort.

En effet, le dispositif présentait les défauts listés à la Figure III-12, mis en évidence par B. Hannes quand il a commencé à utiliser la machine de manière pratique [2] :

- des oscillations du tampon causées par les ressorts, lors du contact, rendant la machine inutilisable ;
- un manque de précision du mouvement du tampon, à cause des contraintes exercées par le piston du vérin pneumatique sur la glissière de guidage ;
- une mauvaise conception de la tête de tamponnage conduisant à :
    - un réglage difficile du parallélisme tampon/substrat ;
    - un plaquage à ressorts inopérant sur toute la surface du tampon ;
- l'impossibilité de contrôler la charge exercée pendant le contact ;
- l'impossibilité de changer de tampon sans re-régler la machine ;

Pour ce qui concerne le du porte-substrat :

- des flexions mécaniques aléatoires importantes ;
- une absence de blocage du porte-substrat après alignement avec le tampon ;
- un positionnement non reproductible du substrat dans le porte-substrat.

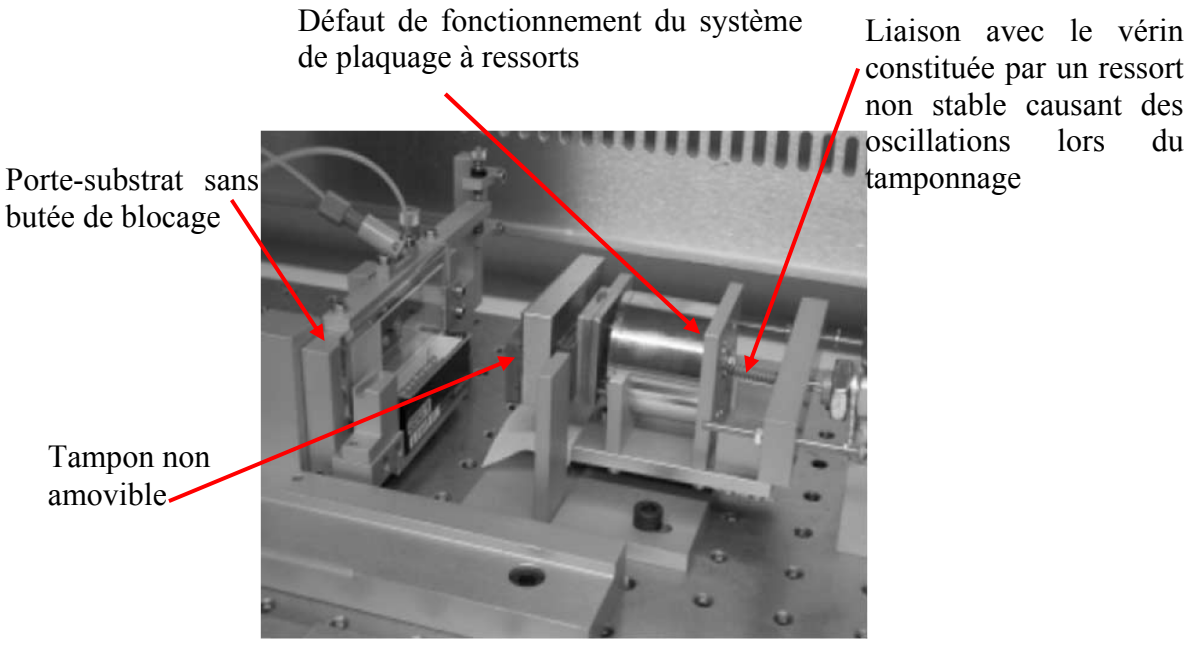


Figure III-12 : Vue des principaux problèmes du banc de mini-tamponnage.

Un pas décisif a été franchi lorsqu'à partir de l'analyse précédente, nous avons modifié directement le prototype en enlevant (i) le ressort de liaison tampon/vérin de façon à relier directement le vérin à la tête de tamponnage, (ii) les ressorts de plaquage. L'on a ainsi pu

éliminer les oscillations pendant le contact et vérifier l'intérêt de l'actionnement automatique par vérin. De plus, un protocole de pulvérisation de l'OTS a été développé pour la première fois avec succès avec et les premiers essais de tamponnage sur des lames de verre se sont révélés très encourageants du point de vue de la reproductibilité du mouvement du tampon [182]. Il était par contre difficile d'aller plus loin en continuant à modifier le prototype existant. Après analyse des problèmes, j'ai donc procédé au développement d'un nouvel instrument, **un banc de µtamponnage**, qui sera exposé aux chapitres suivants.

III.6 LES OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

A notre connaissance, il n'existe pas d'instrument que l'on puisse véritablement considérer comme un banc de µtamponnage intégrant toutes les fonctions nécessaires à ce procédé pour une utilisation orientée vers la chimie/biologie. Dans la suite de ce travail, notre objectif sera de construire cet instrument. Selon nous, un banc de µTP ne doit pas être un simple système d'alignement permettant d'orienter le tampon par rapport au substrat et/ou de le mettre en contact sous l'effet d'un poids. La charge sur le tampon doit pouvoir être facilement réglée avec résolution. Cet instrument doit intégrer aussi un système d'encrage performant ainsi que la possibilité de pouvoir changer facilement de produit de transfert ou encore de tampon. La compacité de la machine permettra éventuellement d'isoler le cœur de l'instrument pour travailler en milieu anhydre et saturé de solvant, ce qui pourrait être utile en chimie de surface pour mieux contrôler les réactions. Le mouvement du tampon doit pouvoir être déclenché de manière automatique et contrôlée, ce qui facilitera la mise en place de la machine dans une enceinte chimique. Un instrument peut coûteux, avec contrôle qualité et impliquant l'utilisation de petites quantités de réactifs est aussi nécessaire.

Par ailleurs l'analyse du banc mini-tamponnage a montré que l'on pouvait tenter de reconcevoir l'instrument en visant une répétabilité de l'ordre du micromètre pour ses principales fonctions mécaniques (position du motif sur le substrat, changement de tampon, changement de tampon de substrat). L'on ouvrirait ainsi des perspectives intéressantes dans le domaine de l'élaboration des biopuces haute densité et aussi des microlaboratoires sur puce Cet instrument serait l'unité de base élémentaire d'une machine pouvant procéder à des greffages ex situ de sondes ou encore à des greffages in situ d'oligonucléotides ou d'oligopeptides.

Le mode de fonctionnement choisi dans ce travail repose sur le réglage et la calibration initiale du banc de µTP avec le premier substrat, de façon à pouvoir procéder

ensuite à la fabrication d'une série de substrats, sans changer les paramètres de la machine à chaque substrat. Ce mode opératoire nécessite la conception d'une machine spécifique ad hoc.

Chapitre IV

BANC DE MICROTAMPONNAGE AVEC CHARGE CONTROLEE PAR VERIN

Dans ce chapitre, le mouvement du tampon du banc de µTP sera guidé par un rail de précision jusqu'au contact avec le substrat, tandis que la poussée sera effectuée par un vérin pneumatique. La machine sera principalement composée de :

- une **tête de tamponnage** mobile permettant de plaquer le tampon sur le substrat ;
- un **porte-substrat fixe** permettant un changement précis et facile des lames de microscope.

Elle sera dotée aussi des fonctions nécessaires à une mise en œuvre facile du µTP (encrage, alignement, visualisation, etc.).

Nous étudierons tout d'abord la conception du banc de µTP fonction par fonction (IV.1.1 à IV.1.3) avant de présenter une vue d'ensemble des possibilités du dispositif (IV.1.4). Puis nous passerons au développement du protocole de mise en œuvre et à la caractérisation de l'instrument (IV.2) avant de terminer avec un exemple d'application (IV.3). Cela nous conduira à proposer une nouvelle solution pour le contrôle de la charge sur le tampon, qui sera examinée au chapitre suivant.

IV.1 CONCEPTION DU BANC DE MICROTAMPONNAGE

IV.1.1 PRINCIPE DE BASE

1. Pressage du tampon par un vérin pneumatique

Le principe de base pour automatiser le banc de µTP consiste à pousser le tampon jusqu'au contact avec le substrat avec un vérin pneumatique (Figure IV-1). Le substrat sert de première butée d'arrêt mécanique pour le vérin tandis que la charge exercée sur le tampon est réglée par la pression pneumatique du vérin. Le contact est maintenu pendant la durée

souhaitée (temps de contact). Puis l'inversion du sens de poussée du vérin permet de décoller le tampon du substrat et de le faire revenir à la position initiale, qui correspond à la deuxième butée d'arrêt mécanique.

Nous avons choisi un vérin pneumatique qui comprend deux compartiments (notés 1 et 2 sur la Figure IV-1), séparés par un piston de diamètre 10 mm, qui servent d'entrées/sorties pour l'air provenant d'un compresseur via un distributeur 5/2. Ce dernier est composé d'une bascule (commandée électriquement via un PC) qui pousse un tiroir et inverse ainsi l'entrée et la sortie d'air du vérin. Le distributeur 5/2 permet donc à la fois de choisir le sens de la poussée et l'instant du déclenchement. Un manomètre en sortie du compresseur permet de régler simultanément la pression à l'aller et au retour du piston. Deux régulateurs de débit disposés sur les entrées/sorties du vérin permettent de régler indépendamment la vitesse du mouvement du vérin à l'aller et au retour. Le mouvement du tampon, la mise en contact avec le substrat et le décollement final sont donc complètement automatisés et d'une grande rapidité, soit quelques secondes dans la pratique.

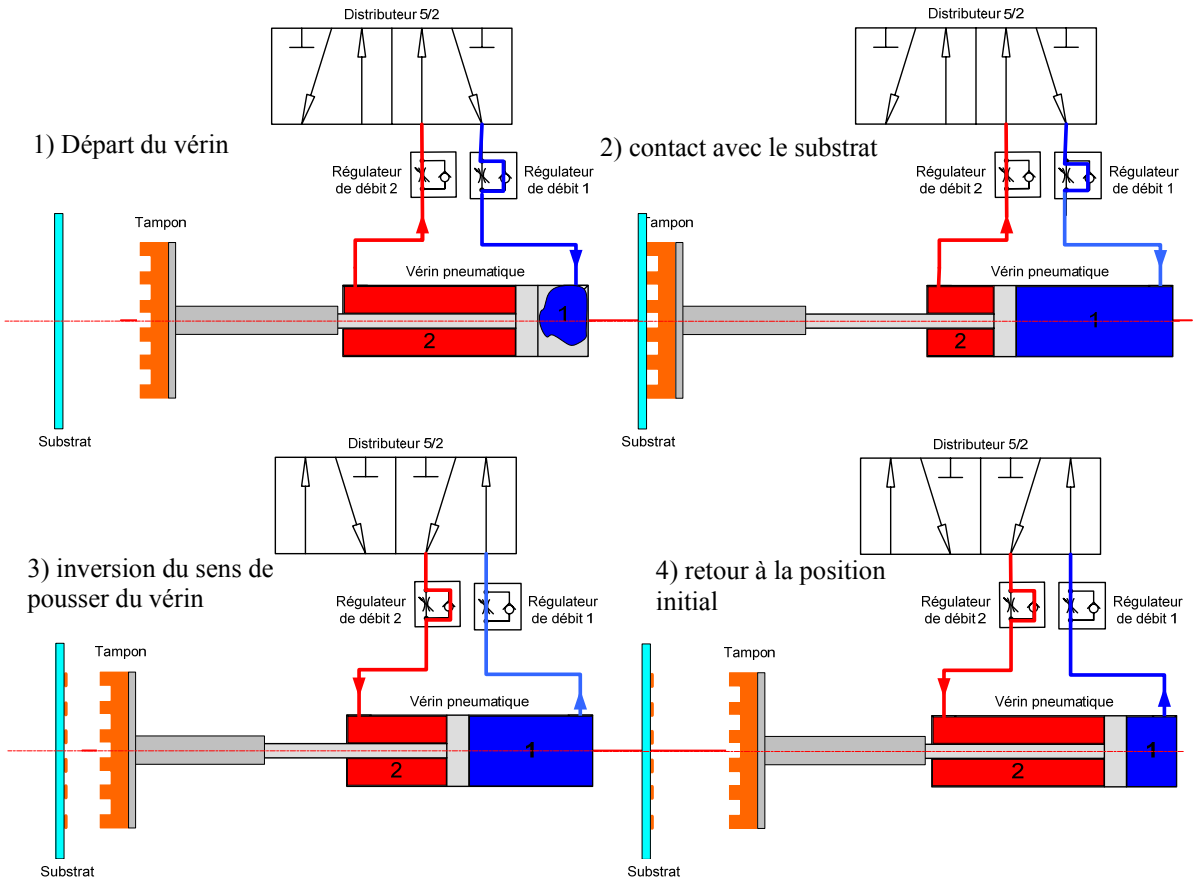


Figure IV-1 : Principe de l'automatisation du µTP.

Le cycle tamponnage/décollement se déroule de la manière suivante :

Au début le distributeur est mis en surpression du côté du compartiment 2 et le tampon est en butée.

Lorsque le distributeur 5/2 est actionné électriquement, il y a une permutation des entrées/sorties d'air le vérin est mis en mouvement en poussant le tampon. La vitesse du déplacement du vérin est réglée par le régulateur du débit placé aux sortie.

Le tampon entre en contact avec le substrat pendant le temps nécessaire au transfert des réactifs.

Une deuxième permutation des vannes du distributeur permet de décoller le tampon du substrat en faisant revenir le vérin au point de départ.

2. Guidage du tampon par un rail linéaire de précision

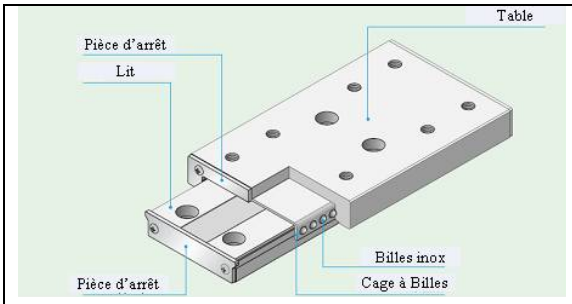
La conception mécanique interne du vérin n'assure pas une bonne reproductibilité du mouvement du piston. Pour assurer un positionnement précis du tampon sur le substrat, la solution retenue a été non pas de guider directement le tampon par le vérin, mais de guider le mouvement du tampon avec une glissière linéaire miniature de précision. Le vérin ne servira plus qu'à pousser le tampon, alors que la glissière guidée par un rail assurera la répétabilité du tamponnage. Cette solution constitue l'une des caractéristiques les plus importantes de la machine de µTP.

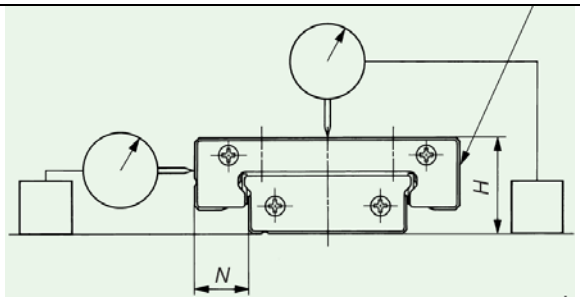
Nous avons sélectionné une glissière d'une très grande précision, qui sert au guidage de disques durs. Cette glissière très compacte (75 x 25 mm² avec une épaisseur de 9 mm) permet une course de 45 mm. Elle est constituée d'un rail et d'un chariot en acier inoxydable pour résister aux produits chimiques corrosifs. Elle comprend deux rangées de billes en acier inoxydable sur chaque coté, qui permettent de faire glisser le chariot. Chaque bille est en contact avec le chemin de roulement en 4 points assurant un déplacement doux et précis.

Le Tableau IV-1 montre les spécifications du constructeur concernant la répétabilité du mouvement de la glissière[1], soit verticalement +/- 4 µm et horizontalement +/- 6 µm (ainsi que la méthode de mesure). Les charges que peut supporter ce rail sont importantes. Il possède donc une grande rigidité aux charges fluctuantes et complexes. Ces caractéristiques restent invariables avec la température jusqu'à 140 °C.

[1] En fait nous verrons en section Partie AIV.2.2.1 que la répétabilité du banc de µTP est bien meilleure que les spécifications de la glissière. L'une des explications possibles pourrait être qu'en réalité la glissière ne supporte que 10% de sa capacité, la charge réelle supportée par le rail étant bien inférieure aux valeurs du

Tableau IV-1. La glissière est aussi parfaitement centrée sur le rail.





Variation du parallélisme (V) / (H)	6 µm / 4 µm
Charge normale statique	2610 N
Charge normale dynamique	1360 N
Charge latérale statique	3105 N
Charge latérale dynamique	1536 N
Moment statique	19.5 N.m

Tableau IV-1 : Spécifications de la glissière pour le guidage du tampon.

Il est par ailleurs absolument indispensable d'assurer la transmission du mouvement du vérin sur le rail en réduisant les contraintes qui seraient dues à une différence d'alignement entre l'axe du piston et l'axe du rail. Pour ce faire, la solution retenue a été de mettre en place un accouplement miniature flexible entre le vérin et le rail, qui absorbe ces désalignements (Figure IV-2). L'accouplement est réalisé en une seule pièce en aluminium, il fait partie de la famille des joints flexibles multicellulaires utilisés pour la robotique, les instruments de mesure, les pompes, etc. Il présente les avantages suivants : insensibilité à la température, réversibilité, rigidité en torsion, flexibilité élevée, aucun entretien ni lubrification. Suivant l'axe X, il a une fonction de ressort de raideur 1,53 N/mm et permet au système d'encaisser une différence d'alignement de 5° entre les axes du vérin et du rail de guidage.

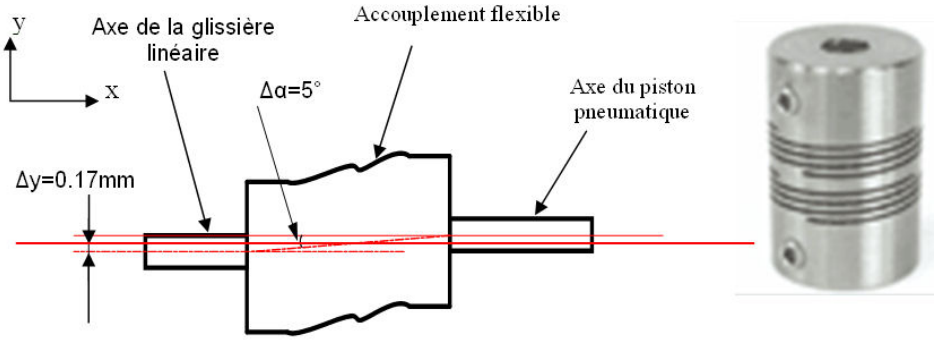


Figure IV-2 : Accouplement flexible.

Pour conclure cette partie, la Figure IV-3 résume la solution mécanique envisagée avec l'ensemble des composants proposés. Nous verrons cependant plus loin, qu'il sera nécessaire de prévoir un dispositif plus complexe au niveau du tampon. Mais avant d'aborder cette question, nous commençons par évaluer la charge exercée sur le tampon pendant le contact.

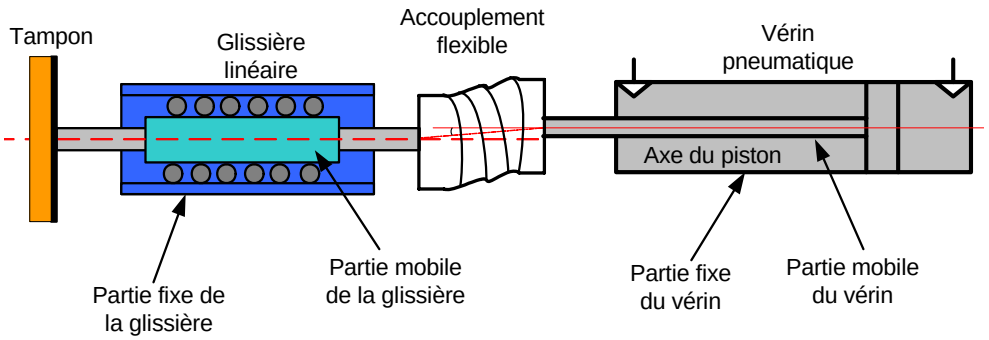


Figure IV-3 : Guidage du mouvement du tampon avec une architecture vérin/accouplement flexible/glissière.

3. Charge exercée sur le tampon en fonction de la pression du vérin

Suivant les spécifications du constructeur, le vérin est actionné par de l'air entre 1 et 10 bars provenant du compresseur. Grâce aux deux régulateurs de flux, le contact entre le tampon et le substrat, ainsi que le décollement, pourra être réglé pour qu'il se fasse toujours d'une manière progressive, même à forte pression. Nous verrons plus loin qu'il sera possible de descendre la pression de fonctionnement à 0,3 bar pour réduire la charge sur le tampon, mais guère en dessous à cause des frottements du système. Notons que l'accouplement flexible a une influence sur la constante de temps du banc de µTP et qu'il réduit la valeur initiale de la charge du tampon sur le substrat. Mais très rapidement (~2 sec après le contact), l'accouplement est comprimé et la valeur de la charge tampon/vérin n'est plus gouvernée que par la pression pneumatique. Lors du contact, le tampon est comprimé jusqu'à ce que la réaction du PDMS équilibre la force exercée par le vérin. Pour simplifier l'exposé, nous n'intéresserons donc qu'à cette valeur finale F de la charge (Figure IV-4).

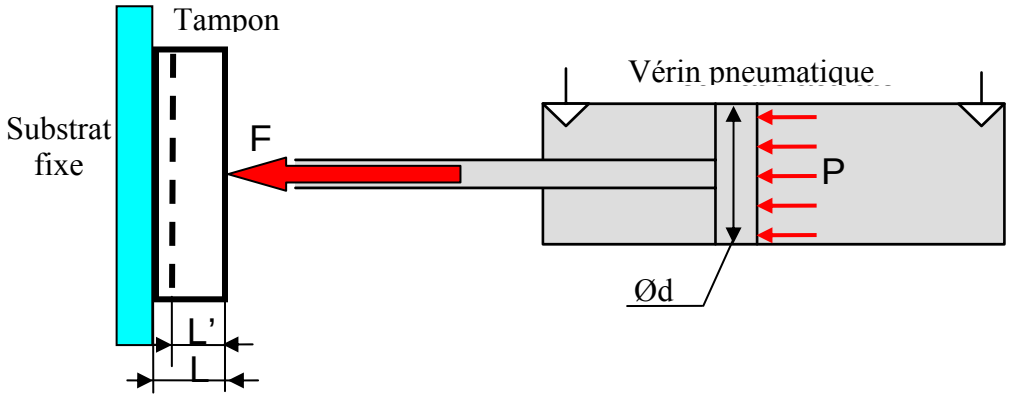


Figure IV-4 : Charge exercée sur le tampon par transmission de la pression.

La charge F exercée sur le tampon varie linéairement en fonction de la pression pneumatique P et du diamètre d du piston : $F = \pi (d^2/4) P$.

A titre d'exemple, pour une pression de 1 bar et un diamètre de piston de 10 mm, la force F exercée sur le tampon est de 7,8 N. La charge est de 2,35 N, c'est à dire 230 g, pour la pression pneumatique minimale de fonctionnement 0,3 bar.

Intéressons nous maintenant à la compression du tampon sous l'effet de cette force. Pour simplifier considérons un tampon plat (sans motif), d'épaisseur initiale L et de surface S. La force appliquée par le vérin comprimera cette épaisseur de $\delta L = L - L'$ (L', étant l'épaisseur après compression). En revenant à la définition du module d'Young, on trouve :

$$E = \frac{CONTRAINTE}{DEFORMATION} = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F}{S} \bullet \frac{L}{L - L'}$$

Soit une déformation δL égale à : $L - L' = \pi\left(d^2/4\right)\frac{P \times L}{E \times S}$

Avec :

σ : contrainte normale
ε : déformation
d : diamètre du piston du vérin pneumatique
P : pression à l'intérieur du vérin
S : surface du tampon en PDMS
L : épaisseur initiale du tampon
L' : épaisseur après application de la charge
E : module d'Young,

Par exemple avec un tampon ayant une épaisseur L de 1 mm, une surface S de 25 x 45 mm² et un module d'Young E de 4 MPa, si l'on applique une pression de 1 bar, on obtient une compression du tampon δL égale à 1,74 µm.

Si au lieu d'un tampon plein, nous considérons un tampon avec des motifs : l'intégralité de la force F sera transmise au motif et la compression des motifs pourra alors

être beaucoup plus importante, proportionnellement à la surface réelle de contact tampon/substrat. Cette question sera reconsidérée au chapitre suivant.

4. Conception de la tête de tamponnage

Dans cette partie, nous allons aborder la conception de la tête de tamponnage**.** La solution retenue est schématisé la Figure IV-5.

La tête de µTP sera constituée de trois parties :

- un **porte-tampon** amovible (cf. IV.2.1) ;
- un **support** fixé d'un côté sur le chariot de la glissière linéaire et relié de l'autre côté au piston du vérin pneumatique via l'accouplement flexible ;
- une **partie suspendue,** dans laquelle sera inséré le porte-tampon et qui sera poussée/tirée par le support.

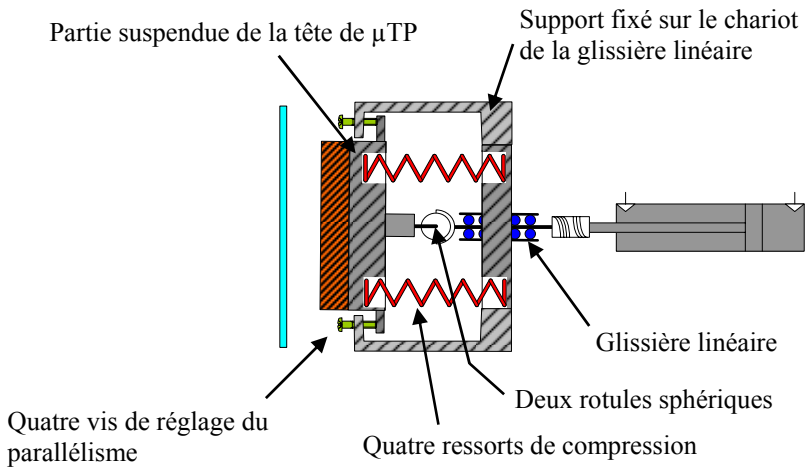


Figure IV-5 : Schéma simplifié de la tête de tamponnage (vue de dessus).

Quatre vis micrométriques intégrées sur la partie suspendue permettent de régler le parallélisme tampon/substrat. Pour maintenir la partie suspendue en équilibre par rapport au support, l'on a prévu (i) deux rotules sphériques pouvant coulisser sur deux axes fixés sur le support de la tête de µTP et (ii) quatre ressorts de compression de raideur de 2,93 N/mm. Pendant le réglage du parallélisme, les rotules sphériques donnent la possibilité de bouger selon deux degrés de liberté en rotation (tangage et lacet) tandis que le coulissement des rotules sur leur axe donne un troisième degré de liberté en translation dans le sens horizontal. Les ressorts comprimés par les vis micrométriques assurent la suspension de l'ensemble avec une élasticité qui permettra un mouvement réversible. Les vis micrométriques permettent ainsi non seulement d'orienter le tampon mais elles viennent aussi bloquer la partie suspendue

contre les ressorts en rigidifiant le système. La Figure IV-6 est une vue plus complète que précédemment de la tête de µTP. **Un point très important à noter est que lors du décollement du tampon, les ressorts permettront de remettre l'orientation du tampon à sa position initiale.**

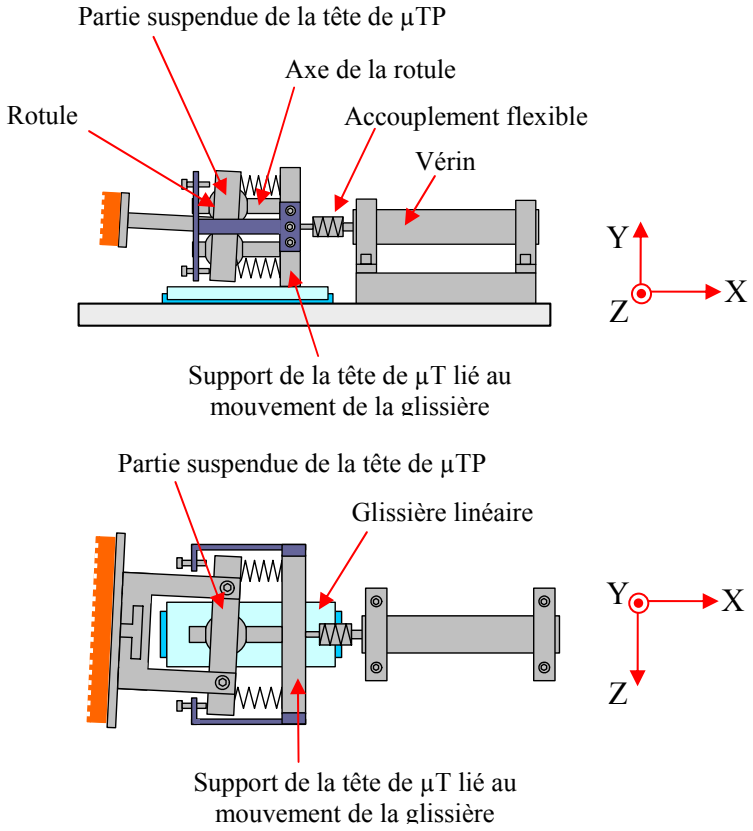


Figure IV-6 : Vue de face et de dessus de la tête de tamponnage.

Vue de face et de dessus de la tête de tamponnage avec les 2 rotules et les 4 vis de réglages du parallélisme tampon/substrat. La mobilité de la partie suspendue (deux rotations θz et θy et la translation des rotules le long d'un axe parallèle à X) permet d'orienter la tête de µTP. Les ressorts servent à maintenir en équilibre la partie suspendue.

Soient Lv et L_H respectivement les distances entre le point d'appui des vis micrométrique, le bord du tampon et l'axe du centre de rotation (Figure IV-7). Soit α l'angle entre le tampon et le substrat et ρ la distance centre de rotation / tampon. Nous considérons uniquement le cas où α est petit. Dans notre cas : L_v = 20 mm ; L_H = 20 mm ; ρ = 25 mm

Les vis micrométriques, ayant un pas de 250 µm/tour, permettent de régler α avec une résolution δ, correspondant à un décalage ε sur le substrat avec : $tg\alpha = \delta / L_v$ et $tg\alpha = \varepsilon / \rho$.

À titre d'exemple pour une fraction de tour de 1°, δ = 0,695µm➔ α = 0,034 ➔ ε = 0,868 µm/°.

Ces résolutions élevées expliqueront les résultats expérimentaux présentés plus loin.

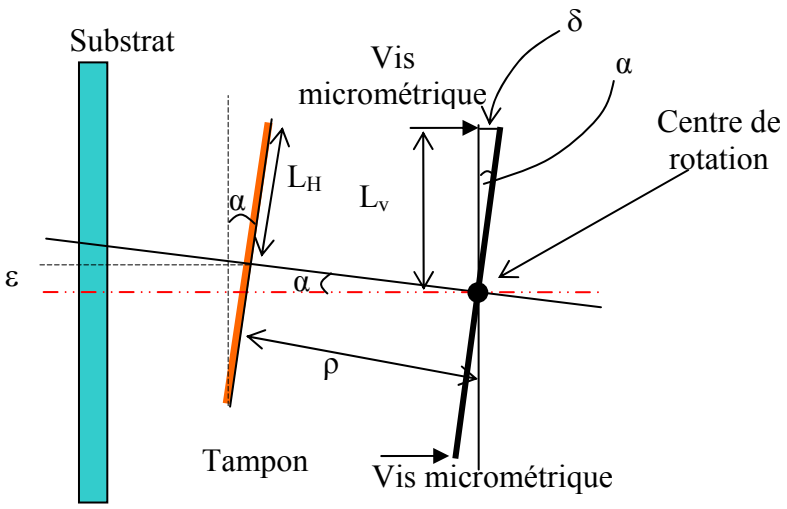


Figure IV-7 : Résolution du réglage du parallélisme tampon/substrat (cas des petits angles).

5. Conception du porte-substrat

La Figure IV-8 montre la conception du porte-substrat dédié aux lames de microscope. Tous les réglages d'alignement seront effectués sur le porte-substrat et non pas directement sur les substrats, ce qui permettra d'assurer une production sans avoir à ajuster les paramètres à chaque changement de substrat. Pour cela, le porte-substrat comporte :

- une fenêtre centrale pour visualiser le contact avec une caméra (IV.1.2) ;
- un système d'encrage original du tampon qui sera décrit dans la section suivante.

Les substrats sont introduits manuellement du haut vers le bas de façon à les plaquer contre la fenêtre et les rebords du porte-tampon selon les axes Yp et Zp (référentiel du porte-substrat) avec des vis de blocage. Le plaquage définit ainsi les axes de références et l'origine commune à toutes les lames de microscope. Ces références seront utilisées dans la section IV.2.2.1 lors de la caractérisation de la reproductibilité mécanique de l'instrument.

Le porte-substrat comporte une partie fixe et une partie mobile, de sorte qu'il est possible d'aligner le porte-substrat par rapport au tampon avec :

- deux degrés de liberté en translation suivant les axes Y_p et Z_p avec des vis micrométriques manuelles (pas de 250 µm / tour avec une course de 5 mm) ;
- un degré de liberté en rotation θ_{Xp} autour de l'axe X_p dont le centre est de rotation est placé près de la référence de la lame ; cette rotation est matérialisée avec un roulement à billes miniature et l'ajustement se fait avec une vis micrométrique (pas de 250 µm/tour et une course de 5 mm) pour pousser avec un bras de levier.

Une vis de serrage est prévue entre les parties fixe et mobile du porte-substrat qui permet de bloquer (par plaquage) ou de libérer les deux parties.

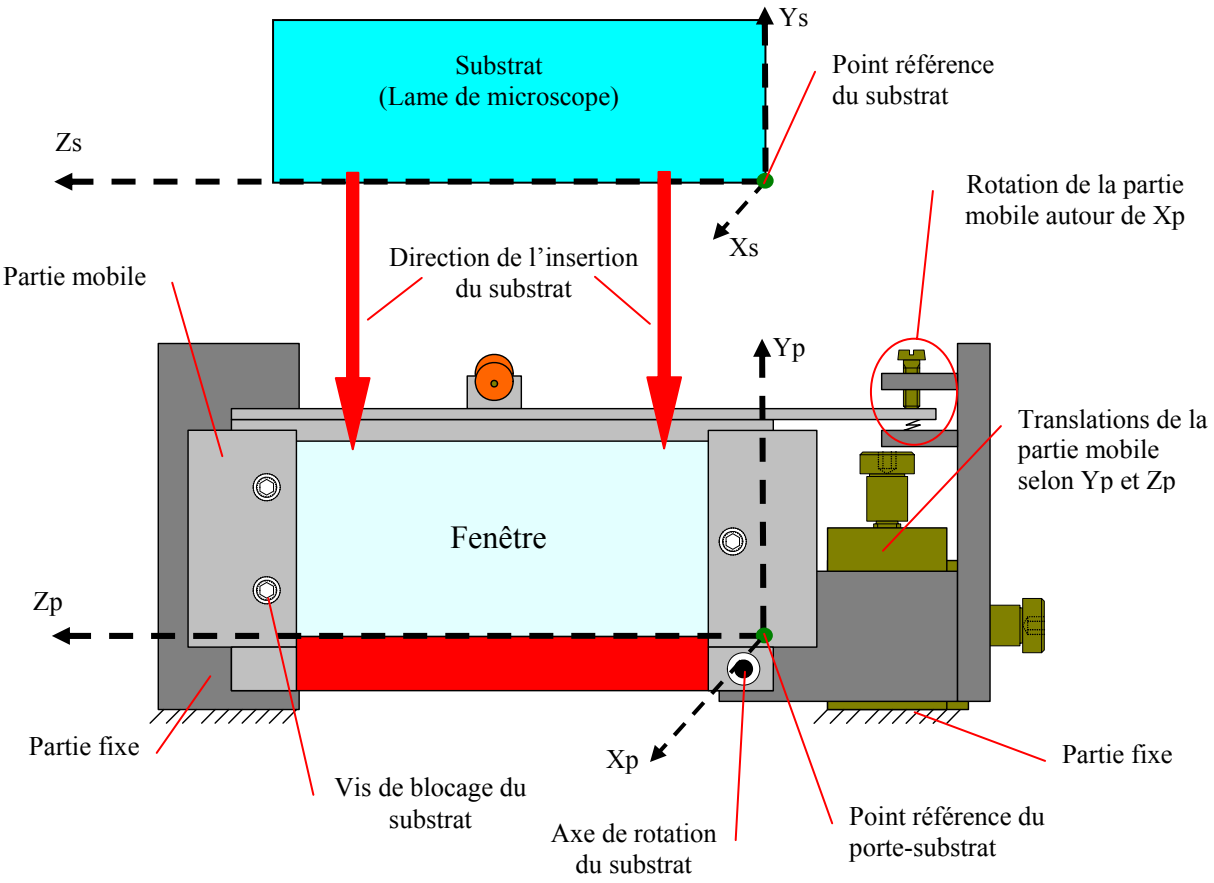


Figure IV-8 : Vue du porte-substrat.

Il est possible ainsi d'aligner un motif préexistant sur le substrat avec un motif du tampon (Figure IV-9) puis de bloquer les deux parties du porte-substrat l'une sur l'autre. A chaque changement de substrat, l'alignement sera inchangé par construction.

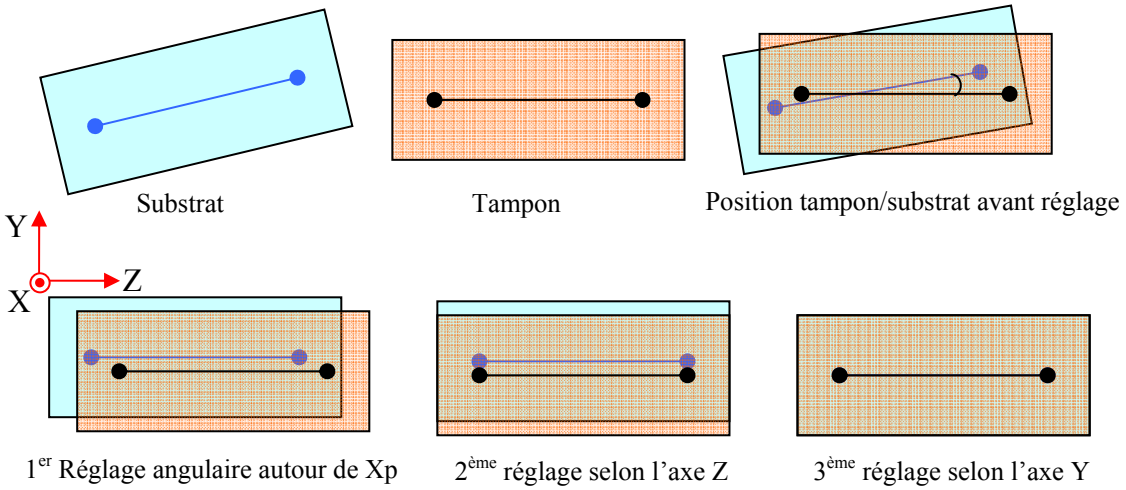


Figure IV-9 : Algorithme d'alignement des motifs du substrat et du tampon.

IV.1.2 ENCRAGE DU TAMPON

1. Etat de l'art

Dans la littérature, l'encrage du tampon est le plus souvent effectué manuellement, soit en déposant le produit sur le tampon avec une pipette ou un coton tige, soit en plongeant le tampon dans un bécher rempli de la solution d'encrage [63, 148]. Dans tous les cas, le tampon est soigneusement séché avec un flux de gaz avant de procéder au µTP [154].

