



**HAL**  
open science

# Impression de biomolécules par lithographie douce, applications pour les biopuces, de l'échelle micrométrique

Christophe Thibault

► **To cite this version:**

Christophe Thibault. Impression de biomolécules par lithographie douce, applications pour les biopuces, de l'échelle micrométrique. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. INSA de Toulouse, 2007. Français. NNT: . tel-00200042

**HAL Id: tel-00200042**

**<https://theses.hal.science/tel-00200042v1>**

Submitted on 20 Dec 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE

En vue de l'obtention du

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE**

Délivré par :

**INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES**

*École Doctorale Sciences de la Matière*

Discipline ou spécialité :

*Nanophysique, Nanocomposants, Nanomesures*

Présentée et soutenue par :

**THIBAULT Christophe**

Le 30 novembre 2007.

Titre :

## **Impression de Biomolécules par Lithographie douce, applications pour les Biopuces, de l'échelle Micrométrique à Nanométrique**

---

Directeur de Thèse : *VIEU Christophe*

---

### **JURY**

<i>M. LIVACHE Thierry</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>M. CHEN Yong</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>M. CARLES Robert</i>	<i>Président</i>
<i>Mme. MAUZAC Monique</i>	
<i>M. FRANCOIS Jean-Marie</i>	
<i>M. MALAQUIN Laurent</i>	

---

**Unité de recherche :** *Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS-CNRS)*



## **Remerciements :**

Je tiens tout d'abord à vous dire le bonheur que j'ai eu à travailler au sein du groupe Nano. Les conditions de travail y sont exceptionnelles tant humainement que scientifiquement.

Je remercie tout particulièrement le Pr. Christophe VIEU, mon directeur de thèse, de m'avoir permis d'intégrer son équipe. Je le remercie de m'avoir fait confiance en me donnant l'opportunité de mener mes recherches librement. Ses conseils et son expertise scientifique m'ont beaucoup apporté et ont forgé au cours de ses trois années mon plus grand respect pour sa personne.

J'adresse mes sincères remerciements à Franck CARCENAC pour son aide tant au niveau scientifique et technologique qu'au niveau humain, pour sa disponibilité et sa générosité.

Je souhaite saluer Véronique Le Berre, Emmanuelle Trévisiol, ainsi que toute l'équipe de la plateforme Biopuce de l'INSA pour leur aide, leurs conseils et la disponibilité dont ils ont toujours fait preuve.

Je remercie, le personnel du service TEAM pour son aide en salle blanche, le laboratoire du LAAS pour m'avoir hébergé et fourni les équipements nécessaire à mes recherches.

Bien sur je remercie l'ensemble des permanents, post-doctorants, doctorants et autres stagiaires du groupe NanoBioSystème. Je ne citerais pas de noms ici par peur d'en oublier, tellement ils sont nombreux à les mériter.

**Spécialité :** Nanophysique, Nanocomposants, Nanomesures

**Auteur :** THIBAULT Christophe

**Titre :** Impression de Biomolécules par Lithographie douce, applications pour les Biopuces, de l'échelle Micrométrique à Nanométrique

188 pages.

**Lieu et date de soutenance :** LAAS-CNRS le 30 novembre 2007

**JURY**

**Président :** *M. R CARLES*

**Directeur de Thèse :** *M. C VIEU (thèse préparée au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes, Toulouse)*

**Rapporteurs :** *M. T LIVACHE, M. Y CHEN*

**Membres :** *Mme. M MAUZAC, M. JM FRANCOIS, M. L MALAQUIN*

---

**Résumé :**

L'objectif des travaux est de démontrer que la lithographie douce, quelquefois baptisée « Micro-Contact Printing ( $\mu$ CP)», constitue une méthode de dépôt de biomolécules présentant de nombreux avantages pour des applications de type Biopuces. Pour la fabrication de puces à ADN, nous démontrons que le  $\mu$ CP est une technique compétitive par rapport au dépôt robotisé de gouttes traditionnellement utilisé. Le coût est inférieur, la densité des puces est augmentée et la qualité et la définition des motifs biomoléculaires sont supérieures. Une étude complète des mécanismes d'encre des timbres élastomères d'impression ainsi que des mécanismes de transfert par contact des molécules vers le substrat est présentée. Le rôle prépondérant des fragments de polymère non réticulés présents à la surface des timbres est mis en évidence. Dans un second volet nous étudions la possibilité de générer par la même méthode des puces à biomolécules uniques. Nous montrons comment le  $\mu$ CP peut être poussé jusqu'à une résolution sub-micrométrique proche de 50 nm. Une voie technologique originale impliquant la lithographie douce est proposée : peigner individuellement en des sites organisés précisément sur la surface des longs brins d'ADN pour des études de génétique.

---

**Mots-clés :**

Lithographie douce, Microcontact printing, Microtransfer molding, ADN, Biopuces, microarrays

---

**Title:** Contact Printing of biomolecules for biochip applications : from the micro to the nano scale

---

**Abstract:**

The main purpose of this research work is the demonstration that soft-lithography, very often called Micro-Contact Printing ( $\mu$ CP) is an efficient patterning technique for arranging biomolecules on a surface in the perspective of biochip applications. For DNA Micro-arrays applications, we demonstrate that  $\mu$ CP is a competitive method compared to the conventional spotting technology, commonly used today. The cost of the technology is much lower, the surface density of the chip is drastically increased and the quality and definition of the biopatterns are greatly improved. A systematic study of the inking mechanisms of the elastomeric stamps is provided together with the study and comprehension of transfer mechanisms of molecules from the surface of the stamp to the substrate. The crucial role played by the free fragments of polymers not cross-linked during the polymerisation of the stamp is highlighted. In a second section we investigate the possibility of using  $\mu$ CP for generating single biomolecule biochips. We show how this printing technique can be optimized for reaching sub-micrometric scale down to 50 nanometers features. A technological process involving soft-lithography is proposed: combing long DNA molecules on spatially organized and registered positions for genetic applications.

# Acronymes

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**AFM:** Atomic Force Microscope

**DUV:** Deep Ultra-Violet

**EBL:** Electron Beam Lithography

**EUV:** Extreme Ultra-Violet

**FIB:** Focused Ion Beam

**HMDS:** Hexamethyldisilazane

**IPL:** Ion Projection Lithography

**MEMS:** Microelectromechanical Systems

**μCP:** Microcontact Printing

**MIMIC:** Micromolding in capillaries

**MEB:** Microscope électronique à balayage

**μTM:** Microtransfer Printing

**nTP:** Nanotransfer Printing

**NIL:** Nano Imprint Lithography

**PDMS:** Polydiméthylsiloxane

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PMMA:** Poly(Méthyl Methacrylate)

**SPM:** Scanning Probe Microscope

**SCALPEL:** Scattering with Angular Limitation. Projection Electron-beam Lithography

**SAMIM:** Solvant Assisted Micromolding

**SFIL:** Step and Flash Imprint Lithography

**SSIL :** Step and Stamp Imprint Lithography

**Tg :** Température de transition vitreuse d'un polymère

**TPM:** Tethered Particle Motion

**UV:** Ultra-Violet

**XRL:** X Ray Lithography

## **Glossaire:**

**Buckling:** flambage des structures du timbre

**Collapse:** effondrement des structures du timbre

**Dendrilame®:** lame de microscope recouverte de dendrimères aldéhydes de génération 4

**Dendrimère:** polymère sphérique hyperbranché

**Embossing:** Imprimer une résine en contrôlant la pression et la température

**Lateral collapse:** effondrement latéral de structures adjacentes du timbre

**Lift-off:** Action de retirer d'un substrat une résine recouverte de métal à l'aide d'un solvant

**Replica molding:** replication par moulage

**Roof collapse:** effondrement des régions du timbre entre les structures

**Sagging:** fléchissement des structures du timbre

**Spin-coating :** enduction centrifuge

**Spotter:** Robot de dépôt de gouttes par aiguilles métalliques



# Sommaire général

---

Introduction.....	1
-------------------	---

## Chapitre I : Micro et nanotechnologie

1-LES METHODES DE LITHOGRAPHIES : .....	6
1-1-LES DIFFERENTES APPROCHES DE LA LITHOGRAPHIE .....	7
1-1-1-Approche Top down.....	7
1-1-2-Approche Bottom-up.....	8
1-2-LES TECHNOLOGIES CLASSIQUES DE LITHOGRAPHIE .....	11
1-2-1-Photolithographie par proximité.....	12
1-2-2-Lithographie par Balayage de faisceau d'électrons/ions.....	18
1-3-LES TECHNOLOGIES DE LITHOGRAPHIE DOUCE .....	22
1-3-1-Technologies d'« Embossing » et de Molding .....	24
1-3-2-Technologies de « contact printing » .....	31
2-BIOPUCES A ADN .....	35
2-1-GENERALITES.....	35
2-1-1-Le marché des Biopuces.....	35
2-1-1-ADN et hybridation .....	36
2-1-2-Systèmes de détection par fluorescence .....	38
2-2-MICROARRAYS .....	40
2-2-1-La problématique et les solutions existantes .....	40
2-2-2-« Microarray » obtenus par dépôt robotisé de gouttes .....	42
2-2-3-Puce in-situ.....	47
2-3- MOLECULES UNIQUES.....	53
2-3-1-Peignage moléculaire.....	53
2-3-2-Suivi de molécules uniques.....	54
3-VERS LA FABRICATION DE BIOPUCES PAR LITHOGRAPHIE DOUCE	5
REFERENCES .....	58

## Chapitre II : Moules et Timbres pour la lithographie douce

<b>1-MOULES.....</b>	<b>66</b>
1-1-FABRICATION DES MOULES.....	66
1-2-TRAITEMENTS DE SURFACE .....	67
1-2-1-Les différentes méthodes .....	67
1-2-2-Le traitement en phase liquide .....	68
<b>2-TIMBRES.....</b>	<b>70</b>
2-1-PDMS .....	70
2-1-1-Une formulation commerciale: Sylgard 184 .....	70
2-1-2-Hard PDMS.....	72
2-1-3-Timbre hybride .....	73
2-2-POLLUTION OCCASIONNEE LORS DU CONTACT PAR LE TIMBRE DE PDMS .....	74
2-2-1- Caractérisation du procédé de contamination.....	76
2-2-2-Influence des conditions de réticulation sur le degré de contamination.....	80
2-2-3-Influence de la composition du PDMS.....	84
2-2-4-Nettoyage des timbres de PDMS.....	86
2-3-PROPRIETES MECANQUES DU TIMBRE EN PDMS .....	87
2-3-1-Conformation du timbre sur le substrat .....	87
2-3-2-Effondrement du timbre.....	91
2-3-3-« Retrait thermochimique » du PDMS .....	96
<b>REFERENCES :</b> .....	<b>100</b>

## Chapitre III : Encrage des timbres

<b>1-PREPARATION DES SURFACES.....</b>	<b>104</b>
1-1-PLASMA .....	104
1-1-1-Impact du processus de nettoyage sur la persistance du traitement de surface par plasma O <sub>2</sub> des timbres de PDMS.....	105
1-1-2-Effet du plasma sur le PDMS .....	107
1-2-TRAITEMENTS CHIMIQUES .....	108
<b>2-ENCRE MOLECULAIRE .....</b>	<b>110</b>
2-1-MOLECULES BIOLOGIQUES (SOLVANTS PROTIQUES) .....	110
2-1-1-Adsorption de l'ADN sur un timbre de PDMS.....	111
2-1-2-Impact du processus de nettoyage du PDMS sur l'encrage des molécules d'ADN.....	113
2-1-3-Adsorption des protéines sur un timbre de PDMS .....	117
2-2-MOLECULES SYNTHETIQUES (SOLVANTS POLAIRES APROTIQUES).....	118
2-2-1-Molécules inférieures au nm .....	119
2-2-2-Molécules synthétiques hydrophiles.....	120
2-2-3-Molécules synthétiques hydrophobes .....	123
<b>3-SUBSTRATS.....</b>	<b>125</b>
3-1-SILANES .....	125
3-2-DENDRILAMES.....	126
<b>REFERENCES :</b> .....	<b>130</b>

# CHAPITRE IV : BIOPUCES

<b>1-DENDRIMERES .....</b>	<b>134</b>
1-1-PRINCIPE DU DEPOT .....	135
1-2-LES DIFFERENTS REGIMES DE DEPOT .....	137
1-2-1- <i>Régime d'excès</i> .....	139
1-2-2- <i>Régime de déficit</i> .....	140
1-3-HAUTE RESOLUTION .....	142
<b>2-BIOPUCES A ADN.....</b>	<b>144</b>
2-1-ETUDE DU NOMBRE ET DU TEMPS DE CONTACT .....	145
2-2-COMPARAISON ENTRE LE SPOTTER ET LE $\mu$ CP .....	149
2-3-FABRICATION DE BIOPUCES POUR LA DETECTION DE MUTATION, MULTIPLEXAGE.....	152
<b>3-BIOPUCES A MOLECULES UNIQUES : PERSPECTIVES .....</b>	<b>156</b>
3-1-OBJECTIFS ET CONTEXTE .....	156
3-2-PEIGNAGE D'ADN .....	158
<b>REFERENCES : .....</b>	<b>164</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>166</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>170</b>

## Introduction :

---

Les progrès des décennies précédentes en microélectronique ont permis de mettre au point des outils de lithographies efficaces permettant de fabriquer des dispositifs comportant des motifs de quelques dizaines de nanomètres. Cette évolution naturelle des technologies suivant la célèbre loi de miniaturisation énoncée par Moore a conduit à une course pour diminuer de plus en plus la taille des dispositifs sans altérer irrémédiablement le coût unitaire des produits commerciaux finaux. Parallèlement à l'amélioration des méthodes de lithographie optique qui constituent l'essentiel des méthodes de production actuelles, un besoin de réduction des coûts et d'augmentation des cadences de fabrications a conduit à l'émergence d'une nouvelle catégorie de lithographie appelée « lithographie douce » (traduction de « soft- lithography », terme introduit par G. Whitesides en 1993). Cette nouvelle famille de procédés regroupe des technologies d'impression permettant de reproduire fidèlement, rapidement et à moindre coût, des moules réalisés par des méthodes plus lentes et onéreuses comme la lithographie électronique ; mais également le « Microcontact Printing » ( $\mu$ CP) permettant le dépôt de molécules sur une surface suivant des motifs contrôlés jusqu'à l'échelle nanométrique. Ces avancées technologiques basées sur l'amélioration des procédés de lithographie ont entraîné logiquement l'application de ces outils pour des secteurs différents de la microélectronique et en particulier pour ses héritiers légitimes que sont les nanotechnologies. Ce vaste domaine que constituent les nanotechnologies s'est dès lors inscrit dans une mouvance « More than Moore ». C'est à dire une ouverture affichée vers les autres domaines scientifiques tels la chimie et la biologie, créant de plus en plus de thèmes de recherche et d'applications interdisciplinaires. C'est dans cet esprit d'utilisation des technologies existantes mais appliquées à de nouveaux domaines, notamment vers les sciences du vivant que s'est déroulée cette thèse. En effet les besoins de nouvelles technologies sont énormes en biologie et plus particulièrement pour les biopuces qui conjuguent sur une surface solide les dernières avancées en matière de lithographie et de biologie moléculaire.

Deux débouchés des nanotechnologies dans ces domaines sont d'une part la « biodétection » et d'autre part le « biopatterning ». Le premier point passe évidemment par l'amélioration des dispositifs de détection déjà disponibles mais surtout par la recherche de nouveaux procédés innovants. La réduction des dimensions à l'échelle nanométrique des

dispositifs de détection, engendre un accroissement significatif de la sensibilité. Des concentrations de l'ordre du fM sont désormais détectables à l'aide de nano-transistors. Le « biopatterning » peut être considéré comme le point subissant le plus d'évolutions durant cette décennie. La problématique consiste à déposer des molécules biologiques sondes qui vont être capables de détecter au sein d'une solution à analyser des molécules cibles en raison de leur interaction spécifique avec ces dernières. La recherche hautement parallélisée d'un très grand nombre de cibles biologiques potentielles, pour diagnostiquer une maladie par exemple, impose donc le dépôt d'un grand nombre de molécules sondes en des motifs de dimension réduite permettant l'intégration de ces biopuces sur des surfaces de quelques cm<sup>2</sup>. De nombreux groupes de recherche essaient donc d'utiliser les méthodes de nanolithographie afin de réaliser ce « biopatterning ». Un des principaux défis est de rendre compatibles ces méthodes avec la fragilité des biomolécules. Dans cette perspective, la lithographie douce apparaît comme un candidat idéal capable de fixer les molécules sondes sur les surfaces suivant des motifs contrôlés et sans les dénaturer. C'est ce choix qui m'a guidé durant le travail de recherche que je présente dans ce mémoire. Outre, les innovations apportées par la lithographie douce en termes de réduction des coûts et de flexibilité d'utilisation, il est désormais envisageable d'influencer directement l'évolution des technologies de détection par le biais du patterning, en jouant sur la forme et la taille des motifs déposées.

Afin d'étudier les possibilités offertes par les nanotechnologies et en particulier la lithographie douce, nous avons décidé de nous focaliser sur le « biopatterning » et notamment le microcontact printing. La première partie de cette thèse sera consacrée à une revue générale des différentes technologies de lithographie et plus particulièrement les nouveaux procédés offerts par la lithographie douce prise au sens le plus large de sa définition. Cet état de l'art sera complété par une présentation des applications dans le domaine des biopuces à ADN. Le second chapitre sera consacré au procédé de « microcontact printing » et aux différents matériaux et outils nécessaires à sa mise en œuvre. Une première partie sera consacré à la fabrication des moules en Silicium et les traitements de surface de ces derniers. La deuxième partie décrira les timbres polymères utilisés, leur comportement mécanique, les différents types de polymères utilisés avec leurs inconvénients et avantages respectifs. L'adsorption des molécules sur le timbre est une étape clé du procédé, la chimie de surface du substrat l'est tout autant afin de favoriser le transfert des molécules depuis le timbre vers la surface d'accueil. Les molécules doivent s'absorber sur le timbre de façon homogène mais doivent dans le même temps préférer se fixer sur le substrat. C'est pourquoi nous avons choisi de consacrer le troisième chapitre entièrement à ces étapes clés que sont l'encrage et le transfert associé.

Finale­ment le dernier chapitre décri­ra les ré­sul­tats obte­nus dans l’uti­li­sa­tion de la litho­gra­phie douce pour la réa­li­sa­tion de bio­puces à ADN. L’uti­li­sa­tion des dendri­mères une molé­cule aux mul­ti­ples appli­ca­tions, l’uti­li­sa­tion du micro­con­tact printing pour dé­po­ser des molé­cules d’ADN et les études pré­li­mi­naires sur les bio­puces à molé­cules uni­ques y seront dé­cri­tes.



# Chapitre I

## Micro et nanotechnologie

### Sommaire

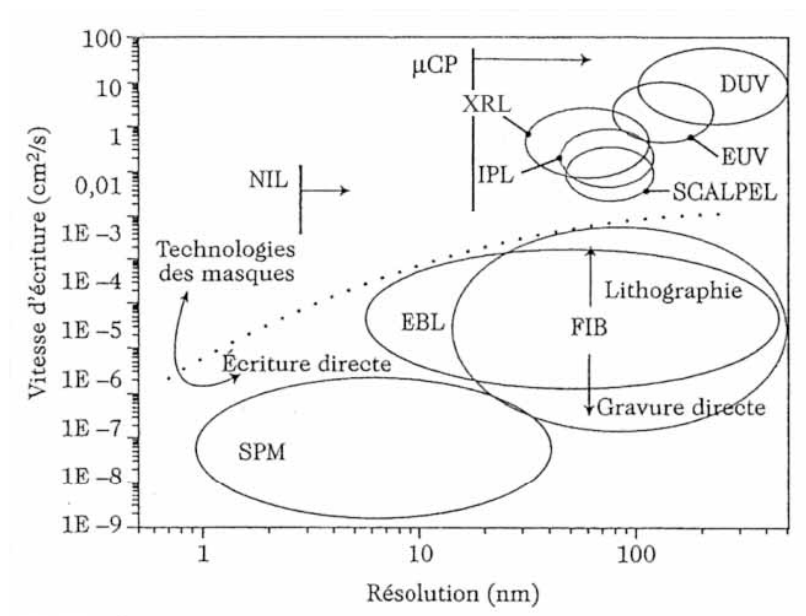
1-LES METHODES DE LITHOGRAPHIES : .....	6
1-1-LES DIFFERENTES APPROCHES DE LA LITHOGRAPHIE.....	7
1-1-1-Approche Top down.....	7
1-1-2-Approche Bottom-up.....	8
1-2-LES TECHNOLOGIES CLASSIQUES DE LITHOGRAPHIE .....	11
1-2-1-Photolithographie par proximité .....	12
1-2-2-Lithographie par Balayage de faisceau d'électrons/ions .....	18
1-3-LES TECHNOLOGIES DE LITHOGRAPHIE DOUCE.....	22
1-3-1-Technologies d'« Embossing » et de Molding.....	24
1-3-2-Technologies de « contact printing ».....	31
2-BIOPUCES A ADN.....	35
2-1-GENERALITES .....	35
2-1-1-Le marché des Biopuces .....	35
2-1-1-ADN et hybridation.....	36
2-1-2-Systèmes de détection par fluorescence.....	38
2-2-MICROARRAYS .....	40
2-2-1-La problématique et les solutions existantes .....	40
2-2-2-« Microarray » obtenus par dépôt robotisé de gouttes.....	42
2-2-3-Puce in-situ .....	47
2-3- MOLECULES UNIQUES .....	53
2-3-1-Peignage moléculaire .....	53
2-3-2-Suivi de molécules uniques .....	54
3-VERS LA FABRICATION DE BIOPUCES PAR LITHOGRAPHIE DOUCE	
.....	56
REFERENCES .....	58



## 1-Les méthodes de lithographies :

Toute construction de structures complexes fait appel à la lithographie. Il existe de nombreuses méthodes, toutes comportent avantages et inconvénients. A titre d'exemple des capacités de fabrication des technologies de lithographie classique et douce, en terme de gamme de résolution et vitesse d'écriture, la figure 1 nous en brosse un bref Récapitulatif. Ce graphique nous démontre bien qu'il est difficile de coupler une bonne résolution avec une grande vitesse d'écriture. C'est une des raisons pour laquelle la lithographie douce est apparue. En effet elle permet de coupler les technologies plus classiques et matures ayant de bonnes résolutions avec de nouveaux procédés, permettant une écriture rapide et a faible coût.

Le cahier des charges qui nous est fixé pour répondre aux besoins en matière de fabrication de biopuces est difficile à remplir. Nous devons être capables à la fois de pouvoir fabriquer des microstructures mais aussi des nanostructures. De plus cette technologie doit être polyvalente car de nombreuses molécules très différentes les unes des autres devront être structurées. Le coût et la rapidité de fabrication des structures doivent être aussi au rendez-vous. C'est pour l'ensemble de ces raisons que nous avons été amenés à choisir les méthodes de lithographie douce et notamment le  $\mu$ CP.



**Figure 1 :** Graphique représentant un panel des différentes technologies de lithographie en fonction de leur couple résolution / vitesse d'écriture. Acronymes : SPM (Scanning Probe Microscope), EBL (Electron Beam Lithography), FIB (Focused Ion Beam), NIL (Nano Imprint Lithography),  $\mu$ CP (Micro-Contact Printing), XRL (X Ray Lithography), IPL (Ion Projection Lithography), DUV (Deep UV), EUV (Extreme UV), SCALPEL (Scattering with Angular Limitation. Projection Electron-beam Lithography).

Nous avons décidé dans ce chapitre de présenter de façon chronologique les différentes méthodes de lithographie. Une première partie sera consacrée aux différentes approches de la lithographie : top-down et bottom-up. Puis nous entrerons dans le détail en différenciant les technologies les plus matures de celles de la lithographie douce. Enfin nous aborderons les applications visées par ces technologies dans le domaine des biopuces.

## **1-1-Les différentes approches de la lithographie**

### **1-1-1-Approche Top down**

L'expression méthode de fabrication Top-down peut être caractérisée par un ensemble de processus qui, à partir d'un apport de matière première brute, visent à forger celle-ci, à la transformer par étapes souvent en lui enlevant des parties indésirables. L'élaboration de circuits intégrés repose sur cette approche. Pour donner un exemple moins scientifique un artiste sculptant de la pierre utilise aussi une technologie Top-down. La tendance dans la fabrication de composants électroniques est de diminuer la taille des structures de plus en plus [1]. Cela conduit à augmenter la densité et les performances de ces composants et dans le même temps de diminuer la consommation en énergie et le coût de ceux-ci. La méthode la plus utilisée et qui sera décrite par la suite est la photolithographie par proximité. La dimension typique des structures fabriquées par ces méthodes de microfabrication est entre 1 et 100  $\mu\text{m}$ . Ces technologies sont de plus en plus utilisés en dehors du cadre traditionnel de la microélectronique, incluant la microfluidique, les systèmes microelectromécaniques (MEMS), comme les microdétecteurs, les microactuateurs et les systèmes optiques. La majorité des recherches dans ces domaines sont basées sur le silicium, mais de plus en plus de nouveaux matériaux comme les polymères apparaissent en même temps que les nouveaux domaines d'applications.

L'approche Top-down en nanofabrication est la suite logique des technologies de microfabrication, mais cette fois pour des dimensions de structures comprises entre quelques dizaines et la centaine de nanomètres. Le FIB (Focus Ion Beam), la Deep-UV lithographie et la lithographie électronique sont des exemples de technologies couramment utilisées pour réaliser des structures nanométriques.

Les technologies de lithographie douces sont quant à elles pour la plupart des approches top-down, que ce soit à l'échelle micrométrique ou bien nanométrique. Une

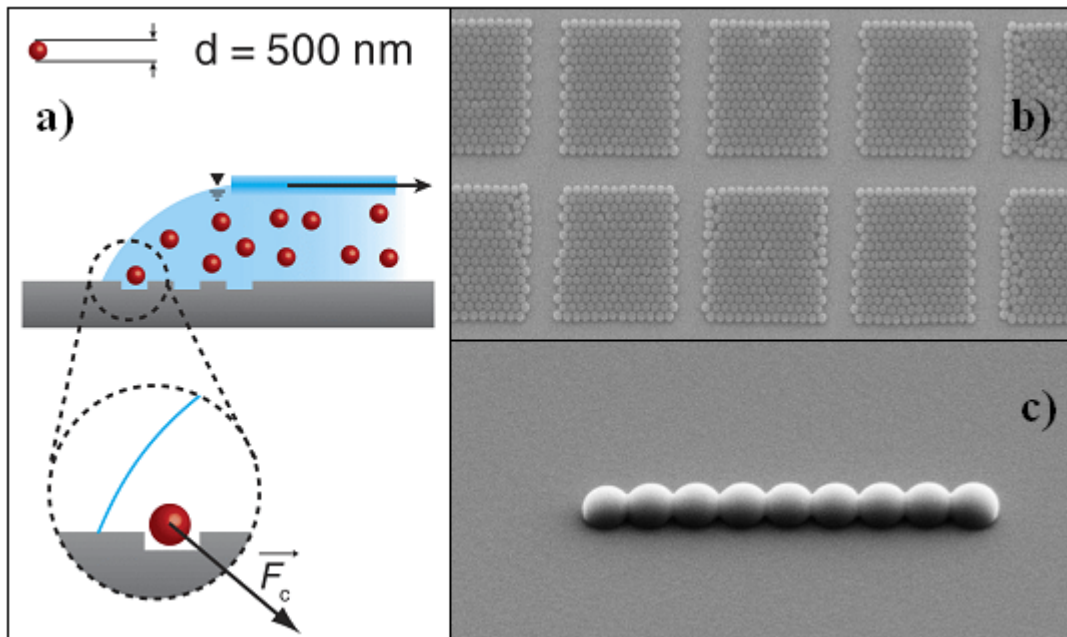
différence notable par rapport aux technologies classiques réside dans leur possible couplage avec des approches Bottom-up comme nous le verrons par la suite.

### **1-1-2-Approche Bottom-up**

Les approches Bottom-up, en revanche, sont philosophiquement complètement opposées aux approches Top-down. Elles emploient les propriétés chimiques de nano-objets pour réaliser un auto-assemblage dans une conformation utile d'une grande quantité de molécules.

Dans un premier temps, le phénomène d'auto-assemblage a surtout été utilisé dans le domaine des semi-conducteurs (boîtes quantiques – optoélectronique) puis s'est étendu à d'autres domaines. Dans ces derniers, c'est principalement la croissance auto-organisée de structure nanométrique des atomes [2] (mûrissement d'Oswald, croissance tridimensionnelle...) à la surface d'un substrat qui a été utilisé.

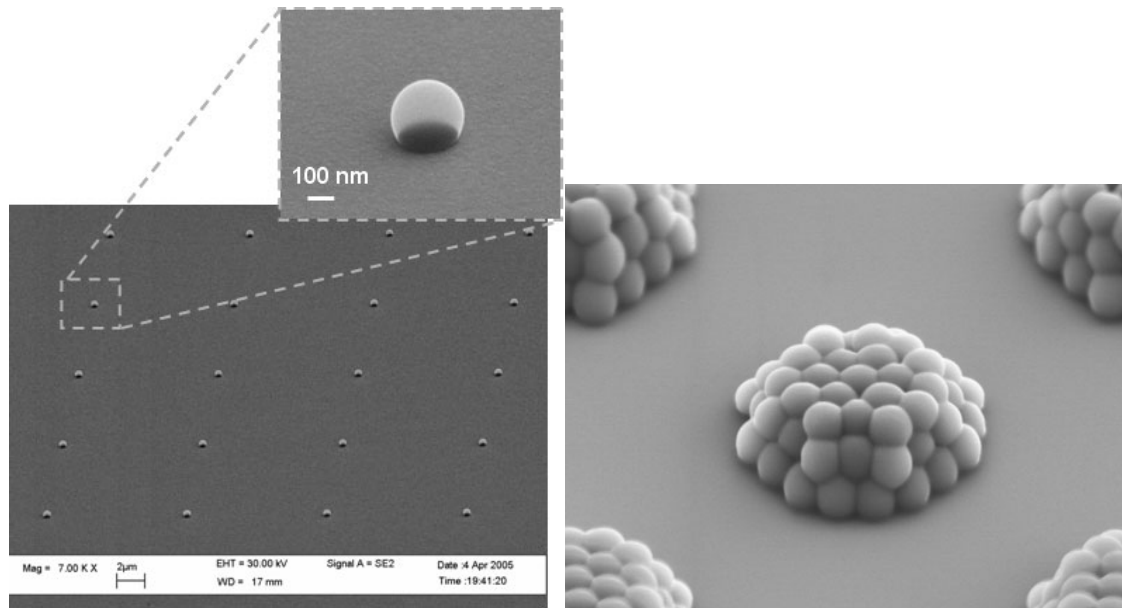
L'approche Bottom-up se situe à la jonction entre la physique et la chimie. Parallèlement au phénomène d'auto-assemblage de nanostructures obtenues par croissance, la chimie permet de synthétiser des nano-particules avec des qualités remarquables (cristal, forme régulière, faible dispersion en taille. . .) puis de les déposer sur un substrat de manière à ce qu'elles s'auto-assemblent. On obtient ainsi une assemblée de nano-particules avec un ordre à courte distance. Les phénomènes physiques utilisés pour contrôler l'assemblage de particules sur une surface sont principalement l'assemblage capillaire et l'auto-assemblage moléculaire, mais il en existe de nombreux autres (Champ électrique ou magnétique, gravité...). Ce dernier utilise les capacités naturelles de certaines molécules à s'auto-assembler sur une surface. L'assemblage capillaire lui « force » les molécules, soit par des structures topographiques soit chimiques à s'auto-assembler. La figure 2 montre une variété d'assemblage sur structures topographiques de billes de polystyrène de 500 nm [3].



**Figure 2 :** Auto-assemblage de billes de polystyrène de 500nm sur structures topographiques. a) Schéma représentant le phénomène d'assemblage capillaire sur une surface contenant des motifs topographiques. B) image MEB de carrées remplies par un cristal 2D, c) ligne de nanoparticules assemblés [3].

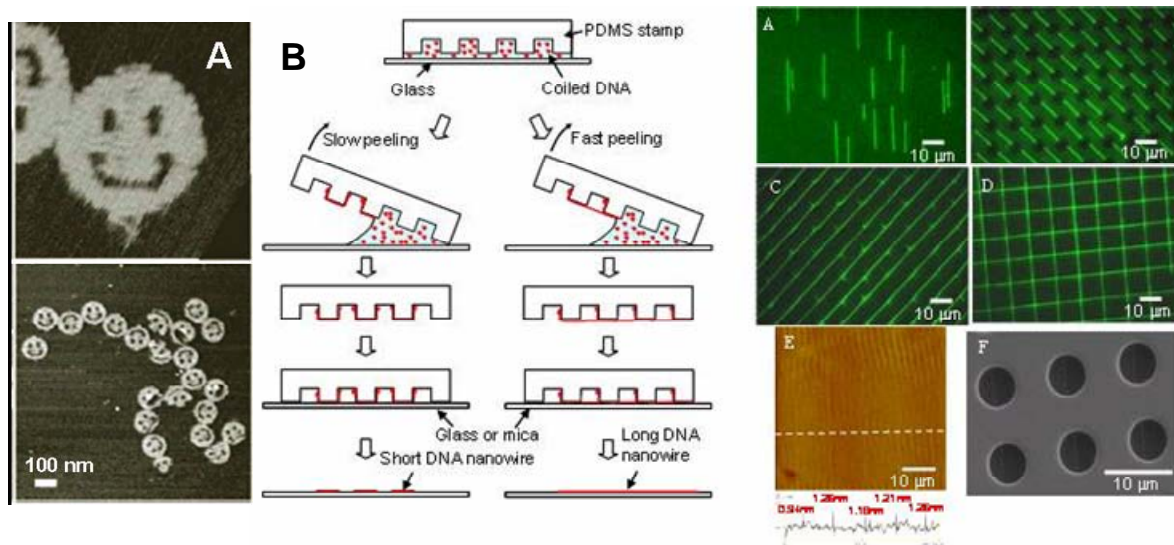
De nombreux types d'assembleurs capillaires existent, ils fonctionnent sur un principe inspiré des techniques de Langmuir-Blodgett [4]. Un film mince de solution contenant les particules à assembler est étiré par mouvement mécanique du substrat (ou d'une lame comprimant la solution sur le substrat). L'évaporation du solvant à l'interface air-liquide entraîne la migration des particules vers cette zone du film qui devient de plus en plus mince en raison du tirage mécanique. Dans cette zone les particules sont fortement attirées par les zones chimiquement modifiées ou/et les motifs topographiques (figure 2a)) et en raison du piégeage du ménisque sur ces motifs. Lorsque le film de solution est trop contraint, il se retire brusquement laissant les particules piégées sur les motifs. Suivant le motif choisi on peut par exemple obtenir un cristal de nanoparticules (figure 2b)) ou bien un ensemble de particules aligné (figure 2c)).

Les technologies de Bottom-up peuvent être couplées avec des technologies Top-down de lithographie douce comme le Microcontact printing ( $\mu$ CP) [3]. Un exemple est illustré sur la figure 3.



**Figure 3 :** Exemple de couplage entre la lithographie douce et l'auto-assemblage dirigé par capillarité. A gauche, particules isolées de polystyrène d'un diamètre de 500 nm assemblées en réseau sur un timbre en PDMS puis déposées par Microcontact printing sur un substrat de silicium. A droite, particules isolées de polystyrène d'un diamètre de 500 nm assemblées en réseau 3D sur un timbre en PDMS puis déposées par  $\mu$ CP sur un substrat de silicium [3].

De nombreux autres exemples de couplage peuvent être cités notamment en biologie. En effet les approches bottom up y sont souvent utilisés, que ce soit pour auto-assemble de l'ADN [5] en motifs (figure 4A) ou pour peigner par capillarité de l'ADN [6] figure 4B qui peut être ensuite transféré par lithographie douce sur un autre substrat.



**Figure 4 :** **A.** Image AFM de molécules d'ADN auto-organisées en forme de smileys sur une surface de mica [5]. **B :** (gauche) Schéma explicatif du peignage de l'ADN pour le dépôt par lithographie douce. (droite) A. Image de fluorescence des molécules d'ADN peignées sur un timbre sans structures de PDMS. B. Image de fluorescence d'un réseau de brins d'ADN. C. Image de fluorescence de lignes de brins d'ADN. D. Micrographie de fluorescence de lignes d'ADN perpendiculaires. E. Image AFM de molécules d'ADN transférées sur mica par lithographie douce. F. Image MEB de molécules d'ADN a suspendues au dessus des structures du timbre de PDMS [6].

Les approches Bottom-up permettent d'obtenir des structures complexes à l'échelle nanométrique et ceux à moindre coût, puisque l'assemblage a lieu sur de grandes surfaces. De plus la possibilité de couplage avec la lithographie douce en fait un outil innovant et prometteur. Un exemple en sera donné dans le chapitre 4.

## 1-2-Les technologies classiques de lithographie

Les technologies de lithographies classiques ou Top-down ont besoin d'équipements en salle blanche, où l'air est filtré pour diminuer la contamination des substrats et/ou la température et l'humidité sont stables. Ceci entraîne des frais financiers élevés mais nécessaires pour atteindre des résolutions nanométriques et une uniformité des procédés. Le tableau 1 permet de visualiser l'investissement temporel ou budgétaire pour obtenir des motifs nanométriques avec différents équipements.

Technique de lithographie	Photolithographie (proximité)	Lithographie électronique	FIB	EUV
Résolution [nm]	1000	1-20	5-30	30
Alignement [nm]	1000	10	10	10
Vitesse [# motifs/s]	$10^{10}$	$10^4$	$10^1-10^2$	$10^{10}$
Prix de l'équipement [\$]	$5.10^5-10^6$	$10^6$	$10^6$	$\sim 5.10^7$

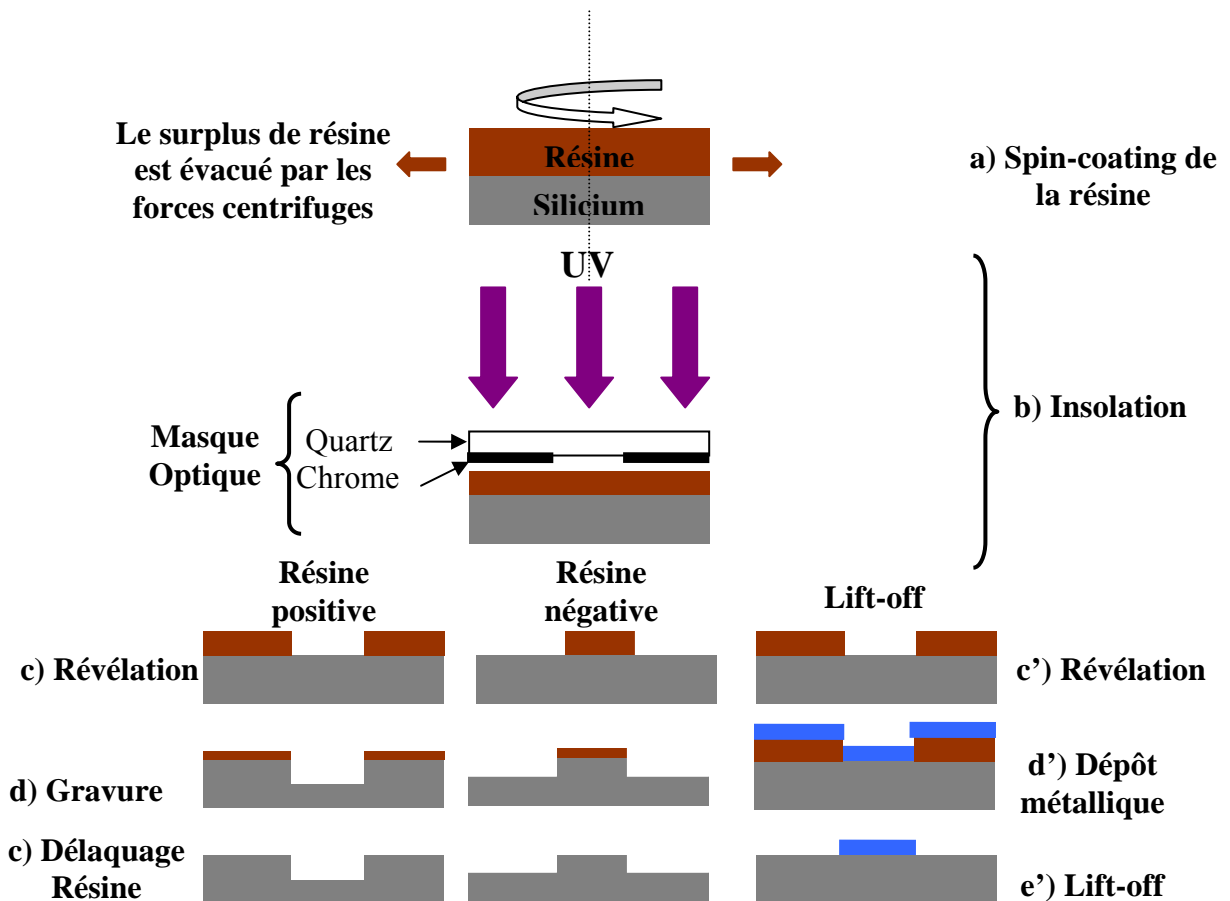
**Tableau 1 :** Comparaison des différentes technologies de lithographies. Les chiffres cités sont approximatifs et dépendent de la configuration de l'équipement. Les coûts n'incluent pas les consommables.

Nous allons décrire dans les paragraphes suivant deux des technologies Top-down les plus utilisés dans cette thèse et dans la plupart des procédés de fabrication à ces échelles: La photolithographie et la lithographie électronique. Ces méthodes conventionnelles de fabrication de structures micro ou nanométriques consistent à enduire un substrat de silicium dans la majorité des cas, avec une résine sensible à un type de radiation qui modifie la structure des chaînes de polymères. Ce changement de structure se traduit soit par une plus grande solubilité dans un solvant (cas des résines positives) soit par une solubilité diminuée (cas des résines négatives).

### 1-2-1-Photolithographie par proximité

#### Principe

Comme décrit précédemment, la photolithographie consiste premièrement à enduire par enduction centrifuge ou « spin-coating » un substrat avec une résine photosensible (figure 5a). Un masque de quartz avec des motifs en chrome (opaque aux rayonnements UV) est placé au dessus du substrat permettant ainsi le rayonnement UV d'insoler seulement les zones voulues (figure 5b). La solubilité des zones insolées change suivant la nature de la résine, le substrat est plongé dans un solvant chimique qui révèle ainsi les motifs (figure 5c). La résine restante est maintenant utilisée comme masque pour la gravure chimique ou physique (figure 5d) ou pour un dépôt métallique. Finalement la résine est retirée par traitement chimique (figure 5e), dans le cas où un dépôt métallique a eu lieu cette étape appelée lift-off, nécessite quelquefois l'emploi d'un bain d'ultrasons et une température du solvant plus élevée pour faciliter l'enlèvement du métal déposé sur la résine.



**Figure 5 :** Schéma des étapes de photolithographie. Spin-coating de la résine sur le substrat a), insolation à travers le masque de photolithographie b), révélation chimique des différentes résines (positives ou négatives) c), gravure chimique et/ou physique d) nettoyage de la résine restante. La voie par lift-off comporte quelques différences : révélation chimique des différentes résines (positives ou négatives) c), dépôt métallique d) nettoyage de la résine restante.

## Résolution

En photolithographie par proximité, le rayonnement est en général ultraviolet (UV) avec une longueur d'onde d'environ 365 - 436 nm. La distance entre le masque de photolithographie et le substrat doit être choisie en fonction de la résolution voulue. En effet la diminution de la distance entre le masque et le substrat diminue les effets de diffraction des UV sur les motifs du masque offrant ainsi une meilleure résolution.

La résolution finale est donnée par la longueur d'onde  $\lambda$  de la source utilisée, l'indice de réfraction de la résine  $n$ , son épaisseur  $d$  et la distance entre le masque et la résine  $g$ . Une approximation commune pour la taille minimale des motifs réalisés par photolithographie en proximité est donnée pour un réseau de ligne de largeur  $b_{min}$  et de pas  $2b_{min}$ , la valeur de  $b_{min}$  est exprimée comme suit :



$$b_{\min} = \frac{3}{2} \sqrt{\frac{\lambda}{n} \left( g + \frac{d}{2} \right)}, \quad (1)$$

Cette équation (1) nous donne donc pour une longueur d'onde de 365 nm, une distance masque résine de 3µm et une épaisseur de résine de 500 nm avec un indice de réfraction de 1,6 une résolution de 1,3µm.

### Exemples de résines photosensibles

Les résines photosensibles sont composées pour l'essentiel de trois matériaux : une matrice, un composé photosensible et un solvant. Les propriétés de la résine sont modifiées par des transformations photochimiques du matériau photosensible, la principale conséquence étant la modification de sa solubilité.

La matrice est une résine polymère, souvent désignée par le terme générique « novolak », qui est un Cresol/Formalmehyde. C'est elle qui procure au film, une fois polymérisée, ses propriétés mécaniques et physiques. La vitesse de dissolution d'un film uniquement composé de novolak (sans agent photoactif) dans un développeur aqueux est de l'ordre de 150 Å/s. Les résines Novolak possèdent de bonnes stabilité thermique, et résistance aux agents de gravure. Elles offrent aussi une bonne transparence et sont solubles dans des développeurs aqueux.

Le composé photoactif (PAC) dans les résines positives est du diazonaphtoquinone (DNQ). Il n'est pas ou peu soluble dans le développeur.

Le solvant, quant à lui, détermine la viscosité de la résine. Il constitue environ 70 % de la résine et comporte généralement plusieurs composants. Actuellement ce sont principalement des PGMEA (Propylene Glycol Monomethyl Ether Acetate) et des Ethyl Lactate (EEP, Ethyl 3-Ethoxy Propionate).

Le principe de la photolithographie repose sur la capacité des résines à voir leur solubilité évoluer en fonction de la quantité de radiation lumineuse absorbée. Le mécanisme mis en jeu pour les résines positives DNQ-Novolak peut se décomposer en deux principales composantes :

Résine non exposée : le PAC interagit avec la résine Novolak lors de la polymérisation pour inhiber la solubilité de la résine dans les développeurs alcalins par formation de liaisons hydrogène avec la matrice. La dissolution du film dans le développeur passe à environ 10 à 20 Å/s.

Résine exposée : la partie active (photosensible) du DNQ va réagir et se transformer sous l'action de la lumière (photolyse) et en présence d'eau. Il s'en suit un réarrangement moléculaire avec la matrice qui libère les liaisons hydrogène ainsi qu'une production d'acide carboxylique. La présence d'acide carboxylique, qui est une molécule polaire, a pour conséquence d'augmenter considérablement la solubilité, et la vitesse de dissolution des parties exposées du film avoisine alors 1000 à 2000 Å/s.

Le mécanisme de formation des images dans de la résine positive est donc basé sur la différence de solubilité des zones exposées, ou non, à un rayonnement lumineux, avec des vitesses de dissolution du film variant d'un facteur 100 (de 10 à 1000Å/s).

### **Le traitement du substrat avant dépôt de la résine**

La contamination des surfaces peut affecter bon nombre d'étapes ultérieures du procédé photolithographique. Les problèmes engendrés sont communément la diminution de l'adhésion et les inclusions de défauts. L'élimination de ces problèmes passe par une très bonne propreté des substrats, traitements de surface, déshydratation.

L'humidité est un des agents parmi les plus polluants au niveau des procédés lithographiques. En effet, les surfaces des substrats couramment utilisés (oxyde...) sont hydrophiles et adsorbent l'humidité de l'air ambiant. L'eau sur la surface des substrats favorise la création d'hydroxydes polarisés particulièrement difficiles à éliminer par la suite. Il en résulte des interférences avec les phénomènes d'adhésion résine/substrat.

La solution consiste en un recuit/étuvage dit de déshydratation. Les plaquettes passent par une étape d'élévation de la température dans une étuve. Cette cuisson doit être effectuée très peu de temps avant l'étape suivante, car la réadsorption d'humidité est très rapide.

Une fois déshydraté, un promoteur d'adhésion est déposé sur la surface afin d'améliorer l'adhésion résine/substrat. Ce composé est ordinairement de l'hexamethyldisilazane (HMDS). Le procédé consiste en un remplacement des groupements hydrophiles qui se forment normalement sur le substrat par d'autres groupements hydrophobes. Une partie des molécules réagit avec la surface oxydée du substrat, partiellement hydrosilicatée du fait de l'adsorption d'hydrogène, pour former des liaisons Si-O, avec production d'eau. L'autre extrémité de la molécule va quant à elle pouvoir former des liaisons avec la résine. Le dépôt de l'HMDS se fait en phase vapeur et consiste en l'introduction du produit sous forme de gaz dans une chambre en présence du substrat. L'application du HMDS peu s'effectuer à froid ou à chaud.

## Dépôt de résine

Le film de résine est obtenu par un procédé d'enduction centrifuge (spin-coating). Le principe consiste à étaler à l'aide de forces centrifuges sur une tournette une petite quantité de résine sur un substrat (plaquette de silicium). Le procédé comprend cinq étapes principales :

- a) Dépôt de la résine sur la plaquette ;
- b) Répartition de la résine sur la totalité de la surface de la plaquette par mise en rotation ;
- c) Augmentation de la vitesse de rotation afin d'éliminer le surplus de résine ;
- d) Rotation à vitesse constante afin d'établir l'épaisseur de la résine ; Rotation durant un temps déterminé pour permettre l'évaporation du solvant.

Lors de la première étape (a) une petite quantité de résine, quelques millilitres, est déposée sur la plaquette. Le dépôt s'effectue selon deux principaux modes : sur la plaquette immobile ou sur la plaquette en rotation à faible vitesse ( $\sim 1500$ tr/min). Le second mode offre l'avantage d'homogénéiser le volume de résine au centre du substrat (diamètre, épaisseur) et d'éliminer aussitôt le surplus de résine. Une forte accélération (b) ( $\sim 5000$ tr<sup>2</sup>/min) est ensuite appliquée à la plaquette pour favoriser la formation d'une couche uniforme sur toute la surface.

L'évaporation du solvant diminue sensiblement la viscosité (lié à la concentration du polymère) de la résine dont dépend directement l'épaisseur du film. L'évaporation étant rapide, il est par conséquent nécessaire de veiller à ce que le délai d'étalement de la résine soit court. L'accélération est cependant limitée par la capacité des moteurs et la résistance mécanique des plaquettes.

Durant l'étape (c) le film atteint son épaisseur finale. La rotation s'effectue à vitesse constante car l'épaisseur est assujettie à la vitesse de rotation. La plage de vitesse de rotation se situe entre 2000 et 7000tr/min, cependant l'uniformité optimale est obtenue aux vitesses supérieures à 4000tr/min. Durant la rotation, la plus grande partie du solvant contenu s'évapore pour finir par produire un film solide. La qualité du film dépend essentiellement de la présence ou non de défauts (comètes, poussières, manques, etc.) et de l'uniformité de son épaisseur.

### **Cuisson après dépôt**

Cette étape succède immédiatement au dépôt de la résine sur la plaquette. Elle assure l'élimination rapide d'une partie des solvants et la polymérisation de la matrice. Le taux de solvant passe ainsi de 20 - 30% restant après le premier séchage à 4 - 7%. Cela a pour conséquence un retrait volumique de la résine qui engendre une perte d'épaisseur de l'ordre de 10%. Le taux de solvant résiduel influe notamment sur le développement : plus ce taux est faible et plus la dissolution de la résine est rapide.

Le chauffage des plaquettes peut s'effectuer selon différents modes. Le plus employé utilise un système de plaques chauffantes sur lesquelles sont disposées les wafers. La température est entre 65°C et 120°C environ et la durée du cycle est très courte (30 - 60 s) et ajustée pour atteindre le taux de solvant désiré.

### **Insolation**

L'insolation consiste en l'exposition de certaines zones de la résine, par le biais d'un système de masquage, à un rayonnement ultraviolet. Il se crée alors, par réaction photochimique, une image latente dans l'épaisseur de la résine photosensible. Le degré d'exposition dépend essentiellement de l'intensité de la source et du temps d'exposition et est mesuré par l'intermédiaire d'une énergie surfacique ( $J/m^2$ ). Il conditionne le degré d'avancement de la réaction photochimique qui dépend de la sensibilité de la résine.

L'exposition de la résine est une étape critique du procédé de photolithographie pour plusieurs raisons : on procède plaquette par plaquette, par conséquent la durée d'exposition influe directement sur le temps de cycle. La durée d'exposition est un paramètre offrant relativement peu de marges car une résine sous-exposée entraîne une dégradation sensible de la résolution des motifs. Le temps consacré à l'alignement des plaquettes n'est pas négligeable et est difficilement réductible. L'amélioration des durées de procédés à ce niveau passe donc obligatoirement par une optimisation des réactions photochimiques. Cette tâche est ardue car il existe une forte dépendance entre l'exposition et toutes les étapes précédentes.

### **Fabrication des masques**

Cette étape va directement influencer sur la résolution des motifs obtenus. C'est aussi l'étape la plus coûteuse en temps et financièrement. Le procédé repose sur le même principe

que la photolithographie. Une résine déposée sur un substrat de quartz est insolée point par point cette fois et non plus à travers un masque à l'aide d'un faisceau laser fin (taille du spot  $\sim 700$  nm). La résine est ensuite révélée, puis un dépôt de chrome est effectué et enfin l'ensemble de la résine restante est retiré par lift-off. Ce procédé permet d'obtenir in fine après toutes les étapes technologiques des motifs d'environ  $1 \mu\text{m}$ . Le masque ainsi constitué de motifs de chrome sur quartz peut être directement utilisé pour la photolithographie.

### **1-2-2-Lithographie par Balayage de faisceau d'électrons/ions**

La lithographie par balayage de faisceau est un ensemble de procédés technologiques sans utilisation de masque d'insolation. Deux technologies similaires peuvent être regroupées sous ce dénominateur : la lithographie électronique et la lithographie par faisceau d'ions focalisé (FIB : Focused ion beam).

#### **FIB**

Les ions sont utilisés pour une grande variété de modification de surface : la nanolithographie (via une résine), la nanofabrication par gravure localisée (pas besoin de résine) avec ou sans gaz réactif (sélective, accélérée ou non), l'implantation ionique localisée, le dépôt localisé par décomposition induite sous faisceau [7,8]. . . Le faisceau, généré par une source d'ions (métal liquide (Ga, Ge, In, Au) ou gaz inerte ionisé), est focalisé sur la surface de l'échantillon par un système composé de lentilles électrostatiques (propriétés focalisatrices indépendantes du rapport entre la charge et la masse de la particule). L'observation de l'échantillon par imagerie ionique permet une mise au point et un positionnement précis de la sonde, dont le meilleur diamètre est de l'ordre de 5-10 nm avec un courant de quelques picoampères pour une source à métal liquide de Ga. La taille de sonde est principalement limitée par les aberrations (chromatiques et sphériques) introduites par le système de lentilles électrostatiques à cause de la large dispersion énergétique de la source à métal liquide (LMIS, liquid metal ionic source). L'effet de ces aberrations est d'autant plus prononcé qu'on augmente le courant du faisceau. En raison de leur masse plus grande que celle des électrons, les ions du faisceau diffusent peu et pénètrent moins dans la matière avec laquelle ils interagissent (peu de rétrodiffusion). Bien que légèrement élargie par les électrons secondaires, peu énergétiques, la zone d'interaction obtenue est mieux délimitée. C'est pourquoi la résolution accessible avec la lithographie par faisceau d'ions (motif transféré) est

normalement meilleure que celle obtenue avec des électrons (pour une même taille de sonde). Du fait de cette très grande efficacité du transfert d'énergie entre les ions et la résine, une même résine aura généralement une sensibilité plus élevée au faisceau d'ions qu'au faisceau d'électrons. Voici les meilleurs résultats en termes de résolution, obtenus en lithographie ionique :

- des lignes d'Aluminium larges de 10 nm à partir d' $\text{AlF}_3$ , résine inorganique, de 50 nm d'épaisseur (décomposition de  $\text{AlF}_3$  sous le faisceau par sublimation du F) [9].
- des réseaux de plots avec des diamètres variant de 10 à 20 nm dans une couche de PMMA (poly(méthyl methacrylate)) de 60 nm d'épaisseur [10].
- des lignes à base d'or de faibles dimensions latérales (30 nm) et verticales (<10 nm) avec un facteur de forme ajustable avec la dose [11].

Lorsque le faisceau est suffisamment intense et énergétique, la collision des ions provoque la pulvérisation des atomes de la surface et une gravure localisée s'opère. Cette option est très intéressante puisqu'elle permet d'effectuer la lithographie et la gravure simultanément sans besoin d'un masque de résine intermédiaire. Habituellement, deux étapes sont nécessaires: la lithographie produit le masque de résine destiné au transfert du motif par lift-off ou gravure. Contrairement au lift-off, la gravure détériore souvent la résolution du motif de résine par érosion ou pulvérisation. D'où l'intérêt de ce mode de fabrication par FIB qui permet la nanofabrication de structures à l'échelle de la dizaine de nanomètres en une seule étape. Des lignes larges de 8 nm ont été obtenues par cette technique (en régime de gravure) dans une couche de GaAs au travers d'une couche de 50 nm d' $\text{AlF}_3$  [9]. Cette gravure peut être rendue sélective ou être accélérée par l'addition d'un gaz réactif dans l'enceinte. Ce procédé de gravure (sélectif ou non) est utilisé pour réparer les masques ou les circuits défectueux (avec dépôt localisé possible), fabriquer des membranes, préparer des échantillons pour une analyse au microscope électronique à transmission . . . Récemment, il a servi à la réalisation de réseaux de trous, constituant des sites de croissance préférentielle pour la fabrication de boîtes quantiques organisées, sur des surfaces de InP(001), Si(001) et GaN [12].

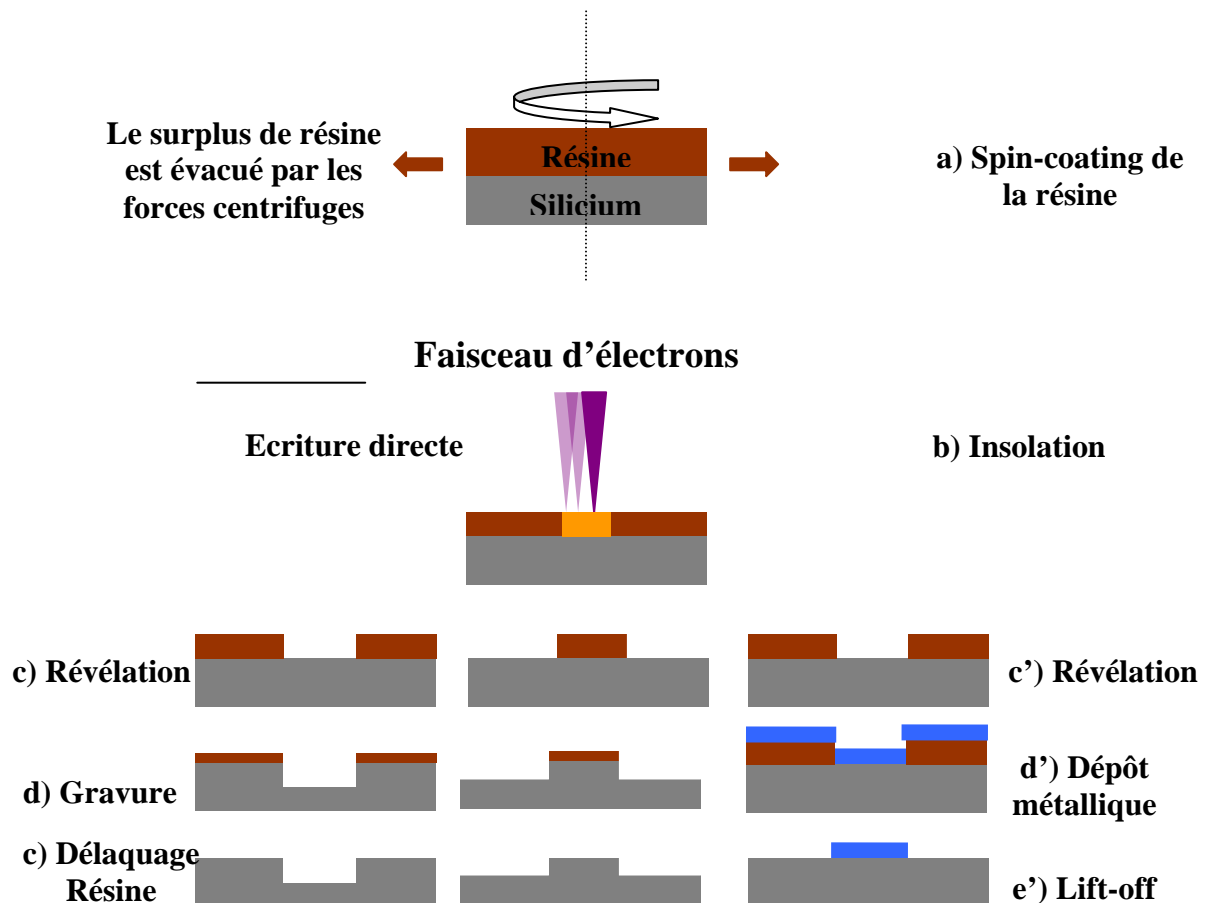
Bien que très lents, la lithographie et l'usinage par faisceau d'ions focalisé sont versatiles, flexibles et permettent une intervention localisée directe à l'échelle nanométrique. Malheureusement, les ions étant des particules lourdes, ils induisent toutefois des dommages en surface :

- amorphisation (possibilité de réduire cet effet en augmentant la température de l'échantillon pendant l'irradiation).
- implantation non contrôlée d'ions issus de la source (Ga...).
- re-dépôt d'atomes éjectés lors du bombardement ionique (possibilité de réduire cet effet soit en procédant à plusieurs passages, soit en introduisant un gaz réactif dans l'enceinte pour former des éléments volatils évacués par le pompage)

Il en résulte une perte de cristallinité et une contamination de la surface, très handicapantes pour certaines applications comme une reprise de croissance, par exemple.

### **Lithographie par faisceau d'électrons focalisé (EBL, Electron Beam Lithography)**

La lithographie par faisceau d'électrons ou lithographie électronique est la technique la plus souvent employée pour fabriquer des dispositifs nanométriques. Elle consiste à balayer par un faisceau d'électrons une résine électro-sensible (sensible aux électrons) pour y dessiner un motif (figure 6) Le dessin des motifs sur la résine est donc dans ce cas sériel et non parallèle comme en photolithographie. La résine peut être soit organique (PMMA...), soit inorganique (procédé SiDWEL : Silicide Direct Write Electron Beam Lithography...).



**Figure 6 :** Résumé des étapes de lithographie électronique. Spin-coating de la résine sur le substrat a), insolation par écriture directe sur la résine b), révélation chimique des différentes résines (positives ou négatives) c), gravure chimique et/ou physique d) nettoyage de la résine restante. La voie par lift-off comporte quelques différences : révélation chimique des différentes résines (positives ou négatives) c), dépôt métallique d) nettoyage de la résine restante.

Les appareils de lithographie sont soit des masqueurs, générateurs de faisceau gaussien, soit des microscopes électroniques à balayage ou à transmission (plus grande énergie de faisceau, 100-200 keV) munis d'un système de pilotage du faisceau. La résolution de cette technique dépend essentiellement de quatre facteurs : les réglages de la colonne (mise au point, énergie des électrons...), le diamètre de la sonde, les interactions électrons matière et le développement pour une même résine. Le premier de ces facteurs prédispose les deux suivants. La taille de sonde, qui dépend de la qualité de la source d'électrons, peut être inférieure à 1 nm dans le meilleur des cas. La diffusion des électrons (faible angle) lors de leur pénétration dans la résine et leur rétrodiffusion à grand angle par le substrat (responsable des effets de proximité) élargissent la zone de résine insolée. La résine par sa sensibilité, son contraste, ses composants et son développement va aussi déterminer le plus petit motif réalisable. Ainsi, dans la résine PMMA, des motifs avec des dimensions inférieures à 30 nm



sont couramment obtenus avec une bonne reproductibilité et des résolutions aussi petites que 3-5 nm ont été atteintes avec du PMMA. De plus petites dimensions ont été obtenues dans des résines inorganiques mais les méthodes de transfert, souvent inadaptées, dégradent la résolution et limitent leur utilisation.

La lithographie électronique est donc une technique d'une grande souplesse qui permet de réaliser des motifs de géométrie diverse avec une haute résolution. L'alignement de différents niveaux de lithographie les uns par rapport aux autres rend possible l'élaboration de dispositifs complets. En plus d'être une technique indispensable pour la fabrication des masques pour la lithographie optique (Deep-UV, Extreme-UV) ou X, la lithographie électronique, très versatile, est donc particulièrement adaptée aux besoins de la recherche et à la réalisation de prototypes.

Le balayage séquentiel (en série) pour insoler le motif entraîne une faible vitesse d'écriture qui limite son utilisation dans l'industrie. Ainsi, récemment, sont apparus des procédés de fabrication « hybrides », utilisant la lithographie optique (reproduction parallèle) pour définir la majorité du motif conjointement à la lithographie électronique pour les zones nécessitant une meilleure résolution. Les sources d'électrons sont bien plus stables et plus brillantes que les sources d'ions. De plus, l'optique électronique introduisant peu d'aberrations, la sonde électronique est bien plus fine que la sonde ionique. Cela n'est cependant pas suffisant pour obtenir des cadences de production comparables à la Photolithographie.

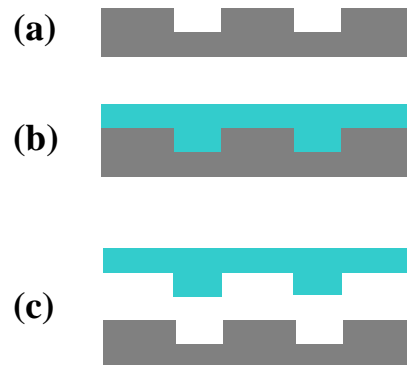
C'est pour ces raisons qu'il a été nécessaire de trouver une nouvelle voie de développement. Cela a donné lieu à la principale révolution de ces dernières années en nanofabrication. Ces nouvelles technologies, appelées lithographies douces permettant de reproduire rapidement et à faible coût les motifs précédemment fabriqués par lithographie électronique.

### **1-3-Les technologies de lithographie douce**

Le domaine des lithographies douces est vaste, mais toutes reposent sur les idées suivantes: la simplicité d'utilisation, la rapidité de réalisation, et un coût faible. De plus toutes ces technologies font appel à un concept identique.

La lithographie douce est basée sur le transfert de motifs en utilisant un moule qui déforme ou structure le matériau du substrat. La majeure partie des lithographies douces

utilise un timbre en polymère formé à partir d'un moule maître. Le timbre est l'exacte réplique des motifs du moule, il peut être employé alternativement pour déformer ou structurer un matériau.

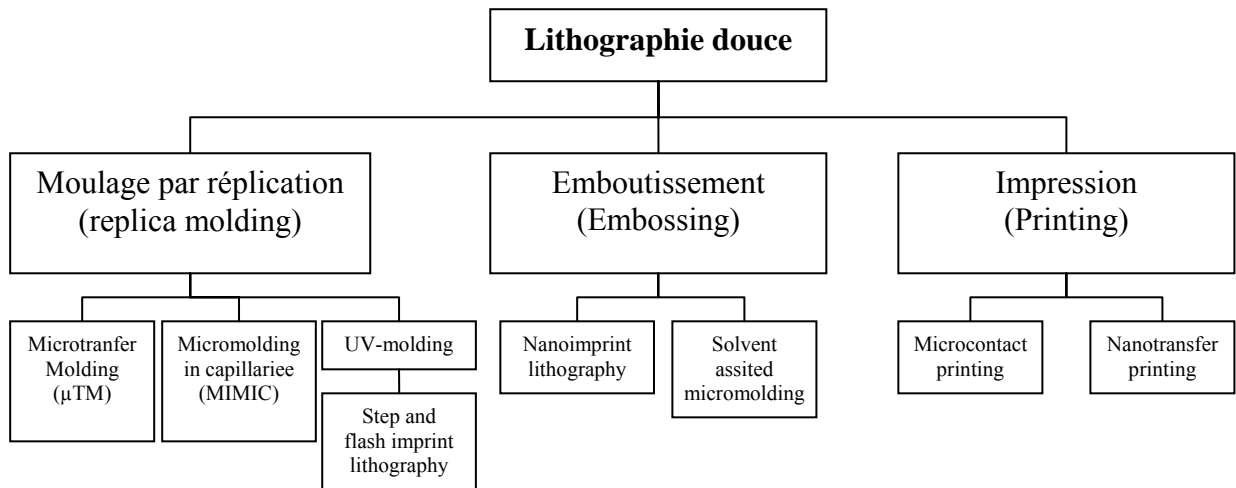


**Figure 7** : Schéma représentant les deux principaux outils de la lithographie douce.

Le processus commence par la fabrication du moule, habituellement en silicium ayant les motifs topographiques (figure 7a). Le timbre est fabriqué en moulant le précurseur liquide, habituellement un mélange de prépolymères sur le moule (figure 7b). Le timbre est alors réticulé (UV ou thermique) pour le rendre plus solide, il est ensuite démoulé (figure 7c). La fabrication du moule est habituellement réalisée par les méthodes de lithographies classiques (photolithographie, lithographie électronique...). Le moule doit avoir des parois latérales et des fonds de motifs peu rugueux. Dans la majorité des cas il est traité chimiquement pour faciliter le démoulage.

La principale force de ces technologies réside dans la possibilité de réutiliser un très grand nombre de fois un moule coûteux fabriqué par les méthodes classiques. Cela permet par exemple de compenser la faible vitesse de la lithographie électronique. De plus la très grande variété de matériaux pouvant être structurés et la possibilité de structurer des surfaces non-planaires et tridimensionnelles font de ces nouvelles technologies des acteurs incontournables des nanotechnologies aujourd'hui.

La lithographie douce inclut une grande variété de techniques. Gates et al [6] ont proposé de les répartir dans trois catégories (figure 8) : replica molding, embossing et printing, chacune d'entre elles incluant des sous-parties.



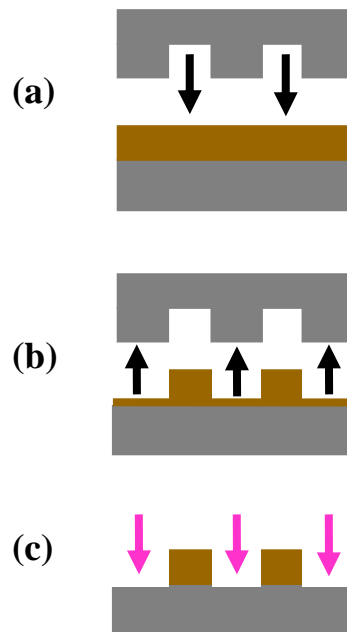
**Figure 8 :** *Catégories regroupant les technologies dites de lithographie douce.*

La nomenclature dans ce domaine n'est pas entièrement établie, et les définitions changent dans différentes références, particulièrement la différence entre embossing et molding n'est pas toujours claire. [13,14] de même que la séparation entre Microcontact printing et Nanotransfer printing. Dans un souci de simplification pour présenter les différentes techniques de lithographie, nous avons fait le choix de regrouper l'embossing et le replica molding. La première partie qui suit décrira celles-ci. En effet elles sont relativement identiques dans la philosophie de mise en œuvre. Puis nous nous attacherons à décrire plus particulièrement les technologies de printing.

### 1-3-1-Technologies d'«Embossing» et de Molding

#### La lithographie par Nano-impression

La «Nano-Imprint Lithography (NIL)» ou la «nano-impression» en français, est l'impression directe de structures nanométriques dans une couche de résine via un moule rigide. La nano-impression est une technique de lithographie douce inventée en 1995 par Stephen Chou et son équipe à l'Université du Minnesota [15]. La figure 9 décrit le principe de ce procédé.



**Figure 9 :** Schéma de principe de la nano-impression. Les étapes illustrées sont : (a) Chauffage du moule et de l'échantillon ou seulement de l'échantillon à  $T > T_g$  et contact entre le moule et l'échantillon avec application d'une pression uniforme (b) Refroidissement et séparation du moule et de l'échantillon à  $T < T_g$  (c) Gravure ionique réactive pour retirer la couche de résine résiduelle suivie d'un éventuel lift-off pour obtenir un masque métallique.

Son principe est très simple. Il consiste à déformer physiquement une couche de polymère thermoplastique par pression avec un moule rigide (son motif a été préalablement défini par l'une des techniques de lithographie conventionnelles telle que la lithographie électronique). Cette opération est effectuée à haute pression et à une température supérieure à la température de transition vitreuse  $T_g$  du polymère. Le succès de l'impression dépend des propriétés viscoélastiques du polymère et de l'adhérence du film au moule et au substrat. Après l'impression, le système est refroidi afin de permettre le démoulage.

La température de transition vitreuse est une donnée importante pour les polymères. La cohésion des polymères est due à 2 types de liaisons : les liaisons covalentes, fortes, qui forment le squelette des longues chaînes carbonées, et les liaisons secondaires (du type Van der Waals) qui relient ces chaînes moléculaires entre elles. Pour  $T < T_g$ , les liaisons secondaires relient les molécules pour former un solide amorphe. Pour  $T > T_g$ , ces liaisons commencent à "fondre", ce qui permet aux molécules de se déplacer les unes par rapport aux autres. Cette « liquéfaction » du polymère permet au moule rigide de déformer le film polymère qui va porter en négatif les motifs du moule. Un simple retour à une température inférieure à  $T_g$  permet la conservation des motifs imprimés. Ceux-ci doivent donner lieu à un contraste d'épaisseur raisonnable pour la suite du procédé de fabrication. Le transfert des motifs imprimés dans l'épaisseur totale de la couche de polymère est assuré par une étape de

gravure ionique réactive. Cette élimination de la couche résiduelle en fond de motif met à jour le substrat et conclut l'opération de lithographie. Comme le profil final dans la résine est comparable à ceux obtenus par d'autres méthodes de lithographie, la nano-impression est compatible avec les méthodes de transfert usuelles : le film de polymère peut alors servir de masque pour transférer dans un matériau les structures imprimées (gravure ou lift-off).

