

Bio-structuration à l'échelle micro et nanométrique

THÈSE

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II
Mention : Sciences des Matériaux, Physique, Chimie et Nanosciences

par

Sophie MASSOU

Composition du jury

Rapporteurs : C. PICART, professeur des universités (INP-Phelma, Grenoble)
C. VIEU, professeur des universités (INSA, Toulouse)

Examineurs : P. BONGRAND, professeur des universités, praticien hospitalier,
(Marseille)

B. BARTENLIAN, chargé de recherche (IEF, Paris)

C. VIGUIER, commercial (Omicron nanotechnology, St Cannat)

Directrice de thèse : M. HANBUCKEN, directrice de recherche (CINaM, Marseille)

Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille - UPR 3118
Campus de Luminy, Case 913, 13288 Marseille Cedex 9

Table des matières

1. Introduction	3
1.1. Notions de biologie cellulaire	3
1.2. Adhésion cellulaire	5
1.2.1. Cellules sur substrats fonctionnalisés avec des protéines	6
1.2.2. Cellules sur substrats fonctionnalisés avec des bicouches lipidiques	7
1.2.3. La cellule sur des substrats structurés	7
1.3. Usage des bio-structurations	12
1.4. Techniques de structuration	12
1.4.1. Généralités	12
1.4.2. La lithographie	13
1.4.3. Techniques bio-compatibles	16
1.5. Les membranes d'alumine poreuses	20
1.6. La thèse	21
2. Matériel et méthodes	23
2.1. Matériel et produits chimiques utilisés	23
2.1.1. L'aluminium	23
2.1.2. Les substrats	23
2.1.3. Les organo-silanes	23
2.1.4. Les polymères	26
2.1.5. Les fluorophores organiques	27
2.1.6. Les tensioactifs	30
2.1.7. Les protéines	30
2.1.8. Les cellules	32
2.1.9. Les tampons	32
2.2. Les méthodes de nettoyage de substrats	33
2.2.1. Nettoyage chimique	33
2.2.2. Nettoyage au plasma oxygène	33
2.3. La gravure ionique réactive (RIE)	33
2.3.1. Principe de fonctionnement	33

2.3.2.	Montage expérimental	35
2.4.	Les méthodes de dépôts	36
2.4.1.	Le dépôt de polymères par spin-coating	36
2.4.2.	Évaporation d'organo-amino-silanes	36
2.4.3.	Méthode de formation des bicouches lipidiques	38
2.4.4.	Le micro-contact printing de protéines	45
2.5.	Les méthodes de caractérisation	48
2.5.1.	Microscopie électronique à balayage (MEB)	48
2.5.2.	Microscope à force atomique (AFM)	49
2.5.3.	Microscopie par contraste d'interférence (Reflection Interference Contrast Microscopy RICM)	53
2.5.4.	Mesures de diffusion	57
3.	Structuration topographique de substrats	67
3.1.	Introduction	67
3.2.	Membranes d'alumine poreuses	67
3.2.1.	Morphologie	67
3.2.2.	Le principe de la croissance de l'alumine	68
3.2.3.	Fabrication des membranes d'alumine	70
3.2.4.	Les types de membranes d'alumine préparés et leurs spécificités	71
3.2.5.	Observation des membranes d'alumine poreuses	73
3.2.6.	Ouverture du fond des pores des membranes d'alumine poreuses	75
3.3.	Nano-structuration topographique	82
3.4.	Application des nanostructures pour la structuration de bicouches lipidiques	87
3.4.1.	Mise au point du protocole d'utilisation de la balance de Langmuir	87
3.4.2.	Bicouche lipidique sur une surface plane	91
3.4.3.	Bicouche sur une surface nanostructurée	92
3.5.	Discussion conclusion et perspectives	98
4.	Structuration biochimique de substrats	101
4.1.	Introduction	101
4.2.	Préparation d'un gabarit pour la nano-structuration chimique	101
4.2.1.	Dépôt direct à travers l'alumine poreuse	102
4.2.2.	Préparation de gabarits composites	103
4.3.	Structuration avec des organo-silanes	110
4.3.1.	Détection d'organo-silanes	110
4.3.2.	Structuration de surfaces avec de l'OTS	112

4.3.3.	Variation de la taille des plots d'OTS	116
4.3.4.	Structuration de surface avec de l'APTES	117
4.3.5.	Dépôt d'APTES en milieu liquide	119
4.4.	Fonctionnalisation avec des protéines	120
4.4.1.	Dépôt de protéines sur une surface structurée avec de l'OTS	120
4.4.2.	Dépôt de protéines sur une surface structurée par des plots d'OTS et de l'APTES	121
4.5.	Études d'adhésion cellulaire sur substrats structurés	127
4.5.1.	La mise en place du micro-contact-printing	127
4.5.2.	Mise en place de la biochimie	131
4.5.3.	L'adhésion de cellules vivantes	135
4.6.	Discussion, conclusion et perspectives	137
5.	Conclusion générale	139
A.	Produits chimiques et matériel utilisés	163
B.	Protocole de nettoyage des lamelles pour le Langmuir	165
C.	Liste des publications	167
	Bibliographie	181

Liste des abréviations

AFM : Microscope à force atomique (Atomic Force Microscope)

APTES : Aminopropyltriethoxy Silane

BODIPY : Boron-dipyrrromethene

BSA : Albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumine)

DI : déionisée

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

FCS : Spectroscopie par corrélation de fluorescence (Fluorescent Correlation Spectroscopy)

FCSrv : Spectroscopie par corrélation de fluorescence à rayon variable

FFT2D : Transformée de Fourier en 2 dimensions (Fast Fourier Transform 2 dimensions)

FITC : Fluorescéine isothiocyanate

FRAP : Redistribution de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence recovery after photobleaching)

LB : Langmuir-Blodgett

LS : Langmuir-Schaeffer

MEB : Microscope électronique à balayage

OTS : Octadécyltrichlorosilane

PBS : Phosphate buffered saline

PDMS : PolyDiMéthylSiloxane

PMMA : Polyméthacrylate de méthyle

Table des matières

RF : Radio-fréquence

RICM : Reflection Interference Contrast Microscopy

RICM : Reflection Interference Contrast Microscopy

RIE : Gravure ionique réactive (Reactive Ion Etching)

rms : Root mean square

SPT : Suivi de particule unique (Single Particle tracking)

UV : Ultraviolet

1. Introduction

Le développement récent des nano bio-technologies a catalysé une croissance importante de la science à l'interface entre la physique, la chimie et la biologie. En effet, le passage du micron au nanomètre représente le même changement de grandeur que le passage du mètre au millimètre. De nombreuses applications concernent l'interaction entre des objets de taille micrométrique et des objets de taille nanométrique. Dans la nature, une dizaine de microns correspond à l'échelle cellulaire alors que l'échelle du nanomètre est celle des protéines et de l'épaisseur de la membrane cellulaire. On peut se demander dans quelle mesure des objets qui sont séparés par une aussi grande différence d'échelle ont la possibilité d'interagir entre eux.

Dans cette thèse nous allons préparer des substrats nano-structurés pouvant être utilisés pour l'étude de l'adhésion cellulaire. Dans cette introduction nous présenterons tout d'abord les mécanismes cellulaires indispensables à la compréhension du fonctionnement de la cellule. Nous expliquerons ensuite le fonctionnement de l'adhésion des cellules sur des substrats, puis sur des substrats structurés à l'échelle micrométrique et nanométrique. Nous présenterons ensuite les techniques disponibles pour la structuration de surface. Enfin, nous donnerons le cahier des charges auxquels nos substrats devront répondre.

1.1. Notions de biologie cellulaire

Toutes les créatures vivantes sont composées de cellules, petits compartiments limités par une membrane et remplis par une solution aqueuse composée de biomolécules [1]. D'un point de vue biologique, l'échelle de la cellule est celle du micron. La cellule est l'unité de base de la vie. Si la cellule humaine avait la taille de la façade d'un immeuble de 6 logements, la bactérie aurait la taille d'un humain, le virus celle d'une souris et la protéine celle d'un insecte. Cette comparaison de taille souligne bien l'écart entre l'échelle de la dizaine de microns (cellule) et celle du nanomètre (protéines). La cellule elle-même est composée de sous-structures biologiquement fonctionnelles ayant des échelles qui descendent jusqu'au nanomètre. La figure 1.1 présente un schéma d'une coupe de la cellule animale avec les organelles principaux.

1. Introduction

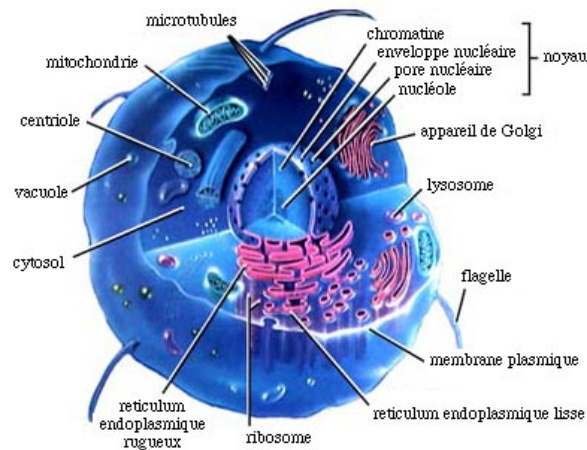


FIGURE 1.1.: *Vue schématique en coupe d'une cellule animale. On peut y voir les principaux organes de la cellule. La largeur de la cellule est de 10 à 30 μm [2].*

La complexité de la cellule apparaît sur ce schéma. Chaque structure contient une structure plus petite, par exemple le noyau dans lequel se trouve l'ADN. Il n'est bien sûr pas question d'expliquer en détail le fonctionnement de la cellule animale, nous décrirons ici seulement quelques parties essentielles à la compréhension de cette thèse.