Trois méthodes d'encrage susceptibles d'être automatisées ont été proposées par ailleurs. La première, proposée dès 1998 par l'équipe de Whitesides, basée sur un cylindre encreur, est restée sans suite sans doute à cause de sa complexité mécanique, proche des machines d'imprimerie [63].

La deuxième, préconisée entre autres par une équipe d'IBM [96], repose sur l'encrage du tampon par contact avec un encreur [155]. Celui-ci constitue en quelque sorte un "buvard" en matériau absorbant[1] déjà imbibé du produit à transférer. Comme la précédente, cette solution, intéressante et offrant beaucoup de possibilités, s'avère complexe d'un point de vue mécanique. Le tampon doit subir un premier contact pour l'encrage et un deuxième contact pour le tamponnage avec un mouvement du tampon entre les deux postes. La qualité de l'encrage et du tamponnage dépendra de très nombreux paramètres, notamment des quantités déposées et transférées, de la vitesse d'évaporation du solvant, de la disposition relative des postes d'encrage et de tamponnage. Elle nécessitera donc une bonne maîtrise des temps de cycle entre les différentes étapes.

Plus récemment, il a été proposé une troisième méthode d'encrage basée sur un circuit µfluidique Annexe en PDMS disposé de manière réversible sur le tampon [183]. La solution particulière proposée apparaît pertinente pour encrer le tampon avec des gradients de concentration. L'on peut imaginer que les méthodes d'encrage par µfluidique vont continuer à se développer.

2. Encrage automatique du tampon par pulvérisation

Le laboratoire s'est intéressé à une méthode d'encrage simple, facile à intégrer et à automatiser et sans mouvement mécanique. Le principe de base (Figure IV-10) consiste à imbiber la surface de PDMS avec un nuage de gouttelettes créées par pulvérisation [2] [184] . Pour ce faire, le produit à encrer est mis sous pression d'azote (0,4 bar) dans une bouteille

[1] Selon une variante, l'encreur est un wafer de silicium (donc non absorbant) recouvert du produit à tamponner à l'aide d'une tournette (machine EVG cf. Partie AIII.3).

fermée par une microélectrovanne rapide (600 Hz). Après ouverture de la microélectrovanne, le produit est envoyé sous pression vers une buse de pulvérisation où il sera mélangé avec de l'azote sous pression plus haute (2,5 bar). Un brouillard de gouttelettes en forme d'un cône sera ainsi généré, avec une taille et une répartition, qui dépendront de la pression du gaz, de la nature du produit et de la géométrie de la buse. Nous avons réussi à encrer une surface de tampon de 1,6 x 2 cm² sous un cône de 55°, en démontrant un tamponnage homogène d'OTS sur des lames de microscope. Le dépôt d'OTS est caractérisé par cartographie de mouillage avec un instrument développé spécifiquement au laboratoire [185].

Notons qu'une buse de séchage commandée par une microélectrovanne est disposée au voisinage de la buse de pulvérisation : elle permet de sécher le tampon avec de l'azote immédiatement après la pulvérisation.

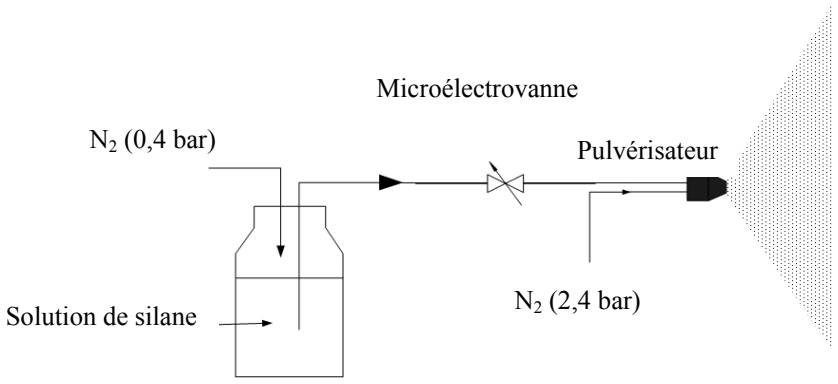


Figure IV-10 : Système automatique d'encrage du tampon par pulvérisation.

Ce système d'encrage étant étudié dans la thèse de B. Hannes, nous nous contentons ci-dessous de souligner rapidement ses avantages et inconvénients. C'est un effet un système très compact, peu onéreux et complètement automatique. La buse de pulvérisation étant un cylindre de Ø = 8 mm et de longueur 10 mm, il est possible de placer plusieurs buses dans le banc de μTP pour couvrir une très grande surface ou encore pulvériser des produits différents. A condition de prévoir des lignes différentes pour les fluides, toute contamination inter-buses peut aussi être évitée. De manière générale les autres avantages de ce procédé d'encrage sont la rapidité, la faible consommation en réactifs et donc le faible coût en produits chimiques[1].

La faible quantité de solvant utilisé a une conséquence importante, puisqu'il est possible de se limiter à imbiber le tampon à sa surface. Par rapport à un encrage par

[1]A titre d'exemple pour l'application liée à la structuration des puces à ADN Partie AIII.5.1, nous avons obtenu des résultats satisfaisants avec une quantité pulvérisée correspondant à OTS xx Mol/l dilué dans l'heptane et un temps de pulvérisation de 2 s. Le coût des réactifs est inférieur à 1,5 centime d'euro par substrat [182].

immersion, l'on réduit ainsi de manière considérable le gonflement du tampon par le solvant d'encrage et donc la dilatation du tampon. L'on élimine ainsi une cause importante de distorsion des motifs [182].

Les produits sont conservés en surpression de gaz, ce qui est très intéressant par exemple pour conserver des silanes polyfonctionnels à l'abri de l'humidité et éviter ainsi une pré-polymérisation. Cela est aussi indispensable pour conserver les phosphoramidites pour la synthèse d'oligonucléotides ou les Fmoc pour la synthèse d'oligopeptides.

3. Compatibilité du système d'encrage avec les réactifs

De manière générale, il convient de s'assurer de la compatibilité du système de pulvérisation avec le produit d'encrage. Nous savons que le système de pulvérisation est compatible avec l'OTS et les alkanethiols [2]. Il devrait l'être aussi à priori avec les réactifs de synthèse d'oligonucléotides ou d'oligopeptides, et aussi sans doute avec l'ADN, car ce sont des produits chimiques peu fragiles. Mais il n'est pas évident que l'on puisse utiliser ce procédé pour tous les produits, notamment les protéines. Dans ce cas, la solution adoptée dans le cadre de ce travail, consiste à encrer le tampon à l'extérieur du banc et le placer dans la machine (ce qu'il est possible de faire avec une grande précision mécanique et sans avoir à retoucher les réglages du banc de μTP grâce à sa conception).

IV.1.3 CONTROLE QUALITE PAR CAMERA

1. Principe de base

Nous allons décrire ci-dessous de manière détaillée le système de visualisation du banc de μTP étant donné son importance dans le contrôle du procédé. La partie centrale du porte-substrat est évidée de sorte qu'en disposant une caméra CCD équipée d'un zoom derrière la lame de microscope, il est possible d'observer par transparence le contact entre le tampon et le substrat. L'ensemble de visualisation comporte aussi un double système d'éclairage : (1) une fibre optique à double branche et (2) une barrette de LED rouges intégrée dans le porte-substrat.

Ce système de visualisation est notamment utilisé pour (i) **vérifier le parallélisme du tampon et du substrat en observant les zones de contact**, (ii) régler la position du tampon par rapport au référentiel du substrat, (iii) **ajuster la charge en étudiant les déformations du tampon**. Nous verrons qu'un choix judicieux de l'éclairage permettra (iv) de **discriminer les**

zones du tampon en contact ou non avec le substrat (cf. V.2). La caméra peut aussi être translaté pour **observer la pulvérisation du tampon et son séchage** [182].

2. Champ et résolution

La caméra Sony installée a un capteur au format ½" sensible dans le visible et comporte une matrice de 752(H) x 582(V) pixels d'une surface de 8,6 (H) x 8,3 µm² (V). Elle est dotée d'un zoom Navitar 6000. Comme le montre le Tableau IV-2, celui-ci est un kit que l'on peut configurer (presque) à volonté à partir des éléments de base : multiplicateur ou diviseur de focale, zoom et bague allonge. En fait quatre configurations optiques ont été développées qui ne différent que par la lentille frontale et la distance de travail lentille de sortie - substrat. Pour passer d'une configuration à l'autre, il suffit de mettre en place la lentille frontale et de déplacer la caméra en la faisant coulisser manuellement sur un rail. Il faut ensuite régler le champ et la résolution en fixant manuellement le grandissement du zoom, et ce tout en ajustant la mise au point.

Les configurations A et B à champ important du Tableau IV-2 permettent d'avoir une vue à basse résolution du tampon pendant la pulvérisation. Elles sont utiles aussi pour régler le parallélisme tampon/substrat par observation des zones de contact initial. La configuration C est standard. La configuration D correspond à la résolution maximale que nous avons utilisée, soit environ 0,5 µm/pixel, servira dans la section IV.2.2 pour caractériser la précision mécanique du banc de µTP.

Il est impossible de visualiser un champ important avec une grande résolution. Pour résoudre cette contradiction, la caméra est déplacée avec un système d'axes motorisés YZ à moteurs pas à pas. Un troisième axe motorisé suivant la direction X permet d'ajuster la mise au point. La caméra et les axes sont contrôlés par le logiciel LabView de sorte qu'il est possible de reconstruire une image d'ensemble du substrat par incorporation de prises de vue locales à haute résolution. L'on peut ainsi par exemple régler le parallélisme du tampon et du substrat en visualisant la zone de contact dans son ensemble ou encore ajuster la pression du vérin en observant des motifs particuliers.

3. Cas des substrats non transparents

La configuration précédente n'est compatible qu'avec des substrats transparents dans le visible et ne couvre donc pas le cas du silicium ou des substrats recouverts d'une couche métallique (or, argent, etc…). Ce dernier cas est important puisque par exemple les

alkanethiols constituent la famille chimique la plus utilisée pour le µTP et qu'elle nécessite de telles couches. Nous envisageons ci-dessous succinctement les solutions possibles.

Pour le silicium, il serait possible d'adapter le banc de µTP existant pour observer à travers le matériau. Le principe consistera à travailler à une gamme de longueurs d'onde résultant d'un compromis entre une zone de semi-transparence du silicium et une zone d'absorption des capteurs de caméra, soit pratiquement le proche infrarouge. Il conviendrait aussi de changer de système d'éclairage en utilisant par exemple un laser YAG à 1,06 µm.

Pour des lames de verre recouvertes d'or ou d'argent, il sera difficile d'adopter la stratégie précédente. Pour les expériences rapportées en section IV.3, nous avons mis au point les paramètres du procédé avec une lame de verre non métallisée et procéder au tamponnage final à "l'aveugle" après mise en place du substrat métallisé. Tout repose alors sur la répétabilité de l'ensemble du procédé. Une configuration du banc de µTP avec une caméra disposée de façon à pouvoir observer à travers un tampon transparent pourrait s'avérer intéressante à terme.

Configuration		A	B	C	D
Utilisation		Champ très large (lame entière)	Champ moyen	Configuration standard	Configuration haute résolution
Distance de travail WD (mm)		WD_{min} = 356 mm WD_{nom} = 220 mm WD_{max} = 390 mm	WD_{min} = 175 mm WD_{nom} = 143 mm WD_{max} = 187 mm	WD_{min} = 92 mm WD_{nom} = 81 mm WD_{max} = 93 mm	WD_{min} = 36 mm WD_{nom} = 34 mm WD_{max} = 37 mm
Eléments du zoom		Connecteur Bague allonge x 2 Zoom x 6,5 Lentille frontale x 0,25	Connecteur Bague allonge x 2 Zoom x 6,5 Lentille frontale x 0,5	Connecteur Bague allonge x 2 Zoom x 6,5 Sans lentille frontale	Connecteur Bague allonge x 2 Zoom x 6,5 Lentille frontale x 2
Champ min et résolution max à WD_{min}	Grandissement	x 0,56	x 4,5	X 9	x 18
	Champ	Champ : 14,16 mm*	Champ : 1,77 mm*	Champ : 0,89 mm*	Champ : 0,44 mm*
	Résolution	15,06µm/pixel (H)** 14,60 µm/pixel (V)**	1,88 µm/pixel (H)** 1,82 µm/pixel (V)**	0.95 µm/pixel (H)** 0,92 µm/pixel (V)**	0.47 µm/pixel (H)** 0,45 µm/pixel (V)**
Champ max et résolution min à WD_{max}	Grandissement	x 0,09	x 0,7	X 1,4	x 2,8
	Champ	Champ : 91,36 mm*	Champ : 11,42 mm*	Champ : 5,71 mm*	Champ : 2.86 mm*
	Résolution	97,19 µm / pixel (H)** 94,19 µm / pixel (V)**	12,15 µm / pixel (H)** 11,77 µm / pixel (V)**	6,07 µm / pixel (H)** 5,87 µm / pixel (V)**	3,04 µm / pixel (H)** 2,95 µm / pixel (V)**

Tableau IV-2 : Le système de visualisation du banc de µTP.

* Suivant la diagonale

** Champ horizontal = 0,8 x champ diagonal

Champ horizontal = 0,6 x champ diagonal

IV.1.4 VUE GLOBALE DE LA MACHINE

Dans cette partie nous allons synthétiser ce qui précède pour avoir une vue globale du banc de µTP (Figure IV-11). Celui-ci est composé des parties suivantes :

(1) **une commande électronique et informatique** reliée à un PC avec un programme développé avec le logiciel LabView de National Instrument (NI). Le traitement des images de la caméra est effectuée avec le logiciel Vision NI.

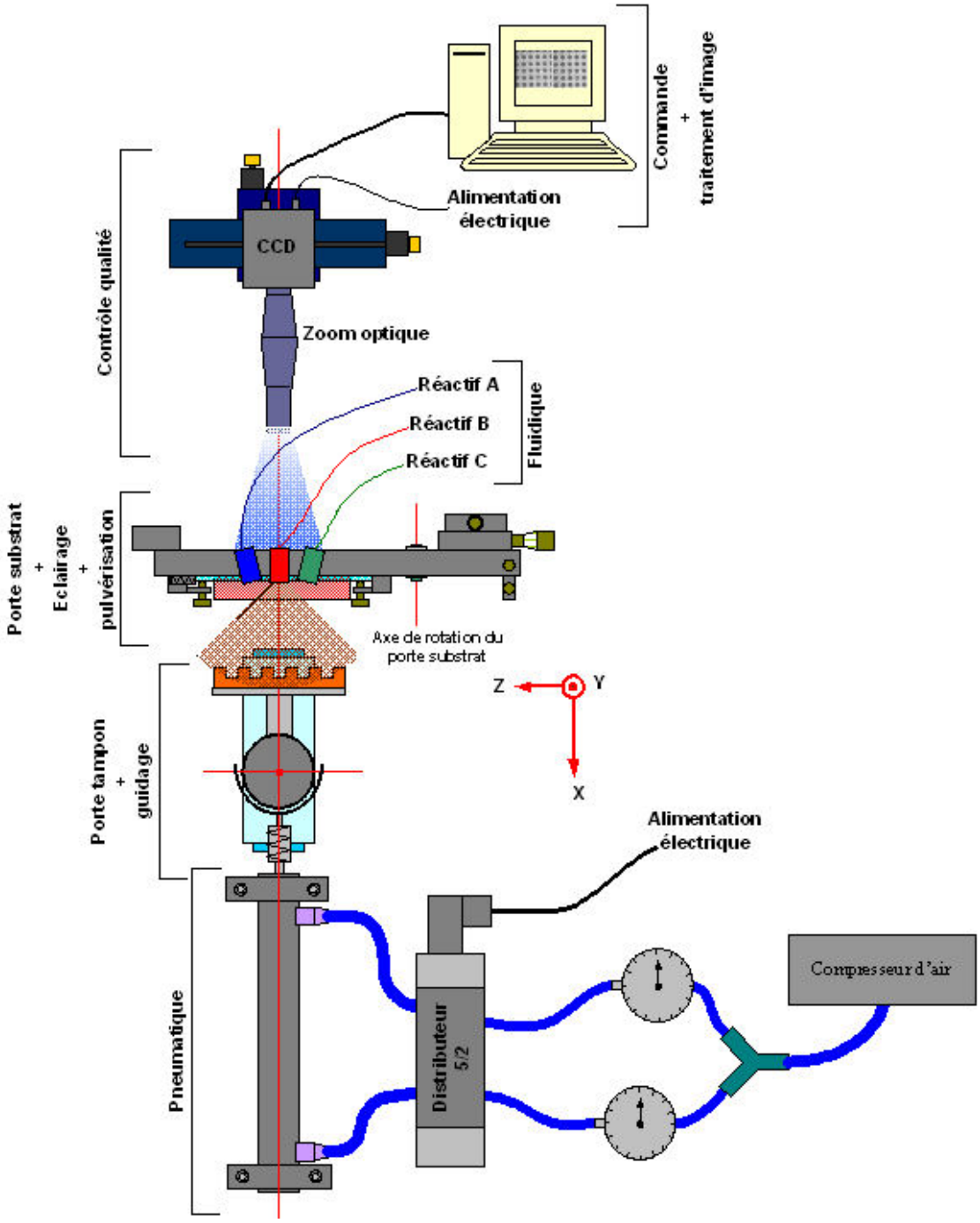


Figure IV-11 : Vue globale du banc de µTP avec trois têtes de pulvérisation.

(2) **un ensemble de visualisation** du processus comportant une caméra CCD et deux systèmes d'éclairage. La partie centrale du porte-substrat est évidée de sorte qu'en disposant la caméra CCD derrière la lame de microscope, il est possible d'observer par transparence le contact entre le tampon et le substrat ainsi que l'encrage du tampon.

(3) **un porte-substrat** permettant de placer dans la machine une lame de microscope et de l'orienter par rapport au tampon avec 2 degrés de libertés en translation YZ et un degré de liberté en rotation θ_x. Le changement de substrat est effectué manuellement mais le substrat est calé de manière reproductible, en le plaquant sur deux cotés qui définissent de fait le référentiel commun à tous les substrats.

(4) **un ensemble d'encrage automatique** du tampon ainsi qu'une buse de séchage disposés sur le porte-substrat en regard du porte-tampon ; l'encrage est basé sur un système de **pulvérisation** dédié à un produit (silane, thiol, réactif de synthèse,…). La buse de pulvérisation est compacte de sorte que l'on peut disposer **plusieurs têtes de pulvérisation** de manière permanente sur la machine : il est possible ainsi de pulvériser différents réactifs de manière complètement automatique au cours d'une production.

(5) **Une tête de tamponnage** mobile suivant l'axe Y sur laquelle est disposée un porte-tampon avec un tampon en PDMS. La tête de tamponnage comporte un réglage qui permet d'ajuster le parallélisme tampon-substrat. **Le porte-tampon est amovible,** avec un changement précis, de sorte que l'on peut mettre en contact différents tampons sur le même substrat.

(6) **Un système de guidage du mouvement de la tête de tamponnage vers le substrat** basé sur une glissière linéaire de précision, qui permet de mettre le tampon en contact avec le substrat de manière reproductible, c'est-à-dire en plaçant le motif de manière répétable par rapport au référentiel commun des substrats.

(7) **Un ensemble pneumatique** basé sur un vérin qui permet de déclencher le mouvement du tampon vers le substrat, de **contrôler la charge appliquée** au cours du contact tampon/substrat, puis de provoquer le décollement du tampon et du substrat.

La Figure IV-12, montre une vue isométrique 3D de la machine de tamponnage (sans les circuits fluidique et pneumatique et sans la caméra) tandis que la Figure IV-13 montre une vue du cœur du dispositif expérimental (sans la caméra) avec les différents constituants (vérin pneumatique, glissière linéaire de précision, accouplement flexible, système d'éclairage, système de pulvérisation,…).

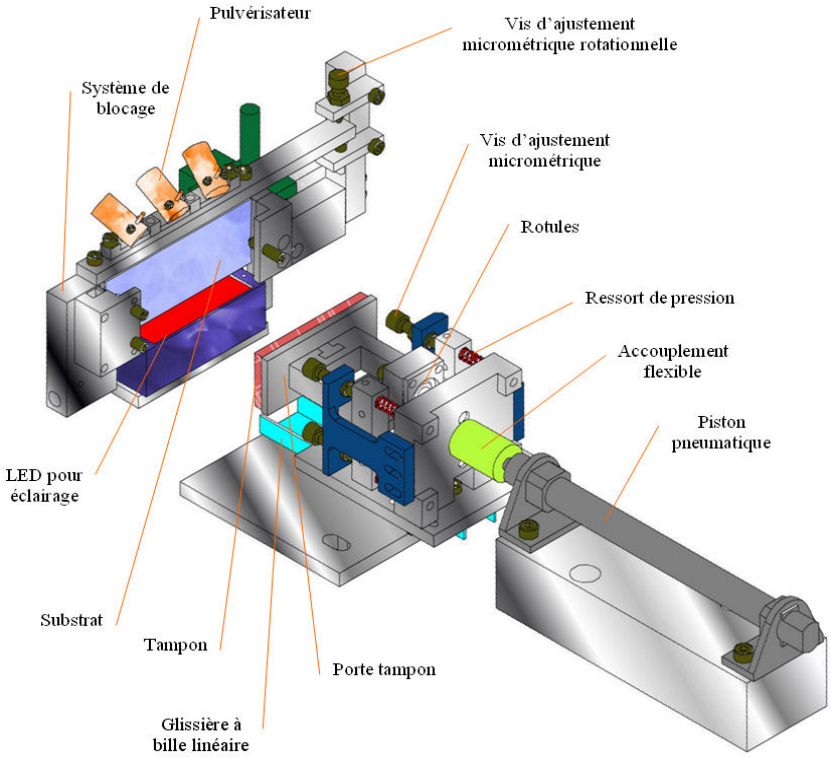


Figure IV-12 : Représentation 3D du banc de µtamponnage.

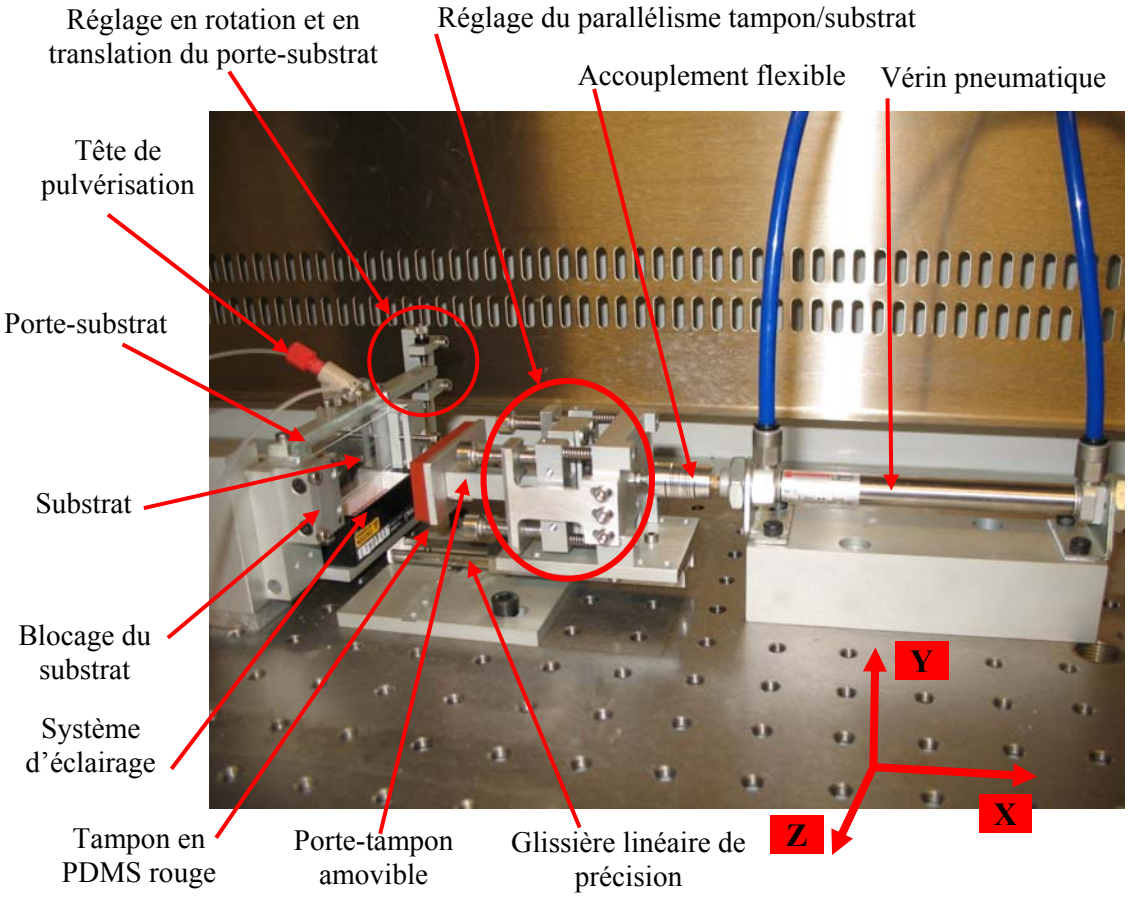


Figure IV-13 : Vue de la partie centrale du banc de µTP placé dans une hotte à flux laminaire.

IV.1.5 CONCLUSION

Le banc de µTP autorise plusieurs configurations qui sont résumées à la Figure IV-14 et qui peuvent être combinées pour procéder au :

a) tamponnage d'une séries de substrats après réglage de tous les paramètres du procédé sur le premier substrat ;

b) tamponnage de différents motifs (par changement du tampon) avec différents produits sur un même substrat;

c) tamponnage dans une enceinte anhydre à atmosphère contrôlée.

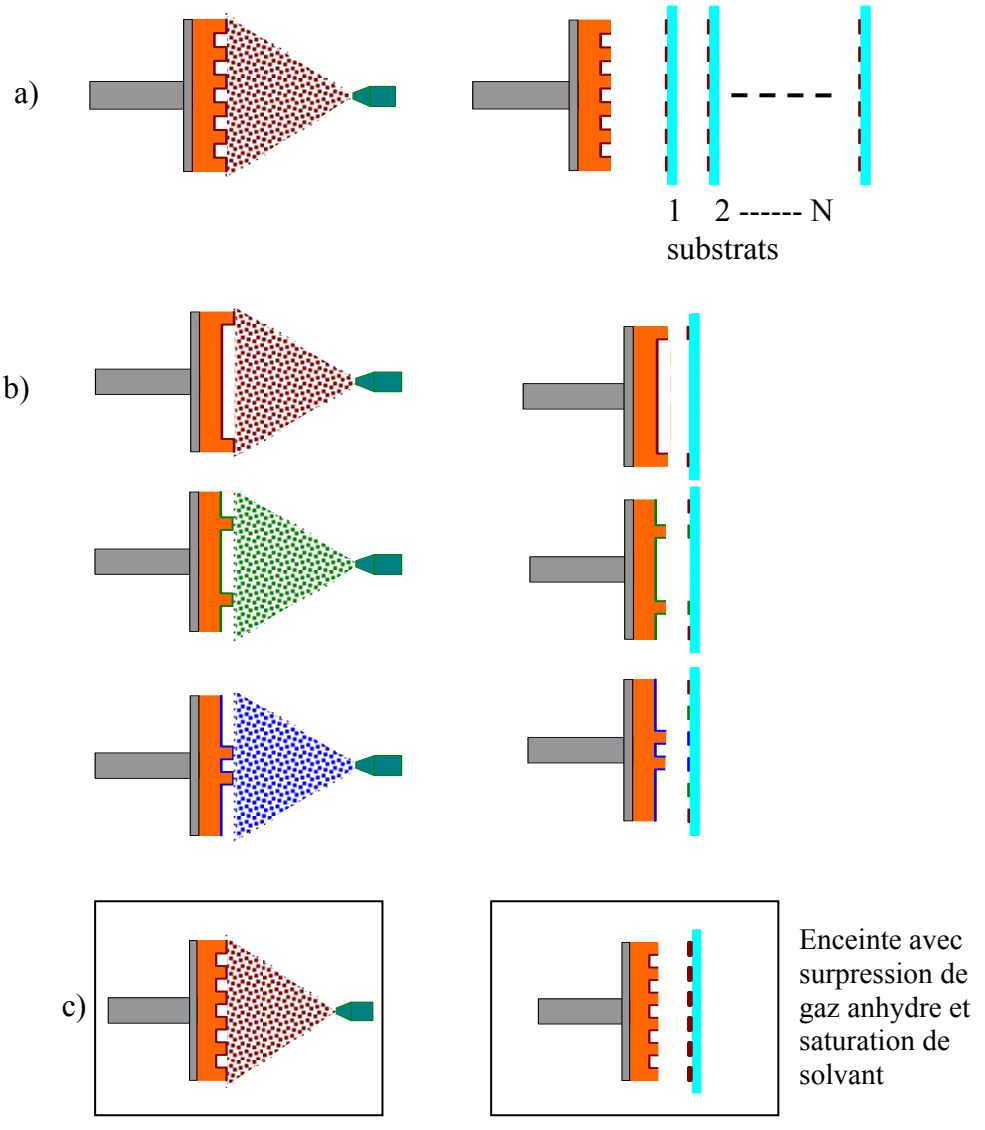


Figure IV-14 : Les différentes configurations du banc de µTP.

Le dispositif expérimental est extrêmement compact. Sans la caméra, il occupe un volume de travail de 30 x 15 x 10 cm^3 (Figure IV-13). La caméra et son zoom occupent une surface importante et le volume de travail passe alors à 60 x 20 x 15 cm. Dans la

configuration actuelle, le banc de µTP est placé dans une hotte chimique à flux laminaire de classe 100, c'est-à-dire avec un premier filtrage de l'enceinte de travail par recyclage et une évacuation de 30% du flux d'air vers l'extérieur après un deuxième filtrage. Cela permet à la fois de protéger l'opérateur des produits chimiques présents à l'intérieur de la hotte (en très faible quantité dans notre cas, provenant uniquement du système de pulvérisation) et de tenir le dispositif et les substrats (relativement) à l'abri de la poussière extérieure[1]. L'entrée de la hotte est en effet un rideau "virtuel" constitué par un flux laminaire d'air filtré.

IV.2 MISE EN ŒUVRE DU PROCEDE ET CARACTERISATION DE L'INSTRUMENT

IV.2.1 FABRICATION DES TAMPONS

Pour fabriquer un tampon, le point de départ est un maître-modèle en silicium usiné et fonctionnalisé à l'OTS (III.1.2), qui est ensuite découpé selon une forme rectangulaire par cassure après rayure avec une pointe diamant. Nous avons choisi cette forme car elle correspond à la géométrie des lames de microscope. Ce maitre-modèle est ensuite moulé par coulage de PDMS.

La question qui se posait était de fabriquer plusieurs tampons à partir du même maitre-modèle avec une référence géométrique commune. Nous avons de plus souhaité un accrochage du PDMS sur le porte-tampon facile, fiable et stable dans le temps, ce qui n'est pas aisé à réaliser chimiquement à cause de la nature hydrophobe du PDMS. Nous avons réalisé une liaison mécanique en adjoignant une encoche par usinage dans le porte-tampon de façon à pouvoir mouler une lèvre en PDMS. Par ailleurs, une prise en queue d'aronde prévue sur le porte-tampon sert de poignée pour manipuler celui-ci et permet de le disposer de manière répétable dans le banc de µTP (Figure IV-15 et Figure IV-16)

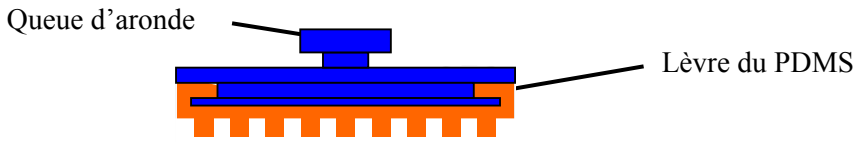


Figure IV-15 : Conception mécanique du tampon et du porte-tampon.

[1] Notons que pour être complètement efficace, cette hotte devrait être installée dans une salle grise de classe 10 000, ce qui n'est pas le cas actuellement.

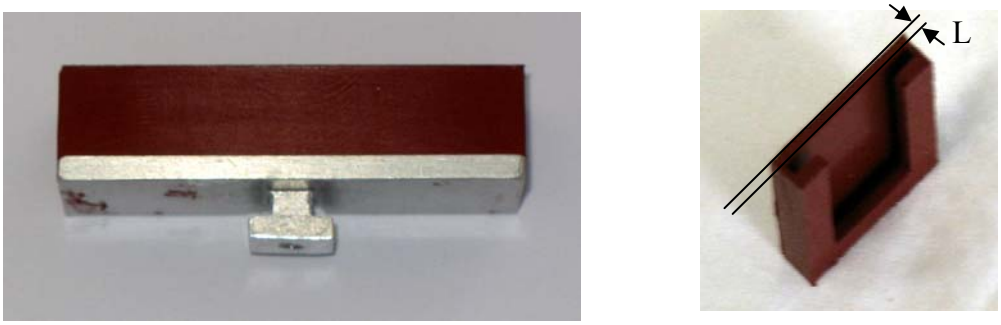


Figure IV-16 : Réalisations expérimentales porte-tampon/tampon.

A gauche : vue d'un ensemble complet porte-tampon/tampon.
A droite : vue en coupe d'un tampon avec les lèvres de maintien. L'épaisseur L peut être ajustée.

Nous avons aussi développé une **presse de moulage** afin de pouvoir fabriquer le tampon avec la lèvre de maintien. Cet instrument permet de mouler et aussi de presser car nous avons prévu de pouvoir faire varier l'épaisseur du tampon L de 0,5 mm à 8 mm (Figure IV-16). Cette **presse** correspond aussi aux besoins suivant :

- **aboutir à des tampons aussi plats que possible** afin de réduire la charge à exercer sur le tampon pendant l'opération de μTP ;
- mettre en place de manière répétable le maitre-modèle et le porte-tampon avec une référence commune, et de manière générale fabriquer des tampons avec une référence géométrique commune.

La presse est constituée en deux parties (Figure IV-17). La partie inférieure est formée d'une base sur laquelle est fixé un moule en dural anodisé constitué d'un cadre démontable en deux parties et d'un fond plat amovible. Ce dernier supporte le maitre-modèle. La partie supérieure contient une barre coulissante qui maintient le porte-tampon. Lors du démoulage, le cadre est démonté, ce qui facilite la séparation du tampon et du maitre-modèle et réduit le risque de détérioration du maître-modèle.

Le maitre-modèle en silicium est posé sur le fond amovible du moule et plaqué par une vis contre le rebord du cadre supérieur du moule. Ce fond amovible permet de placer des maitre-modèles de différentes épaisseurs. Le serrage et le maintien du silicium s'effectuent avec une vis.

Le porte-tampon, fixé sur la barre coulissante, est introduit d'une manière progressive dans le moule avec les vis de serrage et deux ressorts de rappel. Le guidage s'effectue via deux axes verticaux. La hauteur L du tampon est définie par des cales d'épaisseurs différentes placées entre la barre coulissante et le cadre du moule.

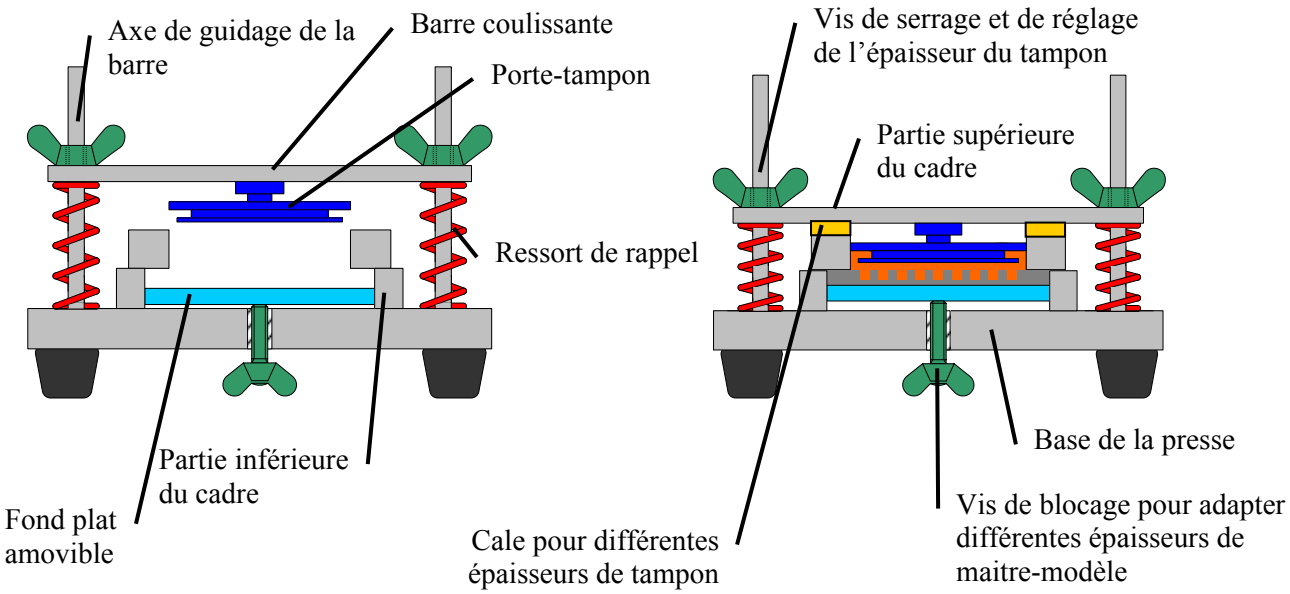


Figure IV-17 : Principe de la presse pour mouler le tampon.

IV.2.2 CARACTERISATION DU BANC DE MICROTAMPONNAGE

1. Reproductibilité mécanique du procédé

Notre objectif est maintenant d'étudier la reproductibilité mécanique du banc de µTP. Nous procéderons par comparaison. Pour ce faire, nous avons utilisé :

- un tampon avec un réseau de plots de diamètre 400 µm avec un espacement centre à centre de 640 µm ;
- une lame de microscope comportant des canaux µfluidiques d'une largeur de 70 µm en forme de croix d'électrophorèse.

La Figure IV-18 illustre le principe de la mesure avec la version préliminaire du banc de µTP de la section III.5.2.2 [182]. La figure de gauche montre une vue du contact tampon/substrat prise avec la caméra de l'instrument. La figure de droite montre le décalage du tampon après un aller-retour du vérin. Le substrat et porte-tampon ayant été laissés en place, ce décalage est attribué au manque de reproductibilité du mouvement du tampon. Il est évalué en superposant une image sur l'autre au niveau des croix et en mesurant le décalage des deux réseaux de plots avec un logiciel de traitement d'images (logiciel Paint Shop). Il s'agit donc bien d'une mesure différentielle à partir d'une référence arbitraire, qui permet d'évaluer une reproductibilité.

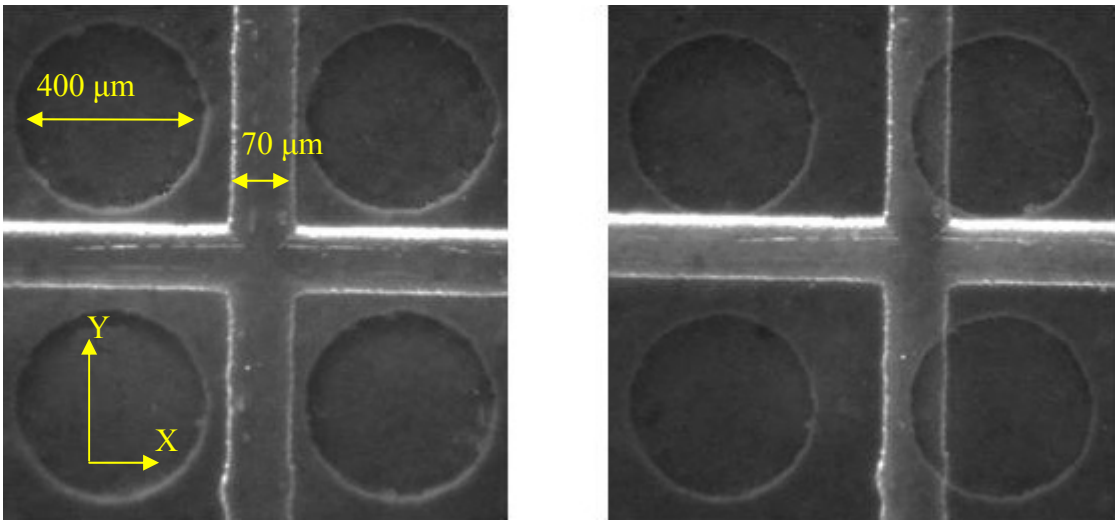


Figure IV-18 : Principe de la mesure de la reproductibilité mécanique du banc de µTP.