Comme elle utilise les propriétés thermoplastiques des polymères plutôt que leur interaction avec des rayonnements (UV, rayons X) ou des faisceaux de particules chargées (électrons, ions), la NIL permet d'atteindre une très haute résolution (absence de limite de diffraction ou de diffusion électronique dans la résine) qui dépend essentiellement de celle du moule (facteur de reproduction). On peut ainsi réaliser des structures de quelques nanomètres à plusieurs microns dans le polymère. Des résolutions inférieures à 10 nm ont été démontrées, ouvrant une nouvelle voie à de nombreuses applications très prometteuses. En plus de sa grande efficacité (procédé parallèle) et de son très faible coût d'équipement, cette technologie, jusqu'alors mise en oeuvre sur de petites surfaces (quelques cm<sup>2</sup>), peut être appliquée sur des substrats de 200 mm de diamètre [16].

Une nano-impression réalisée sur un substrat de 10 cm de diamètre démontre l'homogénéité de cette technique avec une précision de positionnement relatif inférieure à 30 nm pour une surface de 30x30 mm<sup>2</sup>. Pour ces raisons, le nano-imprint s'avère être une alternative intéressante à la lithographie électronique pour la production de nanostructures en masse, rapidement, à très bas coût.

Une fois le procédé optimisé, les principaux verrous technologiques auxquels se heurte la nano-impression sont :

- la fabrication des moules avec des motifs de très haute résolution et de haute densité sur de grandes surfaces
- l'impression de grands et petits motifs simultanément car il est difficile de déplacer de larges quantités de polymère sur une grande distance.
- l'alignement entre plusieurs niveaux de lithographie et/ou le raccord de champ avec une précision comparable à la résolution. L'alignement dépend de la taille du moule, de la stabilité thermique et mécanique du polymère durant cette étape et du choix des matériaux du moule et du substrat. Pour le moment, aucune solution technologique ne permet un alignement dans le plan x-y avec un contrôle de la position autour de 10 nm. La limite de précision d'alignement actuelle se situe autour de 250 nm. Les céramiques piezo-électriques permettent un

déplacement plus précis mais uniquement pour des petits moules : alignement estimé à 30 nm sur 50 mm. Ainsi, l'utilisation du procédé « step and stamp » (SSIL) qui consiste à juxtaposer des champs d'impression (petit moule) pour couvrir de grandes surfaces permettrait d'améliorer la précision d'alignement, au détriment du rendement.

Les temps d'impression (chauffage et refroidissement), d'alignement, de nettoyage du moule, d'enduction du moule par une couche anti-adhérente font que le rendement n'est pas encore concurrentiel avec celui de la lithographie optique. Pour qu'il le devienne, il est conseillé d'augmenter la taille du moule tout en conservant un parallélisme suffisant et une homogénéité du procédé ainsi que d'augmenter la durée de vie du moule.

### **UV imprint**

Dans ce cas, un masque hybride, constitué d'un matériau transparent aux UV, qui agit à la fois comme moule et comme masque est utilisé. Les structures en relief du moule impriment les motifs à l'échelle du nanomètre, alors que les motifs métalliques embarqués dans le moule servent de masque pour répliquer de plus grands motifs. La combinaison de la nano-impression à la lithographie optique, constitue une méthode de lithographie hybride qui apporte une solution simple, ingénieuse et intéressante.

Le procédé «step and flash» (SFIL) [17] constitue aussi une solution d'amélioration du rendement. Un moule rigide et transparent met en forme une solution de faible viscosité qui, une fois exposée au rayonnement lumineux (UV) (à travers le moule), se polymérise et conserve la forme des motifs. La transparence du moule permet ainsi :

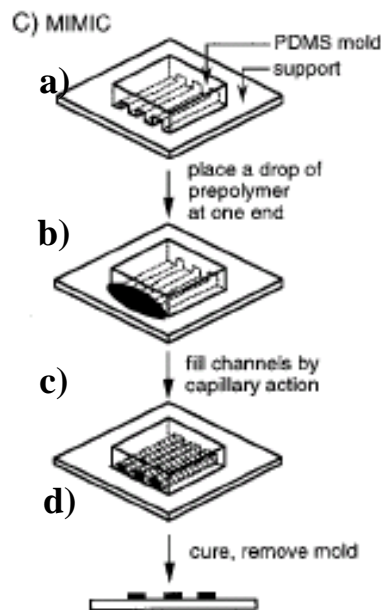
- un alignement plus rapide
- la photopolymérisation de la solution à température ambiante, évitant ainsi les montées et descentes en température.

Ce procédé améliore donc le rendement pour des résolutions de l'ordre 10-50 nm.

Mais cela ne résoud pas les problèmes de planéité des surfaces entre le moule et le substrat qui empêche l'utilisation de grand moules. Pour pallier cet handicap, une méthode d'UV imprint nommé soft UV imprint a été mise au point. La différence avec les autres technologies réside dans le moule qui n'est plus rigide mais souple pour se conformer au substrat sur de grandes surfaces. L'élastomère le plus souvent utilisé pour ces propriétés de transparence aux UV et de relative souplesse d'utilisation est basé sur un PolyDiMéthylSiloxane (PDMS).

## MIMIC

« Micromolding in capillaries (MIMIC) » [18] est une méthode de replica molding utilisant un timbre de polymère (par exemple en PDMS transparent aux UV) et les phénomènes de capillarité pour mouler un polymère réticulable (UV ou thermo réticulable). Cette technique (figure 10) peut être utilisée pour structurer une surface avec un liquide contenant des molécules biologiques.



**Figure 10 :** Principe de fonctionnement du MIMIC; a) un timbre (ou moule suivant les dénominations) souple en PDMS est déposé sur le substrat à structurer, b) une goutte de la solution du matériau structurant est déposée à l'entrée des canaux fluidique formé par le timbre. c) Les canaux se remplissent par capillarité, la réticulation est activée et le timbre est retiré lorsqu' elle a eu lieu [18].

La principale limitation de cette technique est liée aux problèmes de capillarité. En effet le choix de la solution devant rentrer dans les canaux fluidique est restreint, la solution doit être relativement fluide et avoir une affinité avec le timbre et le substrat. De plus, la taille et la forme des motifs est fortement contraintes par les besoins liés aux problèmes fluidiques.

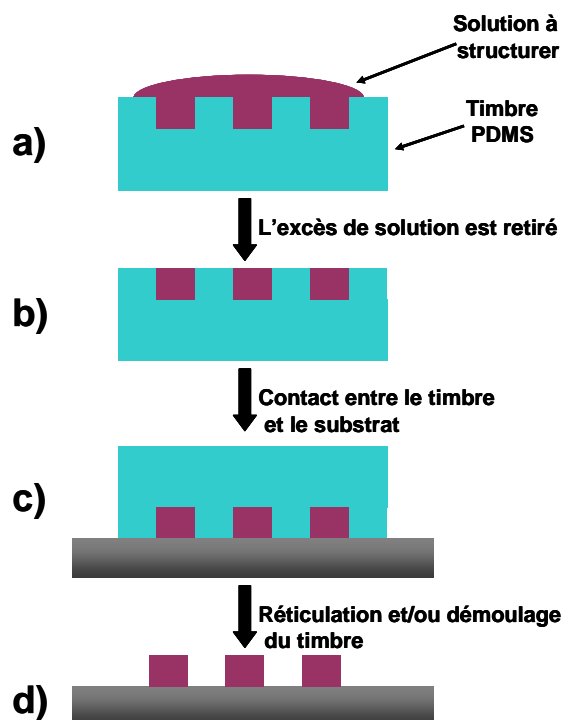
Des variantes de cette technologies existent : on peut citer par exemple le « solvant assisted micromolding » (SAMIM) [19]. Dans cette variante la goutte de solution est déposée sur la face structurée du timbre avant le dépôt de celui-ci sur le substrat. Après réticulation de la solution, on se retrouve dans un cas très similaire au NIL. Les motifs du timbre sont imprimés dans le polymère réticulé et les fonds de motifs contiennent un film résiduel. Cette

méthode permet de réduire sensiblement la viscosité de la résine. Mais le principal défaut réside dans le fait que le film de fond de motif est plus important.

### **Microtransfer molding ( $\mu$ TM)**

Le « Microtransfer molding » ( $\mu$ TM) [20], est elle aussi une méthode de replica molding. La compréhension en est toute fois plus complexe car cette technologie fait appel à la fois à des contraintes de replica molding mais aussi de contact printing. Une part substantielle des chapitres 3 et 4 de cette thèse y sera consacrée. C'est pourquoi je ne me contenterai ici que d'introduire la technologie mise en œuvre sans rentrer dans les détails des phénomènes physico-chimiques qui s'y déroulent. La figure 11 schématise les différentes étapes du  $\mu$ TM. La solution à structurer est déposée sur le timbre Fig. 11a), en général c'est un polymère thermo ou photo réticulable, mais des molécules d'intérêts biologiques tel les dendrimères peuvent être utilisées (voir chapitre 4). L'excès de solution est retiré du timbre soit par un flux d'azote qui chasse la goutte du timbre soit en « raclant » la surface du timbre à l'aide d'un timbre de PDMS plat Fig. 11b). Nous obtenons ainsi un timbre avec les motifs rempli de la solution à structurer. Le timbre est ensuite amené en contact avec le substrat Fig. 11c), la solution est réticulée si besoin et le timbre est retiré laissant la solution structurée sur le substrat Fig. 11d).

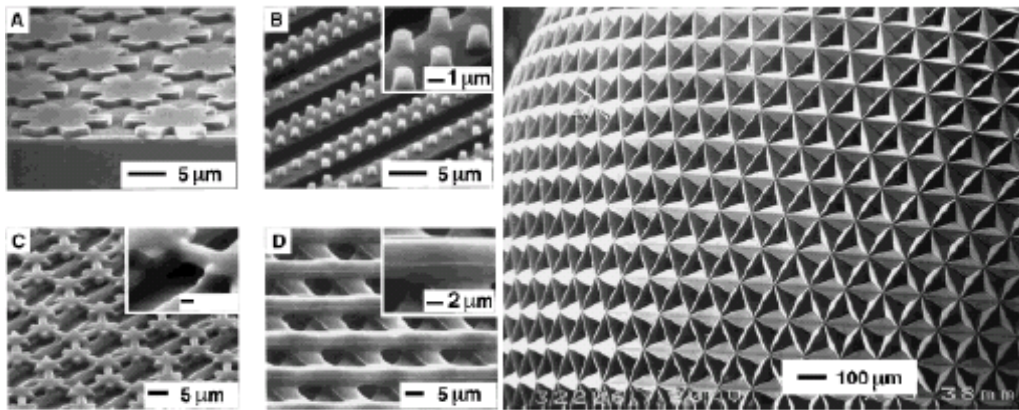




**Figure 11 :** Principe du  $\mu$ TM. a) La solution à structurer est déposée sur le timbre, b) L'excès de solution est retiré du timbre soit par un flux d'azote qui chasse la goutte du timbre soit en « raclant » la surface du timbre à l'aide d'un timbre de PDMS plat. c) Le timbre est ensuite amené en contact avec le substrat, la solution est réticulée si besoin et le timbre est retiré laissant la solution structurée sur le substrat.

Pour que cette étape ne pose pas de problème il faut dans un premier temps considérer les différentes affinités entre la solution, le timbre et le substrat. En effet la solution doit avoir une affinité relativement forte avec le timbre afin de rester dans les structures lors du retrait de l'excédent. Mais dans un même temps cette affinité doit être plus grande avec le substrat, sinon lorsque le timbre est amené en contact avec le substrat, le transfert de la solution vers le substrat n'aura pas lieu. Nous aurons l'occasion de revenir en détail sur ce phénomène dans la suite de cette thèse, cette « cascade d'affinités » étant un des points clés des méthodes de contact printing.

La force de cette technologie réside dans la possibilité de générer des structures isolées ou interconnectées en deux dimensions ou en trois dimensions (Figure 12). Elle permet de surcroît de fabriquer des structures sur des surfaces non-planaires, ce qui est essentiel pour construire un ensemble complexe en trois dimensions couche par couche (Figure 12).



**Figure 12 :** Exemple de structurations 3D par  $\mu$ TM, image MEB. A gauche :A) motifs isolés en polyuréthane (PU) sur de l'argent (1 couche); B) Microcylindres d'époxy isolés sur des lignes de 5  $\mu$ m d'époxy sur un substrat de verre (2 couches). C) Réseau continu d'époxy sur des lignes de 5  $\mu$ m d'époxy supporté par du verre (2 couches). D) Structure de 3 couches de lignes d'époxy thermo réticulable sur une lame de verre. A droite : Objet sphérique recouvert de PU microstructuré par  $\mu$ TM [21].

Les atouts de cette technologie permettent d'envisager des applications en optique, notamment pour les cristaux photoniques [22] et pour l'ingénierie tissulaire pour la médecine [23]. De plus le  $\mu$ TM peut être utilisé pour structurer de grandes surfaces, 4 pouces ou plus. Mais le type de solution pouvant être structurée se limite à des solutions polymériques. A l'heure actuelle des molécules biologiques de type ADN ou protéines n'ont pas pu être transférées par cette technologie. Ce type de molécule est habituellement déposé par des méthodes de contact printing.

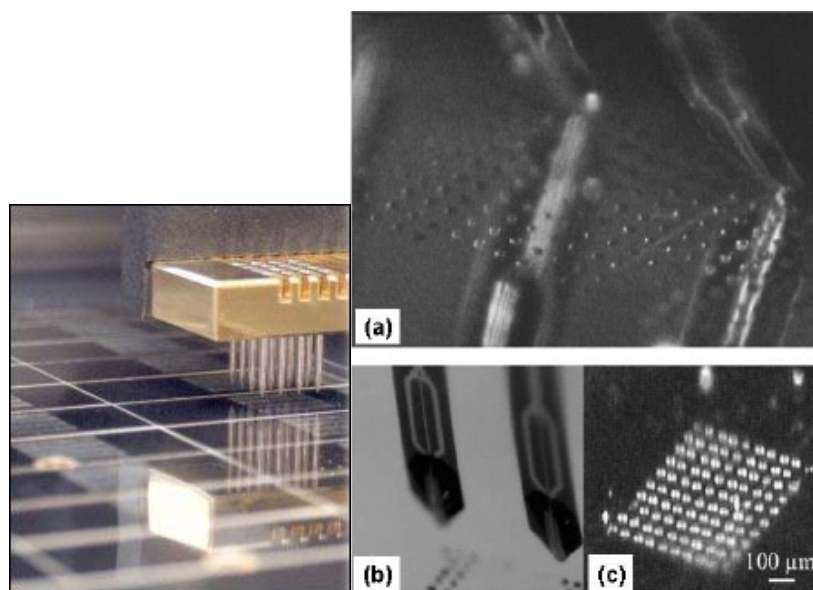
### 1-3-2-Technologies de « contact printing »

Lorsque l'on souhaite déposer des molécules biologiques, souvent fragiles, les méthodes les plus utilisées sont deux technologies de contact printing. La première utilisant un automate (spotter) constitué de fines aiguilles creuses permettant le dépôt de gouttes liquides est très largement majoritaire. La seconde, beaucoup plus récente : le Microcontact printing ( $\mu$ CP) est de plus en plus utilisé, principalement en laboratoire.

#### Spotter

Par technologie de contact printing on peut étendre le sujet bien au delà de la lithographie douce. En effet des technologies plus matures comme le spotter [24] (figure 13) permettent aussi de déposer par contact des molécules sur un substrat. Le principe en est simple, il consiste à remplir des aiguilles possédant un réservoir avec la solution à déposer. Ce

remplissage se fait généralement par capillarité ou bien par électrocapillarité [25]. Ces aiguilles sont amenées une fois remplies en contact avec le substrat créant ainsi une goutte de solution sur celui-ci, allant de quelque nL à quelques pL. La taille de cette goutte dépend grandement de la taille de l'aiguille, puis de façon moins importante du temps de contact entre l'aiguille et le substrat et bien sur de l'angle de contact entre le liquide et la surface. Des tailles de gouttes (souvent appelées spots) de quelques centaines de micromètres à quelques microns [26] peuvent être obtenues.



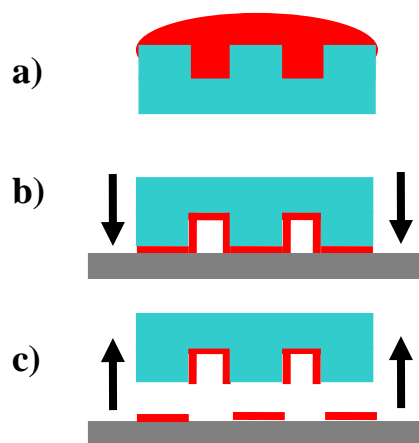
**Figure 13 :** Différents types de spotter. A gauche : spotter classique avec des aiguilles métalliques de quelques centaines de micron au niveau de la pointe permettant le dépôt de gouttes de quelques centaines de micron sur des lames de verre. A droite Spotter développé par le LAAS-CNRS: a) et b) micro leviers en silicium (500 µm de large et une pointe de quelques dizaines de microns permettant le dépôt de gouttes de quelques microns sur des lames de verre c).

### Contact printing en lithographie douce

Les technologies de contact printing existaient bien avant l'apparition de la lithographie douce, elles ne constituent que l'évolution du principe d'imprimerie de Gutenberg. En effet le principe est simple, le but est de transférer des molécules par contact entre les motifs topologiques du timbre et le substrat (figure 14). La première personne à avoir eu l'idée de transposer ce principe à l'échelle du micromètre a été G. Whitesides et al. [27] en utilisant un timbre souple en PDMS.

Pour se faire le timbre en PDMS est premièrement « encre » avec la solution à déposer. L'encre consiste dans la majorité des cas à déposer une goutte de solution sur la surface structurée du timbre, puis après un laps de temps dépendant de la solution de la retirer

et de sécher sous un flux d'azote (figure 14a)). L'encrage est une étape clé du contact printing, de l'uniformité et de la nature du dépôt de la molécule sur le timbre dépendront la qualité et la nature du dépôt final. Nous y reviendrons en détail dans le chapitre 3. Le timbre encré est ensuite amené en contact avec le substrat. Idéalement, lors de ce contact, seul le sommet des motifs topographiques du timbre entre en contact avec le substrat (figure 14b)). Les molécules adsorbées à sa surface sont donc transférées sur le substrat par contact si elles présentent une plus grande affinité avec le substrat qu'avec le timbre. Le timbre peut finalement être retiré, laissant ainsi les motifs de l'encre déposés sur le substrat (figure 14c)).



**Figure 14 :** *Principe du contact printing. a) encrage du timbre : une goutte de solution à transférer est déposée sur la face structurée du timbre. Le timbre encré est emmené en contact avec le substrat, c) les molécules encrées sur le timbre sont déposées sur le substrat.*

Le contact printing en lithographie douce ne regroupe que deux technologies le Microcontact printing ( $\mu$ CP) et le nanotransfer printing (nTP). Ces deux techniques sont en fait identiques, l'une étant utilisée lorsque l'on travaille à l'échelle micrométrique et l'autre à l'échelle nanométrique. Cette distinction est historique, en effet lors des débuts du développement du microcontact printing une partie de la communauté scientifique pensait que l'on ne pourrait jamais obtenir des motifs nanométriques avec cette méthode. Lorsque cette barrière a été franchie le terme nTP a commencé à être utilisé.

Le contact printing a été utilisé pour de nombreuses applications et ceux avec une large variété de molécules. Nous pouvons citer, les Alcane-thiols déposés sur l'or [28] principalement pour la microélectronique. L'Octadécyltrichlorosilane (OTS) utilisé comme passivant de surface [29] ou comme masque de gravure. De nombreux procédés industriels sont même déjà utilisés, notamment chez Phillips [30] et dans la fabrication d'écrans plats [31]. Des résolutions inférieures à 100 nm ont été atteintes avec de nombreuses molécules [32,33]. De plus le dépôt de grandes surface de motifs nanométriques est réalisable [34].

Mais l'utilisation la plus fréquente du  $\mu$ CP concerne la biologie. Les premiers travaux ont été réalisés par IBM sur des protéines [35], la résolution ultime à même été atteinte en déposant un réseau d'anticorps uniques [32]. La déformation du timbre à été également utilisée pour déposer ces mêmes protéines au fond d'un canal microfluidique ouvert [36]. De même les premiers travaux sur le dépôt d'ADN à l'échelle du micron commencent à apparaître [37,38]. Les travaux les plus marquants concernent l'amélioration de technologies couramment utilisées en biologie, par exemple la croissance in-situ d'oligonucleotides par  $\mu$ CP [39].

La méthodologie simple d'utilisation, sa résolution submicrométrique, la possibilité de l'utiliser sur de grandes surfaces, la possibilité de transférer des molécules biologiques en petites quantités (molécules souvent onéreuses) sans détériorer les fonctionnalités font du contact printing un outil de choix pour tout type d'applications en biologie. Les chapitres 2,3 et 4 seront consacrés essentiellement aux résultats de nos travaux dans ce domaine. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous allons nous pencher sur le domaine des biopuces en essayant de présenter les enjeux et les besoins. Nous nous restreindrons au domaine des puces à ADN sans aborder celui des puces à protéines qui constitue la poursuite logique de ce couplage entre les technologies de miniaturisation et d'intégration de la biologie moléculaire.

---

## **2-Biopuces à ADN**

### **2-1-Généralités**

#### **2-1-1-Le marché des Biopuces**

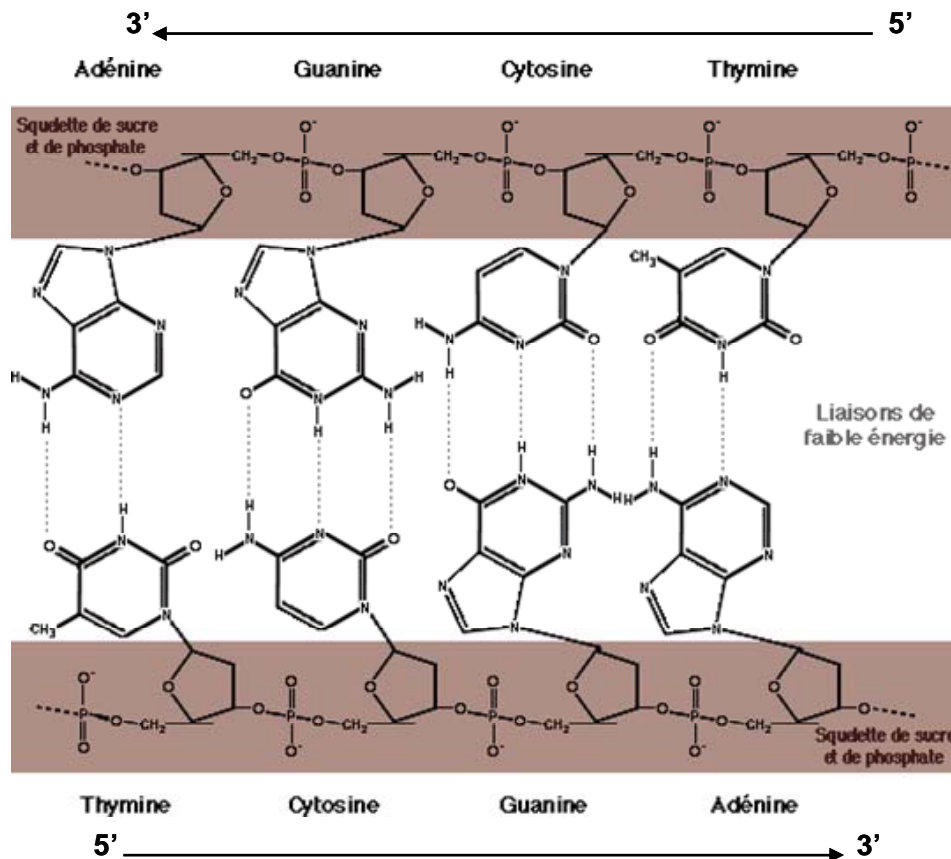
Au cours de ces dix dernières années, les puces à ADN ont envahi le marché de la recherche, bientôt celui du diagnostic, et s'imposent comme un outil incontournable dans l'ère du « post-génome ». Elles ont changé la vision des chercheurs en leur offrant la possibilité de réaliser des milliers d'analyses génétiques en parallèle, que ce soit dans le domaine du diagnostic, du génotypage, de la pharmacogénomique ou de l'analyse globale de l'expression des gènes. Il y a seulement dix ans, le séquençage des génomes semblait une tâche ambitieuse et démesurée. Aujourd'hui, le déchiffrement de ces codes est simplement une étape préliminaire : il faut désormais identifier les gènes, leur fonction, et comprendre l'organisation spatio-temporelle de l'activité des gènes et de leurs produits au niveau cellulaire. C'est pourquoi l'accès à la technologie des puces à ADN est devenu une priorité scientifique pour les centres de recherche académiques et industriels. Il est également une priorité économique puisque le marché mondial des biopuces en 2000 était de 550 millions de dollars, et avec une croissance de 15 % par an, il a dépassé les 2 milliards de dollars en 2005 [40]. Les principaux acteurs actuellement présents sur le marché sont américains (Agilent, Affymetrix, Illumina...).

Les applications de tels outils sont très variées : de la recherche fondamentale jusqu'à la médecine légale (empreinte ADN) et aux applications militaires (détection de menaces bactériologiques), en passant par la découverte de nouveaux médicaments et de nouvelles cibles thérapeutiques, le diagnostic des mutations et polymorphismes de gènes responsables d'une maladie génétique, le contrôle environnemental et agroalimentaire. Les publications les plus récentes parlent de l'identification et de la détection de mutations dans des gènes impliqués dans certains cancers [41] et proposent que les puces à ADN puissent guider le médecin dans le choix de la thérapie la mieux adaptée à son patient. Dans les applications environnementales [42], l'analyse par puce à ADN vise à détecter rapidement et à quantifier une grande variété de micro-organismes pathogènes.

### **2-1-1-ADN et hybridation**

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule que l'on retrouve dans tous les organismes vivants. L'ADN est présent dans le noyau des cellules eucaryotes, dans le cytoplasme des cellules procaryotes, dans la matrice des mitochondries ainsi que dans les chloroplastes. Certains virus possèdent également de l'ADN encapsulé dans leur capsid. On dit que l'ADN est le support de l'hérédité car il constitue le génome des êtres vivants et se transmet en totalité ou en partie lors des processus de reproduction. Il est à la base de la synthèse des protéines.

L'ADN possède une structure en forme de double hélice (découverte en 1953 par James Dewey Watson, Francis Crick et coll.). L'ADN est un polynucléotide ou polymère de nucléotides. Chaque nucléotide est constitué d'un groupement phosphate lié au désoxyribose, un sucre, lui-même lié à une base azotée. Ces bases sont au nombre de quatre : la thymine (T) et la cytosine (C) sont de la famille des pyrimidines, l'adénine (A) et la guanine (G) sont de la famille des purines. Un « brin » d'ADN est formé par la répétition ordonnée de ces nucléotides, le nom d'oligonucléotide lui est fréquemment donné lorsque le nombre de nucléotides le constituant est inférieur à la centaine. Les bases azotées sont complémentaires deux à deux : l'adénine s'associe avec la thymine et la guanine avec la cytosine. Le second brin d'ADN est donc complémentaire au premier et les bases azotées complémentaires sont reliées entre elles grâce à des liaisons hydrogène (figure 15), cette étape de reconnaissance des deux brins d'ADN porte le nom d'hybridation.



**Figure 15 :** Structure d'une chaîne oligonucléotidique.

Par convention, une chaîne oligonucléotidique s'écrit à partir de l'extrémité 5', associée à la fonction phosphate du nucléotide, vers l'extrémité 3', associée à la fonction alcool du nucléotide. Cette succession de nucléotides correspond à une structure primaire simple brin, les deux brins complémentaires étant antiparallèles, ce qui signifie que pour un brin observé dans le sens 3' vers 5', le complémentaire est orienté de 5' vers 3'. La structure ainsi reformée est alors dite double brin hélicoïdale. Sa longueur est donnée fréquemment en nombre de base ou mère (mer en anglais) ou paire de bases.

L'ADN contient l'information génétique, codée par la succession des bases azotées (A, T, C, G), elle est nécessaire à la production de protéines. Les possibilités offertes par l'agencement des quatre bases de l'ADN sont donc immenses et permettent de coder les 20 acides aminés constitutifs des protéines.

Les être vivants disposent ainsi d'un système informatif à une dimension, qui peut être facilement copié ou dupliqué. De cette séquence linéaire découle celle des protéines, qui adoptent spontanément la structure à trois dimensions nécessaire à leur fonction. Ce « gain d'information » est dû au repliement des protéines au fur et à mesure de leur synthèse, en



fonction des contraintes thermodynamiques imposées par leur séquence et par le milieu dans lequel elles sont synthétisées.

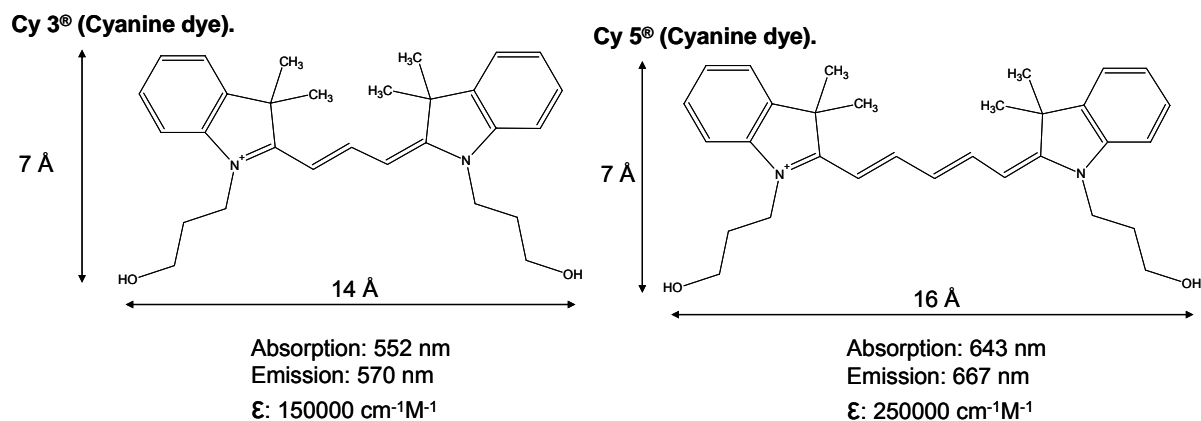
La connaissance théorique sur l'ADN associée à un besoin en recherche d'un outil plus performant que ceux déjà existants ont conduit à la naissance du concept des Biopuces au début des années 1990.

### **2-1-2-Systèmes de détection par fluorescence**

La fluorescence est la technique la plus utilisée en biologie pour détecter une cible (qui est marquée par un fluorophore) après hybridation. En effet elle s'est substituée, peu à peu, à la méthode par marquage radioactif. Contrairement à ce dernier, la détection indirecte par marquage fluorescent ne permet pas de déterminer le taux absolu d'hybridation sur une biopuce. Ce n'est donc pas une méthode quantitative mais comparative. Une quantification relative du taux d'hybridation est rendue possible par l'utilisation de deux fluorochromes (double marquage).

Dans le cas de la lecture directe par fluorescence sur le support, l'orientation du fluorophore sur la surface dépend fortement de celui-ci et de son environnement. La conformation des fluorophores change en fonction du milieu, pouvant influencer l'émission de la fluorescence (nous verrons dans le chapitre 4 l'influence de la méthode de dépôt sur la conformation et donc la fluorescence). La concentration de surface n'est en général pas bien maîtrisée, ne facilitant pas la quantification (même remarque que ci-dessus). De plus, la nature du support utilisé influence l'émission de fluorescence ainsi que le bruit de fond. Drexhage a mis en évidence qu'il existe une forte interaction en champ proche entre le fluorophore et le substrat [43]. Cette interaction a notamment pour effet la perte dans le substrat de la majeure partie de l'énergie émise par le fluorophore.

Les fluorophores utilisés classiquement sont de la famille des carbocyanines, nous utiliserons plus particulièrement par la suite Cy3 et Cy5 (figure 16). Ce sont des petites molécules possédant une bonne solubilité aqueuse, insensibles aux changements de pH entre 3 et 10. Ils sont photo-stables avec un coefficient d'excitation molaire élevé et un bon rendement quantique. Le marquage par ces fluorophores s'effectue via des groupements chimiques (amine, thiols...) de façon covalente et spécifique.



**Figure 16 :** Structure moléculaire de fluorophore de type Cy3 (vert) et Cy5 (rouge).

Parallèlement au développement des puces à ADN, des systèmes de lecture de l'hybridation ont fait leur apparition. Deux principaux systèmes de détection permettent d'acquérir les signaux :

- Les scanners : utilisent un laser pour exciter les pixels un à un et sont couplés à des détecteurs à tubes photomultiplicateur.
- Les CCD (Charge Coupled Device) : associés à une source lumineuse pour assurer l'excitation.

Contrairement aux scanners qui permettent une détection plus sensible, il est plus difficile d'atteindre une séparation effective de la lumière d'excitation et d'émission avec les systèmes CCD.

Après la lecture des puces, reste la phase d'analyse des images obtenues pour en extraire une information sur le différentiel d'hybridation de chaque spot. L'analyse des puces à ADN, produit d'énormes quantités de données, qui tendent à croître exponentiellement. La bioinformatique fournit aux chercheurs les outils informatiques nécessaires pour traiter, organiser, analyser et présenter ces données. Trois étapes sont à distinguer dans l'analyse des images :

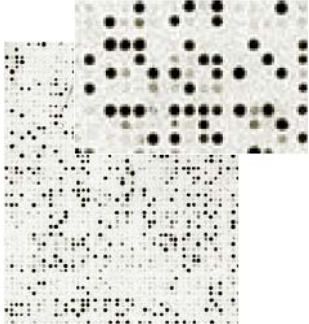
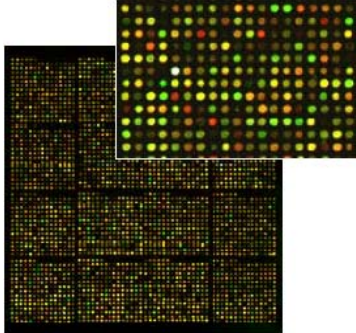
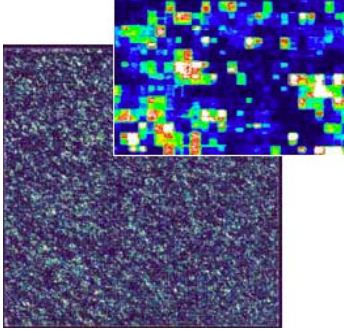
- Localisation des spots.
- Segmentations des spots pour permettre la discrimination entre le pixel signal et les pixels bruit de fond.
- Extraction des intensités du signal de fluorescence pour chaque spot.

## 2-2-Microarrays

### 2-2-1-La problématique et les solutions existantes

Une puce à ADN, aujourd'hui communément appelée « DNA microarray » en anglais (de « array » = réseau ordonné), est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Son fonctionnement repose sur le même principe que des technologies telles que le Southern blot ou le northern blot, qui sont couramment utilisées pour détecter et quantifier la présence d'une séquence nucléique spécifique au sein d'un échantillon biologique complexe, par hybridation à une sonde de séquence complémentaire portant un marquage radioactif ou fluorescent [44]. La confection des puces à ADN a permis d'étendre ce principe à la détection simultanée de milliers de séquences en parallèle. Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « spots » (de l'anglais spot=tache), chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à des sondes de séquences données. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience par traitement statistique.

D'abord conçues sur des membranes poreuses de nylon (appelées parfois « macroarrays » par opposition aux « microarrays »), les puces à ADN ont été progressivement mises au point sur lames de verre à la fin des années 90. La miniaturisation, rendue possible par l'utilisation d'un support solide, de marqueurs fluorescents et par les progrès de la robotique, permet aujourd'hui de fabriquer des puces comportant une très haute densité de spots, susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme sur une simple lame de microscope. On distingue plusieurs types de puces selon la densité des spots, le mode de fabrication, la nature des fragments fixés à la surface et les méthodes d'hybridation. Les caractéristiques des puces les plus courantes sont résumées dans le Tableau 2.

« Macroarray »	« Microarray spottée »	« Puces in-situ »
		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- support : membrane de nylon</li> <li>- taille des spots : 0,5-1mm</li> <li>- densité : quelques centaines de spots/cm<sup>2</sup></li> <li>- sondes : produits de PCR</li> <li>- cibles : ADNc avec marquage radioactif au <sup>32</sup>P</li> <li>- principales applications : analyse de l'expression des gènes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- support : lame de verre à revêtement chimique</li> <li>- taille des spots : ~100µm</li> <li>- densité : 1000-10000 spots/cm<sup>2</sup></li> <li>- sondes : produits de PCR ou oligonucléotides longs (30-70mers)</li> <li>- cibles : ADNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent au Cy3 et Cy5</li> <li>- principales applications : analyse de l'expression, ChIP-on-Chip (chromatin immunoprecipitation-on-chip), CGH-array</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- support : lame de verre à revêtement chimique</li> <li>- taille des spots : ~20µm</li> <li>- densité : 300000 spots/cm<sup>2</sup></li> <li>- sondes : oligonucléotides courts (20-25 mers) synthétisés in situ</li> <li>- cibles : ARNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent à la biotine-streptavidine</li> <li>- principales applications : analyse de l'expression, détection de marqueurs moléculaires</li> </ul>

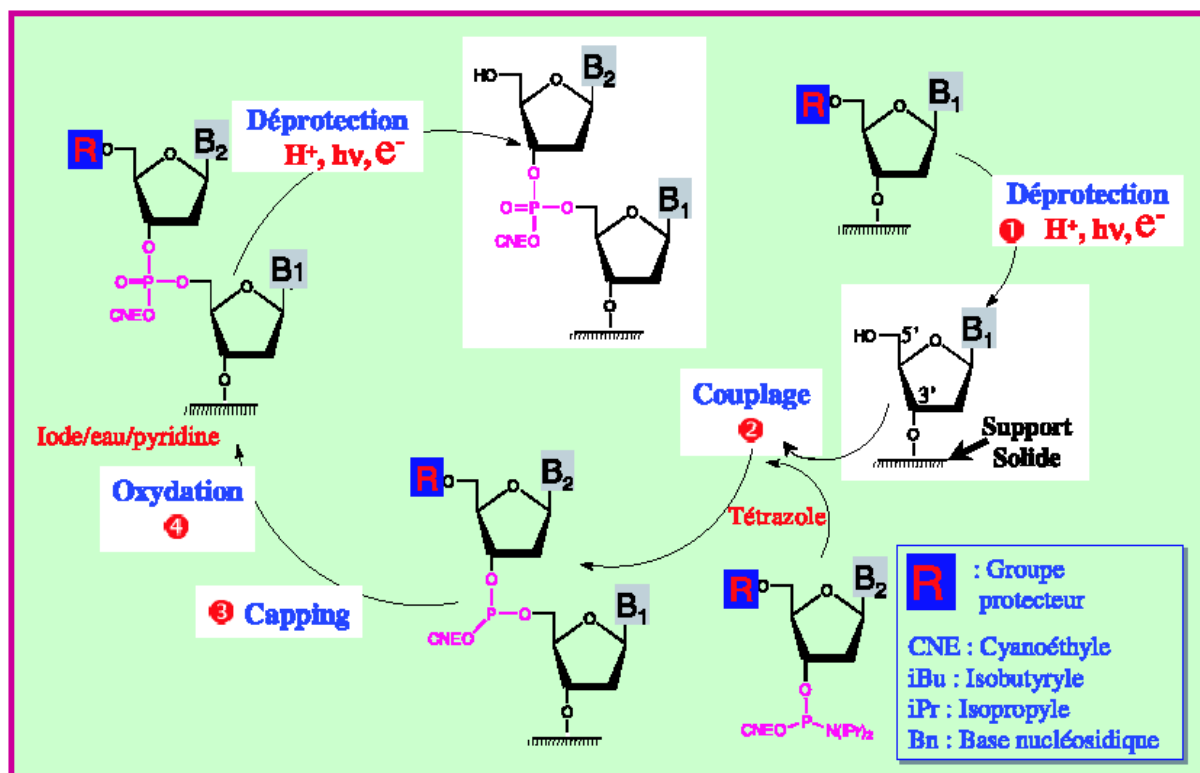
**Tableau 2 :** Les trois grandes familles de puce à AND. Inspiré du rapport de thèse de doctorat de Waka Line à l'Institut Curie 2004.

Les deux technologies dominantes sont les puces dites « spottées » par un dépôt robotisé de produits de PCR (Polymerase Chain Reaction) ou de longs fragments oligonucléiques (« spotted microarrays ») et les puces à oligonucléotides synthétisés in situ.

### **2-2-2-« Microarray » obtenus par dépôt robotisé de gouttes**

La méthode de fabrication des puces « spottées » a été développée par l'équipe de P. Brown à l'Université de Stanford, aux Etats-Unis [45]. Elle est aujourd'hui bien établie et de nombreuses plateformes de production sont implantées dans les laboratoires académiques. Des solutions d'ADN sont préparées soit par amplification PCR à partir du génome ou de banques d'ADN complémentaires, soit par synthèse d'oligonucléotides longs (30-70 mers). Des micro-gouttelettes de ces solutions (appelées sondes) sont ensuite déposées par un robot (spotter), selon une matrice d'emplacements définis, sur une lame de verre traitée par un revêtement chimique qui permet de fixer l'ADN de manière robuste. En général, chaque spot de la matrice correspond à un gène donné. L'étape suivante appelée hybridation consiste par divers protocoles à hybrider les sondes avec des ADN cibles marqués en fluorescence. Les robots nécessaires à la fabrication de ces puces étaient construits à l'origine de manière artisanale dans chaque laboratoire selon le modèle conçu par J. De Risi et dont les plans de montage et le logiciel de pilotage sont disponibles sur internet. Aujourd'hui, il existe plusieurs modèles commerciaux permettant d'obtenir des rendements de quelques dizaines à plusieurs centaines de lames en une seule série de production de quelques heures.

Lorsque la cible ADN est connue, comme les variations génétiques de l'ADN codant les différentes mutations répertoriées d'une protéine ou les différents types génétiques d'un virus, le nombre de plots correspondant aux différentes natures des sondes à immobiliser va de quelques dizaines à quelques centaines. Il s'agit là de puces dites de faible et moyenne densité (ou complexité). Il devient alors réalisable de présynthétiser (figure 17) des sondes purifiées, de composition parfaitement connue (jusqu'à une centaine de bases) et de stocker et manipuler les solutions correspondantes.



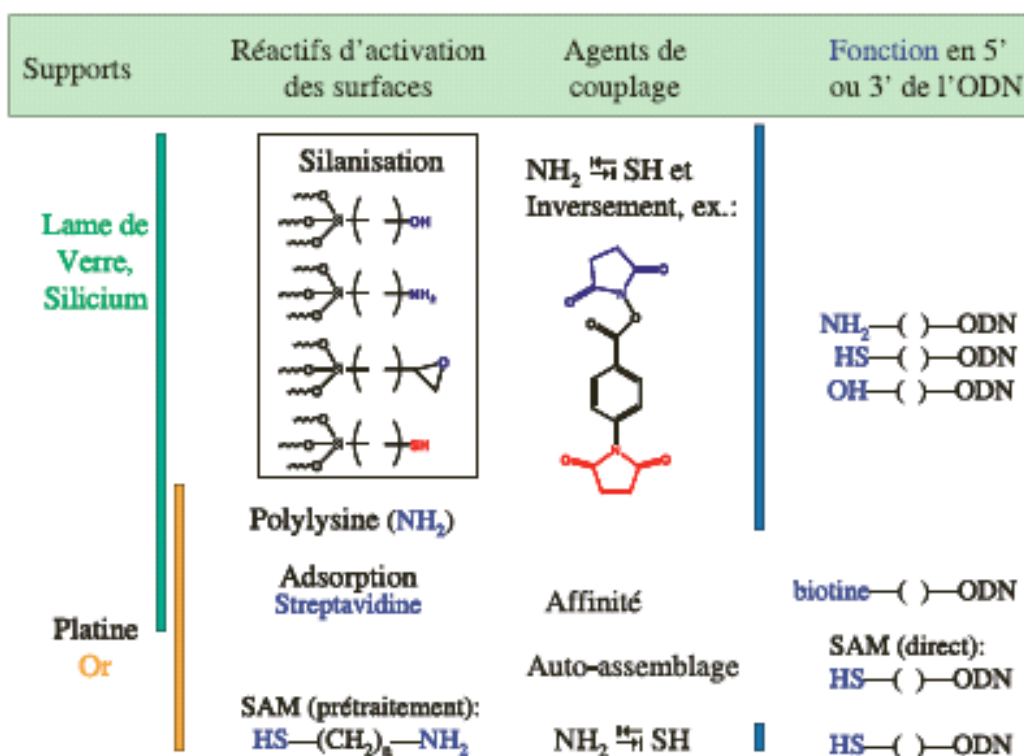
**Figure 17 :** Synthèse conventionnelle phosphoramidite de l'ADN. Les synthétiseurs automatiques de séquence d'ADN mettent en œuvre une synthèse conventionnelle dite « phosphoramidite » en 6 étapes : mis à part la fixation sur support de la première base puis après synthèse, la libération à l'ammoniaque qui fournit la séquence libre, 4 étapes sont répétitives : 1) la déprotection qui active le OH en 5' de la base  $n$  ( $B_1$ ), celle-ci consiste en l'élimination acide du DMTr ( $R =$  diméthoxytrityle) ; l'approche photochimique utilise un groupe photolabile ( $R =$  MeNPoc (( $\alpha$ -méthyl-2-nitropipéronyl)-oxy)carbonyle), l'approche électrochimique utilise un groupe électrolabile ( $R =$   $p$ -nitrobenzoyle) par réduction. Les étapes suivantes sont inchangées : 2) couplage par addition du phosphoramidite activé en 3' de la base  $n+1$  ( $B_2$ ) avec l'hydroxyle en 5' de la base  $n$ , 3) « capping », non détaillé ici, élimine les réactifs n'ayant pas réagi, 4) oxydation du phosphore trivalent instable en son homologue pentavalent avant d'entreprendre le cycle suivant [46].

Les technologies classiques de dépôts (ou « spotting ») impliquent de positionner une aiguille (ou un stylet) au contact avec une surface ou de projeter une gouttelette à partir d'une microbusse (Inkjet) [47]. Les volumes de liquide délivrés vont de la dizaine de pL à quelques nL. Les procédés peuvent être mécaniques (TeleChem, Genemachines, Genetic Microsystems, Genomic solutions, BioRobotics...) ou piézoélectriques (GeSiM, Packard...). De nombreux robots sont disponibles sur le marché.

Pour les Biopuces en général une donnée très importante intervient : la chimie de surface. Elle intervient à trois niveaux :

- La structuration du support : en plus d'une structuration volumique possible en microcuvettes, des motifs hydrophiles ou hydrophobes peuvent être utilisés pour contenir les gouttelettes par la tension de surface afin qu'elles ne s'étendent pas.
- L'activation du support : celui-ci souvent inerte (la lame de verre étant la plus utilisée) est modifié en surface par des groupements fonctionnels capables de réagir avec les fonctions introduites à l'extrémité 5' (ou 3') de l'ADN durant la synthèse ou la PCR.
- La fonctionnalisation de l'ADN pour un greffage direct ou un couplage sur le support préfonctionné.

La littérature propose des centaines de combinaisons possibles entre les supports, leur activation et la chimie de couplage avec l'ADN sonde. La figure 18 présente les stratégies les plus communément mises en œuvre pour l'immobilisation de sondes présynthétisées.



**Figure 18 :** Stratégies les plus développées pour l'immobilisation d'une sonde ADN présynthétisée sur un support. On peut distinguer 3 étapes clés : (i) l'activation du support qui apportera en surface des groupements réactifs thiol, amino, carboxyle ou hydroxyle ; (ii) la fonctionnalisation de l'ODN (ou Oligonucleotide : petit brin d'ADN de taille inférieure à la centaine de bases) sonde bien souvent par ces mêmes fonctions ; (iii) le couplage des fonctions de surface avec celles portées par les ODN sondes. Ces réactions de couplage se font en conditions très douces mises au point depuis longtemps par les biochimistes pour coupler les fonctions thiol, amino, carboxyle ou hydroxyle entre elles [46].

Les groupements d'accroche sur lame de verre ou silicium préalablement oxydé sont des silanes. Cette silanisation modifie la surface du support et apporte les fonctions réactives amine, thiol, carboxyle ou hydroxyle. On retrouve ces mêmes fonctions greffées sur le phosphate terminal en 5' de la sonde ADN à accrocher. L'agent de couplage relie une fonction amine ou hydroxyle avec un thiol et inversement, il est constitué d'un bras portant à une extrémité une fonction réagissant avec un thiol et à l'autre extrémité un ester activé ou un époxyde réagissant avec le groupement amine. La figure 18 donne un exemple d'un tel agent de couplage. Le dépôt de polylysine est une méthode aisée de fonctionnalisation de lame de verre par des groupements  $\text{NH}_2$ . La streptavidine est une protéine qui s'adsorbe spontanément sur beaucoup de surfaces (verre, métaux...). La très forte reconnaissance streptavidine/ biotine ( $K_a \approx 10^{15}\text{M}^{-1}$ ) permet d'accrocher une sonde ADN comportant une biotine. L'interaction or/thiol est exploitée pour faire directement l'accrochage d'un ADN-thiol. Cependant, afin de mieux contrôler l'accessibilité de la sonde pour l'hybridation, on procède souvent à l'élaboration d'une monocouche auto-assemblée (SAM) intermédiaire. Des motifs de zone active peuvent être dessinés sur cette SAM par photolithographie.

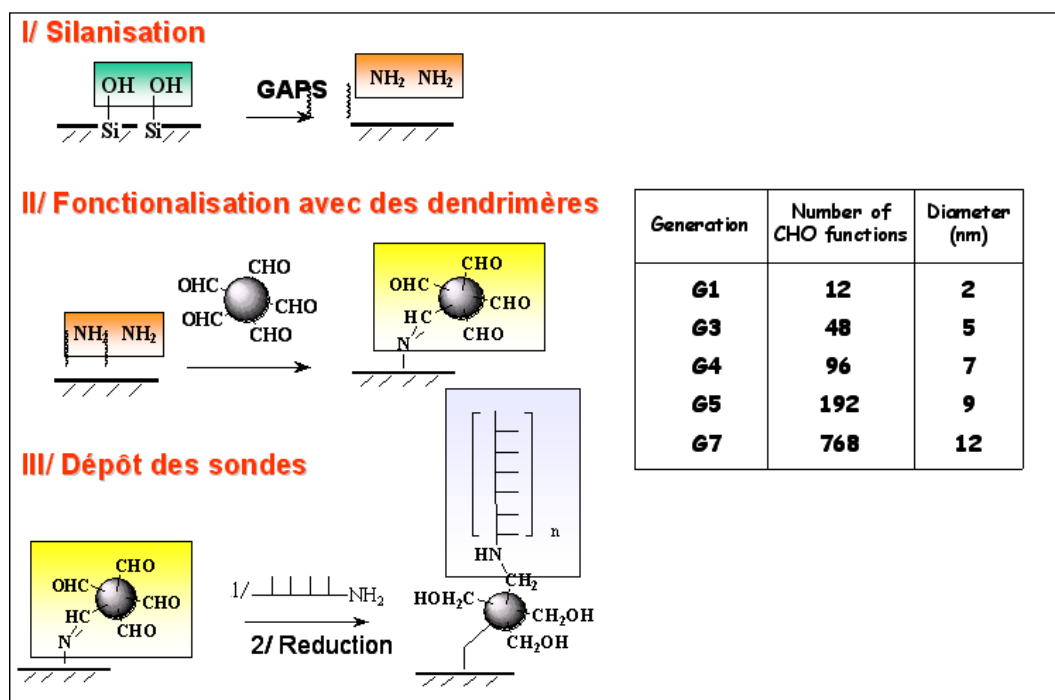
La chimie de surface est une étape clé. Elle permet en plus de fixer les sondes d'ADN sur la surface de la puce, de limiter les problèmes de séchage des gouttes (qui rendent difficile la lecture de la puce) ainsi que les interactions non spécifiques ayant lieu lors des rinçages et des hybridations (augmentation du bruit de fond). Les interactions non spécifiques sont dues à la redéposition des ADN sondes ou cibles sur la puce, lors des rinçages. Cela entraîne un bruit de fond qui peut être important lors de la lecture de la puce. De plus, l'insuffisance des points d'attache des molécules d'ADN sur une puce plane est souvent la cause de faibles intensités des signaux, et par conséquent, d'une sensibilité limitée. C'est pourquoi, pour augmenter la sensibilité, l'immobilisation peut être réalisée grâce à un système d'accroche qui fournit un large nombre de sites de greffage réactifs, une bonne accessibilité envers les cibles et dont l'affinité envers les cibles doit être la plus faible possible, pour ne pas augmenter le bruit de fond, lié à des absorptions non spécifiques.

Différentes stratégies ont été envisagées. Une première classe de solutions consiste à augmenter la « rugosité » de la surface en utilisant des supports poreux ou des micros ou nanostructures non planaire pour augmenter la surface disponible pour l'accrochage des biomolécules. Mais cela demande de nombreuses étapes technologiques souvent coûteuses.

La deuxième solution consiste à fixer sur la surface des molécules de types dendrimériques par réaction chimique directe. Un des exemples est le système développé par



Le Berre et al. [48]. Il est basé sur la formation de « sphères réactives » greffées de manière covalente sur une lame de verre suivi de la fixation elle aussi covalente des sondes ADN modifié  $\text{NH}_2$ . Les sphères réactives sont des dendrimères phosphorés, neutres, de génération 4 contenant chacune 96 fonctions aldéhydes en surface. La puce ainsi produite est appelée « Dendrilame » représentée figure 19.



**Figure 19 :** Principe de fonctionnalisation d'une Dendrilame. I) Silanisation de la lame de verre avec un silane amine. II) Deuxième étape de fonctionnalisation, greffage des dendrimères aldéhydes. III) Dépôt des sondes aminées (spotter), puis réduction chimique de la lame pour empêcher les autres sites d'accroches de réagir pendant les étapes d'hybridations.

Les résultats des études d'hybridation indiquent que la méthode de préparation permet d'avoir une surface homogène avec une forte capacité d'immobilisation en moyenne deux fois supérieure aux surfaces commercialisées pour des oligonucleotides aminés. La détection est effectuée par fluorescence et permet de détecter des concentrations pouvant descendre jusqu'à 10pM.

Les Microarrays spottés font preuve d'une grande simplicité de mise en œuvre et d'utilisation, ces puces sont peut coûteuses et très flexibles dans leur utilisation. De plus, elles ne sont pas limitées par la taille de l'ADN sonde déposé. La principale limitation réside dans le faible nombre de spots possibles, leur temps de fabrication relativement long (plusieurs

heures pour 1000 spots) ainsi que le contrôle de l'environnement pour obtenir un séchage homogène des gouttes sur la puce. Les méthodes in-situ que nous allons décrire maintenant tentent de répondre à ces problématiques.

### **2-2-3-Puce in-situ**

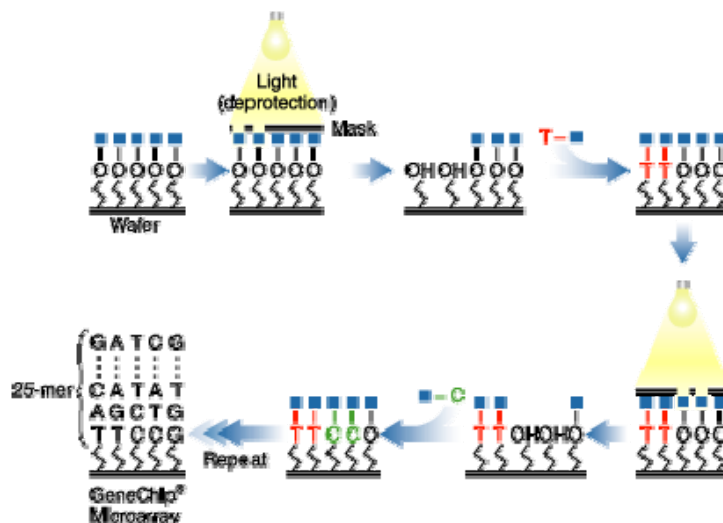
Les puces à oligonucléotides synthétisés in situ par photolithographie [49] (« GeneChips » de la société Affymetrix) ou par impression « jet d'encre » [50] (Agilent Technologies) ne peuvent être produites que par des sociétés industrielles spécialisées. Elles sont de plus en plus utilisées et elles bénéficient désormais d'une importante diversification, d'une certaine baisse des prix et d'un contrôle de qualité accru. Une contrainte souvent posée par l'utilisation de ces puces est qu'elles nécessitent en général l'emploi de méthodes et d'équipements imposés par le fournisseur (type de lecteurs, de logiciels d'analyse...) et que les licences de propriété industrielle ne permettent pas l'accès à certaines informations (telles que la séquence des sondes présentes sur la puce). La dépendance vis-à-vis de ces sociétés commerciales reste ainsi très forte. Il a été également reproché un certain manque de souplesse car les contraintes de production ne permettaient pas de fabriquer en quantité réduite des puces spécifiques à des besoins particuliers. D'importants progrès semblent avoir été accomplis à ce niveau face à l'accroissement de la demande (fabrication de puces à façon, diversification et adaptation des types de puces proposés à de nouvelles applications et de nouveaux organismes...).

Quel que soit le type de puces, le succès de la technologie a entraîné, depuis le début des années 2000, un élargissement considérable du choix des équipements et des protocoles expérimentaux, aussi bien pour la fabrication des lames que pour l'amélioration des conditions de manipulation en vue d'optimiser la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité de la méthode ([51] pour revue). Les études exploitant l'utilisation des puces à ADN se multiplient rapidement dans des domaines d'application variés. Désormais, l'accent est mis prioritairement sur le besoin de rationaliser la gestion des expériences et de développer des systèmes de stockage et d'analyse de la masse de données générée.

Nous avons décidé pour des raisons de simplification de nous focaliser seulement sur un panel restreint mais représentatif du paysage des Biopuces : Affimetryx, Nimbelgene, Agilent et Illumina, puis une nouvelle méthode utilisant la lithographie douce.

## Affimetryx

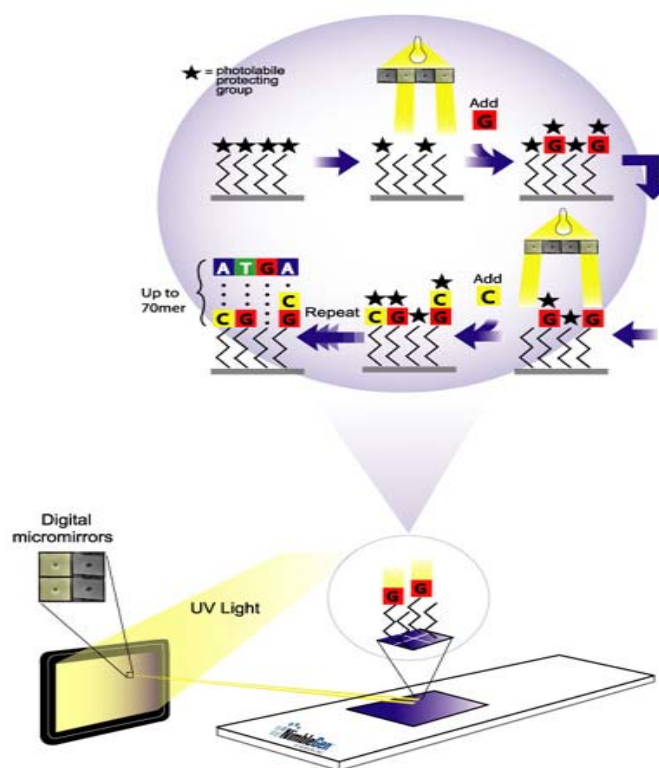
Affimetryx, leader dans ce domaine, développe principalement des puces à haute complexité et vient d'annoncer la mise sur le marché de son produit Customsed™ capable de séquencer rapidement les différents isolats du virus SARS qui comprend environ 30 000 paires de bases. Ce créneau du reséquençage ou du séquençage de cibles inconnues nécessite des « arrays » (matrices) de hautes complexités et densités. Affimetryx a donc opté pour la synthèse « on chip ». Les quatre bases constitutives de l'ADN sont déposées successivement dans l'ordre qui caractérise la sonde sur le support de verre. Cette opération est réalisée par un procédé de photo-déprotection localisée grâce à un jeu de masques (figure 20). Cette étape de photo-déprotection remplace l'étape classique de détritylation en milieu acide dans le cycle conventionnel de la synthèse phosphoramidite des synthétiseurs d'ADN (Figure 17). Le rendement moyen d'un cycle de synthèse avec le premier groupe photolabile utilisé, MeNPoc, était de 91-98 % ( $\lambda = 365$  nm), ce qui limitait fortement la pureté des sondes et leur longueur (une vingtaine de bases). Il a été récemment montré que le groupe NPPoc permet des synthèses photochimiques sur « arrays » avec des rendements proches de 100% [52]. Cette technique nécessite cependant une technologie coûteuse (environ 80 masques pour une sonde de 20-mère), mais le nombre de plots annoncé peut aller jusqu'à 500 000, et le nombre de solutions à manipuler est réduit aux quatre bases et aux rinçages nécessaires.



**Figure 20 :** Les sondes sont synthétisées *in situ* par photolithographie. Au départ, tous les sites sont protégés par un groupement photosensible. L'illumination au travers d'un masque déprotège des plots spécifiques. On peut alors procéder au greffage d'une première base protégée. Le procédé est réitéré avec les bases jusqu'à la synthèse complète des ADN sondes.

## Nimbelgene

Il est le principal concurrent sur le même créneau qu’Affymetrix. La méthode de fabrication de la puce est la même : la photolithographie. L’originalité développée par Nimbelgene (figure 21) consiste à n’utiliser aucun masque de photolithographie, réduisant ainsi les problèmes de changement de masques d’alignement entre les différentes expositions et le grand nombre de masques nécessaires. C’est un miroir digital (matrice de micromiroirs adressables) ou chaque pixel peut être transparent ou réfléchissant pour les UV selon les besoins qui permet l’inscription des motifs.

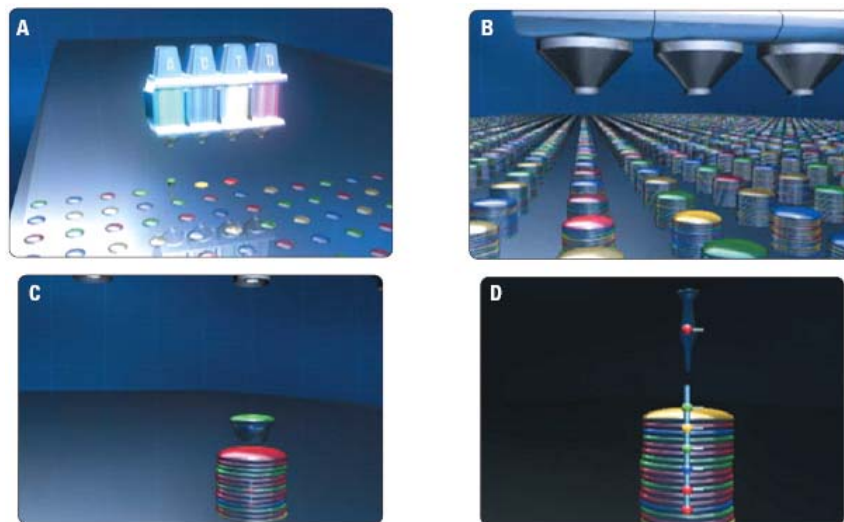


**Figure 21 :** Les sondes sont synthétisées in situ par photolithographie. Au départ, tous les sites sont protégés par un groupement photosensible. L’illumination au travers d’un masque déprotège des plots spécifiques. Dans ce cas l’intelligence du système réside dans le masque qui est un miroir digital. On peut alors procéder au greffage d’une première base protégée. Le procédé est réitéré avec les bases jusqu’à la synthèse complète des ADN sondes.

Les puces produites par cette méthode ont une densité maximum sensiblement identique à Affymetrix, avec un nombre de bases plus grand que cette dernière (jusqu’à 80-mère), un coût moins important. Mais les spots sont de qualité moindre à cause de problèmes de résolution sur les bords de motifs.

## Agilent

Des solutions alternatives ont été proposées pour réduire les coûts et augmenter la flexibilité de production. Par exemple, Agilent utilise une technologie jet d'encre pour délivrer successivement les quatre précurseurs des bases sur une surface figure 22. La buse de dépôt par jet d'encre comporte les quatre réservoirs contenant les bases nécessaires à la formation du brin d'ADN. Cette technologie permet donc de palier au principal défaut de la méthode Affimetryx : le changement de masques et le grand nombre de masques nécessaires. Les chaînes d'ADN peuvent ainsi contenir un nombre de base plus important : jusqu'à 70-mères. Mais c'est une méthode séquentielle, chaque base est ajoutée une à une pour chaque sonde, diminuant ainsi la densité de plots réalisables à environ 40 000.



**Figure 22 :** Méthode de synthèse in-situ Agilent. **A** un premier dépôt constitué du premier niveau de bases est effectué sur la surface activée de la puce. **B** superposition des différentes bases. **C** zoom sur un spot en cours d'ajout de base sur la chaîne d'ADN **D**.

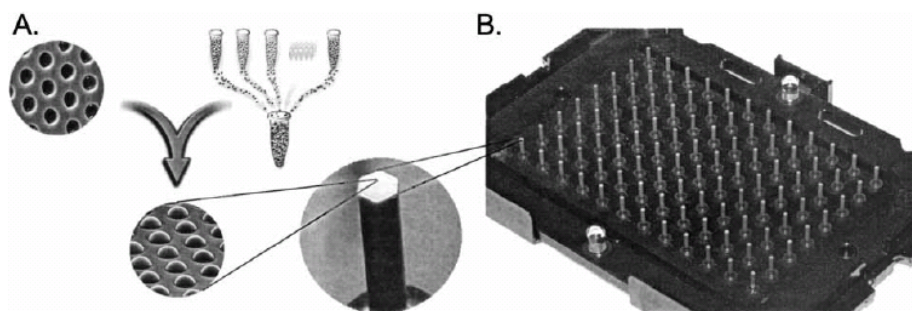
## In-situ Soft lithography

Xiao et al. [39] ont développé une méthode fabrication In-situ de puce à ADN, base par base en remplaçant le dépôt par inkjet d'Agilent (séquentiel) par un dépôt obtenu par Microcontact printing (parallèle). Comme pour les méthodes utilisant la photolithographie, chaque niveau de base de l'ADN requiert non plus un masque mais un timbre avec une architecture différente. Pour synthétiser un ADN contenant N-mère, il faut  $N \times 4$  timbres

différents. Cette méthode est très comparable à celle d’Affimetryx avec les mêmes avantages (grande densité de spots) et inconvénients (alignement nécessaire et grand nombre de timbres). Cette méthode permettrait cependant un développement futur pour augmenter grandement la densité de spots en fabriquant des timbres ayant des motifs nanométriques. Cette nouvelle voie est encore pour le moment en cours de développement.

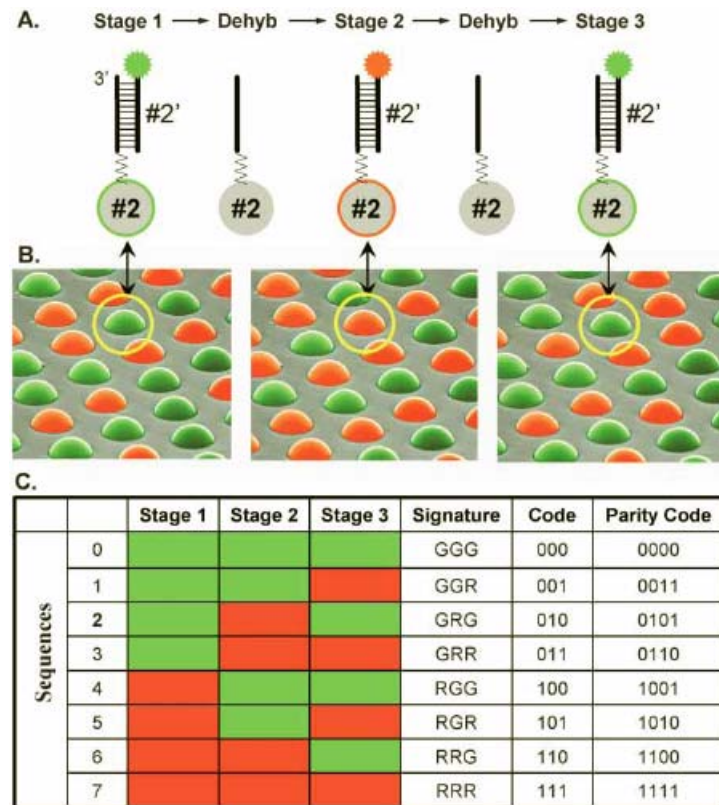
## Illumina

Illumina est représentative des nouvelles technologies innovantes pour les puces à ADN. Elle fait appel à des processus de fabrication plus astucieux et ouvre des possibilités bien plus grandes. La première étape d’élaboration des puces Illumina consiste à modifier une plaque de titration au format standard (de 96 à 1536 puits) pour recevoir une fibre optique par puit. De plus le sommet de chaque fibre est structuré par photolithographie et gravure ionique réactive (RIE) pour accueillir 50 000 puits profonds de 2  $\mu\text{m}$  (figure 23). Des billes de silice de 3  $\mu\text{m}$  de diamètre sont ensuite fonctionnalisées dans différents eppendorf. Chaque eppendorf est caractérisé par des billes contenant les mêmes oligonucléotides et un même code barre constitué de 3 à 4 marqueurs spécifiques différents. Une bille est ainsi fonctionnalisée avec environ  $10^6$  copies d’un même oligonucléotide. De 1536 à plus de 250 000 oligonucléotides différents peuvent être synthétisés et fonctionnalisés dans des eppendorf différents. L’ensemble des différents eppendorf est ensuite rassemblé en une seule solution finale qui va être utilisée par la suite. Les billes sont finalement auto-assemblées sur les fibres optiques en faisant sécher une goutte de solution finale sur les fibres maintenues verticalement [53]. 30 billes de chaque solution d’oligonucléotides sont statistiquement assemblées sur chaque fibre optique.



**Figure 23 :** *Puce Illumina. A. Puits et solution contenant les billes fonctionnalisées, ces dernières sont auto-assemblées dans les puits sur chaque fibre optique. B. Vue d’ensemble d’une puce Illumina avec 96 fibres optiques.*

La lecture de la puce s'effectue grâce à un scanner confocal avec un débit de 600 000 puces par jours. Elle consiste dans un premier temps à repérer grâce à leur « code barre » la position des différentes billes [54]. En effet chaque bille a été fonctionnalisée avec de 3 à 4 différents marqueurs suivant la complexité de la puce (figure 24).



**Figure 24 :** Décodage d'une puce Illumina. Dans cet exemple 3 marqueurs (oligonucléotides) différents ont été greffé sur les billes. Comme l'auto-assemblage est aléatoire, il faut retrouver l'emplacement de chaque oligonucléotide (bille), 3 étapes d'hybridation puis de déshybridation sont utilisées pour coder avec des marqueurs fluorescents la position des billes.

Ce système de codage permet 65 000 combinaisons différentes pour 4 marqueurs et moins de 0.02% d'erreur sur la position des billes. De plus la sensibilité en terme de concentration de cible à détecter est de l'ordre du femto-molaire.

Le système Illumina constitue une alternative intéressante aux fabricants de puce déjà installés sur le marché aussi bien pour la sensibilité du système que pour la complexité de ces puces (jusqu'à 250 000 oligonucléotides différents, présent en 30 copies par puits). De plus, l'analyse de plusieurs échantillons sur la même puce est possible.

## 2-3- Molécules uniques

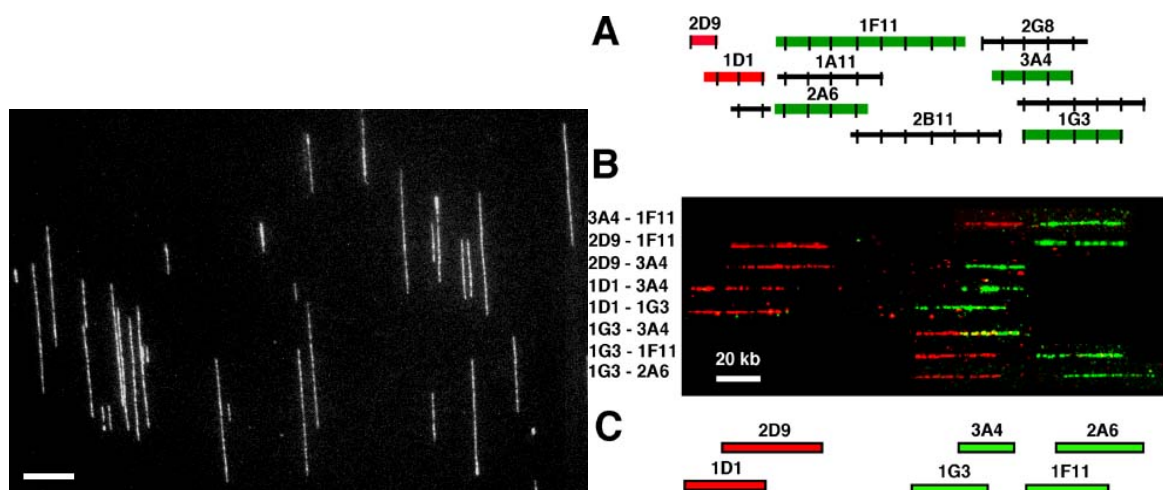
Une nouvelle catégorie de biopuce à émerger ces dernières années au niveau des laboratoires, elles ont pour objectif d'atteindre des informations indispensables à la compréhension des machines moléculaires du vivant qui sont inaccessibles par les approches biochimiques classiques, en atteignant l'échelle de la molécule unique. Nous avons fait le choix de décrire deux types de Biopuces à molécules uniques : le peignage d'ADN et le suivi dynamique de molécules individuelles.