La membrane cellulaire (figure 1.1) est une composante essentielle de la cellule car elle sépare l'intérieur de la cellule de l'extérieur. Elle est composée d'un assemblage protéo-lipidique (figure 1.2) c'est-à-dire une bicouche lipidique et des protéines associées ou intégrées dans la bicouche. Les protéines permettent notamment le transfert de molécules et d'informations ainsi que la catalyse des réactions de surface de la cellule [3, 4, 5, 6]. L'épaisseur de la bicouche ainsi que les protéines sont de l'ordre de quelques nanomètres. Les protéines d'adhésion cellulaire qui permettent à la cellule d'adhérer sur un substrat, sont aussi de l'ordre de grandeur du nanomètre.

La membrane cellulaire est très inhomogène. A l'exception de certaines structures telles que les filopodes qui sont topographiquement distinctes, on retrouve des inhomogénéités dans la composition. Il est possible que certaines protéines résident dans de petits domaines lipidiques appelés radeaux lipidiques (raft en anglais) [7]. Ces domaines présents dans la membrane cellulaire, ont une fluidité inférieure à celle du reste de la membrane cellulaire ce qui leur donne une flottabilité différente [8]. Ces radeaux « flottent » donc sur la membrane cellulaire et diffusent [9]. Bien que leur taille reste très controversée, le consensus émergent est qu'ils sont très dynamiques et de taille nanométrique [10, 11].

Le cytosquelette forme une structure rigide composée de polymères qui confèrent à la cellule sa rigidité et ses propriétés dynamiques [1]. Il est composé de trois types de filaments. Les filaments d'actine forment une structure rigide à l'intérieur de la

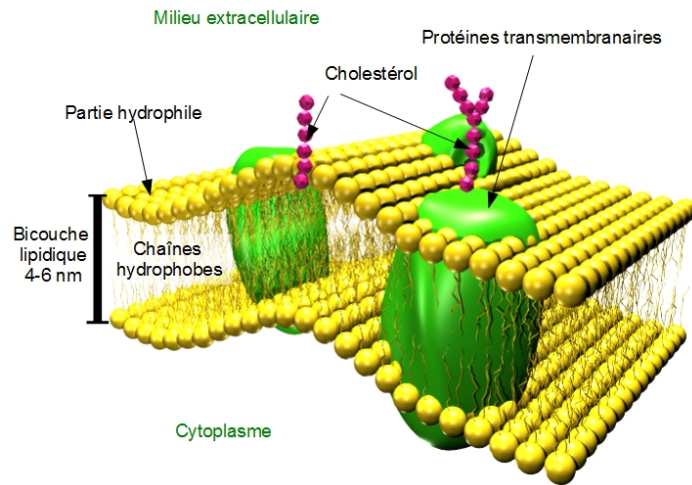


FIGURE 1.2.: *Vue d'artiste d'une membrane cellulaire. On y voit notamment la bicouche lipidique qui compose la membrane et les diverses protéines intégrées dans la bicouche.*

membrane cellulaire faisant le tour de la cellule et lui permettant de garder sa forme. Les filaments d'actine sont composés de polymères biologiques qui forment des filaments dont le diamètre est d'environ 7 nm. Les microtubules forment des tubes d'un diamètre de 15 à 25 nm. Ils jouent un rôle dans trois types d'actions : au cours de la mitose en donnant la forme à la cellule, pour le transfert cytoplasmique, ils servent de « rails » pour le transport de vésicules et dans la mobilité cellulaire en composant le flagelle des cellules. Enfin, les filaments intermédiaires participent à la structure du noyau cellulaire.

1.2. Adhésion cellulaire

Dans les organismes évolués, les cellules sont toujours organisées en tissus. Pour créer des tissus fonctionnels, elles adhèrent entre elles et/ou à la matrice extracellulaire en utilisant des protéines spécifiques. Les protéines d'adhésion forment des assemblages supra-moléculaires organisés à l'échelle du micron. A cause de la complexité des processus mis en oeuvre lors de l'adhésion cellulaire l'étude de ces mécanismes *in vivo* est très difficile. Les outils scientifiques et technologiques actuels ne sont pas adaptés pour étudier le détails des mécanismes d'adhésion *in vivo*. Donc pour en comprendre les détails, les expériences en biologie cellulaire sont souvent effectuées *in vitro* sur des cellules uniques déposées sur des substrats. Le substrat imite soit la deuxième cellule du processus d'adhésion en utilisant une bicouche lipidique supportée fonctionnalisée

1. Introduction

avec la molécule appropriée [12], soit la matrice extracellulaire en utilisant des protéines d'adhésion directement sur la surface [13].

1.2.1. Cellules sur substrats fonctionnalisés avec des protéines

La plupart des expériences sur cellules uniques nécessitent de mettre les cellules en solution. Des cellules uniques de mammifères se trouvant en solutions ont naturellement une forme plutôt sphérique définie par la forme du cytosquelette. Lorsqu'une cellule est déposée sur un substrat, elle peut adhérer de deux façons :

- non-spécifique : la cellule s'étale simplement sur la surface par des interactions physiques. Biologiquement, ce type d'adhésion cellulaire a très peu de pertinence.
- spécifique : dans ce cas, l'adhésion a lieu par l'intermédiaire de protéines d'adhésion spéciales. Le substrat doit être préparé spécialement en le recouvrant par des molécules appropriées pour l'adhésion (ligand) qui peuvent faire une liaison avec la molécule d'adhésion correspondante présente dans la membrane cellulaire (récepteur). Les cellules qui naturellement se trouvent dans des tissus (les cellules endothéliales, les fibroblastes...) adhèrent entre elles et aussi à la matrice extracellulaire. Typiquement les récepteurs impliqués dans l'adhésion sur la matrice extracellulaire sont des intégrines et les ligands sont par exemple de la fibronectine. Les cellules sanguines, qui vivent en milieu liquide (les macrophages et les lymphocytes) adhèrent ponctuellement sur des cellules composant les parois des vaisseaux sanguins (cellules endothéliales) selon les besoins de l'organisme. Les récepteurs impliqués sur les cellules sanguines sont typiquement des intégrines qui font des liaisons avec des ligands présents sur les cellules endothéliales. Les structures d'adhésion formées dans les deux cas sont différentes.

Dans le premier cas, après la formation d'un complexe ligand-récepteur, les points d'adhésion se regroupent en formant des points d'adhésion focaux [1]. La structure du cytosquelette est modifiée et produit des fibres de stress, structures qui partent des points focaux et qui stabilisent l'adhésion [14, 15, 16] (figure 1.3). L'adhésion cellulaire spécifique n'est pas un phénomène passif où la cellule se contente de faire des liaisons chimiques. Elle est capable d'exercer des forces sur son environnement et de « sonder » sa rigidité [17]. La rigidité du substrat est aussi un facteur à prendre en compte dans l'adhésion cellulaire. En effet des études ont démontré que la rigidité du substrat peut influencer l'adhésion cellulaire [18, 19]. La rigidité du substrat permet aussi de changer la différenciation de cellules souches [20, 21, 22].

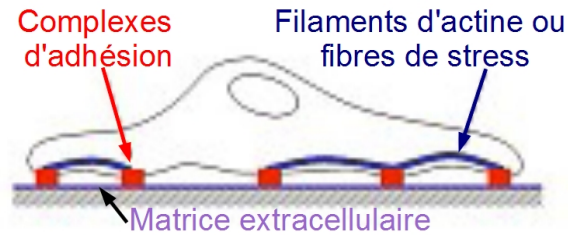


FIGURE 1.3.: *L'adhésion cellulaire sur un substrat recouvert de protéines de matrice extracellulaire. En rouge on retrouve les complexes d'adhésion ligand-protéines. En bleu, les fibres de stress [23].*

Les cellules sanguines qui vivent en permanence en milieu liquide ne font pas de points d'adhésion focaux mais elles font quand même des liaisons spécifiques. In vivo, les cellules se déplacent à l'intérieur des vaisseaux sanguins soit de façon passive poussée par le flux sanguin, soit de façon active par le déplacement de la cellule lorsqu'elles ont besoin de quitter le flux sanguin. Elles s'accrochent aux parois des vaisseaux et finissent par stabiliser l'adhésion. Elles peuvent enfin traverser la paroi du vaisseau. In vitro, les cellules adhèrent sur le substrat en s'étalant.

1.2.2. Cellules sur substrats fonctionnalisés avec des bicouches lipidiques

La membrane cellulaire est souvent imitée par des bicouches lipidiques supportées [24, 25]. Ces bicouches sont composées de phospholipides membranaires déposés en bicouches sur une surface plane (du verre par exemple) [26]. Elles sont d'une hauteur typiquement comprise entre 4 et 6 nm. Une fine couche d'eau d'environ 1 nm se trouve entre la bicouche et la surface et donne des propriétés de diffusion latérale aux phospholipides [27, 28, 29]. Les phospholipides de la bicouche lipidique supportée peuvent aussi être fonctionnalisés avec des protéines.

1.2.3. La cellule sur des substrats structurés

Les cellules réagissent à la structuration à l'échelle micrométrique ou nanométrique présentes sur les surfaces. Ce type de structures peuvent être soit topographiques soit biochimiques. Des surfaces structurées par des molécules bio-compatibles placées de façon ordonnées sont appelées surfaces bio-structurées. Les tailles des motifs ainsi que les distances entre ceux-ci sont contrôlées. Ce type de surfaces peut être important pour des applications biomédicales. Elles peuvent aussi être utilisées comme outils pour répondre à des questions fondamentales à propos des interactions cellules/surfaces [30, 15].