Images du contact tampon/substrat à travers une croix de référence gravée dans une lame de verre et un tampon comportant un réseau de plots (banc de µTP de la section III.5.2.2). A gauche : position initiale. A droite : décalage du tampon après un aller retour du vérin

Avec les améliorations apportées au banc de µTP décrites dans ce chapitre, le décalage est en fait beaucoup moins important. Il est donc nécessaire d'enregistrer les images à la résolution maximale du système de visualisation, soit 0,5 µm/pixel. A ce niveau de résolution, il est aussi nécessaire de répéter les mesures et de procéder à une étude statistique même simplifiée. Aussi, nous sommes nous intéressés à la répétabilité des opérations suivantes :

- tamponnages multiples sur un même substrat pour évaluer la reproductibilité du mouvement du tampon ;
- changement de substrat (décalage lors du changement au niveau du porte-substrat) ;
- changement de tampon (décalage lors de l'insertion et de l'enlèvement du porte-tampon).

A chaque fois, la mesure de la reproductibilité[1] a consisté à :

- faire varier un paramètre en procédant à :
  - n allers/retours du tampon jusqu'au contact avec le substrat ;
  - ou n enlèvements/remises en place du substrat dans le porte-substrat ;
  - n enlèvements/remises en place du porte-tampon dans la tête de tamponnage ;
- à enregistrer les n images au format JPG des contacts ;

[1] En laissant inchangés le réglage du parallélisme tampon/substrat et la pression pneumatique (1,5 bar).

- à analyser les séries d'images ; le principe de l'analyse consistant à prendre une image comme référence commune et à lui superposer les n - 1 autres images en prenant la croix comme motif commun.

Toutes les mesures ont été répétées à 20 reprises. Au final, les reproductibilités ont été estimées en se basant sur l'écart type des variations de la position d'un plot par rapport à la croix. Le Tableau IV- résume les résultats expérimentaux.

	Actionnement du vérin	Changement de substrat	Changement de tampon
Ecart type suivant x (20 mesures)	0,5 µm	2,1 µm	1,8 µm
Ecart type suivant y (20 mesures)	0,5 µm	1,8 µm	10,6 µm

Tableau IV-3 : Reproductibilité mécanique du banc de µtamponnage

La colonne 1 montre que la répétabilité du mouvement du plaquage de la tête de µTP est de l'ordre 0,5 µm. Ce résultat est très important puisqu'il valide la conception de base du banc de µTP ainsi que notre analyse du comportement de la tête de tamponnage (cf. discussion sur le glissement en section V.4).

La colonne 2 concerne le changement de substrat tandis que la colonne 3 montre que le changement de porte-tampon est dissymétrique car plus faible suivant l'axe x que l'axe y. Cette dissymétrie s'explique par un manque de précision du système de fixation du porte-tampon à queue d'aronde selon y. Il devrait être possible de pallier ce défaut et de passer en dessous de 2 µm pour toutes ces valeurs De manière générale, nous pensons qu'une itération supplémentaire dans la conception du porte-substrat et du système de fixation du porte-tampon permettra de ramener l'écart type en dessous de 2 µm. **Après cette optimisation à venir, la répétabilité mécanique du banc de µTP devrait être proche de celle des photomasqueurs microélectroniques fonctionnant dans l'UV à 360 nm (~1 µm). Ces résultats confirment l'intérêt de notre dispositif par rapport à des bancs de wafer bonding ou des photomasqueurs modifiés pour le µTP, alors que notre instrument est beaucoup plus compact et moins coûteux**.

2. Résolution du réglage du parallélisme tampon-substrat

Dans cette partie, nous nous intéressons à la résolution du réglage du parallélisme entre le tampon et le substrat.

Pour ce faire, nous avons fabriqué un tampon plat de surface 22 x 18 mm² sur lequel sont disposées trois croix sortantes de hauteur 12 µm et de longueur 140 µm disposées à 12 et 15 mm entre elles (Figure IV-19). **Ces motifs peuvent donc être considérés comme étant pratiquement isolés.** Notre objectif était de vérifier si la résolution du réglage du parallélisme du mécanisme portant le tampon était suffisante pour plaquer simultanément les trois motifs sur une lame de microscope.

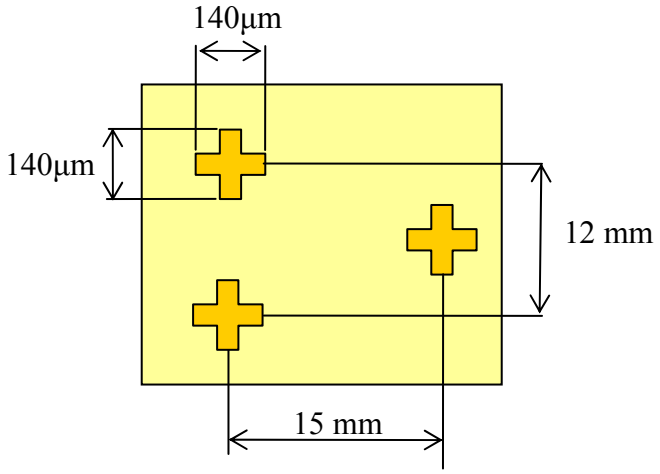


Figure IV-19 : Plan du tampon avec un motif à trois croix sortantes de hauteur 12 µm.

Dans un premier temps, nous avons procédé en poussant le tampon à la main jusqu'au contact. La caméra du banc de µTP permet d'observer si les croix sont en contact et par itérations successives avec les vis micrométriques de réglage, nous avons réussi à régler le parallélisme de façon à n'avoir que les croix en contact. Ainsi la Figure IV-20 (au centre) montre une image reconstituée (avec une prise de vue pour chaque croix) où l'on voit les trois croix simultanément en contact avec le substrat sans qu'il y ait affaissement du tampon. En mettant ensuite en place un substrat verre/chrome/argent, nous avons réussi à transférer les motifs d'HDT, puis à graver l'argent. (Figure IV-20 droite). Seuls les motifs en croix apparaissent après cette gravure, ce qui prouve qu'il n'y a eu contact et transfert de thiols qu'au niveau des motifs. La Figure IV-21 résume la situation : la résolution du réglage du parallélisme du tampon/substrat a permis de réduire par itérations l'angle α de façon à plaquer simultanément les trois croix.

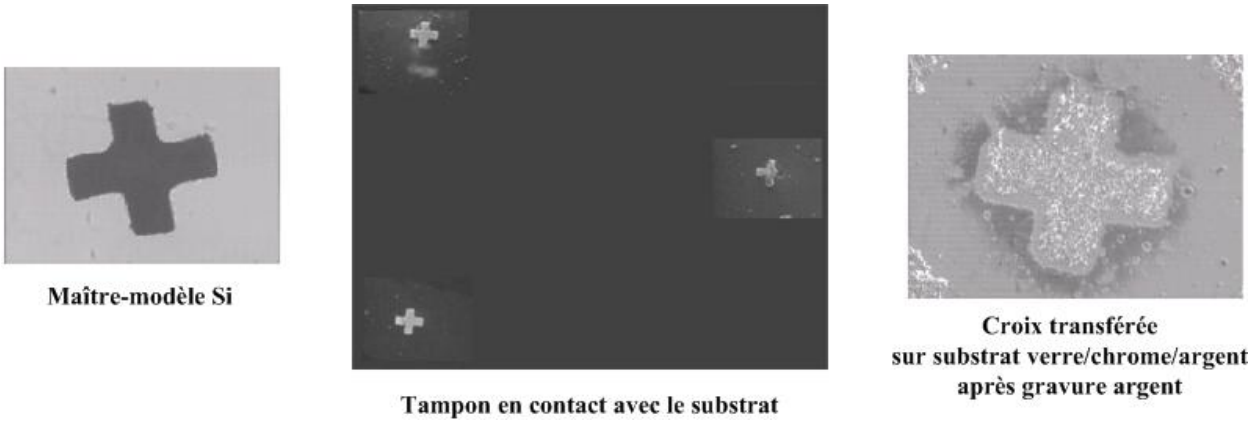


Figure IV-20 : µtamponnage avec motif à trois croix.

A gauche : détail du maitre-modèle en silicium après gravure RIE (microscope optique).

Au centre : vue du contact tampon/lame de microscope par intégration de trois images (caméra du banc de µTP).

A droite : vue d'un substrat verre/chrome/argent après transfert d'HDT sur argent et gravure de la couche d'argent (microscope optique).

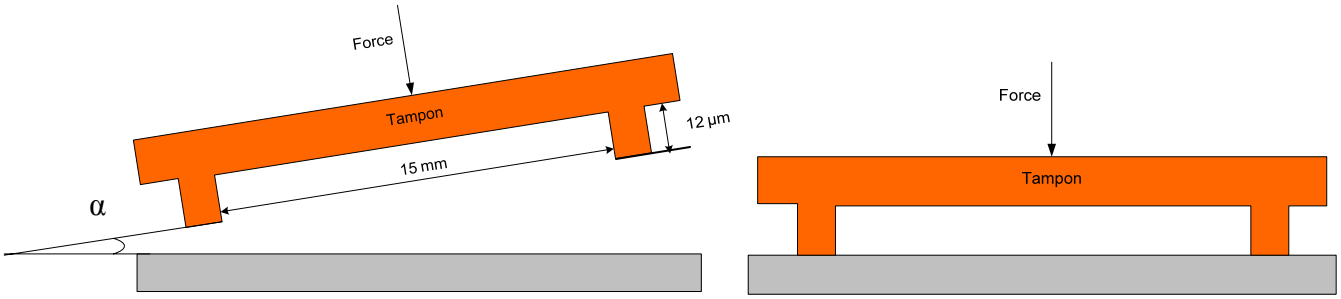


Figure IV-21 : Plaquage du tampon sur le substrat après rotation du tampon.

Lorsque nous avons essayé de plaquer ces motifs avec une pression pneumatique, le tampon s'est déformé et sa base s'est plaquée sur le substrat. La pression pneumatique minimale de 0.3 bar permettrait presque de transférer les motifs sans perte de résolution mais le mouvement du tampon est alors insuffisamment fiable. La Figure IV-22 montre ce qui se passe. Le Chapitre V sera entièrement consacré au traitement de cette question.

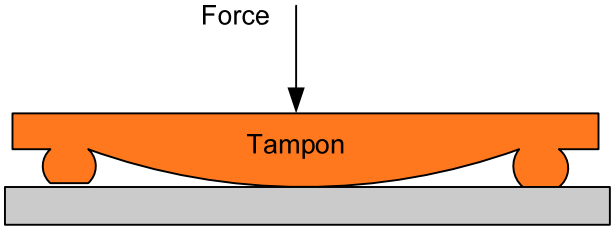


Figure IV-22 : Ecrasement des motifs isolés du tampon.

IV.3 APPLICATION A LA GRAVURE DE CIRCUITS MICROFLUIDIQUES EN VERRE

En collaboration avec les autres chercheurs du laboratoire, nous avons utilisé le banc de µTP, pour transférer des motifs non isolés. Ce projet fait l'objet d'une publication en cours de préparation, qui a été reportée en Annexe 7 avec le détail des protocoles. Nous nous contenterons ci-dessous d'un bref résumé.

L'objectif de ce travail est de développer une méthode originale de fabrication de circuits µfluidiques et de µlaboratoires sur puce en verre. Cette méthode est basée sur l'utilisation exclusive du µTP pour définir le motif à graver et sur la mise en œuvre de gravures par voie humide.

La Figure IV-23 montre une vue d'ensemble du procédé en prenant comme exemple la gravure d'un µlaboratoire sur puce de séparation par électrophorèse. Le substrat est une lame de microscope en verre sodocalcique (donc peut coûteuse) recouverte d'une couche de 150 nm de chrome et 40 nm d'argent. Après transfert par µTP d'un motif de masquage HDT, le motif est transféré à la couche d'argent, puis à celle de chrome par trempage dans une série de béchers (Figure IV-24). Le dernier masque de chrome permet de procéder à la gravure du verre avec une solution optimisée de BOE. Après enlèvement de la couche de chrome, l'on obtient le circuit en verre de la Figure IV-25, qui est gravé avec une profondeur de 20 µm. Notons qu'il s'agit d'un procédé original, les publications existantes ne concernant que la gravure du silicium ou de fines couches de silice thermique.

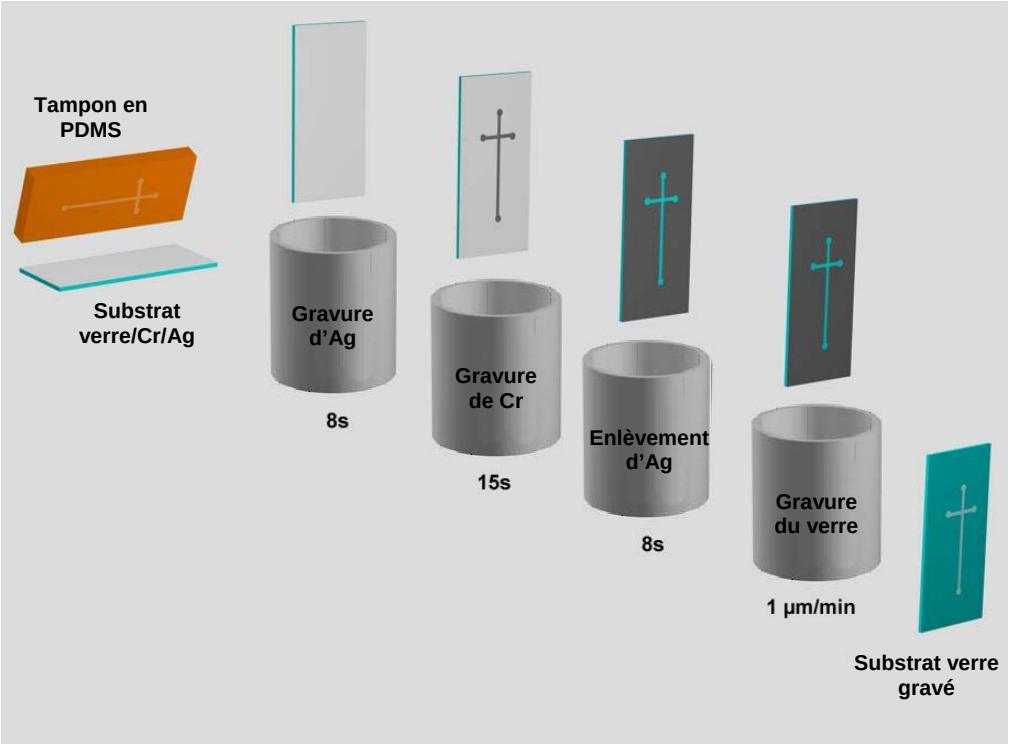


Figure IV-23 : Principe du procédé de gravure de circuits µfluidiques en verre avec masquage par µTP.

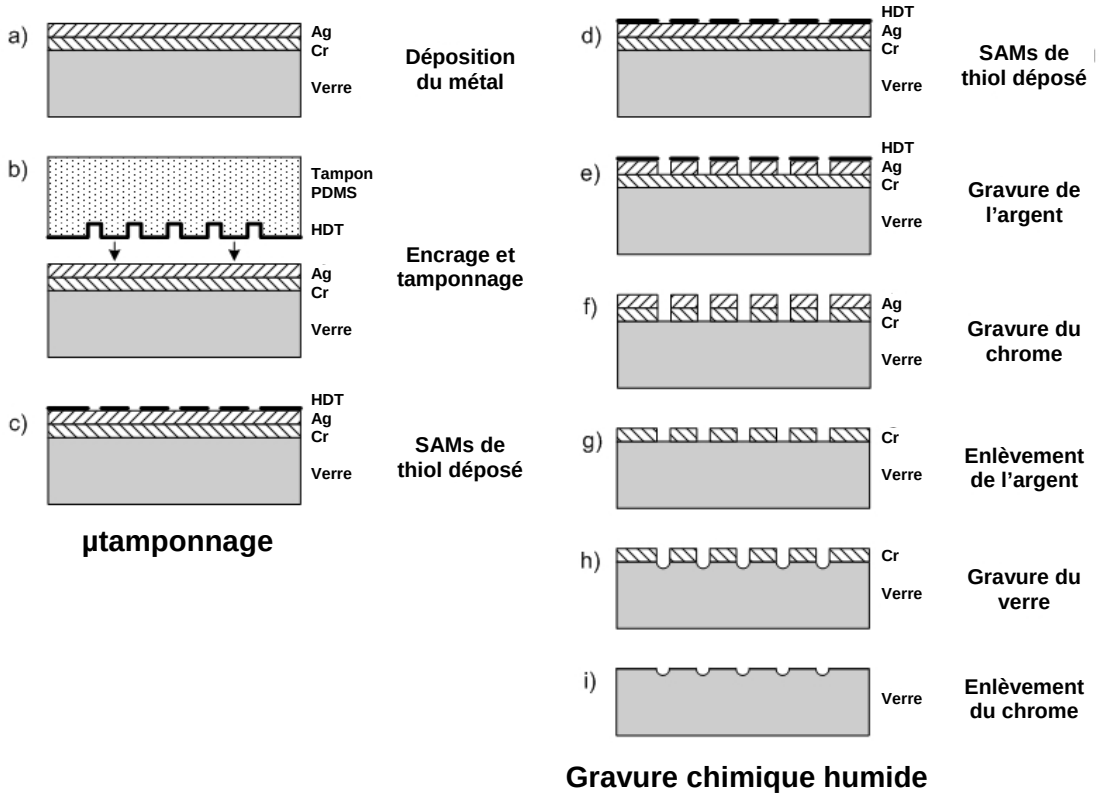


Figure IV-24 : Tamponnage et gravure humide d'une structure verre/chrome/argent.

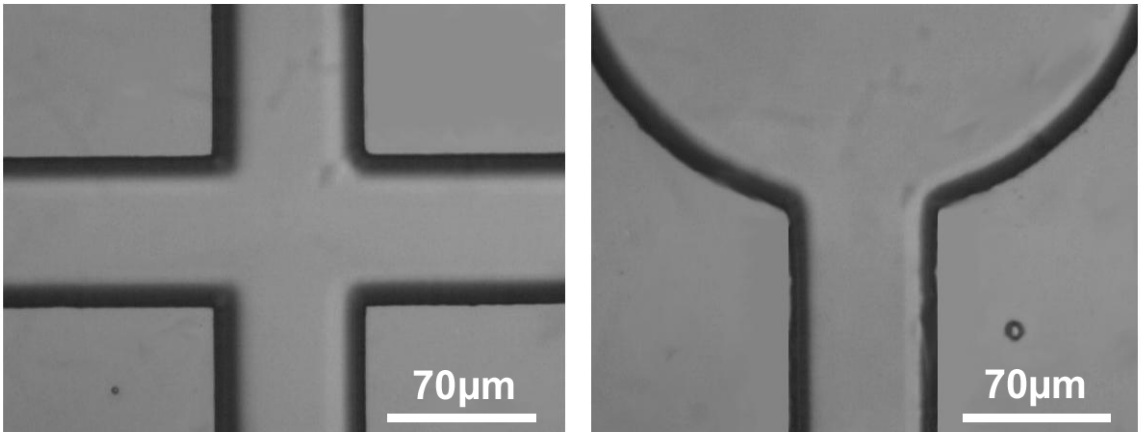


Figure IV-25 : Circuit en verre avec croix et réservoir gravés avec masquage par µTP.

Paramètres du µTP : pulvérisation de 10 µL d'HDT (10^{-3} mol.L^{-1} dans l'éthanol) sur une surface de 23 x 48 mm² pendant 10 s à 1,1 bar. Le temps de contact est de 60 s avec une pression pneumatique du vérin de 0.7 bar.

Nous avons aussi démontré qu'il s'agit d'un microsystème séparatif fonctionnel. En effet, après recouvrement de ce circuit avec une feuille de PDMS, ce dispositif a permis de séparer avec succès des biomolécules ayant trait à une application biologique. Celle-ci concerne la détection de cystéines protéases de la bactérie *Porphyromonas gingivalis,* qui peut causer des infections sévères des gencives. Pour ce faire, nous avons pu disposer d'un antigène RgpB et d'un anticorps monoclonal anti-RgpB. Le µlaboratoire sur puce obtenu par ce procédé a permis de séparer l'antigène RgpB, l'anticorps anti RgpB, ainsi que le complexe formé par les deux, de manière tout à fait comparable à un µlaboratoire sur puce basé sur la même architecture mais dont la gravure du verre a été masquée de manière conventionnelle par photolithographie (Figure IV-26).

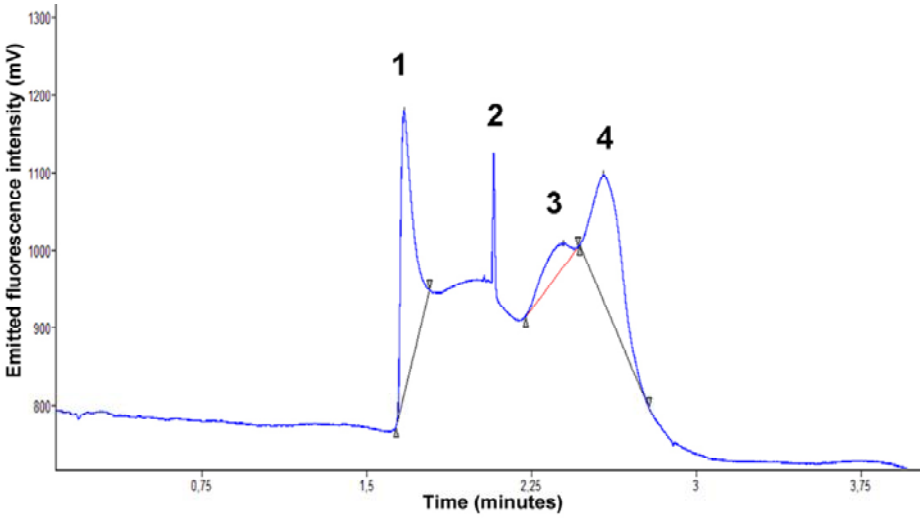


Figure IV-26 : Séparation de biomolécules par électrophorèse avec un µlaboratoire verre/PDMS.

Séparation d'un mélange d'antigène RgpB et d'anticorps monoclonal anti RgpB marqués au CY3 à 250 V/cm dans un tampon borax 10 mM. Le pic 1 a été identifié à l'anticorps monoclonal anti RgpB ; le pic 2 est un artefact instrumental ; le pic 3 a été identifié à l'antigène RgpB et le pic 4 au complexe antigène-anticorps.

A condition de disposer de lames de microscopes métallisées[1] et de maîtres-modèles correspondant aux circuits µfluidiques[2], ce procédé de gravure peut être mis en œuvre par les chimistes ou les biologistes non équipés de technologie microélectronique et/ou de salle blanche. Il est aussi peu coûteux tant en réactifs qu'en équipement. Ce procédé est aussi très rapide, soit quelques secondes par étapes, sauf pour l'étape finale de gravure du verre qui est effectuée à la vitesse de 1 µm/min. L'ensemble constitué par le banc de µTP et la verrerie pour la gravure est compact et peut être installé dans une hotte chimique.

Le banc de µTP permet de fiabiliser ce procédé de fabrication de circuits µfluidiques en verre (encrage intégré, durée du contact, charge, contrôle qualité par caméra,…) et de produire de manière reproductible de petites séries de substrats. La répétabilité du positionnement des motifs permettra d'intégrer les substrats dans des structures plus complexes (architecture multi-niveaux, entrées/sorties fluidiques,…) ou encore d'aligner les canaux µfluidiques sur des motifs préexistants dans le substrat (guides d'onde optique, réseau de microélectrodes,…). La vitesse de fabrication est telle, qu'il sera possible d'envisager une production de masse de circuits µfluidiques basée sur cette technologie.

IV.3.1 CONCLUSION

Le banc de µTP est un dispositif qui reste dans l'esprit flexibilité, faible coût et grande résolution des procédés de Lithographie Souple. La simplicité est l'une des caractéristiques de cet instrument. Il nous aurait même été possible de nous passer complètement d'ordinateur pour commander la machine.

Pour la construction du banc de µTP, nous avons proposé une solution cohérente avec des composants mécaniques commerciaux peu onéreux (vérin, distributeur, régulateurs, ressorts, coupleur, ressorts de rappel,…) et avec des pièces obtenues avec des moyens d'usinage conventionnel. Le tamponnage en lui-même est actionné de manière complètement automatique. Nous avons doté le banc de µTP d'un système d'encrage, d'un système de vision par caméra, de la possibilité de changer de tampons et de substrats, ainsi qu'un ensemble de réglages mécaniques qui rendent cet outil d'un usage très facile et souple.

On peut considérer que la répétabilité du banc de µTP sera de l'ordre de 2 µm, lorsque l'on aura procédé aux toutes dernières améliorations instrumentales (changement de tampon, changement de substrat). Le banc de µTP sera alors un outil proche d'un point de vue

[1] Ces lames pourront sans doute être fournies par des industriels ou des laboratoires de microélectronique.
[2] Le LEOM développe actuellement des méthodes de fabrication flexibles et peu coûteuses de maîtres-modèles

mécanique à un photomasqueur lithographique fonctionnant dans l'UV (~ 1 µm), mais beaucoup moins compact et beaucoup moins coûteux.

Pour des motifs "pleins", nous avons réussi à mettre en œuvre le banc de µTP avec un procédé original de gravure de circuits µfluidiques en verre. Lorsque le tampon comporte des motifs isolés, le point faible du banc de µTP est le contrôle de la charge appliquée sur le tampon, qui n'est pas compatible avec un actionnement automatique par vérin pneumatique. Le chapitre suivant sera consacré à l'amélioration du contrôle de la charge sur le tampon.

Chapitre V

BANC DE MICROTAMPONNAGE AVEC CHARGE CONTROLEE PAR RETROACTION

Lorsque nous avons cherché dans le chapitre précédent à tamponner des motifs isolés, il est apparu qu'il est nécessaire de réduire la charge exercée sur le tampon. La solution la plus facile à mettre en œuvre consiste à réduire la pression pneumatique du banc de μTP mais l'on aboutit rapidement à une valeur inférieure à celle correspondant à la pression d'air minimale permettant d'actionner le vérin. Cette pression limite permet de vaincre les frottements du piston, le fonctionnement du vérin restant chaotique avec beaucoup de faux départs. Il convenait donc de chercher une solution permettant de réduire la charge exercée sur le tampon tout en fiabilisant le fonctionnement du banc de μTP.

Nous avons commencé par remettre en cause le choix du piston pneumatique en envisageant différentes solutions basées sur des moteurs (pas à pas, à courant continu, linéaire magnétique,…) à la place du vérin. En fait, le vérin pneumatique a deux fonctions : (i) plaquer et décoller le tampon, (ii) exercer une charge faible et contrôlée pendant le contact. Il parait peu pertinent de remplacer le vérin par un moteur car la première fonction est assurée par le vérin de manière très économique et la deuxième n'est assurée de manière réellement satisfaisante par aucun dispositif : ainsi le moteur pas à pas peut perdre des pas, etc…

En conservant la solution "vérin", nous avons cherché à réduire la pression minimale de fonctionnement. Cela nous a conduit à étudier l'architecture interne des vérins pour mettre en ouvre des pistons à très faible frottement commerciaux ou qui aurait pu être fabriqués par nos soins. Cependant les modèles publiés récemment sur le fonctionnement des vérins pneumatiques [186-188], montrent que par principe ces dispositifs sont fortement non linéaires à cause de la compressibilité de l'air dans le piston. Un contrôle très précis de la charge aurait nécessité le développement d'une régulation spéciale. Nous avons donc cherché une solution plus directe au problème posé.

V.1 PRINCIPE DE BASE

La solution envisagée repose sur une séparation des fonctions. Le vérin servira toujours à procéder au contact mais le réglage de la charge ne sera plus assuré directement par la pression pneumatique. Pour ce faire, le principe consiste à disposer une butée de hauteur réglable dans le porte-substrat sur laquelle viendra se plaquer le porte-tampon sous l'effet de la poussée du vérin. Cette solution est schématisée sur la Figure V-1 avec deux butées, ce qui correspondra à la première réalisation expérimentale. Pour un tampon d'épaisseur initiale L et d'épaisseur L' sous charge, la hauteur D des butées est réglée de sorte que :

$$D = L' + e \qquad \text{et} \qquad e \leq D \leq e + L \qquad (V.1)$$

Avec :

L = épaisseur initiale du tampon ;
L'= épaisseur du tampon après le contact avec le substrat ;
D = hauteur des butées ;
e = épaisseur du substrat.

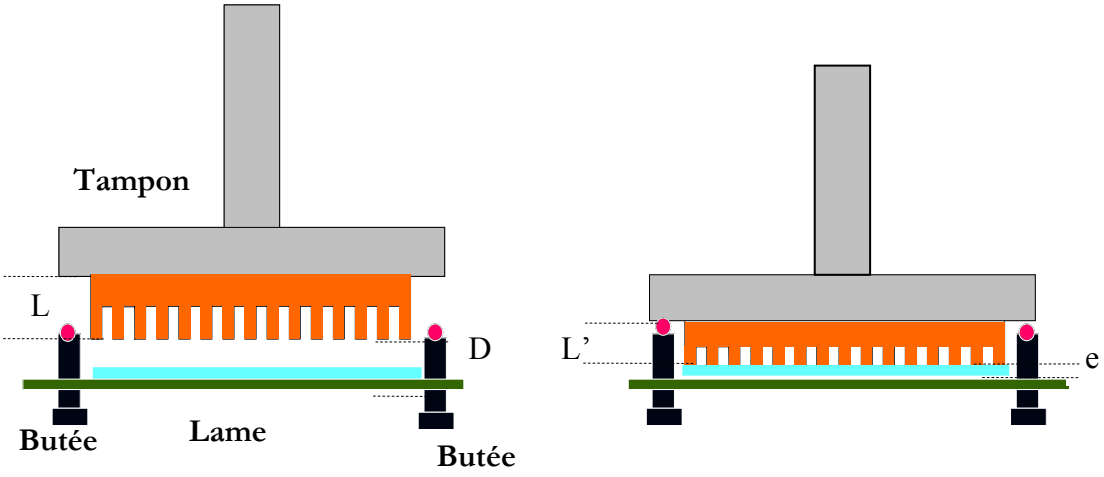


Figure V-1 : Contrôle de la charge sur le tampon par butées micrométriques.

Si nous faisons le bilan des forces sur le porte-tampon à l'équilibre, lors du contact celui-ci est soumis à (Figure V-2) :

- la force F exercée par le vérin,
- les réactions F_{b1} et F_{b2} exercées par les butées avec $F_{b1} = F_{b2}$ par raison de symétrie,
- la réaction f exercée par le tampon suite à sa compression.

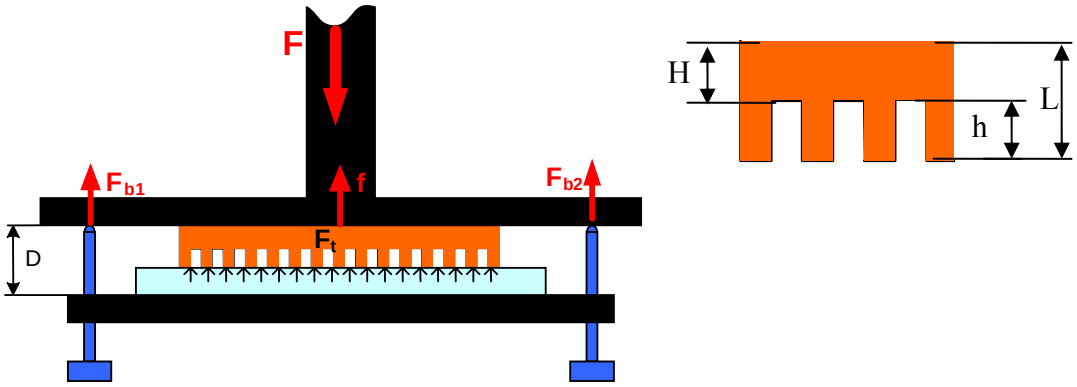


Figure V-2 : Bilan des forces sur le porte-tampon.

Si l'on considère maintenant le tampon à l'équilibre, la charge à laquelle il est soumis correspond à f. Pour simplifier, il est possible d'estimer f en considérant que nous utiliserons dans ce chapitre des tampons avec une base d'épaisseur H très supérieure à la hauteur de h des motifs : soit par exemple respectivement 1 mm et 10 µm pour H et h. Au premier ordre, on peut donc considérer que le bloc de PDMS est homogène est que la charge exercée sur le tampon est simplement définie par la loi de Hooke, soit

$$f = E\ S\frac{L-L'}{L} = E\ S\frac{L-D+e}{L} \qquad \text{(V.2)}$$

Avec :

E= module d'Young du tampon ;
S= surface du tampon en PDMS ;
D = hauteur des butées ;
e = épaisseur du substrat ;
L = épaisseur totale du tampon avant contact (L = H + h).

Ainsi la charge exercée sur le tampon est désormais fixée par un paramètre réglable très simplement d'un point du vue expérimental : la hauteur D des butées. Par construction, la force exercée par le vérin se répartie entre une première composante sur le tampon indépendante de la pression pneumatique et une deuxième composante variable sur les butées et dépendant de la pression pneumatique. Les butées exerçant une réaction qui vient compenser automatiquement cette composante, elles compensent toutes les fluctuations du vérin. Pour ce qui concerne le tampon, l'on peut donc considérer que la charge qu'il voit est régulée par une contre-réaction mécanique. D'un de point expérimental, ce principe simple a permis de fiabiliser le fonctionnement du banc de µtamponnage car la pression d'air du vérin peut être largement supérieure à la pression minimale permettant de vaincre les frottements.

Ce principe permet aussi de réduire de manière considérable la charge exercée sur le tampon. En effet le "moteur" de la déformation des motifs du tampon n'est plus la force globale exercée par le vérin (soit 7,8 N/bar) mais la contrainte fixée par la hauteur des butées. De plus, comme le montre la Figure V-3, si l'on considère un motif particulier du tampon, au premier ordre sa déformation sera indépendante du voisinage, ce qui s'avèrera intéressant pour l'alignement (Figure V-15).

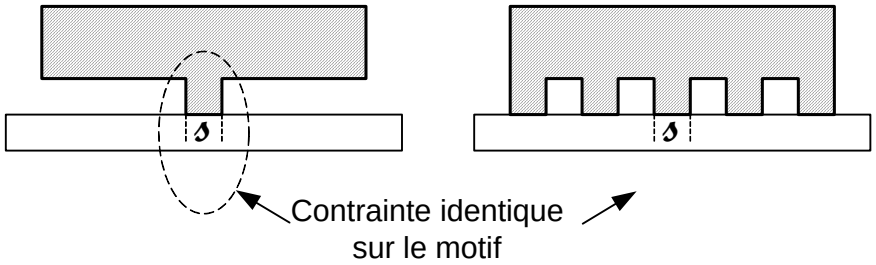


Figure V-3 : Avec les butées micrométriques, la charge sur le motif ne dépend pas du voisinage.

V.2 DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Nous avons modifié le banc de µTP pour introduire deux butées à vis micrométrique à réglage manuel avec un pas de 250 µm/tour, soit une résolution de 2 µm. La Figure V-4 montre comment sont montées les butées dans le dispositif expérimental tandis que la Figure V-5 montre une vue 3D d'ensemble du banc de µTP modifié. Il a été nécessaire de rigidifier le banc de µTP afin réduire la flexion de la machine pendant le contact. En effet cette flexion doit être inférieure à la résolution de la butée, sinon le dispositif serait inopérant : la rétroaction mécanique serait incontrôlable car gouvernée par la flexion de la machine. A noter que dans cette version finale de l'instrument, ce n'est pas directement le porte-tampon qui comprime la butée mais le support de la tête de tamponnage.

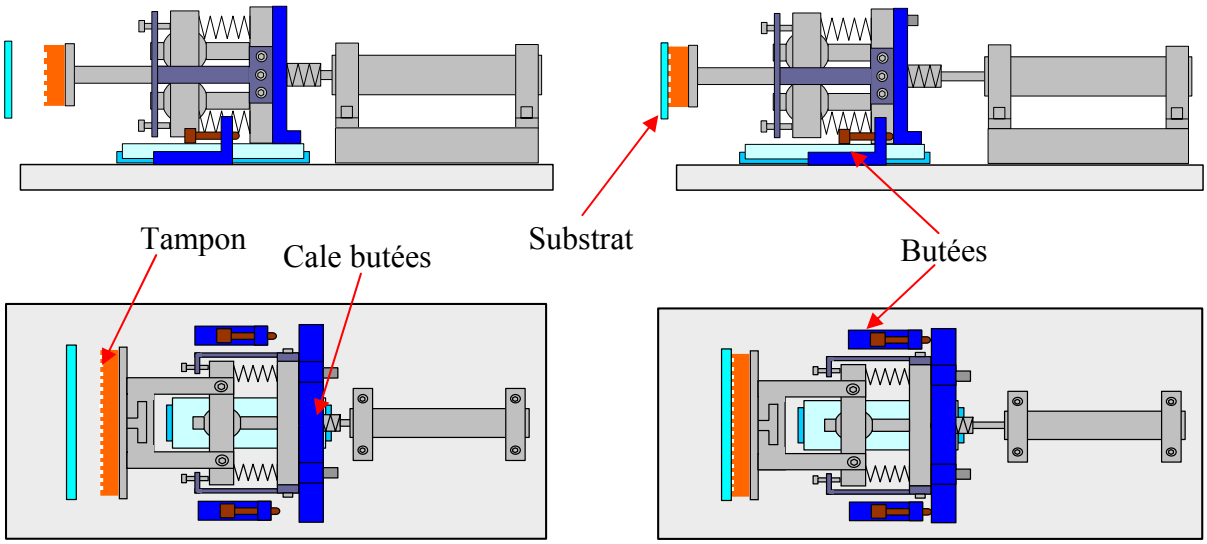


Figure V-4 : Vue du banc de µTP avec les deux butées à vis micrométrique avant et après contact.