### 2-3-1-Peignage moléculaire

Une nouvelle technologie d'analyse de l'ADN, le " peignage moléculaire " (approche Bottom-up), développée par l'équipe d'Aaron Bensimon [55], est désormais applicable à toutes les molécules d'ADN, petites ou grandes, y compris l'ADN génomique humain. Elle devrait permettre d'importantes avancées dans le domaine du diagnostic génétique comme dans celui de la cartographie physique du génome humain.

La technique de " peignage moléculaire " a été mise au point dès 1993, sur de petites molécules d'ADN (ADN de bactériophages et ADN de la bactérie *Escherichia coli*). Elle consiste à obtenir à partir de la molécule d'ADN en " pelote ", forme sous laquelle elle se trouve naturellement en solution, des filaments alignés et étirés, beaucoup plus faciles à étudier que la pelote de départ. Pour ce faire, une lame de verre traitée chimiquement est plongée dans une solution contenant les molécules d'ADN. Chaque molécule se fixe par l'une de ses extrémités. La surface de verre est ensuite lentement retirée et ce mouvement, par un phénomène physique, provoque l'étirement des molécules qui se collent à la lame, sous forme de fils tendus dans la même direction. Cette technologie facilite les projets d'étude de structure des génomes, et en particulier du génome humain. En effet, les distances entre gènes marqués en fluorescence, paramètres indispensables pour la cartographie physique des génomes, peuvent être mesurées de façon directe, et ceci plus finement, plus précisément, et plus rapidement, sur des molécules d'ADN ainsi conditionnées (" peignées "), voir figure 26.





**Figure 25 :** A gauche, ADN peigné observé par microscopie d'épifluorescence. Une solution d'ADN purifié de phage ( $0.25 \mu\text{g/ml}$ ) préalablement incubée avec des molécules fluorescentes s'intercalant dans l'ADN, a servi pour le peignage sur des surfaces traitées à l'aide de dérivés du silane. Le champ de vue photographié à l'aide d'une caméra intensifiée contient une majorité de segments de 25 microns environ. Les fragments plus petits sont dus à des cassures aléatoires qui ont lieu avant ou lors de la préparation. La barre de mesure représente 10 microns. A droite, exemple de cartographie physique sur ADN peigné [56].

Le domaine du diagnostic génétique devrait aussi bénéficier de cette technologie. L'hybridation fluorescente (qui permet l'étude des gènes recherchés grâce à des sondes moléculaires) sur ADN peigné permet de repérer des mutations quasiment indétectables par les méthodes classiques : il s'agit de micro-réarrangements (micro-délétions) qui, présents dans certains gènes, peuvent à eux seuls être à l'origine d'une maladie génétique. C'est le cas notamment de la sclérose tubéreuse, maladie pour laquelle le diagnostic génétique sur ADN peigné a été expérimenté avec succès. Précis, reproductible, simple et peu coûteux, le peignage moléculaire peut être aisément automatisable. Ce qui a été fait par la société française Genomic Vision.

### 2-3-2-Suivi de molécules uniques

Les avancées techniques en vidéomicroscopie couplées à l'analyse d'images ont rendu possible la détection et le suivi de particules ou de molécules fluorescentes uniques avec une précision de l'ordre de 10 nm. Ces techniques de « nanovidéomicroscopie » sont en pleine expansion dans l'étude de la dynamique et de la réactivité de macromolécules biologiques, car elles permettent d'accéder à l'activité biochimique et aux valeurs thermodynamiques de

complexes isolés. En effet, beaucoup des machines moléculaires biologiques impliquées dans une activité enzymatique donnée peuvent prendre plusieurs formes, en fonction des différentes macromolécules qui les constituent, mais aussi des modifications biochimiques de ces macromolécules. Les approches biochimiques classiques, qui procèdent par mesure d'ensemble, ne permettent pas d'accéder aux valeurs énergétiques et cinétiques réelles de ces différentes formes, notamment parce que la dynamique des transitions entre ces formes empêchent la purification à homogénéité d'un complexe moléculaire dans une forme donnée. Pourtant, les différences d'activité de ces formes sont au cœur des processus de régulation du vivant, et leur étude est indispensable à leurs compréhensions. Une technique dite de « Tethered Particle Motion » ou TPM est de plus en plus utilisée en laboratoire par les biophysiciens [51]. Dans la technique de TPM, une molécule d'ADN est immobilisée par une extrémité sur un support et est attachée à une particule microscopique par son autre extrémité : une variation de la longueur effective du brin d'ADN se traduit par une variation de l'amplitude du mouvement de la particule qui est suivie avec une précision nanométrique par l'analyse des images de la particule enregistrées en vidéomicroscopie [58]. Cette architecture moléculaire de surface permet d'étudier l'activité de certains enzymes ayant l'ADN pour substrat en suivant en temps réel les modifications de longueur du brin d'ADN.

Bien qu'elles soient extrêmement informatives et malgré l'intérêt grandissant des biologistes pour ces techniques, les méthodes de mesure à l'échelle de la molécule unique restent un domaine confidentiel. En effet, la multiplicité des formes que peut prendre un complexe et la multiplicité des substrats à étudier pour une forme donnée implique qu'un nombre très important de mesures doivent être effectuées pour que les résultats soient statistiquement exploitables. Les protocoles expérimentaux développés à ce jour rendent cette tâche lente et lourde, ce qui limite considérablement le développement de ces méthodes. En effet aucune étude sur la structuration ou le positionnement par lithographie des sites d'accroche ou de dépôt des molécules uniques n'a été accomplie à ce jour.

### 3-Vers la fabrication de biopuces par lithographie douce

Dans ce chapitre introductif nous avons montré un panorama résumé des méthodes de lithographie issues du monde de la microélectronique ainsi qu'un condensé des méthodes de fabrication des biopuces à ADN. Nous avons ainsi constaté que la technique de photolithographie, est largement employée par et pour des biologistes, afin de fabriquer des biopuces à ADN de haute densité. Parmi les méthodes émergentes de lithographie, la lithographie douce et spécifiquement le Micro-contact printing ( $\mu$ CP) montre une très grande compatibilité avec le dépôt et le positionnement de biomolécules sur des surfaces. Malgré cette constatation, rares sont les études dédiées à l'utilisation de cette méthode pour la fabrication de biopuces ADN fonctionnelles. Ceci constitue principalement l'objectif majeur de mon travail de recherche. En raison de la capacité du  $\mu$ CP à générer des motifs micrométriques et nanométriques, nous nous sommes intéressés aussi bien à la fabrication de microarrays conventionnels (motifs de quelques microns) et à une étude plus prospective sur la réalisation de supports spécifiques à l'étude de molécules d'ADN uniques. Notre choix s'est porté sur le Microcontact printing ( $\mu$ CP) également pour ses atouts en matière de versatilité d'utilisation que ce soit pour le grand nombre de molécules pouvant être utilisé que pour la possibilité de fabriquer à la fois des structures micrométriques et nanométriques avec la même technique.

Afin de pouvoir utiliser au mieux cette technique d'impression nous allons nous intéresser dans un premier temps aux compréhensions des phénomènes et contraintes technologiques qui apparaissent lors de son utilisation. Par contraintes nous entendons contraintes mécaniques du timbre par rapport aux structures de celui-ci mais aussi par rapport au type de polymère utilisé. La pollution lors du dépôt par les fragments de PDMS non réticulés a aussi été étudiée de même que leur influence sur les traitements de surface pouvant être appliqués au matériau polymérique.

Une autre étape importante sinon la plus importante du  $\mu$ CP, l'encrage va être discuté et fera l'objet d'un chapitre entier. Nous nous attacherons particulièrement à l'étude des mécanismes de l'encrage et de la raison du nombre très important de molécules extrêmement différentes qui s'adsorbent à la surface du PDMS. Bien sûr, nous traiterons ce sujet en nous focalisant sur les molécules qui nous serviront à la fabrication des biopuces : l'ADN, les protéines et les dendrimères.

L'étape finale à aborder est le dépôt des molécules d'intérêt que nous avons choisies. Nous allons donc discuter leur impression aussi bien à l'échelle du micron que nanométrique sur des lames de verre, mais surtout comparer les biopuces fabriquées par  $\mu$ CP avec celles utilisant des procédés de fabrication standard. Finalement, dans une partie plus prospective, nous présenterons des résultats préliminaires visant à obtenir des supports compatibles avec des analyses biologiques à l'échelle de la molécule individuelle.

---

## REFERENCES

- [1] G.E. Moore. Cramming more components onto integrated circuits, *Electronics*, vol. 38, nb. 8, pp. 114-117, **1965**.
- [2] G. Subramanian, V. N. Manoharan, J.D. Thorne, D.J. Pine. A possible route to photonic bandgap materials, *Adv. Mater.*, vol. 11, pp. 1261, **1999**.
- [3] T. Kraus, L. Malaquin, E. Delamarche, H. Schmid, N.D. Spencer, and H. Wolf. Closing the Gap Between Self-Assembly and Microsystems Using Self-Assembly, Transfer, and Integration of Particles, *Adv. Mater.*, vol.17, pp. 2438–2442, **2005**.
- [4] I. Langmuir, K. Blodgett. Film Structure and Method of Preparation, *U.S. Patent 2,220,860*.
- [5] P. W. K. Rothemund. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature* vol. 440, **2006**.
- [6] J. Guan, L. J. Lee. Generating highly ordered DNA nanostrand arrays, *PNAS*, vol. 102, nb. 51, pp. 18321–18325, **2005**.
- [7] Information about high technology silicone materials Sylgard ® 184 Silicone elastomer base & curing agent, *Dow Corning*.
- [8] J. C. McDonald and G. M. Whitesides. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices, *Acc. Chem. Res.* 35 7, pp 491-499, **2002**.
- [9] J. Gierak, C. Vieu, H. Launois, G. Ben Assayag, A. Septier. Focused ion beam nanolithography on AlF<sub>3</sub> at a 10 nm scale. *Applied Physics Letters*, vol 70, Issue 15, pp.2049-2051, **1997**.
- [10] C. Vieu, M. Mejias, F. Carcenac and H. Launois. Nanofabrication below 10 nm on organic and inorganic resists. In: Nanostructures. *Physics and Technology* St. Petersburg, pp. 119, **1996**.

- 
- [11] C. Vieu, F. Carcenac, A. Pe'pin, Y. Chen, M. Mejias, A. Lebib, L. Manin-Ferlazzo, L. Couraud, H. Launois. Electron beam lithography: resolution limits and applications. *Applied Surface Science* 164, pp.111–117, **2000**.
- [12] X. Xu, H. Chen, Z. Xiong, A. Jin, C. Gu, B. Cheng and D. Zhang. Fabrication of photonic crystals on several kinds of semiconductor materials by using focused-ion beam method. *Thin Solid Films*, vol 515, Issue 22, pp. 8297-8300, **2007**.
- [13] B. D. Gates, Q. Xu, J. C. Love, D. B. Wolfe and G. M. Whitesides. Unconventional nanofabrication, *Annu. Rev. Mater. Res.* 34, pp.339-72, **2004**.
- [14] B. D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C. G. Willson and G. M. Whitesides. New approaches to nanofabrication: molding printing and other techniques, *Chem. Rev.* 105, pp. 1171-1196, **2005**.
- [15] S. Y. Chou, P. R. Krauss, and P. J. Renstrom. Fabrication of Nanoimprint Stamps by Nanosphere Lithography, *Science* 272, pp. 85, **1996**.
- [16] B. Heidari, I. Maximov, E.L. Sarwe, and L. Montelius. Large scale nanolithography using nanoimprint lithography. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, , vol 17, Issue 6, pp. 2961-2964, **1999**.
- [17] S.Y. Chou, P. R. Krauss, W. Zhang, L. Guo, and L. Zhuang. Sub-10 nm imprint lithography and applications, *J. Vac. Sci. Technol. B* 15, pp. 2897, **1997**.
- [18] E. Kim, Y. Xia, G. M. Whitesides. Polymer microstructures formed by moulding in capillaries, *Nature*, 376, pp.581-584, **1995**.
- [19] E. Kim, Y. Xia, X.-M. Zhao, G. M. Whitesides. Soft lithography, *Adv. Mater.*, 9, pp.651-654, **1997**.
- [20] X.-M. Zhao, Y. Xia, G. M. Whitesides. Fabrication of three-dimensional microstructures: microtransfer molding *Adv. Mater.*, 8, pp. 837-840, **1996**.

[21] E. Kim, Y. Xia, X.-M. Zhao, G. M. Whitesides. Unconventional methods for fabricating and patterning nanostructures, *Adv. Mater.*, 9, pp. 651-654, **1997**.

[22] a) E. Ozbay, E. Michel, G. Tuttle, R. Biswas, M. Sigalas, K. M. Ho. Dipole antennas on photonic band-gap crystals—Experiment and simulation, *Appl. Phys. Lett.*, 64, pp. 2059-2061, **1994**; b) J. D. Joannopoulos, P. R. Villeneuve, S. Fan. Photonic crystals: Putting a new twist on light, *Nature*, 386, pp. 143-149, **1997**.

[23] N. A. Peppas, R. Langer. New challenges in biomaterials, *Science*, 263, pp. 1715-1720, **1994**.

[24] <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/index.html>).

[25] T. Leichle , D. Saya , P. Belaubre , J.B. Pourciel , F. Mathieu , J.P. Laur , L. Nicu , C. Bergaud. Liquid loading of silicon-based cantilevers using electrowetting actuation for microspotting applications, *Sensors and Actuators A*, vol.132, nb. 2, pp.590-596, **2006**.

[26] D. Saya , T. Leichle , J.B. Pourciel , F. Mathieu , C. Bergaud , L. Nicu, Contact force control of piezoresistive cantilevers with in-plane nanotips for femtoliter droplet deposition, *Rapport LAAS N°07440*, Septembre **2007**.

[27] A. Kumar, G. M. Whitesides. Features of stamping with an elastomeric stamp and an alkane-thiol ink followed by chemical etching, *Appl. Phys. Lett.*, 63, pp. 2002-2004, **1993**.

[28] J. L. Wilbur, A. Kumar, E. Kim, G. M. Whitesides. Microfabrication by Microcontact Printing of Self-Assembled Monolayers, *Adv. Mater.*, 6, pp. 600-604, **1994**.

[29] P. M. St. John and H. G. Craighead, Microcontact printing and pattern transfer using trichlorosilanes on oxide Substrates, *Appl. Phys. Lett.* 68 (7), **1996**.

- [30] M.M.J. Decré, R. Schneider<sup>1</sup>, D. Burdinski, J. Schellekens, M. Saalmink and R. Dona<sup>1</sup>. Wave Printing (I): Towards Large-Area, Multilayer Microcontact Printing. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* Vol. EXS-2 © *Materials Research Society* **2004**.
- [31] D. Burdinski, M. Saalmink, J.P. Berg, W.G. van den Marel, C. van der. Universal Ink for Microcontact Printing *Angewandte Chemie*: Vol. 45, No.26, pp. 4355-4358, **2006**.
- [32] JP Renault, A Bernard, A Bietsch, B Michel, HR Bosshard, E Delamarche, M Kreiter, B Hecht, UP Wild. Fabricating Arrays of Single Protein Molecules on Glass Using Microcontact Printing, *J Phys Chem B*, 107 pp.703-711, **2003**.
- [33] H. Li, D.J. Kang, M.G. Blamire, W.T.S. Huck, *NanoLett.* 2 (4) pp. 347, **2002**.
- [34] H.H. Lee, E. Menard, N.G. Tassi, J.A. Rogers, G. B. Blanchet. Large Area Microcontact Printing Presses for Plastic Electronics, *Materials research society*.
- [35] B Michel, A Bernard, A Bietsch, E Delamarche, M Geissler, D Juncker, H Kind, JP Renault, H Rothuizen, H Schmid, P Schmidt-Winkel, R Stutz, H Wolf. Printing meets lithography: Soft approaches to high-resolution patterning, *IBM J Res & Dev*, 45(5), pp. 697-719, **2001**.
- [36] J. Foley, H. Schmid, R. Stutz, and E. Delamarche. Microcontact Printing of Proteins Inside Microstructures, *Langmuir*, 21, pp.11296-11303, **2005**.
- [37] S Lange, V Benes, D Kern, H Hörber, A Bernard. Microcontact Printing of DNA Molecules, *Anal Chem*, 76, pp.1641-1647, **2004**.
- [38] C Thibault, V Le Berre, S Casimirius, E Trévisiol, J François and C Vieu, Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications, *Journal of Nanobiotechnology*, 3:7, **2005**.
- [39] PF Xiao, NY He, ZC Liu, QG He, X Sun and ZH Lu, In situ synthesis of oligonucleotide arrays by using soft lithography, *Nanotechnology* 13 , pp.756–762, **2002**.



[40] Yole Micronews, avril **2002**, 2, pp. 4 ([www.yole.fr](http://www.yole.fr)).

[41] a) Pirrung M. How to Make a DNA Chip, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, p. 1276, **2002**. b) M. Delpech, Hémoglobine glyquée : méthodes de dosage et problèmes *Ann. Bio. Clin*, 58, p. 28, **2000**. c) Souteyrand E. DNA Chips: from elaboration to application, *Analisis*, , 27, pp. 639, **1999**.

[42] <http://www.mobidiag.com/>.

[43] K. Drexhage, Interaction of light with monomolecular dye layers, *Wolf E. (Ed), North Holland, Amsterdam*, pp. 165-229, **1974**.

[44] Southern, E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.*, 98(3): pp. 503-17, **1975**.

[45] J.L DeRisi, V.R. Iyer, and P.O. Brown, Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278(5338): pp. 680-6, **1997**.

[46] G. Bidan, M. Billon, T. Livache, P. Mailley et A. Roget, Ingénierie et électrochimie moléculaires pour la conception de puces à ADN, *l'actualité chimique : Molécules et matériaux d'intérêt médical*, novembre-décembre **2003**.

[47] TR Hughes, LM Mao, AR Jones, J Burchard, MJ Marton, KW Shannon, Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol*, 19, pp. 342-347, **2001**.

[48] V Le Berre, E Trevisol, A Dagkessamanskaia, S Sokol, AM Caminade, JP Majoral, B Meunier, J. François, Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis. *Nucleic Acids Research*, 31: pp. 1-8, **2003**.

[49] R.J. Lipshutz, , et al. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*, 21: pp.20-4, **1999**.

- [50] T.R. Hughes, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol*, 19(4): pp. 342-7, **2001**.
- [51] A.J., Holloway, , et al., Options available--from start to finish--for obtaining data from DNA microarrays II. *Nat Genet*, 32 Suppl: pp. 481-9, **2002**.
- [52] M. Beir, I.D Hoheisel., *Nucleic Acids Res.*, 28, pp. 11, **2000**.
- [53] K.L. Michael, L.C. Taylor, S.L. Schultz, and D.R. Walt, Randomly Ordered Addressable High-Density Optical Sensor Arrays, *Anal. Chem.*, 70, pp.1242-1248, **1998**.
- [54] S. Chee Yang, C. Siegmund, J. Haas, L. Zhou, A. Oliphant, J.B. Fan, S. Barnard and M. Zhao, D. Che, T. Dickinson, E. Wickham, J. Bierle, D. Doucet, M. Milewski, R.K.L. Gunderson, S. Kruglyak, M.S. Graige, F. Garcia, B.G. Kermani, Chanfeng, Decoding Randomly Ordered DNA Arrays, *Genome Res.* 14: pp. 870-877, **2004**.
- [55] T. Strick, J.F. Allemand, V. Croquette, D. Bensimon, Twisting and stretching single DNA molecules, *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 74 , pp. 115-140, **2000**.
- [56] D. Bensimon, A.J. Simon, V. Croquette, A. Bensimon, Stretching DNA with a receding meniscus: Experiments and models. *Physical review letters*, vol 74 nb 23, **1995**.
- [57] a) Pouget et al, A computational perspective on the neural basis of multisensory spatial representations *Nucl. Acid Res*, **2004**; b) Dennis et al, KOPS: DNA motifs that control E. coli chromosome segregation by orienting the FtsK translocase, *EMBO J*, **2004**.
- [58] a) Schafer et al., Transcription by single molecules of RNA polymerase observed by light microscopy , *Nature*,**1991**; b) Yin et al., *Biophys.J.***1994**; c) Finzi and Gelles, Measurement of lactose repressor-mediated loop formation and breakdown in single DNA molecules , *Science*,**1995**;



# Chapitre II

## Moules et Timbres pour la lithographie douce

### Sommaire

<b>1-MOULES .....</b>	<b>66</b>
1-1-FABRICATION DES MOULES .....	66
1-2-TRAITEMENTS DE SURFACE .....	67
1-2-1- <i>Les différentes méthodes</i> .....	67
1-2-2- <i>Le traitement en phase liquide</i> .....	68
<b>2-TIMBRES .....</b>	<b>70</b>
2-1-PDMS .....	70
2-1-1- <i>Une formulation commerciale: Sylgard 184</i> .....	70
2-1-2- <i>Hard PDMS</i> .....	72
2-1-3- <i>Timbre hybride</i> .....	73
2-2-POLLUTION OCCASIONNEE LORS DU CONTACT PAR LE TIMBRE DE PDMS .....	74
2-2-1- <i>Caractérisation du procédé de contamination</i> .....	76
2-2-2- <i>Influence des conditions de réticulation sur le degré de contamination</i> .....	80
2-2-3- <i>Influence de la composition du PDMS</i> .....	84
2-2-4- <i>Nettoyage des timbres de PDMS</i> .....	86
2-3-PROPRIETES MECANQUES DU TIMBRE EN PDMS .....	87
2-3-1- <i>Conformation du timbre sur le substrat</i> .....	87
2-3-2- <i>Effondrement du timbre</i> .....	91
2-3-3- <i>« Retrait thermochimique » du PDMS</i> .....	96
<b>REFERENCES :.....</b>	<b>100</b>

Nous avons présenté dans le chapitre précédent un bref aperçu du Microcontact printing et de ses applications. Nous avons sélectionné cette méthode pour notre travail de recherche afin de montrer sa compatibilité avec la fabrication de biopuces à ADN. Ainsi nous allons commencer par détailler les différents outils utilisés par cette technologie, les problèmes que l'on peut rencontrer et leurs solutions le cas échéant. Nous allons commencer par nous intéresser au moule, sa fabrication et les traitements de surfaces envisageables, puis au timbre élastomère obtenu par moulage sur ce moule, les différents polymères utilisés, leur comportement mécanique et enfin aux problèmes de pollution des surfaces par les différents polymères utilisés dans la composition du matériau constituant le timbre.

## 1-Moules

### 1-1-Fabrication des moules

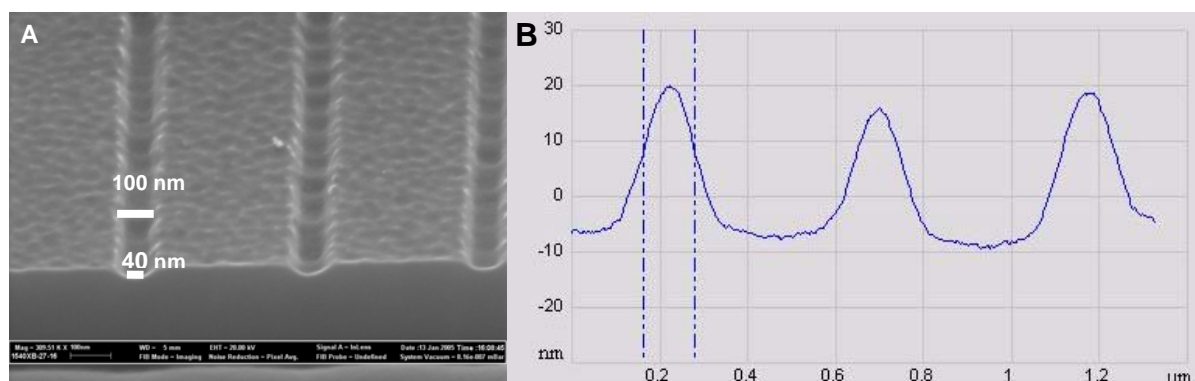
Le moule est la première brique du mécano que nous allons construire pour finalement pouvoir déposer par  $\mu$ CP des molécules sur un substrat. La résolution que nous pourrions obtenir sera au mieux celle du moule. C'est pourquoi il faut prendre le plus grand soin à sa réalisation.

Les moules sont fabriqués principalement sur un type de substrat : le silicium. Suivant la résolution souhaitée : micrométrique ou nanométrique, nous utilisons respectivement la photolithographie et la lithographie électronique (décrit dans le chapitre I : 1-2-2). Les deux technologies peuvent être utilisées séquentiellement si à la fois des motifs micrométriques et nanométriques sont nécessaires, notamment pour obtenir des motifs de soutien (voir les propriétés mécaniques du timbre).

Une importance particulière doit être apportée à la gravure. En effet les flancs doivent être les plus droits et plans possibles (cela pouvant entraîner un problème lors du démoulage du timbre). Ces structures pourraient rester piégées dans les défauts de la gravure et se déchirer lors de l'étape de démoulage.

La figure 1A nous montre un exemple de moule réalisé par lithographie électronique et gravure ionique du silicium (voir figure 1A), observé avec un angle de  $45^\circ$  grâce à une tranchée gravée à l'aide d'un FIB (Focused Ion Beam). La Morphologie d'un timbre est

observée en AFM (figure 1B). Après déconvolution de l'image le timbre exhibe des dimensions identiques au moule à  $\pm 5 \text{ \AA}$ .



**Figure 1 :** L'image A est une image MEB à 45° d'un moule observé par la tranche grâce à une découpe au FIB. Le fond du motif est large de 40 nm et le sommet de 100 nm avec une profondeur de 25 nm. L'image B est une coupe AFM des motifs du timbre. Les structures mesurées après déconvolution de la pointe montre les mêmes dimensions soit 25 nm de hauteur, 40 nm de largeur au sommet du timbre et 100 nm à la base.

## 1-2-Traitements de surface

### 1-2-1-Les différentes méthodes

Le moule ne peut pas être utilisé directement après sa fabrication pour faire réticuler un timbre de PDMS. Un démoulant doit être déposé à sa surface, à la fois pour protéger le moule augmentant sa durée de vie (supérieure à plusieurs centaines de moulage), mais aussi pour faciliter un démoulage des structures de timbre sans les abîmer.

Plusieurs méthodes de traitements de surfaces peuvent être utilisées, une liste est présentée sur la table 1. On retrouve le dépôt en surface de composés fluorés ou de silanes.

Type de dépôt	Qualité et reproductibilité	Stabilité	Coût
Sputtering (PTFE...)	++	-	-
Dépôt plasma (CxFx...)	++	-	-
Dépôt phase vapeur (Silanes...)	+	++	+
Dépôt phase liquide (Silanes...)	+	++	+

**Tableau 1 :** Comparaison des différents traitements de surface en termes de stabilité dans le temps, de reproductibilité/définition et de coût [1].

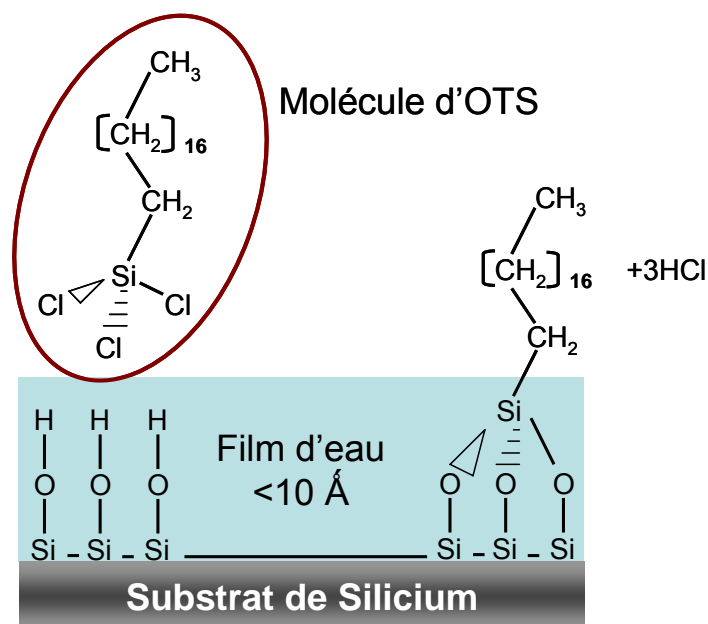
Les méthodes de dépôt les plus sophistiquées comme le sputtering et le dépôt par plasma, offre une très bonne qualité de traitement de surface, aussi bien en terme de

reproductibilité que d'homogénéité et de qualité de la couche anti-adhésive. Elles sont généralement difficiles à mettre en œuvre (appareils coûteux), peu stables dans le temps et assez fragiles (quelques dizaines de moulage) [2]. Pour ces différentes raisons, ces méthodes sont beaucoup moins utilisées que les dépôts en phase vapeur ou liquide.

Ces dernières sont simples à mettre en œuvre, peu coûteuses et très stables dans le temps ((plusieurs centaines de moulages). Nous avons choisi ces méthodes et particulièrement le dépôt en phase liquide comme moyen pour fonctionnaliser chimiquement nos moules avec des traitements anti-adhésifs. Ce choix nous a été dicté par le fait que le procédé de dépôt en phase vapeur est plus long et plus complexe. En effet, ce dernier nécessite une enceinte avec un contrôle du vide et de la température du substrat, le dépôt se déroulant pendant plusieurs heures. La qualité de la couche obtenue, sensiblement meilleure ne justifie pas son utilisation par rapport à la simplicité d'un traitement en phase liquide [3].

### **1-2-2-Le traitement en phase liquide**

Le traitement en phase liquide permet l'utilisation de nombreuses molécules, aussi bien des chaînes Alkylsilanes (-CH<sub>2</sub>-) que des chaînes perfluorosilane (-CF<sub>2</sub>-) de différentes longueurs de chaînes. Ces deux types de molécules sont équivalents en termes de propriétés anti-adhésives. Nous avons fait le choix de la silanisation avec l'Octadécyltrichlorosilane (OTS). Afin d'activer la surface du moule de silicium pour permettre une meilleure fixation de ce silane à sa surface, un traitement au plasma oxygène est nécessaire (typiquement 5 minutes à 400 W). Ce traitement a pour but la formation de groupements silanols (Si-OH) sur la surface du silicium. Les molécules d'OTS viennent se fixer de manière covalente sur ces groupements (Figure 2).



**Figure 2 :** Silanisation d'un substrat de silicium par une molécule d'OTS.

Il faut noter que la réaction de silanisation ne peut avoir lieu sans la présence d'un film mince d'eau en surface du substrat. Ce film est naturellement présent à la surface de tout substrat non déshydraté par un passage sur une plaque chauffante ou dans une étuve. Par contre le liquide utilisé pour la silanisation (généralement du trichloroéthane ou de l'hexane) doit contenir le moins possible de molécules d'eau, ceci afin d'éviter une polymérisation de l'OTS sous forme d'agrégats. Le substrat doit rester immergé dans la solution pendant au moins 5 min, puis être rincé abondamment pour éviter les traces de séchage et de dépôt des agrégats d'OTS.

Ce traitement en phase liquide est simple et rapide, il est de plus très robuste. Après traitement, plusieurs centaines de moulages successifs peuvent être réalisés sur un même moule. La phase suivante va maintenant consister à mouler un timbre de PDMS sur le moule mère en silicium. Cette étape et surtout la nature des différentes formulations chimiques du PDMS utilisées va maintenant être détaillée.



## 2-Timbres

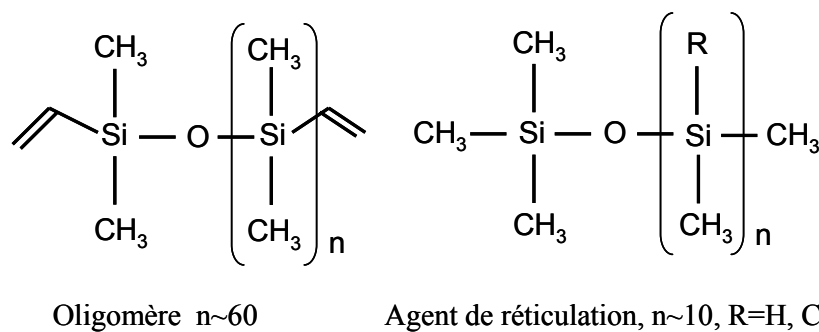
### 2-1-PDMS

Le PDMS est énormément utilisé dans de nombreux procédés technologiques, ces caractéristiques en font un matériau largement utilisé pour la conception de canaux fluidiques et plus généralement pour la lithographie douce. En effet, les deux prépolymères utilisés pour sa fabrication sont suffisamment peu visqueux pour faciliter le moulage. Sa faible énergie de surface en fait un polymère très fiable pour la réplique exacte du moule. L'ajout d'un agent de réticulation permet de plus de rendre faible la rétraction du polymère pendant la réticulation. De plus, la température de transition vitreuse étant basse ( $T_g = -123^\circ\text{C}$ ) et ses propriétés de surface pouvant être facilement modifiées, (l'hydrophilisation par plasma oxygène en est un exemple) cela conforte l'utilisation du PDMS dans le cadre d'un large spectre de conditions expérimentales.

Outre ces aspects chimiques, les propriétés mécaniques du PDMS ne sont pas moins intéressantes. Sa relativement grande élasticité facilite un contact conforme entre le PDMS réticulé et le substrat, augmentant d'autant plus la bonne reproductibilité des dépôts dans le cas du  $\mu\text{CP}$ , ou la bonne étanchéité des canaux microfluidiques. Ses derniers avantages, qui ne sont pas les moindres sont l'isotropie optique combinée à sa transparence dans le domaine visible et ultraviolet. Cela en fait un bon candidat comme moule pour la « Soft-UV impression » (voir chapitre I).

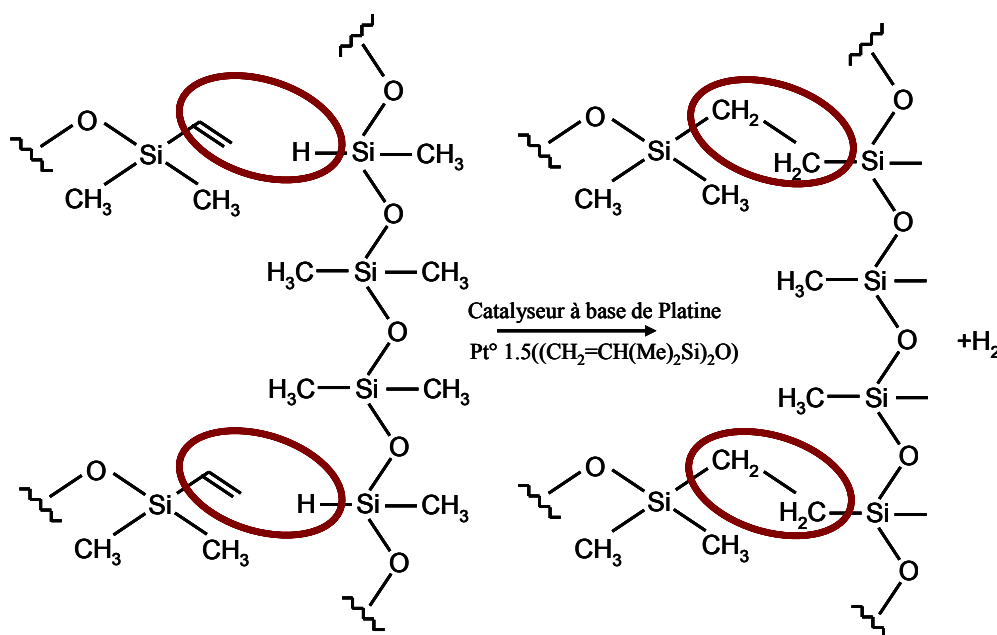
#### 2-1-1-Une formulation commerciale: Sylgard 184

Comme la plus grande partie des « Polydiméthylsiloxanes », le Sylgard<sup>®</sup> 184 doit être préparé en mélangeant une base contenant l'oligomère PDMS et un agent de réticulation (Figure 3) qui lui est formé de deux composés : un catalyseur au platine et un oligomère hydrogéné.



**Figure 3 :** Représentation schématique des deux composants du Sylgard 184®.

Lorsque les deux composés sont mélangés la réticulation du polymère commence. Un phénomène appelé hydrosilylation [4] est activé thermiquement et permet la formation de liaisons covalentes entre les groupes hydrosilanes (Si-H) du polymère contenu dans l'agent de réticulation et les chaînes carbonées non saturées grâce à la présence du catalyseur au platine. Cette réaction conduit à la formation d'un réseau réticulé de chaînes polysilane (Figure 4) qui donne au PDMS ces propriétés élastomériques.



**Figure 4 :** Représentation schématique de la formation de ponts réticulés entre les différentes chaînes de polymères.

En plus de ces composants, il faut noter la présence de 1 à 5% de fragments de PDMS (Si-OSiMe<sub>3</sub>)<sub>4</sub> qui ne réagissent pas pendant la réticulation, ces fragments peuvent constituer des polluants, capables de diffuser au sein du réseau réticulé et d'atteindre la surface du timbre d'où ils peuvent être transférés non intentionnellement lors du  $\mu$ CP.

## 2-1-2-Hard PDMS

De nombreux polymères ont été développés pour des applications très différentes. Le Hard-PDMS parfois appelé matériau A [5] en est un exemple, il a été spécialement développé pour la lithographie douce à haute résolution par les laboratoires IBM Zürich. Grâce à ce nouveau matériau des structures inférieures à 100 nm ont pu être réalisées et des performances mécaniques accrues ont été démontrées. Le concept de base pour développer des polymères à haute résolution est celui du réseau de polymère bimodal qui est composé d'un mélange de petites et de longues chaînes polymères. Ceci afin d'obtenir à la fois un polymère plus rigide (chaînes courtes) mais non friable (chaînes longues).

Le Hard-PDMS est composé d'un mélange de produits commerciaux : le méthylhydrosiloxane-diméthylsiloxane copolymère (HMS-301,  $M_w=1900-200$ , ABCR/Gelest) et le méthylvinylsiloxane-diméthylsiloxane copolymère (VDT-731,  $M_w\sim 30000$ , ABCR/Gelest). Cela confère au timbre élastomérique une plus grande densité de points de réticulation, formant une architecture en réseau polymère multimodal. Les chaînes polymères de faible masse molaire contribuent principalement à l'augmentation significative (facteur trois/PDMS Sylgard 184®) du module de Young. Les chaînes longues augmentent les capacités élastiques comme la déformabilité la capacité d'élongation, etc.... réduisant ainsi considérablement la grande fragilité des élastomères à module de Young élevé.

De plus, ce matériau contient un modulateur réduisant l'activité du catalyseur pendant la réaction d'hydrosilylation et une résine siloxane utilisée comme remplisseur améliorant ainsi les propriétés mécaniques.

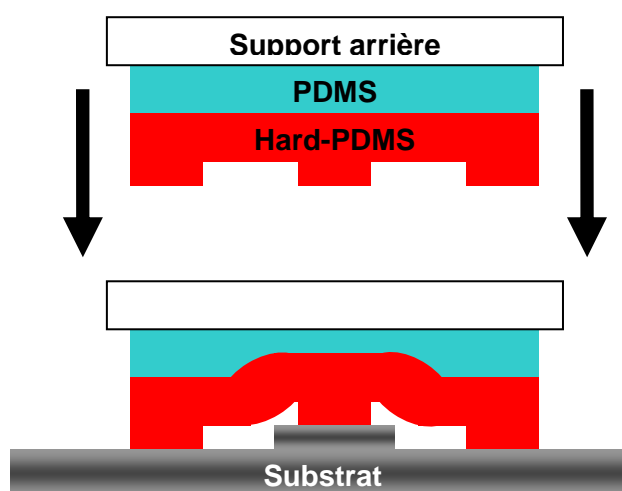
En comparaison du Sylgard 184®, le Hard -PDMS permet la fabrication de timbre hautement performant, permettant d'atteindre des résolutions inférieures à 100 nm, grâce à l'augmentation de la stabilité mécanique des structures du timbre. Cependant, ce grand module de Young rend l'élastomère plus fragile. Cela complique le découpage des timbres sans générer de fissures. De plus sa grande densité de point de réticulation augmente le retrait chimique durant la réticulation. Une solution pour remédier à ce problème est la fabrication de timbre fin en utilisant une lame de verre (200-600 $\mu$ m) ou du Sylgard 184 comme support arrière. Le but dans les deux cas étant de combiner haute résolution et flexibilité. Ces deux approches vont être décrites dans les pages suivantes.

### 2-1-3-Timbre hybride

Afin d'améliorer les propriétés mécaniques des timbres, il est parfois nécessaire d'utiliser un timbre hybride. Il existe un grand nombre de timbres hybrides différents :

- Un film de PDMS standard avec une lame de verre comme support arrière.
- Un film de Hard-PDMS avec un support arrière composé d'une couche de PDMS standard.
- Un film de Hard-PDMS sur un support de verre.
- Un film de Hard-PDMS puis un film de PDMS standard et un support arrière en verre (figure 5).

Chacun de ces timbres hybrides est cité par ordre croissant d'amélioration des propriétés mécaniques recherchées pour la lithographie douce.



**Figure 5 :** Exemple d'un timbre hybride à trois couches. Constitué d'un film de Hard-PDMS structuré, d'un film de PDMS et d'un support arrière en verre. Ce timbre est amené en contact avec un substrat non plan, illustrant ainsi la grande adaptabilité du timbre.

La figure 5 illustre parfaitement les propriétés mécaniques des timbres hybrides. En effet, du fait du module de Young élevé du hard-PDMS les structures présentes sur le timbre ne se déforment pas (pas de perte de résolution). De plus, la couche de PDMS standard souple permet de compenser les déformations dues au contact du timbre avec la surface. La lame de verre utilisée comme support arrière du timbre permet l'application d'une pression uniforme sur le timbre pour que toutes ses structures puissent entrer en contact avec le substrat.

Les différentes couches de polymère constituant le timbre sont déposées l'une après l'autre soit par spin-coating soit dans un moule à la dimension de l'épaisseur souhaité. Après

le dépôt du premier polymère, une réticulation partielle est alors effectuée jusqu'à l'obtention d'un gel (température et temps de réticulation différents pour chaque polymère). Ainsi lors du dépôt d'une autre couche les polymères ne se mélangent qu'à l'interface pour former des liaisons covalentes. Le support arrière en verre est ajouté après la réticulation de la dernière couche de polymère. Cette lame de verre peut soit être activée par plasma O<sub>2</sub> pour former des liaisons fortes avec le polymère soit fonctionnalisée par traitement chimique avec un allylchlorosilane et former ainsi des liaisons covalentes. La partie trichlorosilane se fixe sur le verre laissant le groupement vinyl libre de réagir avec le PDMS (qui rappelons le, n'est pas réticulé complètement). Le dépôt sur la lame de verre est obtenu en phase vapeur dans un dessiccateur entre 15 et 20 mBar pendant 15 min). La lame nouvellement fonctionnalisée est déposée sur le sandwich de polymère jusqu'à la fin de la réticulation.

Une attention particulière doit être apportée au nettoyage de la lame de verre. Une poussière déposée à sa surface entraîne irrémédiablement un défaut dans le timbre hybride. Par exemple une particule de 1,5 µm de diamètre entraîne un défaut visible sur une surface de 300 µm de diamètre.

## **2-2-Pollution occasionnée lors du contact par le timbre de PDMS**

Pendant le µCP, le timbre est encré avec une solution contenant les molécules à déposer et est mis en contact avec le substrat. Dans le meilleur des cas, les molécules de l'encre sont déposées à la surface seulement dans les secteurs de contact correspondant aux structures du timbre. Cependant, on a découvert qu'en plus des molécules constituant l'encre, des fragments à faible poids moléculaire contenues dans le PDMS sont également déposés, pouvant ainsi contaminer la surface [6-8]. Cette contamination peut être problématique dans le cadre du µCP de molécules biologique. En effet ces contaminants peuvent permettre les fixations d'autres molécules non désirées à la surface du substrat [9]. Graham et al. ont proposé un procédé de nettoyage du timbre de PDMS afin d'extraire autant que possible les fragments de PDMS pour réduire au minimum la contamination de la surface pendant le contact. Leur procédé utilise des solvants apolaires et nécessite un long temps de lavage (~24h), il n'est de plus que partiellement efficace à cause de la nature polaire de certains des fragments. Cette interprétation est soutenue par les travaux récents de Ruben et al. [10] et prouve que le degré de contamination des surfaces imprimées dépend de la nature de l'encre. Ces auteurs ont observé un degré plus élevé de contamination pour les encres polaires tandis

que les encres apolaires telles que des molécules d'alcane-thiols empêchaient le dépôt des espèces polluantes polaires. Cet article est le premier étudiant vraiment l'effet de la contamination de timbre sur le résultat du processus de  $\mu$ CP dans le cas de SAM alcane-thiols et des monocouches terminées par des groupements acide carboxylique sur des surfaces d'or.

À notre connaissance aucun rapport semblable n'est disponible dans le cas d'encres composées de biomolécules. Dans le cas des biomolécules, ces grandes molécules complexes sont simplement adsorbées sur la surface du timbre pendant l'étape d'encrage et ne pénètrent pas dans l'élastomère. Fondamentalement, nous ne savons pas si la présence des fragments de PDMS dans le timbre, sont salutaires ou nuisibles pour la qualité de l'impression dans le cas des encres biomoléculaires. Afin de réduire au minimum l'effet de la contamination, il a été suggéré d'employer une concentration élevée en encre [6] pour que les molécules servent de barrière physique au transfert des résidus. Cependant, pour un  $\mu$ CP de haute résolution ou même l'impression de molécules individuelles [11] où les basses concentrations en encre sont nécessaires, il existe un réel besoin d'enlever les contaminants de la surface du timbre avant l'impression. D'autres auteurs ont proposé l'utilisation intentionnelle de l'effet de contamination du PDMS afin de modifier l'énergie de surface d'un substrat hydrophile [12]. En effet, ce  $\mu$ CP "sans encre" laisse des résidus de PDMS qui modifient localement les propriétés physicochimiques de la surface imprimée. Des biomolécules et les complexes conjugués de polyélectrolyte/biomolécules peuvent alors être spécifiquement assemblés sur ces zones devenues hydrophobes [13]. Nous allons étudier dans cette partie de chapitre la cinétique de ce procédé de contamination par une méthode de caractérisation indirecte de l'énergie de surface de l'échantillon et du timbre après l'impression avec le substrat (angle de contact liquide/substrat). Nous analyserons l'influence des conditions de réticulation du PDMS et du temps de contact sur le degré de contamination de la surface.

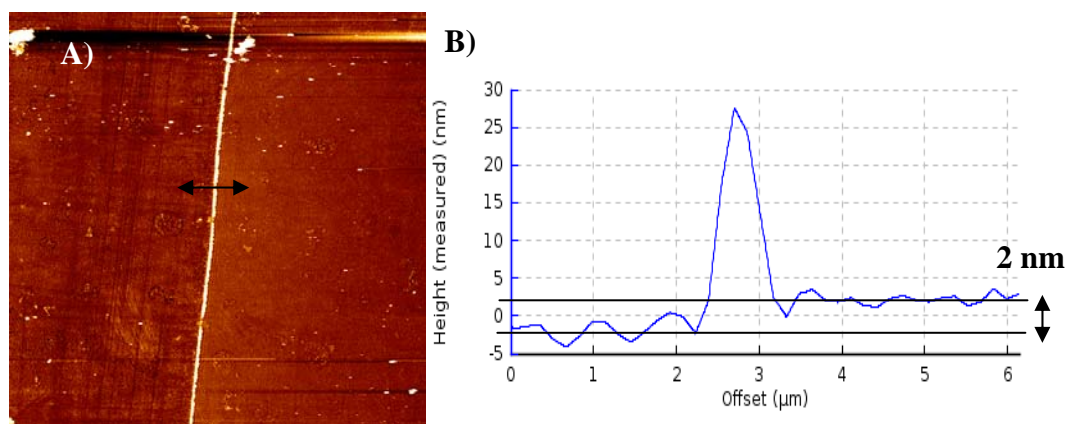
Pour analyser l'effet de la contamination sur le processus de  $\mu$ CP, nous avons recherché une méthode capable de nettoyer des timbres de PDMS afin de comparer des expériences effectuées exactement dans les mêmes conditions avec les mêmes timbres (le même caractère hydrophobe) en présence de la contamination (timbres non nettoyés) ou après dégagement des fragments de PDMS (timbres nettoyés). C'est la raison pour laquelle nous avons étudié un processus de nettoyage du timbre pendant plusieurs heures qui est largement répandu dans la chimie des polymères.

L'influence de ce procédé de nettoyage sur les propriétés du matériau PDMS a été étudiée. D'une part nous avons évalué l'impact de ce traitement de nettoyage sur la persistance du traitement hydrophile des timbres de PDMS en utilisant le plasma l'oxygène et d'autre part

sur la qualité du  $\mu$ CP des molécules d'ADN. Ces dernières études seront présentées dans le chapitre III concernant l'encrage.

### **2-2-1- Caractérisation du procédé de contamination**

Quand un timbre de PDMS entre en contact avec la surface du substrat il libère rapidement quelques molécules présentant un caractère hydrophobe. Ce procédé de contamination change la mouillabilité d'une surface hydrophile en hydrophobe. Nous attribuons cet effet au transfert des fragments de PDMS, non impliqués dans les réactions de réticulation du polymère. Ces chaînes libres de polymère peuvent se déplacer à l'intérieur du réseau polymère jusqu'à la surface du timbre d'où elles peuvent interagir avec le substrat pendant le contact. Nous avons constaté que le temps de contact influe peu sur la quantité de contaminants relarguée sur la surface. Ce résultat indique que le transfert à la surface de l'échantillon est très rapide et a lieu dans les toutes premières secondes du contact. Après quelques dizaines de secondes, la concentration en fragments de PDMS à l'interface timbre/substrat atteint l'équilibre et plus aucun transport de fragment n'est observé. Expérimentalement, nous avons également observé que quelques secondes après le contact avec un substrat, un timbre de PDMS peut contaminer un nouvel échantillon sans différence apparente, ces résultats ne seront pas présentés ici. Cette observation signifie qu'avec une constante de temps de quelques secondes après le contact, la concentration d'équilibre des fragments de PDMS près de la surface du timbre est reconstituée. Le degré de contamination engendré par un timbre dépend de la concentration en fragments de PDMS aussi bien que de leur capacité à se déplacer à l'intérieur du réseau polymère. Le transfert rapide pendant le contact et le rétablissement rapide des molécules contaminantes sur la surface du timbre après contact, indiquent que la diffusion des fragments de PDMS vers de la surface du timbre n'est pas un facteur limitant de ce processus et se produit en quelques secondes. Pour des personnes voulant intentionnellement utiliser le processus de contamination pour modifier chimiquement une surface (voir par exemple les références [12] et [13]), nos résultats démontrent que l'impression consécutive avec un même timbre peut être employée pour des procédés à cadence élevée. L'épaisseur de ces fragments déposés peut être caractérisée par microscopie à force atomique (AFM) (Figure 6) et apparaît comme une couche de moins de 2 nanomètres d'épaisseur.



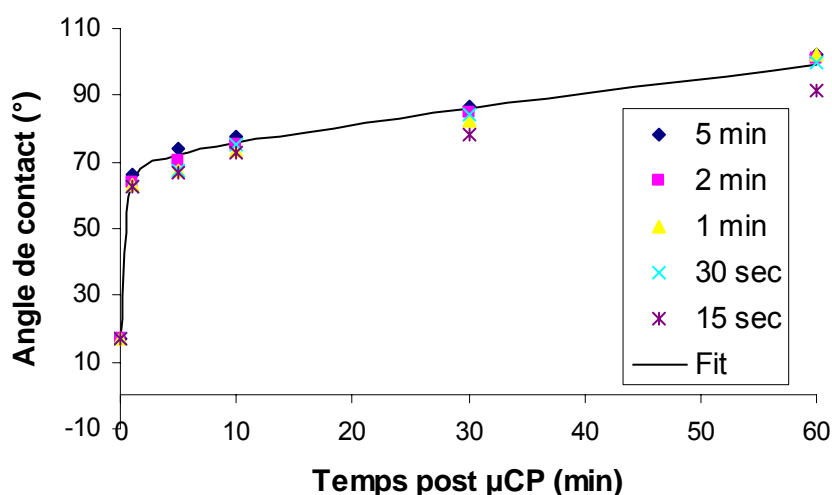
**Figure 6 :** A) Image AFM d'un substrat de verre. La partie située à gauche de la double flèche noir est non contaminée par les résidus de PDMS (Sylgard 184®), la partie à droite est elle contaminée. L'image B) est une section de la zone marqué par une double flèche noir sur de l'image A).

Sur la partie gauche de l'image 6A) nous pouvons observer directement la surface du verre, avec notamment les traces de polissage (lignes verticales noires). La partie droite séparée par une ligne verticale blanche est la zone où le timbre plat de PDMS est entré en contact avec le substrat. Nous pouvons noter que la rugosité de cette zone est bien inférieure à celle du verre nu. La ligne blanche représente la ligne de contact avec le bord du timbre où une grande quantité de contaminant s'accumule. Le profil topographique issu de la figure 6B nous permet de voir plus en détail les différences entre les deux zones. La zone où le contaminant s'est déposé est située environ 2 nm au dessus de la zone vierge même après 24h de contact. La zone d'accumulation des contaminants correspondant à la ligne verticale blanche présente une hauteur de plus de 25 nm mais n'a pas de signification particulière à nos yeux. Afin d'observer clairement la couche de contamination en AFM, des longs temps de contact sont nécessaires afin d'obtenir un contraste topographique significatif. Même avec des temps très longs de contact (24 heures) aucune couche plus épaisse que 2 nm n'a pu être visualisée.

Cependant, en regardant la mouillabilité de la surface du substrat il est possible d'obtenir une signature macroscopique de ce procédé de contamination. En prenant un substrat hydrophile de verre ou de silicium oxydé, nous avons observé un changement radical de l'angle de contact à l'interface substrat-eau dès les temps de contact extrêmement courts de quelques secondes entre le timbre plat en PDMS et le substrat. Afin d'étudier le degré de contamination et l'évolution des résidus de PDMS sur la surface du substrat, nous avons systématiquement mesuré l'évolution de l'angle de contact eau-substrat après contact entre les timbres plats de PDMS et le substrat et ceci pour différentes durées de contact s'étendant de



15 secondes à 5 minutes. Une courbe typique est présentée sur la figure 7. On peut voir que l'évolution de l'hydrophobicité de la surface après contamination par le PDMS montre deux étapes distinctes. Une augmentation très rapide pendant les toutes premières minutes d'un angle  $\alpha_i$ , correspondant à l'angle de contact de la surface oxydée hydrophile initiale, à une valeur intermédiaire de près de  $70^\circ$ . Cette élévation rapide de l'angle de contact est suivie par une évolution beaucoup plus lente qui atteint un état d'équilibre après quelques heures correspondant à un angle de contact final  $\alpha_f$  aux environs de  $90^\circ$ . Nous avons observé cette évolution typique pour beaucoup d'échantillons différents et différentes conditions de réticulation du PDMS comme nous allons le montrer.



**Figure 7 :** Evolution dans le temps de l'angle de contact eau-substrat (substrat de verre) après contact avec un timbre de PDMS (Sylgard 184®) plat. Les différents points expérimentaux correspondent à divers temps de contact : de 15 s à 5 minutes. La courbe de tendance est calculée à partir d'une formule empirique combinant deux exponentielles avec deux constantes de temps, une pour l'évolution rapide observée dans les toutes premières minutes et l'autre pour l'évolution lente au delà de 10 minutes (voir le texte pour des détails). Le PDMS a été réticulé pendant 20 heures à  $25^\circ\text{C}$ . La constante de réorganisation lente des résidus de PDMS sur la surface  $\tau_S$  est de 23 minutes.

Afin de décrire quantitativement la cinétique du processus de contamination induisant l'hydrophobisation progressive de la surface imprimée, nous employons la formule empirique suivante, déjà proposée par Marinova et al. [14] :

$$\alpha(t) = \alpha_f \left[ 1 - \frac{1}{2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_F}\right) - \frac{1}{2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \right]$$

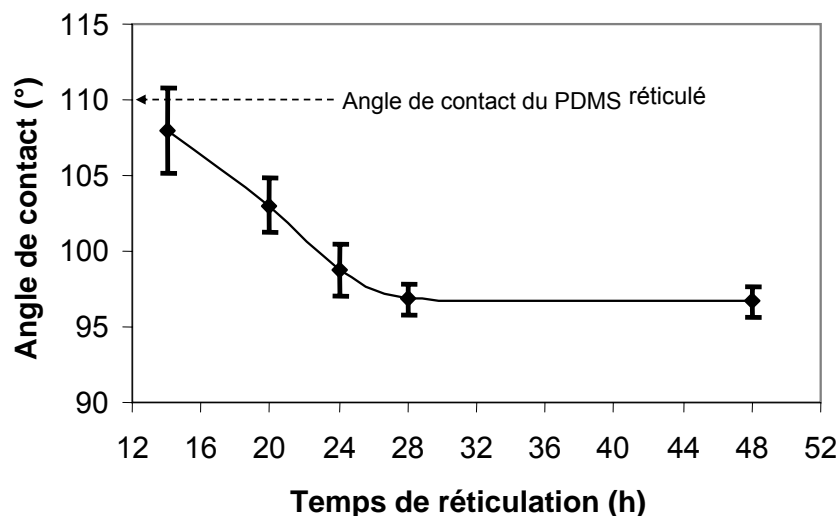
Dans cette expression  $\alpha(t)$  est valeur instantanée de l'angle de contact,  $\alpha_f$  est l'angle de contact final obtenu après des temps très longs,  $\tau_r$  la constante de temps de l'étape rapide et  $\tau_s$  la constante de temps de l'étape terminale lente. La courbe présentée sur la figure 7 nous montre que la cinétique de ces deux étapes d'hydrophobisation est faiblement affectée par le temps de contact du timbre de PDMS avec le substrat de verre, indiquant que le procédé de contamination se produit rapidement pendant le contact et sature après quelques secondes. La combinaison des mesures d'angle de contact et des images AFM conduisent aux premières conclusions que la vitesse de contamination pendant le contact est très rapide (quelques secondes) et sature (un temps de contact plus long n'induit pas un taux significativement plus élevé de contamination). Réciproquement, l'évolution des fragments de PDMS sur le substrat présente une cinétique de réorganisation après le contact qui est beaucoup plus lente et qui peut être décrite en deux étapes : un processus rapide d'hydrophobisation (constante de temps  $\sim 1$  minute) menant à un angle de contact eau-substrat de l'ordre de  $70^\circ$ , suivi d'un processus lent d'hydrophobisation (constante de temps  $\sim 20$  minutes) menant à un angle de contact final eau-substrat de l'ordre de  $90^\circ$ . Pour l'étude suivante, nous choisissons comme bonne mesure du degré de contamination induit par le contact avec le PDMS, la valeur  $\alpha_f$  mesurée après stabilisation du processus d'hydrophobisation induit par la contamination : plus  $\alpha_f$  est élevé, plus la contamination est élevée.

Cette contamination induisant un processus d'hydrophobisation du substrat après contact, est attribuée à la réorganisation des fragments de PDMS sur la surface de l'échantillon. La cinétique de cette remise en ordre dépend évidemment de la nature de la surface (dans ce travail nous avons seulement étudié le silicium oxydé et le verre) et la nature et la taille des fragments du PDMS. Les résultats obtenus peuvent être discutés en utilisant le cadre proposé par Marinova et al. [14] sur l'adsorption de PDMS sur des particules de silice. Dans ce travail, ces auteurs ont mis en évidence en plus de l'adsorption du PDMS sur la surface des particules, un processus d'hydrophobisation très semblable à l'hydrophobisation induite par la contamination dont nous discutons actuellement. Marinova et al. [14] ont rapporté également un processus d'hydrophobisation en deux étapes. Pendant la première étape, ils ont observé une évolution rapide de l'angle de contact dû à la formation de liaisons hydrogène entre les chaînes de PDMS et les groupes silanols de la surface. Pendant la deuxième étape, ils ont rapporté une évolution beaucoup plus lente à température ambiante pour atteindre un angle de contact final dû à la fixation des molécules de PDMS sur les groupes silanols par des réactions chimiques. Cette description semble être appropriée pour expliquer nos propres résultats. Juste après le transfert par contact, les fragments de PDMS

sont faiblement attachés à la surface par des liaisons hydrogène sans cesse interrompues et rétablies par agitation thermique, ayant pour résultat la formation d'une couche mince hydrophobe physisorbée en réorganisation perpétuelle. Cette couche évolue alors lentement par le biais de formation de liaisons chimiques stables entre les molécules de PDMS et les groupes silanols de la surface. Cela entraîne la formation d'une couche chemisorbée où les chaînes de PDMS se retrouvent principalement orientées dans une configuration "fin de chaîne", ce qui provoque une augmentation progressive de l'angle de contact. À la fin du processus une couche mince est formée sur la surface avec un mouvement très faible des chaînes de PDMS dues à leur configuration spatiale et à leur organisation sur la surface. L'angle de contact n'évolue plus dans le temps, il atteint la valeur  $\alpha_f$  précédemment décrite.

### **2-2-2-Influence des conditions de réticulation sur le degré de contamination**

Nous avons d'abord étudié l'impact du temps de réticulation du PDMS sur le degré d'hydrophobisation de la surface observé après la contamination, pour différentes températures de réticulation (température ambiante, 40°C, 60°C, 80°C et 100°C). Dans cette étude nous avons fixé le temps de contact à 1 minute. Ce temps est raisonnable en ce qui concerne la plupart des processus de  $\mu$ CP rapportés dans la littérature et est assez grand pour mesurer des changements sur la surface, nous permettant ainsi d'étudier les mécanismes de la contamination (voir la figure 7). Quelle que soit la température, l'évolution du degré de contamination avec le temps montre toujours le même comportement. Une courbe typique est montrée sur la figure 8 dans le cas d'une réticulation à 60°C.



**Figure 8 :** Dépendance de l'angle de contact final ( $\alpha_p$ ) eau-substrat (substrat de verre) après impression d'un timbre plat de PDMS Sylgard 184® (temps de contact : 1 minute) en fonction du temps de réticulation du PDMS à 60°C. Les barres d'erreur correspondent à différentes mesures combinées avec l'incertitude de mesure de l'angle de contact. La flèche horizontale indique l'angle de contact de l'eau sur le PDMS réticulé.

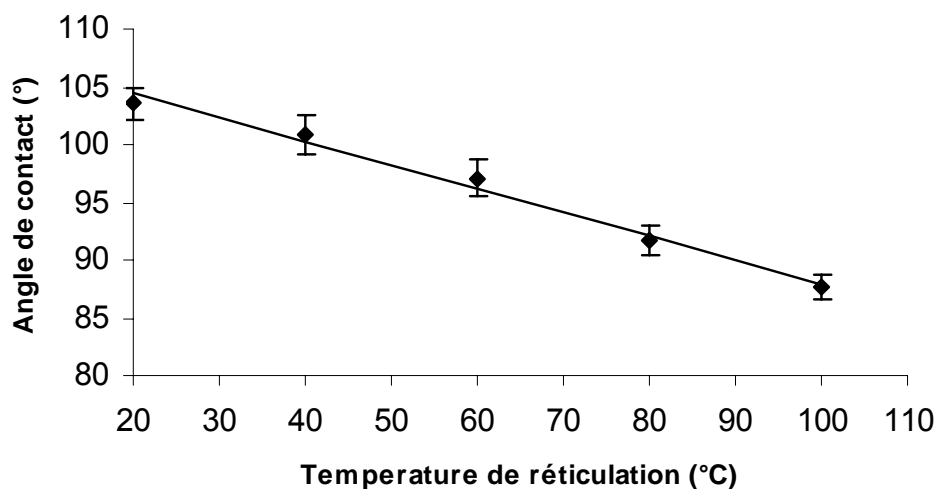
Nous observons que le degré de contamination diminue avec l'augmentation du temps de réticulation, jusqu'à ce qu'il atteigne une valeur minimum au delà de laquelle les accroissements du temps de réticulation n'ont comme conséquence aucun abaissement de la contamination. Dans le cas d'une réticulation à température ambiante, la valeur minimale de l'angle de contact eau-substrat observé après contact entre le timbre et le substrat est de 95°. Un temps de réticulation de 28 heures à température ambiante semble être suffisant pour réduire au minimum la contamination de la surface. Un résultat important de cette étude nous indique que les longs temps de réticulations sont favorables pour réduire au minimum la contamination, il est cependant impossible de l'éviter complètement à cause de l'hydrophobisation instantanée de la surface après contact avec le timbre en PDMS et ceci quelque soit le temps de réticulation. Nous avons observé le même comportement pour les 5 températures de réticulation étudiées. Dans tous les cas, comme sur la figure 8, un plateau est atteint pour des temps de réticulation longs. Ce plateau nous informe sur le degré minimal de contamination pour une température de réticulation donnée.

Ce résultat peut être interprété par une petite augmentation du taux de réticulation avec le temps de cuisson du prépolymère, ayant pour résultat une concentration plus faible des chaînes de PDMS libres à l'intérieur du timbre. Cependant, il est bien connu en chimie des

polymères, que la réticulation ne peut jamais être complète même avec des périodes de réticulation très longues, en raison du manque progressif de mobilité des chaînes. Par conséquent, alors que les longs processus de réticulation sont favorables pour réduire la contamination, il est cependant impossible d'éviter complètement cet effet.

Dans un deuxième temps, nous avons été curieux d'observer l'impact de la température de réticulation sur l'angle de contact minimal (mesuré au plateau) eau-substrat, afin d'élucider quelles sont les meilleures conditions de réticulation pour réduire au minimum la contamination pendant le  $\mu$ CP. Les résultats sont montrés sur la figure 9. De même que précédemment, le temps de contact a été fixé à 1 minute. Pour chaque température, le point expérimental qui est rapporté sur la figure 9 correspond à l'angle de contact minimum mesuré au plateau pour des temps de réticulations long. Cela signifie que pour chaque température de réticulation, le temps correspondant n'est pas le même mais correspond à une situation où la contamination est aussi faible que possible. L'évolution montrée sur la figure 9 démontre clairement l'avantage d'augmenter la température de réticulation pour réduire le degré de contamination. Comme nous l'avons noté précédemment sur l'impact du temps de réticulation, il est impossible d'éliminer complètement toutes les traces de contamination, même à 100°C l'angle de contact minimal eau-substrat mesuré est de 85°.

Le même argument cité précédemment sur l'augmentation du temps de réticulation explique également l'avantage d'augmenter la température de traitement pour réduire au minimum le degré de contamination.



**Figure 9 :** *Dépendance de l'angle de contact eau-substrat (substrat de verre) après impression d'un timbre plat de PDMS (temps de contact : 1 minute) en fonction de la température de réticulation du PDMS. Les barres d'erreur correspondent à différentes mesures combinées avec l'incertitude de mesure d'angle, la ligne est juste un guide pour les yeux.*

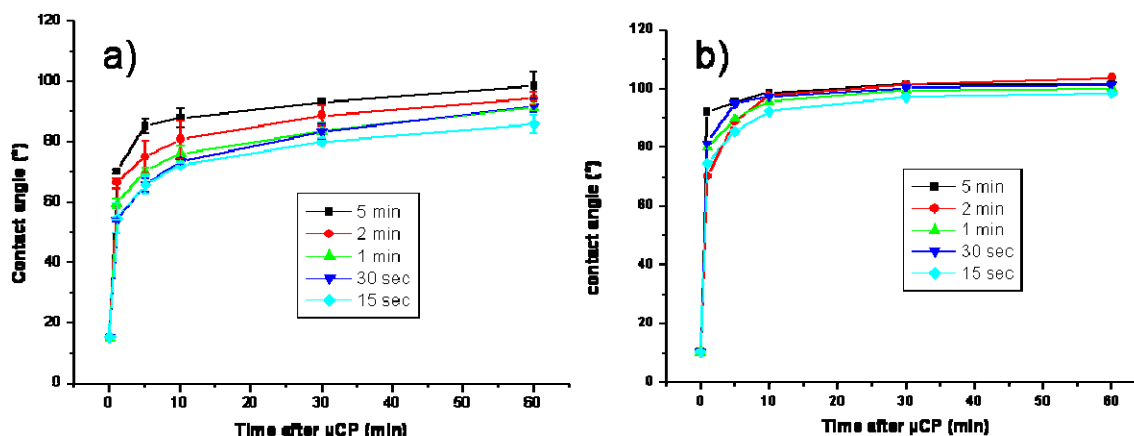
Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'influence des conditions de réticulation sur la cinétique du processus de contamination. Comme précédemment expliqué, cette cinétique est dominée par  $\tau_s$  qui caractérise la capacité des fragments de PDMS à se réarranger pour former un film hydrophobe sur la surface. Le deuxième paramètre important est l'angle de contact final eau-substrat observé une fois que ce processus de remise en ordre est achevé. Ce dernier noté  $\alpha_f$ , donne une indication sur le degré de contamination finalement transférée à la surface lors du contact. Le Tableau 1 présente les valeurs mesurées des  $\tau_s$  et du  $\alpha_f$  pour différentes conditions de réticulation. Il apparaît clairement que le temps de réticulation n'a aucune influence significative sur le paramètre  $\tau_s$ , ce qui indique que la vitesse à laquelle les fragments de PDMS se réarrangent sur la surface ne dépend pas des conditions de réticulation du PDMS. Comme nous l'avons précédemment précisé, selon nous, ce processus à température ambiante dépend seulement de la réactivité chimique de la surface et des fragments de PDMS.

<b>Temps de réticulation (h)</b>	<b>PDMS</b> (T°de réticulation 25°C)	<b>H-PDMS</b> (T°de réticulation 25°C)
2		$\tau_S = 10.83$ $\alpha_f = 105.1$
4		$\tau_S = 10.90$ $\alpha_f = 101.5$
14	$\tau_S = 21.42$ $\alpha_f = 110.0$	
20	$\tau_S = 23.27$ $\alpha_f = 103.5$	
24	$\tau_S = 23.21$ $\alpha_f = 97.6$	
28	$\tau_S = 22.41$ $\alpha_f = 96.4$	

**Tableau 1 :** Influence des conditions de réticulation et de la formulation chimique du PDMS sur les paramètres caractérisant la cinétique de la contamination induisant le processus d'hydrophobisation.  $\alpha_f$  (°) représente l'angle de contact final d'eau-substrat (substrat de verre) après impression avec un timbre plat de PDMS pendant 1 minute et  $\tau_S$  (minute) la constante de temps pour la réorganisation lente des résidus de PDMS sur la surface après impression.

### 2-2-3-Influence de la composition du PDMS

Pour certaines applications du  $\mu$ CP, des matériaux alternatifs au PDMS conventionnel Sylgard® ont été proposés, afin d'améliorer les propriétés mécaniques du timbre. Nous avons fait le choix d'étudier le Hard-PDMS (décrit précédemment). Dans cette nouvelle classe de matériau, le réseau de polymère est plus dense et les fragments de PDMS non impliqués dans les réactions de réticulation qui pourraient contribuer au procédé de contamination sont en moyenne plus courts que ceux du Sylgard®. Afin de comprendre de quelle façon la formulation du PDMS a un impact sur la contamination, nous avons répété les expériences précédentes avec cette formulation. La figure 10 nous montre deux courbes comparatives du processus d'hydrophobisation de surface induit par la contamination : pour le Sylgard® et le Hard PDMS. Le Hard-PDMS réticule beaucoup plus rapidement que le PDMS conventionnel, les conditions de réticulation ne peuvent pas être identiques. La figure 10a) nous montre l'évolution dans le temps de l'angle de contact eau-substrat après impression d'une plaque en verre avec un timbre plat de PDMS fait en Sylgard® réticulé 24 h à 60°C pour différents temps d'impression de 15 s à 5 minutes. La figure 10b) correspond à un timbre semblable en Hard-PDMS réticulé 2 heures à 60°C. La comparaison entre ces deux courbes nous indique que le procédé de contamination se comporte différemment pour les deux types de PDMS.



**Figure 10 :** Evolution dans le temps de l'angle de contact eau-substrat (substrat de verre) après impression d'un timbre de PDMS plat. Les différents points expérimentaux correspondent à divers temps de contact : de 15 s à 5 min. La figure a) correspond à un timbre de PDMS en Sylgard 184® réticulé pendant 24 h à 60°C et la figure b) correspond à un timbre de Hard-PDMS réticulé pendant 2 heures à 60°C.