1. Introduction

Que ce soit pour des applications médicales ou bien dans le cadre de l'étude fondamentale, la connaissance des interactions entre des surfaces structurées et des cellules est primordiale. En effet, des études montrent déjà des différences de comportement lorsqu'une cellule est en contact avec une surface structurée ou avec une surface plane [31, 32, 33, 34, 35]. Par exemple, des cellules vivantes peuvent adhérer différemment, voire mourir en présence d'un substrat micro-structuré lorsque les motifs adhésifs sont plus petits que la taille moyenne d'une cellule [36].

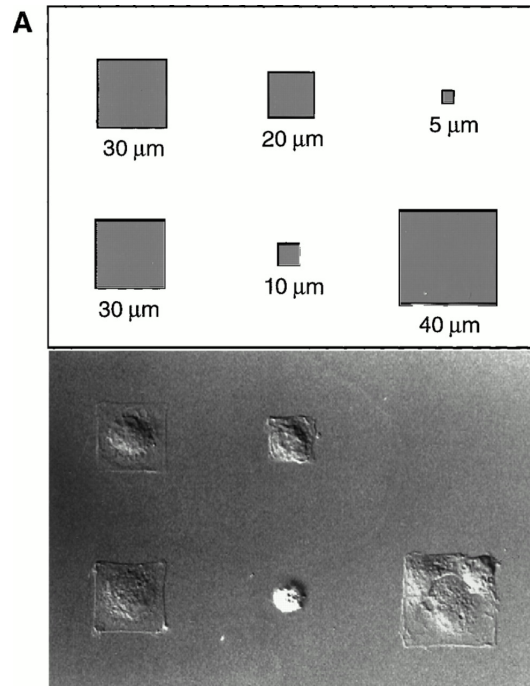


FIGURE 1.4.: *Effet de la structuration de surface sur la cellule. En haut, le schéma représente les micro-structures de protéines d'adhésion. En bas, les cellules adhèrent en prenant la forme pour les structures plus grande que la cellule, n'adhèrent pas sur les plus petites et meurent sur celles du même ordre de grandeur [13].*

En 1997, Chen et al. [13] ont été les premiers à utiliser un substrat micro-structuré pour contrôler l'adhésion et la mort cellulaire. La figure 1.4 permet d'observer un schéma des structures (image du haut). La surface est biofonctionnalisée avec des îlots de matrice extra-cellulaire permettant l'adhésion cellulaire. L'image du bas permet de constater l'adhésion cellulaire en contraste de phase. Cette étude met en évidence le fait que les cellules adaptent leur forme à la taille des structures (20 µm, 30 µm, 40 µm) lorsque la taille de la structure est plus grande que la taille moyenne de la cellule (10 µm). Lorsque les structures sont plus petites, les cellules n'adhèrent pas. Si les structures et les cellules sont du même ordre de grandeur, elles adhèrent et meurent. La diminution de la taille des motifs permet de restreindre l'adhésion cellulaire. La

forme de la cellule varie alors dans le but de garder une matrice cellulaire constante en diminuant la taille et l'espacement entre les points focaux d'adhésion (figure 1.5).

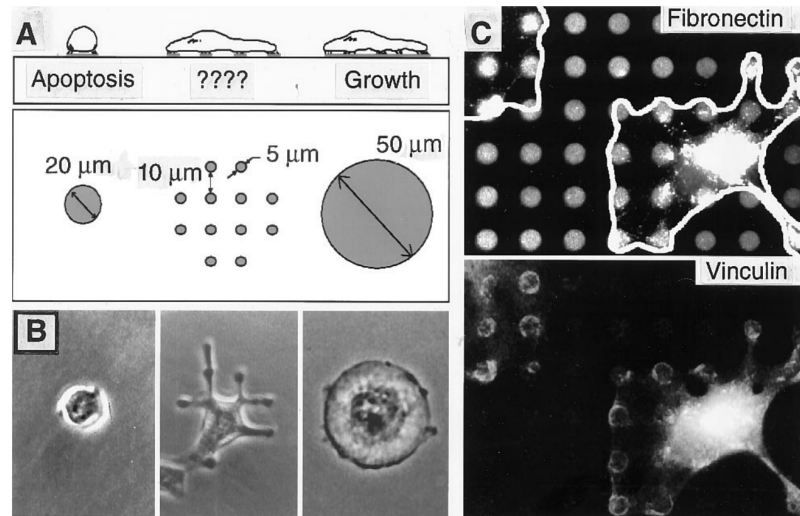


FIGURE 1.5.: *La cellule adapte sa forme à la micro-structure de fibronectine* [13].

Lernert et al. [37] utilisent un substrat micro-structuré pour contrôler la croissance de cellules de mélanome (figure 1.6). La cellule adhère sur un substrat micro-structuré en s'adaptant à la forme des structures.

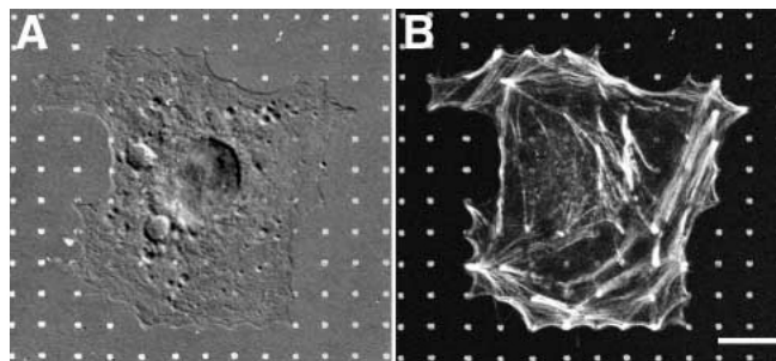


FIGURE 1.6.: *Adhésion cellulaire sur un substrat micro-structuré . Une cellule de mélanome cultivée durant 1 heure sur un substrat bio-fonctionnalisé par de la fibronectine. En A, vue de l'immunofluorescence de la fibronectine en microscopie de contraste d'interférence. Le substrat détermine la forme des cellules : elle est rectangulaire. En B, les filaments d'actine apparaissent, ils partent des plots de fibronectine* [37].

Théry et al. ont observé que les cellules HeLa humaines qui se divisent sur un substrat microstructuré par de la fibronectine orientent leur fuseaux mitotiques [38]. Lors de la mitose, le centrosome de la cellule se divise en deux et migrent chacun à une extrémité

1. Introduction

de la cellule et créent un réseau de micro-tubules, les chromosomes se condensent et se retrouvent piégés entre les micro-tubules produites par chaque pôle. La figure 1.7 montre la mitose de cellules sur des microstructures de fibronectine de formes différentes [39]. La première ligne comporte les images des micro-structures qui apparaissent en rouge. La deuxième ligne permet de voir les cellules déposées sur les structures : les micro-tubules sont marqués en vert, les chromosomes en bleu et les centrosomes en rouge. La troisième ligne montre un schéma des structures en orange et la zone d'encrage des micro-tubules en orange foncé. La forme de la structure change la forme des cellules et oriente la direction de la mitose.

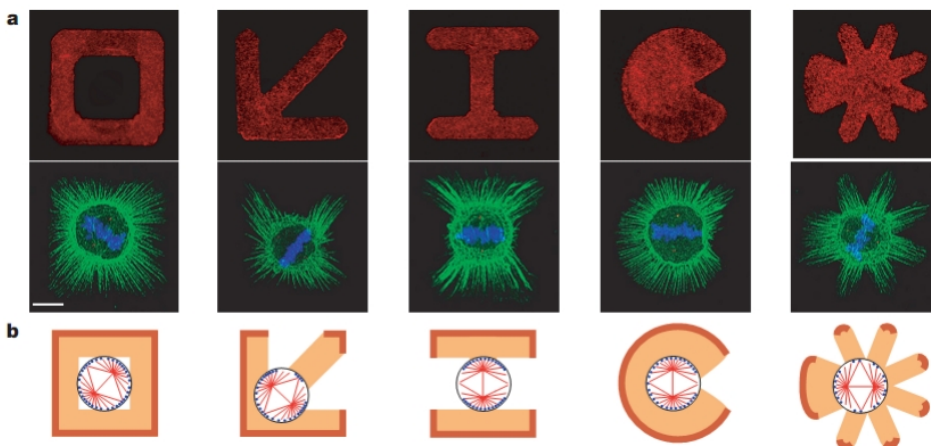


FIGURE 1.7.: *Cellules mitotiques sur des microstructures de fibronectine de formes différentes (1ère ligne, en rouge). Les pôles sont en rouge, les chromosomes en bleu, les micro-tubules en vert. b) Représentation schématique des micro-structures, les points d'encrage des micro-tubules (ligne orange foncé) [39].*

Toutes ces études démontrent que le bio-structuration de surface à l'échelle micro-métrique influence la forme et le fonctionnement des cellules. Nous allons maintenant considérer l'influence des surfaces nanostructurées sur les cellules.

Les études montrent que des cellules vivantes déposées sur une surface plane vont adhérer en s'étalant. Lorsque des cellules sont déposées sur des nanostructures, elles adhèrent sans s'étaler quand les motifs sont séparés de plus de 80 nm [40]. Elles adhèrent en s'étalant lorsque l'éloignement entre les motifs est inférieur à 80 nm : dans ce cas la cellule réagit de la même façon que sur un substrat homogène. La figure 1.8 montre : en A, la variation au cours du temps de l'aire d'une cellule déposée sur un substrat plan, la cellule s'étale après 60 s. En C, les cellules ne s'étalent pas, elles sont déposées sur un réseau de plots d'or fonctionnalisés avec des peptides RGD. En B, lorsque le pas entre deux structures devient trop faible, les cellules cessent de "voir les structures" et se comportent comme si elles étaient un présence d'une surface homogène [30, 41].