Pour fixer les idées, soit un motif isolé sur le tampon avec une surface s élémentaire de 30 x 140 µm et une hauteur h de 15 µm. Supposons que le tampon ait une épaisseur de 1 mm avec une compression de 2 µm soit L = 1000 µm et L'=996 µm. D'après ce qui précède, avec un module d'Young de 4,4 MPa, le motif est soumis à une contrainte égale à 8 800 Pa, soit une charge d'environ 74 µN en tenant compte de sa surface. Avec le dispositif du chapitre précédent (sans butée), la pression d'air minimale de 0,3 bar correspond une charge de 2,3 N sur le tampon. **La mise en place des butées a donc permis de réduire la charge de cinq ordres de grandeur. Elle a permis aussi de régler la charge sur le motif avec une très grande résolution de 32 N/µm, qui correspond à la résolution des butées à vis micrométriques soit environ 2 µm.**

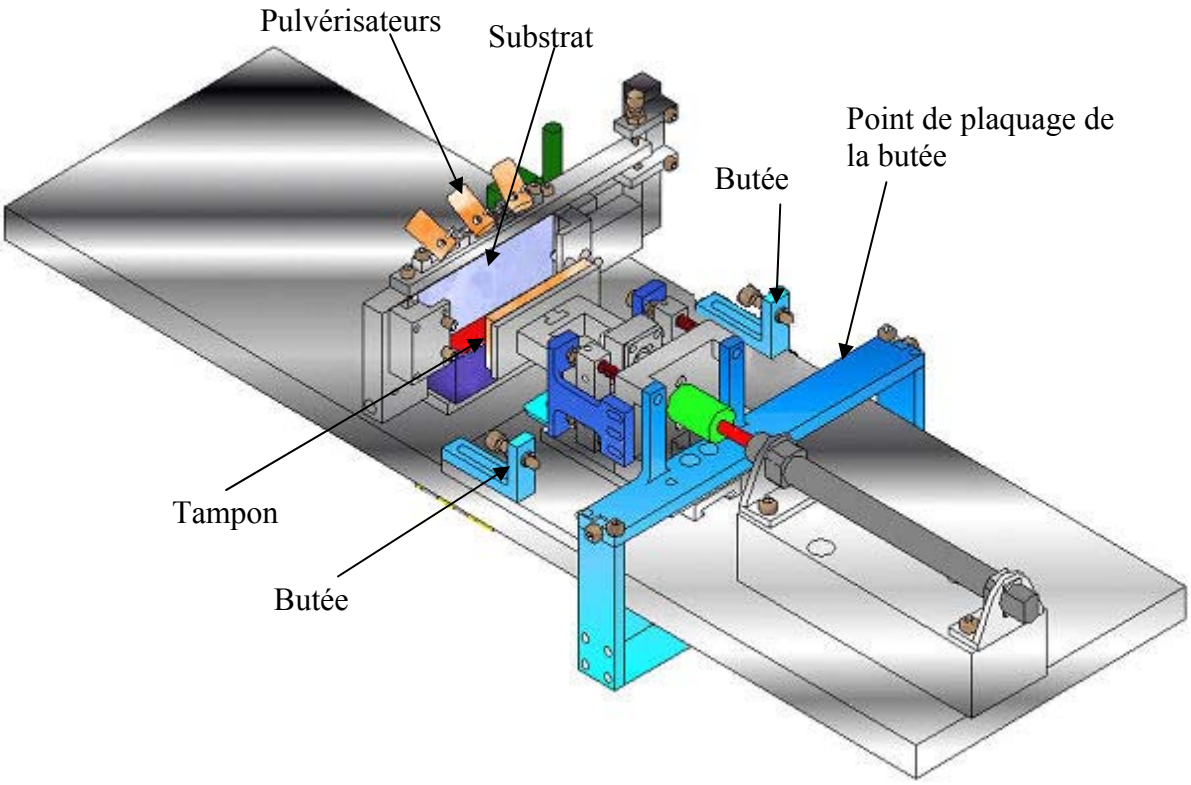


Figure V-5 : Vue 3D du banc de µTP avec les deux butées réglables à vis micrométrique.

En reprenant les expériences menées avec le tampon à trois croix (IV.2.2.1) et en procédant au réglage du parallélisme tampon/substrat, puis à celui des butées, nous avons réussi à mettre en contact simultanément les trois croix en exerçant une pression pneumatique de 1 bar. **Le principe des butées permet donc effectivement de concilier le contrôle du mouvement du tampon par le vérin avec le contrôle de la charge.**

En faisant varier la hauteur des butées, il est possible d'aller ou non jusqu'au contact. L'éclairage à fibres optiques permet d'avoir une vue en pseudo relief du motif mais ne permet pas d'établir s'il y a contact ou non. L'extinction de l'éclairage à fibres optiques et la mise en route de l'éclairage à LEDs, qui éclaire la zone de contact par guidage de la lumière à travers le verre, permet de discriminer s'il y a contact ou non (Figure V-6).

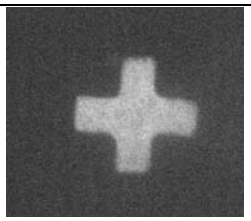
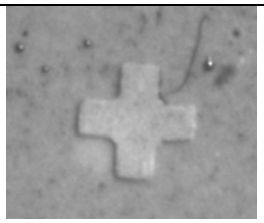
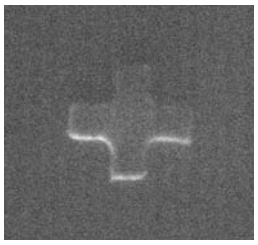
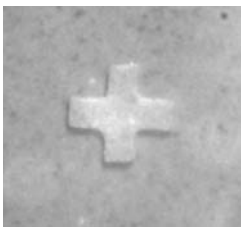
Eclairage rasant à LEDs	Eclairage non rasant à fibres optiques
 (1) hauteur des butées $5 \leq D' \leq 8$ µm	 (2) hauteur des butées $5 \leq D' \leq 8$ µm
 (3) hauteur des butées D' = 250 µm	 (4) hauteur des butées D' = 250 µm

Figure V-6 : Discrimination du contact d'une croix sur le substrat en fonction de la hauteur de butée.

(1) et (2) : contact tampon/substrat effectué. (3) et (4) : pas de contact tampon substrat.
(1) et (3) : éclairage rasant à LEDs. (2) et (4) : éclairage à fibres optiques non rasant
La hauteur de butée D' expérimentale est prise par rapport à une référence arbitraire.

En bloquant le vérin en position de poussée, la Figure V-7 montre la variation de la surface de contact lors du décollage des motifs quand le tampon est décollé progressivement du substrat en augmentant graduellement la hauteur de butée. Cette figure montre nettement la transition entre une position de contact et une position éloignée.

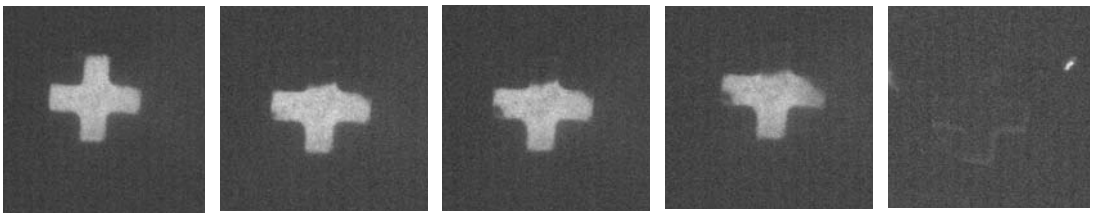


Figure V-7 : Vue du motif du tampon se décollant du substrat pour une hauteur de butée croissante (éclairage rasant).

En procédant à des enregistrements, la caméra s'avère aussi très utile pour étudier des phénomènes dynamiques et de visualiser le front d'établissement du contact ou de la séparation.

Il est intéressant de noter qu'il existe une hystérésis mécanique entre :

- la hauteur de butée correspondant au premier contact possible ;

- pour une hauteur initiale de butée correspondant à un contact, la hauteur de butée (supérieure à la précédente) correspondant au décollage du motif lorsque l'on augmente graduellement la hauteur de butée.

Cette hystérésis pourrait être reliée à l'énergie d'adhésion du tampon et du substrat à condition de maîtriser les paramètres expérimentaux (flexion possible de la machine, etc…). Dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pas eu le temps procéder à une étude systématique de ces différents points.

V.3 MICROTAMPONNAGE DE PROTEINES AU FOND D'UN CANAL MICROFLUIDIQUE

Dans cette partie, nous allons appliquer le principe de la rétroaction en procédant au µtamponnage d'un motif isolé. Nous nous intéresserons au greffage de protéines sur le fond d'un canal µfluidique, par insertion du motif du tampon dans le canal et contact sur son fond sans écrasement. Ce travail a été effectué en collaboration notamment avec les doctorants B. Hannes et J. Vieillard [3, 189] et fera l'objet d'une publication distincte. Nous nous contenterons ici d'un compte rendu succinct concernant essentiellement l'aspect µtamponnage proprement dit.

Nous utilisons le même modèle biologique que dans la section IV.3 afin de greffer l'anticorps monoclonal anti RgpB, qui sera ensuite révélé avec l'antigène RgpB marqué au CY3. Le substrat de départ est une lame de microscope comportant un circuit d'électrophorèse en croix Figure V-8 et (Tableau V-1). La profondeur de gravure est de 20 µm tandis que la largeur des canaux est de 70 µm. La lame en verre est fonctionnalisée avec de l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES)[1]. Les substrats portent donc à leur surface des groupements NH_2.

Nous disposons aussi d'un tampon en PDMS avec un motif sortant en forme de parallélépipède de hauteur 25 µm, de largeur 30 µm et de longueur 500 µm.

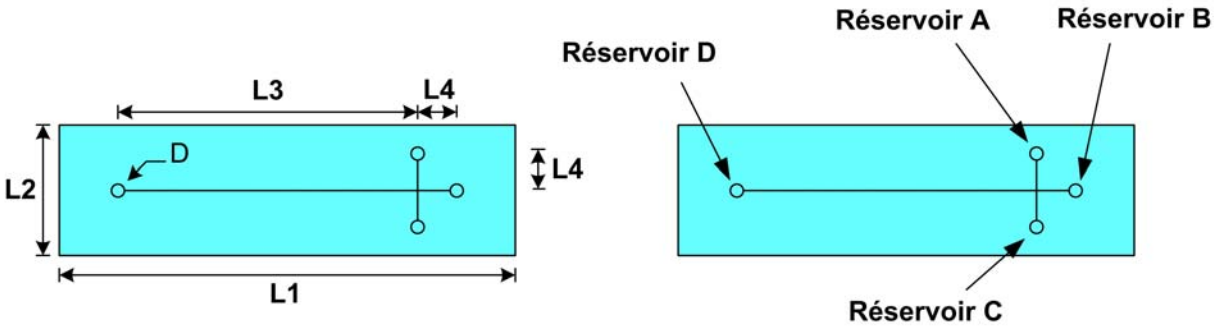


Figure V-8 : Vue du substrat à tamponner.

[1] Par trempage dans un mélange constitué de 95% d'acétone, 3% d'H_2O et 2% d'APTES.

Dimensions Laboratoire sur puce	Dimensions des canaux µfluidiques				Diamètre du réservoir
	Profondeur du canal	Largeur du canal	Longueur du canal d'injection	Longueur du canal de séparation	
L1 = 75 mm L2 = 25 mm	20 µm	70 µm	10 µm	L3 = 60 mm L4 = 5 mm	D = 2 mm(PDMS) D = 2 µm (glass)

Tableau V-1 : Dimensions des motifs µfluidiques.

La Figure V-9 montre le plan de tamponnage de la puce : nous avons tamponné d'abord le motif supérieur avec l'anticorps monoclonal anti RgpB marqué au CY3 (Ab*) puis le motif inférieur avec l'anticorps monoclonal anti RgpB non marqué (Ab).

Ab* : anticorps monoclonal anti RgpB marqué au CY3
Ab : anticorps monoclonal anti RgpB non marqué

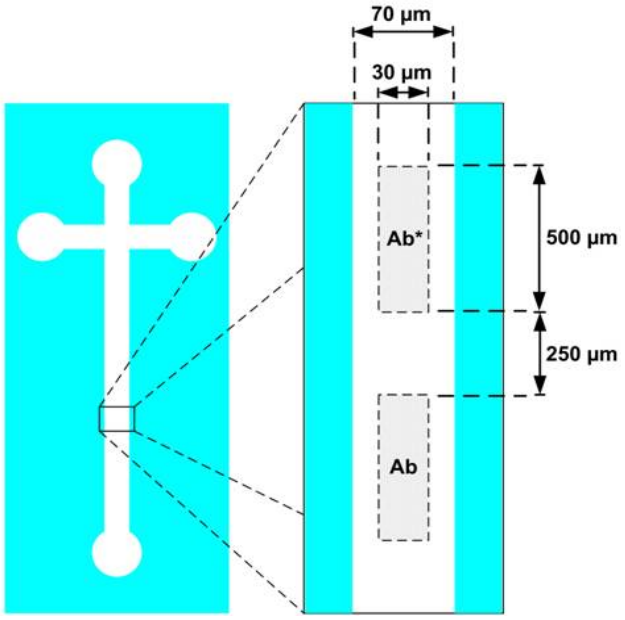


Figure V-9 : Plan de tamponnage de la puce.

Le protocole de µTP peut être résumé de la manière suivante. Après avoir mis en place le tampon et le substrat dans le banc de µTP, le porte-substrat est orienté de façon à faire entrer le motif du tampon dans le canal µfluidique sur toute la longueur du motif. La hauteur des butées micrométriques est ensuite ajustée de façon à ce que le motif du tampon touche le fond du canal tout en gardant un espace libre entre le tampon et le substrat sur le reste de la surface (Figure V-10). En effet toute la surface du tampon sera encrée avec l'anticorps et nous ne voulons un transfert que sur le fond du canal. La hauteur h' du motif comprimé doit donc être supérieure à la gravure du canal. Cela est possible car il y a 5 µm de différence entre la hauteur du motif et la profondeur du canal.

La Figure V-11 gauche est une vue du tampon en contact avec le substrat prise avec l'éclairage à fibre optique, tandis que la Figure V-11 droite correspond à la même vue mais avec l'éclairage rasant. Cette dernière image montre qu'il n'y contact qu'au niveau du canal.

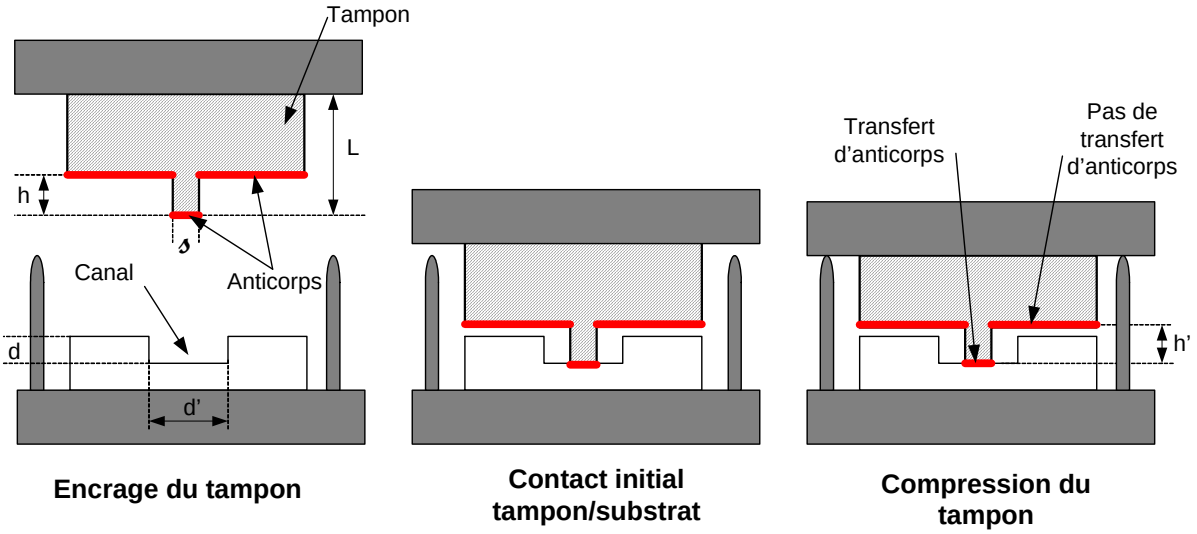


Figure V-10 : Principe du dépôt d'anticorps par µTP au fond d'un canal µfluidique.

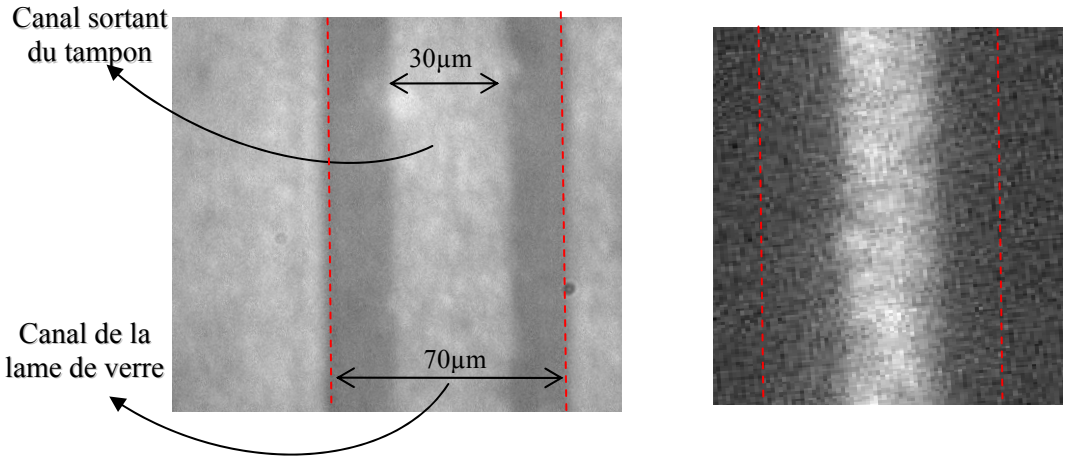


Figure V-11 : Vue du tampon en contact avec le canal µfluidique (caméra du banc de µTP).

Après ce réglage, le tampon est retiré du banc de µTP. Il est encré par dépôt à la pipette d'une goutte d'anticorps marqué Ab*, séché à l'azote, puis remis en place dans la machine[1]. L'on procède au tamponnage du premier motif (pression pneumatique 1 bar ; durée du contact 30 sec). Le tampon est retiré, lavé et séché, encré avec une autre goutte d'anticorps Ab non marqué, puis remis dans la machine, le substrat est ensuite simplement décalé avec les deux axes de translation du porte-substrat (le réglage étant effectivement visuellement en

[1] Les anticorps sont activés par mélange avec du N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) dans du tampon 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbdiimide hydrochloride (EDAC) pendant une heure dans les proportions anticorps mM 42,5 µl / NHS 10 mM 5 µL / EDAC 20 mM. 2,5 µL.

approchant le tampon sans le mettre en contact). Puis l'on procède au tamponnage du 2ème motif avec les mêmes paramètres.

La lame est ensuite lavée avec du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) dilué 10 fois pendant 5 minutes, rincée à l'eau déionisée, puis séchée. La fluorescence de la lame est ensuite cartographiée avec un scanner Axon Genepix Personal 4100 à la longueur d'onde de 532 nm. Comme prévu, l'image obtenue (Figure V-12 gauche) révèle la présence du motif tamponné de l'anticorps fluorescent Ab* mais pas celui de l'anticorps non fluorescent Ab. La lame est ensuite plongée dans une solution de sérum bovin BSA afin de saturer les sites NH_2. Sans cette étape, l'antigène viendrait se greffer sur toute la lame et tout le canal serait fluorescent. La lame est ensuite lavée pour enlever tout excédent. L'image scannée de la lame laisse toujours apparaître le témoin positif tamponné.

Nous faisons ensuite passer dans le canal, l'antigène RgpB* marqué au CY3 par pompage. Pour ce faire le substrat en verre est recouvert d'un couvercle en PDMS afin de fermer les canaux µfluidiques. L'antigène est ensuite disposé dans un réservoir à une extrémité du canal puis aspiré à l'aide d'une seringue de façon à remplir tout le canal. L'incubation dure 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lame est ensuite lavée avec du PBS pendant 10 min puis du Tweer à 0,1% pendant 10 min. Une nouvelle cartographie de fluorescence avec l'Axon révèle le deuxième motif correspondant à l'interaction Ab/RbpB* (Figure V-12).

La fluorescence des motifs tamponnés montre que le transfert d'anticorps par µTP a bien été effectué. L'absence de fluorescence en dehors des motifs du canal prouve que le contact tampon/substrat était bien limité au fond du canal. Ces résultats valident le principe du contrôle de la charge du tampon par rétroaction mécanique. Cette expérience permet aussi d'illustrer les possibilités de notre instrument en matière de réglages d'orientation, de changement de tampon, de contrôle par caméra, etc.

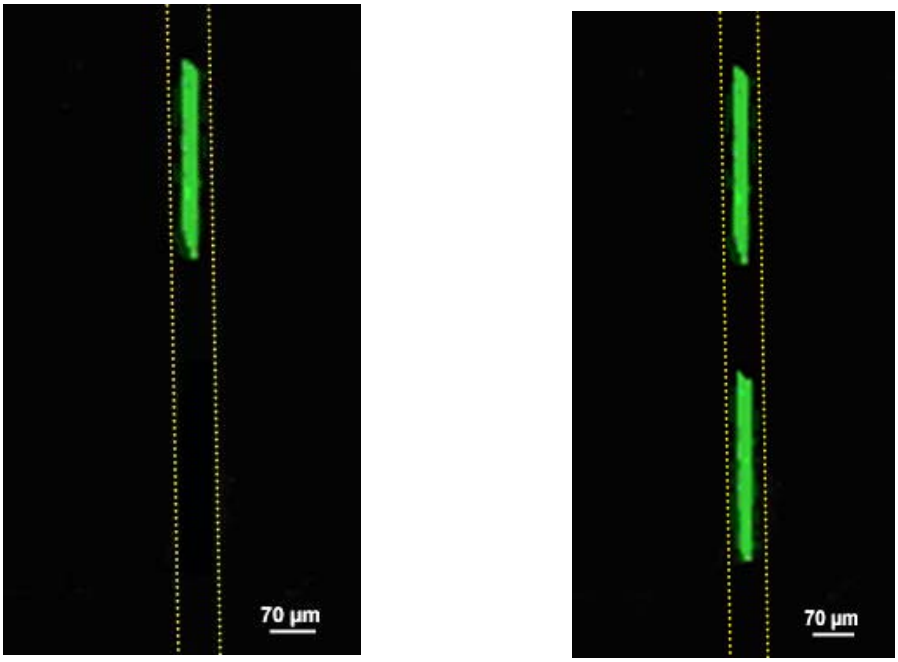


Figure V-12 : Cartographie de fluorescence du µlaboratoire sur puce après tamponnage des deux motifs.

A gauche : cartographie de fluorescence montrant la présence de Ab* tamponné au fond du canal.
A droite : après incubation avec l'antigène RbpB* marqué au CY3, cartographie de fluorescence montrant l'apparition du motif correspondant à l'interaction Ab/ antigène RbpB*.

Nous avons répété cette expérience avec un deuxième substrat. Mais à la fin, nous avons fait passer l'antigène RgpB* dans le canal par effet électrocinétique. L'antigène est disposé dans un réservoir à une extrémité du canal puis déplacé par champ électrique (350 V/cm). Le canal est alors complètement rempli. L'incubation dure 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le résultat obtenu est équivalent à la méthode précédente.

En conclusion, le dépôt de biomolécules par tamponnage au fond d'un canal µfluidique est une première. A notre connaissance la seule autre méthode possible consiste à déposer les biomolécules par projection car il convient d'éviter les méthodes de dépôt impliquant un contact mécanique entre le moyen de dépôt et les flancs du canal. Par projection, nous avons vu qu'avec des moyens piézoélectriques, le volume minimum projeté est de l'ordre de 1,5 picolitres, ce qui fera tout de même à des plots de 10 à 50 µm au fond du canal (en supposant un angle de mouillage de 90°) avec peu de possibilité d'améliorer. Dans ce contexte, le µTP présente un avantage important par rapport à la picoprojection : le produit est "séché" sur le tampon de sorte qu'il n'y a pas de bavures lors du transfert, ni

d'écoulements liquides difficiles à contrôler sur le substrat, les motifs peuvent être écartés des bords fragiles des canaux. La Figure V-12 montre que les motifs transférés sont très nets. Le µtamponnage apparaît donc comme une solution pertinente pour intégrer des biopuces dans de µlaboratoires.

Par extension, il est possible aussi d'envisager d'intégrer dans les µlaboratoires sur puce :

- des motifs fonctionnalisés chimiquement sélectivement par µTP (hydrophile/hydrophobe, actif chimiquement/inactif), par exemple pour limiter par endroit l'adsorption des protéines ou au contraire la favoriser ;
- des réseaux d'électrodes conductrices par gravure de couches métalliques localisés par µtamponnage ;
- des composants optiques (réseaux de diffraction, etc.) définis par µTP.

V.4 GLISSEMENT POSSIBLE DU TAMPON, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre première conclusion est que la rétroaction par butées réglables micrométriques a permis de réduire la valeur de la charge exercée de plusieurs ordres de grandeur. La charge est de plus facilement ajustable par un simple réglage mécanique. Ce principe permet de transférer des motifs (isolés ou non) avec une résolution latérale micrométrique, qui convient à la plupart des applications envisagées pour la microfluidique, les biopuces et les µlaboratoires sur puce dont les dimensions latérales sont du même ordre de grandeur. En effet, une telle résolution latérale implique une hauteur de motif du même ordre de grandeur (facture de forme unitaire), ce qui détermine la résolution nécessaire pour les butées.

L'on peut tenter de passer à une résolution latérale de l'ordre de 1 µm en remplaçant les butées actuelles (résolution 2 µm) par des butées manuelles plus performante (de résolution de 0,5 µm). Mais pour accroître les possibilités de l'instrument, nous avons préféré passer directement à une rétroaction basée sur une butée piézoélectrique avec une résolution de 10 nanomètres. La résolution "réelle" est d'une fraction de µm étant donnée la rigidité actuelle du banc de µTP. Cette butée peut toutefois être commandée par ordinateur, ce qui permet d'effectuer un réglage dynamique. La description du dispositif est reportée à l'Annexe 6 dans la mesure où nous n'avons pas eut le temps de caractériser l'instrument.

Nous souhaitons maintenant mettre en évidence une difficulté liée à la conception de la tête de tamponnage : **un glissement possible du tampon sur le substrat.** Un

désalignement résiduel du parallélisme tampon/substrat pourrait en effet ne pas être entièrement absorbé par la tête de tamponnage, ce qui se traduirait par un glissement des motifs du tampon lors de l'établissement du contact avec le substrat. Précisément l'absence d'articulation flexible entre le porte-tampon et les axes des deux rotules (Figure IV-6) empêche de compenser cet effet. **Nous avons en effet volontairement opté, dans un premier temps, pour une liaison rigide entre le porte-tampon et les axes des rotules pour pouvoir toujours repositionner le tampon de manière répétable par rapport au substrat.**

Dans la pratique, notre choix est validé à l'échelle des motifs transférés dans les chapitres 4 et 5, car **nous n'avons jamais observé de glissement du tampon pendant le contact.** Ce point est confirmé par les mesures de reproductibilité de la section IV.2.2.1**.** L'explication serait que le désalignement résiduel du tampon/substrat serait absorbé par la déformation du tampon dans son épaisseur. En effet l'ordre de grandeur du glissement potentiel est du µm alors que celle de l'épaisseur du tampon est du mm. Pour observer ce glissement et prouver que notre explication est la bonne, il conviendrait de réduire la résolution des motifs et la hauteur du tampon au µm.

Quoiqu'il en soit, aux résolutions très élevées (50 - 100 nm), il conviendrait d'abandonner la contrainte liée au positionnement répétable du motif sur différents substrats. Il serait alors possible d'utiliser une **tête de tamponnage flexible** comme celle de la Figure V-13. **La déformation élastique** des lames de ressort croisées permettra de compenser le désalignement résiduel du parallélisme tampon/substrat en évitant tout glissement des motifs.

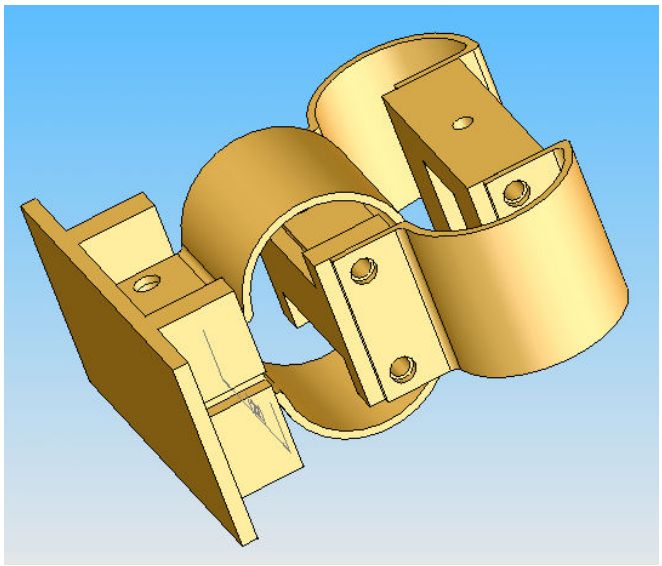


Figure V-13 : Principe d'une tête de tamponnage flexible.

Pour être cohérent, une résolution aussi élevée nécessitera la conception d'un nouvel instrument, un **banc de nanotamponnage,** beaucoup plus rigide que le précédent de façon à réduire les fléchissements lors des contacts. En effet, de manière générale les déformations mécaniques de l'instrument pendant la compression du tampon limiteront la résolution utile. Nous proposons de répartir le réglage de la compression du tampon sur trois points au lieu d'un seul en introduisant trois actionneurs piézoélectriques. A cette échelle, il conviendrait aussi de régler le parallélisme tampon/substrat avec trois autres actionneurs piézoélectriques. Le tampon serait alors porté par une tête flexible comme celle de la Figure V-13.

La Figure V-14 montre une vue très simplifiée de ce banc de nanotamponnage, qui serait basé sur un châssis en acier disposé verticalement. Etant donné les applications possibles en nanotechnologie, cet instrument pourrait être prévu pour des substrats de grande dimension (verre ou wafer silicium de 100 à 200 mm de diamètre) avec des tampons plus petits. La machine serait donc basée sur un principe "step and repeat".

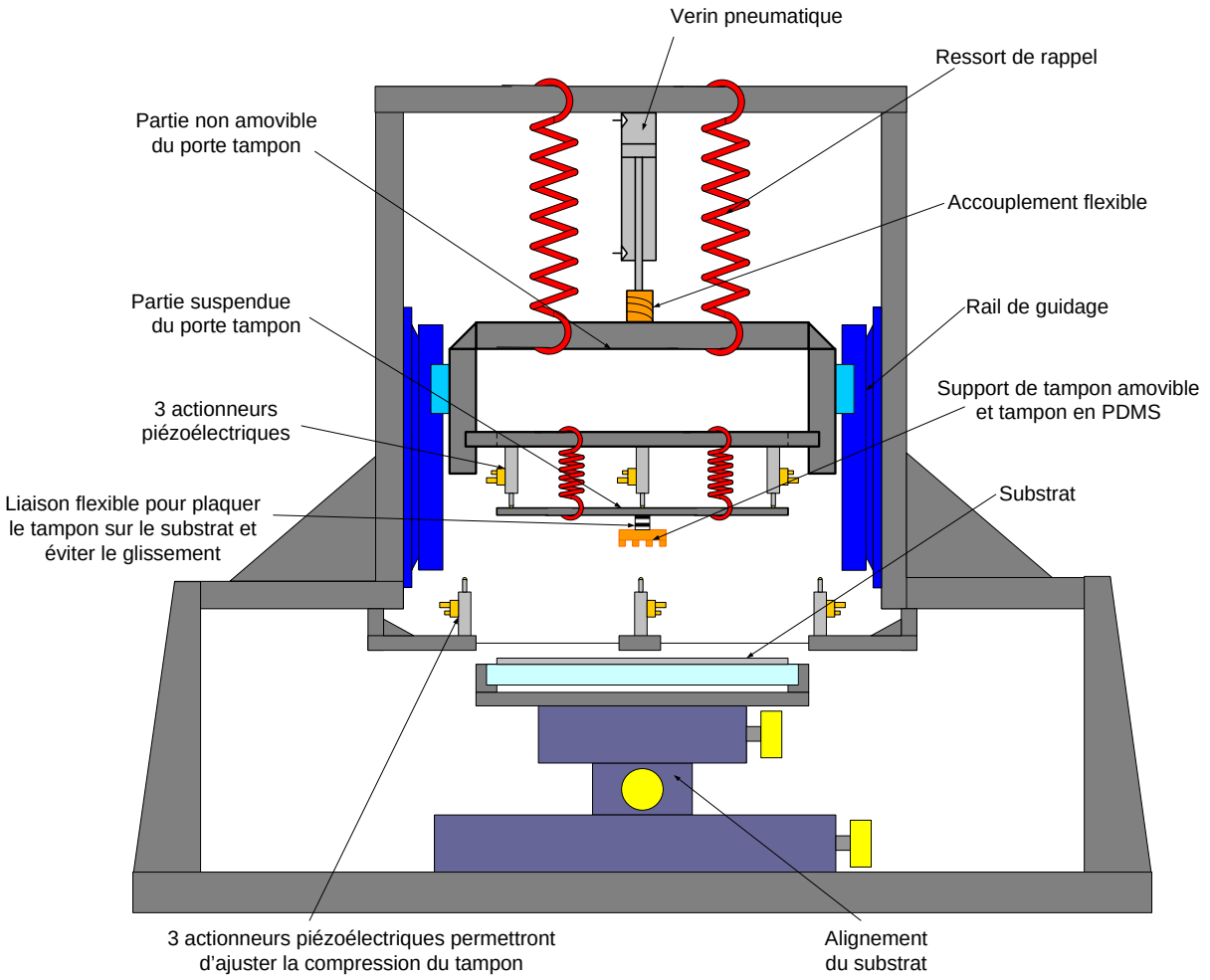


Figure V-14 : Principe du banc de nanotamponnage.

L'alignement de la machine pourrait être basé sur un tampon à plusieurs niveaux comme celui de la Figure V-15. Pour fixer les idées, on peut imaginer que le tampon comprendrait par exemple :

- un premier niveau d'alignement avec des motifs de largeur et de hauteur 2 µm ;
- un deuxième niveau d'alignement avec des motifs de largeur et de hauteur 0,5 µm ;
- un troisième niveau d'alignement avec les motifs à transférer de largeur et de hauteur de 50 à 200 nm.

Le réglage de la machine se ferait de manière progressive, un peu comme le réglage de la mise au point d'un photomasqueur. Avec les motifs du premier niveau, un premier réglage consisterait à aligner le tampon et à ajuster son parallélisme avec le substrat en comprimant "grossièrement" le tampon. Puis l'on affinerait les réglages en comprimant les motifs du deuxième niveau avant de passer au transfert des motifs en tamponnant le troisième niveau. Le réglage fin de la compression se ferait, niveau par niveau.

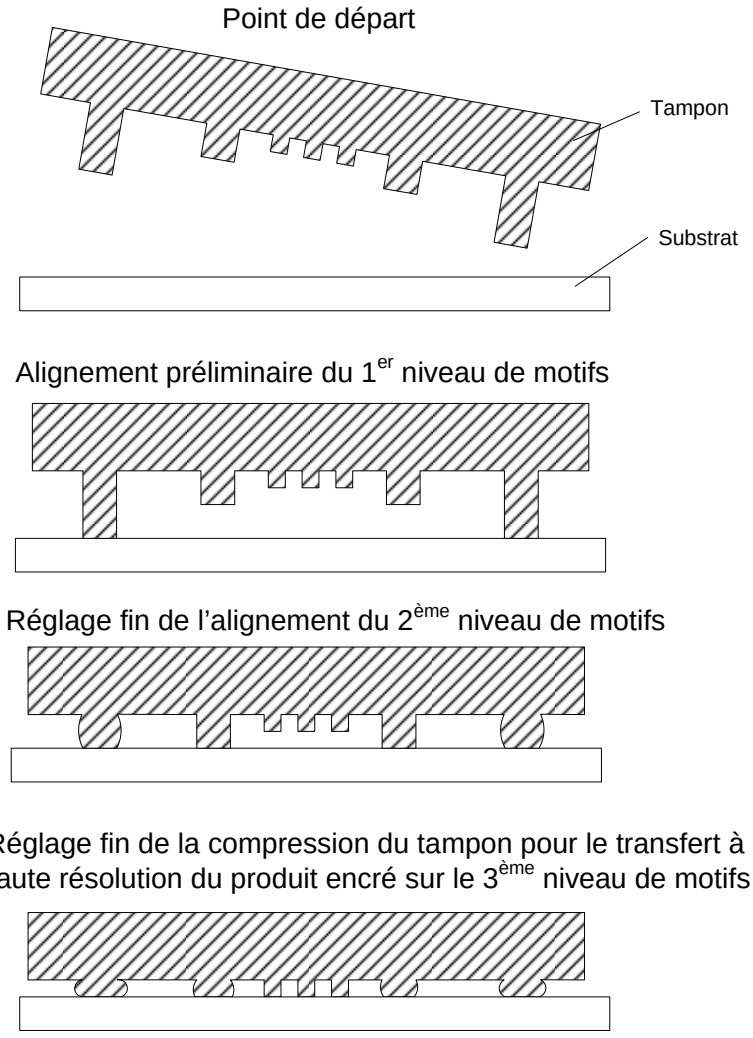


Figure V-15 : Réglage du banc du µTP avec un tampon à plusieurs niveaux.

Nous souhaitons maintenant conclure sur une utilisation très prospective de cet instrument. En effet comme nous l'avons vu, les déformations des motifs du tampon lors du contact constituent actuellement la limitation actuelle en matière de résolution. Elles peuvent être considérées comme intrinsèques au µTP car liées d'une part à l'énergie élastique accumulée dans le tampon pour assurer le contact et d'autre part à l'énergie d'adhésion entre les surfaces en contact (Annexe 5). **Nous proposons d'étudier une nouvelle variante du µTP afin de développer une nouvelle méthode de transfert de produits s'affranchissant de toute interaction mécanique directe entre le tampon et le substrat** et que nous désignerons par **nano-impression sans contact**. Elle permettrait ainsi d'éliminer par principe les causes de déformation du tampon. Ce qui suit doit être considéré comme une contribution d'ordre théorique à la réflexion nécessaire avant de lancer un tel projet.

Après encrage du tampon avec un thiol par exemple, il s'agirait d'approcher le tampon d'un substrat recouvert d'or en conservant un écart de quelques nanomètres, légèrement supérieur à la taille moyenne des molécules de thiol sur le tampon. La question sera d'étudier s'il est possible de transférer le thiol du tampon vers le substrat sans perte notable de résolution latérale. Le franchissement de l'espace libre laissé entre le tampon et le substrat dépendra d'une compétition entre l'affinité du thiol pour l'or et une diffusion non contrôlée, ainsi que des paramètres du procédé (écart tampon-substrat, parallélisme des surfaces, temps d'approche et temps de mise en proximité, etc.). Du point de vue physicochimique, il s'agira de faire varier la nature des interactions entre la surface du PDMS et le thiol en traitant ou en fonctionnalisant le PDMS, en jouant sur la longueur des molécules de thiols, leur nature chimique, la présence ou non de groupements chimiques latéraux, le solvant,…

D'un point de vue expérimental, il sera très difficile de contrôler l'écart de deux surfaces avec une résolution du nanomètre. Il faudrait disposer de tampon en PDMS ultraplat et/ou de silicium très soigneusement poli. C'est la raison pour laquelle nous proposons en fait de combiner µtamponnage et nano-impression sans contact pour régler l'écart tampon/substrat localement et de manière progressive. Comme le montre la Figure V-16, pratiquement cela consisterait (1) à régler les actionneurs piézoélectriques pour établir comme précédemment un contact avec les motifs des deux premiers niveaux (en aplanissant ainsi localement le tampon et en l'ajustant à la surface du silicium) et (2) à régler l'écart tampon/substrat uniquement pour les motifs du troisième niveau.

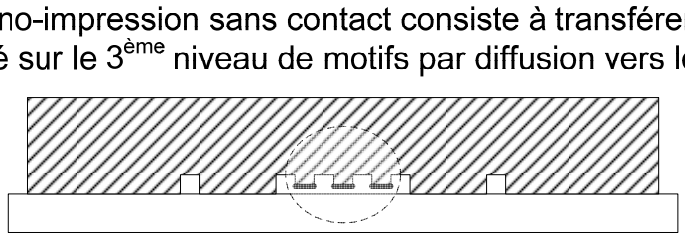


Figure V-16 : Nano-impression sans contact au 3ème niveau du tampon.