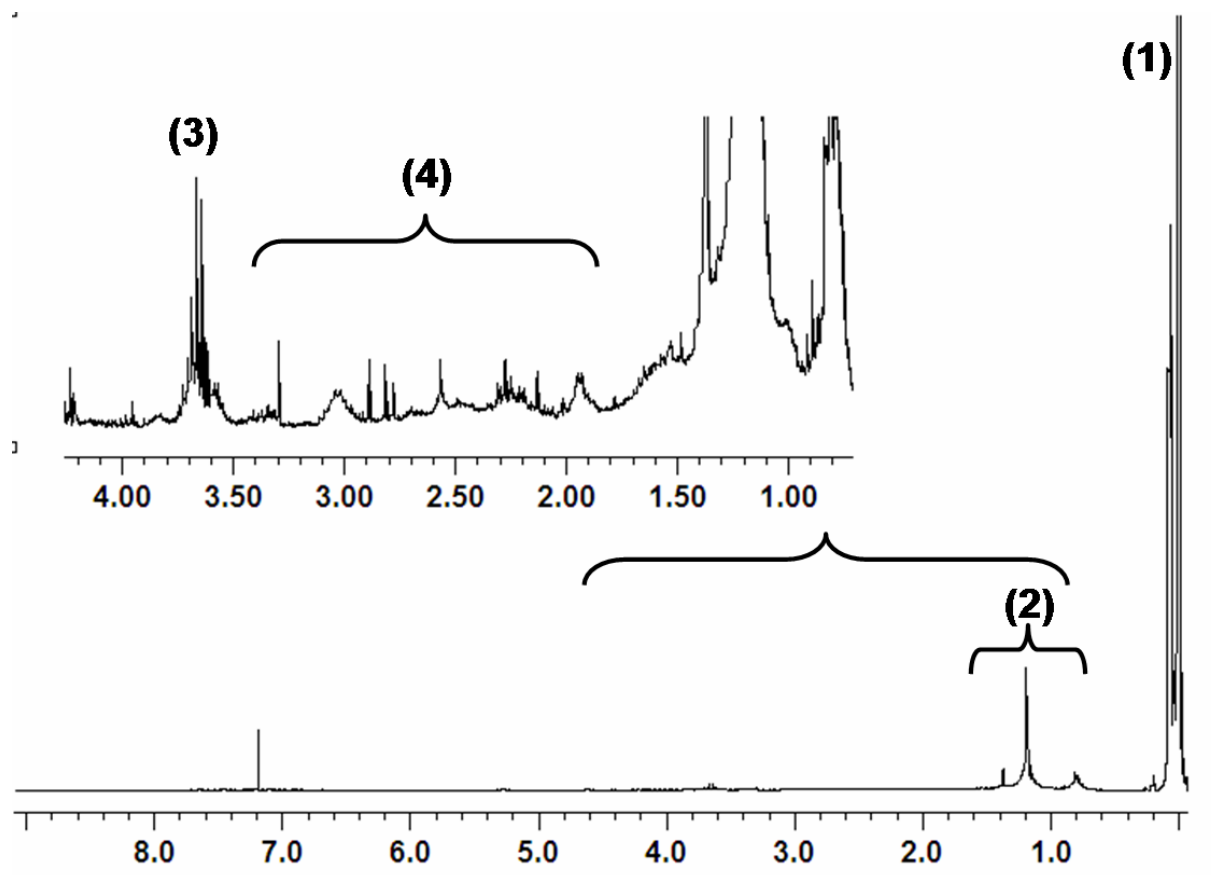
Dans le cas du Sylgard®, le temps de contact influence légèrement le degré de contamination, la courbe prend des valeurs plus grandes à mesure que le temps de contact augmente. Cette dépendance n'est pas significative pour le Hard-PDMS, pour lequel le transfert des fragments de PDMS se produit dans les toutes premières secondes du contact. Une autre différence peut être notée en regardant la cinétique du processus d'hydrophobisation. L'angle de contact atteint un palier beaucoup plus rapidement et l'angle de contact final eau-substrat est en moyenne plus élevé pour le Hard-PDMS. Toutes ces observations expérimentales peuvent être récapitulées comme suit : le Hard-PDMS contamine plus rapidement la surface avec des résidus plus hydrophobes comparés au Sylgard®. Par ailleurs, les molécules transférées pendant le contact se réarrangent plus rapidement que celles déposées par des timbres de PDMS Sylgard®. Nous avons ainsi démontré précédemment que les conditions de réticulation du PDMS Sylgard® n'affectent pas la cinétique du processus de contamination, alors que la reformulation du PDMS, en changeant la taille des chaînes polymères, affecte la cinétique du processus d'hydrophobisation.

Ce résultat est en accord avec l'ensemble de nos interprétations : le Hard-PDMS possède une concentration en fragments de PDMS non réticulés plus élevée et la réactivité de ces fragments avec les groupes silanols de la surface est plus grande.



### 2-2-4-Nettoyage des timbres de PDMS

Pour extraire la majeure partie du contaminant à partir des timbres de PDMS, nous avons utilisé un dispositif appelé Soxhlet qui est généralement utilisé dans la littérature pour extraire des lipides ou des chaînes courtes de polymère de matériaux massifs. Nous avons choisi deux solvants ne déformant pas au point d'endommager irréversiblement le timbre de PDMS : l'éthanol et l'acétate d'éthyle. Avec l'éthanol qui ne provoque qu'un gonflement de 7% en masse du timbre, nous avons pu extraire 3,4% de la masse du timbre employant ce procédé de nettoyage. Dans le cas de l'acétate d'éthyle, un gonflement important du matériel se produit (76% en masse), 4,5% de la masse du timbre a alors pu être extrait. Comme méthode de caractérisation des produits extraits par le procédé de nettoyage, nous avons utilisé une méthode de spectroscopie  $^1\text{H-NMR}$ . Nous n'avons trouvé aucune différence apparente dans la composition des molécules extraites en fonction du solvant utilisé pendant la phase de nettoyage. Sur la figure 11 nous pouvons voir que le matériel extrait contient principalement des molécules de siloxane (~90%) et des chaînes alkyles (<10%), des traces d'amines et d'alcools sont également trouvées. Ces données quantitatives tendent à démontrer qu'une grande quantité de chaînes courtes de polymère, n'ayant pas réagi pendant la réticulation, peuvent être enlevées en grande partie du timbre de PDMS. Nous avons aussi présumé que ce procédé de nettoyage devrait avoir un effet sur le procédé de contamination. Ceci a été vérifié expérimentalement. En effet, après le nettoyage des timbres PDMS avec le Soxhlet il n'était plus possible d'observer une hydrophobisation induite par contamination après le contact du timbre nettoyé avec un substrat de silicium ou de verre. L'évolution dans le temps de l'angle de contact eau-substrat ne peut plus être distinguée de la légère augmentation progressive liée à la contamination inévitable de la surface par l'atmosphère ambiante. L'élimination de la contamination pendant le contact en employant un nettoyage de Soxhlet du timbre élastomère a été obtenue pour les deux types de polymère: Sylgard® et Hard-PDMS. Le plus petit temps de nettoyage étudié est de 6 heures, cela suffit pour éliminer la contamination. Il faut noter que nous sommes les premiers à proposer une méthode de nettoyage efficace [15], les autres tentatives par des nettoyages plus conventionnels permettaient d'atténuer la contamination mais pas de l'éliminer totalement.



**Figure 11 :** Spectre  $^1\text{H-NMR}$  obtenu sur le matériel extrait d'un timbre de PDMS Sylgard 184® pendant un nettoyage au Soxhlet. L'axe horizontal correspond au décalage relatif du champ magnétique résonnant du noyau d'hydrogène impliqué dans des liaisons chimiques par rapport au noyau d'un atome d'hydrogène libre. La résonance prédominante marquée (1) correspond aux groupes siloxanes (Si-Me), les pics visibles dans la région (2) correspondent à des groupes alcane ( $-\text{CH}_3-$ ), les régions (3) et (4) du spectre correspondent respectivement à des groupes amine (NH) et alcool (R-OH).

## 2-3-Propriétés mécaniques du timbre en PDMS

### 2-3-1-Conformation du timbre sur le substrat

Des problèmes apparaissent avec la réduction en taille des motifs du timbre. Le timbre doit être assez souple pour permettre un contact conforme (contact uniforme sur tout le substrat) avec la surface et assez rigide pour que les motifs ne soient pas déformés. Afin de matérialiser ces contraintes, la notion de conformabilité ( $w/E$ ) est souvent utilisée. Elle représente le rapport entre le travail d'adhésion ( $w$ ) et le module de Young ( $E$ ) du timbre,

c'est-à-dire la formation spontanée d'un contact conforme. Dans le tableau 3 sont représentés quelques exemples de conformabilités.

Matériaux constituant le timbre	Module d'Young E (MPa)	Travail d'adhésion sur le verre (or) w (J/m <sup>2</sup> )	Conformabilité sur le verre (or) w/E (nm)
Sylgard 184	2.5	0.1 (0.5)	40 (200)
Matériau A	9.0	0.03 (0.2)	3 (20)
Matériau B	9.7	0.03	3

**Tableau 2 :** Différents paramètres caractérisant les matériaux. Les matériaux A et B (parfois appelé Hard-PDMS) sont des dérivés du Sylgard 184.

Le module de Young est défini comme le rapport de la contrainte exercé sur la déformation induite ( $E=\sigma/\varepsilon$ ). Il représente la rigidité du timbre, plus il est important plus les motifs sont reproduits de façon fidèle. En contrepartie son travail d'adhésion diminue, rendant son contact conforme plus difficile à réaliser. Dans un cas idéal il faudrait un module de Young élevé et un travail d'adhésion élevé. Ceci étant impossible à obtenir, il faut donc choisir un matériau ayant le meilleur compromis conformabilité/module de Young suivant la rugosité du substrat.

Afin de mieux appréhender cette notion de contact conforme, une approche plus formelle va être traitée, ceci va nous permettre de prédire approximativement la conformabilité nécessaire à une rugosité donnée. Cette approche a été développée par Michel et al. [16].

Par la suite, la surface sera considérée comme une sinusoïde à deux dimensions, de longueur d'onde  $\lambda$  et d'amplitude  $\Delta$  :

$$z_{surface} = \Delta \sin\left(\frac{2\pi}{\lambda} x\right) \sin\left(\frac{2\pi}{\lambda} y\right)$$

Pour un timbre initialement plat, un contact conforme avec le substrat est obtenu quand une pression moyenne  $p^*$  est appliquée :

$$p^* = \pi E^* \frac{\Delta}{\lambda}$$

Avec  $E^*$  le module effectif élastique, combinaison des modules d'Young  $E_1$  et  $E_2$ , des modules de Poisson (cisaillement)  $\nu_1$  et  $\nu_2$ , respectivement du timbre et du substrat :

$$E^* = \left[ \frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right]^{-1}$$

Typiquement, le substrat est beaucoup plus dur que le timbre, l'élasticité du substrat peut donc être négligée par rapport à celle du timbre (substrat infiniment dur), d'où :

$$E^* = \left[ \frac{1-\nu^2}{E} \right]^{-1}$$

Lorsque seulement les forces extérieures sont prises en compte, une pression de  $\approx 300$  kPa est nécessaire pour obtenir un contact conforme sur un timbre plat (Module d'Young 2.5 MPa,  $\nu=0.33$ ,  $\Delta=1$  nm,  $\lambda=30$  nm). La pression exercée par le poids du timbre est négligeable : 50 Pa (timbre d'épaisseur 5 mm, de densité 1 g/cm<sup>3</sup>).

Le contact conforme s'établit souvent spontanément par le biais d'interactions avec le substrat. Il est donc important de prendre en compte cet effet. C'est pourquoi  $p^*$  va être comparée avec le travail d'adhésion.

Pour cela, il faut prendre en compte les forces mises en jeu lors du premier contact jusqu'à ce que la pression finale soit obtenue. Le contact initial a lieu au niveau du sommet des sinusoides, pour des petites indentations  $\delta$  ces sommets peuvent être considérés comme des calottes de sphères. Le modèle de Hertz est appliqué pour décrire le contact élastique entre les sphères et la surface plane du timbre. Il est possible de compenser une certaine profondeur d'indentation par déformation élastique du timbre. La profondeur d'indentation compensable  $\delta_c$  est reliée au poids appliqué  $P$  par la relation :

$$\delta_c = \left( \frac{9P^2}{16rE^*} \right)^{1/3} \quad (1)$$

Où  $r$  est le rayon des sphères :

$$r = \frac{\lambda^2}{4\pi^2\Delta} \quad (2)$$

$$\text{Posons : } \tilde{p}(\delta) = \frac{P}{\lambda^2} \quad (3)$$

En combinant (1), (2) et (3), on obtient :

$$\tilde{p}(\delta_c) = \frac{2E^*}{3\pi\lambda\sqrt{\Delta}} \delta_c^{3/2}$$

Cette équation est valable seulement pour des petites indentations, donc, en ajoutant un terme de second ordre à  $\tilde{p}$ , une estimation plus complète de la variation de pression est

obtenue. La pression finale à exercer est aussi connue ( $p^*$  correspond à une déformation  $\delta=2\Delta$ ), on obtient donc :

$$\bar{p}(\delta_c) = \tilde{p}(\delta_c) + C\delta_c^2 = \frac{2E^*}{3\pi\lambda\sqrt{\Delta}}\delta_c^{3/2} + \left(\frac{\pi}{4} - \frac{\sqrt{2}}{3\pi}\right)\frac{E^*}{\lambda\Delta}\delta_c^2$$

Ainsi, le travail de conformation c'est-à-dire le travail nécessaire pour obtenir un contact conforme entre le timbre et la surface est donné par :

$$w_c = \int_0^{2\Delta} \bar{p}(\delta_c) d\delta = \left[ \frac{16\sqrt{2}}{15\pi} + \frac{8}{3} \left( \frac{\pi}{4} - \frac{\sqrt{2}}{3\pi} \right) \right] \frac{E^* \Delta^2}{\lambda}$$

$$\approx 2.2 \frac{E^* \Delta^2}{\lambda}$$

L'amplitude pouvant être compensée par un travail d'adhésion  $w$  donné est donc :

$$\Delta \approx \sqrt{\frac{w\lambda}{2.2E^*}} \quad (4)$$

Pour obtenir une valeur plus précise du travail de conformation, il faut faire une analyse de Fourier de la topographie de surface. Un spectre de rugosité est obtenu avec  $\Delta_n$  et  $\lambda_n$  :

$$w_c \approx 2.2E^* \sum_n \frac{\Delta_n^2}{\lambda_n}$$

Finalement, si le travail d'adhésion  $w$  est supérieur à celui de conformation  $w_c$ , alors le contact conforme a lieu. Ceci est une approximation car nous avons fait le calcul en ne considérant aucune force ajoutée.

A titre d'exemple pour du PDMS classique (Sylgard184®) la rugosité de surface compensée par le polymère est de  $\Delta \approx 22$  nm (relation 4 avec :  $w=0.1$  J/m<sup>2</sup>,  $\lambda=30$  nm,  $E^*=2.805$  MPa). Pour une rugosité faible comme celle d'un wafer de silicium (9 Å) ou d'une lame utilisée lors des différentes expériences réalisées (lame de verre : 15 nm), le travail d'adhésion est supérieur à celui de conformation, il n'est donc pas utile d'exercer une force de pression sur le timbre.

Cependant lorsque le timbre est encré avec une molécule s'adsorbant à sa surface son travail d'adhésion change (changement d'énergie de surface). Cela peut changer la capacité de conformation du PDMS et il est très difficile de simuler ce changement. Dans la

grande majorité des encres (molécules) la différence est minime et ne change en rien le comportement du timbre.

Ce résultat en accord avec ce que nous observons dans la pratique, nous permet de conclure sur le type de PDMS à utiliser par la suite. En effet, lorsque des substrats possèdent des rugosités importantes comme le verre, nous utiliserons un PDMS peu rigide avec une conformabilité importante comme le Sylgard 184®. Avec des substrats aux rugosités beaucoup plus faibles comme le silicium, nous utiliserons des PDMS du type Hard-PDMS avec des conformabilités plus faible et une rigidité plus importante, ceci pour obtenir des résolutions plus grandes que dans le cas précédent.

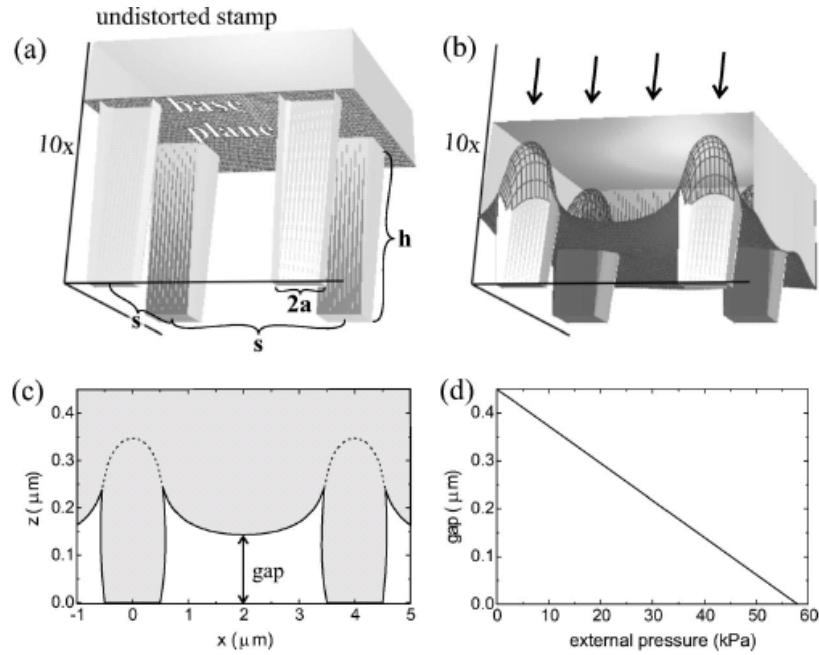
### **2-3-2-Effondrement du timbre**

Un des problèmes fréquemment rencontré pendant le  $\mu$ CP est l'effondrement des motifs ou « collapse ». Deux notions sont importantes : le facteur de remplissage (rapport entre la surface des structures et la surface du timbre exprimé en %) et le facteur de forme (rapport entre la hauteur des structures et leur pas  $h/s$ ).

Deux types de déformations peuvent être regroupés sous le terme de collapse : le « lateral collapse » et le « Buckling » dues à un facteur de forme des structures du timbre trop élevé ( $h/s > 2$ ), le « roof collapse » dû à un facteur de forme trop faible ( $h/s < 0,2$ ) [15]. Ces deux types d'effondrement (collapse) des structures des timbres sont essentiellement dus à la géométrie et aux dimensions de ces dernières. Nous allons nous intéresser dans un premier temps au « roof collapse » souvent appelé simplement « collapse » ou « sagging ».

#### **Roof collapse**

Il intervient lorsqu'une pression extérieure trop importante est appliquée sur le timbre ou/et lorsque les structures du timbre ne sont pas assez hautes par rapport à leur dimension (hauteur, surface,...). Dans ce contexte les zones situées entre les structures du timbre se déforment et entrent en contact avec le substrat (figure 12b et 12c), cela produisant des dépôts de molécules indésirables.



**Figure 12 :** Déformation d'un timbre possédant des plots carrés d'un diamètre  $2a=1 \mu\text{m}$  et de hauteur  $h=0,45 \mu\text{m}$ , espacé de  $s=4 \mu\text{m}$  (facteur de remplissage 6,25%). (a) Timbre non déformé. Les dimensions de l'axe  $z$  ont été déformées d'un facteur 10 pour une meilleure lisibilité. (b) Le même timbre que précédemment mais déformé par une pression extérieure de 40kPa. (c) Coupe latérale de (b). (d) L'espace entre le timbre et le substrat est fonction de la pression appliquée. Le collapse apparaît à une pression de  $\bar{p}_{collapse} = 58\text{kPa}$ . Les paramètres du polymère utilisé pour le timbre (Sylgard 184®) sont  $E=2,5\text{MPa}$ ,  $\nu=0,33$  [16].

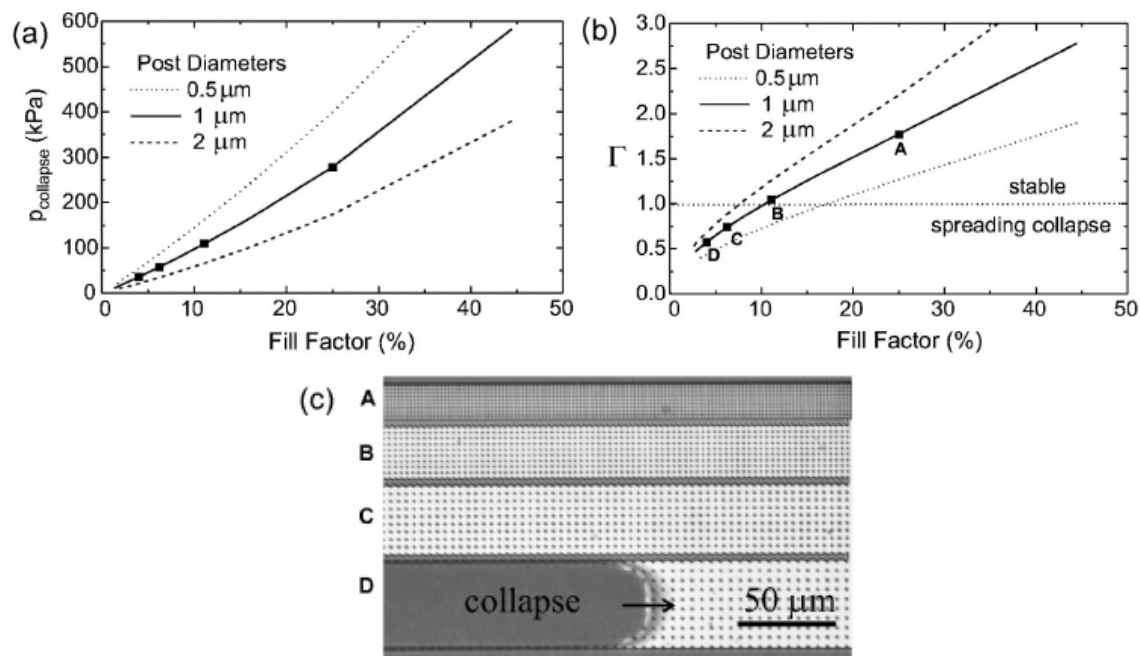
Ce type de déformation a été étudié en détail par Bietsch et al. [16]. Il a notamment démontré que les simples forces d'adhésion pouvaient entraîner le collapse du timbre. Il convient donc d'introduire un critère de stabilité du timbre  $\Gamma$ , qui évalue la stabilité des structures par rapport aux forces d'adhésion. Il est défini comme suit :

$$\Gamma = \frac{s^2 \cdot \bar{p}_{collapse}}{\pi \cdot s \cdot w} = \frac{s \cdot \bar{p}_{collapse}}{\pi \cdot w},$$

Où  $\bar{p}_{collapse}$  est la pression extérieure appliquée pour obtenir le collapse,  $s$  le pas entre les structures et  $w$  la force d'adhésion.

Ainsi une valeur de  $\Gamma$  inférieure à un signifie que le timbre n'est pas stable et que le phénomène de collapse va se propager à l'ensemble du timbre. Pour prévenir cet état il est conseillé soit d'augmenter le facteur de remplissage du timbre et/ou soit d'augmenter le facteur de forme des structures. Il est admis que les facteurs de formes inférieures à 0,2 ne sont pas stables. La figure 13 reproduit une étude menée par Bietsch et al. sur la stabilité des timbres en fonction de  $\Gamma$  et du facteur de remplissage. Ce phénomène peut de plus être

fortement diminué par l'utilisation du Hard-PDMS ou d'un timbre hybride,  $\Gamma$  dépendant linéairement des paramètres du matériau  $E/w$ .



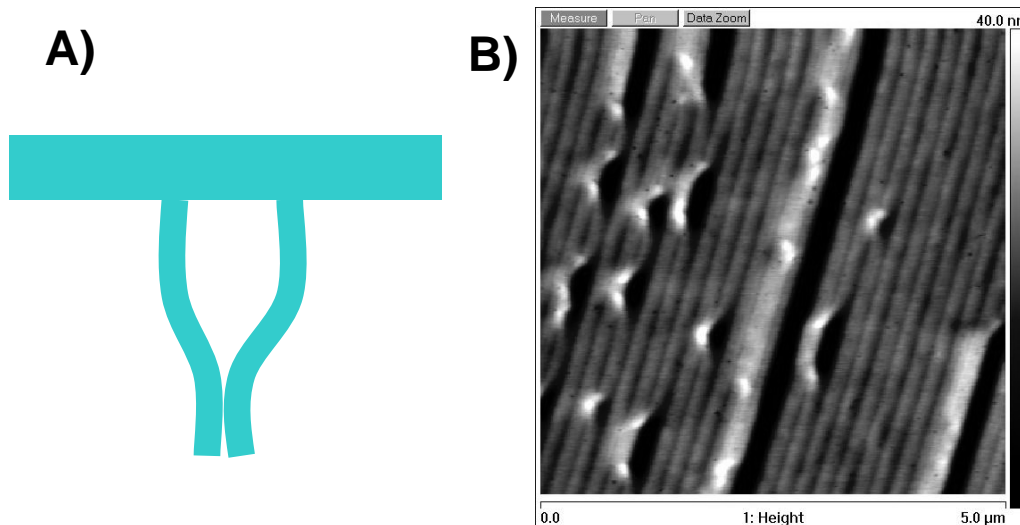
**Figure 13 :** Critères de stabilité des structures du timbre en fonction du facteur de remplissage. (a) Pression de collapse et (b) paramètre de propagation du collapse  $\Gamma$  calculé pour un réseau de plots carrés de diamètre 0,5  $\mu\text{m}$  (ligne pointillé fin), 1  $\mu\text{m}$  (ligne continue), 2  $\mu\text{m}$  (pointillé épais) et une profondeur uniforme de 0,45  $\mu\text{m}$ . Le polymère utilisé est le Sylgard 184®, le travail d'adhésion est celui observé sur le verre. Les structures carrées (noté A-D sur (b)) représentent les résultats expérimentaux donné en (c) : Image optique d'un timbre structuré en contact conforme avec un substrat de verre. Les parties A-D du timbre possèdent différents taux de remplissage. Les différents espacements entre les structures de A à D sont respectivement 2, 3, 4 et 5  $\mu\text{m}$ . La hauteur des structures est de 0,45  $\mu\text{m}$ , le collapse à été déclenché par une force extérieure appliquée sur un bord du timbre. La partie D du timbre (facteur de remplissage 4%) est partiellement collapsée, avec un front de collapse qui avance de la gauche vers la droite [16].

### Latéral collapse et Buckling

Contrairement au roof collapse le latéral collapse et le Buckling ont lieu lorsque le facteur de forme est grand ( $h/2a > 2$  pour du PDMS). Dans le cas du latéral collapse les problèmes mécaniques interviennent avant le contact entre le timbre et le substrat. Dès le démoulage du timbre les structures se déforment et se « collent » les unes aux autres à cause de l'énergie de surface du PDMS et des forces de capillarités. La figure 14 (A et B) nous

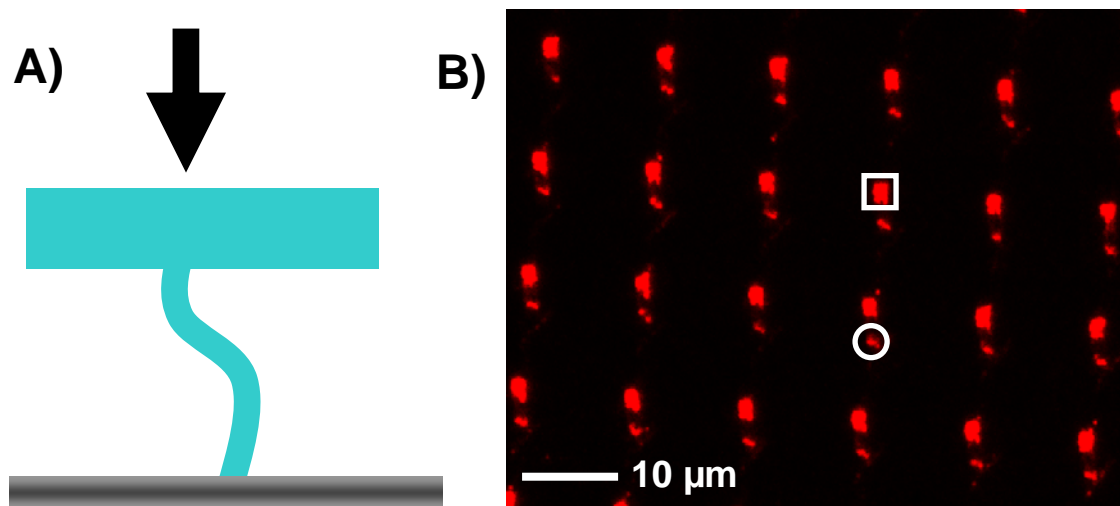


montre un exemple courant de latéral collapse de structure ayant un facteur de forme trop élevé.



**Figure 14 :** *A) Représentation schématique du collapse latéral d'un timbre de PDMS. B) Image AFM du collapse latéral d'un timbre de PDMS. Réseau de lignes de 100 nm au pas de 200 nm avec un facteur de forme  $h/2a=2,5$ .*

Le Buckling est assez différent du latéral collapse il intervient seulement lors du contact entre le timbre et le substrat. Généralement une pression extérieure ou une force d'adhésion trop importante déforme les structures (figure 15 A). Celle-ci trop contrainte, tend à reprendre une forme plus stable. Il s'en suit un saut du timbre ou des motifs, provoquant un double dépôt de molécule en deux endroits proches (figure 15 B).

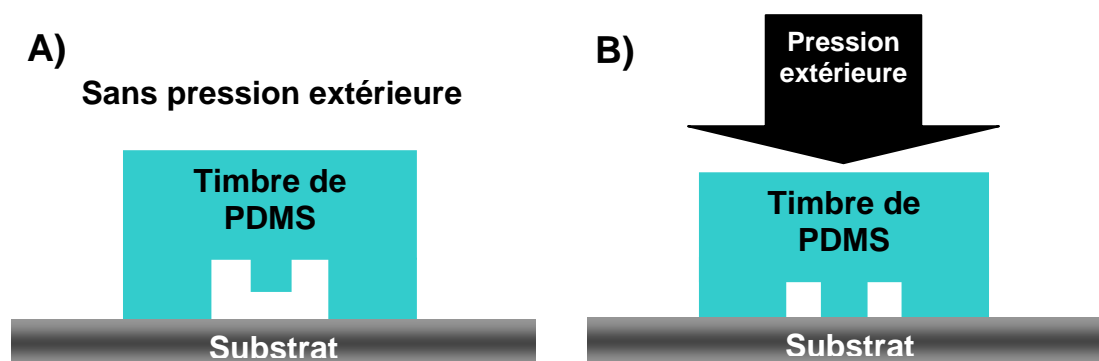


**Figure 15 :** A) Représentation schématique du Buckling d'un timbre de PDMS. B) Image en Epifluorescence de BSA rodhamine déposé par  $\mu$ CP sur une lame de verre. Le cercle entoure le type de dépôt ou le premier contact avant Buckling à eu lieu. Le carré entoure le type de dépôt après relâche de la contrainte due au Buckling.

Pour éviter ces deux types de déformations mécaniques (latéral collapse et Buckling), il suffit soit d'augmenter le module de Young de timbre soit de diminuer le facteur de forme, en général il doit être inférieur à 2 pour du Sylgard® 184. Il faut noter que le Buckling peut tout de même survenir pour des facteurs de forme inférieurs à 2 si une pression extérieure trop importante est appliquée.

### Utilisation des contraintes mécaniques

Les phénomènes d'effondrement tel le « roof collapse » peuvent être utilisés intelligemment en notre faveur. Un des problèmes majeurs du  $\mu$ CP est l'impossibilité de déposer plusieurs molécules différentes en un même contact. La solution généralement proposée est de faire plusieurs dépôts consécutifs avec deux timbres différents, cela incluant une étape d'alignement de plus en plus imprécise avec la diminution en taille des structures du timbre. Une solution plus originale a été proposée par Chalmeau et al. [17] utilisant le « roof collapse » comme moyen de dépôt de deux molécules en une seule étape sans alignement. Pour ce faire un timbre avec deux types de structures différentes possédant une hauteur différente est utilisé. Ensuite le timbre est amené en contact avec le substrat, seules les structures les plus hautes du timbre entrent en contact (figure 16a). Une pression extérieure est ensuite appliquée pour provoquer un roof collapse amenant les structures les moins hautes en contact avec le substrat (figure 16b).



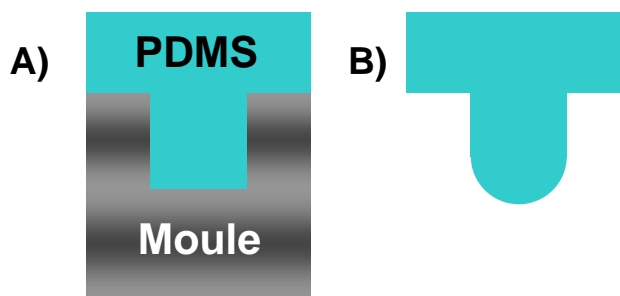
**Figure 16 :** A) Timbre avec deux niveaux de structures en contact conforme avec le substrat, sans force extérieure appliquée. Seul le premier niveau de structure est en contact avec le substrat. B) Une pression extérieure est appliquée uniformément sur le timbre. Celui-ci se déforme amenant le deuxième niveau de structure en contact avec le substrat.

Cette méthode de dépôt demande toutefois un encrage du timbre particulier, une grande partie de la technicité repose dans cette étape. En effet, c'est elle qui permet d'obtenir un timbre encré sur chaque niveau avec des molécules différentes.

### 2-3-3-« Retrait thermochimique » du PDMS

D'autres phénomènes de déformation existent, ils ne sont pas dus à des problèmes de stabilité mécaniques mais de nature « thermochimique ». Ils sont donc inhérents à la réticulation du PDMS. Nous avons fait le choix de les classer en deux types : le premier type appelé arrondissement des structures et le second appelé simplement retrait thermochimique.

L'arrondissement entraîne une déformation des bords des structures du timbre. Ces dernières s'arrondissent au niveau des arêtes (figure 17), à l'échelle du micron la déformation est négligeable. Mais pour des motifs nanométriques l'arrondissement est à prendre en compte, il réduit la largeur de façon significative [18]. Par exemple une structure de largeur 100 nm est réduite de 5 à 25 nm à cause de l'arrondissement. La valeur de la réduction en taille dépend du polymère et dans une moindre mesure des paramètres de réticulation. Par exemple le Hard-PDMS est 5 fois moins sensible au phénomène que le Sylgrad 184® grâce à ces chaînes polymères beaucoup plus petites.

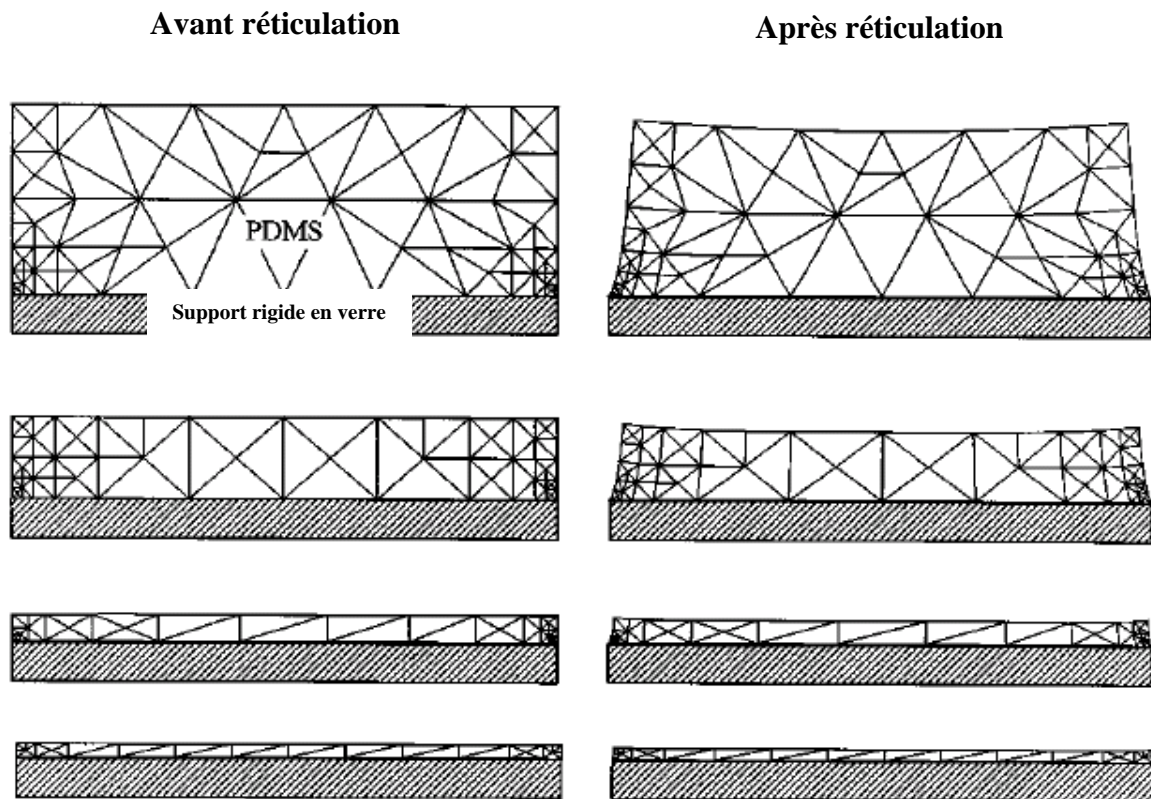


**Figure 17 :** A) représentation schématique d'un timbre de PDMS réticulant sur un moule. Les structures sur le moules sont à angle droit. B) Le timbre est réticulé puis démoulé, les arêtes des structures sont arrondies.

Cet arrondissement est très largement compensé par la déformation mécanique des structures nanométriques lors du contact entre le timbre et le substrat. Cela conduit à une conservation de la taille de la structure créée dans le moule. Mais la répartition de la pression sur la structure n'est pas homogène et cela est à prendre en compte pour comprendre la forme de certain dépôt de molécules.

Les structures du timbre sont fortement contraintes au niveau des arêtes à cause du retrait thermochimique des chaînes de polymères (de 1 à 5% de retrait sur le volume entier) et principalement des énergies de surfaces. En effet le timbre cherche à minimiser son énergie de surface et cela conduit à une réduction de sa surface de contact avec le milieu extérieur, d'où l'arrondissement des angles droits.

Le deuxième type de déformation non mécanique du timbre à lieu lui aussi pendant la réticulation. Il est simplement appelé retrait thermochimique, car il est dû à un rétrécissement au cours de la réticulation d'un volume total du timbre de 1 à 5% suivant le type de PDMS. Ce phénomène est dû à la diminution de la distance moyenne entre les chaînes de polymère pendant la transition liquide-solide. Cela est d'autant plus vrai si le timbre est fixé à un support arrière (de manière covalente ou électrostatique), car cela augmente la contrainte exercé sur le timbre, celui-ci ne pouvant se déformer au niveau de la zone de contact en le support et lui même. Nous pouvons voir de plus sur la simulation du retrait thermochimique réalisée par Giurg et al. (Figure 18) [19] que l'ampleur de la déformation diminue avec l'épaisseur du timbre de PDMS.



**Figure 18 :** Simulation du retrait thermochimique en fonction de l'épaisseur du timbre, avant et après réticulation. La partie gauche représente un timbre en PDMS déposé sur un support rigide en verre. Nous pouvons noter qu'aucune déformation n'est présente quelle que soit l'épaisseur du timbre. La partie droite représente le même timbre après réticulation. Nous pouvons constater que la déformation diminue avec la diminution en épaisseur du timbre.

### Résumé des contraintes mécaniques

Ces études nous montrent que nous ne pouvons pas utiliser n'importe quelle forme de structure. Nous sommes contraints par les propriétés mécaniques du polymère utilisé et les facteurs de remplissage et de forme. Par la suite tous les moules et timbres utilisés respecteront, les contraintes de forme  $0,2 < h/s < 2$ ,  $h/2a < 2$ ,  $\Gamma > 1$  et un facteur de remplissage le plus élevée possible.

De plus seuls les bords du Timbre en PDMS sont déformés par le retrait thermochimique, il convient donc de découper après réticulation les bords déformés du timbre en PDMS. Nous obtenons ainsi un timbre plat et non déformé.

## Conclusions du chapitre

Le chapitre 2 de cette thèse s'est concentré sur l'importance du choix du matériau polymérique constituant le timbre ainsi que des motifs topographiques inscrits sur sa surface. Les contraintes de stabilité mécanique nous imposent de sélectionner une architecture de timbre qui compte-tenu des facteurs de formes choisis pour les motifs du timbre, permette d'obtenir un timbre mécaniquement le plus stable possible. Le matériau de base pour réaliser les timbres souples reste le Poly(DiMethylSiloxane) ou PDMS dont la surface de nature hydrophobe peut être modifiée afin d'accroître sa mouillabilité. Toujours lié au choix du PDMS, nous avons démontré les effets de la contamination des fragments non réticulés de PDMS lors du contact entre le timbre et le substrat. En effet, nous observons que lors du contact d'un timbre de PDMS non encré avec un substrat, quelques molécules sont transférées du timbre vers la surface de l'échantillon. Cette contamination a pour principal effet d'augmenter l'hydrophobicité de la surface ce qui oriente l'interprétation vers un effet de contamination de la surface par des fragments de PDMS hydrophobes. Nous avons pu réaliser une analyse chimique de la composition de ces fragments contaminants qui sont principalement des petites molécules de siloxane  $(\text{Si-O-SiMe}_3)_4$  et dans une moindre mesure des fragments de chaînes. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié et optimisé une méthode pour nettoyer le timbre après réticulation. L'utilisation d'un système de type « Soxhlet » et de solvants polaires tels que l'éthanol s'est avérée particulièrement efficace afin d'éliminer la plupart des fragments de PDMS d'un timbre après quelques heures de nettoyage. Nous avons prouvé que dans ce cas-ci il devient possible de réaliser un processus de  $\mu\text{CP}$  libre de toute contamination.

---

## Références :

- [1] D.R. Barbero, M.S. M. Saifullah, P. Hoffmann, H.J. Mathieu, D. Anderson, G.A.C. Jones, M.E. Welland, and U. Steiner, High Resolution Nanoimprinting with a Robust and Reusable Polymer Mold, *Adv. Funct. Mater.*, 17, pp. 2419–2425, **2007**.
- [2] B Michel, A Bernard, A Bietsch, E Delamarche, M Geissler, D Juncker, H Kind, JP Renault, H Rothuizen, H Schmid, P Schmidt-Winkel, R Stutz, H Wolf: Printing meets lithography: Soft approaches to high-resolution patterning, *IBM J Res & Dev*, 45(5): pp. 697-719, **2001**.
- [3] B. Viallet, C. Martin, L. Ressier, J. Grisolia, J-P Peyrade. Localisation of octadecyltrimethoxysilane self-assembled monolayers by combination of bottom-up and top-down approaches. *Silanes and Other Coupling Agents*, Vol. 4, pp. 1–9, **2006**.
- [4] Stein et al. In Situ Determination of the Active Catalyst in Hydrosilylation Reactions Using Highly Reactive Pt(0) Catalyst Precursors, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, pp. 3693, **1999**.
- [5] H. Schmid and B. Michel, Siloxane Polymers for High-Resolution, High-Accuracy Soft Lithography, *Macromolecules*, 33, pp. 3042-3049, **2000**.
- [6] D.J Graham, D.D. Price, Ratner, B.D. Solution Assembled and Microcontact Printed Monolayers of Dodecanethiol on Gold: A Multivariate Exploration of Chemistry and Contamination, *Langmuir*, 18, pp. 1518-1527, **2002**.
- [7] I Böhm, A Lampert, M Buck, F Eisert, M Grunze. A spectroscopic study of thiol layers prepared by contact printing *Appl. Surf. Sci.*, 141, pp. 237-243, **1999**.
- [8] K Glasmästar, J Gold, AS Andersson, D.S Sutherland, B Kasemo. Silicone Transfer during Microcontact Printing *Langmuir*, 19, pp. 5475-5483, **2003**.
- [9] P Asberg, K.P.R Nilsson, O Inganäs. Surface Energy Modified Chips for Detection of Conformational States and Enzymatic Activity in Biomolecules, *Langmuir*, 22, pp. 2205-2211, **2006**.
- [10] R.B.A Sharpe, D Burdinski, C Van der Marel, J.A.J Jansen, J Huskens, H.J.W Zandvliet, D.N Reinhoudt, B Poelsema. Ink dependence of poly(dimethylsiloxane) contamination in microcontact printing *Langmuir*, 22, pp. 5945-5951, **2006**.

[11] J.P Renault, A Bernard, A Bietsch, B Michel, H.R Bosshard, E Delamarche, M Kreiter, B Hecht, U.P Wild. Fabricating Arrays of Single Protein Molecules on Glass Using Microcontact Printing *J. Phys. Chem. B*, 107, pp.703-711, **2003**.

[12] X. J Wang, M Ostblom, T Johansson, O Inganäs. PEDOT surface energy pattern controls fluorescent polymer deposition by dewetting, *Thin Solid Films* 449, pp. 125-132, **2004**.

[13] Asberg, P.; Nilsson, K.P.R.; Inganäs, O. Surface energy modified chips for detection of conformational states and enzymatic activity in biomolecules *Langmuir*, 22, pp. 2205-2211, **2006**.

[14] K.G Marinova, D Christova, S Tcholakova, E Efremov, N.D Denkov. Hydrophobization of Glass Surface by Adsorption of Polydimethylsiloxane (PDMS), *Langmuir*, 21, pp. 11729-11737, **2005**.

[15] C. Thibault, C. Séverac, C. Vieu and M. Mauzac, Poly(dimethylsiloxane) Contamination in Micro-Contact Printing and its influence for patterning oligonucleotides, *Langmuir*, vol. 23 Iss. 21, pp. 10706-10714, **2007**.

[16] A. Bietsch, B. Michel, Conformal contact and pattern stability of stamps used for soft lithography, *J. of Appl. Phys.*, vol. 88, nb. 7, **2000**.

[17] J. Chalmeau, C. Thibault, F. Carcenac, C. Vieu, Printing self-aligned patterns of multiple biomolecules in one step: Submitted to *Appl. Phys. Letters* **2007**.

[18] K.G. Sharp, G.S. Blackman, N.J. Glassmaker, A. Jagota, and C.Y. Hui, Effect of Stamp Deformation on the Quality of Microcontact Printing: Theory and Experiment, *Langmuir*, 20, pp. 6430-6438, **2004**.

[19] J.A. Rogers, K.E. Paul, and G.M. Whitesides, Quantifying distortions in soft lithography, *J. Vac. Sci. Technol.*, B 16.1, **1998**.





# Chapitre III

## Encrage des timbres

### Sommaire

<b>1-PREPARATION DES SURFACES .....</b>	<b>104</b>
1-1-PLASMA .....	104
1-1-1- <i>Impact du processus de nettoyage sur la persistance du traitement de surface par plasma</i>	
<i>O<sub>2</sub> des timbres de PDMS .....</i>	<i>105</i>
1-1-2- <i>Effet du plasma sur le PDMS.....</i>	<i>107</i>
1-2-TRAITEMENTS CHIMIQUES .....	108
<b>2-ENCRE MOLECULAIRE .....</b>	<b>110</b>
2-1-MOLECULES BIOLOGIQUES (SOLVANTS PROTIQUES).....	110
2-1-1- <i>Adsorption de l'ADN sur un timbre de PDMS.....</i>	<i>111</i>
2-1-2- <i>Impact du processus de nettoyage du PDMS sur l'encrage des molécules d'ADN .....</i>	<i>113</i>
2-1-3- <i>Adsorption des protéines sur un timbre de PDMS.....</i>	<i>117</i>
2-2-MOLECULES SYNTHETIQUES (SOLVANTS POLAIRES APROTIQUES) .....	118
2-2-1- <i>Molécules inférieures au nm.....</i>	<i>119</i>
2-2-2- <i>Molécules synthétiques hydrophiles .....</i>	<i>120</i>
2-2-3- <i>Molécules synthétiques hydrophobes.....</i>	<i>123</i>
<b>3-SUBSTRATS .....</b>	<b>125</b>
3-1-SILANES.....	125
3-2-DENDRILAMES .....	126
<b>REFERENCES : .....</b>	<b>132</b>

Nous disposons depuis le chapitre 2 des connaissances sur les outils (moules et timbres élastomériques) et les contraintes matérielles pour réaliser des dépôts de molécules par  $\mu$ CP. Ce chapitre sera orienté sur l'étape suivante du  $\mu$ CP: l'encrage au sens large. Par encrage au sens large nous entendons l'absorption des molécules (encre) sur la surface du timbre, mais aussi la possibilité de les déposer par la suite sur le substrat. Cette étape est cruciale et fait appel à une cascade d'interactions conduisant au dépôt des molécules sur le substrat. Outre la quantité de molécules absorbées à la surface du timbre cette étape influence fortement la nature du dépôt :  $\mu$ CP ou  $\mu$ TM (cf. chapitre1).

Pour obtenir un  $\mu$ CP de qualité il faut obligatoirement respecter deux règles. Premièrement, une interaction si possible à longue portée doit s'établir entre l'encre et la surface du timbre de PDMS, permettant un encrage homogène et dense. Deuxièmement lors du contact entre le timbre et le substrat une interaction forte entre l'encre et ce dernier doit avoir lieu. Cela permet de transférer l'encre de la surface du timbre au substrat, des liaisons covalentes sont souvent créées à cet instant. Il faut donc que l'interaction encre/substrat soit supérieure à l'interaction encre/PDMS. Afin de respecter ce schéma de cascade d'interactions, il est parfois nécessaire de changer l'énergie de surface du timbre. Ces méthodes et leurs effets sur le timbre vont maintenant être présentés.

## 1-Préparation des surfaces

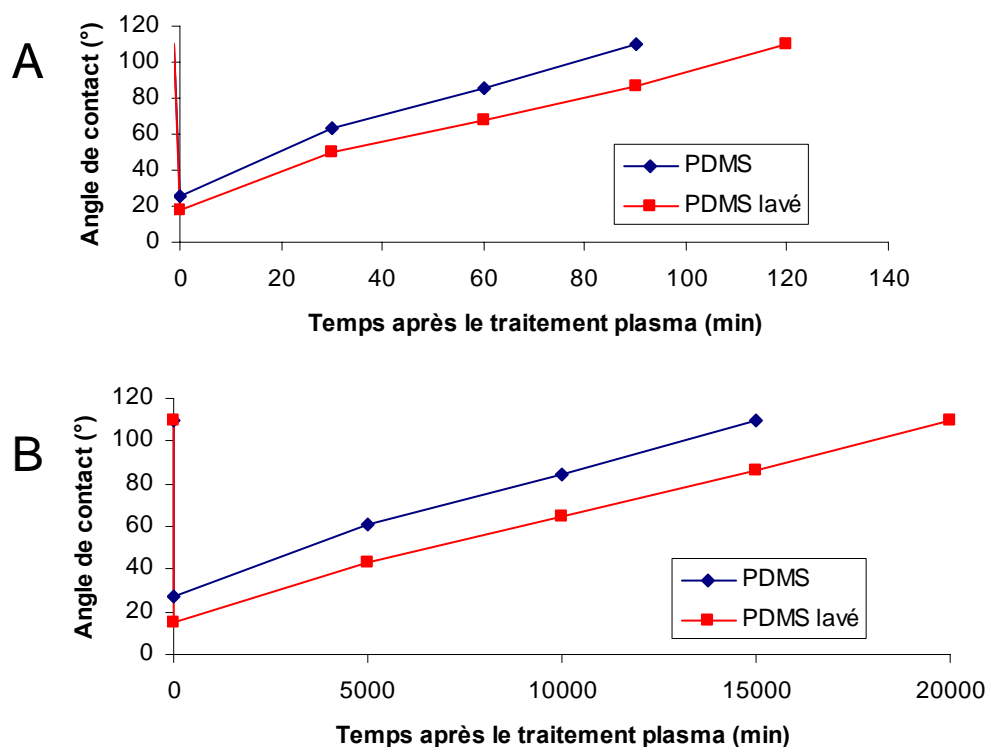
### 1-1-plasma

Un procédé très commun pour modifier l'énergie de surface des timbres en PDMS consiste à l'exposer brièvement à un plasma oxygène, conférant à la surface du timbre des propriétés hydrophiles [1]. Ce processus est d'une importance cruciale pour fabriquer des canaux microfluidiques avec des matériaux tels que le PDMS, ou pour adapter les timbres de PDMS à des solvants polaires pour le  $\mu$ CP. Le mécanisme fondamental changeant l'énergie de surfaces du PDMS consiste en la formation d'une couche de quelques nanomètres de profondeur d'oxyde de silicium. Cette couche est facilement mouillable avec des solvants polaires. Ce processus permet également d'enlever les fragments résiduels de PDMS présents à la surface, diminuant de cette manière la contamination pendant le  $\mu$ CP [2]. Ce traitement hydrophile du PDMS n'est pas stable dans le temps et dépend des conditions de stockage (air ou eau), la surface récupérant progressivement sa nature hydrophobe. Cette évolution dans le

temps peut être expliquée par la grande mobilité des chaînes de polymère du PDMS et la diffusion des fragments de PDMS du timbre vers la couche de surface oxydée, qui progressivement augmente l'hydrophobicité de la surface. Ce phénomène est accentué par la formation de fissures en surface du PDMS créées par le traitement plasma qui génère des fortes contraintes de surfaces. Nous avons donc présumé que si un timbre est correctement nettoyé par le Soxhlet avant oxydation par le plasma, la persistance du traitement de surface hydrophile devrait être plus longue, du fait de la concentration sensiblement inférieure de fragments non réticulés de PDMS dans le timbre. Cette étude va être présentée dans la section suivante.

### **1-1-1-Impact du processus de nettoyage sur la persistance du traitement de surface par plasma O<sub>2</sub> des timbres de PDMS**

Nous avons présumé que si un timbre est correctement nettoyé avant oxydation par le plasma, la persistance du traitement de surface hydrophile devrait être plus longue, du fait de la concentration sensiblement inférieure de fragments de PDMS dans le timbre. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié l'évolution dans le temps des angles de contact PDMS/eau après le processus d'oxydation par plasma en fonction des conditions de stockage et de nettoyage du timbre avant ce traitement. Cette étude est résumée sur la figure 1.



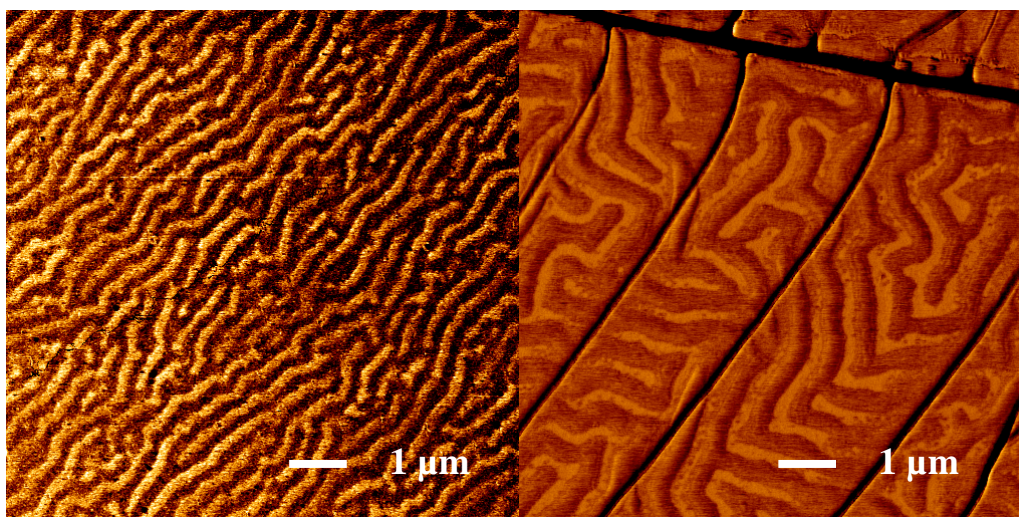
**Figure 1 :** Évolution dans le temps de l'angle de contact eau/PDMS après traitement par plasma oxygène pour deux conditions de stockage : dans l'air (A) et dans l'eau (B). Des timbres non nettoyés de PDMS Sylgard® sont comparés à des timbres semblables nettoyés à l'aide d'un Soxhlet (voir chapitre 2).

Nous pouvons observer que l'angle de contact juste après le traitement plasma est plus petit pour un timbre nettoyé. Ceci tend à indiquer que pour un timbre non nettoyé, même si la plupart des fragments hydrophobes libres sont piégés loin de la surface pendant le traitement plasma, quelques molécules sont encore présentes sur la surface. Si un nettoyage est effectué avant le traitement plasma, alors l'hydrophilisation induit par l'oxydation de la surface par le plasma est de meilleure qualité en l'absence des fragments hydrophobes libres du timbre. La figure 1 prouve également que quelle que soit les conditions de stockage du PDMS, le rétablissement de hydrophobicité a besoin d'un temps plus long pour un timbre nettoyé comparé à un non nettoyé. Cet effet est principalement dû à l'angle de contact initial (eau/PDMS) inférieur observé pour un timbre nettoyé. Il est cependant intéressant de noter, que la persistance de l'hydrophilisation est augmentée par le procédé de nettoyage avec le Soxhlet, malgré le rétablissement lent du caractère hydrophobe du PDMS. Ce résultat

combiné avec le fait qu'après le nettoyage aucune contamination ne peut être détectée sur un substrat après contact avec le timbre, indique que le rétablissement de l'hydrophobicité après le traitement plasma est lié soit au traitement plasma qui crée de nouveaux fragments de PDMS libre en cassant les chaînes de polymère présentes en surface, soit à d'autres mécanismes, tel que le réarrangement des chaînes de PDMS en surface.

### 1-1-2-Effet du plasma sur le PDMS

Comme nous l'avons vu, afin d'augmenter l'énergie de surface et la mouillabilité nous pouvons être amené à traiter les timbres de PDMS au plasma oxygène. Mais cette étape peut conduire soit à la formation spontanée de structures à sa surface soit à la formation de défauts (Figure 2). Il faut donc contrôler très précisément la puissance et la durée du traitement plasma.



**Figure 2 :** Image AFM  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  d'une surface de PDMS ayant subi un traitement plasma  $\text{O}_2$ , l'échelle en  $z$  est de 5 nm. A gauche le PDMS à été exposé à un plasma oxygène 200 W pendant 1 min. A droite le PDMS à été exposé à un plasma oxygène 200 W pendant 5 min.

L'image AFM de gauche sur la figure 2 montre la surface d'un timbre plat de PDMS après un traitement plasma oxygène. Ce traitement est de faible puissance mais conduit à la formation spontanée de structures périodiques d'une hauteur de quelques nanomètres. En fait, il est bien connu que le plasma oxygène oxyde la surface du PDMS et crée une couche de silice d'une épaisseur variant de quelques Å à quelques nm suivant le traitement. La

transformation de la couche superficielle associée à l'échauffement du PDMS pendant le traitement plasma, génèrent des contraintes de surface dont l'ampleur dépend des paramètres du plasma tels que la puissance et la durée. En raison de son faible module de Young, le matériau PDMS relâche la déformation élastique suivant 2 procédés i) une ondulation de la surface d'amplitude égale à quelques nanomètres et de longueur d'onde proche du micron ii) la génération de fissures profondes (plusieurs microns) organisées en réseau qui apparaissent en général pour des temps d'exposition au plasma plus long. Ces 2 modes de relaxation ne sont pas exclusifs et peuvent prendre place simultanément.

Il est impossible de prévenir totalement la formation de ces structures spontanées. Mais il est possible de les réduire à des motifs de seulement quelques Å en réduisant les temps de traitement au plasma oxygène en dessous de la minute. La durée des traitements plasma oxygène que nous utilisons par la suite sur le PDMS est de 30 secondes et de 100W.

## 1-2-traitements chimiques

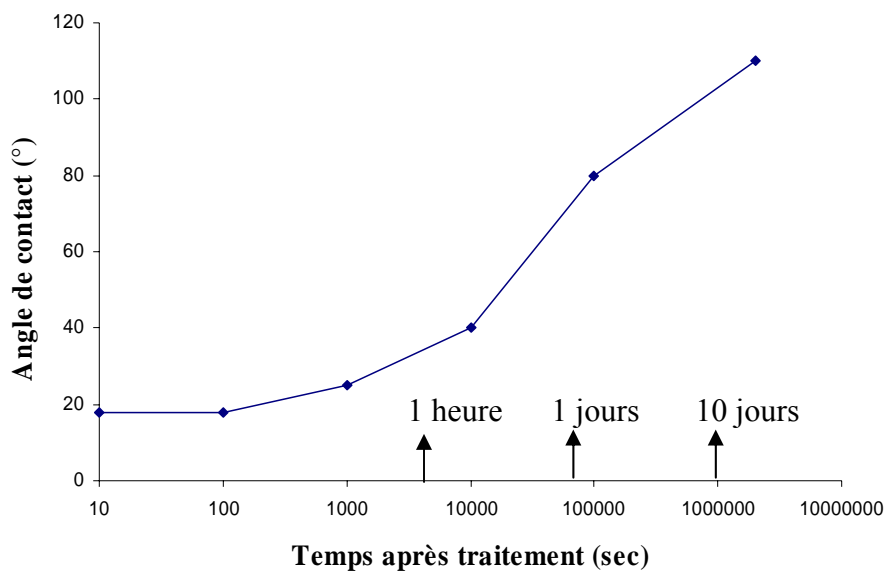
Comme nous l'avons vu précédemment le traitement plasma oxygène n'est pas toujours la meilleure solution pour modifier l'énergie de surface des timbres en PDMS. Un inconvénient aux traitements plasma oxygène est leur pérennité extrêmement brève, même lorsque le PDMS est conservé en milieu liquide. D'autres moyens existent, notamment la modification de la surface du PDMS en phase liquide à l'aide d'une grande variété de molécules chimiques. Nous avons testé plusieurs d'entre elles : le polyvinylpyrrolidone ou povidone (PVP), polyéthylène glycol (PEG).

Ces différentes molécules présentent globalement le même comportement, nous n'en décrivons en détail qu'une seule, le PVP.

Pour fonctionnaliser les timbres en PDMS, une première étape constituée d'un traitement plasma oxygène très bref et peu puissant (200W, 30s) est nécessaire pour favoriser la formation de groupements Si-OH très réactifs, en surface. Puis une fonctionnalisation par phase liquide dans une solution à 1% de PVP/eau déionisée (EDI) pendant 5 minutes. Enfin un recuit à 45°C pendant 30 min suivi d'un rinçage à l'EDI. Le PVP forme ainsi une couche dense à la surface du PDMS, faisant passer l'angle de contact PDMS/eau de 110° à 40°.

Aucun transfert significatif de PVP n'est observé lors de la mise en solution du timbre pendant l'encrage. De plus l'hydrophilicité du timbre peut être conservé plus longtemps dans un bain d'EDI que celle provoquée par un traitement plasma oxygène classique. L'angle de contact croît avec le temps et retrouve son niveau initial après environ 20 jours (figure 3). Des

tests de fonctionnalisation par du PVP de timbres PDMS lavés au moyen d'un Soxhlet n'ont pas empêché l'angle de contact de retrouver sa valeur initial au bout d'environ 1 mois.



**Figure 3 :** Evolution dans le temps de l'angle de contact d'un timbre de PDMS conservé dans l'EDI après un traitement de surface au PVP.



## 2-Encre moléculaire

L'encre est constituée de deux éléments majeurs, le solvant et la molécule dissoute dans ce liquide. On distingue 3 types de solvants:

- Les solvants protiques: possédant un ou plusieurs atomes d'hydrogène susceptibles de former des liaisons hydrogènes. Par exemple, l'eau, le méthanol, l'éthanol, etc.
- Les solvants aprotiques polaires : possédant un moment dipolaire non nul et dénué d'atomes d'hydrogènes susceptibles de former des liaisons hydrogènes. Par exemple, l'acétonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), le diméthylesulfoxyde (DMSO,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ), le tétrahydrofurane (THF,  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ), etc.
- Les solvants aprotique apolaires: ne possédant pas de moment dipolaire permanent. Par exemple, le benzène, les hydrocarbures: alcanes ramifiés ou linéaires, alcanes cycliques, alcènes, etc.

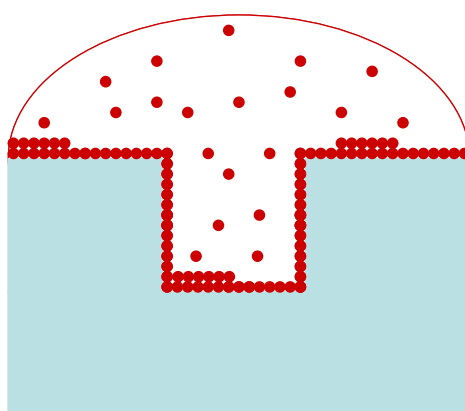
Cette classification des solvants va nous être très utile par la suite pour expliquer les différences d'absorption d'une grande variété d'encre. Pour des raisons d'efficacité de synthèse et de similitudes pendant l'étape d'encrage nous avons décidé de différencier deux grands types d'encre : les encres de nature « biologique » dans leurs solvants protiques, et les encres de nature « synthétique » dans leurs solvants aprotiques polaires. Les solvants aprotiques apolaires étant très peu compatibles avec la grande majorité des encres et le processus de  $\mu\text{CP}$ , ils ne seront pas abordés.

### 2-1-Molécules biologiques (Solvants protiques)

Par encre de nature « biologique » nous entendons principalement ADN, peptides, cellules, bactéries et les protéines telles que par exemple les anticorps. Ces encres se caractérisent par des solvants protiques, en général des tampons salins. Le PDMS constitue un très bon matériau pour absorber des encres biologiques à sa surface en raison de sa faible énergie de surface et de sa capacité à ne pas altérer les molécules constituant l'encre [3]. De plus dans la très grande majorité des cas aucun traitement n'est nécessaire pour permettre une bonne qualité d'encrage et de dépôt. Le traitement rendant hydrophile le timbre tend plutôt à fixer de manière beaucoup trop forte les molécules sur le timbre empêchant ainsi leur largage lors du dépôt.

Les molécules biologiques quelles qu'elles soient s'absorbent de manière homogène sur toute la surface du timbre (figure 4). En raison de leur taille, bien supérieur aux pores du

réseau des macromolécules du timbre elles ne pénètrent pas à l'intérieur de celui-ci. L'épaisseur de la couche moléculaire adsorbée peut aller d'une monocouche à plusieurs dizaines de couche en fonction du temps d'encrage, de la concentration de l'encre et de l'affinité entre les molécules. Les constantes d'affinité entre le timbre et les molécules varient très peu, cette variation ayant un effet sur le temps d'encrage nécessaire [3]. Le nombre de couches recherché étant généralement bien inférieur à une dizaine, les temps d'encrages varient de quelques dizaines de secondes à quelques minutes en fonction des besoins et des encres. Il faut noter que si l'on fonctionnalise le timbre de PDMS pour le rendre hydrophile, le temps d'encrage augmente énormément jusqu'à 45 minutes [4].



**Figure 4 :** Schématisation du processus d'encrage des molécules de nature « biologique » dans des solvants protiques sur un timbre structuré en PDMS. Les points rouges représentent les molécules biologiques de l'encre. Elles s'adsorbent de façon homogène sur la totalité de la surface du timbre formant une ou plusieurs couches.

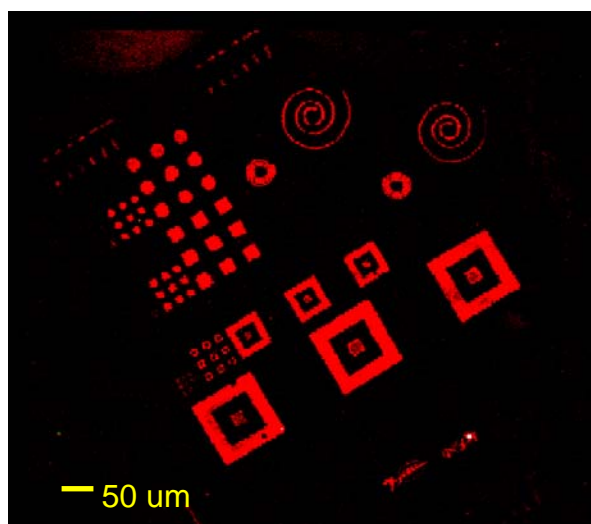
Nous avons choisi de présenter seulement quelques exemples d'encre de nature biologique: l'ADN et une protéine (Bovine Sérum Albumine BSA), celles-ci ont été étudiées en détail et seront abondamment utilisées dans le chapitre 4. De nombreuses autres encres telles que les bactéries, les peptides et de nombreuses protéines ont été étudiées mais ne seront pas discutées spécifiquement dans ce manuscrit.

### 2-1-1-Adsorption de l'ADN sur un timbre de PDMS

L'impression de molécules d'ADN par  $\mu$ CP est intéressante pour la fabrication de microarrays et plus généralement pour les Biopuces. Lange et al. [5] ont prouvé que la technique de  $\mu$ CP peut être employée pour déposer des molécules d'ADN sur une surface avec

un timbre de PDMS hydrophile chimiquement modifié pour permettre aux molécules d'ADN de s'adsorber à sa surface. Cette étape de fonctionnalisation limite fortement l'utilisation de cette technologie. Cela prend plusieurs heures pour convertir la surface terminée par des groupements  $\text{CH}_3$  du PDMS en une surface aminée, puis ensuite 45 min pour encrer les timbres avant impression. Nous avons démontré [6] que le  $\mu\text{CP}$  peut être employé pour fabriquer des Biopuces d'ADN directement sans aucune modification des timbres. Nous avons prouvé que des temps d'encrage et de contact de moins de 30 secondes donnent des résultats de très bonne qualité. Ces résultats seront discutés en détail dans le chapitre 4.

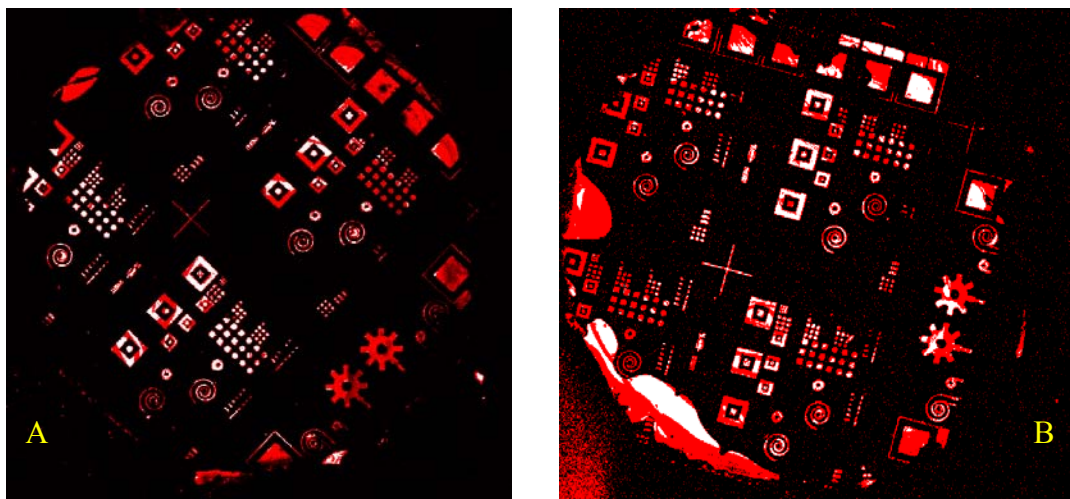
Pour caractériser la vitesse d'adsorption de l'ADN sur le timbre, nous utilisons une méthode indirecte, basée sur la fluorescence en comparant plusieurs résultats de  $\mu\text{CP}$  dans les mêmes conditions mais avec des temps d'encrages différents. La densité d'oligonucléotides fluorescents imprimés sur le substrat est quantifiée par une mesure de l'intensité de fluorescence sur une région donnée. Les motifs de l'ordre du micromètre sont obtenus aisément (Figure 5), et contrairement à ce qui avait déjà été fait dans la littérature aucun traitement de surface n'est requis. Dans ces expériences, les molécules déposées sont des oligonucléotides marqués en fluorescence (taille 20 paires de bases). De plus il faut noter qu'un timbre encré avec une solution d'ADN peut être lavé complètement dans l'eau désionisée pendant 5 min aux ultrasons et être réutilisé plus d'une dizaine de fois.



**Figure 5 :** Exemple de motifs de molécules d'ADN fluorescentes de  $100\ \mu\text{m}$  à  $2\ \mu\text{m}$  déposés par  $\mu\text{CP}$  sur une lame de verre, imagées à l'aide d'un scanner de fluorescence

Nous avons testé de nombreux temps d'encrages, de 1 H à 30 s. Le but ici étant de définir le temps minimum nécessaire pour que suffisamment d'oligonucléotides se déposent à

la surface du timbre. Pour un dépôt efficace d'oligonucléotides sur une surface, le principe de cascade d'interaction doit être respecté, c'est-à-dire que les forces d'attraction entre les oligonucléotides et le timbre en PDMS doivent être moins fortes que celles s'exerçant entre les oligonucléotides et la surface. Le PDMS est naturellement hydrophobe, ce type d'interaction est plus forte que les interactions de Van der Waals (10 à 100 fois selon les cas) et ont un effet à plus longue distance [7]. Ceci est confirmé par le fait qu'au bout de 30 s il y a suffisamment d'oligonucléotides sur le timbre pour ne plus différencier un encrage de 30 s et un d'1 H (figure 6). Les lames de verre ont été quant à elles, traitées avec un dendrimère présentant des terminaisons aldéhydes permettant une réaction avec la terminaison amine des oligonucléotides.



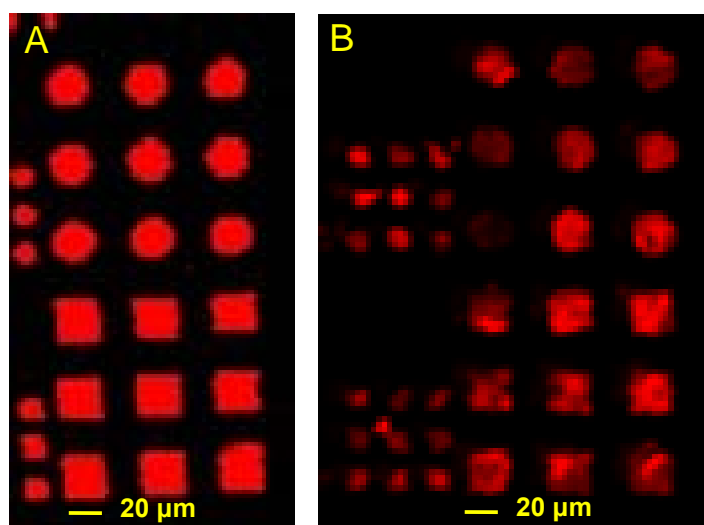
**Figure 6 :** (A) 30 s d'encrage, (B) 1 H d'encrage; Les temps de contact pour A et B sont de 1 min sur lame de verre. Les zones blanches des motifs correspondent à une saturation du signal de fluorescence du scanner.