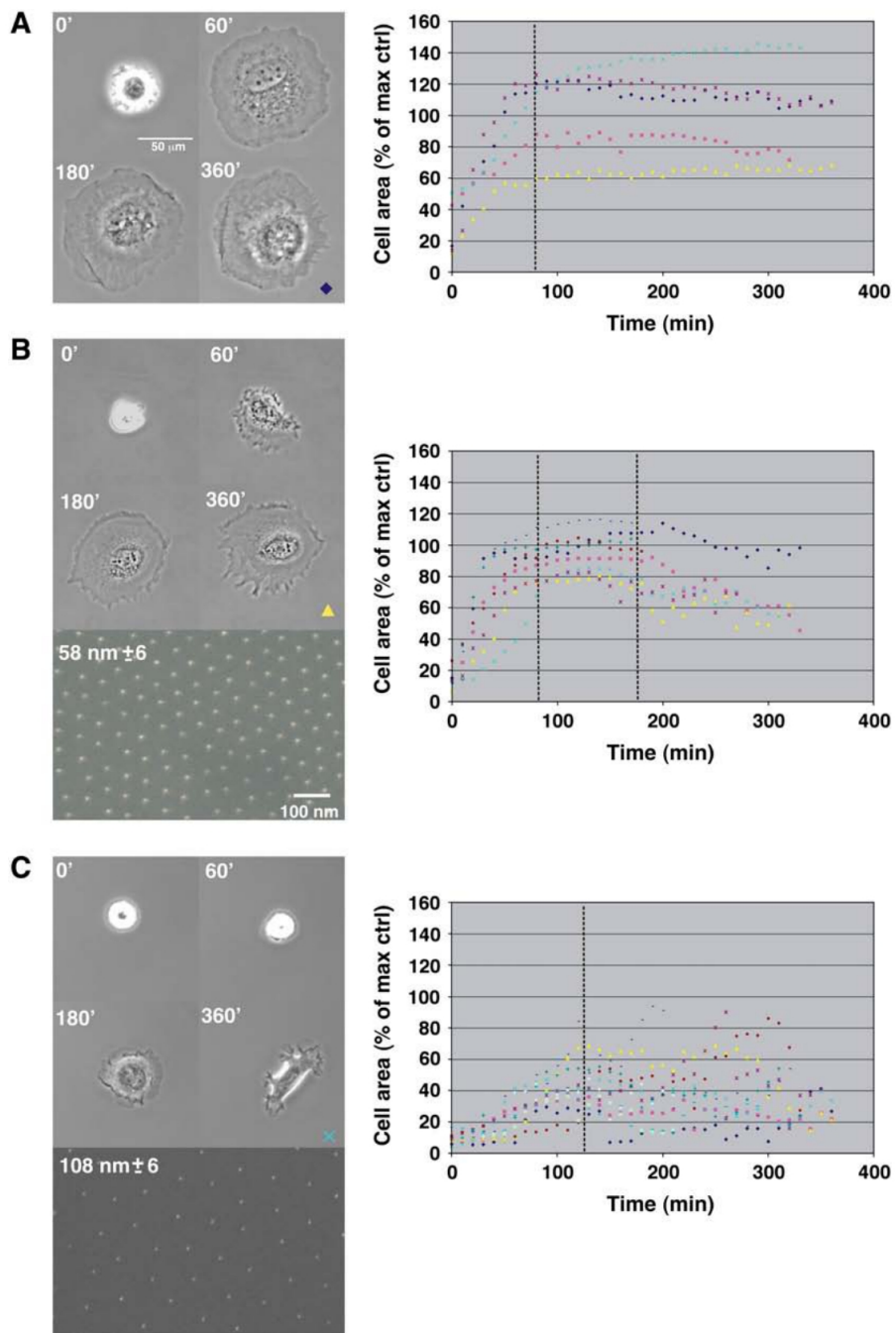


FIGURE 1.8.: Image de l'adhésion cellulaire sur une surface obtenue en microscopie de contraste de phase. En (A), la surface est couverte de façon homogène par des peptides RGD. En (B) et (C) on retrouve des nano-structures de peptides RGD de respectivement 58 nm (B) et 108 nm de distance (C) [40].

1. Introduction

Ainsi, que l'on soit en présence d'un substrat micro-structuré ou nano-structuré, un lien est observé entre la structure de la surface et le comportement des cellules. Il est donc important de bien maîtriser les paramètres qui entrent en jeu si l'on veut dans l'avenir pouvoir utiliser cela dans des applications médicales. En effet, une surface structurée dans un but thérapeutique pourrait devenir dangereuse selon les paramètres utilisés.

1.3. Usage des bio-structurations

Voici quelques exemples non exhaustifs d'utilisation de surfaces bio-structurées. D'un point de vue médical, les biopuces (puces à ADN, à protéines) permettent le diagnostic moléculaire [42]. Ce sont des surfaces bio-fonctionnalisées.

Les biopuces permettent d'effectuer un très grand nombre d'analyses en parallèles. Les puces à ADN sont des surfaces sur lesquelles sont déposés un grand nombre de brins d'ADN complémentaires [43, 44]. Les brins d'ADN sont marqués avec une molécule fluorescente. Lorsque l'ADN à analyser est mis en contact avec la surface, les brins à analyser vont s'hybrider dès qu'ils trouveront un brin complémentaire sur la surface. Après rinçage, les brins non hybridés vont être rincés. L'analyse de la surface en fluorescence permet de savoir quels brins ont été mis en contact avec la surface. Ces puces ont plusieurs types d'applications : diagnostic de maladie, détection de micro-organismes, recherche toxicologique [45] ...

Les puces à protéines sont constituées de protéines déposées sur une surface. Ces protéines sont produites puis fixées chimiquement sur la surface. Elle permettent de détecter les protéines cibles de l'échantillon à analyser [46].

1.4. Techniques de structuration

1.4.1. Généralités

Il existe un grand nombre de techniques permettant de structurer une surface [47, 48]. On peut les séparer en deux grandes familles : l'approche descendante top-down et ascendante bottom-up.

L'approche top-down consiste à partir du matériau massif et d'essayer de réduire la taille. Cela pourrait être comparé au sculpteur qui part d'un morceau de marbre et le sculpte en enlevant de la matière pour obtenir une statue. Cette approche comprend une séquence d'étapes, notamment la lithographie suivie ou précédée par le dépôt ou la

gravure. La résolution est limitée par les méthodes de lithographie. La taille des motifs obtenus par la lithographie optique est largement supérieure au nanomètre. Une des technologies permettant de descendre en taille est la lithographie électronique mais la méthode est séquentielle et assez chère ce qui ne permet pas une production de masse. D'autres méthodes basées sur l'AFM permettent le dépôt et le retrait de molécules à l'aide de la pointe de l'AFM mais elles présentent le même problème.

L'approche bottom-up quant à elle consiste à utiliser les propriétés physico-chimiques des matériaux à l'échelle moléculaire et nanométrique pour les assembler. Cela pourrait être comparé à la fabrication d'une maison : les briques qui sont la matière première, sont assemblées pour construire un mur. L'inconvénient de cette méthode est que les matériaux doivent être choisis pour s'auto-assembler. Cela nécessite de connaître les propriétés physico-chimique des matériaux. Cette méthode est plus simple car les structures sont créées par un assemblage spontané de la matière de façon naturelle et auto-contrôlé.

Il est important de faire la distinction entre les méthodes parallèles et séquentielles. La méthode parallèle permet de structurer une grande surface en une seule fois. La méthode séquentielle crée les structures les unes après les autres. Cela peut être très long et coûteux. Pour une production à grande échelle, une méthode parallèle est préférable.

1.4.2. La lithographie

Le terme de lithographie désigne l'action de transférer des motifs dans une couche mince de polymères appelée résine grâce à l'interaction entre celle-ci et un faisceau de lumière ou de particules. Il existe un grand nombre de techniques de lithographie [49]. Nous allons en citer quelques unes.

La lithographie optique conventionnelle utilise la lumière pour insoler une résine photosensible. Un masque en verre sur lequel est déposée une couche de métal permet de bloquer la lumière selon les motifs désirés. Une gravure est faite en utilisant la résine pour protéger des parties du substrat, les motifs obtenus correspondent à ceux que l'on trouve sur le masque. Cette technique est très efficace pour obtenir des motifs micrométriques et c'est une méthode parallèle. La résolution possible est $0,25\ \mu\text{m}$ en mode contact [50]. La limitation de résolution pour la création de motifs très petits est principalement la loi de la diffraction, une des solutions proposée est d'utiliser une longueur d'onde plus petite.

La lithographie à rayons X a été proposée. Des problèmes liés à la difficulté de fabriquer des masques et à leur fragilité ont fait que les industriels ont abandonné cette technique.

1. Introduction

La lithographie électronique permet d'obtenir une meilleure résolution que la lithographie optique. C'est une méthode séquentielle donc plus lente. Elle demande l'utilisation de matériel plus onéreux que pour l'optique mais permet d'obtenir de très bonne résolution (1 nm en faisceau focalisé) [50].

La lithographie par faisceau d'ions focalisés (FIB) envoie un faisceau d'ions focalisé sur la surface. La résolution est de quelques nm. Cette technique est également adaptée à la gravure directe des matériaux.

Apparues dans les années 90, les lithographies douces (soft) [51] tel que le micro et nano-contact printing utilisent un polymère pour répliquer des motifs obtenus par les techniques de lithographie optique et électronique. La lithographie permet de graver les motifs désirés sur un moule en silicium. Un polymère, le polydiméthylsiloxane (PDMS) est ensuite versé sur le silicium, il réticule en prenant la forme des motifs gravés dans le silicium. Le polymère est démoulé puis découpé et des timbres en PDMS sont obtenus. Ils peuvent ensuite être encrés avec une molécule d'intérêt. Celui-ci est mis en contact avec la surface, la molécule est alors déposée en suivant le motif initial. Le moule et les timbres sont réutilisables plusieurs fois. Cette technique permet d'obtenir une très bonne résolution qui est limitée par la lithographie utilisée pour préparer les tampons et aussi par les proportions des motifs qui peuvent empêcher le démoulage [52].