La **nano-impression inverse sans contact** pourrait aussi être considérée : elle consisterait (i) à préparer une couche autoassemblée de thiol sur un substrat silicium /métal par des méthodes classiques (donc avec le minimum de défauts et possibilité de caractérisation) et (ii) à enlever sélectivement des motifs de thiols en approchant un tampon métallisé, fonctionnalisé ou non. Ce procédé inverse autoriserait une grande souplesse dans le choix des matériaux.

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Pour développer des méthodes d'adressage de produits chimiques ou biologiques à très haute résolution**,** nous nous sommes d'abord intéressés à un procédé de picoprojection à 4 picolitres. Ce procédé est basé sur une adaptation d'un dispositif de projection du commerce à effet piézoélectrique, qui permet de concilier haute résolution, disponibilité et coût. Un autre de ses intérêts est qu'il est très souple d'utilisation, de sorte que nous avons envisagé de le mettre en œuvre dans la synthèse in situ de biopuces, notamment de puces à oligopeptides, qui requièrent la maîtrise de la projection de 21 réactifs. Une contrainte importante est qu'il est nécessaire d'aboutir à un rendement de synthèse aussi élevé que possible pour obtenir des puces d'intérêt biologique. Pour cela nous avons étudié en détail le système de projection pour l'adapter à la variété des produits chimiques que l'on souhaite mettre en œuvre.

Nous avons abouti à une première synthèse peptidique dans des micropuits de diamètre 100 µm avec des apports réguliers par projection pour contrer l'évaporation du solvant et permettre un couplage pendant deux heures. L'enceinte de travail ayant été saturée au préalable de manière très approximative avec le solvant de projection, il est certain que le protocole de fabrication pourra faire l'objet d'améliorations importantes. Cette expérience valide aussi la fonctionnalisation des substrats des puces pour la synthèse des Fmoc.

Ce travail ouvre la voie à la synthèse in situ de puces à oligopeptides haute densité, pour accélérer le développement de puces à protéines, à condition de développer un instrument très performant comme celui défini aux Annexes 1 à 3. Il pourra aussi être appliqué à la synthèse in situ de puces à oligonucléotides haute densité.

Nous nous sommes intéressés dans la deuxième partie de ce travail à un procédé d'adressage de réactifs basé sur le µtamponnage. Moins flexible que le précédent, il présente toutefois l'avantage de concilier coût et très haute résolution, à terme ultra haute résolution. Nous avons développé un banc de µtamponnage intégrant toutes les fonctions nécessaires à ce procédé (encrage, alignements, changements de tampons et de substrat), avec notamment un procédé innovant de contrôle de la charge sur le tampon. Celui-ci est basé sur le contrôle de la compression du tampon par des butées réglables à résolution micrométrique. Il nous a été possible ainsi de transférer des motifs "isolés" sur le tampon.

Du point de vue des applications, nous avons mis en œuvre cet instrument dans un procédé innovant de fabrication de circuits µfluidiques par gravure humide du verre. Ce procédé pourrait servir à des chimistes ou des biologistes, ne disposant pas d'équipement de

microtechnologie pour fabriquer des micro-usines chimiques ou des microlaboratoires d'analyse biologique. Dans ce cas, le motif du circuit est défini par µtamponnage et non pas par photolithographie et le banc de µtamponnage remplace l'ensemble photomasqueur et tournette.

Par ailleurs, en tirant profit de notre méthode de contrôle de la charge, nous avons réussi à transférer par µtamponnage des anticorps au fond d'un canal µfluidique. Cette application ouvre la voie à une méthode originale d'intégration de biopuces dans les microlaboratoires d'analyse biologique.

Il convient de remarquer que le banc de µtamponnage est plus compact et moins coûteux qu'un photomasqueur et d'une "précision mécanique" de 2 µm proche de celle des photomasqueurs dans l'UV proche couramment utilisés en microélectronique (~1 µm). cet instrument pourra servir aux chimistes pour transférer, avec une résolution micrométrique, des produits de nature très différente (thiols, silanes, biomolécules, réactifs de synthèse,…). De ce point de vue le µtamponnage présente beaucoup plus de possibilités que la photolithographie.

Enfin, pour acroitre la résolution de routine du tamponnage, nous avons établi le principe d'un banc de nanotamponnage avec un contrôle de la compression du tampon par des butées piézoélectriques à résolution nanométrique.

Le banc de nanotamponnage permettra d'étudier l'intérêt d'une variante du tamponnage : la nano-impression sans contact. En effet, les déformations des nano-reliefs du tampon lors du contact constituant la limite actuelle du tamponnage en matière de résolution, celles-ci pourraient être éliminées si le transfert pouvait être effectué sans contact en approchant le tampon suffisamment près du substrat.

Nous espérons que ces réflexions contribueront au développement d'instruments de tamponnage flexibles et de faible coût permettant d'atteindre "en routine" une résolution adaptée aux besoins de la Nanotechnologie.

PARTIE D

ANNEXES

Annexe 1 : Étude théorique du Synthétiseur in situ de puces haute densité par picoprojection

1.1 Introduction

Dans cette Annexe, nous présentons une vue d'ensemble de l'architecture et des possibilités du **Synthétiseur de puces haute densité** (la conception mécanique de la machine est étudiée dans l'Annexe suivante). Par rapport au Synthétiseur in situ de puces basse densité, outre sa résolution, cet instrument sera caractérisé par sa **modularité**, qui permettra de faire varier (en fonction des besoins et du degré d'optimisation du dispositif auquel le laboratoire pourra aboutir) **:**

- **La densité des puces** qui pourra varier entre 0,5 plots/cm² et 80 000 plots/cm². La densité dépend directement de la résolution des moyens de projection. Le nouveau Synthétiseur de puces sera doté de moyens de microprojection mixtes piézo-électriques / microélectrovannes d'une résolution de 1,5 picolitres (Annexe C) au lieu de 5 nanolitres pour la machine actuelle.

- **La nature du substrat** des puces (verre, silicium, silicium poreux[1]) avec une capacité de fabrication sur de petites surfaces (lames de microscope) mais aussi sur de très grandes surfaces (wafers verre ou silicium de diamètre 200 mm). Pouvoir faire varier la nature du substrat des puces, dans la même machine de synthèse, permettra (1) de conserver le format traditionnel des puces sur lame de microscope, (2) de développer des puces sur silicium, qui pourront être intégrées dans un process microélectronique "traditionnel" (wafer bonding, gravure, etc.), ou mises en œuvre dans un contexte nouveau : puces sur Si/SiO2 à exaltation de fluorescence [191]. Travailler sur de grands substrats permettra d'augmenter la combinatoire des puces à oligopeptides ou encore de lancer une production importante de biopuces. La fabrication sera effectuée de manière collective sur des wafers Si/SiO2 de diamètre 200 mm pour tirer avantage de la meilleure reproductibilité du silicium par rapport au verre.

Les voies de synthèse chimique in situ mises en œuvre avec deux possibilités :

- une **configuration multi-chimie,** qui permettra avec le même Synthétiseur d'élaborer des puces à ADN via la chimie des phosphoramidites ou des puces à oligopeptides via celle des Fmoc. Notre objectif n'est pas de synthétiser simultanément des biomolécules de nature différente, ce qui est possible d'un point de vue théorique mais prématuré, mais de

[1] Une application différente des puces à ADN et très prometteuse consiste à utiliser le Synthétiseur pour procéder à un très grand nombre de synthèses différentes en parallèle pour les besoins de la mutagenèse [190] ou encore pour la synthèse de gènes artificiels. Les sondes alors clivables. La synthèse est effectuée sur des plots du silicium poreux de surface importante (~ 0,5 plots/cm²) sur la plus grande surface de substrat possible.

développer un dispositif permettant de passer rapidement d'une chimie à l'autre pour les besoins de la recherche. La conception même du dispositif permettra de minimiser les risques contaminations croisées et de réduire les opérations de décontamination.

- une **configuration mono-chimie** avec un fonctionnement multi-postes permettant d'accélérer la vitesse de fabrication et de réduire la consommation en réactifs. La fabrication sera effectuée en parallèle sur 4 wafer.

Ainsi la configuration multi-chimie sera bien adaptée aux besoins de la recherche pour développer les procédés de fabrication de biopuces, tandis que la configuration mono-chimie pourrait intéresser l'industrie pas sa capacité de production de masse de biopuces haute densité.

On pourrait se demander s'il serait possible de modifier le Synthétiseur de puces basse densité pour le faire passer à la haute densité. En fait beaucoup de modifications seraient impossibles à intégrer dans le dispositif existant. Par exemple, l'intégration de la totalité des 21 moyens de projection piézoélectrique nécessaires pour la synthèse des oligopeptides est impossible. Il serait aussi de toute façon indispensable d'améliorer la précision mécanique du dispositif actuel pour passer aux puces à ADN haute densité. Il faudrait refaire complètement le châssis du dispositif, changer les axes linéaires pour passer à une configuration plus rigide (en H et non pas en T),…Il apparaît donc plus cohérent de développer un dispositif prévu directement pour la haute densité.

1.2 Vue générale

La Figure montre l'architecture générale du Synthétiseur de puces haute densité. La partie centrale de la machine est basée sur un plateau tournant de grande taille, qui porte de 1 à 4 porte-substrats (notés A, B, C et D) pouvant contenir des substrats de diamètre maximum 200 mm. Le plateau tournant fait passer les substrats sous quatre postes :

- Un poste localisé dédié à la projection pourvu d'une batterie de 36 moyens indépendants de picoprojection ; ce système d'adressage est porté par des axes linéaires XY de très haute précision afin de projeter les réactifs sélectivement sur le substrat des puces ;
- Trois postes non localisés dotés chacun d'une micro-chambre fluidique qui permet de faire passer les réactifs sur la surface des substrats (postes non localisés 1 à 3). Ces micro-chambres sont actionnées indépendamment les unes des autres et dotées d'une fluidique adaptable, ce qui autorise les différentes configurations pour la chimie.

Une différence essentielle avec le Synthétiseur de puces basse densité actuel sera que la nouvelle machine sera saturée de solvant de manière permanente pendant les campagnes de

fabrication (1 à 2 semaines) afin de stabiliser parfaitement le fonctionnement en contrôlant la durée de vie des picogouttes[1]. Un sas spécifique permettra de charger/décharger les substrats en toute sécurité pour l'opérateur sans désaturer le volume de travail. La machine sera installée dans une salle climatisée pour l'équilibre thermique du volume de travail.

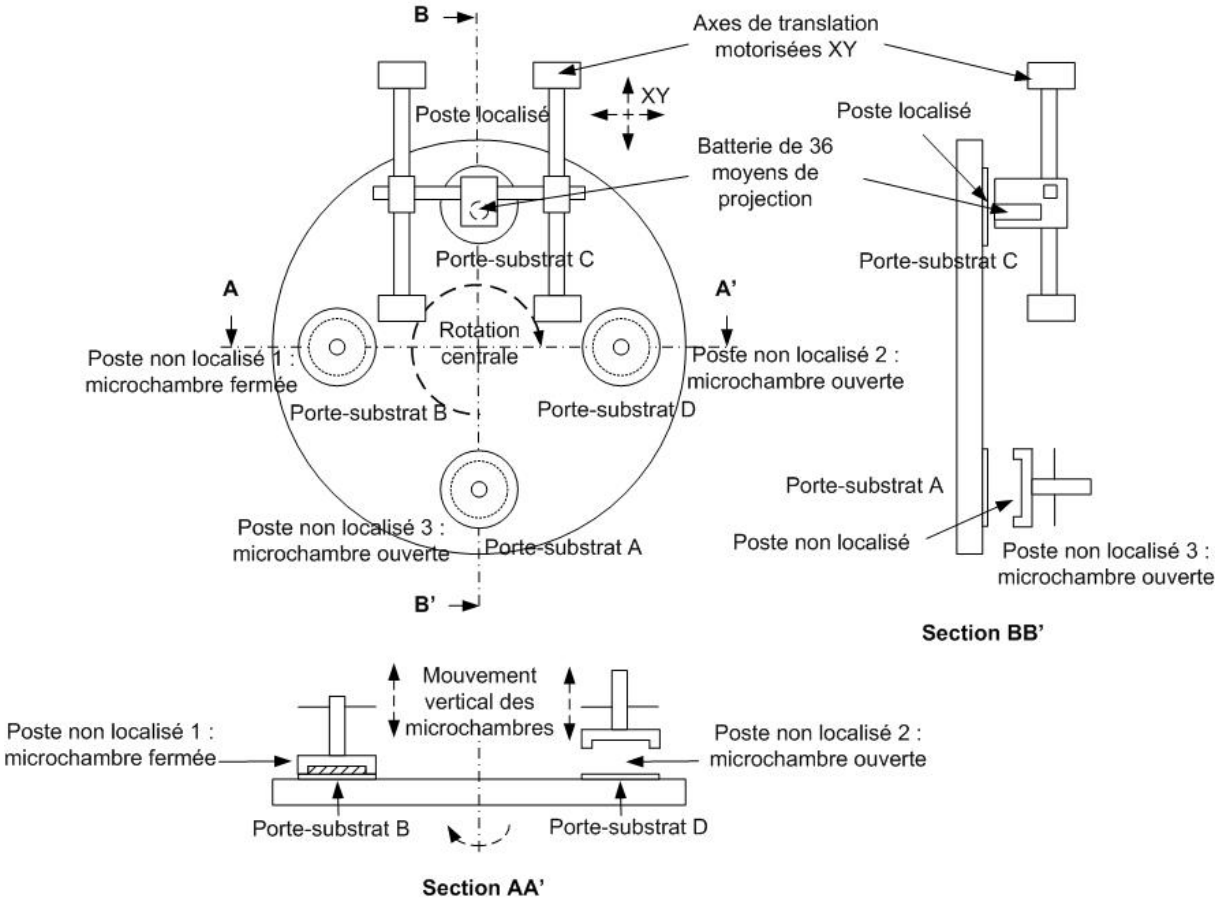


Figure A-1.1 : Architecture générale du Synthétiseur de puces haute densité.

1.3 Configurations multi-chimie

Pour éviter les problèmes de pollution lors des changements de voie de synthèse chimique, la stratégie retenue consiste à réserver un moyen de projection par réactif. Pour cela nous proposons de développer une tête de microprojection comportant 36 piézoélectriques indépendants disposés en batterie, soit 5 dédiés aux oligonucléotides et 21 aux oligopeptides. Les 10 moyens de microprojections restants seront des moyens de réserve ou dédiés à des réactifs spéciaux (PNA, déprotection localisée, réactifs fluorescents, …). Il ne sera donc pas nécessaire de décontaminer les moyens de microprojection. Etant donné l'encombrement de la tête de microprojection (Ø = 190 mm), nous avons opté pour la projection sur des surfaces importantes car travailler sur de petites surfaces n'aurait présenté aucun avantage.

[1] Il sera nécessaire de prévoir une saturation globale de l'enceinte de travail et une saturation locale au niveau du substrat pendant la projection.

Pour les postes non localisés, la **configuration multi-chimie** (cf. Figure , permettra de dédier un poste non localisé par voie de synthèse. Ainsi au niveau de la fluidique des micro-chambres, tout contamination sera évitée entre la chimie des Fmoc et celle des phosphoramidites.

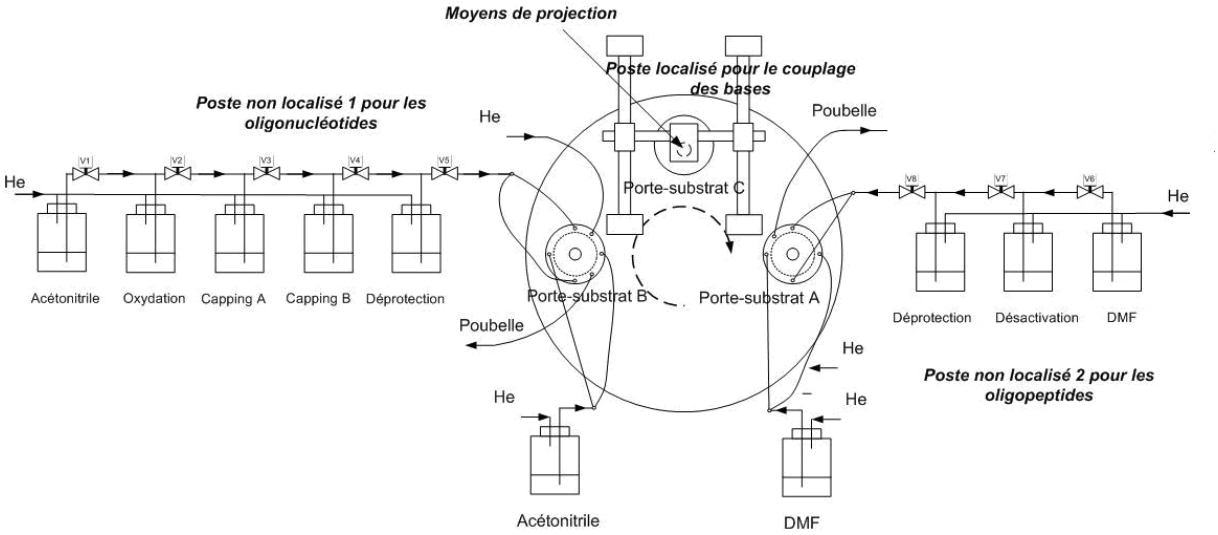


Figure A-1.2 : Principe de la configuration multi-chimie du Synthétiseur de puces haute densité (Phosphoramidites et Fmoc).

Pour réduire au maximum les parties du dispositif communes deux chimies, l'on prévoit :

- un système de saturation double (acétonitrile, DMF) avec des circuits fluidiques propres à chaque solvant avec des entrées/sorties réparties indépendamment dans l'enceinte de travail ;
- des porte-substrats facilement lavables.
- des porte-substrats amovibles[1] avec différents formats prévus pour des substrats de dimension et de nature différente : matrice de 1 à 8 lames de microscope, wafer silicium jusqu'à 200 mm de diamètre.

1.4 Configurations mono-chimie

A plus long terme, nous prévoyons une **configuration mono-chimie** pour laquelle les postes seront dédiés à l'une des phases réactionnelles non localisés. Pour les puces à ADN, le principe est montré dans la Figure 3. En effet la configuration mono-chimie présente un

[1] Tout changement de format de substrat entrainera le changement du format de la micro-chambre fluidique du poste non localisé pour adapter le volume réactionnel (ce qui est d'ailleurs une procédure standard du Synthétiseur de puces actuel).).

intérêt considérable à la fois pour accroître la productivité du système et réduire la consommation en réactifs :

- Elle permet de procéder à une synthèse en temps masqué, c'est à dire, simultanément sur 1 à 4 substrats, de sorte que l'on procédera à la projection des bases sur un substrat tandis que l'on procédera aux réactions chimiques non localisées sur les trois autres par des moyens µfluidiques indépendants et/ou judicieusement regroupés.
- La séparation des produits par poste non localisé, réduit le plus souvent (en fonction des variantes) à deux le nombre de réactifs (produit actif et solvant) par poste à faire passer dans le microréacteur. Il est alors envisageable de disposer sur chaque microchambre des entrées différentes de réactifs, ce qui permettra de réduire les phases de lavage des circuits d'entrées et d'accélérer le système.

Les microchambres seront des réacteurs chimiques presque plan (surface de diamètre 200 mm ; épaisseur de 0,1 à 1 mm) sur lesquels nous pourrons disposer des micromélangeurs à advection chaotique de façon à homogénéiser rapidement le milieu actif (comme cela a été fait au laboratoire pour l'hybridation des puces à ADN [192]). L'on pourra étudier la possibilité de ne pas envoyer systématiquement les réactifs à la poubelle mais d'en récupérer au moins une partie dans les micromélangeurs à advection chaotique.

Beaucoup d'éléments du Synthétiseur de puces haute densité seront directement transposés du Synthétiseur de puces basse/moyenne densité. Citons notamment : la fluidique des postes réactionnels non localisés avec automate programmable, le système de saturation, le système de tir à la volée pour la commande des projections. Dans l'Annexe suivante, nous étudierons les points nouveaux concernant le Synthétiseur haute densité, notamment l'étanchéité du volume de travail et surtout la conception mécanique

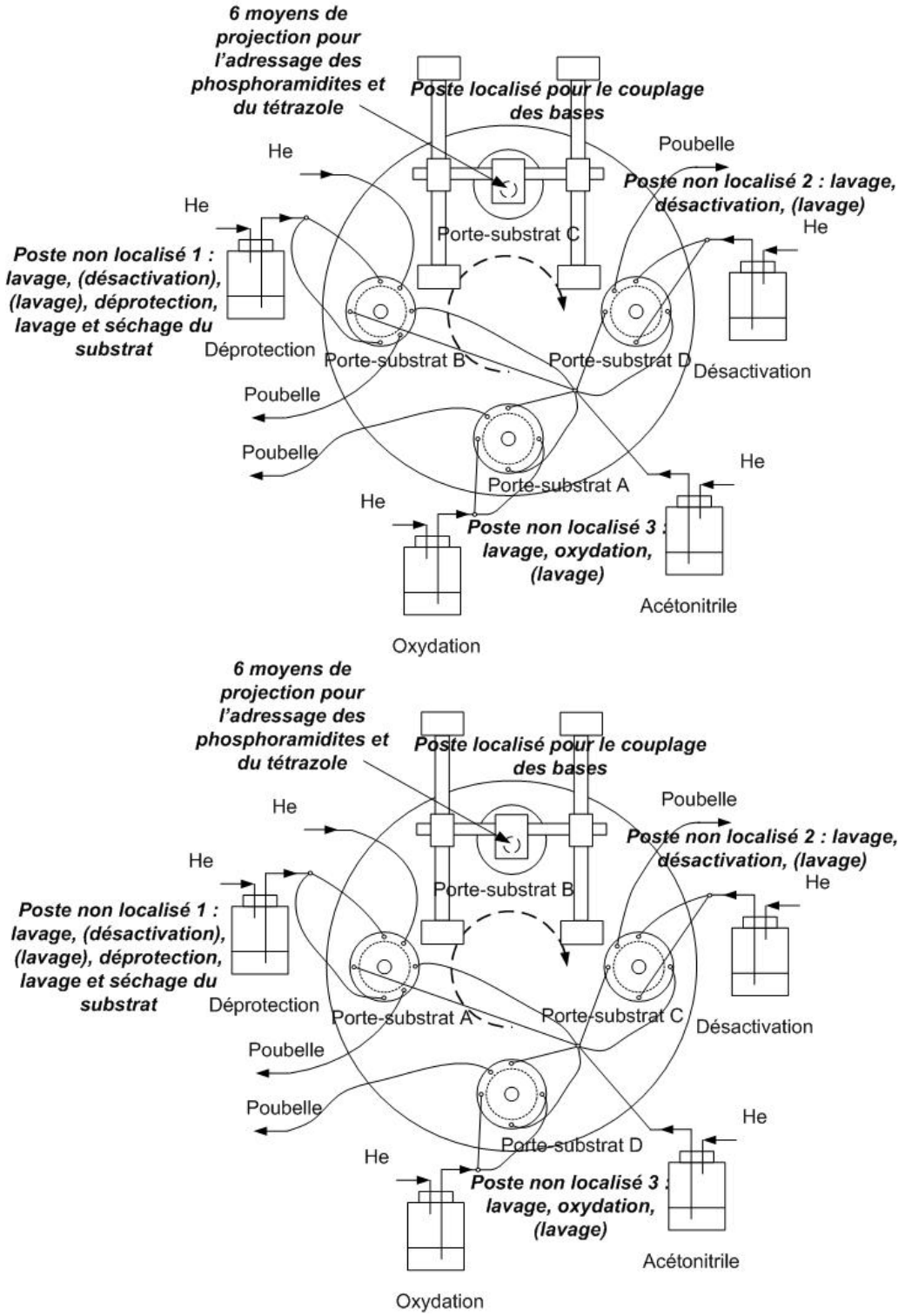


Figure A-1.3 : Configuration mono-chimie phosphoramidite du Synthétiseur in situ de biopuces haute densité.

Le plateau effectue une rotation d'un ¼ de tour entre la figure du haut et celle du bas.

En haut: déprotection sur le porte-substrat B du poste non localisé 1, couplage des bases par projection sur le porte-substrat C du poste localisé, désactivation sur le porte-substrat D du poste non localisé 2, oxydation sur le porte-substrat A du poste non localisé 3.

En bas : déprotection sur le porte-substrat A du poste non localisé 1, couplage des bases par projection sur le porte-substrat B du poste localisé, désactivation sur le porte-substrat C du poste non localisé 2, oxydation sur le porte-substrat D du poste non localisé 3.

Annexe 2 : Conception mécanique du synthétiseur in situ de puces par picoprojection

Dans cette Annexe, nous allons nous intéresser à la conception mécanique du Synthétiseur de puces haute densité, qui sera beaucoup plus délicate que celle du Synthétiseur basse densité à cause de la précision recherchée et de la surface des biopuces. L'autre nouveauté par rapport au dispositif actuel concerne le système de projection mixte piézoélectriques-microélectrovannes et sera abordée dans l'Annexe 3.

On peut considérer que les parties électronique, automatique, informatique, système de saturation global, gestion des réactifs par fluidique et électrovannes et même contrôle qualité par caméra CCD seront directement transposés du Synthétiseur basse densité actuel. Cette transposition représentera un volume de travail extrêmement important à fournir mais elle présente désormais un risque technologique faible. Nous ne décrirons donc pas ces parties, qui sont détaillées en référence [1].

On rappelle, qu'en **configuration multi-chimie**, il sera possible de procéder par campagne de synthèse de 1 à 2 semaines, soit à la fabrication de puces à oligonucléotides, soit à la fabrication de puces à oligopeptides. Le poste de projection sera commun aux deux chimies, mais les moyens de projections concernés seront différents de façon à éviter toute contamination et à éviter d'avoir à vidanger et réinitialiser complètement les microréservoirs. Pour la même raison, il y aura un poste de réactions non localisées par voie de synthèse. Ainsi le passage d'une chimie à l'autre sera simple. Il consistera essentiellement à saturer le volume de travail avec le solvant de synthèse.

En **configuration mono-chimie**, le synthétiseur de puces haute densité aura une architecture multiposte pour pouvoir fabriquer plusieurs substrats en parallèle, de sorte que l'on procédera à la projection des bases sur un substrat tandis que l'on procédera aux réactions chimiques non localisées sur les autres substrats par des moyens µfluidiques indépendants et/ou judicieusement regroupés. Ainsi il sera plus facile d'optimiser chaque étape chimique du point de vue des quantités de produits utilisés tout en réduisant aussi les lavages, et donc la consommation en solvant. Ces opérations en "temps masqué" permettront aussi d'accroître la productivité du système.

2.1 Vue d'ensemble

Une vue générale du projet de Synthétiseur haute densité est présentée à la Figure (pour la lisibilité de l'image, nous avons enlevé pratiquement toutes les connexions fluidiques et électriques ainsi que les réservoirs de réactif). Nous avons conçu une machine qui s'adaptera à plusieurs types de substrats : lames de microscope et wafers silicium jusqu'à Ø 200 mm. Pour optimiser la surface, Les lames de microscope seront disposées en matrice de 4 x 2 lames.

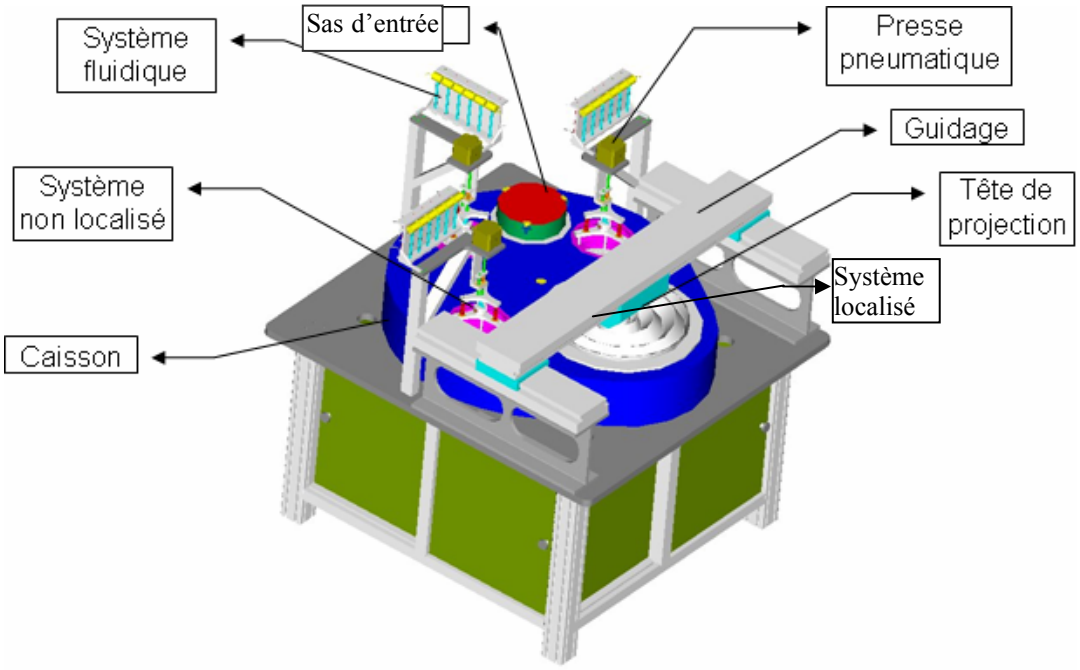


Figure A-2.1 : Vue générale du Synthétiseur in situ haute de biopuces haute densité avec trois postes réactionnels non localisés.

La machine est formée d'une enceinte réactionnelle saturée de solvant (DMF et/ou acétonitrile) avec un balayage de gaz anhydre et saturé du même solvant. Le fond de cette enceinte est constitué d'un plateau circulaire tournant suivant un axe vertical, tandis que la partie supérieure de l'enceinte est constituée par un capot. Le plateau sera porté par un rail circulaire. La Figure , montre l'étanchéité de la rotation du plateau qui sera assurée par un joint en PTFE en forme de U avec un système de ressort qui maintient les lèvres du joint bien en contact avec les parois du plateau et de l'enceinte. La rugosité des surfaces en contact doit être inférieure à 5 µm pour une bonne étanchéité. Pour éviter des usinages coûteux, un anneau circulaire assure le contact entre le joint et l'enceinte. Comme nous le verrons ci-dessous, les autres ouvertures de l'enceinte seront fermées soit par des soufflets, soit par des joints toriques.

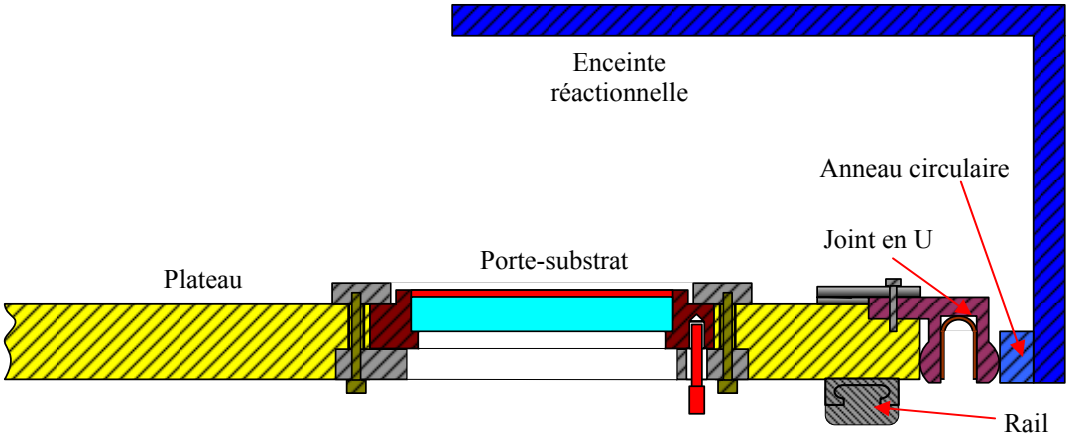


Figure A-2.2 : Schéma montrant l'enceinte, le plateau, le rail, le porte substrat et le joint d'étanchéité en U.

La machine sera constituée de différents sous-ensembles mécaniques :

- Un plateau circulaire (Ø 1 m) comportant 8 emplacements de travail : 4 porte-substrats amovibles conçus pour chaque format spécifique de biopuce, 1 poubelle pour le poste de projection, 1 poubelle pour les poste de réactions non localisées, 1 poste de nettoyage pour la tête de projection, 1 porte-substrat test portant un substrat pour calibrer les microprojections ; la rotation de ce plateau sera assurée par un moteur pas à pas disposé à l'extérieur de l'enceinte saturée.

- Un sas pour enlever et remettre les substrats des biopuces sur le plateau sans interférer avec la saturation de l'enceinte réactionelle.

- Un poste pour les réactions chimiques localisées avec une tête de projection déplacée par un système d'axes linéaires magnétiques rapides XY horizontaux avec une position détectée par des règles optiques et un axe Z vertical pour régler la hauteur de la tête de projection par rapport au substrat. La tête de projection sera composée de 36 moyens de picoprojections piézoélectrique, d'une résolution de 1,5 picolitres, alimentés par des réservoirs commandés par des microélectrovannes. Le substrat étant immobile, il sera donc possible de projeter sur toute la surface de travail toutes les phospororamidites et les Fmoc nécessaires à la synthèse des oligonucléotides et oligopeptides.

- De trois postes de réactions non localisés.

    - En configuration mono-chimie :

        - Un poste pour déprotéger les sondes en cours de synthèse, laver et sécher le substrat.

        - Un poste pour oxyder les sondes en cours de synthèse et laver le substrat.

        - Un poste pour fermer les sites actifs des sondes n'ayant pas réagi.

- Ou en configuration multi-chimie :
  - Un poste pour tous les réactifs non localisés nécessaire à la synthèse de l'ADN par la voie des phosphoramidites.
  - Un poste pour tous les réactifs non localisés nécessaire à la synthèse des oligopeptides par la voie des Fmoc.
  - Un poste pour tous les réactifs non localisés nécessaire à la synthèse des oligopeptides par la voie des tBOC (option).

- De capteurs d'hygrométrie, de température et de pression.
- D'une caméra CCD, avec un éclairage adapté, placée en dessous du caisson pour visualiser les projections ou l'écoulement des fluides dans les postes non localisés. Les substrats seront observés par transparence. Il sera donc nécessaire de travailler dans le domaine visible pour les substrats en verre et dans le proche infrarouge pour le silicium.

L'ensemble sera monté sur une table en acier avec une ouverture au milieu de diamètre 1 m pour accéder à la partie inférieure du plateau et pouvoir procéder à la maintenance. Des armoires sont prévues en dessous de la table pour l'électronique de commande et pour le rangement des réactifs. Les réactifs seront placés au plus près de chacun des postes de travail de manière à diminuer les pertes de charges (qui provoqueraient des bulles dans le système) ainsi que les quantités utilisées, car certains réactifs sont extrêmement onéreux.

Toutes les pièces mécaniques ont été conçues en Conception Assistée par Ordinateur de façon à pouvoir sous-traiter l'usinage et à faciliter l'itération du design. Les autres pièces (axes linéaires, moteurs, pneumatique, fluidique) ont été numérisées pour étudier leur implantation dans le dispositif. Ce travail fait suite à de nombreux travaux préliminaires menés au laboratoire. J'ai refait une étude complète en conservant les points forts de ces études et en tentant de trouver des solutions originales pour les questions mal réglées. Nous allons passer en revue les différents sous-ensembles du Synthétiseur.

2.2 Définition des différents sous-ensembles

Poste central de distribution

Etant donné la surface disponible, le plateau (Ø 1050 mm et épaisseur 15 mm) montré à la Figure comporte huit emplacements de travail avec chacune une ouverture (Ø 220mm) permettant d'observer les substrats ou les poubelles par en dessous avec une caméra.

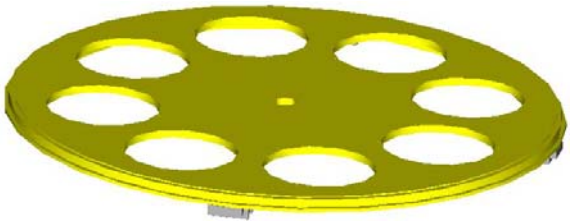


Figure A-2.3 : Vue du plateau.

Le plateau sera usiné en acier inox 316 pour résister aux produits chimiques corrosifs, en particulier les solvants de saturation. Les orifices du plateau seront fermés par des hublots en verre collés de manière à préserver l'étanchéité de l'enceinte réactionnelle. Le plateau effectuera des rotations de 1/8 de tour. Pour ce faire, il sera posé sur un rail circulaire disposé à sa périphérie pour limiter sa déformation, notamment lorsque les presses des postes non localisés seront descendues. En dynamique, le plateau supporte uniquement son propre poids. En statique (Figure), il faut y rajouter 3 charges de 100 N réparties sur chacun des postes non localisés. La précision du positionnement angulaire nécessaire est de $1{,}11 \times 10^{-3}$ °. Le système nécessite une grande précision de positionnement relatif et non absolu. De ce fait, le montage peut accepter des problèmes de décalage à condition qu'ils soient constants

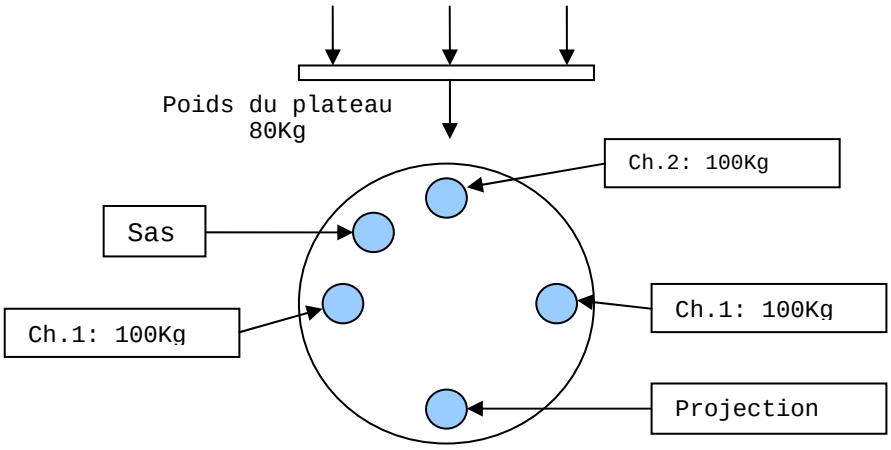


Figure A-2.4 : Charge maximale appliquée sur le plateau.

La masse à soutenir ainsi que la déformation des différents éléments sont à prendre en considération. Nous avons étudiés deux solutions possibles :

(1) mettre un rail circulaire de la marque THK avec 4 patins en dessous du plateau pour le maintenir.

(2) porter le plateau sur un cylindre de 30 cm de diamètre monté sur un moteur rotatif.

Avec la première solution, il est prévu de détecter la position du plateau avec un système d'indexage mécanique (soit constitué de 8 capteurs de position placés aux points d'arrêt soit des indexeurs mécanique positionnés sur le rail circulaire).

Avec la deuxième solution, nous avons prévu une règle optique circulaire. Celle-ci permet de connaitre la position du plateau quel que soit l'incrément, ce qui donne plus de souplesse au fonctionnement du dispositif et aussi plus de sécurité (évitement des collisions).

Porte-substrat

Le porte-substrat est une pièce amovible, qui sera spécifique à chaque géométrie de substrats. Le changement de porte-substrat prévu est simple, rapide et précis. Pour ce faire, la pièce est prise en sandwich entre deux disques creux[1] fixés sur le plateau (Figure).