La raison de l'adsorption rapide et efficace des molécules d'ADN sur les timbres hydrophobes de PDMS non traités n'est pas évidente au premier abord et c'est la raison pour laquelle nous décidés d'étudier le rôle possible des fragments de PDMS sur ce comportement.

### **2-1-2-Impact du processus de nettoyage du PDMS sur l'encrage des molécules d'ADN**

La découverte d'une méthode fiable pour éliminer la présence des fragments de siloxane à l'intérieur et sur la surface du PDMS, nous a logiquement poussé à regarder l'impact de cette huile de silicone sur le  $\mu$ CP. Nous avons voulu principalement savoir si la

présence de ces molécules contaminantes est salutaire ou nuisible. Ici notre but est de regarder l'impact du processus de nettoyage du timbre de PDMS sur l'encrage et le dépôt des molécules d'ADN. Nous avons donc réalisé des dépôts d'ADN fluorescent avec un timbre de PDMS nettoyé au Soxhlet et un autre non nettoyé. Une image typique des résultats obtenus fluorescent est montrée sur la figure 7. Sur cette image on peut voir la fluorescence rouge émise par les molécules d'ADN 20-mer marqué avec un fluorophore Cy5 commercial. Pour le  $\mu$ CP nous avons utilisé une concentration de l'ADN de 10  $\mu$ M dans une solution tampon de Na-phosphate (0,3 M pH 9), 30 sec de temps d'encrage (avec 10 $\mu$ l de solution) et impression manuelle avec un temps de contact de 15 s. L'image A a été obtenue avec un timbre non nettoyé de PDMS contenant des motifs micrométriques compatibles avec la caractérisation en fluorescence. L'image B a été réalisée exactement dans les mêmes conditions, avec le même type de timbre sauf que celui-ci a été nettoyé au Soxhlet avant le  $\mu$ CP. Les mêmes expériences ont été reproduites un grand nombre de fois et ont systématiquement indiqué que la fluorescence émise par les dépôts obtenus avec un timbre non nettoyé est plus élevée que le signal mesuré sur des dépôts obtenus avec un timbre de PDMS exempt de fragments de silicone.



**Figure 7 :** Image en fluorescence des dépôts d'ADN par  $\mu$ CP sur une lame de verre. L'image (A) sur la gauche correspond à une impression réalisée avec un timbre de PDMS non nettoyé contenant des motifs micrométriques compatibles avec la caractérisation en fluorescence. L'image (B) correspond une impression réalisée exactement dans les mêmes conditions avec un timbre de PDMS nettoyé au Soxhlet.

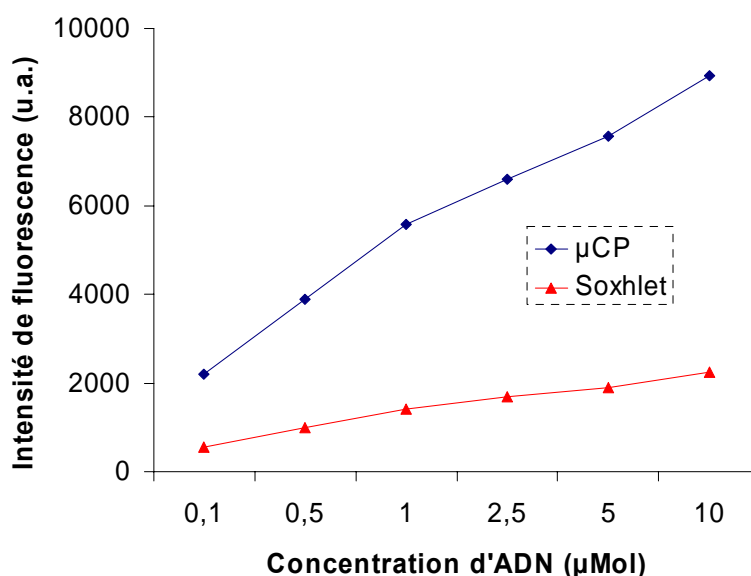
La différence de signal émis a été quantitativement enregistrée, et les résultats sont rapportés dans le tableau 1 pour différentes concentrations de molécules d'ADN dans la solution d'encrage. En plus de l'intensité de fluorescence, nous avons été également intéressés par l'homogénéité surfacique du signal de fluorescence. L'examen de cette table prouve que quelle que soit la concentration de la solution d'encrage, le signal de fluorescence venant des dépôts obtenus avec un timbre non nettoyé est approximativement 4 fois plus élevé que celui obtenu avec un timbre de PDMS nettoyé. Les fluctuations du signal de fluorescence sont négligeables pour les timbres non nettoyés (1%-2%) tandis qu'elles peuvent être de 15% à 51% dans le cas des dépôts obtenus avec le timbre nettoyé. L'hétérogénéité de la fluorescence devient de plus en plus prononcée pour le timbre nettoyé à mesure que la concentration de la solution d'encrage est réduite.

Concentration ( $\mu$ Mol)	Intensité de Fluorescence (u.a.)		Variation du signal (%)	
	PDMS	PDMS extrait	PDMS	PDMS extrait
0,1	2189	555	2	51
0,5	3897	984	1,5	47
1	5575	1418	0,6	46
2,5	6607	1680	0,5	48
5	7561	1907	0,7	14
10	8939	2247	0,4	15

**Tableau 1 :** Les signaux de fluorescence sont mesurés sur des dépôts d'ADN imprimés avec diverses concentrations en ADN. Une comparaison est faite entre les timbres non nettoyés et ceux nettoyés au Soxhlet. En outre, les fluctuations du signal de fluorescence des dépôts sont présentées. Les valeurs rapportées sont une moyenne statistique sur plus de 2000 motifs différents.

Ce résultat étonnant prouve que la présence des fragments de PDMS dans le timbre améliore beaucoup la qualité du transfert des molécules d'ADN. Dans une expérience contrôle nous avons vérifié que cette différence ne peut pas être due à l'auto-fluorescence des fragments de PDMS. En effet, si un timbre est imprimé sans aucune encre fluorescente d'ADN, les molécules contaminantes peuvent être observées par AFM sur la surface, mais aucune fluorescence ne peut être mesurée. Notre résultat précédent est donc clairement

attribué à la quantité plus élevée de molécules d'ADN sondes déposées en utilisant un timbre non nettoyé de PDMS. Afin de compléter ces résultats nous avons également déposé par  $\mu$ CP des brins simple sondes d'ADN non fluorescents et hybridés avec l'oligomère fluorescent complémentaire. Sur la figure 8, nous avons tracé l'intensité du signal de fluorescence mesuré sur des dépôts de 50  $\mu$ m de diamètre après hybridation par le complémentaire fluorescent.



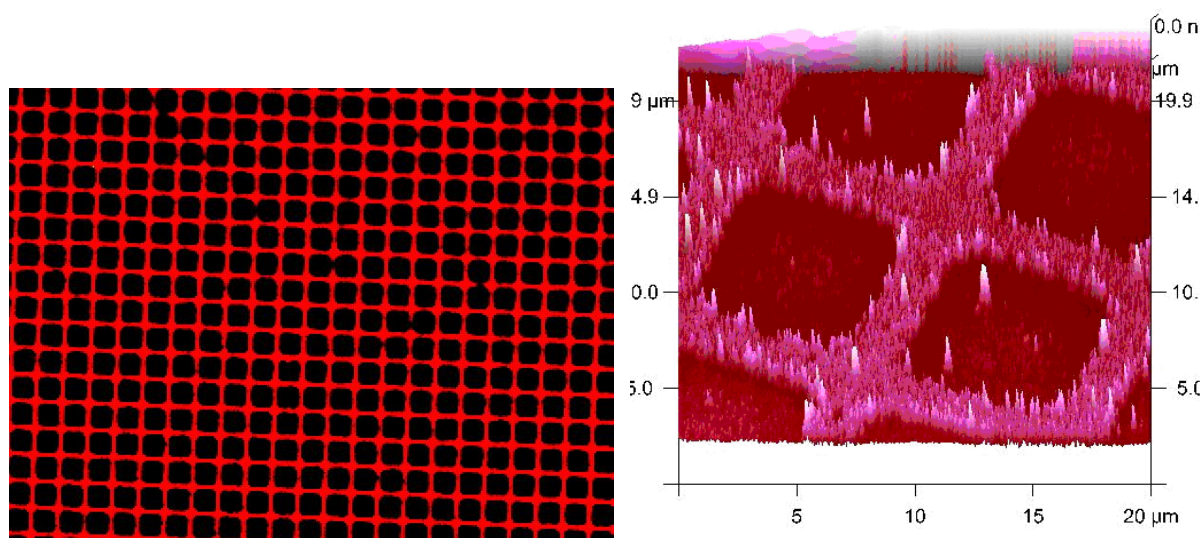
**Figure 8 :** Comparaison de l'intensité de fluorescence mesurée après hybridation sur des dépôts d'ADN réalisés par  $\mu$ CP en utilisant un timbre de PDMS non nettoyé (courbe bleue), par  $\mu$ CP en utilisant un timbre de PDMS nettoyé pendant 12 heures avec un Soxhlet (courbe rouge), pour des concentrations différentes de molécules sondes. Chaque point expérimental correspond à une valeur moyenne sur une centaine de motifs. Les molécules sondes d'ADN (20 mers) ont été déposées par  $\mu$ CP sur des lames de verre chimiquement traitées avec une couche de dendrimère (voir la fin du chapitre pour plus de détails).

Dans la figure 8, nous comparons plusieurs dépôts obtenus par  $\mu$ CP en utilisant un timbre de PDMS non nettoyé et par  $\mu$ CP en utilisant un timbre de PDMS nettoyé pour différentes concentrations en molécules sondes. Les résultats obtenus sont en accord avec la figure 7, nous observons que après hybridation pour une même concentration de molécules sonde d'ADN, l'intensité de fluorescence mesurée sur les dépôts réalisés avec un timbre non nettoyé est plus grande que le signal mesuré sur des dépôts obtenus avec un timbre nettoyé. En utilisant un timbre nettoyé de PDMS pour imprimer les molécules sondes, le signal de fluorescence est fortement diminué. De plus nous avons comparé le signal de fluorescence de deux timbres encrés par une solution d'ADN fluorescent, l'un étant nettoyé. Ce dernier exhibe

un signal de fluorescence beaucoup plus faible. Ceci démontre clairement le rôle des fragments de PDMS dans l'adsorption des molécules d'ADN sur le timbre. Le nettoyage d'un timbre de PDMS conduit donc à une adsorption beaucoup plus faible des molécules sondes d'ADN sur sa surface et ceci malgré la nature intrinsèquement hydrophobe du timbre. Après transfert par  $\mu$ CP, les motifs déposés avec un timbre nettoyé présentent un déficit en molécules qui peut être observé en fluorescence aussi bien avant qu'après hybridation.

### 2-1-3-Adsorption des protéines sur un timbre de PDMS

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment les protéines s'adsorbent de façon homogène à la surface d'un timbre de PDMS non traité (hydrophobe). De la même façon que pour l'ADN un encrage de moins d'une minute conduit à la formation de plusieurs couches de protéines sur le timbre. De nombreux types de protéines ont été testés : Bovine Serum Albumin (BSA), la stréptavidine, des anticorps et des protéines constituant le moteur à flagelle de la bactérie. Un exemple de dépôt caractérisé en fluorescence et à l'AFM est présenté sur la figure 9 dans le cas de la BSA diluée dans un tampon biologique (PBS).



**Figure 9 :** A gauche, image en fluorescence d'un dépôt de protéines (BSA-rhodamine 100 $\mu$ g/ml, encrage 30 s, contact entre le timbre et le substrat 15 s). Les carrés noirs ont une largeur de 10  $\mu$ m et les lignes rouges de BSA une largeur de 2 $\mu$ m. A droite une image 3D AFM du dépôt présenté à gauche.

Des images AFM et en fluorescence du timbre après encrage ont aussi été réalisées mais ne sont pas présentées ici. En effet les images en elles même présentent peu d'intérêt



visuel, elles montrent un timbre recouvert de façon homogène par les protéines. Il a de plus été vérifié que les différentes protéines et anticorps ne perdent pas leur capacité d'interaction.

## 2-2-Molécules synthétiques (Solvants polaires aprotiques)

Nous allons maintenant décrire l'encrage de molécules « synthétiques ». Elles forment une catégorie de molécules plus complexes vis à vis du procédé du  $\mu$ CP que les molécules biologiques. Nous voulons entendre par là que leurs différents solvants ont des effets particuliers sur le PDMS. En effet, contrairement aux solvants protiques, les solvants polaires aprotiques sont absorbés par le timbre en PDMS le faisant ainsi gonfler. Le pourcentage de gonflement varie grandement d'un solvant à l'autre, le tableau 2 montre quelques exemples de solvant et leur effet sur le PDMS.

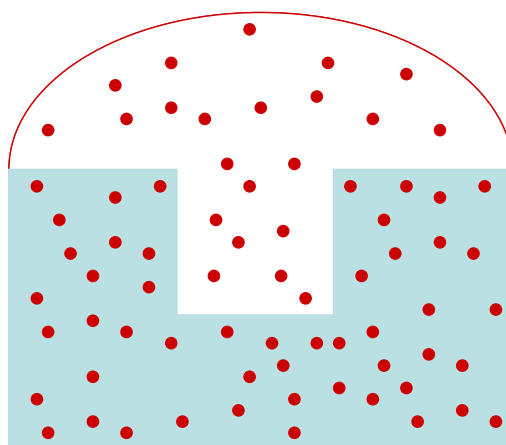
Solvant	$\delta$ (J.cm-3) <sup>1/2</sup>	S (% en masse)
Tetrahexafluore (THF)	17,2	2,174
Trichloromethane	18,6	1,530
Acétone	19,8	0,295
Ethanol	25,5	0,063

**Tableau 2 :** Propriétés physico-chimiques de différents solvants.  $\delta$  correspond au paramètre de solubilité du solvant (en d'autre terme la capacité du solvant à dissoudre une molécule) et S le taux de gonflement.

Nous pouvons remarquer d'après le tableau 2 que de grandes différences de taux de gonflement existent, notamment entre l'éthanol et le THF. De plus les solvants possédant les taux de gonflement les plus importants sont de moins bons solvants ( $\delta$  plus petit). Tout ceci présume un comportement lors de l'encrage très différent des molécules suivant le solvant dans lequel elles sont solubilisées.

### 2-2-1-Molécules inférieures au nm

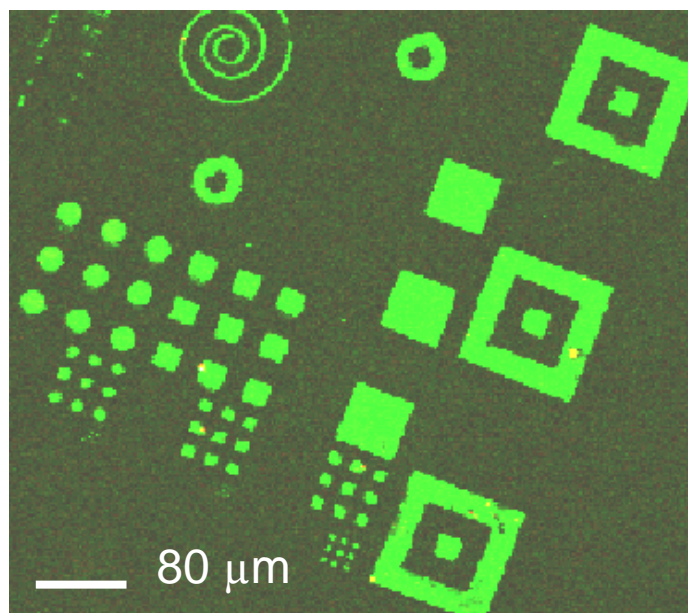
Les petites molécules inférieures au nm ont la possibilité de passer au travers des pores du PDMS grâce au gonflement et à l'absorption du solvant par le volume du timbre. Elles occupent ainsi progressivement durant l'encrage l'ensemble du volume d'un timbre et ceci très rapidement en moins de 5 secondes pour un timbre épais de 50  $\mu\text{m}$  [8], formant ainsi un réservoir très important de molécules (figure 10). De manière logique, plus le solvant gonfle et pénètre rapidement dans le PDMS plus la quantité de molécules encrée est importante, entraînant un temps d'encrage nécessaire d'autant plus court. Deux des exemples les plus connus de ces molécules sont les thiols et l'éthanolamine, toutes deux solubles dans l'éthanol. Ce sont les deux seules molécules de ce type que nous avons testées.



**Figure 10 :** Schématisation du processus d'encrage de petites molécules dans des solvants polaires aprotiques sur un timbre structuré en PDMS. Les points rouges représentent les molécules de l'encre. Elles se répartissent de façon homogène sur la totalité du volume du timbre.

La propension de ces molécules à se déposer sur le substrat durant le  $\mu\text{CP}$  est très élevée, quelques secondes suffisent pour permettre le transfert. Ceci est dû à la présence du solvant dans le timbre qui se répand avec ces petites molécules sur le substrat de manière très rapide par capillarité. La présence du solvant entraîne une diffusion de l'encre sur les parties n'étant pas en contact avec le timbre pour des temps de contact trop longs (supérieur à la seconde). La figure 11 nous montre un exemple de  $\mu\text{CP}$  de thiol carboxyle sur un substrat d'or, ce dernier réagit en phase liquide avec un peptide fluorescent. Le bruit de fond important est dû aux fixations non spécifiques des peptides sur la surface d'or.

Il faut noter que le traitement plasma oxygène du PDMS nuit à un bon l'encrage du timbre par ce type de solution. La couche de silice formée en surface empêchant le gonflement du timbre par le solvant et donc un encrage suffisant du timbre.



**Figure 11 :** Image en fluorescence d'un dépôt par  $\mu$ CP de thiols carboxyle sur de l'or. Un peptide fluorescent est greffé sur le thiol par phase liquide. Le bruit de fond important est dû aux fixations non spécifiques des peptides sur la surface d'or.

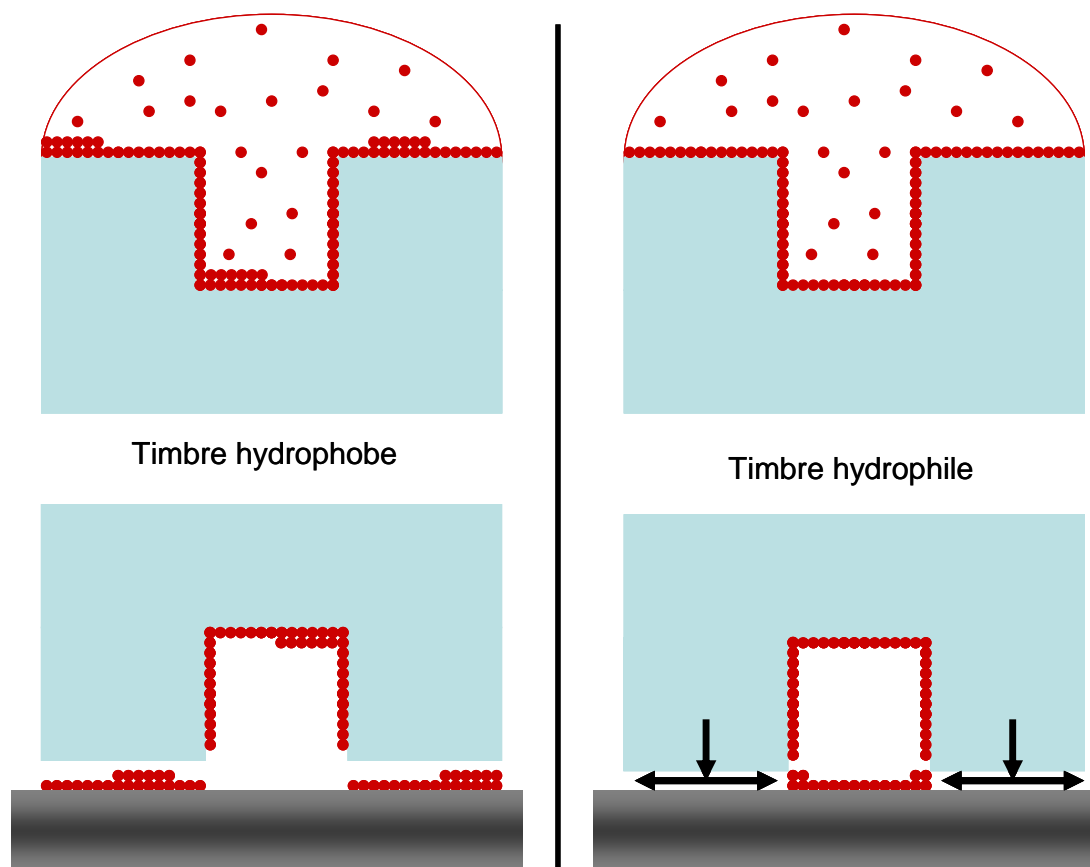
### 2-2-2-Molécules synthétiques hydrophiles

Nous nous sommes également intéressés à des molécules hydrophiles diluées dans des solvants polaires aprotiques, et particulièrement aux dendrimères poly(amidoamine) (PAMAM), qui s'encrent différemment selon l'hydrophilicité du timbre de PDMS. Ces molécules dont la taille est proche de 8 nm ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur du timbre de PDMS. Nous avons obtenu deux types de dépôts très différents. La figure 12 schématise les deux processus possibles suivant la nature hydrophile ou hydrophobe du timbre.

Le premier processus à gauche, représente l'adsorption de dendrimères hydrophiles dans un solvant polaire aprotique sur un timbre de PDMS hydrophobe sans traitement de surface. L'encre s'adsorbe de façon homogène sur la totalité de la surface du timbre en couches denses et épaisses. Lors du contact entre le timbre et le substrat (hydrophile), les dendrimères se déposent en couches épaisses au niveau des points de contact entre le timbre et le substrat.

Le deuxième processus à droite, représente l'adsorption de molécules hydrophiles dans un solvant polaire aprotique mais cette fois sur un timbre de PDMS rendu hydrophile par un plasma oxygène. Lors du dépôt, les énergies de surfaces favorisent une interaction forte entre

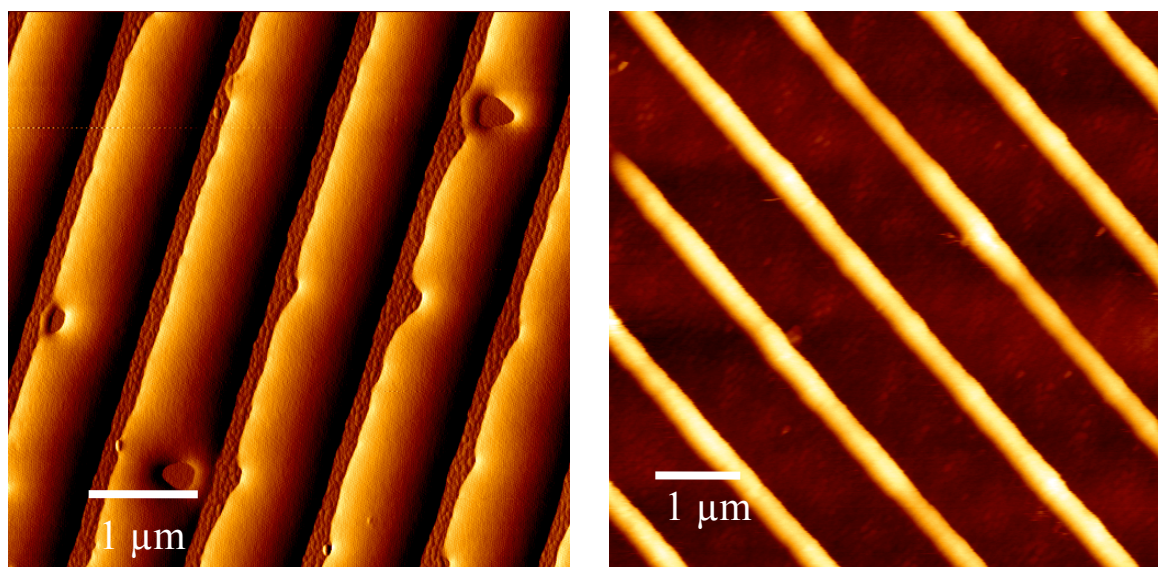
le timbre et le substrat hydrophile. Les molécules adsorbées sur le timbre sont chassées en dehors des zones de contact. Nous obtenons ainsi, un dépôt selon un motif inversé par rapport au cas précédent.



**Figure 12 :** Schématisation du processus d'encrage de dendrimères hydrophiles dans des solvants polaires aprotiques sur un timbre structuré en PDMS. Les points rouges représentent les molécules de l'encre (dendrimères) A gauche, les molécules s'adsorbent de façon homogène sur la totalité de la surface du timbre en couches denses et épaisses. Lors du contact entre le timbre et le substrat (hydrophile), les molécules se déposent suivant un processus de  $\mu\text{CP}$ . A droite, le timbre a subi un traitement plasma oxygène, il est donc devenu hydrophile. Les molécules forment une couche homogène à la surface du timbre. Lors du dépôt les énergies de surfaces favorisent un transfert proche du processus de  $\mu\text{TM}$ . Nous obtenons ainsi, un dépôt selon un motif inversé par rapport au cas présenté à gauche de la figure.

Afin de démontrer ce principe d'encrage et de dépôt nous avons réalisé une série d'expérience de dépôt de dendrimères PAMAM de génération 4 avec les deux types de timbres. Des images AFM des timbres encrés et du dépôt ont été réalisées de manière

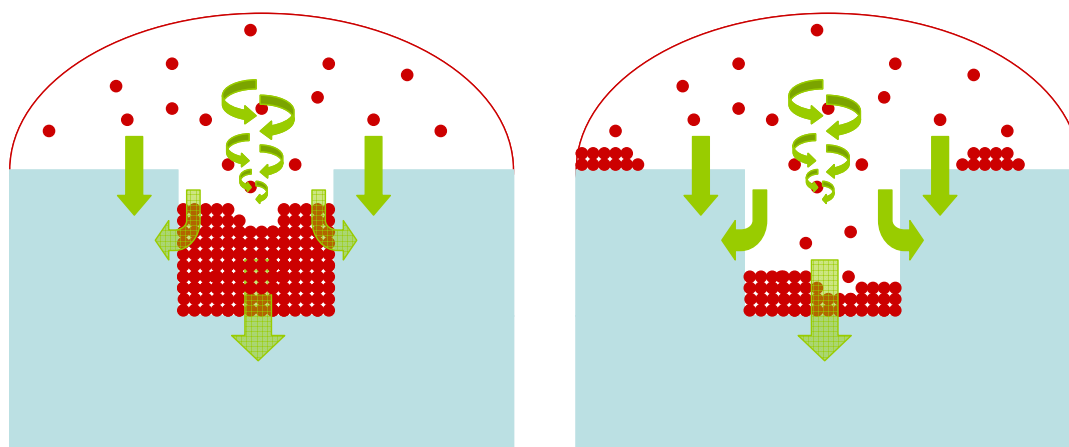
systematique. L'image de la figure 13 (à gauche) nous montre un dépôt réalisé avec un timbre hydrophobe, les dendrimères se déposent bien selon les motifs du timbre, ce qui correspond à la thèse avancée précédemment. En revanche, dans le cas d'un timbre de PDMS préalablement traitée au plasma  $O_2$  afin de la rendre hydrophile nous obtenons un résultat inversé (figure 13 à droite). Alors que les images AFM du timbre (non présentées ici) montrent un encrage homogène sur toute la surface du timbre, les dendrimères sont chassées des motifs lors du contact et viennent se déposer en regard des cavités du timbre. Dans ce travail même si nous n'avons pas spécifiquement utilisé les dendrimères au niveau de l'encre, il nous est tout de même apparu intéressant de faire figurer ces résultats, car ils montrent de manière très spectaculaire l'influence des traitements de surface sur le processus  $\mu$ CP. En effet, en modifiant simplement l'hydrophobicité du timbre, il est possible de modifier complètement la nature du transfert moléculaire lors du contact ( $\mu$ CP et  $\mu$ TM), tous les autres paramètres du procédé restant inchangés. L'encrage du timbre est donc bien une étape clef du processus d'impression. Ceci va être confirmé par le paragraphe suivant concernant le cas des dendrimères hydrophobes.



**Figure 13 :** Image AFM de dépôts de dendrimères PAMAM de génération 4 sur un substrat hydrophile (verre traité en phase liquide par un silane époxyde). Pour les deux images présentées les motifs du timbre sont des lignes de 800 nm de large au pas de 1 $\mu$ m (cavités de 200nm) . L'image de gauche correspond au dépôt réalisé avec un timbre hydrophobe, les dendrimères se déposent bien selon les motifs du timbre. L'image de droite correspond au dépôt réalisé avec un timbre hydrophile, les dendrimères sont chassées des zones de contact entre le timbre et le substrat, nous obtenons ainsi une image inversée par rapport aux motifs du timbre.

### 2-2-3-Molécules synthétiques hydrophobes

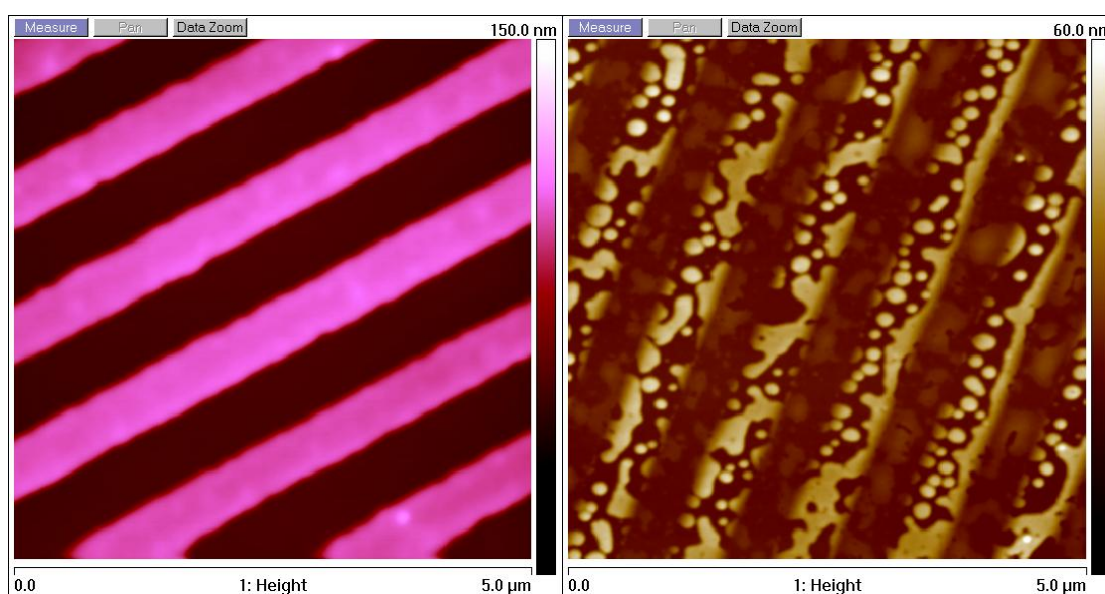
Les molécules hydrophobes dans les solvants polaires aprotiques ont une très forte affinité entre elles et ont tendance à former des agglomérats denses. De plus leurs solvants font partie de ceux qui sont absorbés et qui gonflent le plus le PDMS. Cette absorption forte du solvant par le PDMS entraîne des flux de convection puissants entraînant les molécules dans les fonds de motifs. De plus le liquide disparaît rapidement de la surface du timbre entraînant des phénomènes de capillarités qui déposent les molécules dans ces mêmes endroits (figure 14 à gauche). Nous avons étudié principalement des dendrimères phosphorés de génération 4, recouvert de groupement aldéhydes, en solution dans le tétrahydrofurane (THF), qui est un cas exemplaire de ce genre de phénomène.



**Figure 14 :** Schématisation du processus d'encrage de dendrimères hydrophobes dans des solvants polaires aprotiques sur un timbre structuré en PDMS. Les points rouges représentent les molécules de l'encre. Les flèches vertes représentent les flux de solvants pénétrant dans le timbre. A gauche, le timbre est hydrophobe, les dendrimères s'adsorbent dans les fonds de motifs du timbre. A droite, le timbre a subi un traitement plasma oxygène pour le rendre hydrophile, l'encre « démouille » sur la surface du timbre, des amas de molécules apparaissent.

L'adsorption très spécifique des dendrimères sur le timbre hydrophobe entraîne obligatoirement une méthode de dépôt sensiblement différente du  $\mu$ CP : le Microtransfer molding ( $\mu$ TM). Plutôt que de déposer dans les parties en contact avec le timbre, nous déposons les structures agglomérées entre les motifs (Figure 14 à gauche). Une étude approfondie du  $\mu$ TM de dendrimères hydrophobes a été réalisée et sera présentée dans le

chapitre 4. Si le timbre subit un traitement plasma oxygène, la couche de silice formée à la surface du timbre diminue l'adsorption du solvant par le timbre, entraînant une quantité plus faible de molécules entre les structures du timbre. De plus un phénomène de « démouillage » de l'encre à lieu sur la surface du timbre, ceci étant du à la grande différence d'affinité entre les molécules hydrophobes et la surface hydrophile du timbre (Figure 14 à droite et le dépôt sur la figure 15 à droite).



**Figure 15 :** Image AFM d'un dépôt par  $\mu$ TM de dendrimères phosphoré de génération 4 recouverte de groupement aldéhydes sur du silicium fonctionnalisé par de l'Aminopropyltriéthoxysilane (APTES). L'image de gauche montre un dépôt par  $\mu$ TM effectué avec un timbre hydrophobe, les lignes de dendrimères déposées font 500 nm de largeur au pas de 1  $\mu$ m avec une hauteur de 80 nm. A droite, le dépôt à été effectué avec un timbre ayant subi un plasma oxygène. Les motifs ont les mêmes dimensions que sur l'image de gauche mais sont affectés par le mouillage de l'encre à la surface du timbre.

## 3-substrats

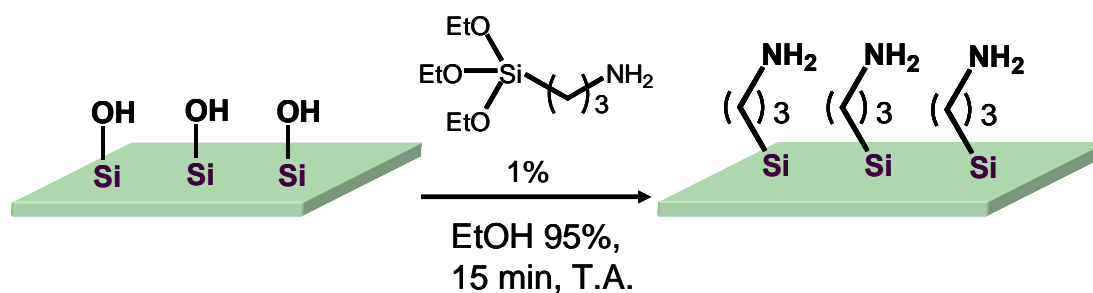
Suivant le principe de cascade d'interactions, les molécules de l'encre doivent avoir une plus grande affinité avec le substrat qu'avec le timbre. Si cela n'est pas respecté le transfert n'a pas lieu durant la phase de dépôt. La préparation du substrat est donc une étape de grande importance. Nous avons choisi de nous restreindre aux traitements chimiques de surface utiles pour la compréhension de cette thèse. Il en existe bien évidemment une grande variété dans la littérature.

### 3-1-Silanes

Nous avons choisi de ne présenter que le processus d'un silane, celui que nous utiliserons le plus l'APTES. Un autre silane sera utilisé: l'époxyde qui a le même processus de fonctionnalisation que l'APTES. L'Aminopropyltriéthoxysilane (APTES) est une molécule d'une grande utilité pour de nombreuses applications. Elle constitue souvent une des premières briques élémentaires d'un édifice moléculaire de surface. Nous l'utilisons principalement pour sa capacité à se charger en solution au niveau de l'amine terminale. Cette propriété permet notamment de fixer de manière électrostatique des espèces chargées négativement comme les bactéries Gram négative, l'ADN, etc....

La fonctionnalisation (figure 16) d'un substrat de verre ou de silicium commence par une activation par plasma oxygène (400W 5 min) afin de former des groupements réactifs Si-OH en surface suivie par une immersion en phase liquide dans une solution à 1% en volume d'APTES dans un mélange éthanol/EDI (95%/5%) pendant 15 minutes puis d'un rinçage à l'éthanol et d'un recuit à 120°C pendant 15 min. L'APTES forme ainsi une couche dense à la surface du substrat. Des images AFM révèlent la présence d'une couche homogène dont l'épaisseur est d'environ 2nm ce qui correspond à la formation d'un film proche de la monocouche.

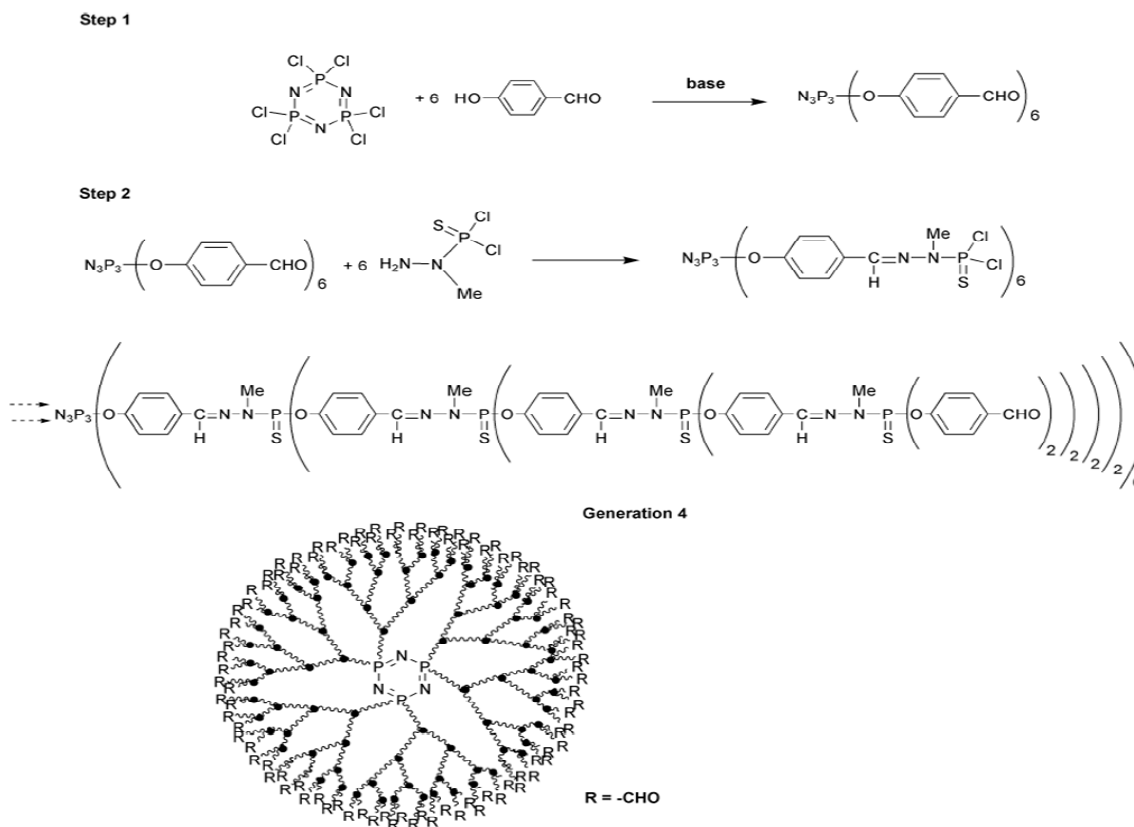




**Figure 16 :** Schéma de la fixation des molécules d'APTES sur une surface de silicium oxydé (pouvant être un wafer de silicium ou une lame de verre). A gauche, le substrat est activé (formation de groupement Si-OH en surface) par un plasma oxygène. Ensuite par phase liquide les molécules d'APTES réagissent avec les groupements activés, formant ainsi des liaisons covalentes.

### 3-2-Dendrilames

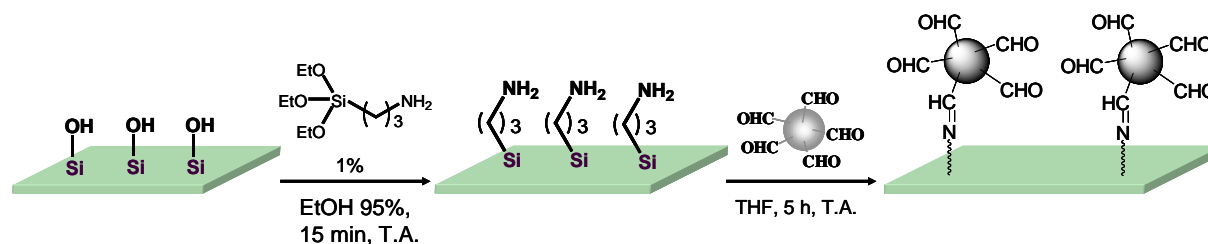
La fonctionnalisation de la surface de verre ou de silicium a de nombreux effets sur la spécificité et la qualité d'une Biopuce. L'intensité du signal, le rapport signal/bruit, l'homogénéité du dépôt, sont influencés directement par la quantité de sondes ADN attachées à la surface, mais aussi par la longueur de la sonde et par l'accessibilité des sondes pour les cibles marquées. Prenant en compte ces conditions, un substrat idéal devrait avoir une chimie permettant la liaison covalente de l'ADN avec l'assurance de sa stabilité, une capacité de liaison élevée obtenue en augmentant le nombre d'emplacements réactifs auxquels les sondes peuvent être liées de façon covalente, et bien sur un bruit de fond le plus faible possible. En outre, les sondes doivent être écartées du substrat, car ceci pourrait induire des problèmes d'accessibilité pendant l'étape d'hybridation. Shchepinov et al. [9] ont suggéré qu'un « espaceur » optimal devrait posséder au moins 40 atomes de longueur, pour ne pas contenir de charges positives ou négatives et afin d'espacer la sonde loin de la surface. Le choix d'un espaceur répondant à ces critères a été fait et s'est porté sur un dendrimère phosphoré de génération 4 avec des groupements aldéhydes en surface (Figure 17) [10]. Ce procédé a été mis au point avant le début de ma thèse par nos collaborateurs de la Plate-forme Biopuce de l'INSA Toulouse.



**Figure 17 :** Schéma de croissance des dendrimères phosphorés jusqu'à la génération 4. Le dendrimère possède finalement 96 groupes aldéhydes terminaux et mesure 7 nm de diamètre en solution.

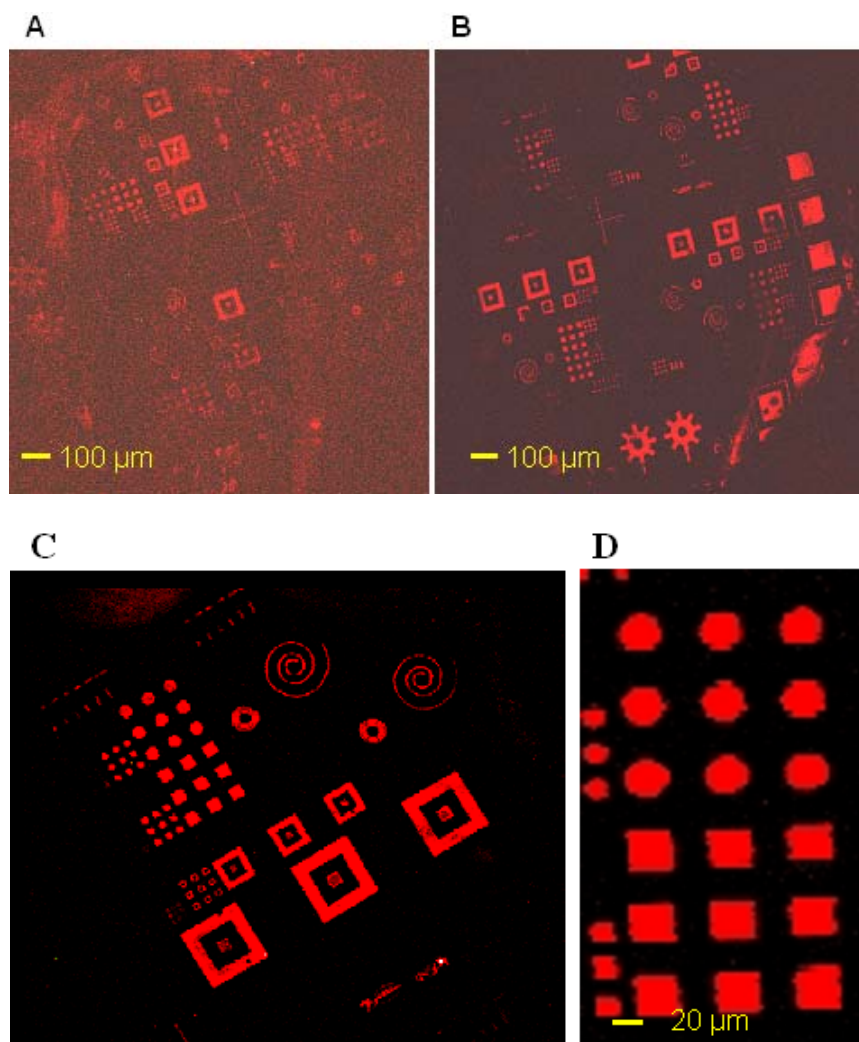
Le choix définitif d'un dendrimère de génération 4 s'est effectué suite à une série de tests sur des générations allant de 2 à 8 [10]. Ces expériences ont été conduites avant le début de ma thèse et ne seront pas discutés en détail ici.

Une première étape de fonctionnalisation avec de l'APTES doit être effectuée sur la lame de verre. La fonctionnalisation de ces lames avec les dendrimères (Dendrilames, figure 18), se fait en phase liquide dans une solution à 0,1% w/v dans du THF pendant 5h. Finalement les lames sont rincées au THF, puis à l'éthanol.



**Figure 18 :** *Processus de fabrication d'une dendrilame. La première étape consiste en la fonctionnalisation d'une lame de verre avec des molécules d'APTES. La deuxième étape permet la fixation par phase liquide des dendrimères par liaisons covalente entre les groupements amines de l'APTES et les groupements aldéhydes des dendrimères.*

Afin de tester cette chimie de surface pour le  $\mu$ CP d'ADN, nous avons procédé au dépôt d'oligonucléotides sondes 5'-NH<sub>2</sub> sur deux types de substrats (dendrilames et lames APTES commerciales ULTRA-Gaps® de chez Dow Corning). Le temps de dépôt a été de 15 sec avec un timbre qui a été encre pendant 30 sec avec une solution sonde de 10  $\mu$ M de 35-mers 5'-NH<sub>2</sub> dans la solution tampon de Na-phosphate à pH 9.0. L'hybridation a ensuite été réalisée en utilisant une cible 15-mer 5'-Cy5 complémentaire à la sonde de 35-mer 5'-NH<sub>2</sub>. Les structures du timbre sont supérieures au micron et clairement apparentes sur les deux types de lame de verre (figure 19). Cependant, nous avons observé systématiquement un rapport signal sur bruit plus grand, une meilleure uniformité avec les dendrilames (fig. 19B) qu'avec les lames APTES électrostatiques (figure 19A). Ce résultat est conforme aux tests précédemment effectués avec des dépôts classiques par aiguilles [11]. Cela confirme donc que les dendrilames réduisent l'adsorption non spécifique du matériel fluorescent.



**Figure 19 :** Comparaison entre deux types de lame fonctionnalisée. Images de fluorescence de motifs micrométriques déposés par  $\mu$ CP. Le timbre a été encré avec un oligonucléotide sonde de 35-mers pendant 30 sec, puis mis en contact pendant 15 sec avec les différents substrats. L'hybridation a ensuite été réalisée en utilisant une cible 15-mer 5'-Cy5 complémentaire à la sonde de 35-mer 5'-NH<sub>2</sub>. (A), lame APTES (ULTRA-Gap®, Dow corning); (B), dendrilame. (C) et (D) sont des zooms de (B).

## Conclusions du chapitre

Après avoir trouvé une solution pour éliminer la plupart des fragments de PDMS sans changer les propriétés physiques d'un timbre (cf. chapitre 2), nous avons été intéressés dans le chapitre 3 à évaluer l'impact de ce procédé de nettoyage sur l'hydrophilisation des timbres de PDMS par traitement de surface avec un plasma oxygène. Nous avons observé qu'après que le même traitement plasma, l'angle de contact de l'eau est plus petit pour un timbre nettoyé montrant un meilleur effet d'hydrophilisation. Si un traitement de nettoyage est exécuté avant le processus de plasma, nous observons également que l'hydrophilisation induit par l'oxydation du plasma est de meilleure qualité en l'absence des fragments hydrophobes libres dans le timbre. Nous avons également démontré pour différentes conditions de stockage du PDMS, que la cinétique du recouvrement de l'hydrophobicité est sensiblement plus lente pour un timbre nettoyé. La persistance de l'hydrophilisation est sensiblement améliorée ainsi par le procédé de nettoyage.

Une étape dont nous avons voulu souligner l'importance dans ce même chapitre 3 est l'encrage. Nous avons discuté de l'importance du type de solvant et de son effet sur la façon dont l'encre va s'adsorber à la surface du timbre. En liaison avec le chapitre 2 nous avons également voulu observer l'importance des contaminants sur l'encrage de timbres de PDMS avec des molécules d'ADN, en étudiant l'intensité de fluorescence de molécules d'ADN marquées déposées par  $\mu$ CP sur une lame de verre. L'adsorption des molécules d'ADN sur la surface de timbre est améliorée par la présence des fragments de PDMS. Quand ces fragments sont irréversiblement enlevés par le nettoyage de Soxhlet, l'adsorption des molécules d'ADN sur le timbre de PDMS est beaucoup plus faible et l'encrage du timbre puis le dépôt par  $\mu$ CP sont de mauvaise qualité. Cet encrage déficient de la surface du timbre a comme conséquence principale une plus petite densité des molécules transférées sur l'échantillon par  $\mu$ CP. C'est à notre connaissance la première fois dans la littérature que la présence de ces molécules de contamination est associée de manière claire à la réussite d'un procédé de  $\mu$ CP. Il est désormais permis de penser qu'en employant un timbre de PDMS montrant une quantité plus élevée d'huile de silicone à sa surface, la qualité du processus de  $\mu$ CP (en termes de densité de molécules d'ADN transférées) pourrait encore être améliorée. Nous prévoyons ainsi qu'en utilisant le matériel A (Hard-PDMS) pour faire un timbre de PDMS, la fluorescence mesurée au niveau des dépôts d'ADN sera plus forte comparée aux ceux issus de motifs imprimés à l'aide d'un timbre de Sylgard®. Il sera très intéressant de mener cette expérience dans un futur proche, comme confirmation de nos interprétations. Nous pensons également que les résultats que nous avons obtenus pour des molécules d'ADN pourraient être généralisés à

d'autres types de biomolécules. Nous ne serions pas étonnés si pour des protéines, la présence des fragments de PDMS à la surface du timbre joue également un rôle prépondérant dans la réussite du  $\mu$ CP. Il serait de plus extrêmement intéressant de coupler ces résultats avec une étude d'affinité de diverses encres avec des timbres de PDMS standards et lavés à l'aide d'une autre méthode de caractérisation plus quantitative telle que la microbalance à quartz (QCM).

Toutes les étapes du  $\mu$ CP ayant été décrites en détail, nous allons nous concentrer dans le chapitre suivant sur les applications de cette méthode de lithographie douce pour les Biopuces. Nous décrirons plus particulièrement les différents régimes de dépôt et la résolution possibles par  $\mu$ CP en utilisant des dendrimères. Nous étudierons de même le  $\mu$ CP d'ADN et ses applications pour les Biopuces. Enfin nous aborderons la fabrication par lithographie douce des Biopuces à molécules uniques et leurs perspectives.

## Références :

- [1] Y Xia, G. M Whitesides, Soft lithography *Angew. Chem., Int. Ed.*, 37, pp. 550-575, **1998**.
- [2] P Asberg, K.P.R.Nilsson, O Inganäs, Surface energy modified chips for detection of conformational states and enzymatic activity in biomolecules *Langmuir*, 22, pp.2205-2211, **2006**.
- [3] A Bernard, D Fitzli, P Sonderegger, E Delamarche, B Michel, H.R Bosshard, H Biebuyck, . Using liquid crystal to detect Affinity Microcontact Printed Biomolécules *Nat. Biotechnol.*, 19, pp. 866-869, **2001**.
- [4] J.P Renault, A Bernard, A Bietsch, B Michel, H.R Bosshard, E Delamarche, M Kreiter, B Hecht, U.P Wild. Fabricating Arrays of Single Protein Molecules on Glass Using Microcontact Printing *J. Phys. Chem. B*, 107, pp. 703-711, **2003**.
- [5] S Lange, V Benes, D Kern, H Hörber, A Bernard. Microcontact · Printing of DNA Molecules. *Anal Chem*, 76: pp. 1641-1647, **2004**.
- [6] C Thibault, V Leberre, S Casimirius, E Trévisiol, J.M. François, C Vieu. Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications *J. of Nanobiotech.*, 3:7, **2005**.
- [7] H.Christenson, J.Fang, B.Ninham and J. Parker, Effect of Divalent Electrolyte on the Hydrophobic Attraction, *J. Phys. Chem.*, 94, pp. 8004-8006, **1990**.
- [8] T.Kraus, R.Stutz, T.Balmer, H.Schmid, L.Malaquin, N.Spencer and H.Wolf, Printing Chemical Gradients, *Langmuir*, 21, pp. 7796-7804, **2005**.
- [9] M. Shchepinov, S.Case-Green and E.Southern, Steric factors influencing hybridization of nucleic acids to oligonucleotide *Nucleic Acids Res.*, 25, pp. 1155, **1997**.
- [10] E Trévisiol, V Leberre, J Leclaire, G Pratviel, AM Caminade, JP Majoral, J François, B Meunier. Dendrislides, Dendrichips: a Simple Chemical functionalization of glass slides with Phosphorus Dendrimers as an effective Mean for the Preparation of Biochips. *New J Chem*, 27: pp. 1713-1719, **2003**.
- [11] V Le Berre, E Trevisol, A Dagkessamanskaia, S Sokol, AM Caminade, JP Majoral, B Meunier, J François: Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis. *Nucleic Acids Research*, 31:e1-8, **2003**.

# Chapitre IV

## Biopuces

### Sommaire

<b>1-DENDRIMERES.....</b>	<b>134</b>
1-1-PRINCIPE DU DEPOT .....	135
1-2-LES DIFFERENTS REGIMES DE DEPOT .....	137
1-2-1-Régime d'excès .....	139
1-2-2-Régime de déficit .....	140
1-3-HAUTE RESOLUTION .....	142
<b>2-BIOPUCES A ADN.....</b>	<b>144</b>
2-1-ETUDE DU NOMBRE ET DU TEMPS DE CONTACT .....	145
2-2-COMPARAISON ENTRE LE SPOTTER ET LE $\mu$ CP.....	149
2-3-FABRICATION DE BIOPUCES POUR LA DETECTION DE MUTATION, MULTIPLEXAGE .....	152
<b>3-BIOPUCES A MOLECULES UNIQUES : PERSPECTIVES.....</b>	<b>156</b>
3-1-OBJECTIFS ET CONTEXTE .....	156
3-2-PEIGNAGE D'ADN .....	158
<b>REFERENCES :.....</b>	<b>164</b>



Nous avons discuté dans les chapitres précédents des différentes étapes du  $\mu$ CP. De la fabrication des moules et des timbres aux mécanismes permettant l'encrage et le dépôt. Dans ce dernier chapitre nous allons nous concentrer sur les possibilités offertes par cette méthode de lithographie et notamment pour la conception de biopuces. La discussion sera fractionnée en trois grandes parties, la première axée sur les dendrimères qui sont des molécules polyvalentes pouvant être aussi bien utilisées pour la microélectronique que pour la biologie. Dans la deuxième partie nous montrerons les nouvelles possibilités offertes par les méthodes de lithographie douce pour la conception de micro-array à ADN. La troisième et dernière partie discutera des perspectives ouvertes par ces travaux de thèse, notamment pour la réalisation de puces ADN à molécules uniques.

## 1-Dendrimères

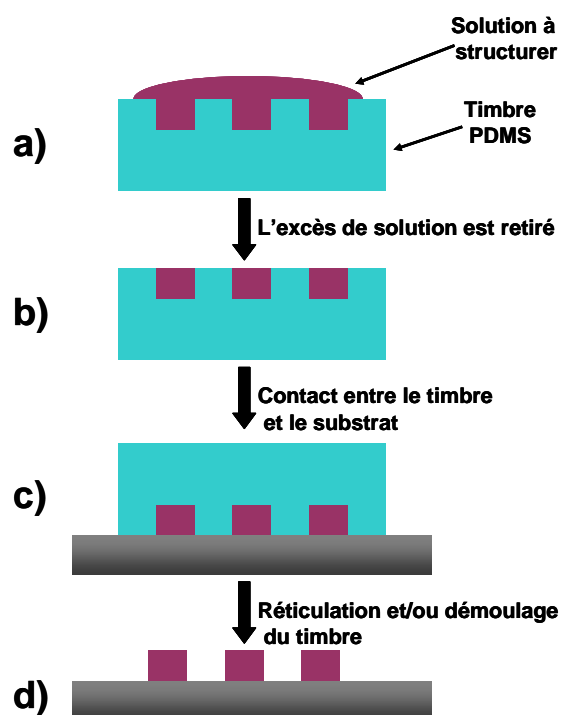
La figure 7 de la troisième partie du chapitre précédent nous montre la structure moléculaire des dendrimères que nous allons utiliser. Les dendrimères sont des polymères sphériques aux nombreuses propriétés engendrées par les structures moléculaires présentes à leur surface. Par exemple, un dendrimère peut être hydrosoluble quand son extrémité-groupe est un groupe hydrophile, comme un groupe carboxylique. Il est théoriquement possible de concevoir un dendrimère hydrosoluble avec une hydrophobicité interne, qui lui permettrait de porter un composé hydrophobe dans son intérieur (afin de transporter un composé thérapeutique hydrophobe dans le sang par exemple). Les applications des dendrimères pour la biologie sont très diverses comme élément organique électroluminescent, comme vecteur de médicaments ou comme moyen de fixation des molécules biologiques sur une surface. Comme nous l'avons discuté dans le chapitre III 3<sup>ème</sup> partie sur l'utilité des dendrilames pour les technologies de micro-arrays, c'est cette dernière propriété qui nous a intéressée particulièrement.

Dans le domaine de la nanofabrication, les dendrimères peuvent aussi être utilisés comme résine électrosensible ou comme masque de protection pour les gravures sèche. De plus, des lignes périodiques des dendrimères de génération 4 de polyamidoamine amine-terminés (PAMAM) avec des largeurs de 140 nm et un espacement de 70 nm ont été produites par  $\mu$ CP en 2002 par Li et al. [1]. Cette résolution nanométrique est rendue possible par la très faible diffusion de ces molécules sur le substrat. Parallèlement Arrington et al. [2] ont prouvé qu'en augmentant la concentration, des films épais de PAMAM (60 nm d'épaisseur)

pourraient être imprimés. Plus récemment, des couches alternatives de bio-nano-composite composé de polyélectrolytes, dendrimères, et de protéines amphiphiles ont été obtenues par Kholi et al. [3] employant une approche originale combinant le spin-coating pour encrer une structure multicouche sur un timbre élastomère, utilisant ensuite le  $\mu$ CP pour transférer la structure 3D intacte à la surface du substrat. Ces travaux démontrent l'intérêt d'employer des dendrimères pour atteindre une bonne résolution à l'échelle nanométrique avec la lithographie douce aussi bien que l'utilité de cette technique pour assembler des biomolécules et d'autres matériaux en 2D ou en structures 3D.

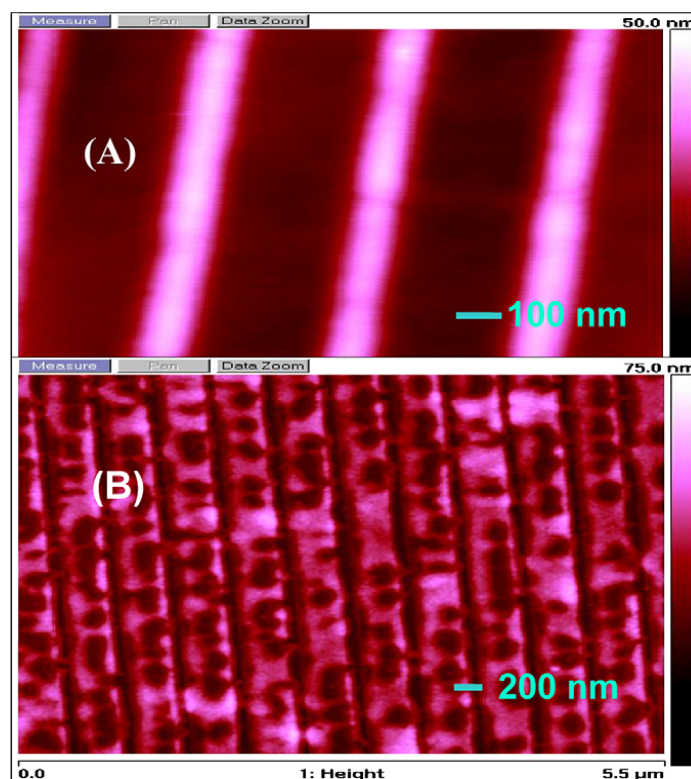
## 1-1-Principe du dépôt

Nous avons décidé d'utiliser une nouvelle classe des dendrimères hydrophobes (aldéhyde G4, groupe d'extrémité CHO), les mêmes ayant servi pour la réalisation de dendrilames. Ces dendrimères sont d'un intérêt particulier pour des applications de biopuce comme nous avons démontré dans les travaux précédents [4] en raison de l'interaction forte entre les groupes d'extrémité CHO et les groupes NH<sub>2</sub> se trouvant sur les protéines ou l'ADN. En accord avec le chapitre III (2-2-3) discutant de l'encrage de ces molécules et donc du type de dépôt en résultant, nos résultats indiquent un transfert par Microtransfer molding ( $\mu$ TM), voir figure 1 pour le principe. Dans ce procédé de  $\mu$ TM, aucun procédé n'est nécessaire afin de retirer l'excès du timbre pour le dépôt de couches épaisses à la différence d'autres polymères présentés par Whitesides et al. [5, 6]. Ce « nettoyage » du timbre a lieu spontanément pendant l'étape d'encrage en raison de l'affinité particulière du timbre de PDMS et du solvant (THF, voir Chapitre III 2-2-3).



**Figure 1 :** Principe général du Microtransfer Molding ( $\mu\text{TM}$ ). a) La solution à structurer est déposée sur le timbre, b) L'excès de solution est retiré du timbre soit par un flux d'azote qui chasse la goutte du timbre soit en « raclant » la surface du timbre à l'aide d'un timbre de PDMS plat. c) Le timbre est ensuite amené en contact avec le substrat, la solution est réticulée si besoin et le timbre est retiré laissant des structures épaisses sur le substrat.

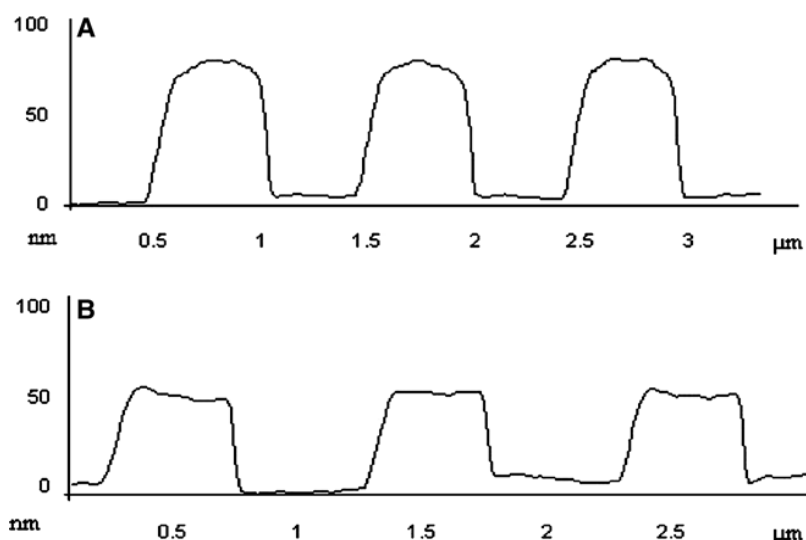
La Figure 2 présente une image AFM du timbre (a) et du dépôt réalisé à partir de celui-ci (b). Les lignes résultantes du  $\mu\text{TM}$  de dendrimères sont bien résolues. Les dépressions observées sur la surface des structures de dendrimères sont peu profondes, quelques nanomètres. Les mesures AFM indiquent une largeur des structures de dendrimères de 360 nm avec un espacement vide de dendrimère de 40 nm. L'examen soigneux des profils obtenus par AFM n'a indiqué aucune différence apparente entre la taille des structures du timbre de PDMS (40 nm au dessus dans fig. 2A) et les vides entre les structures (40 nm au fond dans fig. 2B) du film de dendrimères. Ceci suggère une fidélité élevée dans la réplique des motifs du timbre par  $\mu\text{TM}$ , avec l'avantage de produire des couches épaisses contrairement au  $\mu\text{CP}$ .



**Figure 2 :** Résolution ultime de  $\mu\text{TM}$  avec une solution de dendrimères. (A) Image AFM des motifs du timbre, la largeur des lignes est de 40 nm. (B) Image AFM du résultat du  $\mu\text{TM}$  de motifs de dendrimères sur du silicium, les lignes font 36 nm de large pour un pas de 400 nm.

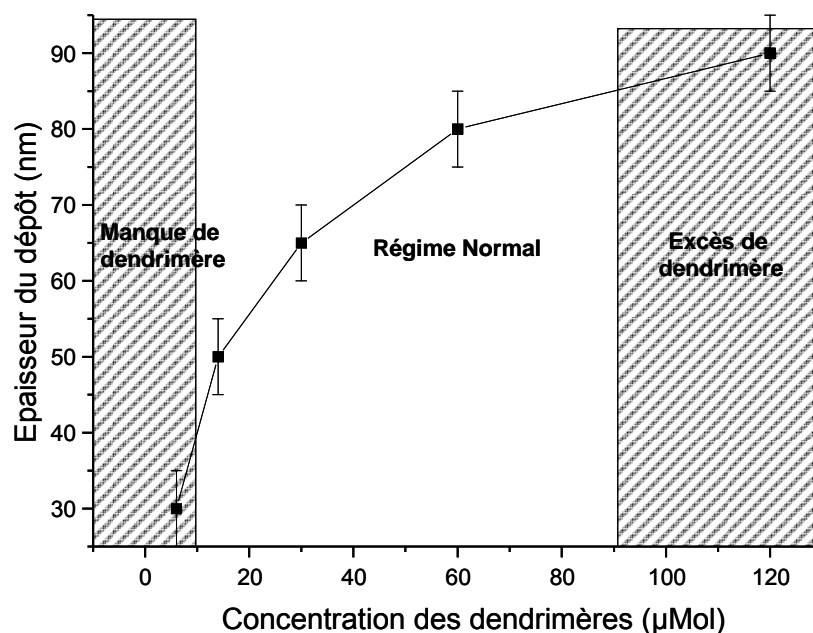
## 1-2-Les différents régimes de dépôt

Le  $\mu\text{TM}$  avait été jusqu'ici employé dans la littérature avec des prépolymères plus ou moins visqueux qui avaient exigé plusieurs heures d'encrage. Le polymère en excès avait besoin d'être enlevé par un morceau de PDMS plat raclant la surface du timbre. Dans le cas de ces dendrimères hydrophobes dilués dans le THF, ce « nettoyage » du timbre a lieu spontanément pendant l'étape d'encrage en raison de l'affinité particulière du timbre de PDMS et du solvant (THF), 30 secondes d'encrage seulement sont nécessaires. En outre, l'épaisseur des nanostructures déposées s'est avérée contrôlable. Sur tous les dépôts réalisés, nous avons déterminé que l'épaisseur moyenne de la couche de dendrimère adsorbé sur le timbre augmente avec la concentration. La solubilité maximum de dendrimères dans du THF est de 60  $\mu\text{M}$ . Les dépôts résultants d'un encrage à cette concentration ont une épaisseur de 80 nm (fig. 3A). Si une concentration quatre fois inférieure est employée, l'épaisseur diminue à 50 nm (fig. 3(B)).



**Figure 3 :** *Mesure AFM de lignes de dendrimères de 500 nm de largeur, obtenues par  $\mu$ TM sur un wafer de silicium fonctionnalisé avec de l'APTES : (a) solution concentrée : 60  $\mu$ M et (b) quatre fois plus faible : 15  $\mu$ M. La profondeur des motifs sur le timbre est de 90 nm.*

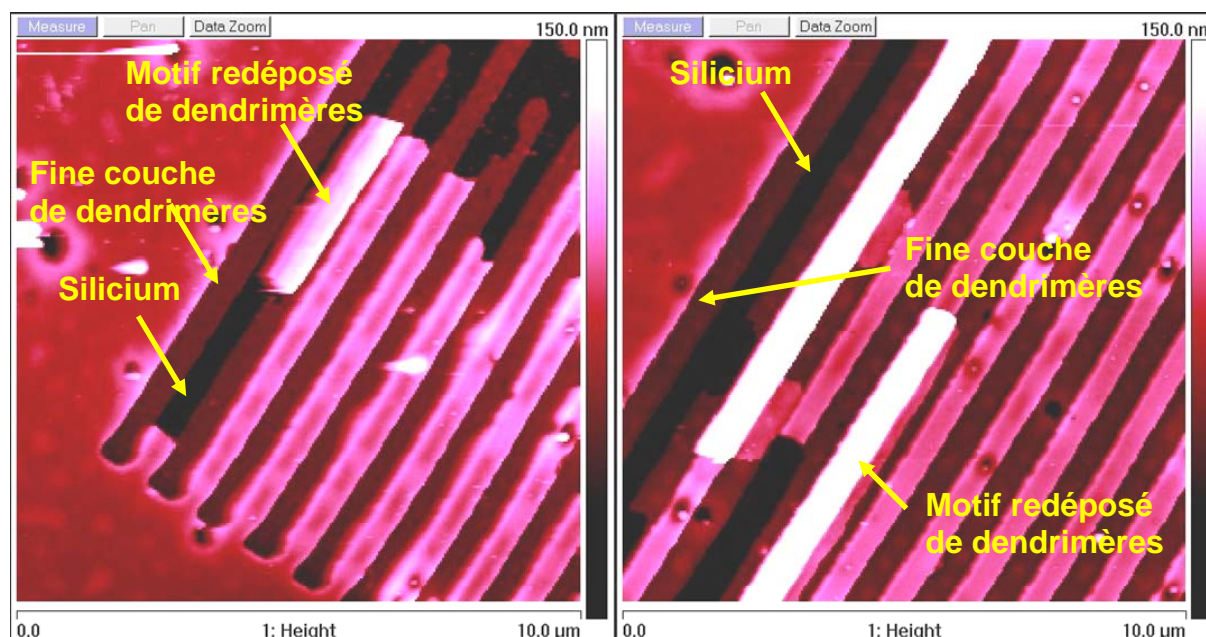
Dans le but de contrôler l'épaisseur de dendrimères adsorbée sur le timbre puis imprimée sur la surface, une large gamme de concentration de dendrimères dans le THF à été utilisée. Nous avons parfois procédé à un double encrage des timbres afin d'obtenir des épaisseurs plus importantes de dendrimères. Ces doubles encrages ont été notés par la suite comme étant un simple encrage avec une solution de concentration doublée (par rapport à la solution d'encrage). La figure 4 récapitule l'évolution de l'épaisseur des films déposés en fonction de la concentration de dendrimères. On peut noter trois parties dans cette courbe, la première correspond à des concentrations basses ( $<10 \mu\text{Mol}$ ). La quantité de dendrimère adsorbée a la surface est trop faible pour remplir l'espace entre les motifs du timbre, le film de dendrimère est discontinu sur le timbre, le dépôt de même. La deuxième partie, que nous appelons régime normal ( $10\mu\text{Mol} < [C] < 60\mu\text{Mol}$ ) correspond à une gamme de concentration permettant un dépôt de film homogène d'une épaisseur de 45 à 85 nm. Au-dessus d'une concentration de 60  $\mu\text{Mol}$ , les timbres ont besoin d'être raclés par un timbre de PDMS plat pour enlever l'excès, c'est le troisième régime, appelé régime d'excès. Ces différents régimes vont maintenant être détaillés, excepté le régime normal correspondant aux figures 2 et 3 puis à la partie 1-3 consacrée à la résolution maximale du procédé.



**Figure 4 :** Epaisseur du dépôt en fonction de la concentration en dendrimères. En-dessous de 10μMol, les motifs deviennent non-uniformes. Le manque de dendrimère engendre un régime de déficit. Au-dessus de 60 μMol nous entrons dans un régime d'excès de concentration de dendrimères. Courbe obtenue pour un timbre dont la profondeur des motifs est de 90nm.

### 1-2-1-Régime d'excès

La quantité de dendrimères adsorbée à la surface du timbre en PDMS est telle que, au-dessus d'une concentration de 60 μMol, les timbres ont besoin d'être raclés par un timbre de PDMS plat pour enlever l'excès. Si cela n'est pas fait, un film épais est déposé sur le substrat avec à sa surface des motifs de dendrimères. Il n'y a plus de régions sans dendrimères comme nous pouvons l'observer sur la figure 5.