Des lithographies émergentes permettent de préparer des mono-couches auto-organisées (figure 1.9) [53].

Les lithographies en champ proche utilisent une pointe de microscope à force atomique (AFM) pour déposer ou retirer des molécules organisées sur une surface. La technologie « dip-pen » permet de déposer des molécules sur une surface grâce à une pointe de microscope à force atomique (AFM Atomic Force Microscope) . La nano-impression consiste à imprimer des motifs présents sur un moule en relief dans une couche de résine déposée sur un substrat puis d'effectuer une gravure ionique réactive (RIE). Cette méthode présente l'avantage d'être bio-compatible [54].

Enfin, une technique pour préparer des nano-objets consiste à les faire croître sur des substrats pré-structurés sous ultra-vide. La croissance sous vide permet un très bon contrôle du dépôt. En effet, celui-ci se fait dans une enceinte fermée et propre, dans laquelle tous les contaminants de l'air ont donc pu être retirés. Les techniques sous ultra-vide sont coûteuses, contraignantes et sont souvent incompatibles avec la biologie.

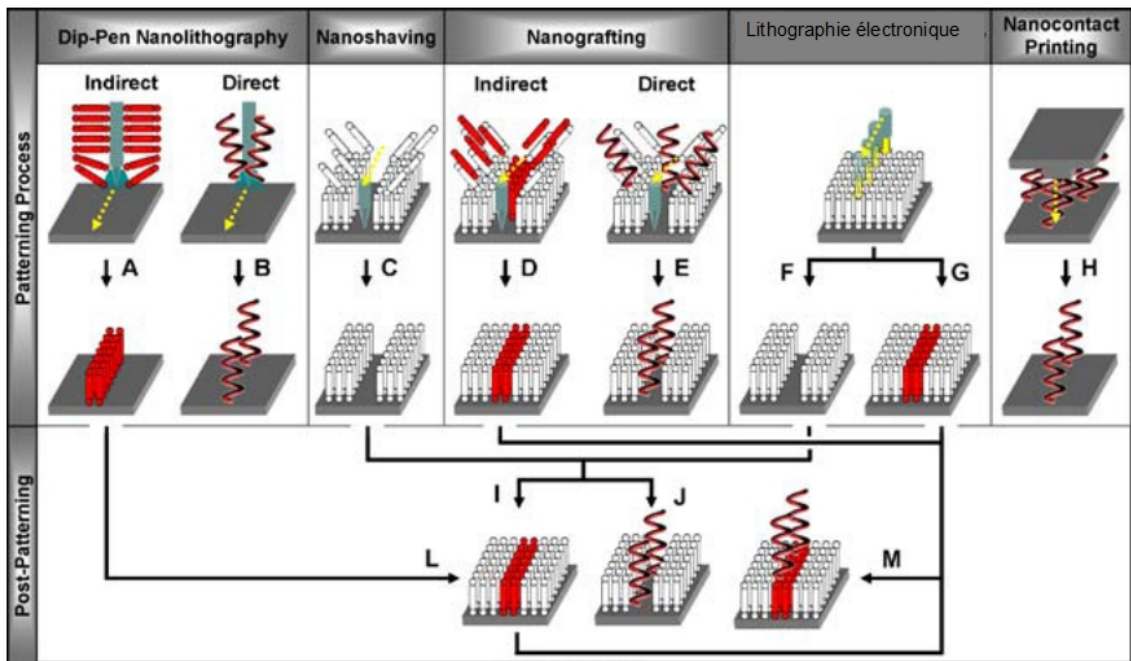


FIGURE 1.9.: Quelques exemples de structurations de surfaces [53]. Les techniques dip-pen utilisent la pointe d'un AFM pour le dépôt de molécules sur la surface (A,B). La nanoshaving utilise une pointe d'AFM pour retirer des molécules d'une couche de résine préalablement déposée sur la surface (C). Le nanografting utilise une pointe AFM pour remplacer les molécules d'une monocouche auto-assemblée par une autre molécule ayant une plus grande affinité avec la surface (D,E). La lithographie électronique permet d'insoler une résine sensible avec des électrons (F,G). Le nano-contact printing (voir microcontact printing) permet de déposer des molécules à l'aide d'un timbre (H). Toutes ces techniques, sauf le nano-contact printing, sont des étapes préalables à une gravure ou le dépôt de d'autres molécules (I,J ,L,M) .

1.4.3. Techniques bio-compatibles

Nous allons citer quelques exemples de bio-structurations que l'on retrouve dans la littérature.

JR. Li et al [55] utilisent des billes de latex pour structurer une surface (figure 1.10). Les billes sont collées sur la surface puis des amino-organo-silanes sont évaporés à travers le réseau obtenu. Une partie de la molécule a la propriété de faire une liaison covalente avec la surface et l'autre partie de la molécule comporte une fonction amine. Ils peuvent être utilisés pour accrocher une molécule biologique grâce à leur fonction amine.

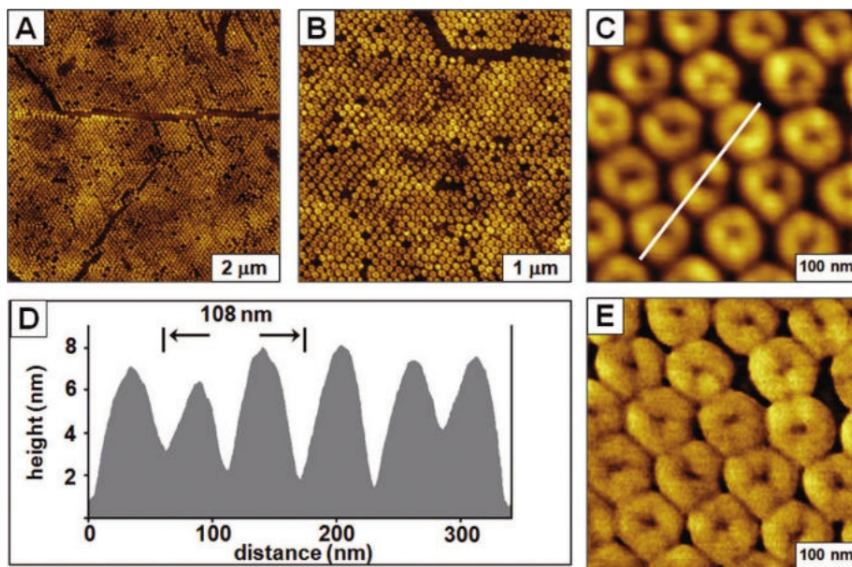


FIGURE 1.10.: *Structuration de surface grâce à des billes de latex. Les billes sont collées sur la surface puis les organo-amino-silanes sont évaporés à travers [55]. En A, B, C, E ce sont des images AFM à différentes échelles caractérisant la structuration de la surface. En D, profil en z obtenu à partir de l'image C.*

Jackson et al. [56] utilisent des techniques combinant l'utilisation de l'aluminium comme masque pour structurer une surface puis la bio-fonctionnalisation avec des protéines. Ils utilisent à la fois les propriétés de la lithographie pour structurer de l'aluminium et les propriétés des organo-amino-silanes pour accrocher une protéine fonctionnelle. La figure 1.11 expose le protocole : un fin film d'aluminium est structuré par une technique de lithographie classique sur une surface de verre (figure 1.12A). Les motifs d'aluminium ont une largeur de 200 nm, espacés de 2 μm (figure 1.12B). Les organo-amino-silanes sont déposés sur la partie laissée à nu après la lithographie. La fibronectine est attachée par des liaisons covalentes à la fonction amine du silane. Après

1. Introduction

dissolution de l'aluminium, une bicouche lipidique est déposée sur le substrat laissé à nu (figure 1.12C).

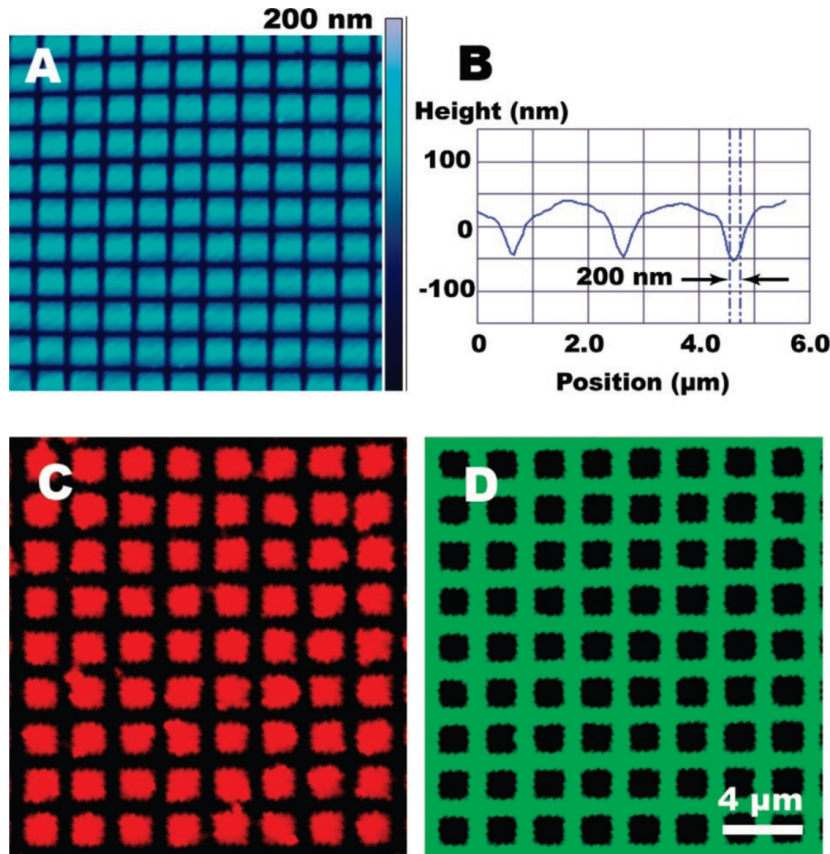


FIGURE 1.12.: Structures hybrides protéines lipides produites par lithographie électronique. (A) Mesure de la hauteur du gabarit d'aluminium par AFM. (B) Ligne de balayage le long de l'image (A). Image de fluorescence d'une bicouche lipidique (en rouge) formée après retrait de l'aluminium. (D) Image de fibronectine correspondante (vert) [56].