Le porte-substrat est mobile en rotation : un réglage manuel à vis micrométrique est prévu afin d'aligner le réseau des micropuits des substrats et celui des buses des têtes piézoélectriques. Le bord extrême du porte-substrat glisse sur le bord interne du perçage du grand plateau avec un graissage[2], qui assure l'étanchéité avec l'extérieur.

Pour permettre l'observation à la caméra, le porte-substrat est évidé dans sa partie centrale de façon à contenir un hublot en verre épais. L'étanchéité verre/porte-substrat est assurée par une colle silicone, comme dans le Synthétiseur de puces basse densité. Le substrat sera plaqué contre le hublot en verre, dont la planéité devra être suffisante, et fixé mécaniquement par les bords sur le porte-substrat.

[1] Seul le disque supérieur sera démonté lors du changement de porte substrat.
[2] Graisse insoluble dans les solvants de saturation. Il est possible aussi de remplacer la graisse par un joint torique tournant en Kalrez

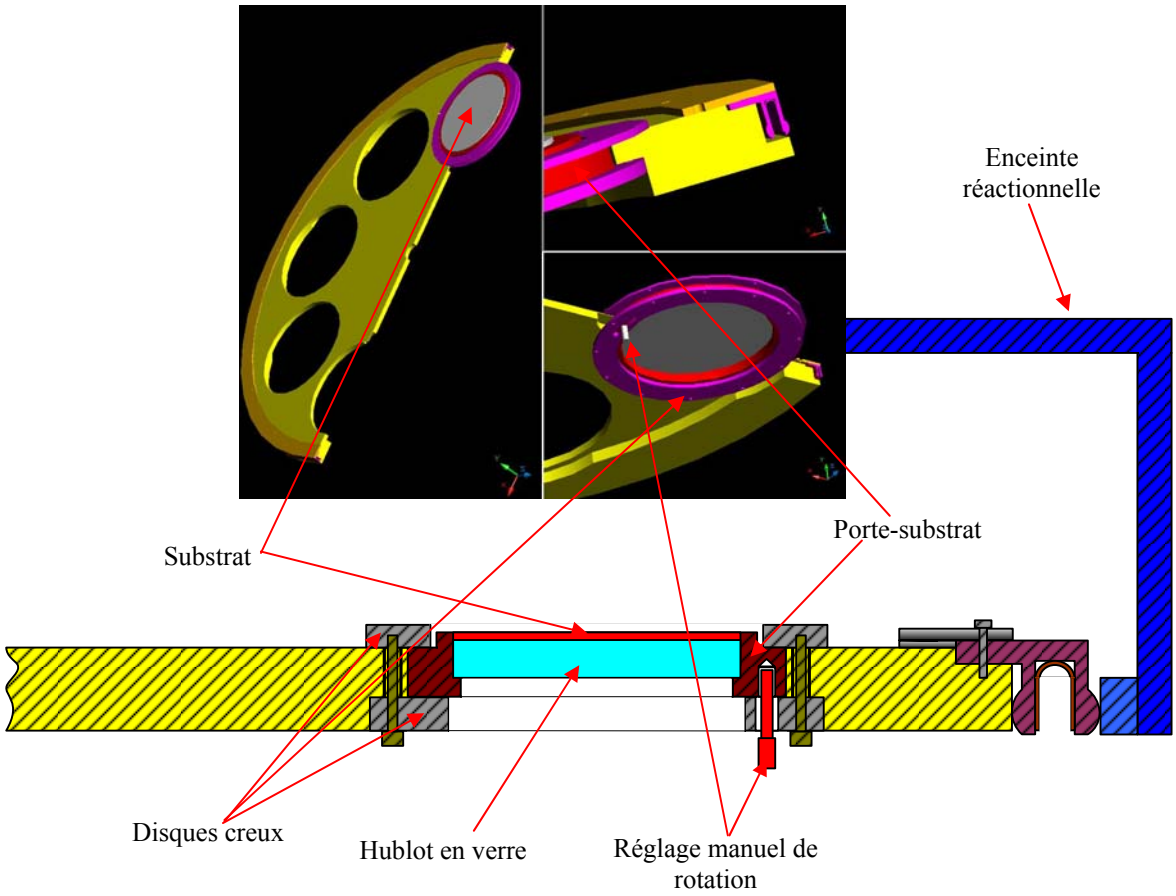


Figure A-2.5 : Conception du porte-substrat avec wafer silicium Ø 200 mm.

Poste de projection

Ce poste est l'un des plus importants de la machine car c'est de la précision des projections et des mouvements de la tête de projection, que dépendra la densité des puces produites. Chaque rang de sondes sera synthétisé après une rotation complète du plateau tournant : un repositionnement répétable à chaque tour sera donc nécessaire. Il conviendra aussi d'éviter les vibrations pendant les mouvements de la tête de projection.

La Figure IV-20 et la Figure IV-21 montrent une vue du poste de projection. La conception est directement inspirée des générations précédentes de machine de synthèse in situ [1, 20, 38].

Les 6 têtes de projection piézoélectrique sont disposées dans un fût en inox ouvert vers l'extérieur, de façon à pouvoir procéder aux connexions fluidiques et électriques sans avoir à intervenir dans l'enceinte réactionnelle. L'enceinte réactionnelle est fermée par un soufflet flexible en silicone armé de Kevlar, qui entoure le fût. La déformation du soufflet permet de compenser les déplacements de la tête de projection en conservant l'intégrité du volume réactionnel.

Chaque moyen de projection peut projeter 6 réactifs différents, on peut alors au total projeter 36 réactifs différents. Chaque réactif est projeté sur 1 ligne de 48 buses indépendantes espacées de 212 µm.

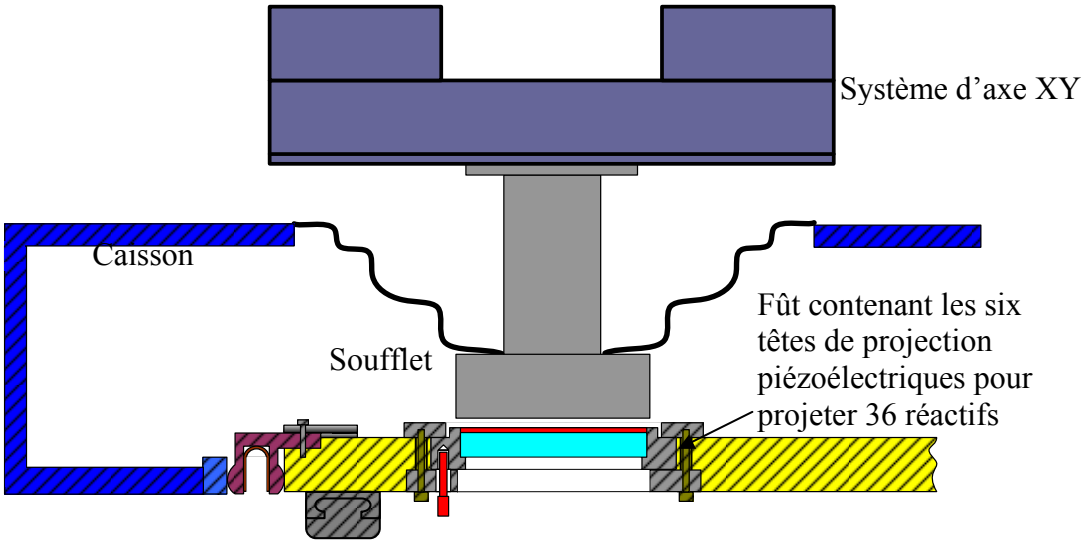


Figure A-2.6 : Module de projection.

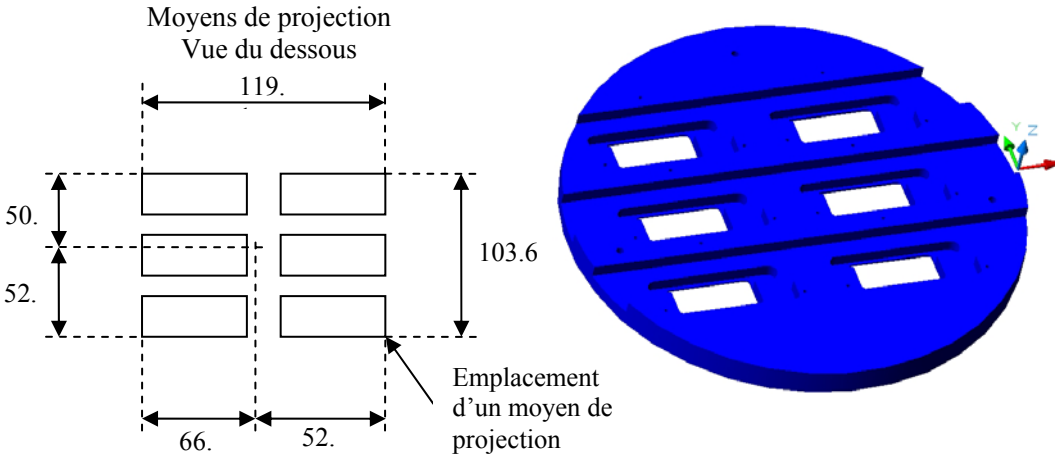


Figure A-2.7 : Dimensions du module de projection et vue 3D du support des têtes de projection.

Axes (X, Y) et moteurs linéaires

La masse de la tête de projection est d'environ 10 kg. Elle est mise en mouvement par un système de translation XY disposé en H sur le châssis de la machine pour une bonne rigidité. Un troisième axe Z permettra d'ajuster l'écart entre la tête de projection et le substrat. La course des axes permettra d'adresser avec tous les réactifs l'intégralité de la surface d'un wafer de silicium de Ø 200 mm.

Etant donné les contraintes de précision, de vitesse et de coût, le système de translation choisi est un système d'axes linéaires magnétiques. La position des axes sera détectée par des

règles optiques. Pour projeter sur un wafer de Ø 200 mm avec les six têtes de projections et pour que toutes les buses puissent tirer, il faut une course de balayage de 380 mm et une course de décalage, c'est-à-dire de saut de ligne en ligne et de nettoyage de 360 mm. Le positionnement devra être effectué avec une précision suffisante pour pouvoir projeter dans les micropuits sans erreur.

La solution choisie est basée sur des moteurs magnétiques linéaires pour réduire les phases et les longueurs d'accélérations au minimum. Ces moteurs sont équipés d'un double rail monté en "Gantry" (deux moteurs en Y et un moteur en X). Le décalage sera selon Y, le balayage et le positionnement selon X avec une précision de +/- 2µm. La vitesse sera réglable et pourra varier de Vmin = 200 mm/s à Vmax = 800 mm/s. Le matériel préconisé (fournisseur HIWIN) aura une flexion des axes inférieure à 1/10 de mm.

- 2 SLMS 371 UA 405 pour Y, de longueur 834 mm et assurant une course de 405 mm ;
- 1 SLMS 231 UA 744 pour X de longueur 1090 mm permettant une course de 744 mm.

La fréquence maximale de tir est limitée par l'électronique 11 kHz, ce qui donne une vitesse maximale de déplacement de 770 $mm.s^{-1}$.

Les problèmes d'alignement et de parallélisme

La hauteur des têtes de projection doit pouvoir être réglée manuellement sur une plage de 0.5 mm à 2.5 mm avec une précision de l'ordre de 0.1 mm. Le parallélisme entre les têtes de projection et le substrat doit être de l'ordre du $1/10^{ème}$. Avec un bon montage mécanique nous pouvons résoudre cette difficulté sans avoir recours à des systèmes compliqués d'alignements.

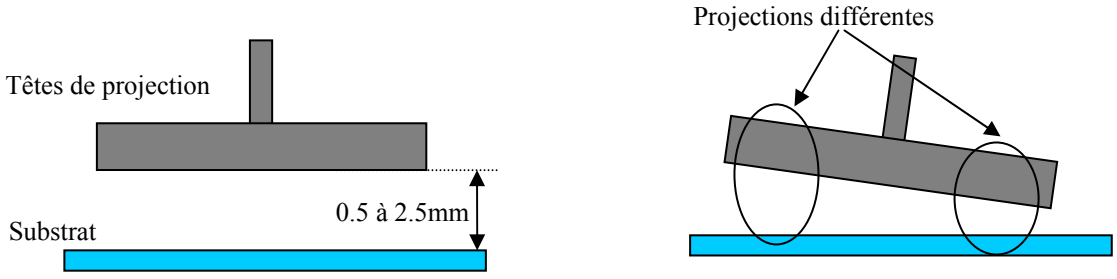


Figure A-2.8 : Schématisation du réglage en hauteur de la tête de projection et problème de parallélisme entre les têtes de projection et le substrat.

Il conviendra aussi (i) d'aligner les réseaux des buses d'éjection des six moyens de projection entre eux et aussi (i) d'aligner le réseau commun ainsi constitué avec le réseau des

micropuits du substrat. De ces alignements dépendront la densité des puces (avec la résolution des projections et leur répétabilité).

Le premier alignement sera effectué à l'extérieur de la machine lors du montage des moyens de projection dans le support de la Figure IV-19 (réglages micrométriques manuels). Il restera inchangé pour toute la durée de vie des moyens de projection. Pour assurer une durée de vie longue, les systèmes d'alimentation en fluide des têtes de projection et le système de nettoyage sont des éléments critiques. En effet il faut déboucher régulièrement les buses.

Le deuxième alignement sera effectué lors du chargement de chaque substrat grâce à la rotation prévue dans le porte- substrat. Il sera effectué à l'aide du système de visualisation par caméra, qui lui aussi est un élément critique de la machine

Système de nettoyage des têtes de projection

Le système de nettoyage de la tète de projection sera déduit directement de celui des imprimantes bureautiques. Lorsque le plateau tournera, la tête de projection viendra se plaquer sur une cuve, mobile verticalement avec un jeu de ressorts, de façon à former une chambre étanche. Une pompe créera alors une dépression dans la tête de projection, qui permettra de déboucher les buses d'éjection des piézoélectriques.

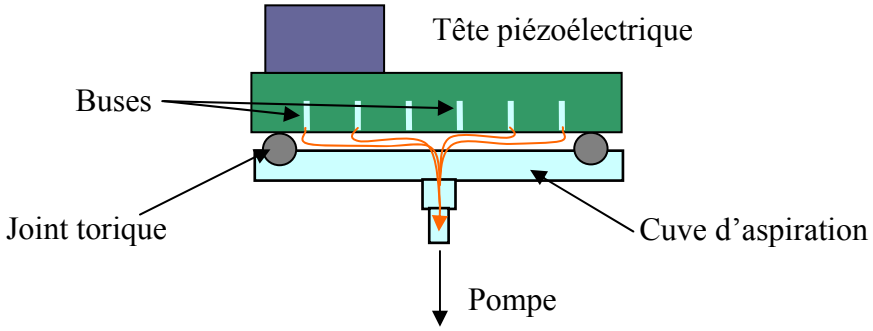


Figure A-2.9 : Système de nettoyage d'une tête de projection piézoélectrique.

Postes non localisés

Ils correspondent aux trois chambres de réactions non localisées. La solution est identique pour les trois. Elle est basée sur un principe comparable à celui d'une presse.

Chaque poste est constitué d'un axe de translation verticale actionné par un vérin pneumatique et guidé deux pivots glissants. Au bout de l'axe, une demi-chambre fluidique est disposée avec un joint torique, qui vient recouvrir la partie active du substrat. Lorsque la presse est baissée, l'étanchéité du système formée par la demi-chambre, le joint et le substrat

est suffisante pour permettre d'envoyer les réactifs sur toute la surface du substrat avec une faible consommation (volume de la chambre : 31 ml pour un wafer Ø 200 mm).

Pour limiter au maximum les jeux entre la demi-chambre et le substrat, on utilise :

- un embout à rotule permettant un pivotement autour de 2 axes ;
- un système triangulaire à ressorts permettant de plaquer les bords de la demi-chambre sur la surface du substrat (tête flexible de conception proche de la tête de tamponnage du banc de µTP).

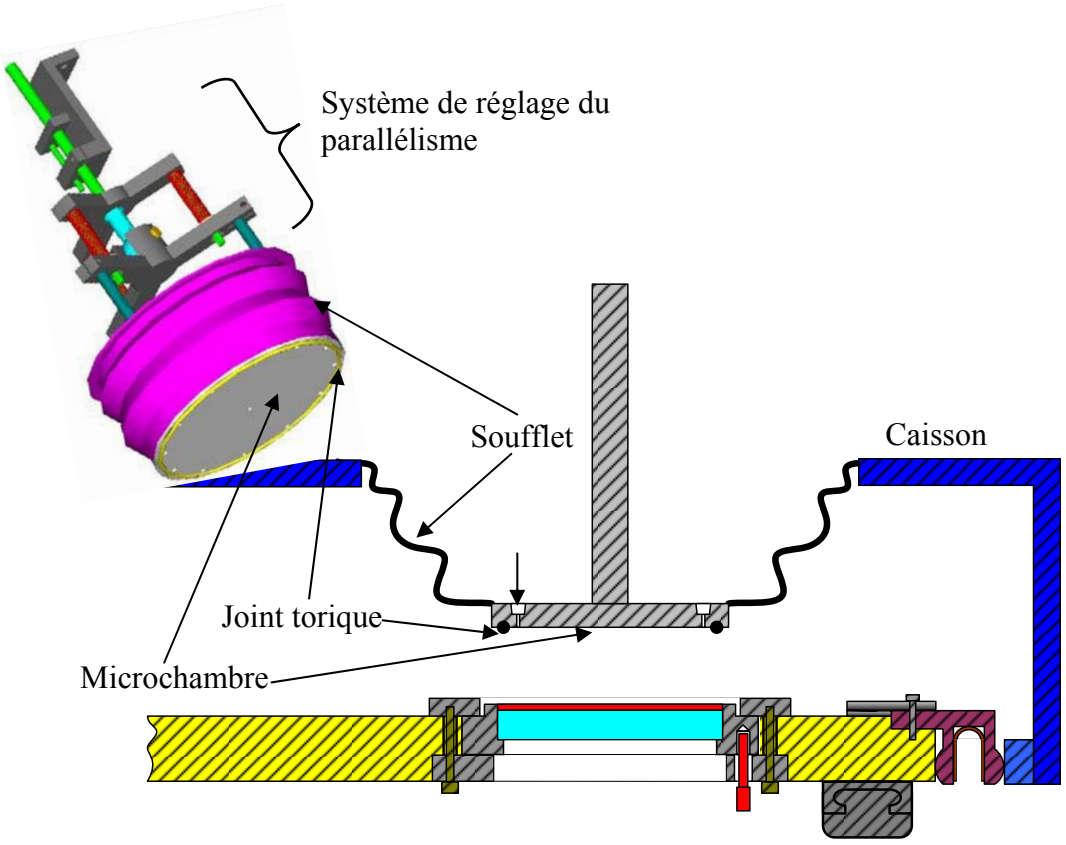


Figure A-2.10 : Poste non localisé

Un soufflet en silicone armé de Kevlar entoure la tête de la presse et assure l'étanchéité avec l'enceinte réactionnelle. La longueur variable du soufflet compense le mouvement de la presse.

Enceinte réactionnelle

Il s'agira d'un volume fermé d'un coté par un capot (Figure) et de l'autre coté par le plateau tournant ; l'étanchéité entre les deux sera assurée par le joint en U. Les différentes ouvertures du capot seront fermées par des soufflets, à l'exception du sas d'entrée/sortie des

substrats. Des capteurs seront prévus pour contrôler l'hygrométrie et la température de l'enceinte réactionnelle. Le système de saturation sera triple :

- une réserve interne de solvant pour procéder à une saturation grossière du volume de travail ;
- un balayage de gaz anhydre saturé de solvant envoyé vers l'enceinte, pour empêcher toute entrée d'humidité ;
- une saturation locale prévue au niveau du poste de projection pour contrôler la durée de vie des picogouttes dans les micropuits des substrats.

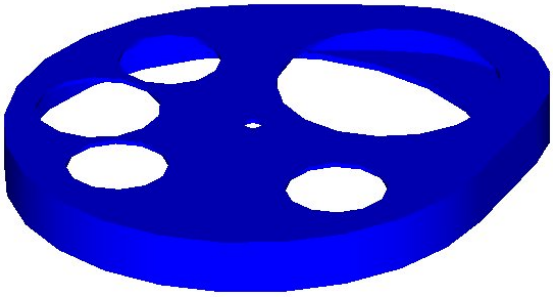


Figure A-2.11 : Vue CAO du capot fermant l'enceinte réactionnelle.

Sas d'entrée/sortie du substrat

Nous prévoyons un sas pour introduire et enlever les substrats dans l'enceinte réactionnelle en toute sécurité et sans avoir à la désaturer. Le sas est mis en place par l'opérateur à chaque introduction/enlèvement de substrat c'est-à-dire au début et à la fin de la synthèse. Le principe du dispositif est montré à la Figure . Le sas est constitué d'un cylindre creux fermé par deux couvercles amovibles. Il coulisse verticalement dans le capot de l'enceinte réactionnelle de façon à venir se positionner sur l'un des porte-substrats. Pendant ce mouvement, l'étanchéité est assurée par un premier joint torique en Kalrez disposé sur le capot. La partie inférieure du sas porte un deuxième joint torique, qui permet, en pressant suffisamment le sas, de constituer une mini-chambre étanche entre le couvercle inférieur du sas et le porte-substrat. Il est possible ainsi d'isoler ce mini-volume du reste de l'enceinte et de procéder à sa désaturation à l'aide d'une pompe. Le substrat est ensuite introduit en enlevant successivement les deux couvercles amovibles et en les replaçant. Avant l'ouverture de la demi-chambre et l'enlèvement du sas, le mini-volume d'air est pompé de façon à éliminer toute trace d'eau pouvant affecter le rendement de synthèse.

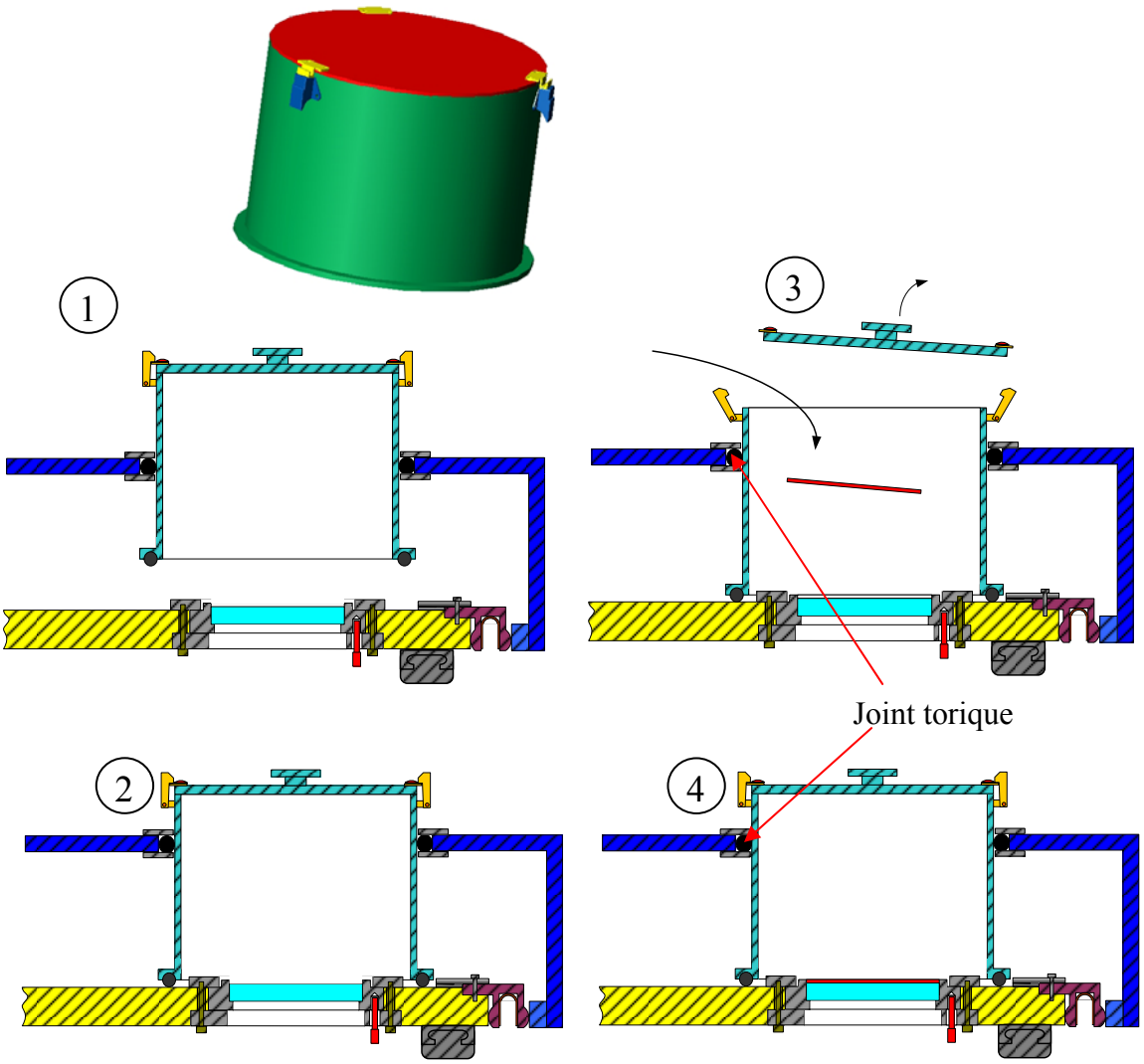


Figure A-2.12 : Sas pour l'introduction et l'enlèvement du substrat.

2.3 Conclusion

Au total, le Synthétiseur comporte 16 axes en mouvement :

- une rotation centrale pour le plateau tournant (moteur pas à pas) ;
- trois translations correspondant aux axes linéaires magnétique de la tête de projection :
- 6 rotations pour les têtes piézoélectriques pour aligner indépendamment les réseaux de buses avec le réseau de plots ;
- une rotation pour une réglage manuel de l'orientation de chaque porte-substrat ;
- une rotation centrale (moteur pas à pas) pour la tête de projection pour un alignement globale des buses de projection par rapport aux puits de la puce ;
- trois translations verticales pour les postes localisés ;
- 2 translations et une rotation pour le déplacement de la camera.

Le Synthétiseur in situ de biopuces haute densité peut paraître complexe. Mais il repose sur de nombreux éléments qui ont été validés sur la machine de génération précédente et qui sont repris systématiquement pour réduire les risques. La principale nouveauté est le système de projection piézoélectrique, qui a été validé au chapitre deux. La construction mécanique de l'instrument est délicate car nous avons comme objectif de travailler sur de grands substrats avec une grande précision géométrique. L'on aboutit ainsi à un instrument aux dimensions imposantes, mais dont finalement l'architecture repose principalement sur le rail circulaire. Le budget nécessaire, pour mettre en place le Synthétiseur est de l'ordre de 200 k€ réparti entre 125 k€ pour les composants et 75 k€ pour l'usinage et le montage. Bien entendu, le développement des protocoles de synthèse et leur validation, nécessitera de mettre en place des moyens humains et techniques tout aussi importants que la mise en place du Synthétiseur.

Annexe 3 : Moyens de projection mixtes piézoélectriques-microélectrovannes

Nous proposons de compléter les systèmes de projection piézoélectriques du chapitre 2 par un système original d'alimentation en réactif. En effet, pour atteindre un bon rendement de couplage, les phosphoramidites pour la synthèse d'ADN doivent être impérativement être à l'abri de l'humidité de l'air [1]. De plus, le remplissage manuel des réservoirs de la tête piézoélectrique à l'aide de seringues, tel qu'il est effectué au chapitre 2, n'est absolument pas une manipulation pratique et simple à effectuer. Le remplissage est difficilement reproductible, ce qui complique beaucoup l'initialisation "fluidique" du système de projection. Il est alors nécessaire de procéder à de très nombreux cycles de projection avant d'arriver à initialiser le système de projection de manière satisfaisante.

Pour résoudre ces problèmes, nous proposons de prévoir, pour chaque réactif de projection, un réservoir fluidique contrôlé par une microélectrovanne.

3.1 Projection par microélectrovannes

Nous allons tout d'abord expliquer le principe du système de projection par microélectrovanne développé par le LEOM pour le Synthétiseur in situ de puces à ADN basse densité et pour le procédé de fabrication ex situ de biopuces par multiprojection.

Ce système de projection est constitué à partir d'une microélectrovanne commerciale rapide (Lee Company) et d'un microréservoir fluidique indépendant (Eppendorf) contenant le liquide à projeter (une biomolécule dans un tampon ou un réactif de synthèse dans un solvant) [181]. Le principe est montré à la Figure : une arrivée de gaz neutre permet de mettre le microréservoir en surpression (par exemple 0,3 bar) et de faire remonter le produit, via un tube en PTFE, vers la microélectrovanne normalement fermée. Celle-ci est constituée d'une entrée par laquelle pénètre le liquide en surpression ainsi que d'un clapet qui s'ouvre sur une commande TTL (via deux électrodes) et qui se referme par l'action d'un ressort. L'ouverture du clapet permet de propulser le liquide vers l'extérieur au niveau de la buse d'éjection (Figure 2).

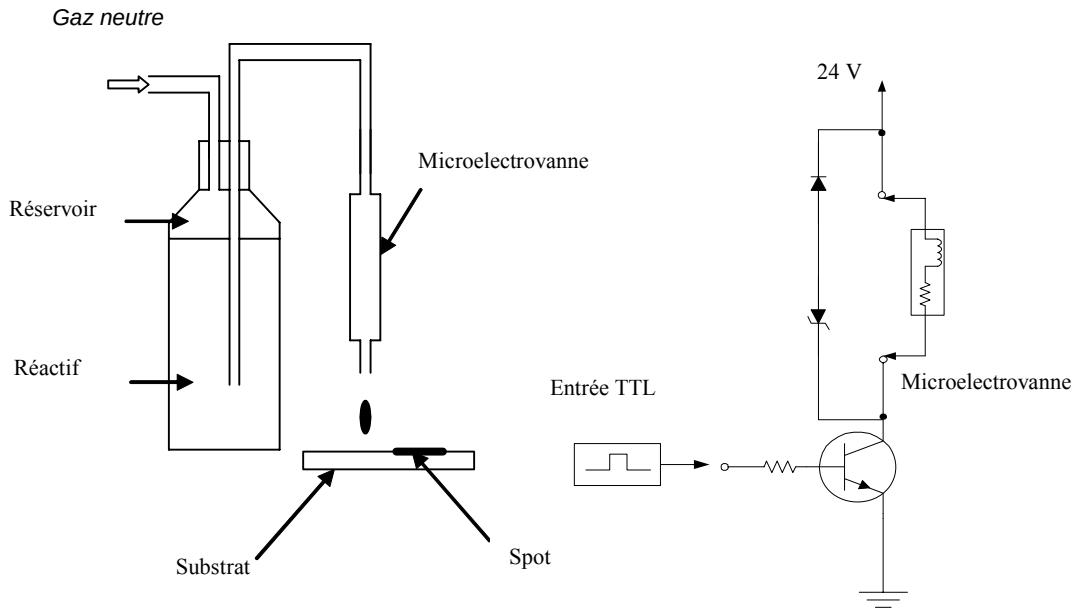


Figure A-3.1 : Principe de la projection par microélectrovanne.

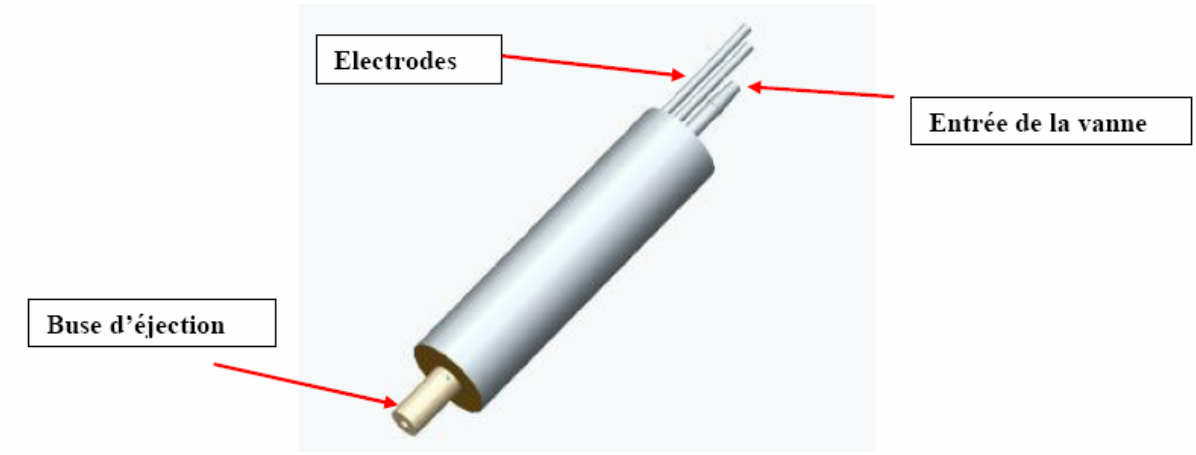


Figure A-3.2 : Vue CAO 3D d'une microélectrovanne miniature (Lee Compnay).

La microélectrovanne est miniaturisée de sorte que la vitesse de commutation est rapide. Le signal de commande d'une microvanne est un signal carré TTL dont la durée d'ouverture est de l'ordre de la milliseconde (Figure) :

- en dessous d'une valeur limite inférieure (1 ms), la bobine n'a pas assez d'énergie pour comprimer le ressort : il n'y a pas de projection ;
- au dessus d'une valeur limite supérieure Tsup, la dissipation de chaleur par effet Joule risque de griller la microvanne.

La quantité de fluide injectée dépend de la pression du système (donc du diamètre des connexions fluidiques et la buse d'éjection), de la durée d'ouverture du système de la fréquence des cycles du signal de commande.

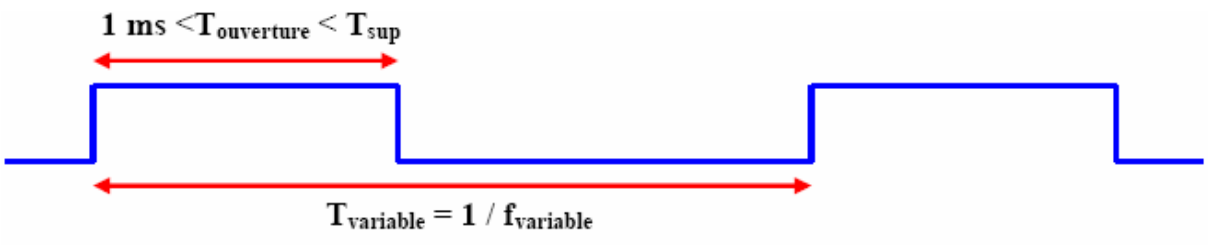


Figure A-3.3 : Signal électrique de commande d'une microélectrovanne.

L'ensemble du système de projection est miniaturisé de sorte qu'il est possible d'en réserver un pour chaque liquide à projeter en évitant ainsi toute contamination entre les produits. De nombreuses variantes ont été développées au laboratoire [45]. Utilisé tant pour la synthèse in situ, que pour le procédé ex situ, ce dispositif permet d'effectuer des projections avec une résolution de 5 à 100 nanolitres. Le clapet peut être en EPDM ou en Kalrez™, matériau proche du PTFE autorisant la projection d'une large gamme de solvants.

La conservation du produit dans un réservoir en surpression permet d'éviter l'évaporation du solvant, sa concentration en réactif restant de plus inchangée. **Dans le cas de la synthèse in situ, la surpression permet aussi de conserver le produit en milieu anhydre, ce qui est l'un des éléments clefs pour aboutir à un bon rendement de synthèse : il a été montré que la durée de conservation des phosphoramidites dans le Synthétiseur de puces est du même ordre de grandeur que dans un synthétiseur d'oligonucléotides, soit de l'ordre d'une semaine, ce qui est absolument essentiel étant donné le coût des réactifs de synthèse.**

3.2 Tête de projection intégrant microélectrovannes et piézoélectriques

Pour ce concerne la tête de projection du Synthétiseur in situ de puces haute densité, nous proposons de prévoir un réservoir piloté par microélectrovanne pour chaque réactif. La tête de projection complète est représentée sur la Figure , chacune de ses 6 lignes indépendantes de buses, possède une microélectrovanne d'alimentation en réactif.

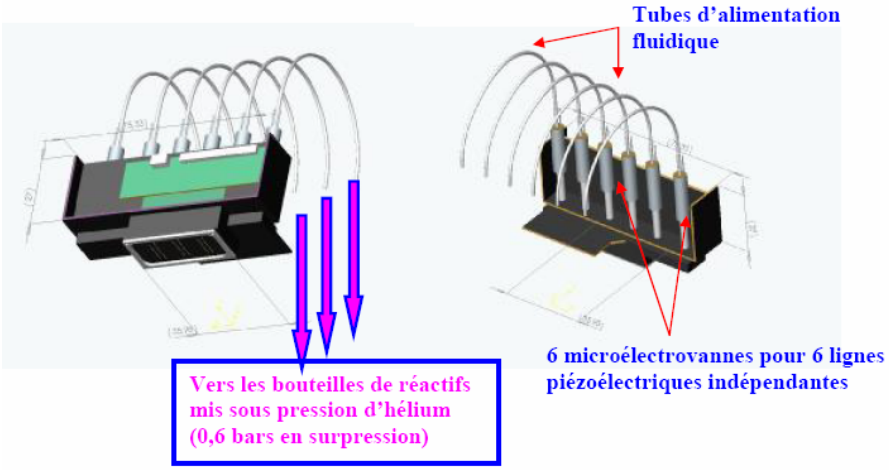


Figure A-3.4 : Tête de projection assemblée avec les 6 microvannes d'alimentation.

En amont de l'entrée des microélectrovannes, un système fluidique sous pression comparable à celui de la Figure assure l'alimentation des vannes qui, elles mêmes distribueront les réactifs sur commande dans les lignes de buses piézoélectriques. Les microélectrovannes choisies ont une durée d'ouverture minimale compatible avec l'injection de 50 nanolitres de réactifs dans les six voies de projection de la tête piézoélectrique. Pour générer tous les signaux électriques qui sont nécessaires à la commande de la tête piézoélectrique et aux 6 microélectrovannes (plus d'une vingtaine), nous avons développé un logiciel sous LabView. Il a été possible de développer un protocole de remplissage initial fiable de la tête de projection piézoélectrique et un protocole de compensation permettant de remplir régulièrement les réservoirs de la tête piézoélectrique pendant les projections. Le fonctionnement du système de projection ainsi formé s'est avéré d'une grande régularité.

Annexe 4 : Electronique du banc de microtamponnage

Les différents sous-ensembles de la commande électronique du banc de μTP sont détaillés à la Figure . La machine est commandée par un PC avec des cartes électroniques internes reliées à des composants extérieurs. Soit :

- une carte multifonctions National Instruments PCI 6014 reliée à un bloc de connexion externe au PC de façon à piloter l'électronique de commande (Cool Drive 225DX24) qui fournit la puissance nécessaire déclencher les électrovannes du distributeur pneumatique du vérin, du système de pulvérisation (cf. Figure IV-10 dans le chapitre 4) et de séchage du tampon ;
- une carte ISA Owis PC-SM 30 pour commander directement les trois moteurs pas à pas des platines XYZ déplaçant la caméra ;
- une carte National Instruments d'acquisition d'images PCI-1409 qui récupère l'image provenant de la caméra (les images de celle-ci peuvent être visualisées par le moniteur du PC et par un moniteur indépendant).

Il y a de plus des éléments indépendants du PC (systèmes d'éclairage et actionneur piézoélectrique).

La Figure montre une vue simplifiée de l'organigramme du logiciel. Celui-ci a été entièrement développé sous LabView. En mode "réglage de la machine", il consiste à visualiser les images de la caméra. Le logiciel permet de déplacer la zone d'observation de la caméra. Les autres paramètres du processus sont réglés manuellement par des manodétendeurs (pression pneumatique du vérin, pression de pulvérisation, pression de séchage du tampon). En mode action, il consiste à entrer la durée du contact et à déclencher le départ de vérin. La pulvérisation et le séchage sont automatiquement effectués. Une image du contact tampon/substrat est enregistrée automatiquement.