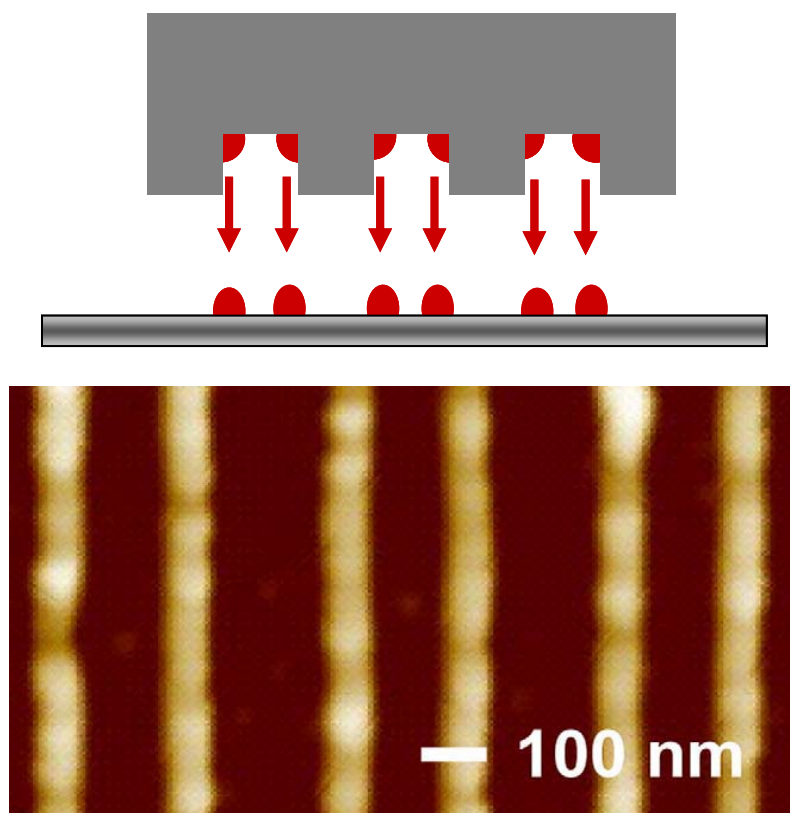
**Figure 5 :** Les images de gauche et de droite montre des dépôts de dendrimères en régime d'excès avec une concentration de  $120 \mu\text{Mol}$ .

Sur la figure 5 nous pouvons observer les motifs de dendrimères en surface (rose) puis un fond constitué par un film épais de dendrimère (rouge) et enfin le substrat de silicium en noir sur les images. Lors du retrait du timbre une partie des motifs de dendrimères du substrat à été « arrachée » du substrat. Ces zones « arrachées » se sont redéposées sur (images de droite) ou entre les motifs fixés (image de gauche) sur le substrat. Ces zones laissées libres de tout dendrimère nous ont ainsi permis de mesurer l'épaisseur de la fine couche de dendrimères (10 nm) ainsi que celle des motifs (80 nm).

### 1-2-2-Régime de déficit

Nous avons choisi une gamme de concentrations correspondantes au régime de manque et nous avons observé un dépôt seulement sur les bords des structures du timbre (figure 6). Le dépôt sur les bords ou « edge printing » en anglais est un régime qui n'apparaît pas dans la courbe de la figure 4. La raison en est simple, nous le considérons comme faisant partie du régime de manque car il donne lieu à des dépôts uniformes et d'épaisseur contrôlée mais ne reproduisant pas les structures du timbre. Quand les concentrations baissent en-dessous de  $20 \mu\text{M}$ , il n'y a plus assez de dendrimères pour remplir entièrement le canal entre deux lignes du timbre. En conséquence, les timbres déposent seulement des dendrimères aux bords des motifs (fig. 6). Ceci a été confirmé en regardant à la fois le timbre encré (image non

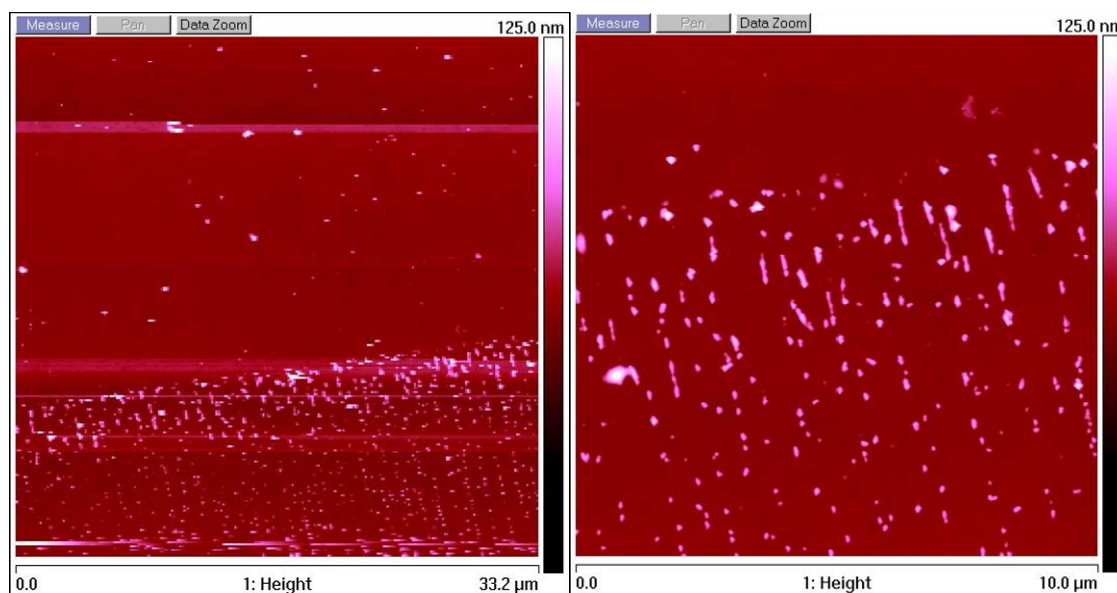
montrée) et le dépôt. Ce régime de dépôt présente l'avantage d'obtenir des motifs de dendrimères sur le substrat de dimensions plus petites que les motifs initiaux du moule.



**Figure 6 :** Schéma et image AFM d'un dépôt de bord de dendrimères avec une concentration de  $6 \mu\text{Mol}$ . Le timbre utilisé dans cette expérience est le même que pour les figures précédentes (lignes de  $500 \text{ nm}$  au pas de  $500 \text{ nm}$ ). Seuls les bords des motifs du timbre sont transférés ayant pour résultat des lignes larges de  $100 \text{ nm}$  et d'une épaisseur de  $30 \text{ nm}$ .

Lorsque la concentration passe en dessous de  $5 \mu\text{Mol}$ , le manque de dendrimères est tel que le dépôt devient discontinu. Il forme des pointillés d'épaisseur variable en fonction de la concentration, mais suit un motif similaire à un dépôt de bord (figure7).



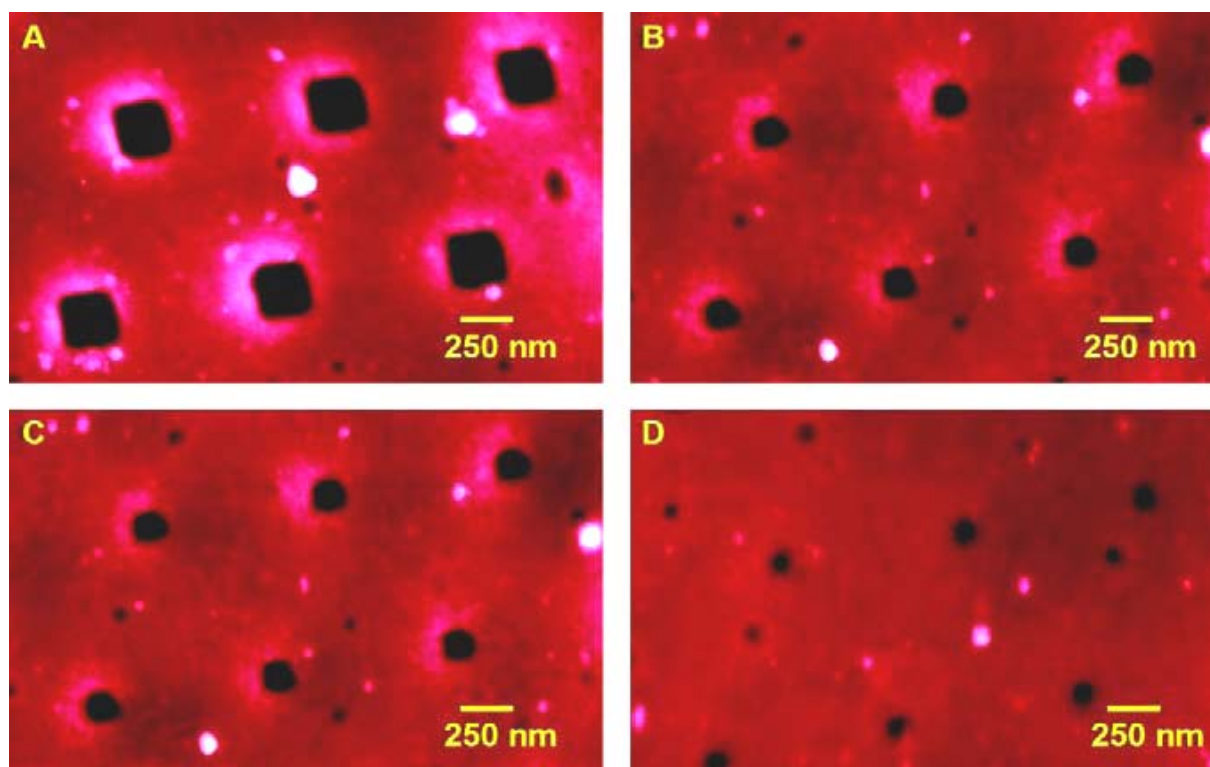


**Figure 7 :** Image AFM d'un bord de motif déposé par  $\mu$ TM en régime de manque. La concentration en dendrimère est de  $1\mu\text{Mol}$ .

### 1-3-Haute résolution

Pour estimer la résolution de la technique, nous avons utilisé des timbres avec des motifs carrés d'une taille de 250 à 50 nm avec un pas de  $1\mu\text{m}$ . Le dépôt a été obtenu en régime normal afin d'être homogène et de pouvoir contrôler l'épaisseur de dendrimères encrés. Des motifs de 250 à 50 nm ont ainsi pu être déposés par  $\mu$ TM (figure 8). Ce résultat correspond à ce jour à la meilleure résolution obtenue par  $\mu$ TM, toutes encres confondues. Les motifs sont très bien définis et la couche de dendrimère est homogène et d'épaisseur constante. Nous pouvons toutefois remarquer de petites dépressions dans la couche de dendrimère, elles sont attribuées à des agrégats de dendrimères qui sont demeurés sur le timbre lors du retrait. Ces petites dépressions n'excèdent jamais 10 nm.

Nous avons également suivi l'évolution dans le temps des dépôts. Des observations ont été effectuées un an après le dépôt initial sans aucune différence apparente avec les observations initiales. Les structures ainsi formées sont donc très stables dans le temps sur plus d'une année.



**Figure 8 :** Images d'AFM de  $\mu$ TM d'un film de dendrimères en régime normal. Tous les motifs ont un espacement de  $1 \mu\text{m}$  (a) carrés de  $250\text{nm}$ , (b) carrés de  $100$  de  $\text{nm}$ , (c) carrés de  $80$   $\text{nm}$  et (d) carrés de  $50$   $\text{nm}$ . L'épaisseur du film varie de  $80$   $\text{nm}$  à  $50$   $\text{nm}$  respectivement pour les images de A et D. Les zones noires sont les trous et les parties roses les dendrimères.

Dans ce paragraphe, nous avons démontré la possibilité de produire des couches épaisses avec une résolution nanométrique en utilisant une nouvelle classe de dendrimères hydrophobes (aldéhyde G4). Nous avons montré comment l'épaisseur de la couche de dendrimer peut être contrôlée par l'intermédiaire de la concentration de la solution constituant l'encre. Des motifs de  $250$   $\text{nm}$  à  $40$   $\text{nm}$  peuvent être transférés à partir du timbre de PDMS sur un substrat, ce qui constitue la meilleure résolution obtenue par  $\mu$ TM. Il est important de noter que dans nos expériences nous n'avons pas fait varier la profondeur des motifs du timbre de PDMS. Ce paramètre affecte la courbe 4, car les régimes déficitaires et en excès ne correspondent plus alors aux mêmes concentrations. De plus la stabilité des dendrimères dans le temps en fait un candidat idéal pour la lithographie 2D ou 3D et ses nombreuses applications. Cette technologie de dépôt de dendrimères a été développée pour répondre à des besoins au sein de notre groupe de recherche au LAAS. En effet, structurer un matériau possédant un indice optique intéressant associé à la possibilité de fixer des biomolécules à sa surface sous forme de réseaux diffractifs pourrait permettre la détection

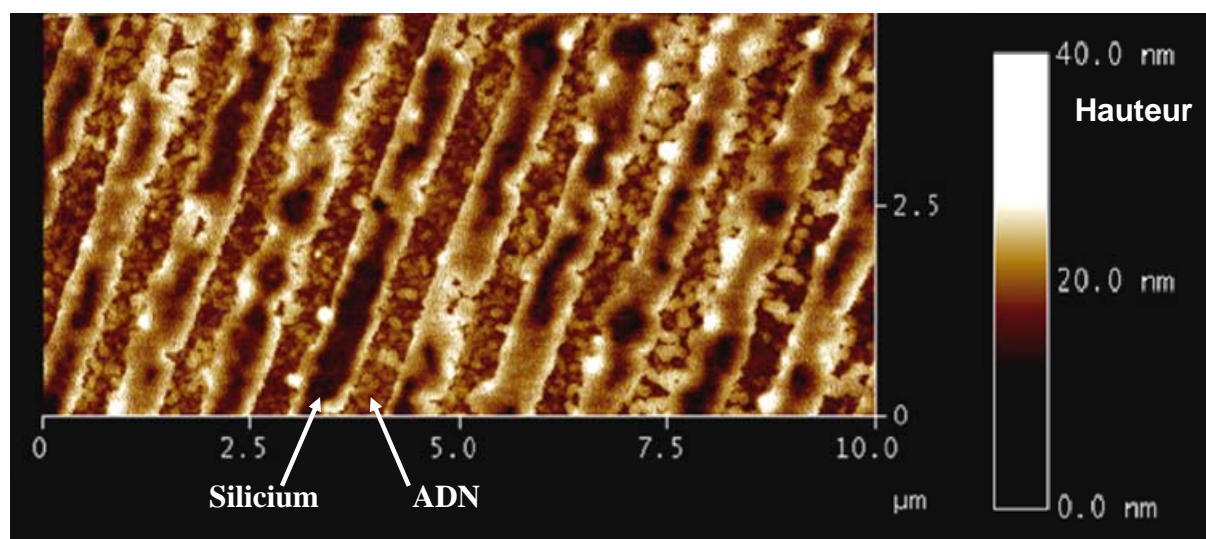
d'interactions entre une molécule cible et une molécule sonde. Ce projet constitue le sujet de thèse de J.C. Cau et de H. Lalo qui me succèdent au sein du groupe de recherche.

## 2-Biopuces à ADN

Les microarrays à ADN sont rapidement devenus l'un des outils essentiels pour étudier l'expression ou la mutation de milliers de gènes simultanément. Les différentes méthodes de fabrication de ces microarrays ont été discutées dans le chapitre 1, 2<sup>ème</sup> partie. Une caractéristique typique de ces techniques est la nature séquentielle du processus. Une molécule est déposée l'une après l'autre ou une base est ajoutée à la précédente, avec la conséquence que chaque spot est un original avec une vitesse de fabrication réduite. Bien que la fabrication de microarrays par la méthode Affymetrix comporte des étapes de fabrication qui permettent à des microarrays multiples (autour de 96) d'être synthétisés en parallèle. Ces plateformes technologiques ont besoin d'équipements sophistiqués, pour les puces à haute densité qui sont souvent trop chères pour la production et l'utilisation par les clients.

Il y a donc un besoin de méthodes alternatives qui doivent être très simples, reproductibles, rentables, et par la suite transférables vers tous les laboratoires dans leur problématiques respectives. Le microcontact printing ( $\mu$ CP) pourrait remplir cette condition. Cette méthode permet en effet le dépôt des molécules sondes sur une surface en parallèle, avec des motifs pouvant atteindre l'échelle nanométrique (figure 9). Nous allons donc tenter de démontrer que le  $\mu$ CP peut être employé pour fabriquer des biopuces à ADN. Nous avons déjà discuté dans le chapitre précédent de l'encrage de ces molécules sur un timbre en PDMS. Ce qui nous a conduit à constater la rapidité de l'encrage et du temps de dépôt (respectivement 30 et 15 secondes). Les dépôts montrés par la suite ont tous été réalisés sur des « Dendrilames ». Les dendrilames sont des lames de verre fonctionnalisées par des dendrimères aldéhyde de génération 4 (cf chapitre III 3). Nous avons également vérifié que des timbres pourraient être réutilisés plusieurs fois après nettoyage dans l'eau déionisée. Les expériences détaillées ci-dessous visent à étudier le nombre de contacts successifs pouvant

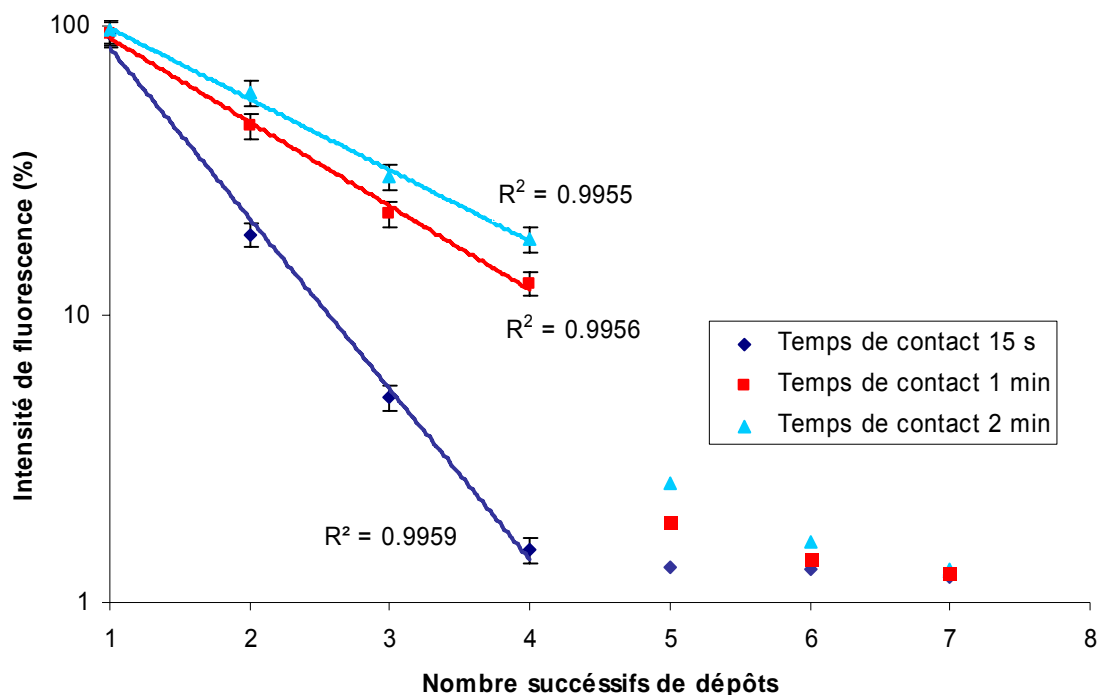
être réalisés sans réencrage, puis de démontrer la potentialité de cette technique pour des biopuces réelles.



**Figure 9 :** Image AFM d'un dépôt d'ADN suivant un réseau de lignes de 500nm de largeur au pas de 1 $\mu$ m et de quelques manomètres d'épaisseurs. Le dépôt a été effectué sur une lame de verre d'où une rugosité importante.

## 2-1-Etude du nombre et du temps de contact

Dans le but de contrôler précisément le nombre de dépôts successifs possibles avec un même timbre sans encrage entre chaque dépôt, nous avons étudié l'influence du temps de contact pendant le  $\mu$ CP et l'évolution des signaux fluorescents après plusieurs dépôts successifs avec un même timbre. Nous avons encré un timbre avec un oligonucléotide fluorescent de 35-mer (5'Cy5-TTAGCGCATTTTGGCATATTTGGGCGGACAACCTT-NH<sub>2</sub>-3'). Puis nous avons fait 10 dépôts successifs (sur des zones différentes) sans encrage entre chaque dépôt avec un temps de contact de 15s. Nous avons fait de même pour des temps de contact de 1 minute et de 2 minutes. Pour évaluer l'évolution de l'intensité de fluorescence au fur et à mesure des dépôts successifs (et donc du nombre d'oligonucléotides déposés), l'intensité moyenne de chaque motif a été soustraite du bruit de fond et comparées à celle des motifs du premier dépôt qui a été placée arbitrairement à 100% (figure 10).



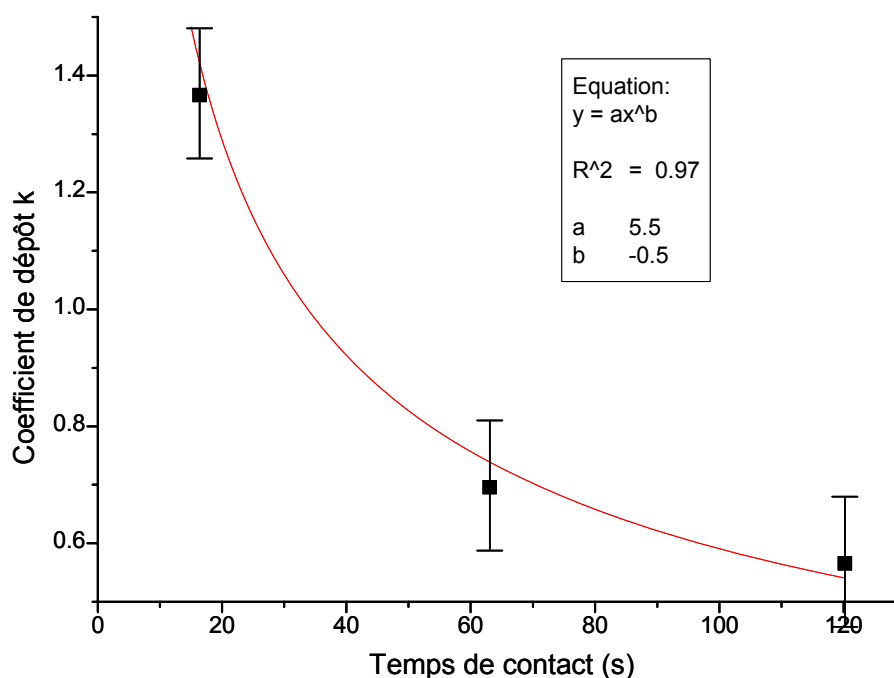
**Figure 10 :** Variation de signal fluorescence en fonction de nombre de dépôts successifs pour 3 temps de contact différents ; 15 s, 1 min et 2 min. Le timbre a été encré avec une solution d'oligonucléotide à 10 $\mu$ Mol 35-mer 5'-Cy5 pendant 30 sec, puis mis en contact avec la dendrilame. La valeur de l'intensité de fluorescence (fluorescence – bruit de fond), chaque point représente une moyenne de 4 expériences indépendantes. La régression linéaire exponentielle (lignes solides) a une bonne concordance avec les points expérimentaux, comme le démontrent les facteurs de corrélation R rapportés sur les courbes.

Nous pouvons voir sur la figure 10 un affaiblissement exponentiel de l'intensité de fluorescence jusqu'au 4<sup>ème</sup> dépôt consécutif, quel que soit le temps de contact. Après le 4<sup>ème</sup> dépôt nous voyons apparaître un régime différent (dépôt 5,6 et 7) ne correspondant plus à la décroissance exponentielle. Nous allons nous intéresser à la première partie de cette courbe où plus les temps de contact sont courts plus la diminution de l'intensité de fluorescence est rapide. La régression exponentielle que nous avons effectuée a une bonne concordance avec les points expérimentaux, comme le démontrent les facteurs de corrélation  $R^2$  tous supérieur à 0,995. Cette régression nous a conduit à l'équation suivante :

$$-\frac{dN}{dn} = kN \quad (1)$$

Où N est le nombre de molécules déposées sur la dendrilame au dépôt numéro n. Cette équation représente la diminution des molécules présentes à la surface du timbre après chaque dépôt en raison des transports opérés lors des impressions précédentes. Nous allons utiliser

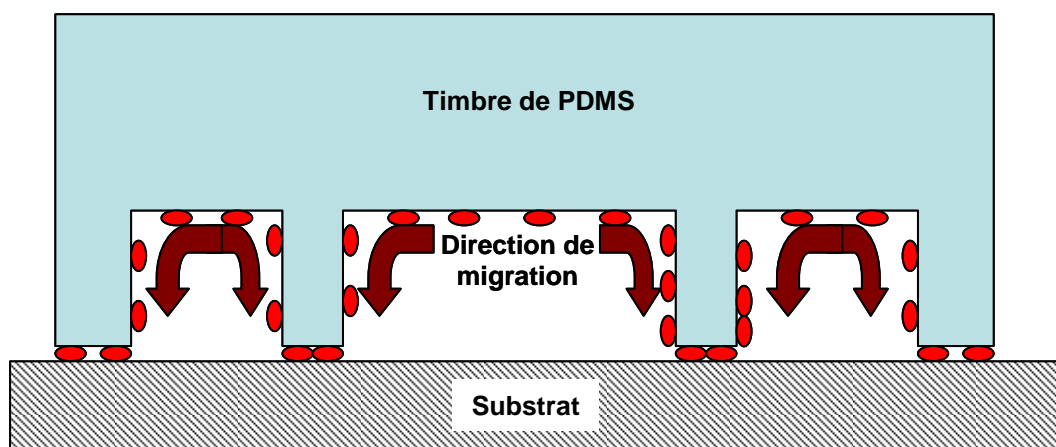
cette expression pour déterminer les valeurs de  $k$ , le coefficient de dépôt des molécules sur le substrat. Les valeurs de  $k$  extraites de l'équation (1) ont été calculées pour les différents temps de contact :  $k = 1.36$  pour  $t = 15$  s,  $k = 0.67$  pour  $t = 1$  minute,  $k = 0.57$  pour  $t = 2$  minutes. Ce résultat indique que plus le temps de contact est long, plus l'épuisement du timbre en molécule est lent, ce qui correspond au phénomène inverse de ce à quoi nous aurions pu nous attendre. Le coefficient  $k$  caractérise d'une certaine manière la cinétique du transfert des molécules depuis le timbre vers la surface de l'échantillon lors du contact. Il nous a paru intéressant de tracer l'évolution de  $k$  en fonction du temps de contact. La courbe est représentée en figure 11. Un bon ajustement passant par ces 3 points ( $R^2 = 0,97$ ) est obtenu pour un comportement de  $k$  variant comme l'inverse de la racine carrée du temps de contact.



**Figure 11 :** Evolution du coefficient de dépôt  $k$  en fonction du temps de contact. La courbe en rouge correspond à un ajustement effectué sur les données expérimentales avec une bonne correspondance ( $R^2=0,97$ ). L'équation en résultant est la suivante :  $k = 5,5 \frac{1}{\sqrt{x}}$ .

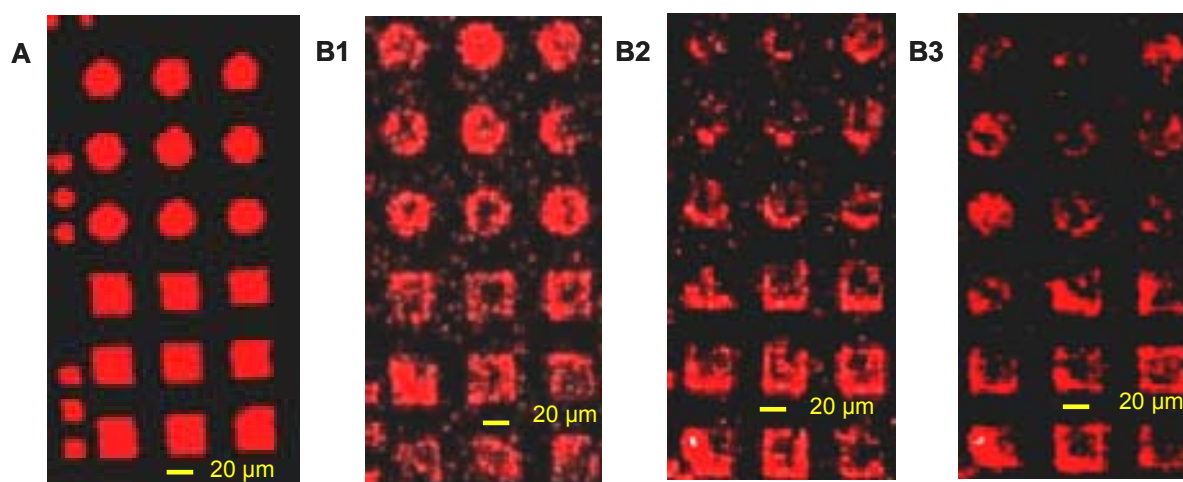
Cette dépendance en  $t^{-1/2}$  suggère que la cinétique du transfert des molécules d'ADN est contrôlée par un phénomène de diffusion. Notre interprétation est la suivante : lors du contact, les molécules d'ADN peuvent diffuser à la surface du timbre depuis les cavités du timbre vers les zones du timbre en contact avec la dendrilame. Un schéma de ce mécanisme est représenté sur la figure 12. Il est très étonnant toutefois d'observer une diffusion de

surface des molécules d'ADN à température ambiante compte tenu de leur poids moléculaire élevé.



**Figure 12 :** Mécanisme de diffusion des oligonucléotides pendant le contact. Les molécules d'ADN migrent vers les zones en contact avec le substrat ayant une grande affinité avec elles.

Notre interprétation permet d'expliquer la diminution plus lente de l'intensité de fluorescence pour des temps croissants de contact, en raison du temps plus long pendant lequel les molécules d'ADN migrent à la surface du timbre. En outre, nous avons calculé que le coefficient  $k$  évolue comme l'inverse de la racine carrée du temps de contact, ce qui est conforme à un mécanisme de diffusion. De plus, nous avons vu qu'après 4 dépôts successifs un deuxième régime apparaissait. Ce régime peut être expliqué par le fait que le nombre de molécules adsorbées sur les structures du timbre de PDMS a été dans une grande majorité déposé précédemment. Les cavités du timbre sont progressivement dépeuplées et le transfert par  $\mu$ CP cesse d'être opérationnel. Cependant, une diminution très lente de l'intensité de fluorescence du 5<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> dépôt est mesurée. Sur les images en fluorescence du 5<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> dépôt pour un temps de contact de 2 minutes (figure 13) nous observons que seule la périphérie des motifs est visible. Ces images attestent bien que le transfert des molécules s'effectue depuis les cotés des motifs ce qui confirme l'interprétation que nous avons donnée. Pour des temps plus courts de contact, les images en fluorescence ont une intensité trop faible pour être présentées. Nous pouvons donc supposer que les molécules situées sur les bords des structures du timbre ont eu assez de temps en deux minutes pour diffuser pendant le contact et pas assez de temps pour les temps de contacts inférieurs. Ceci nous permet d'estimer grossièrement le coefficient de diffusion des molécules d'ADN à la surface du timbre de PDMS pendant le contact : l'ordre de grandeur est de  $10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ .



**Figure 13 :** (A) Image en fluorescence du premier dépôt, et (B) montre les dépôts numéros 5 (B1), 6 (B2) et 7(B3). Un timbre a été encré avec une solution d'oligonucléotide 10µMol de 15-mer 5'-Cy5 pendant 30 sec puis a été placé en contact pendant 2 minutes avec une dendrilame et ce 10 fois consécutivement en des positions différentes de la lame.

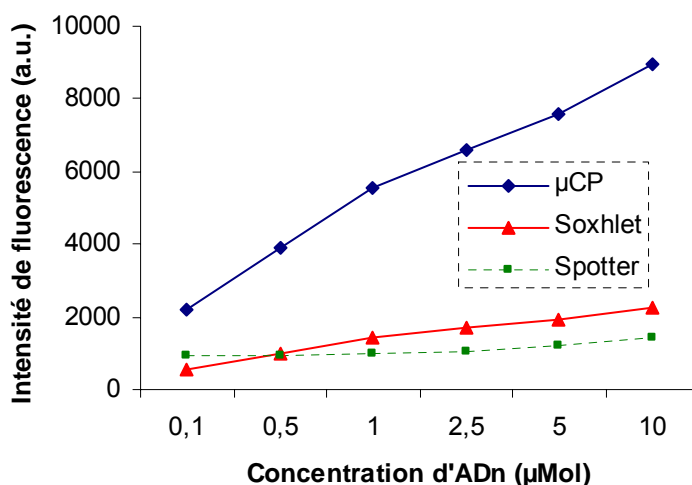
En conclusion de ce paragraphe, nous avons ainsi démontré la possibilité d'effectuer 4 dépôts successifs sans encrage. L'étude de l'évolution des signaux de fluorescence d'une impression à l'autre nous a permis de dégager un comportement diffusif des molécules d'ADN à la surface du timbre en PDMS pendant le contact. Cette interprétation a été confirmée par les observations des dépôts obtenus au-delà de la 4<sup>ème</sup> impression, où seuls les bords des motifs sont imprimés. Le coefficient de diffusion de surface à température ambiante est de l'ordre de  $10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ . Nous suspectons le rôle prépondérant joué par les fragments non réticulés de PDMS présents à la surface du timbre pour expliquer ce phénomène de diffusion. Notre interprétation est confirmée par les résultats que nous avons obtenus pour des timbres de PDMS préalablement lavés (voir chapitre III 2-1-2). Dans ce dernier cas, le transport de molécules d'ADN est de moindre qualité (voir figure 7 chapitre III) et des impressions successives ne sont plus possibles en raison de l'absence de diffusion de surface. Ce résultat est étonnant en raison de la grande taille et de la masse molaire élevée des molécules d'ADN.

## 2-2-Comparaison entre le spotter et le µCP

La grande majorité des micro-arrays à ADN sont fabriqués grâce à un système de dépôt par aiguilles métalliques. Ce système est utilisé par nos collaborateurs de la plateforme biopuce de l'INSA. Nous avons souhaité comparer le dépôt par µCP et cette méthode largement utilisée. Pour ce faire, nous avons mené une expérience dans laquelle l'intensité de



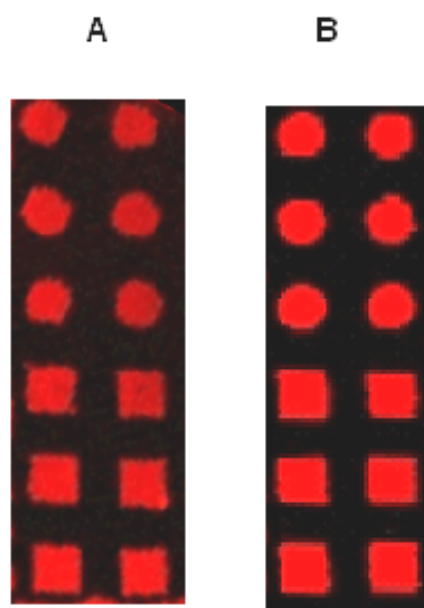
fluorescence d'un motif de taille donnée est mesurée en fonction de la concentration des molécules sondes d'ADN pour les deux techniques de dépôt. Des dépôts de même taille (60  $\mu\text{m}$  taille minimum du dépôt par aiguille) ont été réalisés avec différentes concentrations en oligonucléotides 20-mer du gène HSP12 de la levure, sur des dendrilames par les deux techniques. Les motifs ont ensuite été hybridés avec des oligonucléotides complémentaires marqués en fluorescence.



**Figure 14 :** Comparaison de l'intensité de fluorescence mesurée après hybridation sur des dépôts d'ADN réalisé avec un « spotter » conventionnel (courbe verte), par  $\mu\text{CP}$  en utilisant un timbre de PDMS non nettoyé (courbe bleue), par  $\mu\text{CP}$  en utilisant un timbre de PDMS nettoyé pendant 12 heures avec un Soxhlet (courbe rouge), pour des concentrations différentes de molécules sonde. Chaque point expérimental correspond à une valeur moyenne sur une centaine de dépôts. Les molécules sonde d'ADN (20 mers) ont été spottées et déposées par  $\mu\text{CP}$  sur des dendrilames.

La figure 14 montre l'évolution de l'intensité de fluorescence en unités arbitraires en fonction de la concentration initiale de la sonde. Pour une concentration de 0,1 à 10  $\mu\text{M}$ , le signal de fluorescence est de 5 à 10 fois plus élevé quand le dépôt a été effectué par  $\mu\text{CP}$ . Cette différence significative pourrait être expliquée par le fait que le dépôt effectué par  $\mu\text{CP}$  s'opère à sec, les molécules d'ADN encrées sur le timbre de manière uniforme et dense (voir chapitre 3) sont redéposées sur le substrat sous cette même forme. A contrario, le dépôt d'une goutte de liquide sur le substrat, est sujet à l'évaporation, cela entraîne la formation de couches irrégulières de molécules. Il est alors possible qu'une quantité non négligeable de molécules sondes présentes dans la goutte ne se lient pas de manière stable avec la dendrilame et soient arrachées lors du séchage où ne participent pas à l'hybridation ultérieure. De plus, il est possible que les sondes déposées sur le substrat par  $\mu\text{CP}$  soient mieux organisées, permettant ainsi une plus grande quantité de sondes accessibles aux cibles. Dans tous les cas, pour un

rapport signal sur bruit donné, la quantité de molécules sondes nécessaires pour obtenir les mêmes signaux d'hybridation en utilisant le  $\mu$ CP est toujours inférieur par rapport à la technologie classique de dépôt. Ceci peut être à l'avenir un des principaux avantages de cette technique compte tenu du prix élevé des molécules sondes d'ADN. Sur la figure 14 nous avons ajouté une courbe rappelant les mêmes expériences faites avec un timbre nettoyé au Soxhlet comme nous l'avons vu dans le chapitre III. Nous pouvons remarquer que l'intensité de fluorescence obtenue dans ce cas est comparable à celle obtenue par dépôts à aiguilles. De plus elle est plus de 10 fois plus faible que celle obtenue avec un timbre non lavé. Cela démontre bien que cette différence d'intensité entre un dépôt classique par aiguilles métalliques et un dépôt par  $\mu$ CP est essentiellement dû aux fragments non réticulés du timbre. Outre les avantages cités ci-dessus, ce procédé d'impression est souple et donne également d'excellents résultats avec de plus longues molécules d'ADN ou des fragments de PCR (figure 15).



**Figure 15 :** Images en microscopie à fluorescence de motifs micrométriques typiques obtenus par  $\mu$ CP. Le timbre a été incubé pendant 30 sec avec un fragment du gène de la levure HSP12 (a) ou avec de l'oligonucléotide du mer 20- du même gène de levure (b), puis amené en contact manuellement pendant 15 sec avec une dendrilame. L'hybridation a été effectuée avec l'oligonucléotide complémentaire HSP12 Cy5-labelled. L'intensité moyenne moins le bruit de fond des deux expériences est respectivement de 2120 pour A et 4119 pour B (unités arbitraires).

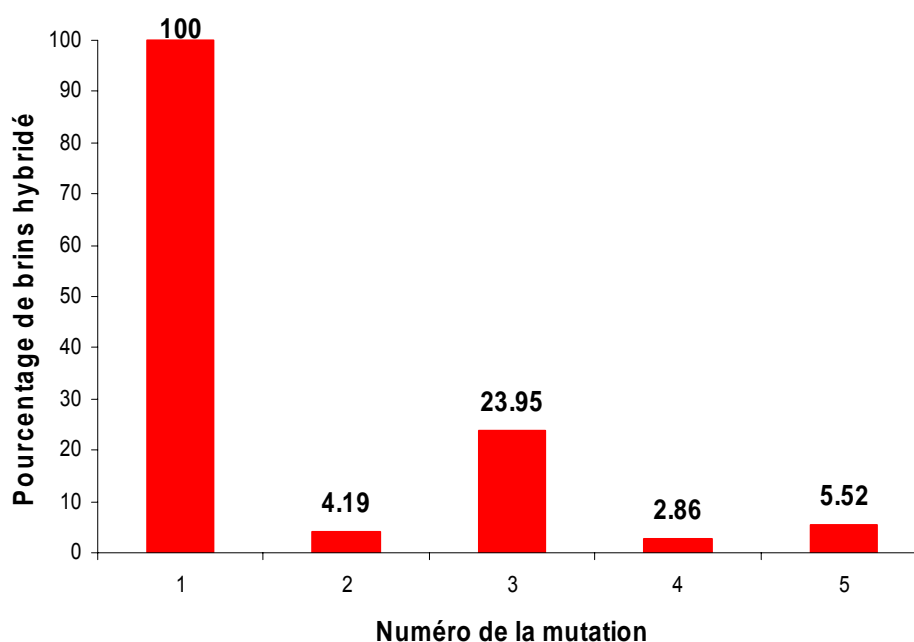
Il faut noter que les fragments PCR d'ADN donnent toujours, quelle que soit la méthode de dépôt utilisée, des valeurs d'intensité de fluorescence deux fois inférieures aux

intensités obtenus avec des oligonucléotides. Ceci explique la différence obtenue sur la figure 15 entre les fragments PCR et les oligonucléotides.

## **2-3-Fabrication de Biopuces pour la détection de mutation, multiplexage**

### **Validation**

Ayant démontré que des oligonucléotides peuvent être efficacement déposés par  $\mu$ CP, nous nous sommes intéressés à la finalité de cette thèse, la fabrication de Biopuces. Nous avons étudié la possibilité de fabriquer un type de puce couramment utilisé et standard afin de pouvoir la comparer avec des résultats existants. Nous avons donc déposé par  $\mu$ CP 5 oligonucléotides 20-mer du gène HSP12 différents, codant une protéine chaperonne de la levure [7]. Ces sondes diffèrent par une mutation simple ou double à des positions proximales des extrémités 5' ou 3' ou en position centrale. Le dépôt s'est effectué en une seule étape de  $\mu$ CP, les différents oligonucléotides ayant été encrés en différents endroits du timbre. Ces oligonucléotides une fois déposés, ont alors été hybridés avec de l'ADN marqué en fluorescence (Cy5) préparée à partir de l'ARN total de levure dans une chambre automatique d'hybridation. Nous avons ensuite comparé l'intensité d'hybridation des molécules cibles sur les motifs déposés. Nous avons observé comme décrit dans la littérature que selon la position et la nature de la mutation, le signal d'hybridation est considérablement réduit. Comme prévu, la position de la mutation le long de la molécule sonde influence fortement le pourcentage d'hybridation (figure 15). Cette expérience a été répétée 4 fois indépendamment, les données sont fortement reproductibles avec une déviation statistique inférieure à 1%. Lorsque la mutation est en bout de chaîne (mutation n°3 - coté fixé sur la surface) le pourcentage d'hybridation est plus élevé. Ceci est normal car la reconnaissance peut s'effectuer sur une plus grande partie de l'oligonucléotide. Contrairement à cela, une mutation en position centrale (mutation n°2) empêche une bonne hybridation. Ces données sont similaires à celles obtenues par une méthode de dépôt pas aiguille [8]. Nous avons vu précédemment que pour une même concentration l'intensité du signal de fluorescence est plus élevée pour un dépôt par  $\mu$ CP. Cela facilite la différenciation des différents oligonucléotides mutés. Nous avons donc besoin d'accumuler moins d'expériences que par la méthode de dépôt par aiguille métallique. De plus le signal étant plus uniforme, l'erreur statistique est 4 fois plus faible (<1% pour le  $\mu$ CP et 4% pour un dépôt par aiguille).



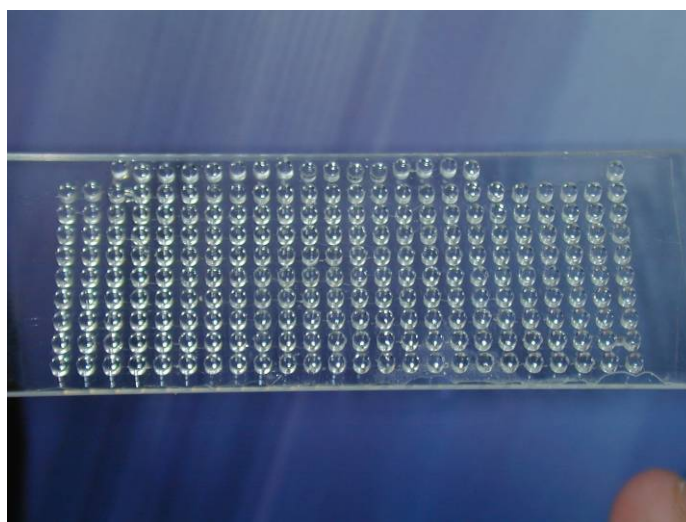
**Figure 16 :** Biopuce réalisée par  $\mu$ CP. Comparaison de l'intensité du signal d'hybridation des molécules cibles sur 5 oligonucléotides mutés. La "mutation" 1 correspond au parfait complémentaire de la molécule cible et son intensité de fluorescence sert de référence. Cette « puce » permet de détecter les mutations d'une séquence donnée et de les différencier avec seulement 0,4 % d'erreur. La comparaison est effectuée par hybridation des cibles avec le brin sonde parfaitement complémentaire de la séquence non mutée (1) qui sert ainsi de référence. Les séquences des différentes sondes sont les suivantes, la position de la mutation (sauf 1) est repérée : 1:

NH2 5'- AATATGTTTCCGGTCGTGTC  
 2: NH2 5'- AATATGTTTCAGGTCGTGTC  
 3: NH2 5'- AATATGTTTCCGGTCGTGTA  
 4: NH2 5'- AATATGATTCCGGA CGTGTC  
 5: NH2 5'- AATAAGTTTCCGGTCGTGTC

## Multiplexage

Une des limitations du  $\mu$ CP pour la fabrication de biopuces réside dans le fait que seulement 1 type de molécules ou un nombre très limité de molécules différentes comme nous avons vu ci-dessus peut être déposé en une seule étape. Ceci est dû au fait qu'il est très difficile d'encreur un timbre de PDMS avec des molécules différentes sans contamination. Il est donc important de permettre un multiplexage de ce procédé pour le rendre concurrentiel avec les méthodes classiques de dépôt. Afin de nous affranchir de cette limitation nous avons imaginé un procédé permettant de déposer jusqu'à 1536 molécules différentes en une seule étape de  $\mu$ CP, ce procédé a fait l'objet d'un brevet [9]. L'idée consiste en la fabrication d'un timbre de taille macrométrique possédant des protubérances (1536 au maximum) permettant à

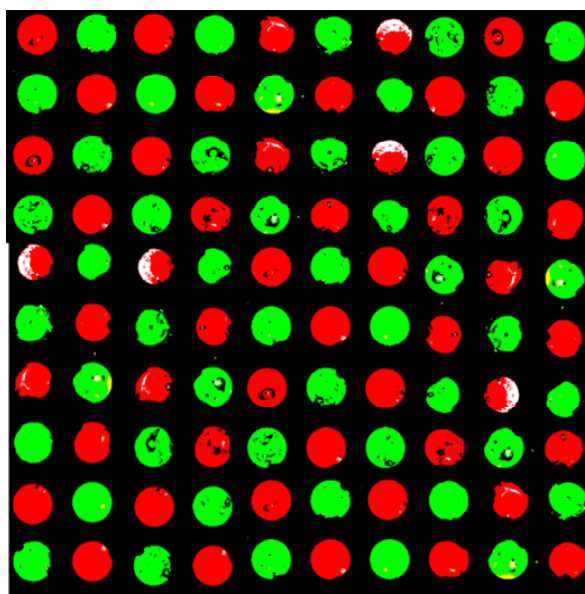
chacune d'entre elles d'être plongé en même temps dans une plaque de titration classique de 1536 puits, tous remplis de molécules différentes, lors de l'étape d'encrage. Ce macrotimbre (figure 17) est alors séché classiquement, puis emmené en contact avec un substrat standard pour la fixation des molécules choisies. Chacune des protubérances agissant comme un timbre indépendant, nous pouvons recouvrir chacun de ces timbres avec un grand nombre de motifs différents, ces timbres déposant chacun leur molécules. Les motifs pouvant aller de l'échelle nanométrique à micrométrique, un très grand nombre de motifs (par exemple : 25 réseaux diffractifs de  $100\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$ ) et de molécules (jusqu'à 1536) est ainsi déposé, facilitant d'autant plus les études statistiques. La fabrication du macrotimbre est simple, un moule plastique macrométrique percé de trous de taille inférieur au rayon des puits d'une plaque de titration, est aligné et pressé sur un wafer de silicium possédant les motifs micrométriques et/ou nanométriques. Le PDMS est ensuite coulé et réticulé sur cet assemblage.



**Figure 17 :** Photographie d'un timbre de PDMS avec des dimensions conformes à une plaque de titration pour le  $\mu\text{CP}$  multiplexé. Ce timbre comporte plus de 200 protubérances agissant toutes comme un timbre indépendant. Chaque protubérance fait moins d' $1\text{ mm}^2$  et possède des motifs micrométriques et/ou nanométriques à sa surface.

Afin de vérifier la viabilité du procédé, nous avons effectué des tests de contaminations croisées (figure 18). Ceci dans le but de contrôler si chaque protubérance du macrotimbre est bien indépendante de ses voisins proches. Sur la figure 18 nous pouvons voir le dépôt par  $\mu\text{CP}$  de 100 protubérances d'un macrotimbre. Chacune de ces protubérances a été encrée dans une plaque de titration où chaque puits a été rempli par une alternance de fluorophores rouges et verts. Aucune des protubérances ne possédait de motifs à sa surface. Nous pouvons remarquer que l'alternance de dépôts rouges et verts est bien respectée. Si un

mélange avait eu lieu entre deux puits ou suite à une migration d'une protubérance vers une autre, un dépôt jaune résultant du mélange d'un fluorophore rouge et vert apparaîtrait, ce qui n'est pas le cas ici. Ces tests sont donc la preuve qu'aucune contamination n'a lieu. Cela nous permet de valider la possibilité de déposer en une seule étape jusqu'à 1536 molécules différentes sans contamination selon des motifs bien précis avec tous les avantages évoqués ci-dessus du  $\mu$ CP par rapport aux méthodes de dépôt classique. Les validations de ce macrotimbre au sein du groupe de recherche se poursuivent au-delà de mon travail de thèse en collaboration avec la plateforme biopuces de l'INSA.



**Figure 18 :** Image en fluorescences de fluorophores déposés sur une lame de verre en utilisant un macrotimbre de PDMS. Test de contamination croisé avec 1 minute d'encrage du timbre dans la plaque de titration, séchage sous un flux d'azote et 15 s de contact avec le substrat. La plaque de titration est remplie avec une alternance puits par puits de fluorophores rouge et vert. La bonne fidélité des couleurs du dépôt certifie une absence de contamination entre les protubérances adjacentes.

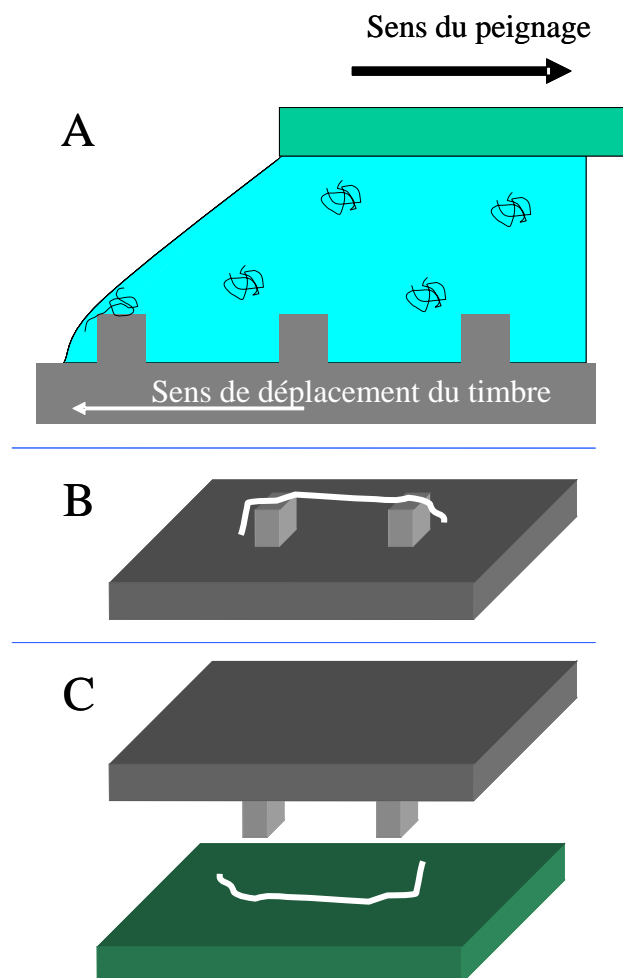
Nous avons démontré que le  $\mu$ CP est une nouvelle technologie de fabrication de microarrays d'ADN, offrant une grande vitesse de production et une résolution élevée. Deux avantages significatifs de cette technologie sont : (i) la simplicité du  $\mu$ CP associée au bas coût du matériel utilisé pour faire le timbre, (ii) les dépôts obtenus par  $\mu$ CP offrent une intensité plus élevée de la fluorescence d'un facteur 10 après hybridation comparé aux technologies conventionnelles. De plus la possibilité de multiplexer les dépôts jusqu'à 1536 molécules différentes avec un macrotimbre augmente d'autant plus sa cadence de dépôt et sa flexibilité. À l'avenir le  $\mu$ CP peut aider à simplifier, accélérer, améliorer la fabrication des microarrays classiques et augmenter de manière significative leur accessibilité pour des applications

cliniques. Mais l'avantage le plus important du  $\mu$ CP est sans doute la possibilité de déposer l'ADN avec un grand choix de motifs différents. Dans le cadre de la thèse de J.C. Cau et H. Lalo (projet Diffrapuce) le dépôt de molécules en réseaux diffractifs par  $\mu$ CP est étudié. Il permettrait de s'affranchir de tout marquage en fluorescence par la détection de la variation de l'intensité diffractée consécutive à l'hybridation de l'ADN sonde par son ADN cible.

### **3-Biopuces à molécules uniques : perspectives**

#### **3-1-Objectifs et contexte**

Les approches à l'échelle de la molécule unique permettent d'atteindre des informations indispensables à la compréhension des machines moléculaires du vivant et inaccessibles par les approches biochimiques classiques. L'approche que nous avons étudiée consiste à auto-assembler par peignage capillaire des brins d'ADN à la surface d'un timbre structuré, puis de les déposer par  $\mu$ CP sur le substrat (figure 19). Le dépôt d'ADN peigné sur un timbre de PDMS a déjà été démontré par Guan et al. [10]. La figure 19A schématise le principe du peignage capillaire que nous allons utiliser. Une goutte de solution contenant la molécule à peigner est pressée entre une lame de verre et le timbre de PDMS. Le timbre de PDMS est déplacé par un moteur avec une vitesse de 100nm/s à plusieurs centaines de microns par secondes. Il faut noter que le ménisque formé par la solution se déplace dans le sens inverse du déplacement du timbre. Les molécules d'ADN sont ainsi piégées sur les structures du timbre par le déplacement du ménisque. Les timbres que nous utilisons possèdent des structures carrées de 5 $\mu$ m de côté au pas de 15 $\mu$ m (la longueur des brins d'ADN que nous allons utiliser est de 20 $\mu$ m). La figure 19B représente un brin d'ADN peigné entre deux structures du timbre. Le timbre est ensuite emmené en contact avec le substrat déposant ainsi le brin d'ADN peigné (figure 19C).



**Figure 19 :** (A) *principe schématique du peignage capillaire. Une goutte de solution contenant la molécule à peigner est confinée entre une lame de verre et le timbre de PDMS. Le timbre de PDMS est déplacé par un moteur. Les molécules d'ADN sont ainsi piégées sur les structures topographiques du timbre par le déplacement du ménisque. (B) représente un brin d'ADN peigné entre deux structures du timbre. Le timbre est ensuite emmené en contact avec le substrat déposant ainsi le brin d'ADN peigné (19C).*

L'enjeu principal est d'atteindre, avec une efficacité et une bonne fiabilité, une seule molécule au plus fixée sur tous les sites du support fonctionnalisé. L'intérêt d'une telle approche est l'augmentation de la vitesse d'acquisition des résultats par l'analyse simultanée d'une grande population de molécules. Les expériences décrites ci-après constituent les premières étapes de ce projet et ne doivent pas être considérées comme un bilan achevé de la technologie. Elles sont présentées dans ce manuscrit comme une perspective intéressante ouverte par mes travaux de thèse.

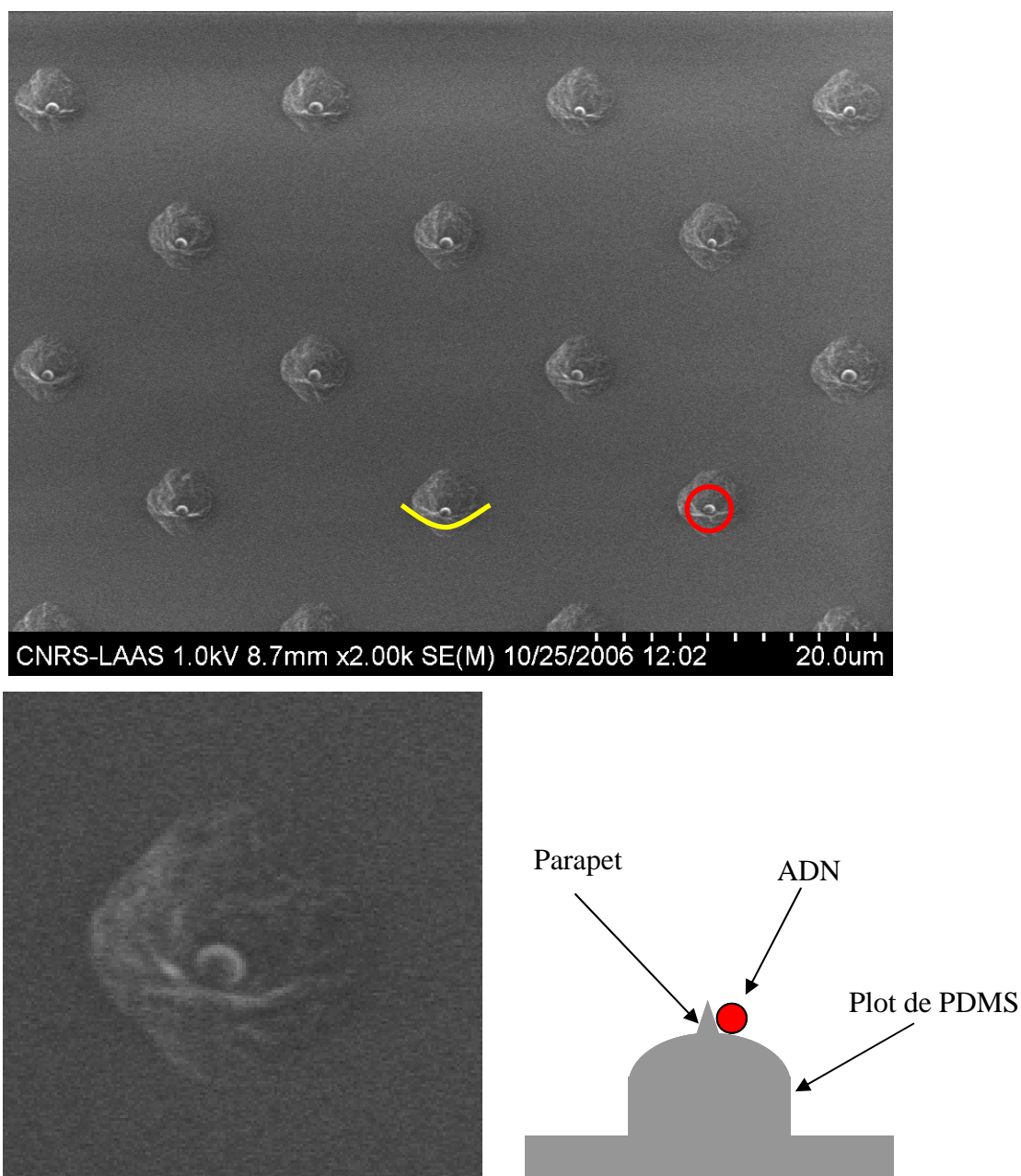


### 3-2-Peignage d'ADN

Le peignage moléculaire ne constituant pas le cœur de ma thèse nous nous sommes simplement contentés de l'introduction faite sur ce sujet dans le chapitre 1 (approche bottom-up et peignage d'ADN) et la figure 19. Nous ne nous risquons pas non plus à expliquer de manière exacte et complète les phénomènes physiques mis en jeux. Le but que nous nous sommes fixés est d'utiliser un appareil de peignage capillaire disponible au sein de notre groupe pour diriger l'assemblage de brins d'ADN étirés sur une surface structurée de PDMS, pour les transférer par la suite par  $\mu$ CP [10] sur le substrat. Les brins d'ADN étant déjà étirés et adressés sur le timbre, nous n'avons plus besoin de substrat fonctionnalisé avec des motifs précis, ni de peigner à sa surface les dits brins (figure 19C).

Pour que l'ADN Phage- $\lambda$  utilisé (20  $\mu$ m étiré et 1 $\mu$ m de diamètre en pelote) puisse se fixer sur le PDMS, le pH des solutions tampon a dû être fixé à 5,6. En effet, un double brin d'ADN s'ouvre à pH acide et se fixe sur les surfaces hydrophobes par ses extrémités. Nous avons utilisé de plus un timbre de PDMS possédant deux types de motifs : un réseau de carrés de 5 $\mu$ m au pas de 20 $\mu$ m et un réseau de pilier de 5  $\mu$ m au pas de 20 $\mu$ m avec une particularité, celle de posséder au sommet un bourrelet prenant la forme d'un parapet semi-circulaire (voir figure 25). Ce parapet a été obtenu de manière fortuite à cause d'un problème de révélation lors de l'étape de photolithographie, le motif a été ensuite transféré après gravure dans le moule de silicium. Les vitesses les plus faibles de peignage ont été testées : de 100 nm/s à 1 $\mu$ m/s sans changements significatifs. Dans toutes les images qui seront présentées le ménisque de peignage se propage du haut de l'image vers le bas.

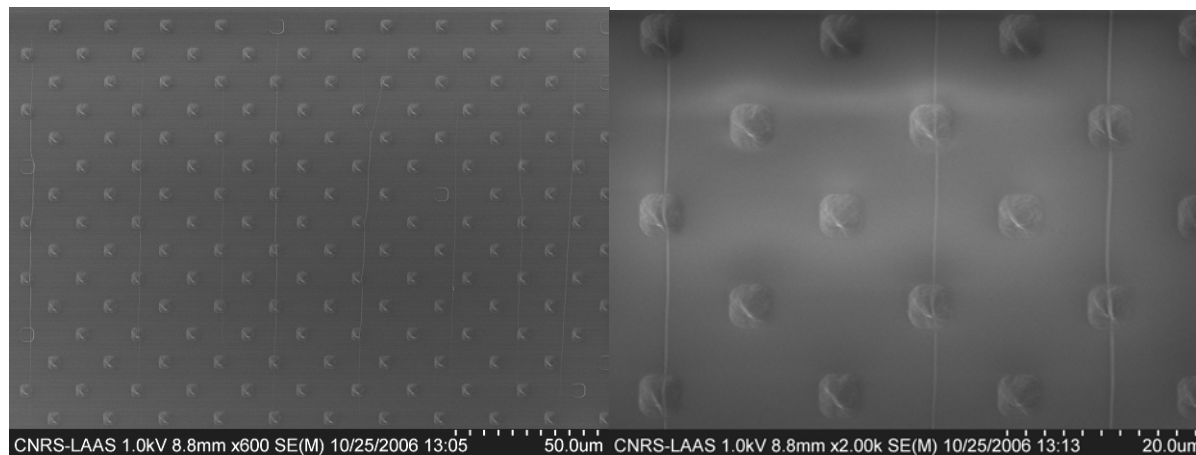
Dans un premier temps nous avons exploré l'effet de l'orientation des motifs sur le peignage de l'ADN. Nous allons nous intéresser particulièrement aux motifs possédant un parapet sur le sommet, le but étant de l'utiliser pour piéger l'ADN. La figure 20 nous montre les motifs avec l'orientation du parapet perpendiculairement au sens de propagation du ménisque de peignage.



**Figure 20 :** Images MEB d'un peignage d'ADN phage- $\lambda$  sur un timbre de PDMS. Sur l'image du haut nous pouvons remarquer des pelotes d'ADN (repéré par un cercle rouge) prises au piège par le parapet (repéré par l'arc de cercle jaune) sur chacun des motifs de PDMS et uniquement en ces endroits. L'image du bas à gauche nous montre un zoom sur un des motifs. Le schéma en bas à droite représente une coupe d'un motif du timbre piégeant une pelote d'ADN.

La figure 20 nous montre que les structures de PDMS peuvent piéger efficacement l'ADN, le taux de piégeage est de 100% sur tout le réseau. La taille de la pelote d'ADN correspond à 1 ou quelques doubles brins, le chiffre exact étant difficile à mesurer dans ce cas précis. Pour vérifier si l'orientation des motifs a bien un impact sur le peignage nous avons

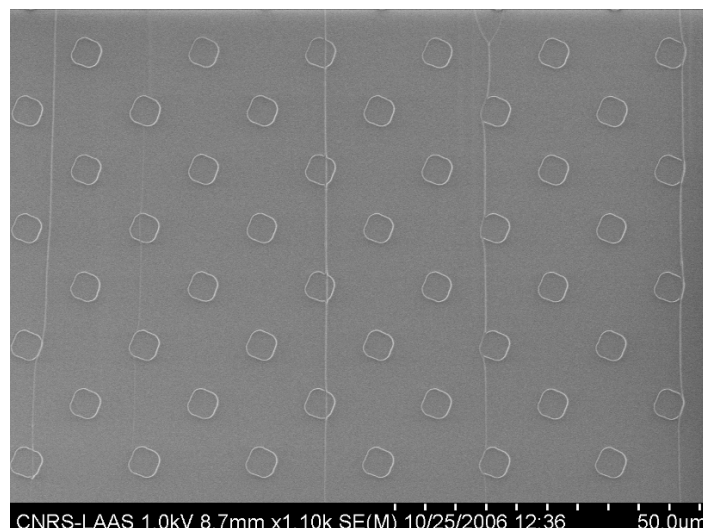
réalisé la même expérience sur un réseau de même nature mais le parapet orienté à  $45^\circ$  par rapport à la propagation du ménisque de peignage (figure 21).



**Figure 21 :** Images MEB d'un peignage d'ADN phage- $\lambda$  sur un timbre de PDMS. Le réseau de motifs avec le parapet a été orienté à  $45^\circ$ . Les brins d'ADN se fixent sur les motifs de PDMS et s'étirent dans la direction de propagation du ménisque de peignage.

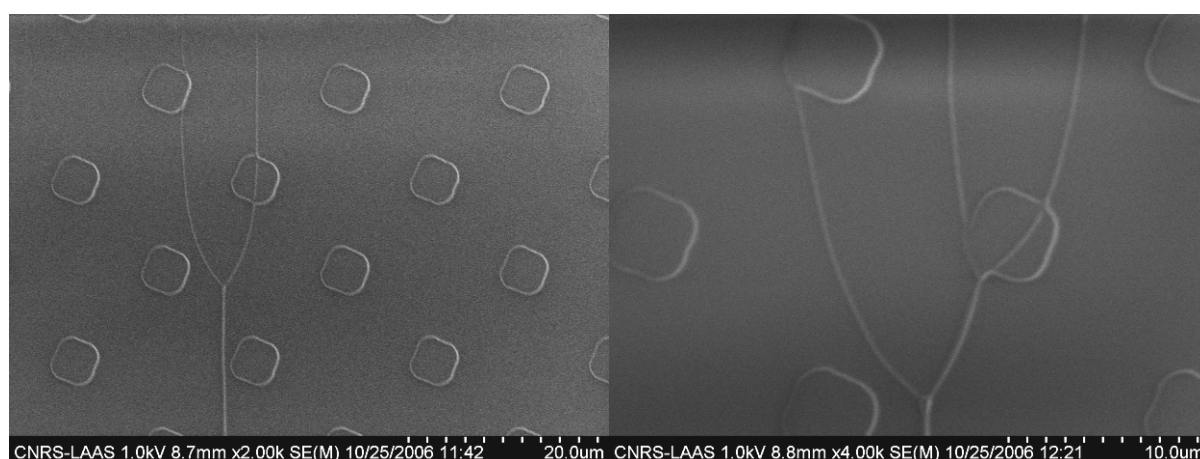
Cette fois l'ADN n'est pas piégé par le parapet, il s'étire en prenant comme point de départ le sommet d'un motif jusqu'au prochain motif. Des mesures AFM nous ont permis de vérifier que les brins d'ADN se déposent sous forme de cordes (plusieurs brins enroulés). Formant ainsi des lignes continues sur toute la longueur du peignage. De plus, nous pouvons voir sur les images de la figure 21 que toutes les cordes suivent les reliefs topographiques du timbre de PDMS, la majorité prenant appui sur le parapet (figure 21 zooms) qui est la zone retenant le plus longtemps le ménisque.

Dans un second temps nous nous sommes intéressés aux motifs carrés sans parapet. La figure 22 nous montre que dans ce cas la quasi-totalité des cordes d'ADN suivent les bords des motifs et ne passent plus que très rarement dessus contrairement aux exemples ci-dessus. Il faut noter que dans ce cas il n'y a pas d'effet de l'orientation des motifs. Ces deux exemples réalisés dans les mêmes conditions expérimentales montrent qu'il y a donc un effet de la forme des motifs sur le peignage.



**Figure 22 :** Images MEB d'un peignage d'ADN phage- $\lambda$  sur un timbre de PDMS. Le réseau de motifs carrés sans parapet a été orienté à  $45^\circ$ . Les cordes d'ADN se fixent sur les bords motifs de PDMS et s'étirent dans la direction de propagation du ménisque de peignage.

Un dernier phénomène rencontré est la formation de structures branchées favorisant l'augmentation de l'épaisseur des cordes d'ADN. En effet, les cordes proches les unes des autres sont attirées entre elles par la déformation du ménisque de peignage et forme des cordes plus épaisses. La figure 23 nous en montre deux exemples représentatifs. Nous avons remarqué que certaines orientations des motifs favorisent ce phénomène, notamment lorsque ceux-ci sont agencés en quinconces. Cette disposition des motifs permettant au ménisque de rapprocher aisément les différentes cordes.



**Figure 23 :** Images MEB d'un peignage d'ADN phage- $\lambda$  sur un timbre de PDMS. Le réseau de motifs carrés sans parapet a été orienté à  $45^\circ$ . Les cordes proches les unes des autres sont attirées entre elles par la déformation du ménisque de peignage et forme des cordes plus épaisses.

Dernièrement nous avons commencé à augmenter progressivement la vitesse de peignage. Nous avons remarqué une diminution de la taille des cordes. Nous espérons ainsi en trouvant la bonne vitesse réduire la taille de la corde à un seul double brin d'ADN.

## Conclusions du chapitre

Dans ce dernier chapitre nous nous sommes concentrés sur le dépôt par  $\mu$ CP de molécules d'ADN pouvant être utilisées pour la fabrication de biopuces et de dendrimères pouvant constituer une couche d'accrochage en surface. Nous avons démontré la possibilité de produire des couches épaisses avec une résolution nanométrique en utilisant une nouvelle classe des dendrimères hydrophobes (aldéhyde G4). Nous avons montré comment l'épaisseur de la couche de dendrimères peut être contrôlée par l'intermédiaire de la concentration de l'encre. Des motifs de 250 nm à 40 nm peuvent être transférés à partir du timbre de PDMS sur un substrat, ce qui constitue la meilleure résolution obtenue à ce jour par  $\mu$ TM. De plus la stabilité des dendrimères dans le temps en fait un candidat idéal pour la lithographie 2D ou 3D et ses nombreuses applications. Cette technologie de dépôt de dendrimères a été développée pour répondre à des besoins au sein de notre groupe de recherche au LAAS. En effet, structurer un matériau possédant un indice optique intéressant combinée à la possibilité de fixer des biomolécules à sa surface sous forme de réseaux diffractifs pourrait permettre la détection d'interactions entre une molécule cible et une molécule sonde grâce à la mesure de la variation de l'intensité diffractée par ces réseaux. Ce projet constitue le sujet de thèse de J.C. Cau et de H. Lalo qui me succèdent au sein du groupe de recherche.

Nous avons ensuite démontré que le  $\mu$ CP peut être considéré comme une nouvelle technologie de fabrication de microarrays d'ADN, offrant une grande vitesse de production et une résolution élevée. Deux avantages significatifs de cette technologie sont : (i) la simplicité du  $\mu$ CP associée au bas coût du matériel utilisé pour faire le timbre, (ii) les dépôts obtenus par  $\mu$ CP présentent une intensité de fluorescence plus élevée d'un facteur 10 après hybridation comparé aux technologies conventionnelles. De plus nous avons proposé une méthode permettant de multiplexer les dépôts jusqu'à 1536 molécules différentes avec un macrotimbre.

À l'avenir le  $\mu$ CP pourrait aider à simplifier, accélérer, améliorer la fabrication des microarrays classiques et augmenter de manière significative leur accessibilité pour des applications cliniques. Mais l'avantage le plus important du  $\mu$ CP est sans doute la possibilité de déposer des molécules d'ADN avec un grand choix de motifs différents. Dans le cadre de la thèse de J.C. Cau et H. Lalo (projet Diffrapuce) le dépôt de molécules en réseaux diffractifs par  $\mu$ CP est particulièrement étudié. Il permettrait de s'affranchir de tout marquage en fluorescence par la détection de variation de l'intensité diffracté consécutive à l'hybridation des molécules sondes par des molécules d'ADN cibles.