La figure 1.12D représente le résultat obtenu : les structures hybrides protéines-lipides produites par lithographie électronique. Sur l'image, la fibronectine apparaît en vert, la bicouche lipidique est en noir à l'intérieur des motifs de protéines. Cette technique a une bonne résolution mais la dissolution de l'aluminium nécessite l'utilisation de produits chimiques qui peuvent être un problème à la bio-compatibilité avec certaines protéines.

Spatz et al. [57], quant à eux, proposent de nano-structurer une surface à l'aide de plots d'or déposés par voie chimique (figure 1.13).

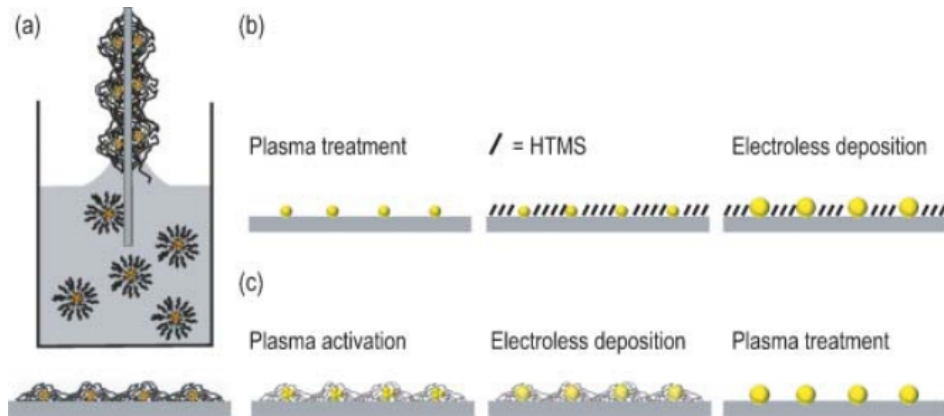


FIGURE 1.13.: *Technique de préparation d'une surface structurée avec des plots d'or* [57].

Cette technique permet d'obtenir des structures nanométriques. L'espacement entre les plots peut varier mais pas leur taille. La surface est structurée de plots d'or (figure 1.14) qui peuvent être fonctionnalisés avec de la fibronectine. Les fonctionnalisations possibles de l'or sont assez limitées. La présence de l'or peut perturber certaines techniques de microscopie optique utilisées pour observer les cellules telle que la microscopie par contraste d'interférence.

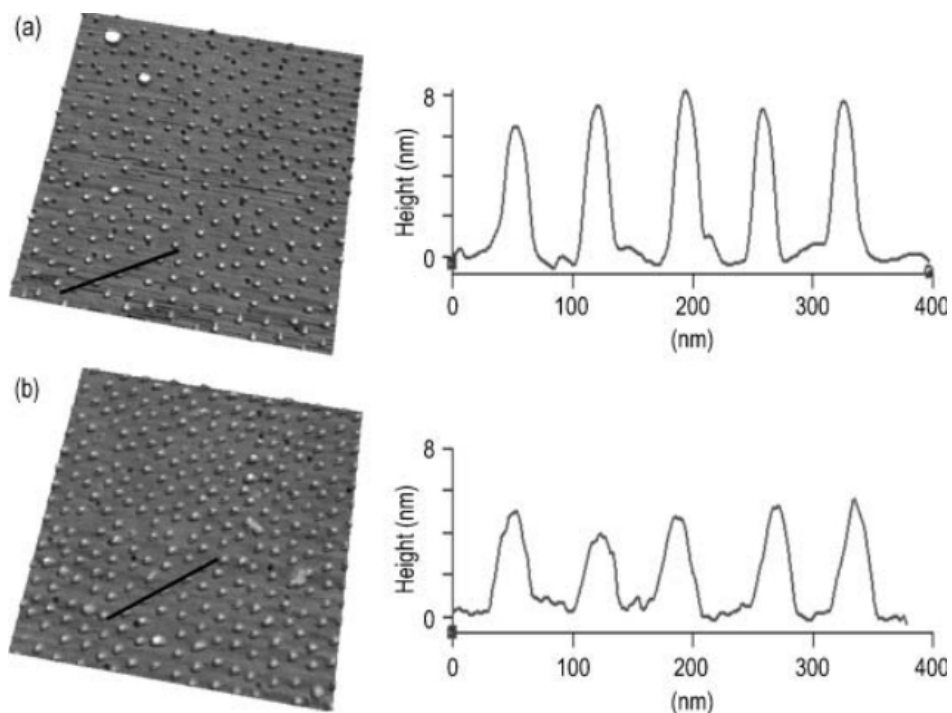


FIGURE 1.14.: *Image AFM de plots d'or sur une surface. A gauche, vues de la surface structurée par les plots d'or. A droite, profils en z des surfaces de gauche.* [57].

1.5. Les membranes d'alumine poreuses

Les membranes d'alumine poreuses ont été découvertes en 1953 [58]. L'aluminium peut servir d'anode pour le passage d'un courant électrique à travers un acide. Il a été montré que dans de bonnes conditions, le passage du courant va permettre l'oxydation anodique de l'aluminium en alumine et l'auto-organisation de la surface par des pores. Cette couche d'alumine une fois récupérée est appelée membrane d'alumine poreuse. Les membranes d'alumine poreuses comportent des pores très verticaux organisés sur de grandes surfaces (plusieurs cm^2). La taille des pores peut être comprise entre 10 nm et 200 nm selon les paramètres de préparation utilisés (voir la revue en [59]). Deux méthodes de préparation sont possibles : soit elles sont préparées sur un substrat massif d'aluminium puis détachées du substrat pour être utilisées. Soit elles sont préparées directement sur le substrat à partir d'une couche d'aluminium déposée directement sur la surface. Les membranes d'alumine poreuses ont été utilisées dans de nombreuses applications [60, 61, 62]. Leur faible coût, leur stabilité en température et leur faible vitesse d'attaque par la gravure ionique réactive en font un masque idéal pour la nanostructuration de surface. Leurs propriétés sont des objets d'études depuis les cinq dernières décennies. Nous les utilisons comme masque pour la structuration de surface et comme gabarit pour le dépôt de molécules. Pour l'utilisation comme masque, nous avons choisis l'anodisation d'un substrat massif d'aluminium. Nous expliquerons en détails les méthodes de préparations utilisées à la section 3.2.

1.6. La thèse

Le but de cette thèse est de préparer des surfaces bio-structurées suivant deux approches : par des bicouches lipidiques structurées et par des surfaces nanostructurées avec des protéines composant la matrice extra-cellulaire.

Comme nous avons vu précédemment, un grand choix de techniques est déjà à disposition pour structurer une surface. Le nombre de techniques bio-compatibles est déjà plus restreint. Nous voulons préparer une structuration de surface qui soit bio-compatible dans le but de pouvoir ensuite les utiliser pour tester l'adhésion cellulaire, ou des membranes cellulaires modèles. Nous proposerons donc une nouvelle voie pour la structuration de surface en utilisant une technique flexible plus légère à mettre en œuvre que celles présentées précédemment. Les principales contraintes auxquelles nous avons voulu répondre sont :

- utilisation d'une méthode parallèle pour une structuration à grande échelle (quelques mm)
- possibilité de changer l'espacement entre les motifs et la taille du motif
- bio-compatibilité
- faible coût de préparation

Le travail est effectué à deux échelles. A l'échelle nanométrique, nous utiliserons les propriétés d'auto-assemblage des membranes d'alumine poreuses pour fabriquer des gabarits à l'échelle nanométrique. A l'échelle micrométrique nous utiliserons la technique du micro-contact printing.

Cette thèse est partagée en six chapitre. Le chapitre 1 est le chapitre d'introduction. Le chapitre 2 est le chapitre « matériel et méthode » de la thèse. Ce chapitre est partagé en deux sections : une première section décrit les matériaux utilisés. Une seconde section décrit les méthodes de dépôt de molécules : le dépôt d'organo-silanes en phase vapeur ainsi que le dépôt de bicouches lipidiques avec une balance de Langmuir. Les méthodes d'observation sont ensuite décrites : la microscopie optique de fluorescence, microscopie par contraste d'interférence, la spectroscopie par corrélation de fluorescence, la microscopie électronique et la microscopie à force atomique.

Les deux chapitres suivants (chapitre 3 et chapitre 4) présentent les résultats.

Au chapitre 3, nous présenterons les membranes d'alumines poreuses, les tentatives pour en contrôler l'ouverture puis leur utilisation comme masque de gravure. Des surfaces structurées sont utilisées pour le dépôt de bicouches lipidiques dans le but de préparer un substrat mimant l'interaction cellule-cellule. Nous montrerons la préparation du substrat et les mesures de diffusion effectuées pour connaître les propriétés

1. Introduction

de la bicouche (ce travail est effectué en collaboration avec l'Institut Fresnel, CNRS, UMR 6133).