Dans la version du banc de μTP avec actionneur piézoélectrique (Annexe 6), la position de l'actionneur piézoélectrique est commandée manuellement par un potentiomètre avec affichage de la position avec un capteur de résolution 10 nanomètres. Il est possible de commander l'actionneur via le PC.

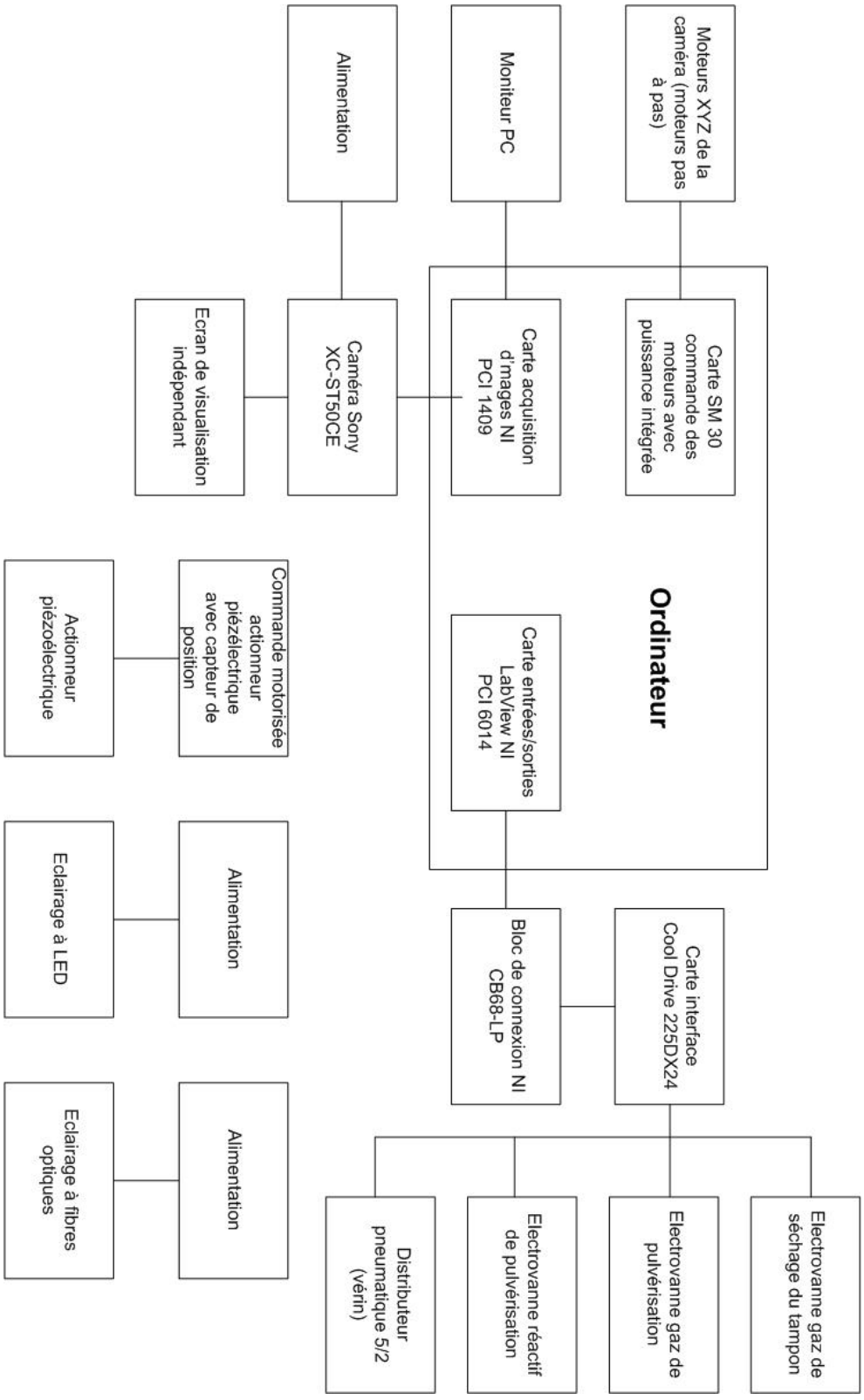


Figure A-4.1 : Commande électronique du banc de µtamponnage.

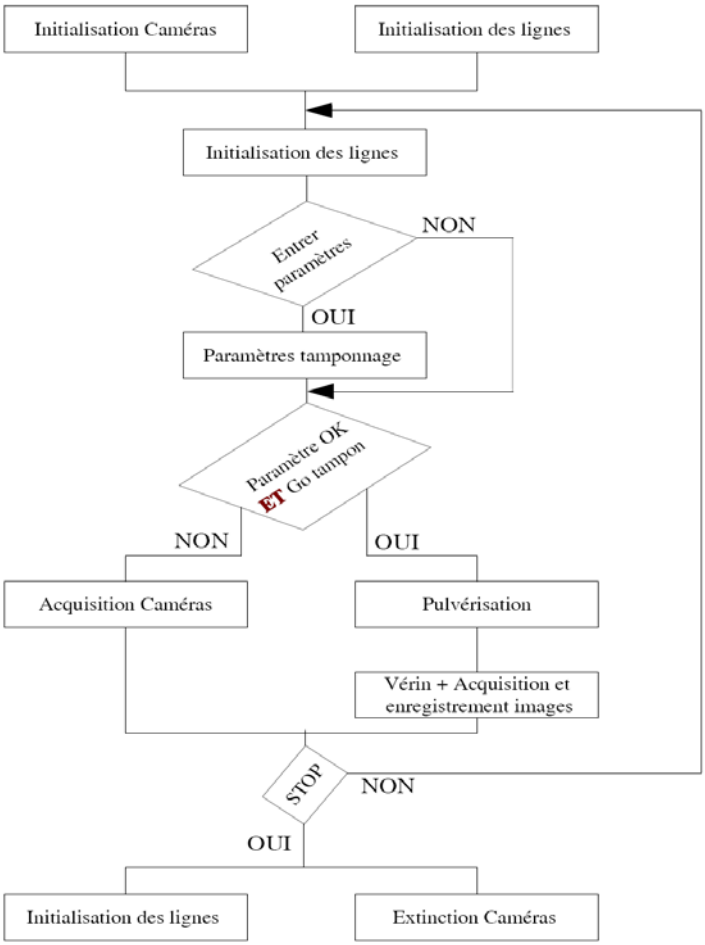


Figure A-4.2 : Organigramme du programme principal.

Annexe 5 : Les déformations du tampon

Dans cette partie nous allons explorer les différentes théories récemment publiées sur les déformations du tampon. Nous discuterons ces modèles du point de vue physique sans nous attarder sur les développements mathématiques. Nous rappelons que les déformations des motifs du tampon correspondant à la pratique du µtamponnage ont été répertoriées dans la Figure III-5 de la section III.2.1 [147, 149] :

La Figure ci-dessous, rappelle la géométrie définie par [147] dans le cas d'un tampon très allongé suivant l'axe z et comportant un réseau de canaux parallèles à z de largeur 2w séparés par des piliers de largeur 2a. Les canaux ont une profondeur h tandis que la base du tampon à une épaisseur H. Le facteur de forme h/2a est l'un des paramètres les plus importants du procédé.

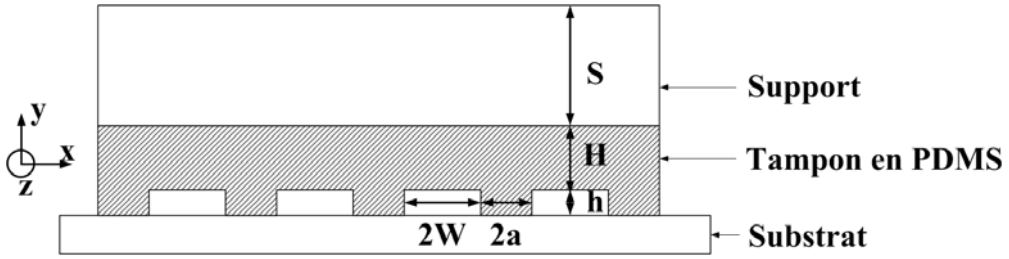


Figure A-5.1 : Paramètres géométriques du tampon d'après [147]

5.1 Modèle ne faisant pas intervenir l'énergie de surface

Hui et al. [147] ont proposé un modèle pour l'affaissement de la base du tampon dont les seuls paramètres sont :

- la charge σ exercée sur le tampon ;
- la géométrie du tampon.
- un paramètre E' lié au module d'Young du PDMS

Soit $E' = E(1-\nu^2)$; ν étant le coefficient de Poisson. Quasiment E' = 4/3 E pour un coefficient de Poisson de 0,5, ce qui est bien vérifié pour le PDMS

Dans le cas où h << a et w, il n'y a pas affaissement de la base du tampon tant que :

$$\frac{4}{\pi}\frac{\sigma}{E'}\frac{w}{h}(1+a/w)\ \cosh^{-1}\left[\sec\left(\pi/2\ \ \frac{1}{1+a/w}\right)\right] \prec\ \ 1$$

Lorsque la fonction à gauche atteint la valeur 1, la charge externe atteint une valeur critique σ_c et la base du tampon s'effondre.

Du point de vue physique, ce modèle est établi dans le cas où h << a et w pour des réseaux de canaux parallèles et allongés. Le critère de stabilité ne fait intervenir que des termes géométriques et le module d'Young mais pas de terme d'énergie de surface. Bien que ce modèle semble être confirmé par les expériences menées par Sharp[149], il apparaît contredit par l'équipe de Rogers et al [151, 193, 194]. Cette équipe a montré expérimentalement, en renversant le dispositif expérimental qu'un effondrement est possible sans charge externe, indépendamment même du poids du tampon. Il parait donc nécessaire d'améliorer cette approche.

5.2 Modèle faisant intervenir l'énergie de surface

L'équipe de Rogers, Huang et al. [193] a ainsi proposé un nouveau modèle faisant intervenir l'énergie thermodynamique d'adhésion entre le tampon et le substrat en plus de la description géométrique du substrat et de son module[1].

Nous nous plaçons dans le cas le plus intéressant : soit un réseau avec w ~ a, qui est mis en contact avec un substrat très rigide. L'épaisseur réelle du tampon n'intervient pas dans ce modèle, mais l'on suppose toujours que la profondeur du relief est nettement **inférieure** à la largeur des canaux et des piliers[2], soit h << w et a. Les écarts tampon/substrat sont alors considérés comme des microfissures (microcracks) et l'on peut faire appel à la théorie développée pour modéliser Tada et al [195]. L'hypothèse de départ est que l'effondrement intervient dès que h est au dessous d'une valeur critique. En considérant, qu'il n'y pas de charge externe, le modèle repose alors sur un calcul de l'énergie potentielle du système tampon/substrat incluant :

- un terme lié à la déformation élastique du tampon au niveau du relief (terme répulsif) ;
- un terme lié à l'énergie thermodynamique d'adhésion du tampon sur le substrat (terme attractif).

L'énergie thermodynamique d'adhésion γ du système tampon/substrat est : $\gamma = \gamma PDMS + \gamma SiO2 - \gamma int$, où γ_{PDMS} et γ_{SiO2} sont les énergies de surface du tampon et du substrat par rapport à l'air, tandis que γ_{int} est l'énergie de l'interface tampon/substrat. Notons que γ_{PDMS} et γ_{SiO2} sont connus, par contre γ_{int}, et par conséquent γ sont des inconnues, qui

[1] Notons [194] n'exclue pas la possibilité d'une composante électrostatique dans l'interaction PDMS/silicium, qu'il faudrait alors intégrer dans le modèle si son existence était établie.

[2] Nous avons conservé partout une notation cohérente pour w et a, mais dans les articles référencés il y a un risque de confusion car les définitions de w et a sont souvent échangées.

seront déterminées expérimentalement. Ainsi pour un système PDMS / silicium, Huang [193] trouve expérimentalement que γ vaut 50 mJ/cm² tandis que Zhou [151] trouve 30 mJ/cm² . Ces valeur sont cohérentes avec celle trouvée par Chaudhury [196].

Considérons maintenant un système constitué du tampon et du substrat. Pour simplifier, on définit l'énergie de référence du système, égale à zéro, comme étant celle du tampon non déformé. La base du tampon s'effondre si l'énergie du système devient inférieure à l'énergie de référence. L'hypothèse fondamentale d'un point de vue physique faite par Rogers, Huang et al. [193] est de considérer que l'énergie potentielle du système effondré est égale à la différence entre celle du système non effondré et celle d'un système comportant une série de microfissures entre le tampon et le substrat coplanaires et périodiques avec une longueur de contact 2b. Soit, graphiquement :

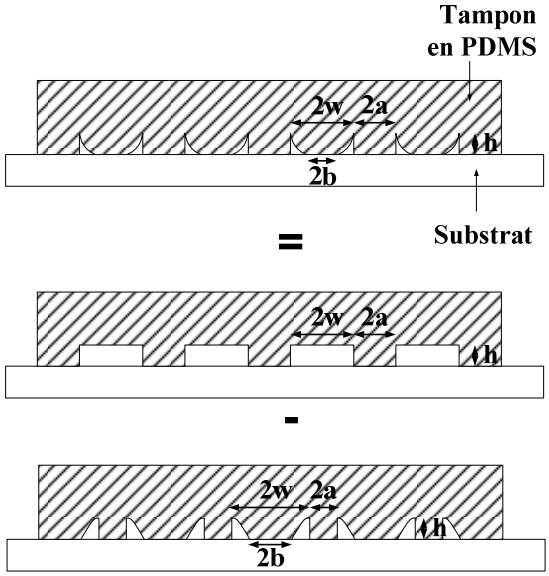


Figure A-5.2 : Approximation de l'énergie du tampon dans le cas du modèle faisant intervenir l'énergie de surface.

Le terme lié à l'énergie thermodynamique d'adhésion du tampon sur le substrat vaut donc : - 2 b γ pour chaque microfissure.

Par ailleurs, pour chaque microfissure, le terme lié à la déformation élastique du tampon au niveau du relief vaut :

$$U_{déf} = -1/2 \int \sigma_{yy}\, h\, dx = 1/2\ E'\ h^2\ f\left(\frac{b}{w}, \frac{a}{w}\right)$$

Où σ_{yy} est la contrainte normale à la fissure et f une fonction adimensionnelle à déterminer.

Ainsi, toujours pour chaque microfissure, l'énergie potentielle du système est donc :

$$U_{totale} = U_{déf} - 2b\gamma$$

soit dans le cas présent :

$$U_{totale} = 1/2\ E'\ h^2\left[f\left(\frac{b}{w},\frac{a}{w}\right) - \frac{4\gamma w}{E'h^2}\frac{b}{w}\right] = 1/2\ E'\ h^2\left[f\left(\frac{b}{w},\frac{a}{w}\right) - \Gamma\ \frac{b}{w}\right]$$

Cette formule fait intervenir un paramètre adimensionnel Γ important qui avait aussi été identifié par [149], soit : $\Gamma = \frac{4\gamma w}{E'h^2}$

Γ peut être considérée comme une énergie d'adhésion normalisée caractéristique de la géométrie et des paramètres physiques du système. Ce paramètre correspond en effet au rapport entre deux composantes énergétiques caractéristiques du tampon, soit :

- énergie maximale d'adhésion du tampon 2 γ w ;
- énergie maximale de déformation ½ E'h² ;

Si nous revenons à l'énergie potentielle du système, l'effondrement interviendra pour une valeur 2b correspondant à un minimum de l'énergie potentielle, soit :

$$\frac{\partial U_{total}}{\partial b} = 0$$

Cette équation qui peut être exprimée en nombres adimensionnels permet de relier b/w à a/w et Γ.

Sans entrer dans les détails mathématiques, pour un réseau avec w ~ a, [193, 195] propose une solution analytique pour f, qui conduisent à trois états du système exprimés en fonction de Γ et a/w [1] :

- pas d'effondrement de la base du tampon si

$$\Gamma\frac{8}{\pi^2}(1+a/w)^2\ \ln\left[\sec\left(\pi/2\ \ \frac{1}{1+a/w}\right)\right] \prec 0{,}83$$

[1] En rappelant que sec = 1/ cos

- effondrement possible de la base du tampon mais non stable si :

$$0{,}83 \prec \quad \Gamma \frac{8}{\pi^2}(1+a/w)^2 \ln\left[\sec\left(\pi/2 \ \frac{1}{1+a/w}\right)\right] \prec 1{,}40$$

- effondrement stable si :

$$1{,}40 \prec \quad \Gamma \frac{8}{\pi^2}(1+a/w)^2 \ln\left[\sec\left(\pi/2 \ \frac{1}{1+a/w}\right)\right]$$

D'après [193, 194], pour un système PDMS/silicium, ce modèle est confirmé expérimentalement pour au moins les valeurs suivantes :

- 2 w = 1000 µm ;
- 100 µm < 2 a < 2000 µm d'après [193] à 5000 µm d'après [194] ;
- 1,5 µm < h < 5 µm ;

5.3 Conséquences pour des motifs µfluidiques à l'échelle micrométrique

D'après ce qui précède, l'un des paramètres critiques du modèle précédent est la hauteur h du relief. On suppose systématiquement h << w et a. Physiquement, cela justifie que l'on modélise le contact tampon / substrat comme s'il s'agissait d'un problème de microfissures entre un solide élastique et le substrat. Dans la pratique l'approximation précédente n'est pas valable, car nous avons systématiquement h ~ w ou a. Quelquefois les motifs sont isolés et nous avons alors h ~ a avec h << w. Par exemple, pour le dépôt de protéines à l'intérieur du canal µfluidique, nous avons : a = 15 µm avec w ~ ∞ et h = 25 µm. Le modèle ci-dessus n'est donc pas applicable tel quel.

5.4 Conclusion

Malgré l'intérêt des travaux récents sur les interactions tampon/substrat, il nous parait hasardeux de penser que les modèles publiés décrivent correctement la réalité expérimentale et surtout d'affirmer qu'ils définissent une limite intrinsèque au µtamponnage. L'on peut simplement souligner que ces travaux mettent en avant l'importance des termes d'énergie élastique et d'énergie d'interface tampon/substrat. Le paramètre adimensionnel Γ parait important.

Si l'on reprend l'exemple du dépôt de protéines au fond du canal µfluidique, l'on sait que la hauteur de motif du tampon passe de 25 à 20 µm, ce qui correspond à une énergie élastique accumulée de ½ E'(h'-h)². A partir de l'énergie d'interface 2 γ a, avec a = 15 µm et γ estimé à 40 mJ/cm², on trouve que Γ est de l'ordre de 2. Le contrôle de la charge par les butées micrométriques a donc permis de limiter l'énergie élastique accumulée dans le motif au même ordre de grandeur que l'énergie de contact des deux surfaces.

Il serait sans doute possible de reprendre cette question en menant une étude expérimentale systématique avec le banc de µTP (avec et sans contre-réaction).

Annexe 6 : Banc de microtamponnage avec rétroaction par actionneur piézoélectrique

Nous utilisons le même principe que dans le chapitre V, mais en remplaçant les butées micrométriques manuelles par une butée à actionneur piézoélectrique d'une résolution plus fine, ce qui devrait permettre de travailler avec des motifs de tampon d'une plus grande résolution (en théorie équivalente à celle de l'actionneur).

Nous avons disposé dans le banc de µTP un actionneur piézoélectrique Melles Griot 17 DRV 517 (Figure). Il s'agit d'un dispositif combinant une vis micrométrique manuelle de course 13 mm avec un actionneur piézoélectrique motorisé. La commande électronique du piézoélectrique (réf : 17DRV517 Melles Griot) comporte une boucle de rétraction avec un capteur de sorte que la course motorisée de l'actionneur a une amplitude de 20 µm avec une résolution 10 nanomètres. Ainsi l'on peut procéder tout d'abord à un réglage préliminaire micrométrique manuel exactement comme dans chapitre 5, avant de passer à un réglage plus fin avec la commande électronique.

Figure A-6.1 : Platine de déplacement Melles Griot 17 DRV 517 intégrant une vis micrométrique manuelle et un actionneur piézoélectrique motorisé.

Pour des questions d'encombrement, nous avons prévu de ne disposer qu'un seul actionneur dans le banc de µTP. Comme le montre la Figure , celui-ci est logé dans une pièce fixée au bâti de la machine, sous le rail de guidage, avec un renvoi mécanique de façon à disposer le point de contact sur un centre de symétrie (soit l'axe horizontal au milieu du coté du grand coté du tampon). La liaison entre l'actionneur et la machine se fait par l'intermédiaire d'une tige coulissante poussée d'un coté par l'actionneur piézoélectrique et de l'autre coté par un ressort. Le ressort est absolument nécessaire pour que le piézoélectrique soit constamment chargé car c'est un élément très fragile [197]. Nous avons choisi un ressort de compression de raideur 0,2 N/mm qui correspond à une charge minimale de 1 N en l'absence de contact. La Figure montre une vue du dispositif expérimental. L'actionneur

piézoélectrique peut être piloté par l'ordinateur, ce qui permet de faire varier la hauteur de butée de manière dynamique. Cet instrument préfigure ce que pourrait être un banc de nanotamponnage.

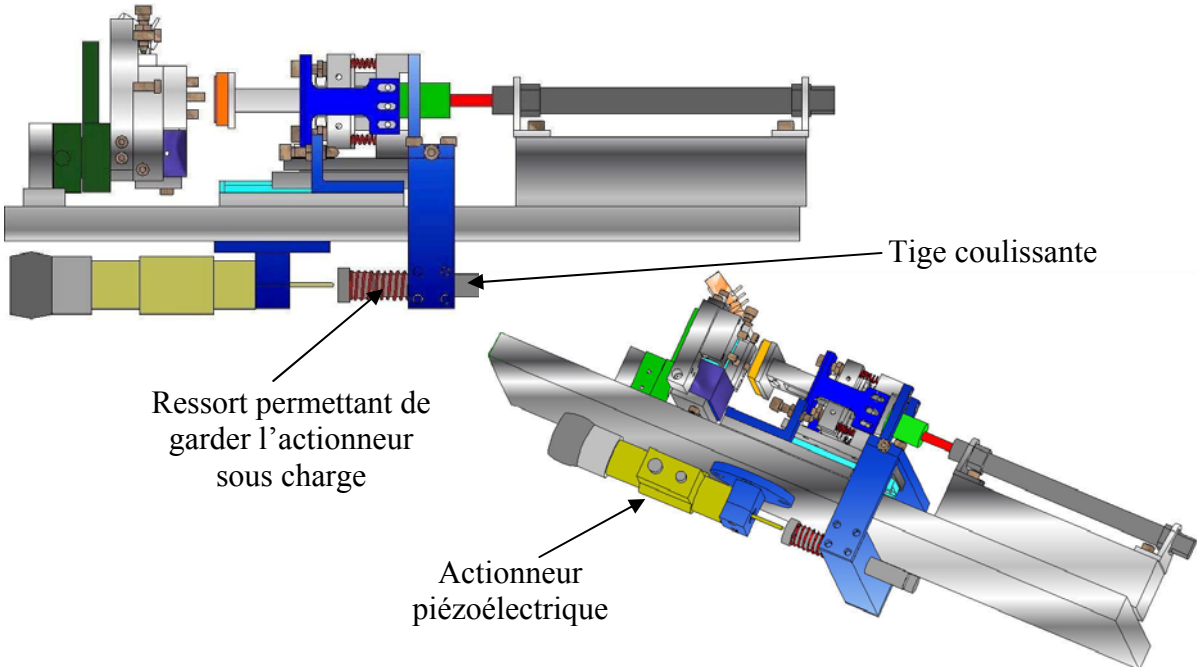


Figure A-6.2 : Conception mécanique du banc de µtamponnage avec actionneur piézoélectrique.

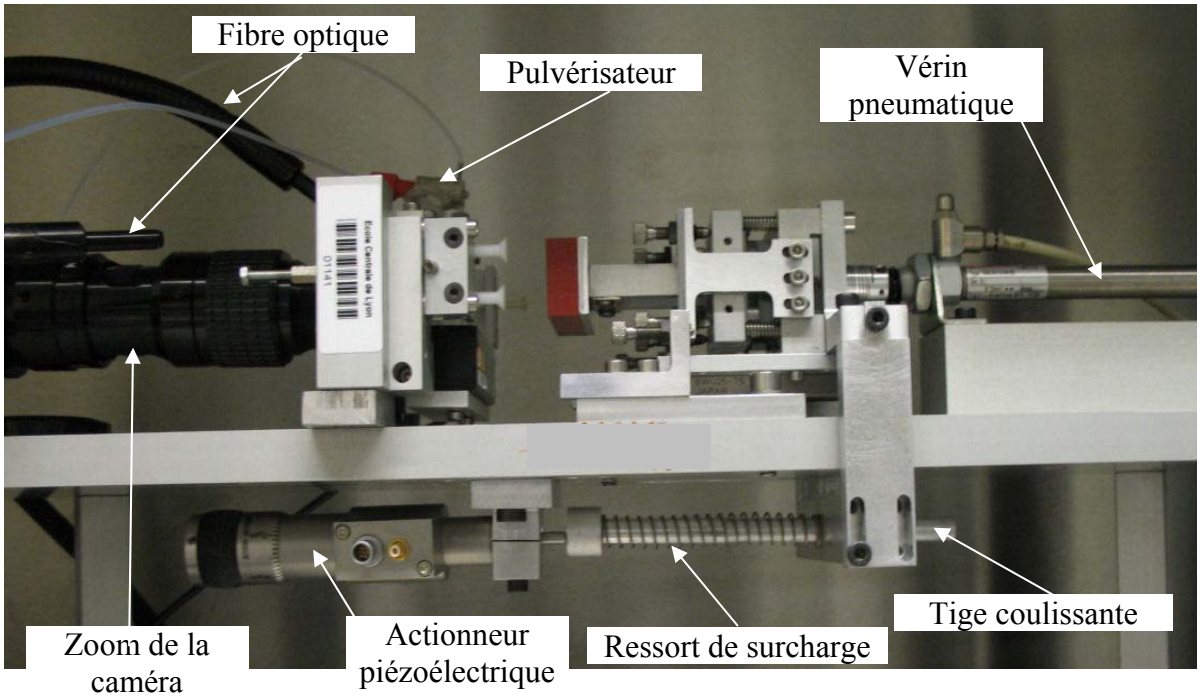


Figure A-6.3 : Vue du banc de µtamponnage avec actionneur piézoélectrique.

Etching of glass patterned by microcontact printing with application to microfluidics and electrophoresis

Benjamin Hannes,*[a] Julien Vieillard,[a] Elie Bou-Chakra,[a] Radoslaw Mazurczyk,[a] Jan Potempa,[bc] Stanislas Krawczyk[a] and Michel Cabrera*[a]

[a]LEOM UMR CNRS 5512, Ecole Centrale de Lyon, 36 avenue Guy de Collongue, F 69134 Ecully, France. E-mail: Benjamin.Hannes@ec-lyon.fr; Michel.Cabrera@ec-lyon.fr
[b]Dept. Biochem. & Mol. Biol., University of Georgia, 30602 Athens, USA
[c]Dept. Microbiol., Faculty of Biochem. Biophys., & Biotechnol., Jagiellonian University, Kraków, Poland

Abstract

We report here a new method to fabricate microfluidic structures and lab-on-chips in soda-lime glass substrates with successful applications for electrophoresis. The manufacturing concept consists of two main steps. First, in order to define the microfluidic pattern, the substrate glass coated with an appropriate chromium/silver layer is masked by microcontact printing (μCP) with a self-assembled monolayer. This is performed with a Microcontact Printer, which is a versatile and low cost new instrument, developed in our laboratory specifically for μCP. Second, a series of wet chemical etching steps is successively performed through the different layers of materials until the final etching onto glass. This process required the development of specific coatings, and the optimizations of etching solutions, which are discussed, as well as the overall process parameters. As a proof of concept, a lab-on-a chip with polydimethylsiloxane cover is characterized with electroosmotic flow, and used for the detection of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* by immuno-electrophoresis. The potential use of this technology for the flexible manufacte of glass lab-on-chips is also analyzed. It appears that this technology may prove to be highly interesting for chemical and biological laboratories, willing to develop complex microfluidic glass devices without expensive microfabrication equipment. This simple, low cost and high throughput fabrication process may be also suitable for future mass production of microfluidic systems.

1. Introduction

This paper describes a new method to fabricate microfluidic structures and lab-on-chips in glass substrates. Nowadays glass, in addition to silicon and polymers, is used more and more widely in microfluidics. This material offers a plethora of useful features, including low cost, chemical compatibility with many reactants; transparency for optical detection or for guided optics; and high electrical isolation. The etching of microfluidic structures in glass, like channels or reservoirs, can be performed by means of conventional microtechnology derived from silicon processing;[1] but this requires expensive equipment and skilled personnel. Therefore, chemical or biological laboratories may be interested in a low cost and flexible technology based on the microcontact printing of glass substrates (e.g. microscope slides) coated with appropriate metal layers. Such microscope slides with appropriate metal coating can be purchased from most public or industrial laboratories dealing with microelectronics technology. The same concerns the master required for μCP, which can be made of silicon or glass substrates using classical photolithography or prepared by non photolithographic methods.[2] Using our technique, and with the appropriate substrates and stamps, a virtually unlimited number of copies of the same lab-on-a-chip can be easily replicated in any chemical or biological laboratory, without the need for sophisticated equipment.

This paper is organized in the following manner: we start with a short reminder on the two techniques at the core of the process: microcontact printing and wet chemical etching of glass. The specific coating and etching solutions required for the process are discussed. We further show here proof of the feasibility of a lab-on-a-chip dedicated for the electrophoretic separation of bio-molecule; along with a detailed characterization of the electrokinetic phenomena of this chip. Finally, we successfully apply the developed lab-on-a-chip for the detection of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* by immuno-electrophoresis. A detailed description of the applied materials and methods is also presented at the end of the manuscript.

2. Overview of the entire technological process

Fig. 1 and Fig. 2 outline the process, and the detailed protocols are explained in the following sections. The raw substrate is a low cost soda-lime glass microscope slide, coated with an appropriate chromium/silver layer. The mask for future etching is formed by self-assembled monolayers (SAMs) on top of the substrate, and is obtained by µCP with a polydimethylsiloxanne (PDMS) stamp. This is performed with the dedicated Microcontact Printer instrument, as described below, and was developed in our laboratory specifically to facilitate new applications in µCP. After formation of the SAMs, the protocol consists simply of a series of wet chemical etching steps, to successively open the desired windows in the different layers of materials. Elimination of each metal layer takes roughly a few seconds and the principal etching of the glass occurs at a rate of about 1 µm/min. After final removal of the remaining metal the result is a bare glass microdevice which can be directly used for microfluidics applications.

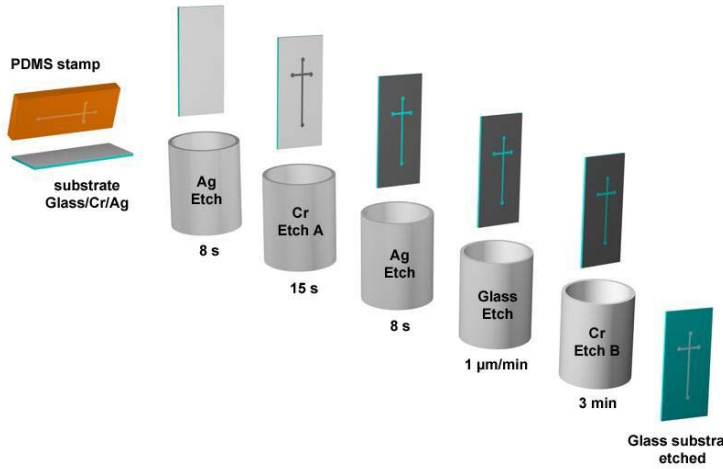


Fig. 1 Overview of the process with different etching times. Etching solutions are listed in Table 1, in the section 3.3.

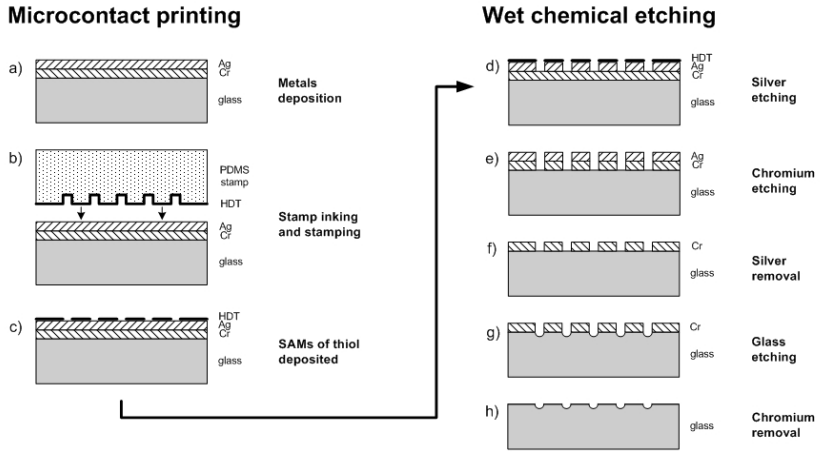


Fig. 2 The two key steps of the process microcontact printing and wet chemical etching

3. Detailed description of the technological process

3.1. Microcontact Printing

The principle of Microcontact Printing was introduced by Whitesides and co-workers[3] as a versatile tool for the modification of surfaces and for the creation of well-ordered molecular assemblies.[4] It allows the transfer of patterns of SAMs on silicon substrates coated with gold, silver or other metals. The substrate is usually coated with a few nanometers layer of chromium or titanium for adhesion enhancement, and a thicker upper metallic layer suitable for SAMs formation. Microcontact printing makes use of an elastomeric stamp of PDMS with a relief pattern. The stamp is inked with a chemical to deposit, for example

hexadecanethiol (HDT) which is the best established thiol,[3, 4] so that the pattern of HDT is transferred onto the surface of the metal by direct contact of the stamp and the substrate.

The SAMs can then serve as an organic nanometer-thick mask for the etching of the underlying metallic layer. To achieve this, specific etching solutions have been proposed for gold,[5] silver[6] and other metals[7, 8]. The top metal layer can also serve as a second mask for subsequent substrate etching (the adhesion metal layer is so thin that it does not interfere and is thus easily removed). In the case of silicon substrates, the etching of the substrate through a gold[5, 9] or a silver mask[6] has been reported. Much of the previous work documented in the literature has been established for silicon substrates. Consequently very little work has been reported on silicon dioxide and that which does exist is mainly focussed on thermally grown SiO_2 on a silicon substrate[10] with only a 2 µm SiO_2 thickness on top of the silicon substrate. To the best of our knowledge no work has been published about the etching of bare glass with deeper channels (e.g. 20 µm) using microcontact printing.

So far most articles report that µCP was performed manually and seldom with modified mask aligner or wafer bonders, which are expensive equipments.[11] One key point of this work is that µCP was performed with an innovative new instrument developed in our laboratory and named Microcontact Printer (Fig. 3).[12] Briefly this machine integrates, in one low cost compact instrument, features like: micrometric alignment of the stamp and the substrate with 5 degrees of freedom, automatic stamp inking with HDT by pulverization and automatic actuation of the stamp on the substrate with a pneumatic jack. The use of this instrument greatly simplifies the µCP process (making possible for example the exact positioning of the pattern with other features in the substrate like through holes or electrodes) and automation improves its repeatability especially thanks to the accurate control of the load on the stamp during the contact with the substrate. The use of the Microcontact Printer is consistent with our main goal, which is to develop a process free of complex technical steps and without costly microfabrication equipment. It takes a few minutes only to microprint a series of microscope slides, so that the overall process to stamp and etch glass is extremely fast and may be even of interest for future mass production of microfluidic parts.

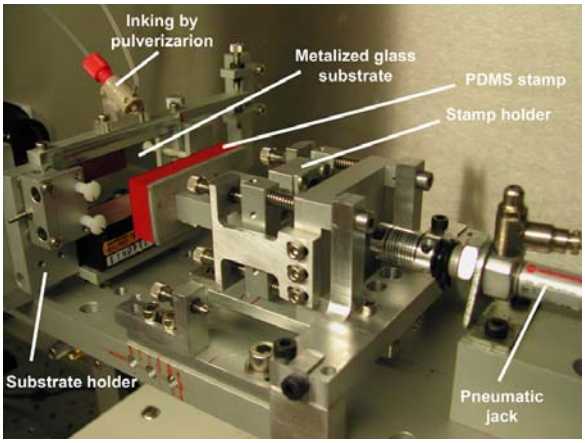


Fig. 3 Overall view of the compact Microcontact Printer developed at the LEOM.

3.2. Wet chemical etching of glass

In order to explain, why we decided to use a glass/chromium/silver structure, and how the different etching solutions were selected, it is necessary to analyze the process from the last operation, namely etching of the glass. First of all, wet chemical etching is used, since unlike dry etching process like Reactive Ion Etching, it requires standard equipment and products available in all chemical laboratories (fume hood and beakers). Depending on the glass composition (borosilicate or soda-lime), different etching solutions based on hydrofluoric acid (HF)[13-15] have been proposed for wet chemical etching. These are diluted[16] or concentrated HF,[17, 18] mixtures of HF with nitric acid (HNO_3)[19, 20] or HCl.[21] Buffered HF is also used,[16, 22-24] sometimes with HCl.[25, 26] The addition of HCl or HNO_3 is indispensable to solubilize the precipitation of insoluble salts during the etching and improves glass smoothness.[21, 27]

The nature of the mask used to cover glass during etching is a critical point. This mask has to withstand the harsh conditions of glass etching and may be complex to manufacture. Therefore, many solutions for the fabrication of masks have been proposed in the literature, which are based on photoresist,[21, 25, 28-30] amorphous silicon,[17, 21, 28, 31-34] polysilicon,[1, 21, 28, 35, 36] silicon carbide,[37] a combination of amorphous silicon and silicon carbide,[31] or even silicon anodically bonded.[38] Overall masks made of chromium/gold/photoresist have been found convenient by many researchers.[13, 17, 19] Metal layers of either chromium or chromium/gold are employed as they can withstand attack from HF better than most organic photoresists. Sometimes, this photoresist is not removed during the etching of glass as it can serve as an additional level of protection.[22] The process parameters are not easy to standardize (metallization, hardbake and postbake of the

resin), therefore there are many variations on this principle.[17, 18, 20, 21, 29, 32, 39-42].

As a matter of fact, it is difficult for chemical laboratories to develop such processes without the help of skilled people in microelectronics. We believe that an interesting solution could be to standardize glass/metal structures, which could be directly patterned by μCP and etched without microelectronic equipment (aligners, spin coaters, ovens, etc.). Standard etching conditions should be also provided as discussed below.

3.3. Discussion on materials and process parameters

In our process a HDT/silver structure is used instead of the photoresist. Silver layer serves only for scribing down the HDT pattern and for transferring the pattern to the chromium layer. Silver is preferred to gold because it is more reactive, so the etching is much faster for silver/HDT than for gold/HDT.[6, 8] This allows minimizing the interaction between the silver etchant and the chromium layer which may cause damage to the latter. Furthermore, chromium is used not only to enhance the adhesion of silver onto the glass, but as the main protective mask during glass etching. Note that a similar approach was described by Whitesides et al. with a nickel/gold arrangement on top of a silicon substrate,[9] however nickel is unsuitable for glass etching because it is etched by HF, HNO_3 and HCl.