La dernière partie de ce chapitre a été consacrée à la fabrication de biopuces à molécules uniques, qui constituent un nouveau domaine d'application des biopuces notamment pour la recherche fondamentale. Pour répondre à ces besoins émergents, nous avons imaginé d'utiliser le peignage de l'ADN sur des timbres de PDMS, l'ADN ainsi encré pouvant être ensuite transféré par  $\mu$ CP sur un substrat. Nos études préliminaires, nous ont permis de mettre en évidence un effet de l'orientation et de la forme des motifs topographiques sur l'efficacité du peignage capillaire. Ces motifs permettent soit de déposer dans des « pièges » des pelotes d'ADN soit de peigner des cordes de ces mêmes molécules. De plus l'orientation de ces motifs peut favoriser ou non le regroupement des cordes à proximité les unes des autres. Finalement un effet d'amincissement de la taille des cordes liée à la vitesse de peignage a été observé. Ces expériences prospectives indiquent la possibilité à terme de peigner des molécules d'ADN uniques suivant des motifs prédéfinis sur le timbre.

## Références :

- [1] H. Li, D. Kang, M.G. Blamire, W.T.S. Huck, High-resolution contact printing with dendrimers *Nanoletters*, 2 (4) 347, **2002**.
- [2] D. Arrington, M. Curry, S.C. Street, Patterned Thin Films of Polyamidoamine Dendrimers Formed Using Microcontact Printing *Langmuir*, 18, pp.7788–7791, **2002**.
- [3] N. Kohli, R.M. Worden, I. Lee, Intact transfer of layered, bionanocomposite arrays by microcontact Printing *Chem. Commun.*, pp. 316–318, **2005**.
- [4] C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trevisiol, J. François, C. Vieu, Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications *J. Nanobiotech.*, 3, 7, **2005**.
- [5] Y. Xia, G.M. Whitesides, Soft lithography *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, pp. 550–575, **1998**.
- [6] X. Zhao, Y. Xia, G.M. Whitesides, *Adv. Mater.*, 8, pp. 840–873, **1996**.
- [7] UM Praekelt, PA Meacock: HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen Genet*, 223: pp.97-106, **1990**.
- [8] V Le Berre, E Trevisiol, A Dagkessamanskaia, S Sokol, AM Caminade, JP Majoral, B Meunier, J François: Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis. *Nucleic Acids Research*, 31:e1-8, **2003**.
- [9] J.C. Cau, H. Lalo, J.P. Peyrade, C. Vieu, C. Thibault, C. Séverac. Procédé de dépôt simultané d'un ensemble de motifs sur substrat par macro timbre, *Brevet* **2007**.
- [10] JP Renault, A Bernard, A Bietsch, B Michel, HR Bosshard, E Delamarche, M Kreiter, B Hecht, UP Wild: Fabricating Arrays of Single Protein Molecules on Glass Using Microcontact Printing, *J Phys Chem B*, 107:703-711, **2003**.
- [11] J. Guan, L.J. Lee, Generating highly ordered DNA nanostrand arrays, *PNAS*, vol. 102, no. 51, 18321–18325, **2005**.





## Conclusions et Perspectives

L'objectif principal de cette thèse a été de développer un outil de lithographie polyvalent et performant pour la fabrication de biopuces à ADN. Nous avons choisi le Microcontact printing ( $\mu$ CP) pour sa capacité à déposer de nombreuses encres différentes selon des motifs micrométriques et nanométriques. Afin de mieux maîtriser ce procédé technologique, nous avons essayé mieux comprendre les différentes étapes du  $\mu$ CP.

Le chapitre 2 de cette thèse s'est concentré sur l'importance du choix du matériau polymérique constituant le timbre ainsi que des motifs topographiques inscrits sur sa surface. Les contraintes de stabilité mécanique nous imposent de sélectionner une architecture de timbre qui compte-tenu des facteurs de formes choisis pour les motifs du timbre, permette d'obtenir un timbre mécaniquement le plus stable possible. Le matériau de base pour réaliser les timbres souples reste le Poly(DiMethylSiloxane) ou PDMS dont la surface de nature hydrophobe peut être modifiée afin d'accroître sa mouillabilité. Toujours lié au choix du PDMS, nous avons démontré les effets de la contamination des fragments non réticulés de PDMS lors du contact entre le timbre et le substrat. En effet, nous observons que lors du contact d'un timbre de PDMS non encré avec un substrat, quelques molécules sont transférées du timbre vers la surface de l'échantillon. Cette contamination a pour principal effet d'augmenter l'hydrophobicité de la surface ce qui oriente l'interprétation vers un effet de contamination de la surface par des fragments de PDMS hydrophobes. Nous avons pu réaliser une analyse chimique de la composition de ces fragments contaminants qui sont principalement des petites molécules de siloxane ( $(\text{Si-O-SiMe}_3)_4$ ) et dans une moindre mesure des fragments de chaînes. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié et optimisé une méthode pour nettoyer le timbre après réticulation. L'utilisation d'un système de type « Soxhlet » et de solvants polaires tels que l'éthanol s'est avérée particulièrement efficace afin d'éliminer la plupart des fragments de PDMS d'un timbre après quelques heures de nettoyage. Nous avons prouvé que dans ce cas-ci il devient possible de réaliser un processus de  $\mu$ CP libre de toute contamination.

Après avoir trouvé une solution pour éliminer la plupart des fragments de PDMS sans changer les propriétés physiques d'un timbre, nous avons été intéressés dans le chapitre 3 à évaluer l'impact de ce procédé de nettoyage sur l'hydrophilisation des timbres de PDMS par traitement de surface avec un plasma oxygène. Nous avons observé qu'après que le même traitement plasma, l'angle de contact de l'eau est plus petit pour un timbre nettoyé montrant un

meilleur effet d'hydrophilisation. Si un traitement de nettoyage est exécuté avant le processus de plasma, nous observons également que l'hydrophilisation induit par l'oxydation du plasma est de meilleure qualité en l'absence des fragments hydrophobes libres dans le timbre. Nous avons également démontré pour différentes conditions de stockage du PDMS, que la cinétique du recouvrement de l'hydrophobicité est sensiblement plus lente pour un timbre nettoyé. La persistance de l'hydrophilisation est sensiblement améliorée ainsi par le procédé de nettoyage.

Une étape dont nous avons voulu souligner l'importance dans ce même chapitre 3 est l'encrage. Nous avons discuté de l'importance du type de solvant et de son effet sur la façon dont l'encre va s'adsorber à la surface du timbre. En liaison avec le chapitre 2 nous avons également voulu observer l'importance des contaminants sur l'encrage de timbres de PDMS avec des molécules d'ADN, en étudiant l'intensité de fluorescence de molécules d'ADN marquées déposées par  $\mu$ CP sur une lame de verre. L'adsorption des molécules d'ADN sur la surface de timbre est améliorée par la présence des fragments de PDMS. Quand ces fragments sont irréversiblement enlevés par le nettoyage de Soxhlet, l'adsorption des molécules d'ADN sur le timbre de PDMS est beaucoup plus faible et l'encrage du timbre puis le dépôt par  $\mu$ CP sont de mauvaise qualité. Cet encrage déficient de la surface du timbre a comme conséquence principale une plus petite densité des molécules transférées sur l'échantillon par  $\mu$ CP. C'est à notre connaissance la première fois dans la littérature que la présence de ces molécules de contamination est associée de manière claire à la réussite d'un procédé de  $\mu$ CP. Il est désormais permis de penser qu'en employant un timbre de PDMS montrant une quantité plus élevée d'huile de silicone à sa surface, la qualité du processus de  $\mu$ CP (en termes de densité de molécules d'ADN transférées) pourrait encore être améliorée. Nous prévoyons ainsi qu'en utilisant le matériel A (Hard-PDMS) pour faire un timbre de PDMS, la fluorescence mesurée au niveau des dépôts d'ADN sera plus forte comparée aux à ceux issus de motifs imprimés à l'aide d'un timbre de Sylgard®. Il sera très intéressant de mener cette expérience dans un futur proche, comme confirmation de nos interprétations. Nous pensons également que les résultats que nous avons obtenus pour des molécules d'ADN pourraient être généralisés à d'autres types de biomolécules. Nous ne serions pas étonnés si pour des protéines, la présence des fragments de PDMS à la surface du timbre joue également un rôle prépondérant dans la réussite du  $\mu$ CP. Il serait de plus extrêmement intéressant de coupler ces résultats avec une étude d'affinité de diverses encres avec des timbres de PDMS standards et lavés à l'aide d'une autre méthode de caractérisation plus quantitative telle que la microbalance à quartz (QCM).

Dans le dernier chapitre nous nous sommes concentrés sur le dépôt par  $\mu$ CP de molécules d'ADN pouvant être utilisées pour la fabrication de biopuces et de dendrimères pouvant constituer une couche d'accrochage en surface. Nous avons démontré la possibilité de produire des couches épaisses avec une résolution nanométrique en utilisant une nouvelle classe des dendrimères hydrophobes (aldéhyde G4). Nous avons montré comment l'épaisseur de la couche de dendrimères peut être contrôlée par l'intermédiaire de la concentration de l'encre. Des motifs de 250 nm à 40 nm peuvent être transférés à partir du timbre de PDMS sur un substrat, ce qui constitue la meilleure résolution obtenue à ce jour par  $\mu$ TM. De plus la stabilité des dendrimères dans le temps en fait un candidat idéal pour la lithographie 2D ou 3D et ses nombreuses applications. Cette technologie de dépôt de dendrimères a été développée pour répondre à des besoins au sein de notre groupe de recherche au LAAS. En effet, structurer un matériau possédant un indice optique intéressant combinée à la possibilité de fixer des biomolécules à sa surface sous forme de réseaux diffractifs pourrait permettre la détection d'interactions entre une molécule cible et une molécule sonde grâce à la mesure de la variation de l'intensité diffractée par ces réseaux. Ce projet constitue le sujet de thèse de J.C. Cau et de H. Lalo qui me succèdent au sein du groupe de recherche.

Nous avons ensuite démontré que le  $\mu$ CP peut être considéré comme une nouvelle technologie de fabrication de microarrays d'ADN, offrant une grande vitesse de production et une résolution élevée. Deux avantages significatifs de cette technologie sont : (i) la simplicité du  $\mu$ CP associée au bas coût du matériel utilisé pour faire le timbre, (ii) les dépôts obtenus par  $\mu$ CP présentent une intensité de fluorescence plus élevée d'un facteur 10 après hybridation comparé aux technologies conventionnelles. De plus nous avons proposé une méthode permettant de multiplexer les dépôts jusqu'à 1536 molécules différentes avec un macrotimbre. À l'avenir le  $\mu$ CP pourrait aider à simplifier, accélérer, améliorer la fabrication des microarrays classiques et augmenter de manière significative leur accessibilité pour des applications cliniques. Mais l'avantage le plus important du  $\mu$ CP est sans doute la possibilité de déposer des molécules d'ADN avec un grand choix de motifs différents. Dans le cadre de la thèse de J.C. Cau et H. Lalo (projet Diffrapuce) le dépôt de molécules en réseaux diffractifs par  $\mu$ CP est particulièrement étudié. Il permettrait de s'affranchir de tout marquage en fluorescence par la détection de variation de l'intensité diffractée consécutive à l'hybridation des molécules sondes par des molécules d'ADN cibles.

La dernière partie de cette thèse a été consacrée à la fabrication de biopuces à molécules uniques, qui constitue un nouveau domaine d'application des biopuces notamment pour la recherche fondamentale. Pour répondre à ces besoins émergents, nous avons imaginé

d'utiliser le peignage de l'ADN sur des timbres de PDMS, l'ADN ainsi encré pouvant être ensuite transféré par  $\mu$ CP sur un substrat. Nos études préliminaires, nous ont permis de mettre en évidence un effet de l'orientation et de la forme des motifs topographiques sur l'efficacité du peignage capillaire. Ces motifs permettent soit de déposer dans des « pièges » des pelotes d'ADN soit de peigner des cordes de ces mêmes molécules. De plus l'orientation de ces motifs peut favoriser ou non le regroupement des cordes à proximité les unes des autres. Finalement un effet d'amincissement de la taille des cordes liée à la vitesse de peignage a été observé. Ces expériences prospectives indiquent la possibilité à terme de peigner des molécules d'ADN uniques suivant des motifs prédéfinis sur le timbre.

L'ensemble de nos travaux ont pour ambition de montrer les potentialités de la technique de lithographie douce pour la fabrication de biopuces. Cela concerne des Micro-arrays en continuité de la technologie existante mais aussi dans l'avenir de biopuces beaucoup plus originales telles que les puces à molécules uniques. Un autre aspect concerne également l'assemblage de Biomachines issues du vivant sur des surfaces par  $\mu$ CP. Un travail de ce type est en cours de développement au sein du groupe de recherche du LAAS (thèse de J. Chalmeau), il concerne l'assemblage d'une partie du nanomoteur flagellaire des bactéries. L'assemblage dirigé sur la surface repose sur le  $\mu$ CP et sur les briques technologiques mises au point au cours de ma thèse.

## **Annexes techniques :**

Les protocoles relatifs aux expériences décrites dans le chapitre 2 et 3, sur la surface du PDMS, les fragments non réticulés, et l'encrage sont détaillés dans la publication suivante : « Poly(dimethylsiloxane) Contamination in Microcontact Printing and Its Influence on Patterning Oligonucleotides ».

Vous pourrez de même trouver les protocoles relatifs aux expériences décrites dans la première partie du chapitre 3 sur le dépôt de dendrimère dans la publication suivante : « Microtransfer molding of hydrophobic dendrimer ». Ceux concernant la deuxième partie de ce même chapitre, le Microcontact printing d'ADN sont à chercher dans l'article suivant : « Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications ».

# Poly(dimethylsiloxane) Contamination in Microcontact Printing and Its Influence on Patterning Oligonucleotides

Christophe Thibault,<sup>\*,†</sup> Childéric Séverac,<sup>†</sup> Anne-Françoise Mingotaud,<sup>‡</sup>  
Christophe Vieu,<sup>†</sup> and Monique Mauzac<sup>‡</sup>

LAAS-CNRS, Université de Toulouse, 7 avenue du Colonel Roche, Toulouse 31077 Cedex 4, France, and  
IMRCP, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, Toulouse 31062, France

Received June 21, 2007. In Final Form: July 19, 2007

It is well-established that, during microcontact printing ( $\mu$ CP) using poly(dimethylsiloxane) (PDMS)-based stamps, some unexpected siloxane fragments can be transferred from the stamp to the surface of the sample. This so-called contamination effect coexists with the delivery of the molecules constituting the ink and by this way influences the printing process. The real impact of this contamination for the  $\mu$ CP technique is still partially unknown. In this work, we investigate the kinetics of this contamination process through the surface characterization of both the sample and the stamp after imprinting. The way both the curing conditions of the PDMS material and the contact time influence the degree of contamination of the surface is investigated on silicon and glass substrates. We propose a cleaning process of the stamp during several hours which eliminates any trace of contamination during printing. We show that hydrophobicity recovery of PDMS surfaces after hydrophilic treatment using oxygen plasma is considerably slowed down when the PDMS material is cleaned using our procedure. Finally, by comparing cleaned and uncleaned PDMS stamps, we show the influence of contamination on the quality of  $\mu$ CP using fluorescent DNA molecules as an ink. Surprisingly, we observe that the amount of DNA molecules transferred during  $\mu$ CP is higher for the uncleaned stamp, highlighting the positive impact of the presence of low molecular weight siloxane fragments on the  $\mu$ CP process. This result is attributed to the better adsorption of oligonucleotides on the stamp surface in presence of these contaminating molecules.

## 1. Introduction

Since its discovery more than a decade ago,<sup>1</sup> microcontact printing ( $\mu$ CP) has become a well-established technique, capable of patterning in a highly parallel way a large variety of molecules on arbitrary surfaces for both research purposes and technical applications. Initially, the technique was proposed as a route for creating patterns of self-assembled monolayers (SAMs)<sup>1–3</sup> and was later extended to the patterning of biomolecules<sup>4,5</sup> as well as functional molecules on surfaces using supramolecular interactions.<sup>6</sup> The transfer of these molecules along well controlled features is achieved through the use of a patterned elastomeric stamp, typically fabricated from poly(dimethylsiloxane) (PDMS)<sup>7</sup> cast onto a lithographically patterned silicon hard master. The PDMS material turned out to possess unique advantages with respect to the printing process such as its ability to exhibit conformal contact on rough surfaces and its chemical inertness. During  $\mu$ CP, the elastomeric stamp is inked with a solution

containing the molecules to be deposited and is gently brought into contact with the substrate. Ideally, the molecules of the ink are delivered to the surface only in the contact areas corresponding to the protrusions of the stamp. However, it was discovered that, in addition to the molecules constituting the ink, low molecular weight PDMS fragments are also delivered inside the microcontact printed patterns, possibly acting as contaminating species.<sup>8–10</sup> Graham et al.<sup>8</sup> have proposed a cleaning procedure of the PDMS stamp to extract as much as possible the PDMS fragments for minimizing the contamination of the surface during contact printing. Their procedure using apolar solvents takes quite a long time and is only partially efficient due to the polar nature of these fragments. This interpretation is supported by the recent work of Sharpe et al.<sup>11</sup> showing that the degree of contamination of the patterns depends on the nature of the ink. These authors observed a higher degree of contamination for polar inks, while apolar inks such as alkanethiol molecules prevented the release of the polar contaminating species. This paper is the first one really investigating the effect of stamp contamination on the results of the  $\mu$ CP process in the cases of SAMs of alkanethiols and carboxylic acid-terminated monolayers on gold surfaces. To our knowledge, no similar report is available in the case of biomolecule patterning where it is known that these large complex molecules simply adsorbed on the stamp surface during the inking step and did not penetrate into the elastomer. Basically, we do not know if the presence of PDMS fragments on the stamp are beneficial or detrimental for the quality of the printing in the

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: cthibault@laas.fr (C.T.); cseverac@laas.fr (C.S.); afmingo@chimie.ups-tlse.fr (A.-F.M.); cvieu@laas.fr (C.V.); mauzac@chimie.ups-tlse.fr (M.M.).

<sup>†</sup> LAAS-CNRS.

<sup>‡</sup> IMRCP.

(1) Kumar, A.; Whitesides, G. M. *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *63*, 2002–2004.

(2) Biebuyck, H.; Larsen, A.; Delamarche, E.; Michel, B. *IBM J. Res. Dev.* **1997**, *41*, 159–170.

(3) Gates, B.; Xu, Q.; Stewart, M.; Ryan, D.; Willson, C. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1171–1196.

(4) Bernard, A.; Fitzli, D.; Sonderegger, P.; Delamarche, E.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Biebuyck, H. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 866–869.

(5) Renault, J. P.; Bernard, A.; Bietsch, A.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Delamarche, E.; Kreiter, M.; Hecht, B.; Wild, U. P. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 703–711.

(6) Auletta, T.; Dordi, B.; Mulder, A.; Sartori, A.; Onclin, S.; Bruinink, C. M.; Péter, M.; Nijhuis, C. A.; Beijleveld, H.; Schönherr, H.; Vancso, G. J.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Ravoo, B. J.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 373–377.

(7) Younan, X.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 550–575.

(8) Graham, D. J.; Price, D. D.; Ratner, B. D. *Langmuir* **2002**, *18*, 1518–1527.

(9) Böhm, I.; Lampert, A.; Buck, M.; Eisert, F.; Grunze, M. *Appl. Surf. Sci.* **1999**, *141*, 237–243.

(10) Glasmästar, K.; Gold, J.; Andersson, A. S.; Sutherland, D. S.; Kasemo, B. *Langmuir* **2003**, *19*, 5475–5483.

(11) Sharpe, R. B. A.; Burdinski, D.; Van der Marel, C.; Jansen, J. A. J.; Huskens, J.; Zandvliet, H. J. W.; Reinhoudt, D. N.; Poelsema, B. *Langmuir* **2006**, *22*, 5945–5951.

case of biomolecular inks. To minimize the effect of the contamination, it has been suggested to use a high ink concentration<sup>8</sup> so that the ink molecules serve as a physical barrier for the transfer of residues. However, for high resolution  $\mu$ CP or even ultimate single molecule printing<sup>5</sup> where low ink concentrations are mandatory, there is a need to remove the contaminants on the stamp surface before printing. An efficient method for extracting these residues from PDMS stamps without changing the adhesive properties of the stamp and also its hydrophobicity remains to be discovered. Other authors proposed the intentional use of the PDMS contamination effect to modify the surface energy of a hydrophilic substrate.<sup>12</sup> This “inkless” printing leaves PDMS residues which locally modify the contacted surface. Biomolecules and conjugated polyelectrolyte/biomolecule complexes can then be specifically assembled onto these hydrophobic patterns.<sup>13</sup>

This paper investigates the kinetics of this contamination process through the surface energy characterization of both the sample and the stamp after contact printing. We analyze the influence of the curing conditions of the PDMS material and the contact time on the degree of contamination of the surface. For analyzing the effect of the contamination on the  $\mu$ CP process, we have researched a method capable of cleaning PDMS stamps to compare printing experiments carried out exactly in the same conditions with the same stamps (same hydrophobic character) either in the presence of contamination (uncleaned stamps) or without PDMS fragment release (cleaned stamps). This is the reason why we have investigated a cleaning process of the stamp during several hours which is widely used in polymer chemistry. This extraction process eliminates any trace of contamination during printing. The influence of this cleaning procedure on the properties of the PDMS material has been investigated. On one hand, we have been interested in evaluating the impact of this cleaning treatment on the persistence of the hydrophilic surface treatment of PDMS stamps using oxygen plasma and, on the other hand, on the quality of microcontact printed patterns of DNA molecules.

Indeed, a very common procedure for modifying the wettability of PDMS stamps consists of a brief exposure to oxygen plasma, which gives rise to an increased hydrophilicity of the surface.<sup>14</sup> This process is of crucial importance for fabricating microfluidic channels with PDMS materials as well as for treating PDMS stamps to accommodate polar solvents for  $\mu$ CP processes. The underlying mechanism changing the surface energy of PDMS surfaces is the formation of a few nanometers thick oxidized silicalike layer that is easily wettable with polar solvents. This process removes also the residual PDMS fragments present on the surface and by this way decreases the degree of contamination during  $\mu$ CP.<sup>15</sup> The hydrophilic surface treatment of PDMS is not stable over time, and, depending on the storage conditions (in air or in water), the surface progressively recovers its hydrophobic nature. The interpretation of this time evolution involves the diffusion of PDMS fragments from the bulk of the stamp through the oxidized surface layer which progressively, as diffusion takes place, increases the degree of hydrophobicity of the surface. We thus hypothesized that if a stamp is correctly cleaned before plasma oxidation, the persistence of the hydrophilic surface

treatment should be longer due to a significantly lower concentration of diffusing fragments of PDMS in the bulk of the stamp.

Printing DNA molecules by  $\mu$ CP can be interesting for microarray fabrication and more generally for biochip technology. Lange et al.<sup>16</sup> showed that the  $\mu$ CP technique can be used to deposit DNA molecules with a PDMS surface of the stamp chemically modified to enable the DNA molecules to stick to the stamp. This functionalization step strongly restricted the speed of this technology, as it takes several hours for the conversion of the CH<sub>3</sub> terminated surface of the PDMS into an aminated surface to complete inking of the stamps prior to printing. More recently, Thibault et al.<sup>17</sup> demonstrated that  $\mu$ CP can be used to fabricate DNA biochips directly without any surface modification of the stamps. These authors have shown that inking times and contact times of less than 30 s give high quality and high resolution arrays. The reason for the rapid and efficient adsorption of DNA molecules on hydrophobic untreated PDMS stamps was not explained, and this is the reason why we became curious to investigate the possible role of PDMS fragments on this behavior.

## 2. Experimental Section

**2.1. Materials.** All substrates for  $\mu$ CP were prepared from (100)-oriented polished silicon wafers and microscope glass slides. Substrates were cleaned by immersion in ethanol for 5 min inside an ultrasonic bath and then dried under nitrogen flow. In some experiments, pure oxygen plasma treatment was applied to the different substrates (1 min, 200 W, 1000 mL/min). The stamp material was obtained from Dow Corning. PDMS (Sylgard) was mixed in a 1:10 curing agent/prepolymer ratio then pumped under primary vacuum for 30 min and thermally cured. The curing temperatures varied from room temperature to 120 °C, and the curing time was changed between 2 and 48 h, depending on the experiments. The PDMS stamps were cast under flat silicon wafers or silicon masters exhibiting patterns fabricated by photolithography and reactive ion etching. These masters were systematically silanized with octadecyltrichlorosilane (OTS, 98%) from Sigma-Aldrich prior to the casting process. Flat PDMS stamps were used for all experiments except for DNA printing. To compare different PDMS materials, some experiments were done with H-PDMS stamps processed according to IBM technology.<sup>18</sup> The DNA molecules used for  $\mu$ CP were 20-mer oligonucleotides from the HSP 12 yeast gene, labeled with the Cy5 commercial fluorophore. We used a concentration of 10  $\mu$ M DNA in sodium phosphate buffer (0.3 M, pH 9), with 30 s of inking time (with 10  $\mu$ L of solution) and blow drying under a stream of nitrogen. The inked stamp was printed manually onto the substrate surface and left in place during 15 s.

**2.2. Stamp Cleaning.** The Soxhlet extractor was originally designed for the extraction of lipids from a solid material, but it can be used as long as it is difficult to extract any compound from a polymer solid. In our case, cured PDMS material is loaded into the Soxhlet extractor. The extractor is attached to a flask containing a solvent (two solvents were tested: absolute ethanol and ethyl acetate) and a condenser. The solvent is heated, causing its evaporation, and the vapors travel up to the condenser, where they are cooled and dripped down onto the PDMS stamp. The stamps were designed with the same nominal size of 1 cm  $\times$  1 cm  $\times$  2 mm, and each stamp was carefully weighed dry, full of solvent, and after extraction (dried at room temperature until no weight variation can be observed). The chamber containing the material slowly fills with warm solvent until it is almost full, and then it is emptied by siphon action back down to the flask. This cycle may be repeated many times. During each cycle, a portion of the contaminant species is dissolved and stripped

(12) Wang, X. J.; Ostblom, M.; Johansson, T.; Inganäs, O. *Thin Solid Films* **2004**, *449*, 125–132.

(13) Asberg, P.; Nilsson, K. P. R.; Inganäs, O. *Langmuir* **2006**, *22*, 2205–2211.

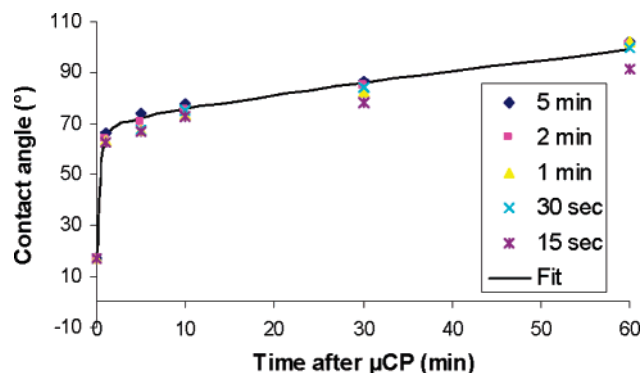
(14) Xia, Y.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 550–575.

(15) Langowski, B. A.; Uhrich, K. E. *Langmuir* **2005**, *21*, 6366–6372.

(16) Lange, S.; Benes, V.; Kern, D.; Hörber, H.; Bernard, A. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1641–1647.

(17) Thibault, C.; Leberre, V.; Casimir, S.; Trévisiol, E.; François, J. M.; Vieu, C. *J. Nanobiotechnol.* **2005**, *3*, 7.

(18) Schmid, H.; Michel, B. *Macromolecules* **2000**, *33*, 3042–3049.



**Figure 1.** Time evolution of the water–substrate contact angle (glass substrate) after printing with flat PDMS stamps. The different experimental points correspond to various contact times ranging from 15 s to 5 min. The fit uses an empirical formula combining two exponential decays with two time constants, one for the fast evolution observed in the very first minutes and the other for the slow evolution beyond 10 min (see text for details). The PDMS material was cured for 20 h at 25 °C. The time constant for the slow reorganization of PDMS residues on the surface,  $\tau_s$ , was found to be 23 min.

out. However, once the contaminant reaches the solvent heating flask, it stays there and does not participate in the extraction cycle anymore. This is the key advantage of this type of extraction; only clean warm solvent is used to extract the solid in the thimble. This system greatly increases the efficiency of the extraction when compared to a simple heating or ultrasonic agitation of the solid inside a flask containing the solvent. At the end of the extraction process, the excess solvent may be removed using a rotary evaporator and desiccator, leaving behind only the extracted material that is carefully weighed and characterized by nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR).

**2.3. Characterization.** Contact angle measurements were performed at room temperature and ambient humidity with a Digidrop system (FAST/60 from GBX), with a measurement error of  $\pm 2^\circ$ . A Bruker  $^1\text{H}$  NMR 200 MHz spectrometer was used to characterize the extracted materials from the PDMS stamps cleaned using the Soxhlet system. Fluorescent images of microcontact printed patterns of DNA molecules were captured with the laser scanner GenePix 4000 B from Axon at appropriate sensitivity levels of the photomultiplier (PMT). The scanner runs and collects data in  $5\ \mu\text{m}$  steps, and then it averages the data into  $10\ \mu\text{m}$  pixels. For correct fluorescent intensity data, only features larger than  $10\ \mu\text{m}$  were used.

### 3. Experimental Results

**3.1. Characterization of the Contamination Process.** When a PDMS stamp contacts the surface of the substrate, it releases rapidly some molecules exhibiting a hydrophobic character. This deposited material can be imaged using atomic force microscopy (AFM) (images not shown here) and appears as a rough layer of less than 2 nm thick. To see this layer, long contact times are necessary to obtain a significant topographical contrast in AFM. Even for very long contact times (24 h), it was never possible to image layers thicker than 2 nm. However, by looking at the wettability of the surface of the substrate, it is possible to obtain a macroscopic signature of this contamination process. Starting with a hydrophilic substrate of glass or oxidized silicon, we observed a significant change of the contact angle at the substrate–water interface after contact times as short as a few seconds with flat PDMS stamps. To investigate the degree of contamination and the evolution of the residues on the substrate surface after printing, we have systematically measured the time evolution of the water–substrate contact angle after printing with flat PDMS stamps for different contact time durations ranging from 15 s to 5 min. A typical curve is presented in Figure 1. One can see in

Figure 1 that the evolution of the hydrophobicity of the surface after PDMS contamination exhibits two distinct stages. A very rapid increase during the very first minutes from a value  $\alpha_i$  corresponding to the contact angle of the initial hydrophilic oxidized surface to an intermediate value close to  $70^\circ$  is followed by a much slower evolution that reaches a steady state after a few hours corresponding to a contact angle  $\alpha_f$  greater than  $90^\circ$ . This typical evolution was observed for many different samples and many different conditions of PDMS preparation as detailed below.

To describe quantitatively the kinetics of the contamination-induced hydrophobization process, we use the following empirical formula, already proposed by Marinova et al.:<sup>19</sup>

$$\alpha(t) = \alpha_f \left[ 1 - \frac{1}{2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_F}\right) - \frac{1}{2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \right]$$

In this expression,  $\alpha(t)$  is the instant value of the contact angle,  $\tau_F$  is the time constant of the fast early stage evolution, and  $\tau_S$  is the time constant of the slow terminal stage. The curves presented in Figure 1 show that the kinetics of those two stages of the hydrophobization process are only weakly affected by the contact time of the flat PDMS stamp with the glass substrate, indicating that the contamination process occurs rapidly during contact and saturates after a few seconds.

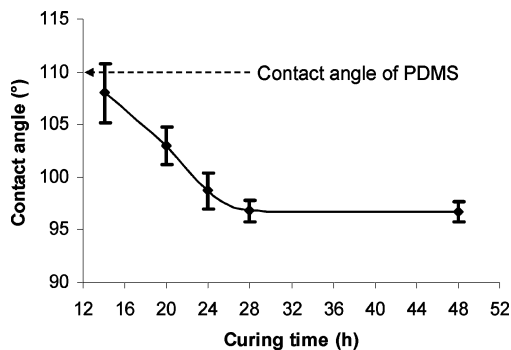
The combination of AFM imaging and contact angle measurements thus leads to the first conclusions that the contamination rate during contact is very rapid (a few seconds) and saturates (longer contact times do not induce a significant higher rate of contamination). Conversely, the postcontact evolution of the PDMS fragments on the substrate exhibits a time evolution which is much slower and can be described by two stages: a fast hydrophobization process (time constant close to 1 min) leading to a water–substrate contact angle in the order of  $70^\circ$  followed by a slow hydrophobization process (time constant close to 20 min) leading to a final steady water–substrate contact angle of  $90^\circ$  and greater. For the following study, we choose as a good measurement of the degree of contamination induced by contact with PDMS the value of  $\alpha_f$  measured after stabilization of the contamination-induced hydrophobization process: the higher the  $\alpha_f$  value, the higher the degree of contamination.

**3.2. Influence of the Curing Conditions on the Degree of Contamination.** We first investigated the impact of the curing time of the PDMS material on the degree of contamination as seen after the hydrophobization of the surface, for different curing temperatures (room temperature (RT), 40 °C, 60 °C, 80 °C, and 100 °C). In this study, we fixed the contact time to 1 min. This time is reasonable with respect to most of the  $\mu\text{CP}$  processes reported in the literature and is large enough to measure significant changes on the surface, enabling us to investigate the mechanisms of contamination (see Figure 1). Whatever the temperature, the evolution of the degree of contamination with the curing time always exhibits the same behavior. A typical curve is shown in Figure 2 in the case of curing at 60 °C.

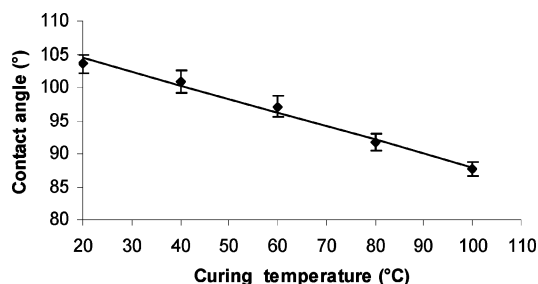
We observe that the degree of contamination decreases when the curing time is increased until it reaches a minimum value beyond which further increases of the curing time do not result in any lowering of the contamination. In the case of room-temperature curing, the minimal value of the water–substrate contact angle observed after printing is close to  $95^\circ$ . A curing time of 28 h at RT seems to be enough for minimizing as much as possible the degree of contamination of the surface. Another

(19) Marinova, K. G.; Christova, D.; Tcholakova, S.; Eftremov, E.; Denkov, N. D. *Langmuir* **2005**, *21*, 11729–11737.





**Figure 2.** Dependence of the steady water–substrate contact angle (glass substrate) after printing with a flat PDMS stamp during 1 min as a function of the curing time of the PDMS material at 60 °C. The error bars correspond to different measurements combined with angle measurement accuracy, and the line is just a guide for the eyes. The horizontal arrow indicates the contact angle of water on bulk PDMS.



**Figure 3.** Dependence of the steady water–substrate contact angle (glass substrate) after printing with a flat PDMS stamp during 1 min as a function of the curing temperature of the PDMS material. The error bars correspond to different measurements combined with angle measurement accuracy, and the line is just a guide for the eyes.

important result of this study relies on the observation that while long curing processes are favorable for minimizing the contamination, it is however impossible to avoid completely the effect because whatever the curing time a strong hydrophobization of the surface occurs after contact with the PDMS stamp. The same behavior has been observed for the five temperatures of curing investigated. In any case, as in Figure 2, a plateau is reached for long curing times, and this plateau fixes the minimal degree of contamination achievable for a given curing temperature.

In a second step, we have been curious about the impact of the curing temperature on the minimal water–substrate contact angle (measured at the plateau) to elucidate what are the best curing conditions for minimizing PDMS contamination during  $\mu$ CP. The results of this investigation are shown in Figure 3. As previously discussed, the contact time was fixed to 1 min. For each temperature, the experimental point which is reported in Figure 3 corresponds to the minimum contact angle as measured for long curing times. This means that, for each curing temperature, the curing time is not the same but corresponds to a situation where the contamination is as low as possible. The evolution seen in Figure 3 clearly demonstrates the benefit of increasing the curing temperature for minimizing the degree of contamination. As previously noticed for the impact of the curing time, it is however impossible to completely eliminate any traces of contamination, since even at 100 °C the water–substrate contact angle measured after contamination is as large as 85°.

In a third step, we have been interested in the influence of the curing conditions on the kinetics of the contamination-induced process observed after printing. As previously explained, this kinetics is dominated by a time constant  $\tau_S$  which characterizes the ability of the PDMS fragments left on the surface after printing

**Table 1. Influence of the Curing Conditions and Chemical Formulation of the PDMS Material on the Parameters Characterizing the Kinetics of the Contamination-Induced Hydrophobization Process<sup>a</sup>**

curing time (h)	PDMS (curing at 25 °C)	H-PDMS (curing at 25 °C)
2		$\tau_S = 10.83, \alpha_f = 105.1$
4		$\tau_S = 10.90, \alpha_f = 101.5$
14	$\tau_S = 21.42, \alpha_f = 110.0$	
20	$\tau_S = 23.27, \alpha_f = 103.5$	
24	$\tau_S = 23.21, \alpha_f = 97.6$	
28	$\tau_S = 22.41, \alpha_f = 96.4$	

<sup>a</sup>  $\alpha_f$  (°) represents the steady water–substrate contact angle (glass substrate) after printing with a flat PDMS stamp during 1 min, and  $\tau_S$  (min) represents the time constant for the slow reorganization of PDMS residues on the surface after printing.

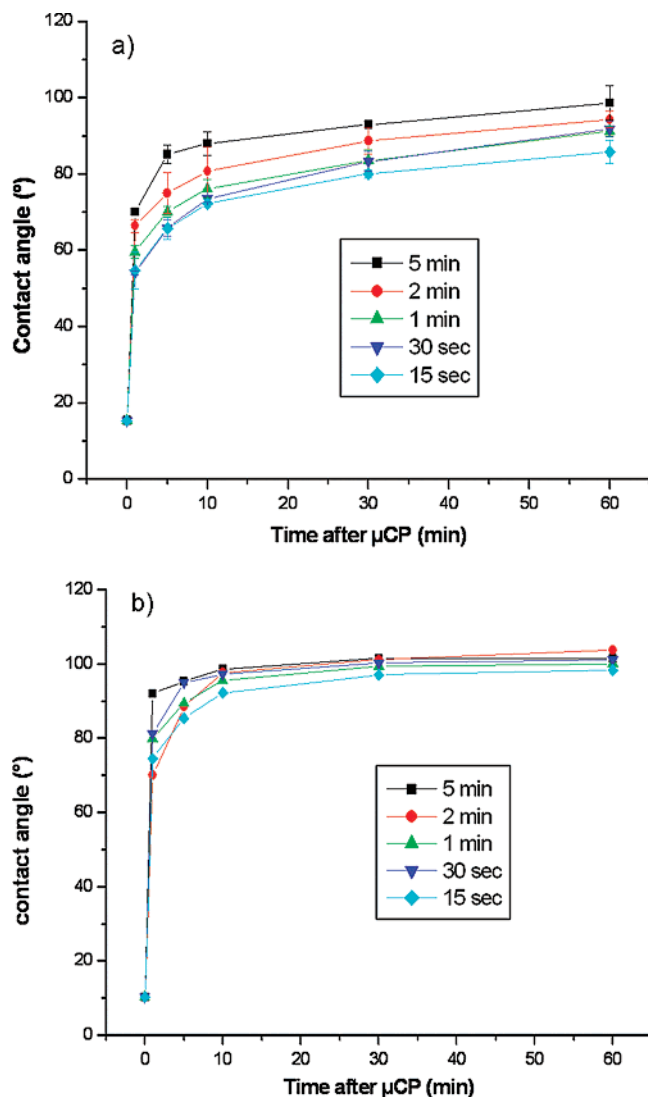
to rearrange themselves to form a hydrophobic coating on the surface. The second parameter is the final water–substrate contact angle observed once this rearrangement process is completed. This latter value  $\alpha_f$  gives an indication on the degree of contamination finally transferred to the surface by the contact. Table 1 presents the measured values of  $\tau_S$  and  $\alpha_f$  for different curing conditions. It clearly appears that the curing time has no significant influence on  $\tau_S$ , which indicates that the rate at which PDMS fragments rearrange themselves on the surface is not dependent on the curing conditions of the PDMS material. Conversely, as explained before in Figures 2 and 3,  $\alpha_f$  changes with the curing time, indicating that the degree of contamination thus depends on the curing conditions.

### 3.3. Influence of the Formulation of the PDMS Material.

For  $\mu$ CP applications, alternative materials to the conventional PDMS (Sylgard) have been proposed to improve its hardness for minimizing collapse of the structures during printing which results in pattern imperfections. A common route<sup>18</sup> which is employed to increase the compression modulus uses the concept of bimodal polymer networks<sup>20</sup> composed of end-linked mixtures of short and long polymer chains. The combination of these two molecules enables an improvement of the hardness (short chains) while preserving elongation and reducing the degree of brittleness (long chains). In this new class of material, the polymer network is denser and the possible PDMS fragments not engaged in the cross-linking reactions which could contribute to the contamination process are on average shorter than those for the Sylgard material. To elucidate how the formulation of the PDMS material impacts the contamination process, we have thus replicated our experiments with the most famous formulation of hard PDMS developed by Schmid et al.,<sup>18</sup> from IBM Zurich laboratories. This elastomeric material, known as Material A, contains a methylhydrosiloxane–dimethylsiloxane copolymer ( $\bar{M}_w = 1900$ –2000) and a methylvinylsiloxane–dimethylsiloxane copolymer ( $\bar{M}_w = 30\,000$ ), together with a modulator reducing the catalyst activity toward hydrosilylation cross-linking and a filler improving the mechanical properties. This highly sophisticated engineered material is used for enhancing the resolution of  $\mu$ CP due to the superior mechanical properties of the stamp. Figure 4 displays two comparative curves of the contamination-induced hydrophobization process for the Sylgard material and Material A (hard PDMS). As Material A cures much faster than conventional PDMS, the curing conditions could not be kept constant for this comparison. In Figure 4a, we present the time evolution of the water–substrate contact angle after printing a glass slide with

(20) Mark, J. E.; Erman, B. *Rubberlike Elasticity: A Molecular Primer*; Wiley: New York, 1988.

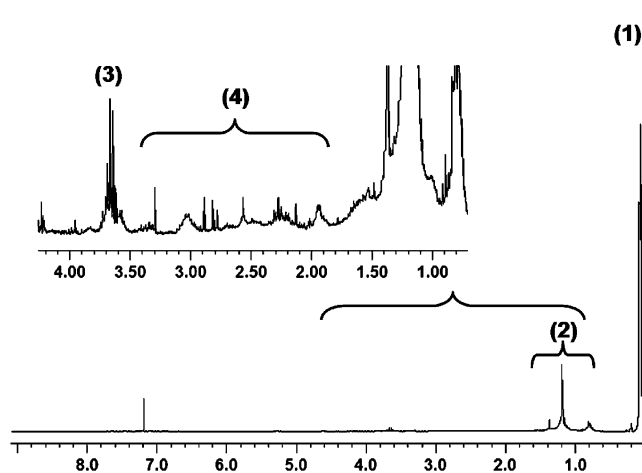
(21) Fritz, J. L.; Owen, M. J. *J. Adhes.* **1995**, *54*, 33–45.



**Figure 4.** Time evolution of the water–substrate contact angle (glass substrate) after printing with flat PDMS stamps. The different experimental points correspond to various contact times ranging from 15 s to 5 min. (a) PDMS stamp made of Sylgard cured for 24 h at 60 °C and (b) PDMS stamp made of Material A cured for 2 h at 60 °C.

a flat PDMS stamp made of Sylgard cured for 24 h at 60 °C for different printing times ranging from 15 s to 5 min. Figure 4b corresponds to a similar stamp made of Material A cured for 2 h at 60 °C. As seen through the comparison of the two materials in Figure 4, the contamination process behaves differently for the two types of PDMS materials.

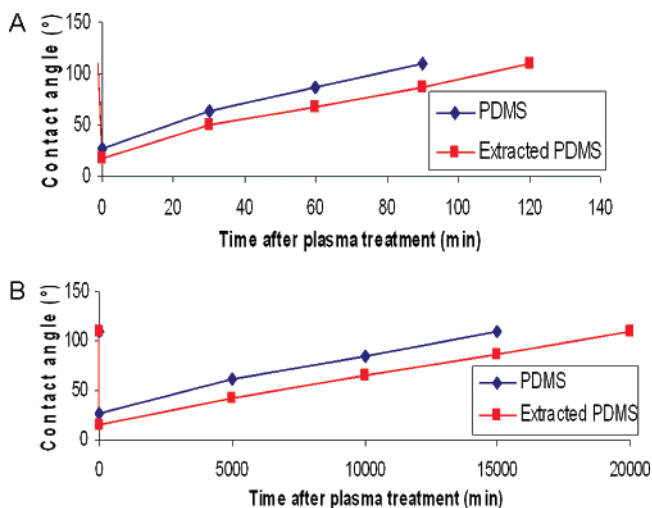
In the case of the Sylgard material, the contact time influences the degree of contamination, with the latter being higher as the contact time increases. This dependence is much less significant for Material A, for which the transfer of contaminating molecules occurs in the very first seconds of contact. Another major difference can be seen when looking at the kinetics of the hydrophobization process. The contact angle stabilizes much faster, and the final steady water–substrate contact angle is higher for Material A. All these experimental observations can be summarized as follows: Hard PDMS (Material A) contaminates more rapidly the surface during contact and transfers more hydrophobic residues compared to the Sylgard material. It is not possible to distinguish if Material A transfers a higher quantity of residues or if the transferred residues are themselves more hydrophobic. A combination of the two effects is probably



**Figure 5.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum obtained for the material extracted from a PDMS Sylgard stamp during a Soxhlet cleaning process. The horizontal axis corresponds to the relative shift of the resonant magnetic field for the hydrogen nucleus involved in chemical bonds compared to that of the free hydrogen nucleus. The predominant resonance (1) corresponds to siloxane groups (Si–Me), the peaks (2) correspond to alkane groups (–CH<sub>3</sub>–), and the regions (3) and (4) of the spectrum correspond to amine (N–H) and alcohol (R–OH) groups, respectively.

occurring. Moreover, the contaminating molecules transferred during contact rearrange themselves on the surface faster than those deposited by PDMS stamps made of the Sylgard material. We have thus evidenced that while the curing conditions of the PDMS Sylgard material do not affect the kinetics of the contamination-induced hydrophobization process, the reformulation of the PDMS material, by changing the size of the polymer chains left on the surface, does impact the kinetics of the postcontact hydrophobization process.

**3.4. Cleaning Process of the PDMS Stamps.** To extract most of the contaminant from the solid PDMS stamps, we have used a Soxhlet device which is commonly used in the literature to extract lipids or short polymer chains from any bulk material. We have tested two solvents that do not deform or damage irreversibly the PDMS stamp: ethanol and ethyl acetate. In the case of ethanol, which is the less swelling one (7%), we have been able to extract 3.4% in mass from the stamp. In the case of ethyl acetate, an important swelling of the material occurs (76%) and 4.5% in mass can be extracted from the stamp. As a characterization method of the products extracted by the cleaning procedure, we have used  $^1\text{H}$  NMR. We found no noticeable difference in the composition of the extracted molecules as a function of the solvent molecules used during the cleaning phase. As can be seen in Figure 5, the extracted material predominantly contains siloxane molecules (~90%) and alkyl chains (<10%), and traces of amines and alcohols are also found. These semiquantitative data tend to demonstrate that a large quantity of short polymer chains, having not reacted during the cross-linking reaction, can be removed from the bulk of the PDMS stamp. We thus hypothesized that this cleaning procedure should have a major effect on the contamination process. This has been verified experimentally. Indeed, after cleaning the PDMS stamps with the Soxhlet device, it was not possible to observe any contamination-induced hydrophobization process after contact of the cleaned stamp with silicon or glass surfaces. For contact times as long as 24 h, AFM imaging failed to detect any traces of contamination on the surface. In the same way, it was not possible to see any increase of the water–substrate contact angle after contacting a surface with cleaned PDMS stamps. The time evolution of the water–substrate contact angle cannot be



**Figure 6.** Time evolution of the water–PDMS contact angle after oxygen plasma treatment for two storing conditions: in air (A) and in water (B). Uncleaned PDMS stamps made of Sylgard material are compared to similar stamps cleaned using the Soxhlet device.

distinguished from the slight progressive increase related to the unavoidable contamination of the surface in the ambient atmosphere. The elimination of contamination during contact by using Soxhlet cleaning of the elastomeric stamp has been obtained for both types of PDMS materials: Sylgard and hard PDMS (Material A). The shortest cleaning time we have investigated is 6 h, and for this treatment the contamination process is already suppressed as far as using the water–substrate contact angle as a method of characterization.

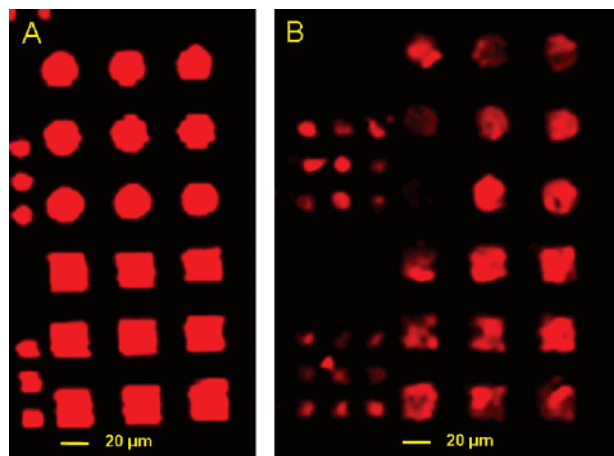
**3.5. Impact of the Cleaning Process on the Persistence of the O<sub>2</sub> Plasma Surface Treatment of PDMS Stamps.** For modifying the wettability of PDMS stamps, a brief exposure to oxygen plasma can be used. This process turns the surface of PDMS from hydrophobic to hydrophilic. The underlying mechanism is the formation of a few nanometers thick oxidized silica-like layer easily wettable with polar solvents. However, this surface treatment is not stable over time and, depending on the storage conditions (in air or in water), the surface progressively recovers its hydrophobic nature. The interpretation of this time evolution involves the diffusion of PDMS fragments from the bulk of the stamp through the oxidized surface. We thus hypothesized that if a stamp is correctly cleaned before plasma oxidation, the persistence of the hydrophilic surface treatment should be longer due to a significantly lower concentration of diffusing fragments of PDMS in the bulk of the stamp. This is the reason why we have investigated the time evolution of the PDMS–water contact angles after the plasma oxidation process as a function of the storing conditions and the cleaning of the stamp prior to surface treatment. This study is summarized in Figure 6.

We have reported the evolution of the water/PDMS contact angle over time after oxygen plasma hydrophilization of the stamp for two storing conditions (in air and in water), and we compare the uncleaned and cleaned stamps. We observe that the water contact angle just after the plasma process is smaller for a cleaned stamp compared to a pristine one. This tends to indicate that, for an uncleaned stamp, even if most of the free hydrophobic fragments are etched away during the plasma treatment, some molecules are still present at the surface. If a cleaning treatment is performed before the plasma process, then the hydrophilization induced by plasma oxidation of the surface is of higher quality due to the absence of free hydrophobic fragments in the stamp material. Figure 6 also shows that, whatever the storing conditions

of the PDMS stamp, the hydrophobicity recovery requires a longer time for a clean stamp compared to an uncleaned one. This effect is mainly due to the lower initial water–substrate contact angle observed for a cleaned stamp. It is however worth noticing that, even if the persistence of the hydrophilization is improved by the Soxhlet cleaning procedure, the slow recovery of the hydrophobicity character of the material is nevertheless observed. This result combined with the observation that after cleaning no contamination can be detected by surface contact indicates that the recovery of hydrophobicity after plasma treatment is not related to the migration of PDMS chains from the bulk but rather involves other mechanisms.

**3.6. Impact of the Cleaning Process on the Microcontact Printing of DNA Molecules.** Having found a reliable method for eliminating the presence of siloxane fragments inside and at the surface of PDMS stamps, we have been interested in looking at the impact of this silicone oil on the microcontact printing process itself. Mainly, we wanted to know if the presence of these contaminating molecules is beneficial or detrimental with respect to the quality and characteristics of a print. In the case of the  $\mu$ CP process of SAMs made of alkanethiols on gold surfaces, we have not been able to see any noticeable difference in the quality of the prints achieved using uncleaned or cleaned PDMS stamps. In a second step, we have investigated the impact of the cleaning of PDMS stamps on the  $\mu$ CP process of biomolecules and specifically DNA molecules. Indeed, in a recent publication, Thibault et al.<sup>17</sup> demonstrated that  $\mu$ CP can be used to fabricate DNA biochips. They have shown that inking times and contact times of less than 30 s give high quality and high-resolution DNA spots. The reason for the rapid and efficient adsorption of DNA molecules on hydrophobic untreated PDMS stamps was not explained, and in the present paper we want to evidence the possible role of PDMS fragments on this behavior. Moreover, Thibault et al.<sup>17</sup> showed that the fluorescence signal emitted by DNA hybridization spots created by  $\mu$ CP was systematically higher compared to that of similar spots created by conventional tip deposition. In the present paper, our aim was to reproduce these experiments and carefully look at the impact of the cleaning process of the PDMS stamp on these results. Basically, we wanted to learn if the presence of PDMS fragments during the transfer of the DNA molecules during  $\mu$ CP could be responsible for this improvement of the surface density of probe molecules on the surface. We have thus replicated the experiments of Thibault et al.<sup>17</sup> and compared the results obtained with uncleaned and Soxhlet-cleaned PDMS Sylgard stamps. Typical images of fluorescent single strand DNA spots created by  $\mu$ CP are shown in Figure 7. In these images, one can see the red fluorescence emitted by the DNA molecules used for  $\mu$ CP (20-mer labeled with the Cy5 commercial fluorophore). For printing, we used a concentration of 10  $\mu$ M DNA in sodium phosphate buffer (0.3 M, pH 9), with 30 s of inking time (with 10  $\mu$ L of solution) and manual printing with a contact time of 15 s. On the left side (Figure 7A), the print was achieved with an uncleaned PDMS stamp containing micrometric features compatible with fluorescence scanner characterization. On the right side (Figure 7B), the print was achieved in exactly the same conditions with the same type of stamp except that the stamp suffered a cleaning process before  $\mu$ CP. The same experiment was reproduced a large number of times, and it systematically indicated that the fluorescence emitted by the spots printed with an uncleaned stamp is significantly higher than the signal measured on spots printed with a PDMS stamp free of silicone fragments.

The difference in the emitted signal was quantitatively recorded, and the results are reported in Table 2 for different concentrations



**Figure 7.** Fluorescence images of DNA spots printed by  $\mu$ CP on a glass slide. The image on the left (A) corresponds to a print achieved with an uncleaned PDMS stamp containing micrometric features compatible with fluorescence scanner characterization. The image on the right (B) corresponds to a print achieved in exactly the same conditions with a Soxhlet-cleaned PDMS stamp.

**Table 2. Fluorescence Signals Measured on DNA Spots Printed at Various DNA Concentrations<sup>a</sup>**

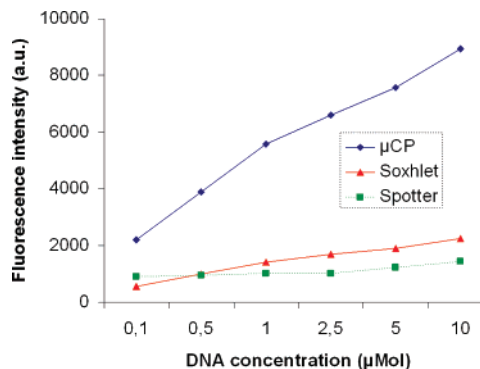
conc ( $\mu$ M)	fluorescence intensity (au)		fluorescence variation (%)	
	PDMS	extracted PDMS	PDMS	extracted PDMS
0.1	2189	555	2	51
0.5	3897	984	1.5	47
1	5575	1418	0.6	46
2.5	6607	1680	0.5	48
5	7561	1907	0.7	14
10	8939	2247	0.4	15

<sup>a</sup> Prints made with uncleaned stamps are compared to prints made with a Soxhlet-cleaned stamp. Also shown are the fluctuations of the fluorescence signal across individual spots. The reported values are a statistical average over 2000 different spots.

of DNA molecules in the inking solution. In addition to the fluorescence intensity, we have also been interested in the homogeneity of the fluorescence signal across individual spots. Examination of the table shows that, whatever the concentration in the inking solution, the fluorescence coming from the spots printed with an uncleaned stamp is approximately 4 times higher than the fluorescence coming from spots printed with a cleaned PDMS stamp. Moreover, the fluctuations of the fluorescence signal are negligible for uncleaned stamps (1–2%), whereas they can be as large as 15–51% in the case of spots printed with a cleaned stamp. The heterogeneity of the fluorescence becomes more and more pronounced for the cleaned stamp as the concentration of the inking solution decreases.

This surprising result shows that, in the case of DNA printing, the presence of PDMS fragments in the elastomeric stamp greatly improves the quality of the transfer of the molecules. In a control experiment, we have checked that this difference cannot be due to the possible autofluorescence of PDMS fragments left on the surface by the contamination process. Indeed, if the same stamp was printed without any DNA fluorescent ink, contaminating molecules can be seen by AFM on the surface but no fluorescence can be measured with the scanner. The higher fluorescent signal is therefore unambiguously attributed to the higher quantity of DNA molecules printed when using an uncleaned PDMS stamp.

In the final experiment, we have observed the same behavior after hybridization. In this experiment, the printed single strand DNA probes are not fluorescent and hybridization with a complementary fluorescent oligomer is performed. This experi-



**Figure 8.** Comparison of the fluorescence intensity measured after DNA hybridization on DNA spots patterned by using a conventional metal pin spotter (green curve), by  $\mu$ CP using a PDMS stamp not cleaned after curing (blue curve), and by  $\mu$ CP using a PDMS stamp cleaned during 12 h with the Soxhlet system (red curve) for different concentrations of probe molecules. Each experimental point corresponds to an average value over hundreds of spots. The DNA probe molecules (20-mers) were spotted over a glass slide chemically treated with a dendrimer layer (see ref 17 for details).

ment mimics a real microarray DNA bioassay. In Figure 8, we have plotted the intensity of the fluorescence signal measured with the scanner on hybridization spots of 50  $\mu$ m.

We compare the case of probe molecules printed with a metal pin arrayer conventionally used for DNA microarray fabrication (see Materials and Methods) with the case of DNA spots printed by  $\mu$ CP either with an uncleaned stamp susceptible of contaminating the surface with PDMS fragments or with a Soxhlet-cleaned PDMS stamp giving rise to DNA patterns free of silicone residues. In good agreement with the experiment reported on Figure 7, we observe that, whatever the concentration of DNA probe molecules, the fluorescence intensity measured on spots printed with an uncleaned stamp are significantly higher than the signal measured on spots printed with a clean stamp or deposited by a metal pin. This experiment reproduces the results published by Thibault et al.<sup>17</sup> fairly well, but it gives an additional indication about the mechanism underlying the increasing fluorescence emissivity of DNA hybridization spots printed by  $\mu$ CP. Indeed, when using a cleaned PDMS stamp for printing the probe molecules, the fluorescence signal is not increased. This clearly demonstrates the role of the PDMS fragments for the quality of the adsorption of DNA molecules on the stamp and/or their role for the packing of a high density of accessible probes on the surface.

#### 4. Discussion

In this paper, we have presented experimental results showing that, during contact between a freshly cured PDMS stamp and a substrate (silicon or glass), some molecules are transferred from the stamp to the surface of the sample. This so-called contamination process converts the wettability of the surface from hydrophilic to hydrophobic. Following the well documented literature on this domain,<sup>8,19</sup> we attribute this effect to the transfer of PDMS fragments not involved in the cross-linking reactions of the polymer during curing. The composition of these fragments is not exactly known due to the complexity of the prepolymer mixture used, for example, in the Sylgard material. According to the NMR analysis of the extracted material, these hydrophobic fragments can be either alkyl chains or siloxane molecules. As an example, it is known that, in the Sylgard formulation we have used, small molecules of siloxanes ( $\text{Si-O-SiMe}_3$ )<sub>4</sub> unable to react are added in significant concentrations (1–5%). These free chains are able to diffuse inside the polymeric network to the

stamp surface where they can be released on the substrate during contact printing. By investigating the wettability of the substrate after contact printing and specifically the postprinting time evolution of the water–substrate contact angle, we have been able to draw some conclusions about the characteristics of this transfer of contaminating material. The very small influence of the contact time on this process reveals that the transfer to the surface of the sample is very rapid and takes place in the very first seconds of contact. After a few tens of seconds, the concentration of PDMS fragments at the stamp–substrate interface reaches equilibrium and no more transport of material can be observed. Experimentally, we have also observed that, a few seconds after contact with a substrate, a PDMS stamp is able to contaminate a new sample with no noticeable difference. This observation means that, with a time constant of a few seconds after contact, the concentration of PDMS fragments close to the stamp surface is restored. The degree of contamination produced by a stamp depends on the bulk concentration of unlinked PDMS fragments as well as their ability to diffuse inside the network of the polymer. The rapid transfer during contact and the rapid recovery of contaminating molecules at the stamp surface after contact indicate that the diffusion of the PDMS fragments close to the surface of the stamp is not a limiting factor of this process and occurs within a few seconds. For people interested in using intentionally this contaminating process for chemical patterning of surfaces (see, for example, refs 12 and 13), our result shows that multiple consecutive printing with a single stamp can be used for a high throughput process.

Conversely, the postcontact evolution of the PDMS fragments on the substrate exhibits a time evolution which is much slower and can be described by two stages: a fast hydrophobization process (time constant close to 1 min) leading to a water–substrate contact angle in the order of  $70^\circ$  followed by a slow hydrophobization process (time constant close to 20 min) leading to a final steady water–substrate contact angle of  $90^\circ$  and greater. This contamination-induced hydrophobization process of the substrate after contact is attributed to the rearrangement of the PDMS fragments on the surface of the sample. The kinetics of this rearrangement depends obviously on the nature of the surface (in this work, we have only investigated oxidized silicon and glass characterized by a given density of silanol groups) and on the nature and size of the PDMS fragments. The results we have obtained can be discussed using the framework proposed by Marinova et al.<sup>19</sup> about the investigation of PDMS adsorption on glass and silica particles. In this work, these authors have shown that, under PDMS adsorption, the surface of the particles exhibited an hydrophobization process which is very similar to the contamination-induced hydrophobization that we are currently discussing. Marinova et al.<sup>19</sup> reported also a two stage hydrophobization process. During the first stage, they observed a rapid evolution of the contact angle due to the formation of hydrogen bonds between the PDMS chain backbone and the silanol groups of the surface. During the second stage, they reported a much slower evolution at room temperature to reach a steady final contact angle due to the grafting of PDMS molecules on the silanol groups through surface chemical reactions. This description seems to us very relevant for explaining our own results. Just after the contact transfer, the PDMS fragments are weakly attached to the surface through hydrogen bonds which are continuously broken and re-established by thermal agitation, resulting in a thin physisorbed hydrophobic layer in perpetual rearrangement. This layer then slowly evolves through the formation of chemical bonds between the PDMS molecules and silanol groups of the surface into a chemisorbed layer where the PDMS chains are

principally oriented in an “end-on” configuration, which gives rise to a smooth and progressive increase of the contact angle. At the end of the process, a thin layer is formed on the surface with a very poor motion of the PDMS chains due to their packing and organization on the surface. The final steady state is characterized by a stable contact angle which reflects the degree of contamination of the surface. The second stage of the contamination-induced hydrophobization process is characterized in our experiments by a time constant of roughly 20 min for PDMS Sylgard and 10 min for hard PDMS (Material A). This result is rather intuitive, since the PDMS chains of hard PDMS contain more reactive groups, leading to an increase of the kinetics of rearrangement on the surface after contact.

In addition, we have observed that the degree of contamination decreases when the curing time is increased until it reaches a minimum value beyond which further increases of the curing time do not result in any lowering of the contamination. This result can be interpreted by the small increase of the cross-linking ratio with the curing time, resulting in a smaller concentration of unbound PDMS chains inside the PDMS stamp. However, as it is well-known in polymer chemistry, the cross-linking can never be complete even for very long curing times due to the progressive lack of mobility of the chains. As a consequence, while long curing processes are favorable for minimizing the contamination, it is however impossible to completely avoid the effect because whatever the curing time a significant hydrophobization of the surface occurs after contact with the PDMS stamp. The same behavior has been observed for the five temperatures of curing investigated. The same argument also explains the benefit of increasing the curing temperature for minimizing the degree of contamination. As previously noticed for the impact of the curing time, it is however impossible to completely eliminate all traces of contamination, since even at  $100^\circ\text{C}$  the water–substrate contact angle measured after contamination is as large as  $85^\circ$ . As can be seen in Table 1, the curing time has no significant influence on the time constant for the rearrangements of PDMS fragments ( $\tau_s$ ). As previously pointed out, this surface process at room temperature only depends on the chemical reactivity of both the surface and the PDMS fragments. This is the reason why experimentally the major differences are observed when we change the formulation of the PDMS material (Sylgard versus Material A) rather than the curing conditions (time or temperature). The experimental observations indicate that hard PDMS (Material A) contaminates more rapidly the surface during contact and transfers more hydrophobic residues compared to the Sylgard material. Moreover, the contaminating molecules transferred during contact rearrange themselves on the surface faster than those deposited by PDMS stamps made of Sylgard material. This is in agreement with the previous discussion, as for hard PDMS the concentration of unbound PDMS small fragments is higher and the reactivity of those fragments with the surface silanol groups is higher.

Our results thus clearly indicate that it is not possible to eliminate PDMS contamination during printing by changing the curing conditions. This is the reason why we have investigated an alternative method for cleaning the stamp after curing. The use of a Soxhlet system and polar solvents such as ethanol eliminated most of the PDMS fragments on a stamp after a few hours of processing. We have shown that in this case it becomes possible to achieve a contamination-free  $\mu\text{CP}$  process. The elimination of contamination during contact by using a Soxhlet cleaning of the elastomeric stamp has been obtained for both types of PDMS materials: Sylgard and hard PDMS (Material A). Having found a solution for eliminating most of the PDMS

fragments without changing the physical properties of a stamp, we have been interested in evaluating the impact of this cleaning procedure on the hydrophilization of PDMS stamps by oxygen plasma treatment as well as on the  $\mu$ CP process itself.

We have observed that after the same plasma treatment the water contact angle is smaller for a cleaned stamp compared to that for an unclean one. If a cleaning treatment is performed before the plasma process, then the hydrophilization induced by the plasma oxidation of the surface is of higher quality due to the absence of free hydrophobic fragments in the stamp material. Another possible effect for explaining this higher hydrophilicity is the increased porosity of the PDMS material after cleaning. We have also evidenced that, whatever the storing conditions of the PDMS stamp, the kinetics of the hydrophobicity recovery is significantly slower for a clean stamp compared to that for an unclean one. The persistence of the hydrophilization is thus significantly improved by the Soxhlet cleaning procedure. However, even for PDMS stamps washed using the Soxhlet device during 14 h, slow recovery of the hydrophobicity character of the material is nevertheless observed. We thus conclude that the recovery of hydrophobicity after plasma treatment is not related only to the migration of the PDMS chains from the bulk because for cleaned stamps these chains have been massively extracted. Among the other mechanisms that could be responsible for the hydrophobicity recovery in the case of a cleaned PDMS stamp, we may consider the reorientation of surface silanol groups into the bulk polymer or their condensation at the stamp surface.<sup>22</sup> However, the possibility that some PDMS fragments are still present in the bulk of the PDMS stamp in very small quantities even after our cleaning procedure cannot be totally ruled out. In that case, after oxygen plasma treatment which generates some cracks inside the PDMS stamp across the silica-like surface layer, those fragments could diffuse toward the surface and restore progressively the hydrophobicity. We think that those remaining free PDMS chains after Soxhlet cleaning are present in a very small concentration and are not able to build a noticeable contamination layer during contact printing, which cannot be discriminated either by AFM imaging or by water–substrate contact angle measurements. It is only in the presence of cracks at the stamp surface (thus after oxygen plasma treatment) that these residual PDMS chains can play a role in the physical properties of the surface of the stamp (for example, hydrophobicity recovery).

We have not been able to observe any difference in the general quality of printed patterns of alkanethiol molecules on gold surfaces, or silane layers on oxidized silicon surfaces with respect to the cleaning of PDMS stamps. Of course, if we had chemically analyzed the printed layer, some clear differences would have been observed due to the absence of PDMS contamination when using Soxhlet-cleaned stamps. Conversely, significant differences have been observed in the case of DNA printing. By investigating the fluorescence intensity of labeled DNA molecules printed on glass slides, it was possible to demonstrate that a higher density of DNA molecules is transferred by  $\mu$ CP when an uncleaned stamp is used. This result shows that, in the specific case of DNA printing, the silicone oil present at the stamp surface is beneficial.

We have thus proposed an explanation for the recent results of Thibault et al.,<sup>17</sup> who showed that the fluorescence emission of DNA spots was significantly stronger for spots printed by  $\mu$ CP compared to that of spots deposited using the metal pins of a conventional biochip arrayer. We think that the main effect occurs during the inking of the stamp with the solution containing the DNA molecules. The adsorption of DNA molecules on the stamp surface is improved by the presence of the PDMS fragments. When those fragments are irreversibly removed by Soxhlet cleaning, the adsorption of DNA molecules on the PDMS stamp is reduced and the inking of the stamp exhibits a lower quality. This poor inking of the stamp surface results in a smaller density of transferred molecules on the sample by  $\mu$ CP. If this argument is valid, then we may think that, by using PDMS stamps exhibiting a higher quantity of silicone oil at their surface, the quality of the  $\mu$ CP process (in terms of the density of transferred DNA molecules) could be further improved. We thus predict that, by employing Material A (hard PDMS) to make the PDMS stamp, the fluorescence measured on printed DNA spots will be stronger compared to that of spots printed with a Sylgard made stamp. This experiment would be very interesting to implement as a confirmation of our interpretations. We also think that the results we have obtained for DNA molecules could be more general. We would not be surprised if for proteins also the presence of PDMS fragments on the stamp surface plays a key role in the  $\mu$ CP process.

## 5. Conclusions

In this paper, we have presented a new method for reliably cleaning PDMS stamps. Using a Soxhlet device, we have shown that most of the unbound PDMS fragments can be removed from the cross-linked polymer. This process enabled us to eliminate any trace of contamination during contact printing. This cleaning procedure turned out to be superior to any other methods previously proposed for eliminating PDMS contamination during  $\mu$ CP. Our stamps were not damaged by the cleaning procedure and were still compatible with  $\mu$ CP processes. Interestingly, we have also demonstrated that cleaned PDMS stamps conserve their hydrophilicity after oxygen plasma treatment over longer periods of time in comparison to uncleaned PDMS stamps. This effect was attributed to the quasi-complete elimination of PDMS fragments in the bulk of the material. Finally, we highlighted the positive effect of these PDMS chains for the printing of biomolecules such as DNA. We have presented convincing experiments which demonstrate that patterns of DNA printed by  $\mu$ CP exhibit a higher density of DNA molecules when an uncleaned stamp is used. We suggest that the silicone oil present at the surface of a stamp greatly improves the adsorption of the molecules during the inking process.

**Acknowledgment.** This work was supported by the EC-funded project NaPa (Contract No. NMP4-CT-2003-500120). The content of this work is the sole responsibility of the authors. Experiments on DNA  $\mu$ CP have been achieved at the Biochip platform (LBB, CNRS-INRA, Université de Toulouse, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4, France) in collaboration with V. LeBerre.

(22) Owen, M. J.; Smith, P. J. *J. Adhes. Sci. Technol.* **1994**, *8*, 1063–1075.

# Microtransfer molding of hydrophobic dendrimer

C. Thibault<sup>a,\*</sup>, C. Severac<sup>a</sup>, E. Trévisiol<sup>b</sup>, C. Vieu<sup>a</sup>

<sup>a</sup> LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, Toulouse 31077 Cedex 4, France

<sup>b</sup> Biochips Plateform Genopole Toulouse and Laboratoire de Biotechnologie & Bioprocédés, UMR-CNRS 5504 & INRA 792, 135 Avenue de Ranguel, Toulouse 31077 Cedex 4, France

Available online 28 February 2006

## Abstract

Microtransfer molding ( $\mu$ TM) was used to deposit nanostructured patterns multilayers of G4 aldehyde dendrimers on silicon wafers. We demonstrate that this soft-lithography process is capable of reaching nanometer scale resolution. In contrast with micro-contact printing techniques, we show that thick layers of dendrimer films can be processed. As far as we know, it is the first time that nanoscale features have been achieved by microtransfer molding. We show that the thickness of the dendrimer layer can be controlled via the dendrimer concentration inking the PDMS stamp. Features as small as 40 nm spaced by 360 nm can be achieved with aspect ratio as high as two.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Microtransfer molding; Dendrimer; Soft-lithography; Microcontact printing

## 1. Introduction

Periodic lines of single layer amine-terminated polyamidoamine (PAMAM) generation 4 dendrimers with widths of 140 nm and interline widths of 70 nm were produced by  $\mu$ CP in 2002 by Li et al. [1]. This nanoscale resolution was indeed possible due to the very low diffusion of the molecules on the surface. At the same time Arrington et al. [2] showed that by increasing the concentration, thick films of PAMAM (60 nm thick) could be printed. More recently, layered bionanocomposite patterns containing alternating layers of polyelectrolytes, dendrimers, and amphiphilic proteins were obtained by Kholi et al. [3] using an original approach combining spin self-assembly, layer-by-layer self-assembly to pre-establish a multilayered structure on an elastomeric stamp, and then using  $\mu$ CP to transfer the 3D structure intact to the target surface. These works demonstrate the interest in using dendrimer inks for reaching nanoscale resolution by soft-lithography as well

as the usefulness of this patterning technique for assembling biomolecules and other materials in 2D or 3D structures. Here we report the use of a new class of hydrophobic dendrimers (G4 aldehyde, CHO end group) that can be used in a microtransfer-molding ( $\mu$ TM, Fig. 1) process for achieving nanoscale features. These dendrimers are of particular interest to biochip applications as we have demonstrated in previous work [4] due to the strong interaction between the CHO end groups and  $\text{NH}_2$  groups found in proteins or attached to DNA strands.