Au chapitre 4 nous utilisons les membranes d'alumine poreuses pour structurer une surface chimiquement grâce à l'évaporation d'organo-silanes. Les amino-silanes forment une couche d'accroche sur la surface, la fonction amine permet ensuite une bio-fonctionnalisation avec des protéines. Enfin, nous utilisons des substrats micro-structurés par la technique du microcontact printing, technique peut onéreuse et facile à mettre en oeuvre pour se familiariser avec la biochimie de l'adhésion de cellules immunitaires sur des substrats structurés (ce travail est effectué en collaboration avec le laboratoire Adhésion cellulaire et Inflammation, INSERM UMR 600 - CNRS UMR 6212).

Le chapitre 5 est la conclusion. Nous proposons d'abord une synthèse et une discussion sur le travail effectué durant la thèse, puis les perspectives.

.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel et produits chimiques utilisés

2.1.1. L'aluminium

Les membranes d'alumine poreuses sont préparées par électrochimie à partir de plaquettes d'aluminium pur à 99,999 % de 4 cm de diamètre et 0,5 mm d'épaisseur (*Goodfellow*, Allemagne).

2.1.2. Les substrats

Le substrat nano-structuré sera utilisé pour étudier l'adhésion cellulaire. Pour cela, un substrat transparent à la lumière est nécessaire pour l'observation au microscope optique en transmission. Le verre est un substrat très souvent utilisé parce qu'il est transparent et peu coûteux. Cependant la surface du verre n'est pas aussi bien définie à l'échelle atomique que le silicium monocristallin. La bonne connaissance du silicium pour les étapes de préparation de gabarits nous a conduit à commencer les essais sur ce type de substrat. La présence d'une couche d'oxyde de silicium sur la surface du silicium permet de garder la même chimie de surface que sur le verre. Nous utilisons des wafers de silicium orientés (100) dopé n *Siltronix* (France)

2.1.3. Les organo-silanes

Deux organo-silanes ont été utilisés : l'octadécyltrichlorosilane, OTS et l'aminopropyl-triéthoxysilane, APTES [63].

L'OTS ($C_{18}H_{37}Cl_3Si$) est un organo-silane qui peut être greffé par liaison covalente sur l'oxyde de silicium du substrat, après un traitement au plasma oxygène. Le plasma permet la formation de groupement silanols Si-OH qui permet la liaison avec l'OTS (figure 2.1). L'OTS est composé d'une chaîne carbonée (C_{18}) non saturée qui est inerte chimiquement. Il a été choisi pour deux raisons :

- il est facile de l'imager en AFM grâce à sa longue chaîne carbonée
- sa chaîne carbonée est inerte chimiquement

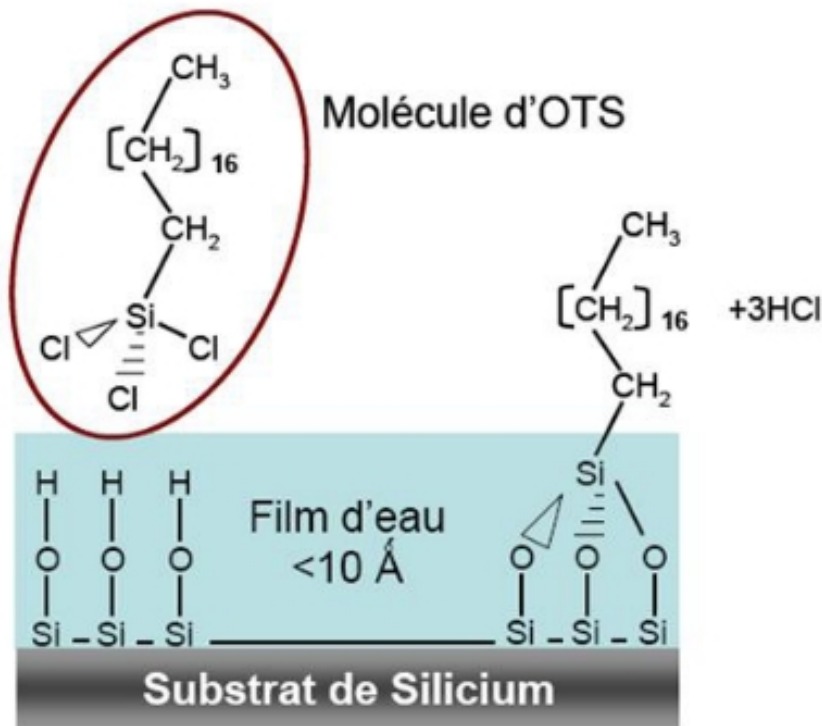


FIGURE 2.1.: La molécule d'OTS et la réaction de liaison entre l'OTS sur le silicium. [64].

L'APTES ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$) est un organo-amino-silane. Comme l'OTS, il peut être greffé sur SiO_2 grâce à sa fonction silane. Il possède un groupement amine (NH_2) qui peut faire une liaison peptide avec plusieurs types de molécules comme les protéines tout en la gardant fonctionnelle [65]. La liaison peptide est une liaison covalente entre la fonction amine d'une molécule et la fonction acide carboxylique (COOH) de la protéine (figure 2.2). Elle nécessite une activation par une autre molécule (EDC et NHS). La liaison obtenue est covalente et ne peut être rompue que par une enzyme, la peptidase. Pour éviter l'activation de la liaison, nous avons utilisé un peptide, le glutaraldéhyde. Cette molécule fait une liaison peptide avec l'APTES puis une liaison peptide avec la protéine. L'intérêt de la molécule d'APTES est qu'elle peut se lier en formant une liaison covalente avec le substrat et être bio-fonctionnalisée en même temps (figure 2.3).

Les deux molécules, OTS et APTES rendent la surface hydrophobe après dépôt.

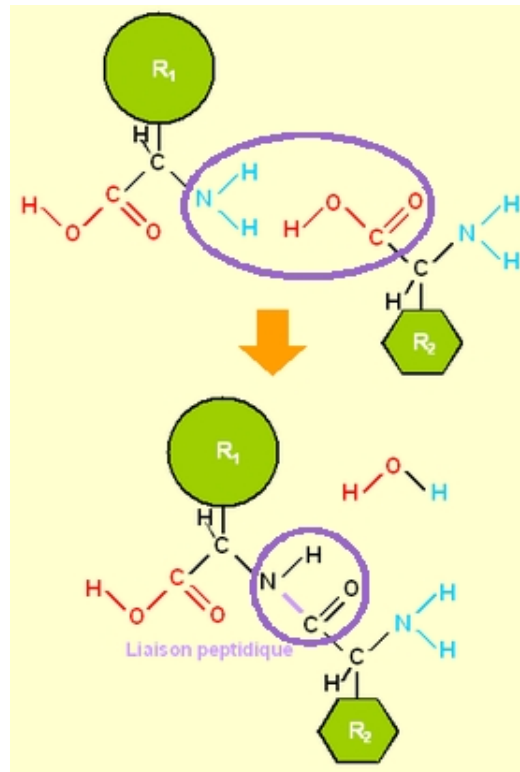


FIGURE 2.2.: La liaison peptide : la fonction NH_2 d'un acide aminé se greffe sur la fonction acide carboxylique $COOH$. Une liaison covalente se crée.

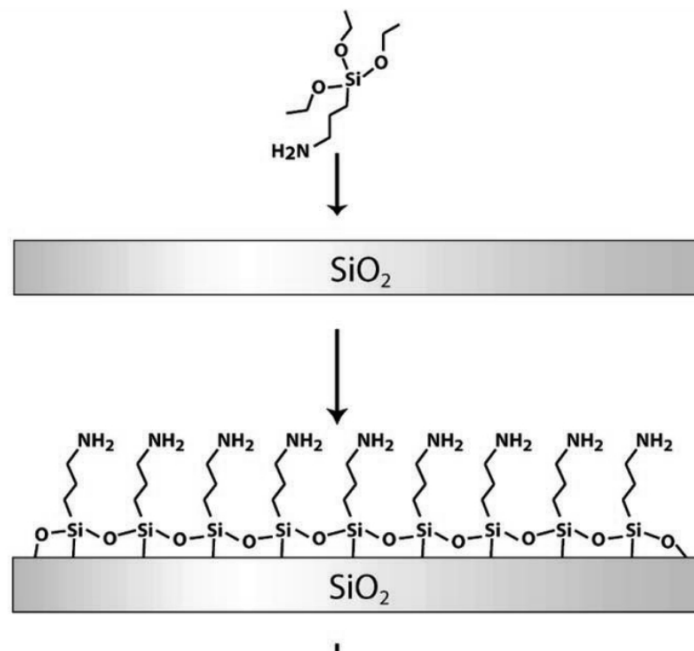


FIGURE 2.3.: Le dépôt d'APTES sur une surface de SiO_2 (verre) ou oxyde de surface d'un wafer en silicium.[56]

2.1.4. Les polymères

2.1.4.1. Le PMMA

Le polymère utilisé est du polyméthacrylate de méthyle (PMMA) en solution dans l'éthyl-lactate (figure 2.4). Un millilitre de solution est déposé sur la surface.

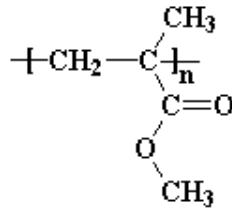


FIGURE 2.4.: *Formule chimique de la molécule de méthacrylate de méthyle. Elle est répétée n fois pour obtenir le polyméthacrylate de méthyle.*

Le réglage de l'accélération, de la vitesse de rotation et du temps permet une maîtrise de l'épaisseur du dépôt (tableau 2.1).