With a nanometer-thick HDT mask, the quality of metal layers is a critical point during the etching process. Using the etching solutions discussed below, every attempt to etch structures with chromium deposited with the e-beam Edwards-Varian equipment available in our laboratory failed. This was also the case when the silver was deposited by the e-beam. Better results were obtained when chromium was deposited by MRC822 magnetron sputtering, because materials deposited in this manner generally feature higher density and integrity due to the intensive ion bombardment during the process. Unfortunately, it is not possible to deposit silver and chromium together in the same sputtering machine which is a critical point because this would have been desirable to avoid possible oxidation and dust contamination between the chromium and the silver deposition. However, a good solution was determined by: (a) depositing the chromium onto the glass by MRC822 magnetron sputtering, (b) removing the substrate from the machine and dissolving the oxide layer on top of the chromium by dipping the substrate into BOE 7:1 for 2 s and (c) evaporating the chromium/silver bi-layer with an UHV evaporator (Leybold). Step (b) is essential otherwise the chromium layer often falls apart during glass etching. After metallization, the substrates are stored dry in a vacuum box to minimize future oxidation of the silver layer. A rapid immersion of the substrates in BOE is always performed immediately prior to microcontact printing so as to remove the oxide layer on top of the silver.

As far as the etchings solutions are concerned (see Table 1), the key element is that they must be selective, meaning that they must only etch the target layer whilst leaving the underlying and overlaying layers intact. Thus, four etching solutions have been chosen: one per metallic layer, one for the glass and one to remove the remaining metal and obtain bare glass. For the etching of silver patterned with HDT, a solution (Ag Etch in Table 1) based on thiosulfate and ferri/ferrocyanide is applied.[6]

Regarding the etching of chromium, we cannot use commercial chromium etchant based on cerric ammonium nitrate[16] as it also etches silver. Therefore we have used 37% hydrochloric acid (Cr Etch A in Table 1), which etches chromium but not silver. We achieve repeatable results only when touching the chromium surface with an aluminium wire,[43] because when chromium is exposed to air it acquires an oxide surface which passivates the substrate and makes etching difficult in most acids. The dissolution of chromium is triggered by mechanical contact with the aluminium wire, which is more electropositive than chromium. An important point is that the etching proceeds very rapidly, so that it limits underetching. Due to the stress of silver, which is not sputtered like chromium, we find convenient to remove the silver layer with Ag Etch before the final glass etching.

In this study we have worked exclusively with soda-lime microscope slides (Corning #2947), thus with regards to the etching of glass, excellent results can be obtained with BOE. The reason for this is that soda-lime does not require strong etching conditions with HF.[22] Initially we used a mixture of BOE 7:1 + 37% HCl + H_2O in v/v 1:2:2. However, the chromium layer was sensitive to HCl, resulting in the production of many defects in the protected area. As it is known that HNO_3 does not attack chromium, we replaced HCl with HNO_3 resulting in the solution of BOE 7:1 + 68% HNO_3 + H_2O in v/v 1:2:2 termed Glass Etch. At the end of the process, the chromium layer is removed with a commercial chromium etchant (Cr Etch B).

With regards to the thickness of the metallic layers; using silver, we achieve acceptable results with a 40 nm layer thickness and an etching time of 8 s with Ag Etch. Below this thickness silver is damaged during chromium etching (Step e of Fig. 2) and above it the etching time of silver is too long and the HDT pattern is damaged (Step d of Fig. 2). With chromium, we obtain acceptable results with a 150 nm layer thickness and an etching time of 15 s with Cr Etch A. Below this thickness, the protection of glass is not sufficient (Step g of Fig. 2), and above it the etching time of chromium is too long, damaging the silver

pattern (Step e of Fig. 2), and so the silver pattern is not correctly transferred to the chromium. Table 1 summarizes all of the chemical compositions and etching rates.

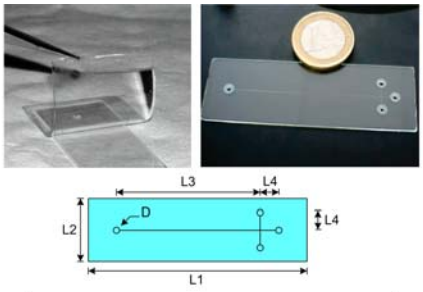
Etchant	Short name	Target	Etching rate
0.1 M $Na_2S_2O_3$ + 0.01 M $K_3Fe(CN)_6$ + 0.001 M $K_4Fe(CN)_6$ at 25°C	Ag Etch	Silver	5 nm/s
37% HCl + H_2O in v/v 1:1 at 35°C	Cr Etch A	Chromium	11 nm/s
BOE 7:1 + 68% HNO_3 + H_2O in v/v 1:2:2 at 45°C	Glass Etch	Glass	1 µm/min
Chromium etchant (Merck) at 25°C	Cr Etch B	Chromium	50 nm/min

Table 1 Etching solutions used in the process

4. Fabrication and characterization of a microfluidic chip designed for electrophoresis

4.1. Microfluidic chip layout and fabrication

A microfluidic chip dedicated to electrophoretic separation was fabricated with a 60 mm long separation channel crossed with a 10 mm long injection channel. The etching depth was 20 µm. At the end of the process the lateral underetching was 20 µm. The final channels width was 70 µm. All channels extremities had cylindrical reservoirs with a 250 µm diameter (see Fig. 4).



Lab-on-a-chip dimensions	Microfluidics channels dimensions				Reservoir diameter
	Channel depth	Channel width	Injection channel length	Separation channel length	
L1 = 75 mm L2 = 25 mm	20 µm	70 µm	10 µm	L3 = 60 mm L4 = 5 mm	D = 2 mm (PDMS) D = 250 µm (glass)

Fig. 4 Photography of the lab-on-a-chip with PDMS cover for electrophoresis. The draft and the table below show typical dimensions of the microfluidic channels.

Roughness measurement with an accuracy of ±1 Å were used at different steps for the characterization of etching with a KLA Tencor AS 500 profilometer (10 µm measured length and 2 µm/s scan speed). Initial glass roughness before metallization was 30 Å. After all etching steps and the final removal of chromium the roughness of the glass was 99 Å inside the channel and 35 Å outside the channel. The roughness inside the channel was expected to grow during the glass etching because of the dissolution of glass components.[20, 42] This small increase shows that the etching solution for glass was correctly selected while the negligible increase of roughness outside the channel shows that there was little chromium damage during the process.

This can be further evaluated by intermediate roughness measurement on the metals. The roughness on silver of the glass/chromium/silver before any etching was 20 Å (step a of Fig. 2). After step d of Fig. 2, the roughness was still 20 Å on the remaining silver and 24 Å on the chromium. After step f of Fig. 2, the roughness was 46 Å on the remaining chromium and 30 Å on the glass.

Fig. 5 shows the intersection of channels and one reservoir etched according to the process. The quasi-absence of defects in the etched areas and the presence of a few defects in the non etched, non functional area (less than 10 defects/cm²) in this figure are clearly noted. This microdevice was characterized and used directly for electrophoresis separation as discussed below.

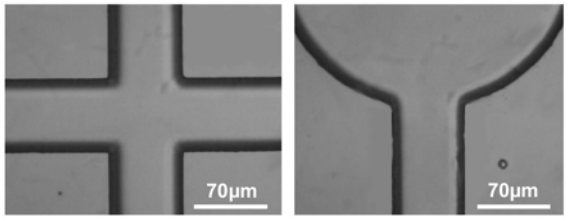


Fig. 5 View of the intersection between the two microfluidic channels and one reservoir after glass etching and removal of all metals.

4.2. Electrokinetic charaterization of the microfluidic channels

The electrokinetic motion of molecules in microfluidic channels are controlled both by electrophoretic and electroosmotic mobility. The electroosmotic properties depend on the properties of the interfaces between the fluid in the channel and the channel walls. In our case the channel is etched in a glass substrate and covered with a

PDMS layer. In such a non-conventional structure it is important to measure the electroosmotic mobility. Note that the effective mobility of molecules is the addition of both electroosmotic and the electrophoretic mobilities. This effective mobility can be directly determined for a given molecules from the position of the separation peaks. Thus, when the electroosmotic mobility is known one can easily determine the electrophoretic mobility of these molecules, as well as other parameters of the microfluidic channel (e.g. potential zeta etc.). Thus, it is important to measure the electroosmotic mobility of any new microfluidic structure in order to have a global picture of the electrokinetic processes involved.

In our analyses we initially discerned that the electroosmotic flow had a cathodic character. We then measured the electroosmotic mobility with two independent methods, namely the amperometric method and indirect fluorescence.[44-46] Both experiments were repeated 3 times. In the amperometric method, the more concentrated buffer was a 20 mM borax solution and the more diluted one was a 15 mM borax solution (pH = 9.5) The principle of the method is that we replace electrokinetically the first buffer solution with the second one, or vice versa (at 300 V/cm). At the same time the current intensity is monitored until stabilization, meaning that the entire channel has becomed filled with the new buffer. The results obtained are shown in Fig. 6. On the basis of these results we found that the electrosmotic mobility is $(4.0 \pm 0.2)\times10^{-4}$ cm².V^{-1}.s^{-1} in our microfluidic channels.

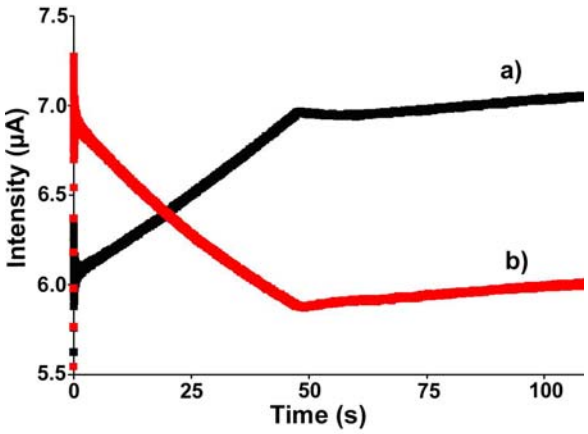


Fig. 6 Measurement of the electroomotic mobility by the amperometric method. Current intensity vs. time is measured when (a) low concentration buffer is replaced by high concentration buffer and (b) high concentration buffer is replaced by low concentration buffer.

For indirect fluorescence we filled the microfluidic channel with a fluorescent solution of rhodamine 6G prepared in a borax buffer. The lab-on-a-chip was placed in a fluorescent microscope with a 100mW doubled YAG laser excitation (wavelength 532 nm) and the fluorescence signal was collected with a femtowatt photodetector (New Focus). Electroosmotic mobility is evaluated from the migration time of an ethanol sample plug (Fig. 7). We obtained an electroosmotic mobility of $(4.4 \pm 0.3)\times10^{-4}$ cm².V^{-1}.s^{-1}, which is comparable with the amperometric method.

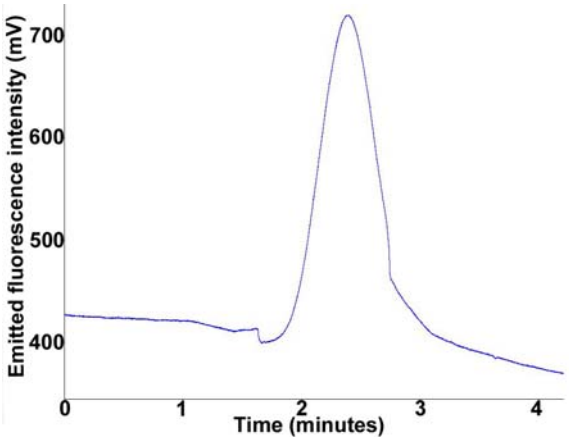


Fig. 7 Electroosmotic mobility measured using the indirect fluorescence method (fluorescence intensity vs. time). A highered fluorescence intensity indicated the presence of the ethanol sample in the detection area.

4.3. Electrophoresis separation coupled with immunoreaction.

After these measurements, we evaluated the separation performance of the lab-on-a-chip device with an application concerning the detection of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. The Gram-negative anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis* is an important etiologic agent for adult periodontitis, a common inflammatory disease of tissues supporting the teeth ultimately leading to tooth loss.[47, 48] It is known that gingipains, *P. gingivalis* cysteine proteases, play an important role in the development and progression of periodontal disease.[49, 50] A monoclonal antibody which recognizes specifically one of the gingipains, RgpB, was previously produced and employed to detect infections with *P. gingivalis*.[54] Thus we attempted to detect RgpB and the immunological complex antibody-antigen in a lab-on-a-chip device. Before injection each protein was tagged with a Cy3 dye. To estimate the migration time of the proteins we injected the monoclonal antibody and the purified antigen separately (Fig. 8 and 9, respectively). Proteins were injected electrokinetically at 140 V/cm over a 3 seconds time period. To control the size of the plug, we applied a pullback voltage to limit leakages from the injection

channel to the separation channel. The separation was carried out at 250 V/cm in a borax buffer of 10 mM. The antibody was detected after 100 ± 2 s, and the antigen was detected after 140 ± 4 seconds.

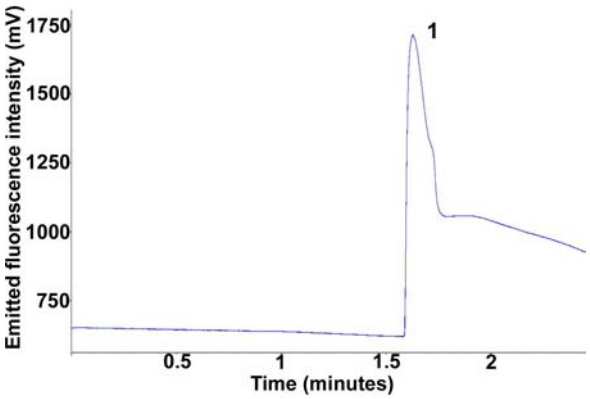


Fig. 8 Electropherogram of monoclonal antibody at 250 V/cm in a 10 mM borax buffer (pH = 9.2).

When we mixed the proteins and injected the mixture into the separation channel, we obtained the separation profile depicted in Fig. 10. According to the migration time of previous separation experiments, we identified peak 1 as the monoclonal antibody and peak 3 as RgpB protein. It is interesting to note that the resolution, measured at half of the height, was 3.22. Thus in these experiments we have validated the use of the use µpatterned lab-on-a-chip device to separate a mixture of proteins. As peak 2 was not reproducible, and its peak efficiency was estimated at 40872 theoretical plates, we have annotated peak 2 as an electrical spike.

Peak 4 is identified as the immunological complex resulting from interaction between the antibody and the RgpB antigen. To our knowledge there are just a few reports that demonstrate capillary electrophoresis and immunological reaction in the microfluidic channel of a lab-on-a-chip.[51] Those, and our own, preliminary results illustrate all of the potentialities of our lab-on-a-chip devices.

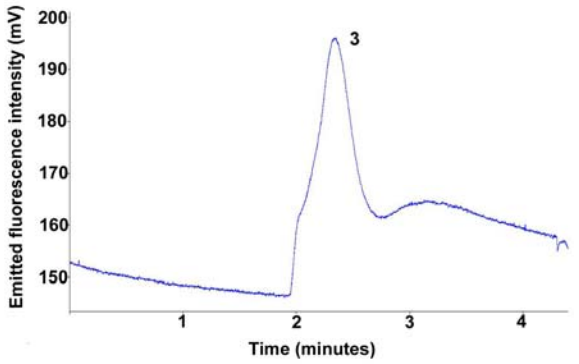


Fig. 9 Electropherogram of antigen RgpB at 250 V/cm in a 10 mM borax buffer (pH = 9.2).

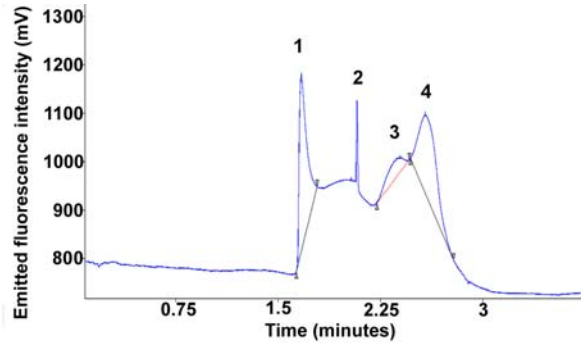


Fig. 10 A mixture of monoclonal antibody and antigen RgpB separated at 250 V/cm in a 10 mM borax buffer. Peak one is identified as the monoclonal antibody, peak 2 seemingly corresponds to an electrical spike, peak 3 is the antigen RgpB and the peak 4 represents the immunological complex of antibody and antigen.

5. Discussion

These preliminary results illustrate the potentialities of our lab-on-a-chip devices. In comparison with the literature, our hybrid device has an average EOF of $(4.2 \pm 0.5)\times10^{-4}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$, which is an intermediate between full-glass chip (5.45×10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$)[52] and native PDMS device (3.28×10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$).[53] It featured also comparable EOF mobility with other hybrid PDMS/glass devices fabricated by UV photolithography and wet etching methods ($3.7–4.7\times10^{-4}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$).[54, 55] It is worth noting that PDMS oxidized chip had an EOF measured between 4.89×10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$ [56] and 5.7×10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$.[52] The compromise made as regards the choice of the materials and the etching solutions, as well as the process parameters, led us to an efficient protocol which could be standardized. In comparison with the literature, the channels of our device have comparable roughness than, for example, an optimized HF/HCl based etching solution published for soda-lime glass (with classical photoresist, amorphous silicon, polysilicon and Cr/Au masking layers).[21]

Despite the presence of remaining defects, the microfluidic device was successfully operated. To reduce these defects, there are several points which can still be improved and that we have left for future research.

First of all, it is worth noting that during a first round of optimization, the number of defects has been already substantially reduced with stringent initial cleaning of the glass prior to metallization (see Materials and Methods). This was important since dust is in general thicker than the future metal and HDT layers. But in the reported experiment, although metallization was performed in a clean room, µCP and wet etching were not. So to

improve this, we plan to take advantage of the compactness of the experimental set up to design a mini box (with laminar air flow and chemical exhaust) in order to protect the whole μCP and wet etching workbench in a 0.5 x 1 m² area.

Second, there is a possible concern about the presence of defects in the coverage of metal surfaces by thiols, which has to be linked together to the degree of protection during the etching of the top metal layer. According to the literature, after etching, the number of defects ranges from 5 pitts/mm² to 1000 pitts/mm² for gold[6, 57] and is about 10 pitts/mm² for silver[6]. Anyhow we found out, that in our case, defects of SAMs were not critical from the experimental point of view. We observed fewer defects than in the literature possibly thanks to more robust metallization protocols. Fig. 11 shows for example an important 0.2 x 0.2 mm² area of the device just after silver etching: any substantial defects would have been amplified during glass etching to several micrometers. In fact for microfluidic devices for research, unlike microelectronics, it is not necessary to fabricate many devices closely packed in the same substrate. So the relevant defects are only those along the border of the channels or very close but outside them. If in Fig. 5, we define an area of 10 μm along the 173 mm perimeter, this leads to a total surface of 1.7 mm². This corresponds statistically to 1 or 2 defects according to the literature, which may not even be necessary problematic for the function. Of course it would be interesting to improve the yield of fabrication, especially for mass production. There are may ways to do so: the coverage of metals by SAMs has been extensively studied and it is known that the defects depend on the nature of the metal and its way of preparation (atomic flatness, size of metal grains, etc.).[4, 7] It can be also improved by changing the nature of the alkanethiol, by adding amphiphiles, such as octanol, or by using etchants with molecular surfaces bigger than the holes.[7, 58, 59]

This leads us to a final comment about the preparation of the metal layers. As the etching of glass is performed via thin metallic masks, the homogeneity and the overall quality of the metallic layers are indeed essential. It is known that the residual stress in the chromium mask layer may be responsible for the pinholes on the protected glass surface and the notch defects formed at the etch edges of glass.[32] This stress is correlated with average crystallographic grain size, preferential crystalline orientation, morphology and microhardness[60] and it can be reduced by careful control of the sputtering parameters (nature of gas, total pressure, temperature of the growing film).[27, 32]

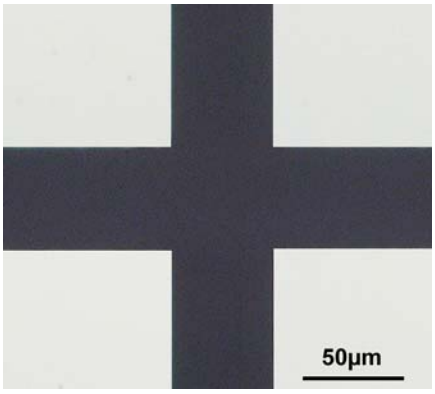


Fig. 11 View of the junction channel pattern on the substrate after etching of the silver: the chromium layer is in black, the remaining silver outside the microfluidic pattern is in white.

6. Conclusions

We report here for the first time the etching of microfluidic structures in glass substrates for lab-on-chips through masks patterned by μCP. Furthermore we have successful validated the application of these chips for electrophoretic separation.

The work and techniques documented rely on soda-lime microscope slides coated with a carefully designed chromium/silver layer and a set of specific etching solutions. We have demonstrated the feasibility of a microfluidic channels with a depth of 20 μm and proven it's suitable for microfluidics. The roughness of the channels is comparable with the one obtained with classical microtechnology. Although some defects (10 defects/cm²) are still present in the masked areas, only those close to the border of the channels are relevant. However to get a functional device, we simply covered those defects with a PDMS film. To reduce these defects, for example for future mass production, an improvement of the coverage of the silver with SAMs may be of interest. But the most direct improvement would come from a better control of the internal stress of the metallic layers.

A detailed characterization of the electrokinetic properties of the fabricated channels has been also performed and it is found that the electroosmotic mobility is fully compatible with the values reported in the literature for glass/PDMS structures. Lab-on-a-chip were subsequently fabricated for the electrophoretic separation of bio-molecules, and proved entirely successful for this application. Specifically, we demonstrated the detection of cystein proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. It is known that gingipains, *P. gingivalis* cysteine proteases, play an important role in the development and progression of periodontal disease. A monoclonal antibody which recognizes specifically one of the gingipains, RgpB, was generated. The monoclonal antibody and the RgpB antigen

were separated in the fabricated device. We clearly demonstrated the ability to detect the antigen by an immunological reaction in liquid phase, followed by electrophoretic separation, which contributed an additional peak on the electropherogram attributed to the complex of antigen-antibody interaction. Until now very few similar experiments have ever been performed successfully in a lab-on-a-chip format.

This process could be a valuable tool for chemists and biologists to make functional glass microdevices without the need for sophisticated microelectronic equipment. If used in conjunction with glass/metal substrates, which can be standardized, and non photolithographic methods to get the PDMS stamp for μCP, it allows low cost rapid prototyping of glass microfluidic devices. Used together our Microcontact Printer, it makes possible to perform, in a flexible way, quick design iteration and validation. After this prototyping phase, it allows also fabrication of a virtually unlimited number of copies of glass components for lab-on-chips. Therefore, due to its high throughput, this process may be also considered for the mass production of microfluidic devices. Future work will target the reduction of the number of defects, the etching of deeper channels and the use of different kinds of glass (for example borosilicate glass for easy bonding with silicon).

7. Material and Methods

Master fabrication. **A** 4" <100> silicon wafer with a 2 μm thermal SiO_2 layer (Siltronix) was cleaned with a Piranha solution 34% H_2O_2 + 96% H_2SO_4 in v/v 1:3 for 2 minutes, before being rinsed with deionised water for 10 minutes, dried with nitrogen gas and baked at 100 °C. A photoresist layer (AZ5214E) was deposited by spin coating at 5000 rpm for 30 s and then baked at 120 °C for 2 min 30 s. The resin was then UV exposed. The wafer was dipped into developer AZ726 MIF for 50 s, dried under nitrogen and baked at 120° C for 2 min 30 s. The SiO_2 layer was etched with BOE 7:1. The silicon was etched in RIE plasma (Cl_2 20 sccm, 250 W, 100 mTorr) at 20 nm/s.

Stamp fabrication. The master was immersed in 10^{-3} M octadecyltrichlorosilane for 10 minutes to facilitate demolding. 5 g of PDMS prepolymer from Rhodia (RTV 3255) and 0.5 g of its curing agent were mixed, degassed and poured onto the master. The stamp was then baked for 36 h at 40 °C.

Cleaning of the glass substrates. Soda-lime microscope glass slides (Corning #2947) were cleaned in ultrasonic baths: first with acetone at 50 °C for 30 minutes and then ethanol at 50 °C for 30 minutes. The slides were rinsed in deionised water for 10 minutes and dried with nitrogen. Next, the substrates were cleaned by corona discharge for 40 s on both sides. Then, the slides were dipped in Piranha solution for 30 minutes, rinsed in deionised water for 20 minutes and dried with nitrogen.

Metal deposition. Immediately after the cleaning process, a 150 nm chromium layer (99.998% purity) was deposited on the glass by magnetron sputtering (MRC822). The substrate was dipped into BOE 7:1 for 2 s. Then, a 20 nm chromium/40 nm silver bi-layer (99.99% purity silver) was deposited on the previous chromium layer with a UHV evaporator (Leybold).

Microcontact printing. HDT in ethanol (10^{-3} mol.L^{-1}) was used as "ink" for μCP. 100 μL was pulverized on the (23 x 48 cm²) PDMS stamp with nitrogen (1.1 bar) for 10 s. The stamp was brought into contact with the substrate for 60 s, with a 0.7 bar pneumatic actuator air pressure, which corresponds to a 78 g load on the stamp. The stamps are rinsed with ethanol and dried under a stream of nitrogen for cleaning for multiple uses.

Wet Etching. 68% HNO_3, 37% HCl were purchased from Roth, BOE 7:1 from Honeywell and Chromium Etchant from Merck. All compositions and etching times are in Table 1 and the sequence of etching is shown in Fig. 1. At each step, the substrate was washed with deionised water for a few seconds and dried with nitrogen.

Separation. Sylgard 184 PDMS cover was prepared according to the Dow Corning standard protocol. Before separation experiments, microfluidic channels were conditioned in 1 M NaOH for 15 minutes, rinsed for 10 minutes in deionised water and then was put in 10 minutes in 10 mM borax buffer (pH=9.2). The monoclonal antibody and RgpB were supplied by J. Potempa and tagged with Cy3 dye according to the process described by GE Healthcare.

Acknowledgments

We are also indebted to Dr. Lindsey N. Shaw (University of Missouri, Columbia, MO) for English corrections and critical reading of the manuscript. This work was supported in part by the National Institutes of Health through grant DE 09761. JP is a recipient of the award *SUBSYDIUM PROFESORSKIE* from the Foundation for Polish Science (FNP, Warszawa).

References

1 E. Verpoorte and N. de Rooij, Proc. IEEE, 2003, **91**, 903.

2 L. W. Zilch, G. A. Husseini, Y.-Y. Lua, M. V. Lee, K. R. Gertsch, B. R. Cannon, R. M. Perry, E. T. Sevy, M. C. Asplund, A. T. Woolley, and M. R. Linford, *Rev. Sci. Instr.*, 2004, **75**, 3065.

3 Y. Xia and G. M. Whitesides, *Ang. Chem. Inter. Ed.*, 1998, **37**, 550.

4 F. Schreiber, *Prog. Surf. Sci.*, 2000, **65**, 151.

5 Y. Xia, X.-M. Zhao, E. Kim, and G. M. Whitesides, *Chem. Mat.*, 1995, **7**, 2332.

6 Y. Xia, E. Kim, and G. M. Whitesides, *J. Electrochemical Soc.*, 1996, **143**, 1070.

7 J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 1103.

8 Y. Xia, X.-M. Zhao, and G. M. Whitesides, *Microelec. Eng.*, 1996, **32**, 255.

9 E. Kim, A. Kumar, and G. Whitesides, *J. Electrochemical Soc.*, 1995, **142**, 628.

10 Y. Xia, N. Venkateswaran, D. Qin, J. Tien, and G. M. Whitesides, *Langmuir*, 1998, **14**, 363.

11 E. Delamarche, in 'Microcontact Printing of Proteins', ed. Wiley, Weinheim, 2005.

12 B. Hannes, G. Dilosquer, E. Bou Chakra, F. Bessueille, J. Martin, and M. Cabrera, Proc. Eurosensors XIX, Barcelona, 2005.

13 S. J. Haswell, *Analyst*, 1997, **122**, 1R.

14 T. McCreedy, *TrAC Trends in Anal. Chem.*, 2000, **19**, 396.

15 J. Bühler, F. P. Steiner, and H. Baltes, *J. Micromech. Microeng.*, 1997, **7**, R1.

16 K. R. Williams, K. Gupta, and M. Wasilik, *J. Microelectromech. Syst.*, 2003, **12**, 761.

17 P. C. Simpson, A. T. Woolley, and R. A. Mathies, *Biomed. Microdev.*, 1998, **1**, 7.

18 M. Bu, T. Melvin, G. J. Ensell, J. S. Wilkinson, and A. G. R. Evans, *Sens. Actuators A*, 2004, **115**, 476.

19 Z. H. Fan and D. J. Harrison, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 177.

20 M. Ilie, V. Foglietti, E. Cianci, and A. Minotti, Proc. SPIE, 2003, **5227**, 318.

21 C. Iliescu, J. Jing, F. E. H. Tay, J. Miao, and T. Sun, *Surf. Coat. Tech.*, 2005, **198**, 314.

22 R. N. C. Daykin and S. J. Haswell, *Anal. Chimica Acta* 1995, **313**, 155.

23 S. C. Jacobson, R. Hergenroeder, L. B. Koutny, R. J. Warmack, A. W. Moore, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 1107.

24 S. C. Jacobson, L. B. Koutny, R. Hergenroeder, A. W. Moore, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 3472.

25 M. Stjernström and J. Roeraade, *J. Micromech. Microeng.*, 1998, **8**, 33.

26 C.-H. Lin, G.-B. Lee, Y.-H. Lin, and G.-L. Chang, *J. Micromech. Microeng.* 2001, **11**, 726.

27 I. Steingoetter and H. Fouckhardt, *J. Micromech. Microeng.*, 2005, **15**, 2130.

28 D. C. S. Bien, P. V. Rainey, S. J. N. Mitchell, and H. S. Gamble, *J. Micromech. Microeng.*, 2003, **13**, S34.

29 A. Grosse, M. Grewe, and H. Fouckhardt, *J. Micromech. Microeng.*, 2001, **11**, 257.

30 C.-H. Lin, G.-B. Lee, Y.-H. Lin, and G.-L. Chang, *J. Micromech. Microeng.* 2001, **11**, 726.

31 A. Berthold, F. Laugere, H. Schellevis, C. R. de Boer, M. Laros, R. M. Guijt, P. M. Sarro, and M. J. Vellekoop, *Electrophoresis*, 2002, **23**, 3511.

32 C. Iliescu, J. Miao, and F. E. H. Tay, *Sens. Actuators A*, 2005, **117**, 286.

33 C. Iliescu, J. Miao, and F. E. H. Tay, *Surf. Coat. Tech.*, 2005, **192**, 43.

34 E. T. Lagally, C. A. Emrich, and R. A. Mathies, *Lab Chip*, 2001, **1**, 102.

35 M. A. Grétillat, F. Paoletti, P. Thiébaud, S. Roth, M. Koudelka-Hep, and N. F. de Rooij, *Sens. Actuators A*, 1997, **60**, 219.

36 W. H. Grover, A. M. Skelley, C. N. Liu, E. T. Lagally, and R. A. Mathies, *Sens. Actuators B*, 2003, **89**, 315.

37 A. F. Flannery, N. J. Mourlas, C. W. Storment, S. Tsai, S. H. Tan, and G. T. A. Kovacs, Proc. TRANSDUCERS'97, Chicago, 1997, 217.

38 T. Corman, P. Enoksson, and G. R. Stemme, *J. Micromech. Microeng.*, 1998, **8**, 84.

39 S. Shoji, H. Kikuchi, and H. Torigoe, *Sens. Actuators A*, 1998, **64**, 95.

40 C. M. Matzke, D. W. Arnold, C. I. Ashby, S. H. Kravitz, M. E. Warren, and B. C. A., Proc. SPIE, 1998, 164.

41 I. Schneegass, R. Brautigam, and J. M. Kohler, *Lab Chip*, 2001, **1**, 42.

42 M. Ilie, V. Foglietti, and E. Cianci, Proc. 7th Italian Conference on Sensors and Microsystems, 2002, 55.

43 C.-Y. Wei, *US Pat., 4 350 564*, 1982.

44 S. Y. Chang and C.-H. Liao, *J. Chrom. A*, 2002, **959**, 309.

45 P. L. Desbene, C. J. Morin, A. M. D. Monvernay, and R. S. Groult, *J. Chrom. A*, 1995, **689**, 135.

46 L. Ren, C. Escobedo-Canseco, and D. Li, *J. Coll. Int. Sci.*, 2002, **250**, 238.

47 A. D. Haffajee and S. S. Socransky, *Periodontology 2000*, 2005, **38**, 9.

48 T. Imamura, J. Travis, and J. Potempa, *Curr. Prot. Pep. Sci.*, 2003, **4**, 443.

49 N. M. O'Brien-Simpson, P. D. Veith, S. G. Dashper, and E. C. Reynolds, *Periodontology 2000*, 2004, **35**, 101.

50 J. Potempa, A. Banbula, and J. Travis, *Periodontology 2000*, 2000, **24**, 153.

51 Q. Xiang, G. Hu, Y. Gao, and D. Li, *Biosens. Bioelec.*, 2006, **21**, 2006.

52 M.-S. Kim, S. I. Cho, K.-N. Lee, and Y.-K. Kim, *Sens. Actuators B*, 2005, **107**, 818.

53 G. Ocvirk, M. Munroe, T. Tang, R. Oleschuk, K. Westra, and D. J. Harrison, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 107.

54 A.-M. Spehar, S. Koster, V. Linder, S. Kulmala, N. F. de Rooij, E. Verpoorte, H. Sigrist, and W. Thormann, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 3674.

55 J. Vieillard, R. Mazurczyk, C. Morin, B. Hannes, Y. Chevolot, P.-L. Desbène, and S. Krawczyk, *J. chrom. B*, in press.

56 U. Bilitewski, M. Genrich, G. Mersal, and S. Kadow, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 556.

57 X. M. Zhao, J. L. Wilbur, and G. M. Whitesides, *Langmuir*, 1996, **12**, 3257.

58 B. Michel, A. Bernard, A. Bietsch, E. Delamarche, M. Geissler, D. Juncker, H. Kind, J.-P. Renault , H. Rothuizen, H. Schmid-Winkel, R. Stutz, and H. Wolf, IBM *J. Res. Dev.*, 2001, **45**, 697.

59 M. Geissler, H. Schmid, B. Michel, and E. Delamarche, *Microelec. Eng.*, 2003, **67-68**, 326.

60 V. Guilbaud-Massereau, A. Celerier, and J. Machet, *Thin Sol. Films*, 1995, **258**, 185.

THESE DE L'ACADEMIE DE LYON : ECOLE CENTRALE DE LYON

Elie Bou Chakra	Date de soutenance le 16 mars 2007
Thèse de Doctorat : Micro et nanothechnologie	N° d'ordre : 2007-08

TITRE : NOUVEAUX PROCEDES D'ELABORATION A HAUTE RESOLUTION DE BIOMICROSYSTEMES POUR LA BIOTECHNOLOGIE ET LA MICROFLUIDIQUE

Résumé : Ce mémoire traite du développement de procédés d'adressage de produits chimiques ou biologiques à haute résolution et de leur intégration dans les méthodes d'élaboration de biopuces et de microlaboratoires sur puce. Les avantages attendus sont multiples : réduction de la surface de travail et accroissement de la sensibilité de ces microdispositifs, augmentation de leur capacité d'analyse paramétrique et aussi intégration de biopuces dans les microlaboratoires sur puce. Deux modes d'adressage ont été particulièrement étudiés.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la projection de produits à l'échelle de 4 picolitres. Ce procédé est basé sur l'adaptation d'un dispositif de projection à effet piézoélectrique du commerce, qui permet de concilier résolution, disponibilité et coût. Il est aussi très souple d'utilisation, de sorte que nous avons envisagé de le mettre en œuvre dans la synthèse in situ de biopuces, notamment de puces à oligopeptides. Cela implique la maîtrise de la projection de réactifs dans des conditions de rendement de synthèse chimique aussi élevé que possible pour obtenir des puces d'intérêt biologique. Pour cela nous avons étudié le système de projection pour l'adapter à la variété des produits à adresser. Ce travail a abouti à démontrer la faisabilité d'une picosynthèse peptidique dans le cadre d'une biopuce modèle simplifiée. Le potentiel d'application est étudié pour la synthèse in situ de puces à oligonucléotides ou à oligopeptides à haute résolution (à terme 80 000 plots/cm²).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'adressage de réactifs par microtamponnage. Ce procédé, moins flexible que le précédent, permet d'atteindre une résolution beaucoup plus élevée avec un mode de fabrication collectif et de faible coût. Pour faciliter sa mise en œuvre, nous avons développé un banc de microtamponnage compact intégrant les fonctions nécessaires au procédé (encrage, alignements, changement de tampons et substrats). Le contact tampon/substrat est effectué automatiquement. Nous avons aussi développé une méthode innovante de contrôle de la charge sur le tampon basée sur une compression par des butées micrométriques réglables. Cet instrument a été mis en œuvre dans le cadre de deux applications originales : la fabrication de circuits microfluidiques par gravure humide du verre ; le greffage d'anticorps au fond d'un canal microfluidique. Nous concluons sur les améliorations possibles pour passer à une résolution supérieure.

Mots-clés : biomicrosystème, biopuces, microlaboratoire sur puces, haute résolution, intégration, projection, piézoélectrique, microtamponnage.

TITLE : NEW HIGH RESOLUTION PROCESSES APPLIED TO THE FABRICATION OF BIOMICROSYSTEMS FOR BIOTECHNOLOGY AND MICROFLUIDICS

Abstract: This thesis is about the development of high resolution addressing processes of biological or chemicals products and their integration in the manufacturing of biochips and lab-on-chips. Multiple advantages are expected: reduction of the surface of work and increase in the sensitivity of these microdevices, increase in their capacity of parametric analysis and also integration of biochips into labs on chip. Two ways of addressing were particularly studied.

First of all we studied the projection of products at 4 picolitres scale. This process is based on the adaptation of a commercial piezoelectric projection device allowing a compromise between resolution, availability and cost. It allows also flexibility of use, so that we planned to use it for the in situ synthesis of biochips, notably oligopeptide chips. This implies the control of the projection of reagents to reach as high chemical yield of synthesis as possible, in order to obtain chips of biological interest. For that we studied the projection system to adapt it to the variety of the products to be addressed. This work led to the feasibility of a peptide picosynthesis in the case of a simplified model biochip. The potential of application is analyzed for the in situ synthesis of oligonucleotide or oligopeptide high resolution chips (80 000 spots/cm² in the future).

Then we studied the addressing of reactants by microcontact printing. This principle, less flexible than the previous one, allows reaching a much higher resolution with a collective and low cost manufacturing process. To facilitate its use, we have developed a compact instrument, a microcontact printer, which integrates the functions necessary for the process (inking, alignments, change of stamps and substrates). The contact stamp/substrate is carried out automatically. We developed also an innovative method to control the load on the stamp, which is based on a compression by two adjustable micrometric thrusts. This instrument was used in two original applications: the manufacturing of microfluidic devices by wet etching of glass; the grafting of antibodies at the bottom of a microfluidic channel. We conclude on the possible improvements to increase the resolution.

Key words : biomicrosystème, biochips, lab-on-a-chips, high resolution, integration, projection, piezoelectric, microcontact printing.

Laboratoire de recherche : LEOM UMR CNRS 5512, Ecole Centrale de Lyon, 69134 Ecully Cedex France

Rapporteur	CHEN Yang	Professeur (ENS - Paris)
Rapporteur	VIEU Christophe	Professeur (LAAS – CNRS – Toulouse)
	MORIN Pierre	Directeur de Recherche (CNRS – INL)
	ERRACHID A.	Docteur (Universitat de Barcelona – Espagne)
	CABRERA Michel	Chargé de recherche (CNRS – INL - ECL)
	GARRIGUES Michel	Directeur de Recherche (CNRS – INL - ECL)