Furthermore, they do not require any curing steps to yield thick layer patterns unlike the original  $\mu$ TM scheme introduced by Whitesides et al. [5,6].

## 2. Experimental procedure

Silicon wafers were treated with a 1% (v/v) solution of aminopropyltriethoxysilane (APTS) in 99% ethanol for 15 min at room temperature. Slides were removed and rinsed twice with 95% ethanol, then twice with water. They were dried under a stream of nitrogen and finally baked for 120 °C for 15 min. This treatment provides an adhesive layer on the surface of silicon for dendrimers.

\* Corresponding author. Tel.: +33 561 337 950; fax: +33 561 339 208.  
E-mail address: [cthibaul@laas.fr](mailto:cthibaul@laas.fr) (C. Thibault).

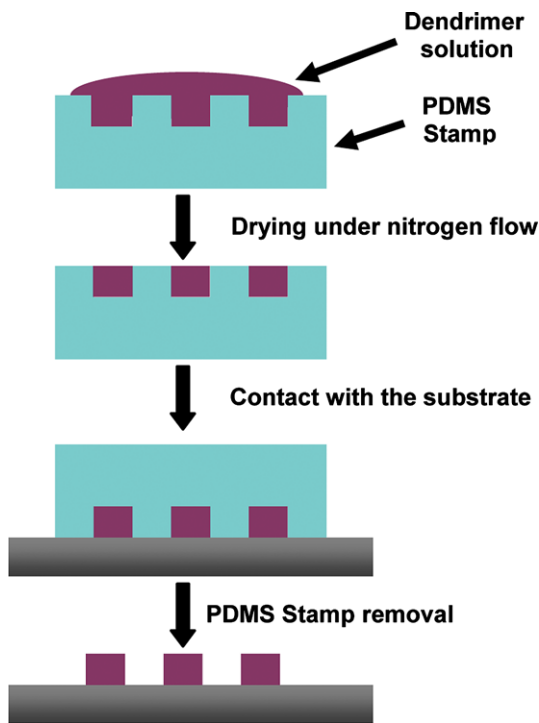


Fig. 1. Schematic procedure of microtransfer molding process.

Dendrimers with CHO end groups, generation 4 (G4), were synthesized according to a method developed and published earlier [7], and dissolved into tetrahydrofuran (THF).

The first step in the fabrication of a stamp [8] consists in generating a silicon master. This was achieved by electron beam lithography on polymethylmetacrylate (PMMA) and pattern transfer by deep reactive ion etching (RIE). The etch depth was limited to 100 nm. To enable simple demolding of this master, an anti-adhesive treatment is carried out by a well-established process using octadecyltrichlorosilane (OTS) in liquid phase. The final step consists of curing the PDMS prepolymer solution (containing a mixture (10:1 mass ratio) of PDMS oligomers and a reticular agent from Sylgard 184 Kit (Dow Corning) on the silicon master. A silicon master can be re-used more than 100 times and each stamp can be used for several prints. Several patterns were used: 40 nm lines grating separated by 360 and 100 nm high; 500 nm width lines with a pitch of 1  $\mu\text{m}$  and an aspect ratio of 1/5; finally, gratings of squares (250, 100, 80 and 50 nm width) with 1  $\mu\text{m}$  pitch.

Initially, dendrimer solution was pipetted onto the stamp (6  $\mu\text{l}$ ) making sure that the molded PDMS stamp was wetted by the liquid. After less than 30 s the stamps were dried under a dry nitrogen flow and printed manually onto silicon substrates for 30 s.

Atomic force microscopy (AFM) has been used to characterize both the stamps and the resulting prints on the silicon substrates while some silicon molds were characterized using a combined field ion beam (FIB) and electron beam microscope (EBM) to check the cross section of the lines.

### 3. Results and discussion

Fig. 2 presents the results of the two steps involved in  $\mu\text{TM}$ : the stamp (A) and the print (B). From the aspect ratio between the line width and the distance between each line, it is possible to see that the protuberant lines of the stamps form the groves in the dendrimer print. The resulting dendrimer lines are well resolved. Shallow depressions on top of the lines are due to dendrimer aggregates that have remained on the stamp. AFM cross sections of the print reveal 360 nm line widths and interlines of only 40 nm. Careful examination of line profiles by AFM revealed no noticeable difference between the size of the PDMS protrusions (40 nm at the top in Fig. 2A) and the grooves (40 nm at the bottom in Fig. 2B) in the dendrimer film. This suggests a high fidelity printing process.

$\mu\text{TM}$  presents the advantage over micro-contact printing ( $\mu\text{CP}$ ) to produce thick layers. Yet,  $\mu\text{TM}$  has so far been used with more or less viscous prepolymers that required curing and that took several hours to fill the capillaries of the stamp.

Excess polymer needed removing by scraping it away using a piece of flat PDMS. In contrast, dendrimers in THF take only 30 s to fill the capillaries of a stamp. Furthermore, the thickness of nanostructured patterns was found to be controllable. For all substrates tested, the patterned average thickness increased with dendrimer concen-

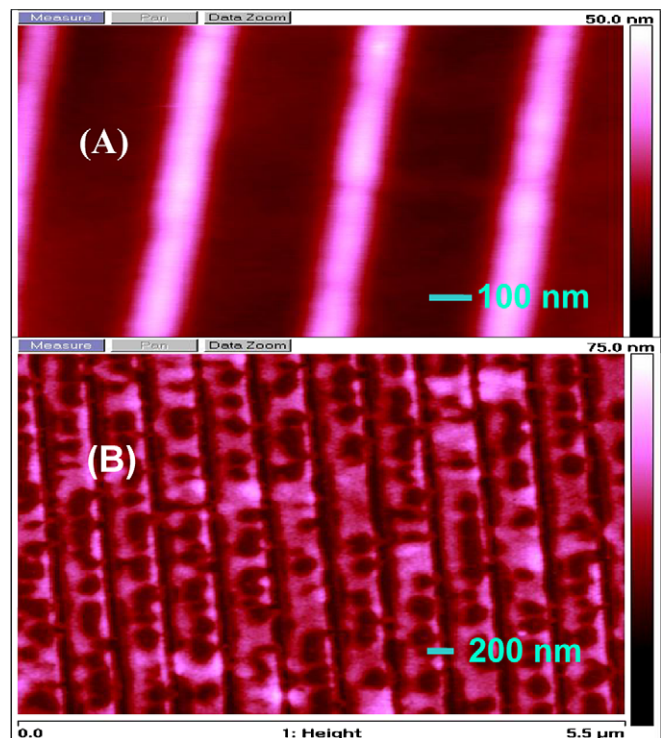


Fig. 2. (A) AFM picture of the stamp, the size of the lines are 40 nm on top of the lines. (B) AFM pictures of  $\mu\text{TM}$  dendrimer film on silicon, the lines have 40 nm widths with a pitch of 400 nm.



tration, with maximum height of dendrimer patterns equal to those on the stamp. In the case of the 500 nm lines, the maximum concentration for high quality printing is 60  $\mu\text{mol}$ . The resulting patterns have a height of 80 nm (Fig. 3A). Above this concentration the stamps would need scraping to remove excess dendrimers. The 20 nm difference between the height of the lines on the stamp and the resulting dendrimer height is probably due to a deformation of the stamp during manual printing. If a four times lower concentration is used, the height decreases to 50 nm (Fig. 3(B)).

When concentration drops below 10  $\mu\text{mol}$  there are not enough dendrimers to fill entirely the channel between two lines of the pattern. As a result, stamps with 500 nm lines only print dendrimers at the edge of the lines (Fig. 4). This was confirmed by looking at the edge of the line grating.

Fig. 5 summarizes the evolution of the thickness of the printed patterns as a function of the dendrimer concentration. Our process exhibits a quite large latitude which enables the control of the thickness in the range of 45–85 nm.

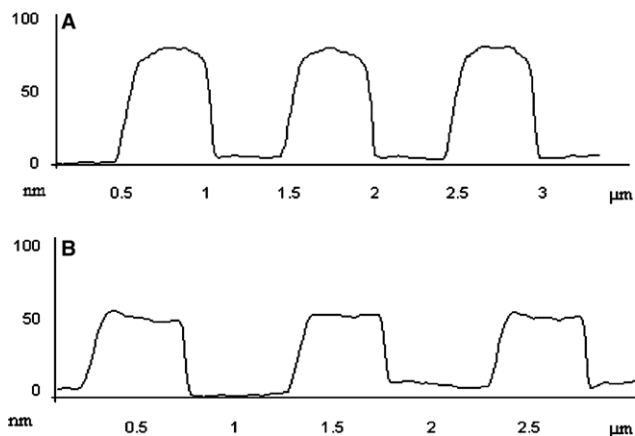


Fig. 3. AFM section of 500 nm width lines of dendrimers  $\mu\text{TM}$  on a silanised silicon wafer: (A) high concentrated solution: 60  $\mu\text{M}$  and (B) four times lower concentration: 15  $\mu\text{M}$ .

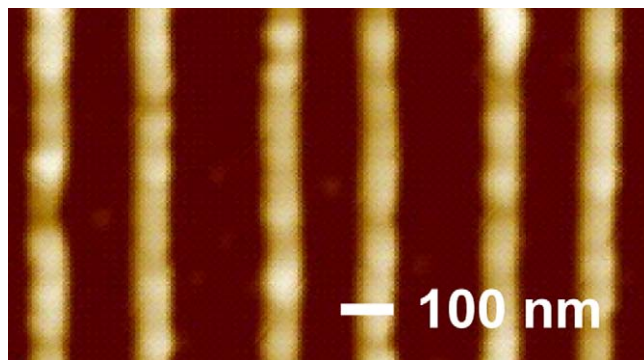


Fig. 4. Edge printing at a concentration of 6  $\mu\text{M}$ . The stamp used in this experiment is the same as for Fig. 3. Only the edges of the 500 nm lines of the stamp are transferred resulting in 100 nm wide lines and a thickness of 30 nm.

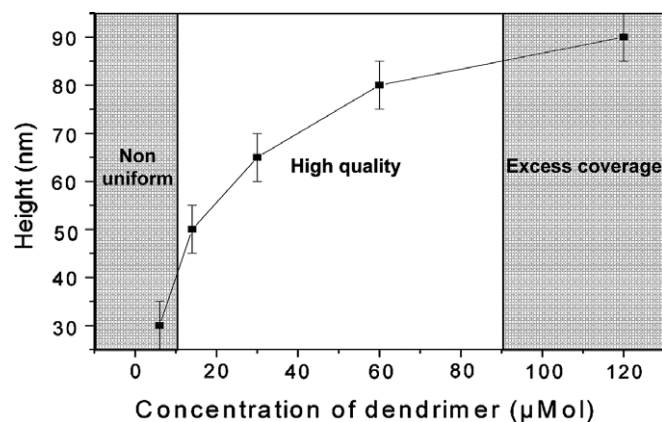


Fig. 5. Patterns height as a function of dendrimer concentration. Below 10  $\mu\text{mol}$ , patterns become nonuniform. Above 90  $\mu\text{mol}$  dendrimer are in excess.

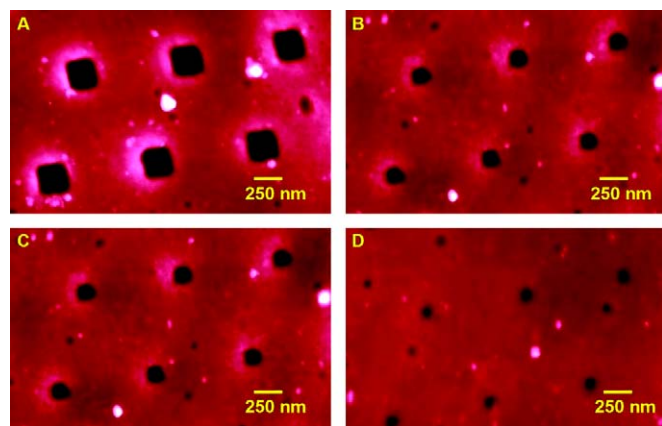


Fig. 6. AFM images of microtransfer molding of dendrimer films. All the features have a pitch of 1  $\mu\text{m}$  (A) 250 nm squares, (B) 100 nm squares, (C) 80 nm squares and (D) 50 nm squares. All the features are in negative.

To check the versatility of the technique, we have also produced periodic arrays of line and dot patterns with a large range of size from 250 to 50 nm square features (1  $\mu\text{m}$  pitch) shown in Fig. 6. Small depressions in the dendrimer layer between the periodic features are attributed to dendrimer aggregate that have remained on the stamp. These small depressions never exceed 10 nm in depth.

Interestingly, we observed that the produced patterns were stable over long periods. Observations carried out 6 months after the printing showed no noticeable difference with initial observations.

#### 4. Conclusion

We have demonstrated the use of microtransfer molding ( $\mu\text{TM}$ ) to produce thick layer with nanometric resolution using a new class of hydrophobic dendrimers (G4 aldehyde, CHO end group). We have shown that the thickness of the dendrimer layer can be controlled via the concentration of dendrimer in the solution inking the PDMS stamps.

Features from 250 nm down to 40 nm can be transferred from the PDMS stamp onto APTS treated silicon wafers. These results exhibit the very low diffusivity of the dendrimer ink placing it as an ideal candidate for 3D soft-lithography.

#### Acknowledgements

This work was supported by the EC-funded project NaPa (Contract No. NMP4-CT-2003-500120). The authors thank AM Caminade and JP Majoral from the Laboratoire de Chimie de Coordination in Toulouse for providing us with hydrophobic dendrimers. The content of this work is the sole responsibility of the authors.

#### References

- [1] Hongwei Li, Dae-Joon Kang, Mark G. Blamire, Wilhelm T.S. Huck, *NanoLett.* 2 (4) (2002) 347.
- [2] D. Arrington, M. Curry, S.C. Street, *Langmuir* 18 (2002) 7788–7791.
- [3] Neeraj. Kohli, Robert M. Worden, Ilsoon Lee, *Chem. Commun.* (2005) 316–318.
- [4] C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J. François, C. Vieu, *J. Nanobiotech.* 3 (2005) 7.
- [5] Y. Xia, G.M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 550–575.
- [6] X. Zhao, Y. Xia, G.M. Whitesides, *Adv. Mater.* 8 (1996) 840–873.
- [7] E. Trévisiol, V. Leberre, J. Leclaire, G. Pratviel, A.M. Caminade, J.P. Majoral, J. François, B. Meunier, *New J. Chem.* 27 (2003) 1713–1719.
- [8] L. Malaquin, C. Vieu, *Alternative Lithography*, in: D.J. Lockwood (Ed.), *Book Series on Nanostructure Science and Technology*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, NRC Ottawa, Canada, 2002.

Research

Open Access

## Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications

C Thibault<sup>†1</sup>, V Le Berre<sup>†2,3</sup>, S Casimirius<sup>1</sup>, E Trévisiol<sup>2,3</sup>, J François<sup>\*2,3</sup> and C Vieu<sup>\*1</sup>

Address: <sup>1</sup>LAAS-CNRS, 7, avenue du Colonel Roche 31077 TOULOUSE Cedex 4, <sup>2</sup>Biochips Platform Genopole Toulouse, UMR-CNRS 5504 & INRA 792, 135, avenue de Ranguel, 31077 TOULOUSE Cedex 4 and <sup>3</sup>Laboratoire de Biotechnologie & Bioprocédés, UMR-CNRS 5504 & INRA 792, 135, avenue de Ranguel, 31077 TOULOUSE Cedex 4

Email: C Thibault - [c-thibault@laas.fr](mailto:c-thibault@laas.fr); V Le Berre - [leberre@insa-toulouse.fr](mailto:leberre@insa-toulouse.fr); S Casimirius - [scasimir@laas.fr](mailto:scasimir@laas.fr); E Trévisiol - [trevisiol@insa-toulouse.fr](mailto:trevisiol@insa-toulouse.fr); J François\* - [fran\\_jm@insa-toulouse.fr](mailto:fran_jm@insa-toulouse.fr); C Vieu\* - [vieu@laas.fr](mailto:vieu@laas.fr)

\* Corresponding authors †Equal contributors

Published: 01 July 2005

Received: 11 April 2005

*Journal of Nanobiotechnology* 2005, **3**:7 doi:10.1186/1477-3155-3-7

Accepted: 01 July 2005

This article is available from: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/3/1/7>

© 2005 Thibault et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** A critical step in the fabrication of biochips is the controlled placement of probes molecules on solid surfaces. This is currently performed by sequential deposition of probes on a target surface with split or solid pins. In this article, we present a cost-effective procedure namely microcontact printing using stamps, for a parallel deposition of probes applicable for manufacturing biochips.

**Results:** Contrary to a previous work, we showed that the stamps tailored with an elastomeric poly(dimethylsiloxane) material did not require any surface modification to be able to adsorb oligonucleotides or PCR products. The adsorbed DNA molecules are subsequently printed efficiently on a target surface with high sub-micron resolution. Secondly, we showed that successive stamping is characterized by an exponential decay of the amount of transferred DNA molecules to the surface up the 4<sup>th</sup> print, then followed by a second regime of transfer that was dependent on the contact time and which resulted in reduced quality of the features. Thus, while consecutive stamping was possible, this procedure turned out to be less reproducible and more time consuming than simply re-inking the stamps between each print. Thirdly, we showed that the hybridization signals on arrays made by microcontact printing were 5 to 10-times higher than those made by conventional spotting methods. Finally, we demonstrated the validity of this microcontact printing method in manufacturing oligonucleotides arrays for mutations recognition in a yeast gene.

**Conclusion:** The microcontact printing can be considered as a new potential technology platform to pattern DNA microarrays that may have significant advantages over the conventional spotting technologies as it is easy to implement, it uses low cost material to make the stamp, and the arrays made by this technology are 10-times more sensitive in term of hybridization signals than those manufactured by conventional spotting technology.

## Background

DNA microarrays have rapidly evolved to become one of the essential tools to investigate expression or mutation of thousands of genes simultaneously. Two main technology platforms for manufacturing DNA chips have emerged. The first platform uses the immobilization of prefabricated DNA or oligonucleotides by spotting on functionalized glass slides using metal pins as originally developed by Brown and collaborators (see <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/index.html>), or by a non-contact method using piezoelectric liquid handling [1]. The second platform rests on the direct *in-situ* synthesis of oligonucleotides (between 20 to 70 mers in general) on glass slides or silicon surfaces, as developed by Affymetrix or Agilent [2]. A typical characteristic of these techniques is the sequential nature of the process. One molecule is deposited after another or one base is added to the previous one, with the consequence that each array is made as an original with a reduced throughput, although Affymetrix microarrays manufacturing involves combinatorial processes that allow multiple microarrays (around 96) to be synthesized in parallel in matters of hours. Nevertheless, these technology platforms need sophisticated equipment, leading to high density arrays that can be too expensive for production and utilization of simple-customized-DNA arrays.

There is a need for alternative patterning methods that must be very simple, reproducible, cost-effective, and eventually transferable to any laboratories for their own problematic. The microcontact printing ( $\mu$ CP) could fulfill this requirement as it is a printing technology that uses cheap elastomeric stamps made usually of polydimethylsiloxane (PDMS) and which exhibits relief patterns at the micron and nanoscale [3]. These stamps let to parallel deposition of molecules on a target surface, in the same manner as the printing of a page of book instead of a letter being written individually to compose the page. Previous works demonstrated that proteins can be deposited on a substrate surface by microcontact printing ( $\mu$ CP) [4,5]. More recently, Lange *et al.* [6] showed that  $\mu$ CP technique can be used to deposit DNA molecules with a PDMS surface of the stamp chemically modified to enable the DNA molecules to stick on the stamp. This functionalization step strongly restricted the speed of this technology, as it takes several hours from the conversion of the  $\text{CH}_3$  terminated surface of the PDMS into an aminated surface to complete inking of the stamps prior to printing the target surface.

In this paper, we demonstrate that  $\mu$ CP can be used to fabricate DNA biochips directly without any surface modification of the stamps. We show that inking and contact times of less than 30 seconds give high quality and high resolution arrays by  $\mu$ CP. According to our new variant of

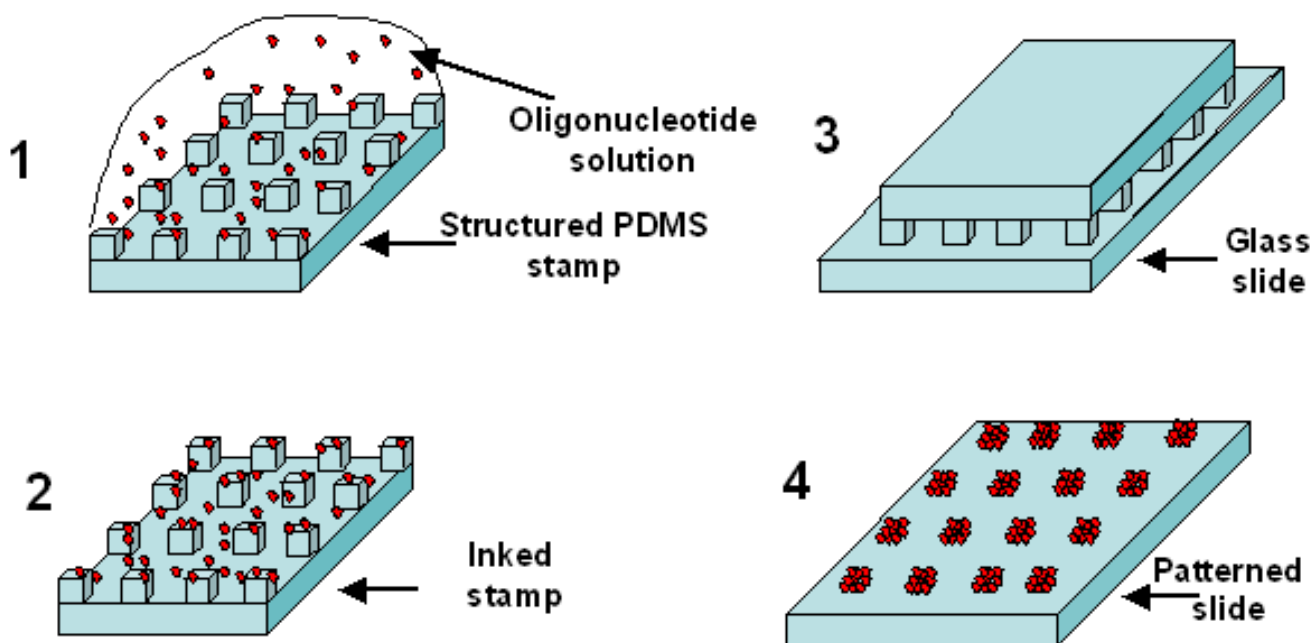
the process, the stamp is simply inked with the molecules of interest, dried under a nitrogen stream and then printed manually onto the substrate surface (see Fig. 1). It is foreseen that this technology platform will be highly competitive for high throughput analysis of gene expression and mutation detection analyses. Moreover, this technique can be easily implemented for sub-micron patterns as demonstrated previously [6] and in this work.

## Results and Discussion

The two main steps of  $\mu$ CP are the adsorption of the biomolecules on the stamp (inking process) and the transfer from the stamp to a target surface (contact printing). It is important that the retention of molecules on the stamp surface does not prevent their subsequent transfer to the slide, and that the inking and the contact time were as short as possible for optimizing the high throughput of the technique. In a recent work [6], this compromise was obtained by a specific chemical treatment of the elastomeric poly(dimethylsiloxane) material (PDMS) of the stamp after molding. In contrast to this report, we found that untreated PDMS stamp that has a strong hydrophobic surface after curing, easily adsorbs a sufficient amount of DNA molecules within few seconds while allowing their subsequent deposition by contact on microscope glass slides or silicon. The printing process works for untreated glass or silicon surfaces, but real bioassays were carried out on treated glass surfaces enabling strong binding of the probe molecules. During the contact, the purpose is to transfer efficiently and as quick as possible the molecules from the stamp surface to the slide without affecting the size of the patterns. A specific chemistry on the surface of the slide is also important for the attachment of the probes after taking away the stamp from the surface. We also verified that stamps could be reused several times after cleaning in deionized water. The experiments detailed below aim at investigating the influence of several parameters including the surface chemistry of the slide, the inking and the contact time of the stamp, and to demonstrate the potentiality of this technique for actual biochips.

### Surface chemistry and high uniformity of DNA printing on target surfaces

Experiments reported in this paper were carried out using two different type of glass slides that differed by their surface functionalization: positively charged amine glass slides (Ultra Gap, Dow corning) and dendrslides, which are glass slides that have been functionalized with nanometric spherical dendrimeric particles bearing aldehydes reactive group at the periphery for covalent attachment of the 5'- $\text{NH}_2$  probes [7,8]. These two types of functionalized slides were printed for 15 sec with a stamp that has been incubated for 30 sec with a 10  $\mu\text{M}$  solution of 35-mers 5'- $\text{NH}_2$  probe in Na-phosphate buffer at pH 9.0.

**Figure 1**

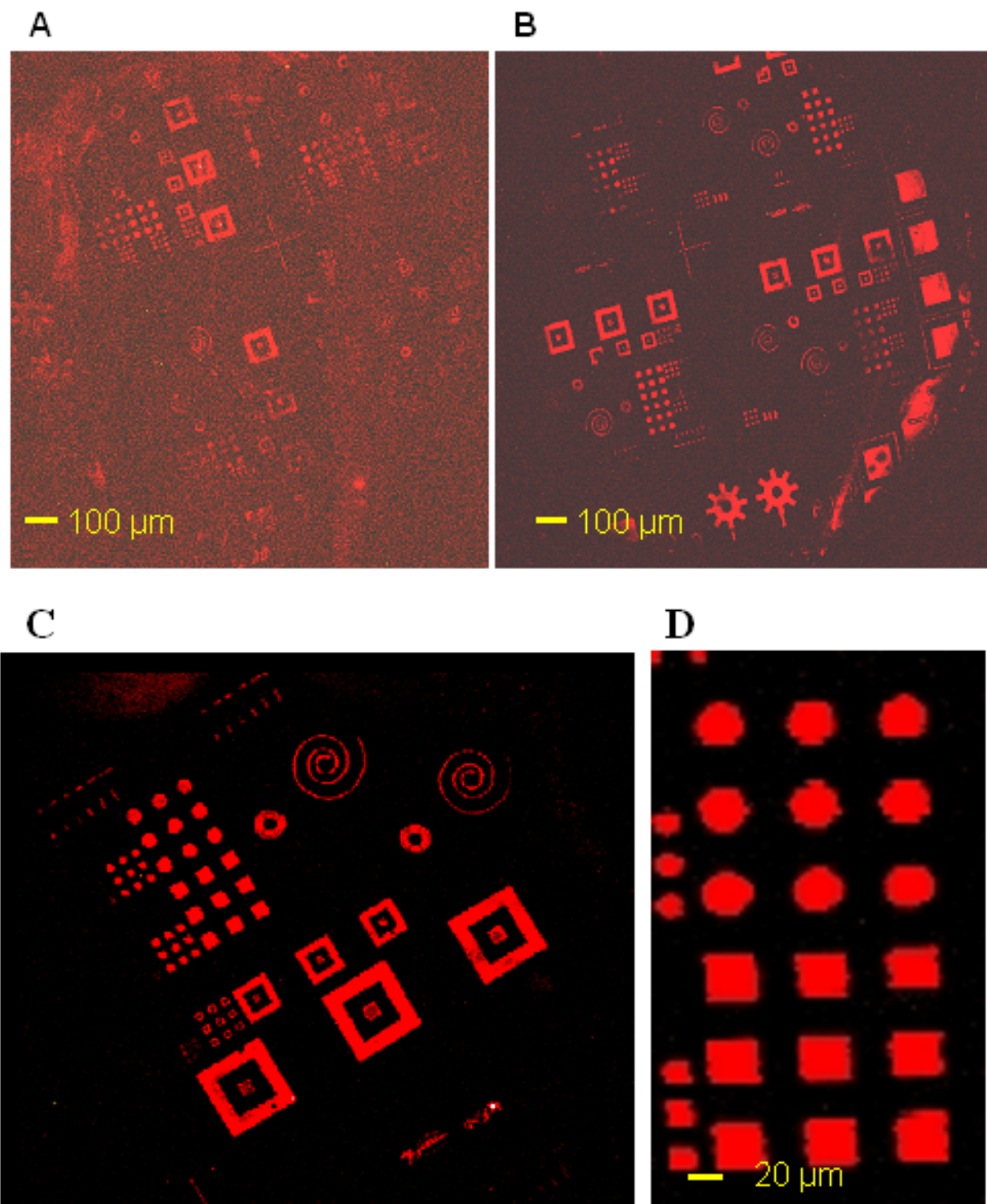
**Principle of microcontact printing of DNA molecules.** (1) Inking of the stamp with the oligonucleotide solution, a 1 cm<sup>2</sup> stamp is loaded with a 2 to 20  $\mu$ l droplet of solution for a given time (2) drying of the stamp under Nitrogen stream, (3) manual contact between the inked PDMS stamp and the glass slide, (4) probe molecules are transferred on the slide along patterns that correspond to the relief structures of the PDMS stamp.

Hybridisation was achieved using a 15-mer 5'Cy5 target complementary to the 35-mer 5'-NH<sub>2</sub> probe. As shown on Fig. 2, the micronic features of the stamp (squares, disks, gears, crosses, spirals, ...) were clearly noticeable on both types of glass slides. However, we observed systematically a greater signal to noise ratio, a better uniformity and edge definition of the spots with dendrislides (Fig. 2B) than with electrostatic slides (Figure 3A). This result is consistent with our previous report that the functionalization of surface with dendrimers reduces the non specific adsorption of fluorescent material [8]. In addition, the "donut" formation of spots frequently obtained after deposition of DNA molecules by contact spotting was no longer observed since the  $\mu$ CP is a "dry" deposition technique. This enables a better treatment of the fluorescence images for quantitative analysis. The upper part of Fig. 2C shows few lines on the array that exhibit a pitch of 4  $\mu$ m which could only be seen as very small red spots because the fluorescent scanner cannot resolve the features. A magnification on conventional features (*i.e.* squares and disks) is shown in Fig. 2D. On this image, the contour of the patterns was mainly blurred by the pixel size of the scanner. In order to allow Atomic Force Microscopy (AFM) characterization, submicronic features were printed on silicon

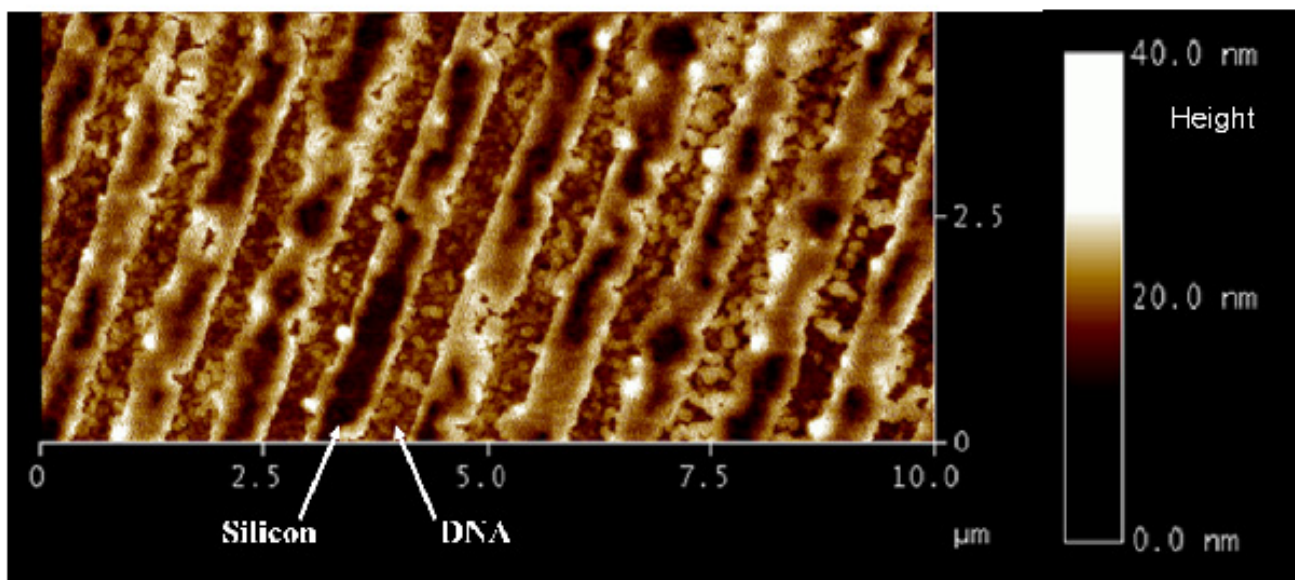
surface instead of glass slides to minimize the surface roughness. These patterns consisted in a periodic array of 500 nm wide lines at a pitch of 1  $\mu$ m. As shown in Fig. 3, the 500 nm wide lines are clearly visible and the printed oligonucleotides appear as small aggregates that could be distinguished from the smooth surface of the silicon substrate. It is worth noticing that in this case the surface of the sample could not be rinsed after printing, because the untreated silicon surface does not provide strong adhesion of DNA molecules. Edge roughness and small aggregates visible on the image can be possibly attributed to residues coming from the buffer solution.

#### **Inking time**

In our first trial, the molded PDMS stamps were incubated at room temperature in the oligonucleotides solution for different times ranging from 30 sec to 1 hr, and then printed on a dendrislide after drying. Under these conditions, a very high and saturating fluorescent intensity was obtained independently of the inking time, likely because the amount of transferred fluorescent DNA molecules to the surface was already very high at the shortest inking time tested. It was even possible to observe deleterious effects for excessive inking times due to excess fluorescent

**Figure 2**

**Comparison between two types of slides.** Fluorescence images of printed micronic patterns. Stamp was incubated with a 35-mers probe oligonucleotide for 30 sec, then put in contact for 15 sec with two types of microscope glass slides. A, electrostatic slide (ultra Gap, corning), B, dendrislide (home made slide). Slides were then incubated with a 15-mer 5'-Cy5 labeled oligonucleotide. C and D are a zoom area of B.



**Figure 3**

**Example of DNA printing at the submicronic scale.** AFM image (tapping mode) of 30-mers 5'-GCATGCTTAGTT-GCTATTATCAAATA-3', corresponding to *BCK2* yeast gene printed on an untreated silicon surface. The pitch of the periodic array of lines is 1  $\mu\text{m}$ . Note that the chemical surface states of the silicon was not really controlled: rough native oxide.

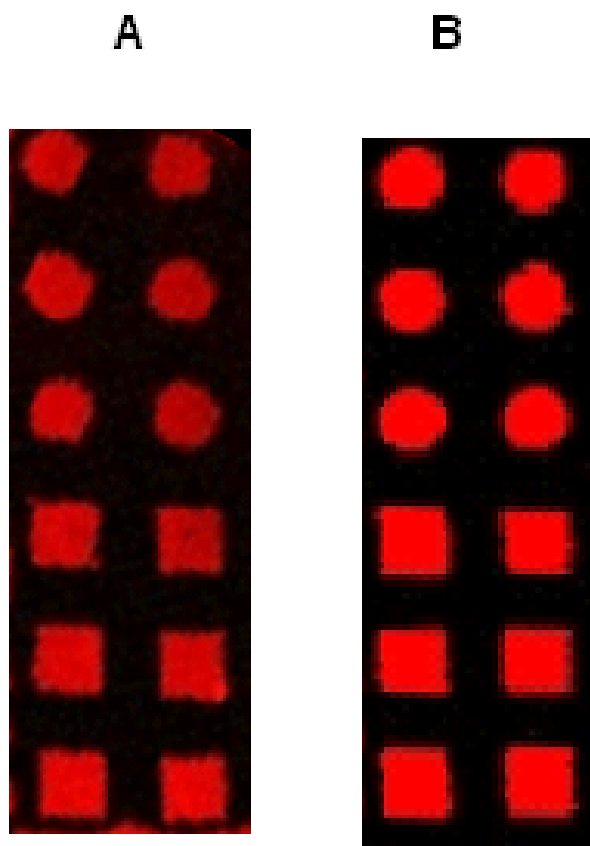
material deposited at the periphery of the stamp (data not shown). These results indicated that the PDMS surface was saturated with DNA molecules in less than 30 sec of inking. We therefore reduced the inking time to a period that is easily compatible with a handling procedure of the stamps, *i.e.* 15 sec.

To explain the excellent performance of this technique to print DNA probes, we suggest that a hydrophobic interaction takes place between the PDMS surface of the stamp and single strand DNA molecules, since the PDMS surface is highly hydrophobic, and the DNA strand can also exhibit hydrophobic properties through its bases content, even though it is an hydrophilic molecule. Moreover, hydrophobic interactions are 10 to 100 times stronger and have a longer range of action than the Van der Waals interactions [9,10]. On the other hand, a fast and efficient transfer of the DNA probes from the stamp to the slide required that the interacting forces between the oligonucleotides and the PDMS surface must be weaker than those occurring between the oligonucleotides and the surface of the slide. This was verified in our experiments for both positively charged and hydrophobic dendrimeric activated surface slides. As a consequence, preserving the hydrophobicity of the PDMS stamp is clearly a key point in order to reduce the inking times for DNA printing and to favor the subsequent transfer of the molecules to either

a positive charged or a hydrophobic surface. This is the main difference between our work and that of Lange *et al* [6]. In this latter work, the adsorption of DNA probes on the stamp was mainly based on electrostatic interactions with the consequence of long inking period (45 min.). In addition, as the surface treatment of PDMS is known to be unstable on air, our process, which does not involve any surface modification after molding, should be more reproducible and should allow the reusability of the stamp (see below). It is worth to note that similar results were obtained using long single DNA molecules or double stranded PCR fragments. However, as can be seen in Fig. 4, the signal intensity was significantly lower with stamped PCR products than with oligonucleotides. This observation was actually not specific to this technique since the same results were observed using conventional fabrication of arrays by mechanical spotting (V. Le Berre, unpublished data).

#### **Contact time and successive prints**

To identify the transfer mechanisms of the molecules from the stamp surface to the slide, we investigated the influence of the contact time and the evolution of fluorescent signals after successive prints with the same stamp loaded with a fluorescent 35-mer 5'-labelled Cy5-oligonucleotide-3' $\text{NH}_2$  (5'Cy5-TTAGCGCATTTTGGCATATTTGGGCGACAACCT-NH<sub>2</sub>-3'). On the same slide,



**Figure 4**  
**Comparison between oligonucleotides and PCR fragments.** Fluorescent images of typical micrometric printed features. Stamp was incubated for 30 sec with a 500 bp PCR fragment (dsDNA) of the yeast *HSP12* gene (A) or with a 20-mer oligonucleotide of the same yeast gene (B), then set in contact manually for 15 sec with a dendrislide. Hybridisation was carried out with *HSP12* complementary Cy5-labelled oligonucleotide. Values of fluorescence intensity were measured at 635 nm with the GenePix 4000B from axon at 600 PMT. Mean intensity at 635 of 12 features on two experiments – Background was 2120 for A and 4119 for B.

consecutive stamping steps were performed with a contact time of 15 sec, 1 min or 2 min, which took in total 2 to 20 min to pattern a dendrislide with 10 successive prints. To evaluate the change in fluorescence intensity along the successive print, the total intensity subtracted from the local background of specific features on the patterned slide were integrated and compared to the total intensity from the first print which was set arbitrarily at 100%. As shown on Fig. 5, this change followed an exponential decay up to the 4<sup>th</sup> stamping, and surprisingly, this decay

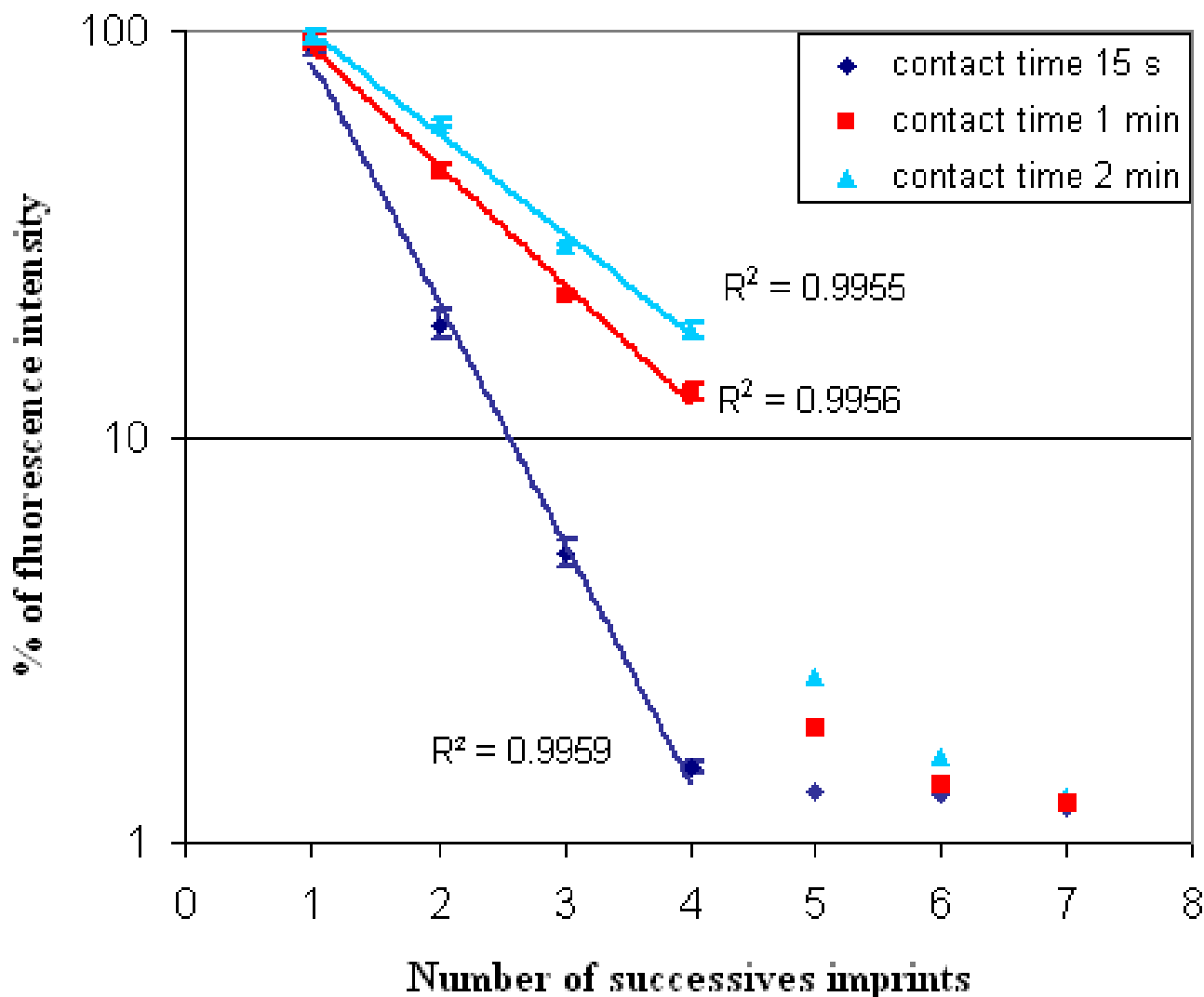
was dependent of the contact time. The following equation

$$-dN/dn = kN$$

where  $N$  is the number of molecules deposited on the slide at print number  $n$ , could be used to determine the characteristic of  $k$ , a kind of sticking coefficient of the molecules on the surface. The extracted values for  $k$  turned out to be dependent upon the contact time, with  $k$  increasing as the contact time decreased ( $k = 1.36$  for  $t = 15$  s,  $k = 0.67$  for  $t = 1$  min,  $k = 0.57$  for  $t = 2$  min). This result indicated that longer the contact time, slower was the depletion of the stamp in biomolecules. This behavior is suggestive of a slow diffusion of the molecules retained inside the cavity of the PDMS stamp to its relief structures that are in contact with the slides, as depicted in Fig. 6. It is therefore expected to observe a slower decrease of the fluorescence intensity for increasing contact times because there is more time for the biomolecules to migrate to the surface. In addition, we calculated that the  $k$  coefficient roughly changes with the inverse of the square root of the contact time, which is consistent with a diffusion limited deposition mechanism. Accordingly, the exponential decay of the fluorescence signal was no longer valid after 4 successive printing steps (Fig. 6). For  $n > 4$ , the number of molecules initially adsorbed on the relief structures of the PDMS stamp has been largely depleted in previous prints. However, a low fluorescence intensity that decrease very slowly from the 5<sup>th</sup> to the 7<sup>th</sup> print was still measured. This suggested a slow diffusion of molecules from the edges of the pattern to the slides during the contact. In that case, the number of printed molecules should be higher at the periphery of the features than in the center. The fluorescence images of the 5<sup>th</sup> to the 7<sup>th</sup> print for a contact time of 2 min nicely confirmed this assumption (Fig. 7). Essentially the rims of the specific features were recognizable likely because the remaining molecules had enough time to migrate from the edges of the relief printing of the stamp to the glass surface during the contact time. Thus, at shorter contact times, the fluorescence images were even worse (not shown), and hence the intensity values were lower (see Fig. 5).

As a conclusion of this section, we clearly identified some problems related to diffusion of biomolecules during stamping that may hamper the production of high quality arrays by successive stamping without re-inking. On the other hand, taking into account that the loading of the stamp is very fast and that high quality deposition by  $\mu$ CP of DNA molecules takes less than 15 sec to give optimal fluorescence signals, it appears more favorable to re-ink the stamp during 15 – 30 sec after each print, which is eventually faster than consecutive print.





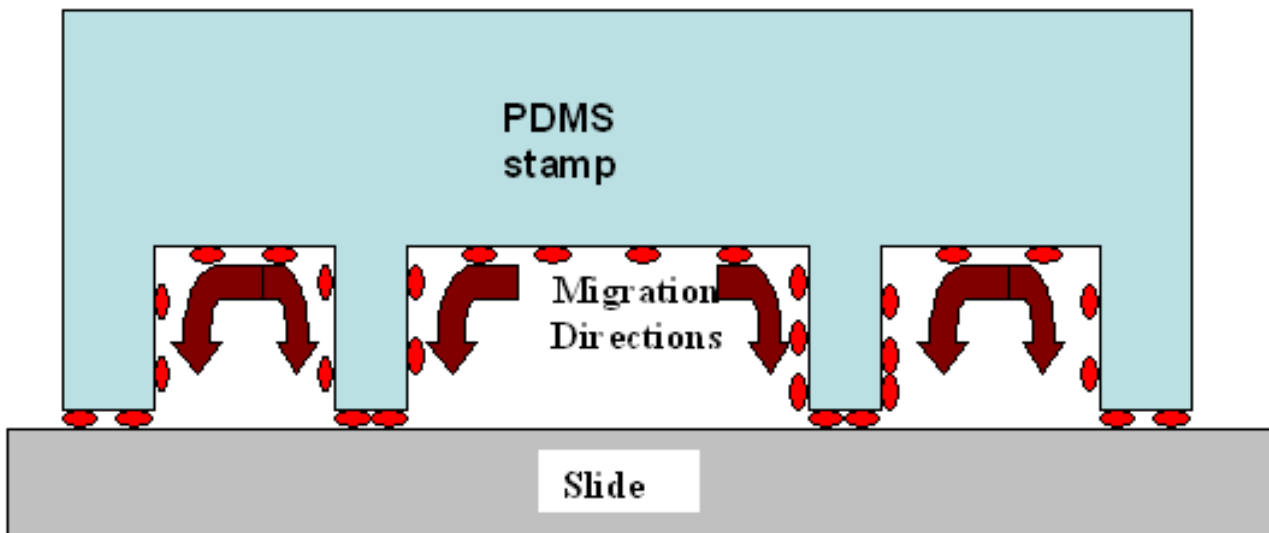
**Figure 5**

**Fluorescence signal variation for successive prints.** Variation of the fluorescence intensity for successive prints and for three different contact times (15 seconds, 1 minute and 2 minutes) between the stamp and the slide. Stamp was incubated with a 35-mer 5'-labelled Cy5 oligonucleotide for 30 sec than put in contact with the dendrislides. The value of fluorescence intensity (fluorescent – background) was measured at 635 nm with Genepix scanner under 600 PMT optical excitation. Each point represents an average of 4 independent experiments. Fittings of the data points with an exponential linear regression (solid lines), exhibits good agreement as attested by the reported correlation factors R.

#### **Comparison between $\mu$ CP deposition and contact deposition using metal pins**

In order to compare  $\mu$ CP with a conventional spotting method, we performed a dedicated experiment in which the fluorescence intensity of DNA array was determined as a function of the concentration of the DNA probe used to manufacture the slides by the two techniques. To allow a direct comparison between the two methods, spots of 60

$\mu$ m diameter size made with different concentration of 20-mer oligonucleotides from HSP12 were spotted with a commercial spotter (VersArray ChipWriter Pro, Biorad company) on a dendrislide, and disks of the same dimension were printed by  $\mu$ CP under the same condition. The arrays were then hybridized with the complementary labeled molecules. Fig. 8 shows the evolution of the fluorescence intensity in arbitrary units as a function of the



**Figure 6**

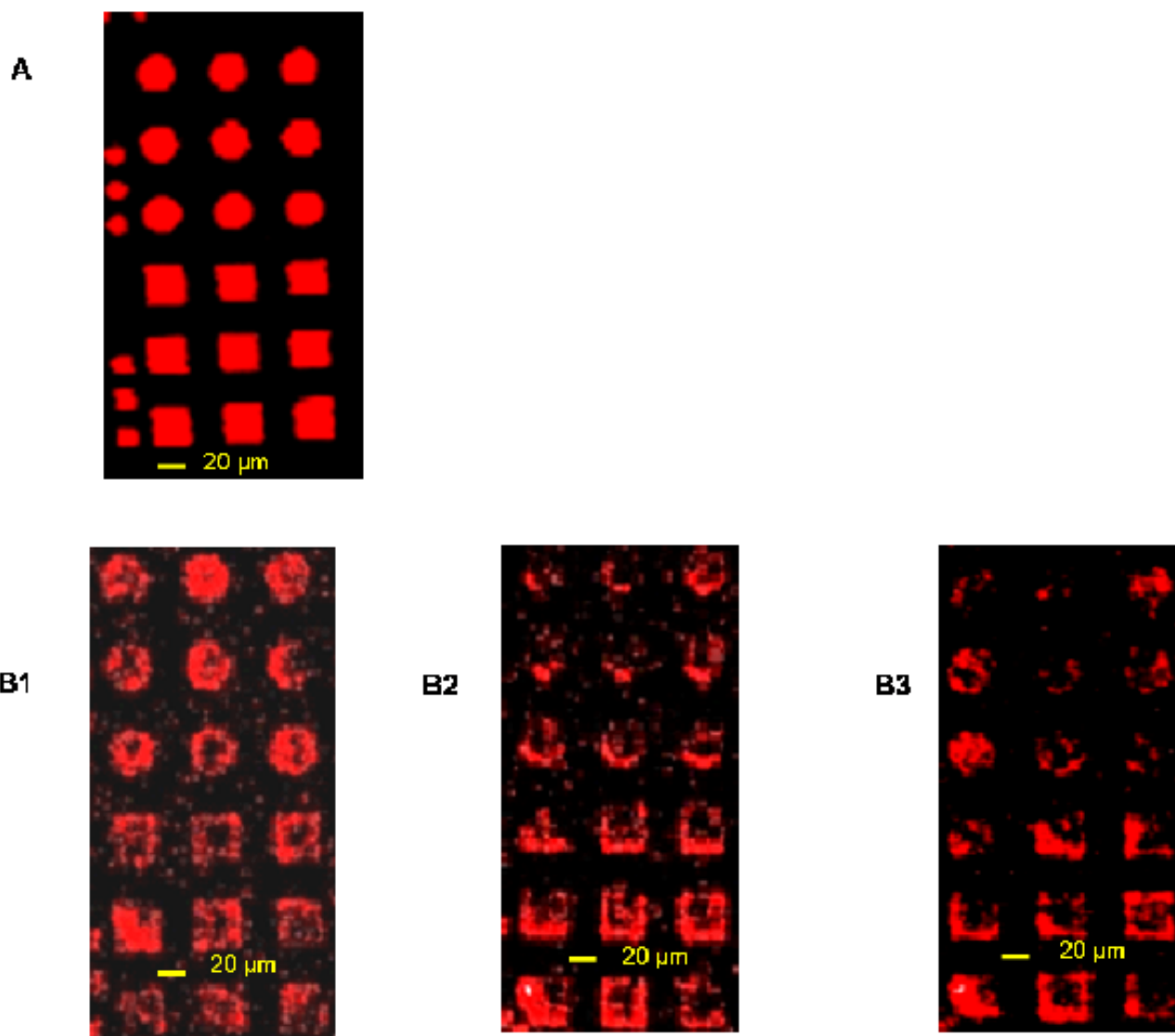
**Proposed mechanism for the diffusion of oligonucleotides during stamping.** This picture shows schematically the possible migration direction of the oligonucleotides on the stamp surface during contact. This flow could explain the preferential deposition of molecules at the rim of the patterns.

initial concentration of the probe. From a range of 0.1 to 10  $\mu\text{M}$ , the fluorescence signal was 5 to 10-fold higher when the deposition was performed by  $\mu\text{CP}$  than by a conventional spotter. This significant difference could be explained by the fact that deposition with a dry stamp in which the DNA molecules are delivered at the interface between the elastomeric material and the slide surface could offer uniform layers of densely packed molecules. Conversely, the deposition of a liquid droplet on the slide surface, which is let to evaporate, may give irregular layers of dispersed molecules. Alternatively or complementarily to this explanation, it is possible to consider that the probes printed on the surface by  $\mu\text{CP}$  are better organized than by spotting, enabling a greater amount of targets accessible to the probes. In any case, for a given signal/noise ratio, the amount of probe molecules is significantly lower to get the same hybridization signals using  $\mu\text{CP}$  as compared to the spotting technology. This could be in the future a reasonable advantage of this technique taking into account the prohibitive price of DNA probe molecules. Moreover, this printing procedure is versatile and gives also excellent results with longer DNA molecules or double stranded PCR fragments.

#### **Mutation detection**

Having demonstrated that oligonucleotides can be successfully printed in multiple copies, yielding uniform patterns, we investigated the possibility to manufacture an

array bearing short oligonucleotides of a given gene by  $\mu\text{CP}$  for detecting a single mutation as it can be made with the DNA microarray technology [11,12]. We printed 5 different 20-mer oligonucleotides from *HSP12*, encoding a protein chaperone in yeast [13]. These probes differed from each other by a single or a double base mutation at positions proximal to the 5' or 3' end or in the middle of the sequence. These oligonucleotides were then hybridized with Cy5-labelled cDNA prepared from total yeast RNA (see method section for additional details) in the automatic hybridization room. We compared the hybridization intensity of the target molecules on the printed patterns with that from the perfectly matching target sequence to the 20-mer oligonucleotide probe. We observed that whatever the position and nature of the mutation, the hybridization signal was considerably reduced for mutated sequences. As expected, the position of the mutation along the sequence of the probe molecule strongly influenced the hybridization ratio (Fig 9). This experiment was repeated 4 times independently and yielded highly reproducible data with a statistical deviation of <1%. Altogether, these results were very similar to those obtained using microarrays fabricated with dendrislides by a conventional spotting method [7]. This indicates that the quality of the arrays printed by  $\mu\text{CP}$  with respect to hybridization assay is largely equivalent to arrays produced by conventional deposition techniques.

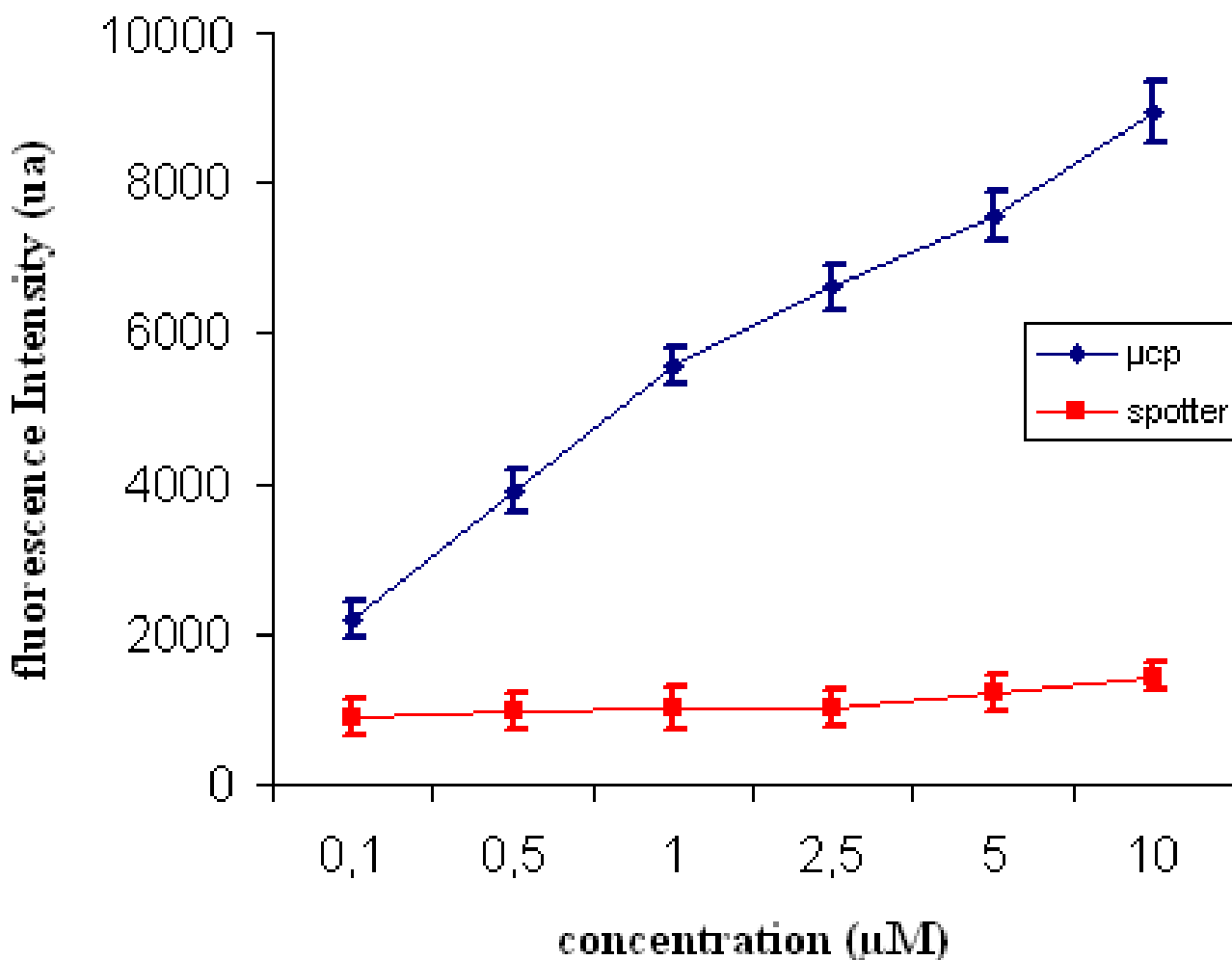
**Figure 7**

**Comparison between first and last print with the same stamp.** (A) shows the fluorescent image of the patterns transferred at the first print, and (B) shows the printing patterns after 5<sup>th</sup> (B1), 6<sup>th</sup> (B2) and 7<sup>th</sup> print (B3). Stamps were inked with a 15-mer 5'-labelled Cy5 oligonucleotide for 30 sec and then set in contact for 2 min with the dendrislide. The well defined features is shown in (A) whereas only the rims of the patterns were detected after the 4<sup>th</sup> print (B).

### Conclusion

In this work, we demonstrated that  $\mu$ CP is a new potential technology platform to pattern DNA microarrays at a relatively high speed, high resolution and high reproducibility. Two additional features which may provide significant advantages of this technology over the conventional spotting technologies are: (i) the simplicity of the  $\mu$ CP associated with the low cost of the material employed to make the stamp, and (ii) the arrays made by  $\mu$ CP technology

provide 10-times higher fluorescence intensity after hybridization compare to those manufactured by conventional spotting technology. With these advantages in mind, our next step will be the fabrication of a dedicated automatic X, Y, Z controlled tool for printing different probe molecules with a high throughput. In the future,  $\mu$ CP may help to simplify, accelerate and improve the fabrication of microarrays and increase significantly their reliability and accessibility in *i.e.* clinical applications.



**Figure 8**

**Comparison between  $\mu$ CP deposition and contact deposition using metal pins.** Evolution of the fluorescence intensity in arbitrary units as a function of the concentration of the solution containing the probe molecules. 60  $\mu$ m diameter spots of 20-mer oligonucleotides from *HSP12*, were deposited using a commercial Spotter (VersArray ChipWriter Pro, BIO-RAD) and then hybridized with the complementary labeled molecules. Disks and square of the same dimension were printed by  $\mu$ CP and treated exactly in the same conditions.

## Methods

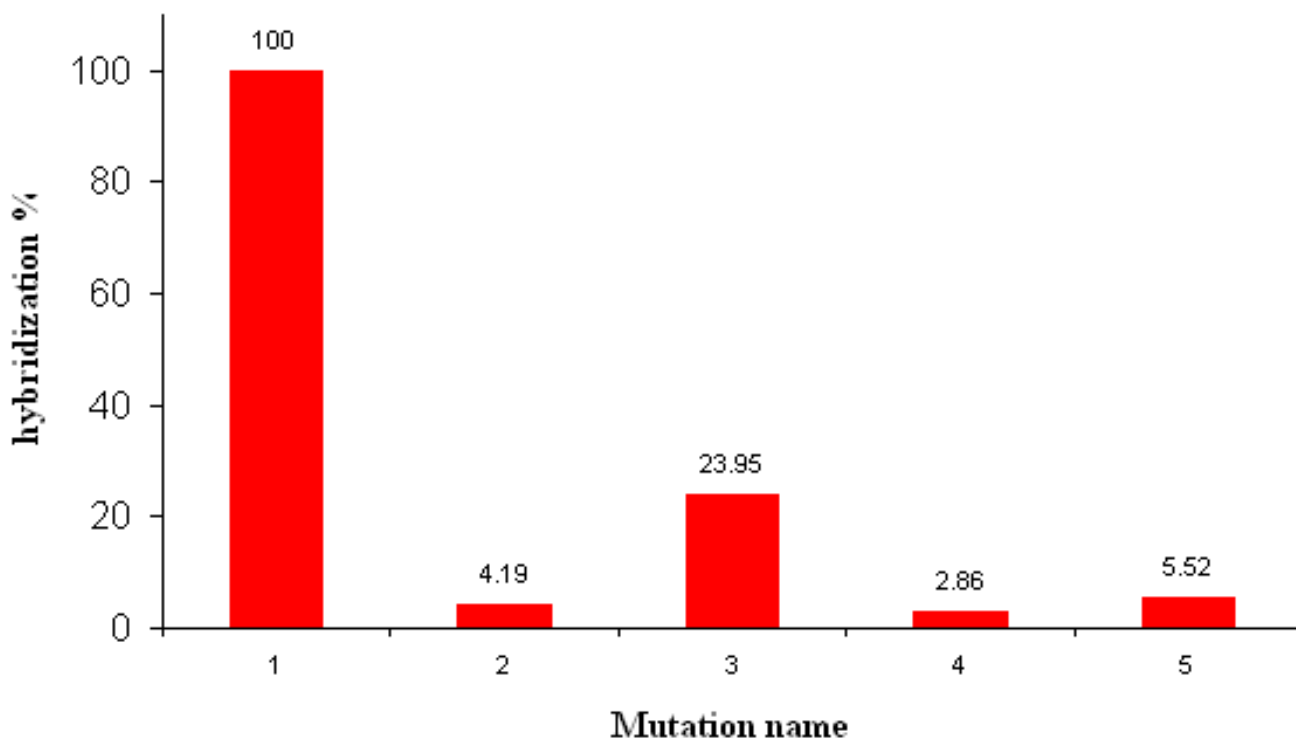
### Stamp fabrication

The first step of fabrication consists in generating a silicon master. This was achieved by proximity U.V. photolithography on a Si [100] wafer coated with positive resist (AZ 1529), and pattern transfer by deep Reactive Ion Etching (1.4  $\mu$ m deep). For submicronic patterns, Electron beam lithography on PMMA (PolyMethylMetAcrylate) was used instead of UV photolithography and the etch depth was limited to 100 nm. To enable simple demoulding of this master, an anti-adhesive treatment is carried out using silanisation in liquid phase with OTS (octadecyltrichlo-

rosilane). The final step consists to cure the PDMS prepolymer solution containing a mixture (10:1 mass ratio) of PDMS oligomers and a reticular agent from Sylgard 184 Kit (Dow Corning) on the silicon master. The PDMS was thermally cured at 120°C for 90 min or for 12 hr at 80°C (both methods giving similar results of stamping). A silicon master can be reused more than 50 times and each stamp can be used for a large number of prints (>100).

### Surface chemistry of the substrate

Two kinds of microscope glass slides were used for spotting and printing the probes. Using "electrostatic" glass



**Figure 9**

**Mutation detection.** Comparison of the hybridization signal intensity of the target molecules on 5 different printed patterns differing by only single or double mutations. "Mutation" 1 corresponds to the exact match of the target molecule and serves as a reference. Five 20-mer oligonucleotides probes were printed at 10  $\mu$ M in Na-Pi buffer 0.3 M, pH 9.0 on a dendrislide. These oligonucleotides were part of the yeast *HSP12* sequence, and varied from each other by a single or two mutations proximal to the 5' end or 3' end or in the middle of the sequence. The 20-mer sequences from *HSP12* are noted as follows: 1: NH<sub>2</sub> 5'-AATATGTTTCCGGTCGTGTC-3'; 2: NH<sub>2</sub> 5'-AATATGTTTCAGGTCGTGTC-3'; 3: NH<sub>2</sub> 5'-AATATGTTTCCGGTCGTGTA-3'; 4: NH<sub>2</sub> 5'-AATATGATTCCGGACGTGTC-3'; 5: NH<sub>2</sub> 5'-AATAAGTTTCCGGTCGTGTC-3'; Hybridisation was carried out with Cy5-labelled oligonucleotide (Cy5 5'-GACACGACCGAAACATATT 3'). Values of fluorescence intensity were measured at 635 nm with the GenePix 4000B from axon at 600 PMT and correspond to an average of 4 experiments. Statistics errors are less than 0.4% for the 4 experiments.

slides that are positively charged amine glass slides (Ultra Gap, Dow corning), the printed/spotted probes were cross-linked onto the amine surface by UV light at 300 mJ. With dendrislides (home made slide bearing generation 4 dendrimers, see [7], and our web site: <http://biopuce.insa-toulouse.fr>), a covalent attachment of the probes on the glass surface through aldehyde function of the dendrimers was performed [8,9]). After spotting, the dendrislides were allowed to dry overnight at room temperature. The reduction of the imines function formed between probes and dendrimer was carried out by immersion of the slides into a solution containing NaBH<sub>4</sub> at 3.5 mg/ml for 3 hr at room temperature under agitation. The DNA slides were

washed three times in water during 2 min, at room temperature and then dried under a stream of nitrogen.

#### Stamping process

Stamps were incubated with 2–20  $\mu$ l of a 10  $\mu$ M oligonucleotide solution made in Na-phosphate buffer 0.3 M, pH 9 for only 30 sec (unless mentioned differently), and then blown dried under a stream of nitrogen. Then, the stamp was printed manually onto the substrate surface and left in place during a controlled contact time. A 35-mer 5'-labelled Cy5-oligonucleotide-3'-NH<sub>2</sub> (5'-Cy5-TTAGCC-CATTTTGGCATATTTGGGCGGACAACCTT-NH<sub>2</sub>-3'), a 35-mer 5'-amino modified (5'-NH<sub>2</sub>-GTGATCGTTGTATC-

GAGGAATACTCCGATACCATT) and 70-mer 5'NH<sub>2</sub> oligonucleotides corresponding to yeast *HSP12* gene (from Qiagen/Operon yeast set) were used in spotting and printing experiments. The PCR fragment was a 500 bp amplified fragment on *HSP12* gene using universal primers as described elsewhere [7].

#### Preparation of labeled targets

The target was a 15-mer 5'-labelled Cy5 oligonucleotide (Cy5-AATGGTATCGGAGTA) complementary to the 35-mer probes (5'NH<sub>2</sub>-GTGATCGTTGTATCGAGGAATACTCCGATACCATT). Other targets were prepared from total yeast RNA as a template by incorporation of fluorescent-labeled Cy5 or Cy3-dCTP during first-stand cDNA synthesis. The labeling reaction and cDNA purification was carried out with 15 µg total RNA using the Label-Star Kit from Qiagen following the manufacturer's instruction.

#### Hybridization

In initial experiments, the hybridization was carried out in an hybridization cassette (Corning Inc), according to the standard protocol used in the lab for microarray technology <http://biopuce.insa-toulouse.fr> in the presence of 20 µl solution containing 16.5 µl Dig Easy buffer (Roche Diagnostic), 1 µl of denatured salmon sperm DNA and 2.5 µl of labeled target and covered with a 2.2 cm<sup>2</sup> cover slip to achieve a uniformed hybridization reaction during 15 min. After hybridization, the slides were washed for 2 min in 2 × SSC/0.1% (v/v) SDS; 2 min in 0.2 × SSC/0.1% (v/v) SDS and 2 min in 0.2 SSC at room temperature, and then dried under a nitrogen stream. In experiments reported on Figure 8, hybridization was carried out with an automatic hybridization room (Discovery from Ventana Medical System, Inc). Prehybridization was carried out with a freshly prepared solution of 1% BSA, 2 × SSC, 0.2% SDS during 1 h 30 at 42 °C. After automatic washing according to manufacturer instruction, the slides were hybridized for 8 hr in a 200 µL of ChipHybe™ buffer (Ventana Medical System, Inc) containing 20 µl of labeled and purified cDNA. Fluorescence imaging. Fluorescent images were captured with the laser scanner GenePix 4000 B from Axon at appropriate sensitivity levels of photomultiplier (PMT). The scanner run and collects data in 5 µm steps, then averages the data into 10 µm pixels. For correct data treatment, only features bigger than 10 µm were used.

#### Authors' contributions

C.T. and V.L. carried out the technological and biological part of the work and wrote the first draft of the manuscript. E.T. carried out the chemical part of the study. JF and CV conceived of the study, participated in the design of the experiments, and finalized the writing of the man-

uscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by the EC-funded project NaPa (Contract n° NMP4-CT-2003-500120, to C.V.) and by Genopole Toulouse Midi-Pyrénées (to J.F.). The content of this work is the sole responsibility of the authors.

#### References

- Hughes TR, Mao LM, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, et al.: **Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer.** *Nat Biotechnol* 2001, **19**:342-347.
- Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR, Lockhart DJ: **High density synthetic oligonucleotide arrays.** *Nat Genet* 1999, **14**:1675-1680.
- Renault JP, Bernard A, Bietsch A, Michel B, Bosshard HR, Delamarche E, Kreiter M, Hecht B, Wild UP: **Fabricating Arrays of Single Protein Molecules on Glass Using Microcontact Printing.** *J Phys Chem B* 2003, **107**:703-711.
- Michel B, Bernard A, Bietsch A, Delamarche E, Geissler M, Juncker D, Kind H, Renault JP, Rothuizen H, Schmid H, Schmidt-Winkel P, Stutz R, Wolf H: **Printing meets lithography: Soft approaches to high-resolution patterning.** *IBM J Res & Dev* 2001, **45**(5):697-719.
- Malaquin L, Vieu C: **Using PDMS as Thermocurable Resist for a Mold Assisted Imprint Process.** In *Alternative Lithography "unleashing the potentials of Nanotechnology" Volume Chapter 8.* Edited by: Clivia M Sotomayor Torres. Kluwer Academic Publishers Boston/Dordrecht/London; 2003:169-199.
- Lange S, Benes V, Kern D, Hörber H, Bernard A: **Microcontact Printing of DNA Molecules.** *Anal Chem* 2004, **76**:1641-1647.
- Le Berre V, Trevisol E, Dagkessamanskaia A, Sokol S, Caminade AM, Majoral JP, Meunier B, François J: **Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis.** *Nucleic Acids Research* 2003, **31**:e1-8.
- Trévisol E, Leberre V, Leclaire J, Pratviel G, Caminade AM, Majoral JP, François J, Meunier B: **Dendrisides, Dendrichips: a Simple Chemical functionalization of glass slides with Phosphorus Dendrimers as an effective Mean for the Preparation of Biochips.** *New J Chem* 2003, **27**:1713-1719.
- Huajian G, Yong K, Daxiang C, Cengiz S: **Spontaneous Insertion of DNA Oligonucleotides into carbon Nanotubes.** *Nano Letters* 2003, **3**:471-473.
- Fain B, Xia Y, Levitt M: **Determination of Optimal Chebychev-expanded hydrophobic discrimination function for globular protein.** *IBM Journal of research and development* 2001, **45**:525-532.
- Hacia JG: **Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays.** *Nature Genet* 1999, **21**:42-47.
- Hacia JG, Collins FS: **Mutational analysis using oligonucleotide microarrays.** *J Med Genet* 1999, **36**:730-736.
- Praekelt UM, Meacock PA: **HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function.** *Mol Gen Genet* 1990, **223**:97-106.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)