Épaisseur du dépôt	100 nm	200 nm	300 nm	400 nm
Concentration	2%	4%	4%	4%
Accélération	500	500	500	500
Vitesse (rpm)	2000	6000	4000	2000
Temps (s)	60	60	60	60

TABLE 2.1.: *Paramètres de dépôt nécessaires pour maîtriser l'épaisseur de la couche de PMMA déposée : données du fabricant.*

Pendant le recuit à la température de 160°C, une fois le solvant évaporé, les molécules polymérisent en formant une couche homogène à l'épaisseur voulue.

2.1.4.2. Le PDMS

Le polyméthysiloxane (PDMS) est un polymère de la famille des siloxanes. Ses propriétés font qu'il est utilisé comme matériau dans beaucoup d'applications notamment le micro-contact printing et la microfluidique. Le PDMS se présente sous forme de deux produits distincts : une base et un agent réticulant. La base est constituée d'un oligomère de PDMS (figure 2.5A). Le réticulant contient un catalyseur au platine et un oligomère (figure 2.5B). Le mélange des deux produits va provoquer une réaction de réticulation qui aboutira à l'obtention de PDMS solide (figure 2.5C). Cette réaction commence par l'hydrosilylation permet de former une liaison covalente entre les groupes hydrosilanes (Si-H) du polymère de l'agent de réticulation et les chaînes carbonées non saturées du

PDMS réaction catalysée par le catalyseur platine [66]. Cela conduit à la formation de ponts réticulés qui donnent au PDMS ses propriétés élastomériques. Le ratio entre la base et l'agent réticulant permet de modifier les propriétés du PDMS.

2.1.5. Les fluorophores organiques

2.1.5.1. Le principe de la fluorescence

Un photon incident d'énergie $E_{ex} = h\nu_{ex}$ est envoyé sur un chromophore. Ce photon est absorbé par un électron qui passe à un état excité puis cet électron revient dans son état fondamental en émettant un photon d'énergie $E_{em} = h\nu_{em}$, cependant, du fait de l'existence de phénomènes de conversions internes, il y a une perte d'énergie non radiative qui se traduit par $E_{em} < E_{ex}$ (figure 2.6). La longueur d'onde d'émission est donc supérieure à celle d'excitation. La microscopie de fluorescence tire profit de ce décalage pour sélectionner spécifiquement les photons émis par les fluorophores observés. Un filtre passe-bande permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation.

Les fluorophores ne peuvent effectuer qu'un certain nombre de cycles d'absorption/émission. Une fois ce nombre effectué, un photoblanchiment ou extinction de fluorescence apparaît. Cela est dû à des ruptures de liaisons covalentes par oxydation qui donnent un réarrangement dans la structure chimique du fluorophore. Ce processus est aléatoire et obéit à une décroissance exponentielle. Soit N_0 le nombre initial de fluorophores, le photoblanchiment obéit à l'équation [67] :

$$N(t) = N_0 \exp(kt) \quad (2.1)$$

avec t le temps (s) et k la constante de temps (s^{-1}). Le photoblanchiment est plus rapide lorsque l'illumination est élevée. Ce processus est utilisé dans des techniques de microscopie.

2.1.5.2. Les fluorophores utilisés

Il existe un grand nombre de fluorophores disponibles dont les propriétés varient. Les gammes de longueur d'onde permettent de couvrir tout le spectre. Nous avons utilisé deux marqueurs fluorescents : la fluorescéine isothiocyanate (FITC) qui appartient à la gamme des fluorescéines et du boron-dipyrrromethene (BODIPY)[68] (figure 2.7). Les molécules de FITC sont sensibles au photoblanchiment, ce qui permet de les utiliser dans des techniques basées sur le photoblanchiment telle que le retour de fluorescence après photoblanchiment ou bien le photoblanchiment continu. La gamme de longueur d'onde d'excitation est 475-515 nm et la gamme d'émission est 530-580 nm.

2. Matériel et méthodes

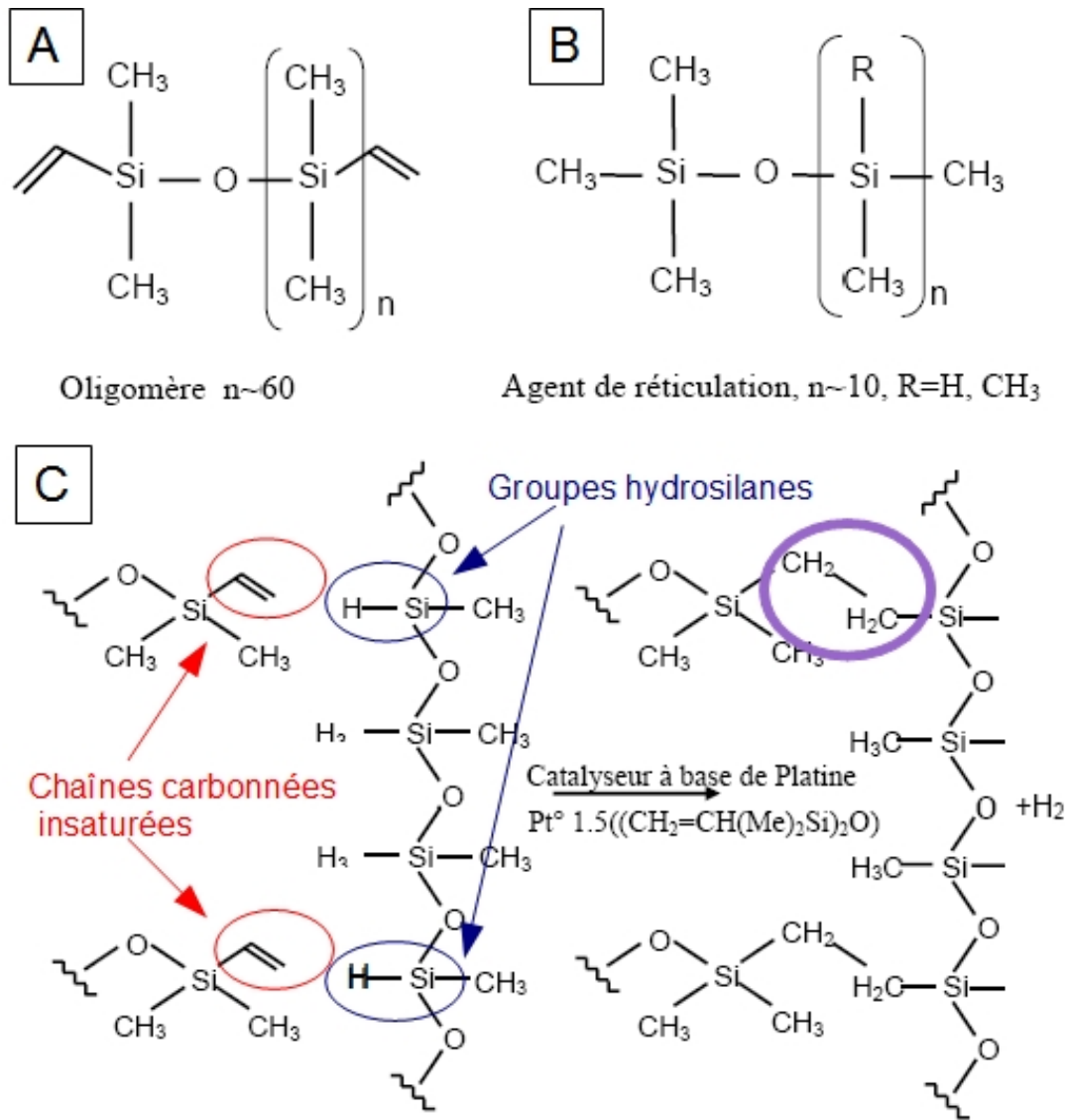


FIGURE 2.5.: Le PDMS de chez Sylgard®. En A, la formule chimique de l'oligomère composant la base.. En B, la formule chimique de l'oligomère composant l'agent réticulant. En C, la réaction de réticulation du PDMS. Les chaînes carbonées insaturées de la base vont faire une liaison covalente avec les groupes hydrosilanes de l'agent de réticulation sous l'action du catalyseur platine. Il y a formation des ponts réticulés qui .

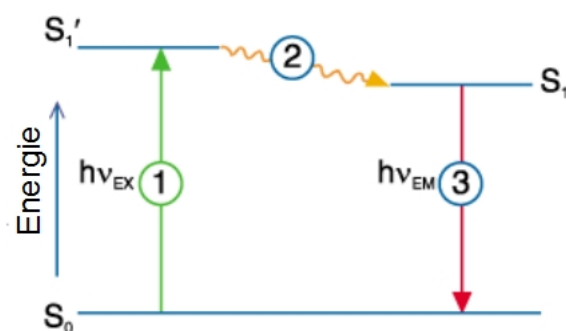


FIGURE 2.6.: Schéma montrant les transferts radiatifs ayant lieu lors de la fluorescence. S_0 , S'_1 , S_1 sont les états électroniques : initial-après excitation-après désexcitation radiative. Un photon incident fait passer l'état électronique initial (S_0) vers un état excité. A cause des transferts radiatifs, l'énergie de l'état excité diminue (S'_1). Le photon réémit lors de la désexcitation électronique a une énergie inférieure à celle du photon initial. Le décalage d'énergie entre les photons incidents et réémis permet l'observation en microscopie optique.

Au contraire, le BODIPY est une molécule qui photoblanchit peu, cette molécule est donc utilisée dans les techniques nécessitant une molécule stable telles que la spectroscopie par corrélation de fluorescence (figure 2.7b). Les fluorophores sont greffés sur des phospholipides. Ceux-ci sont ensuite mélangés aux phospholipides de la bicouche lipidique supportée.

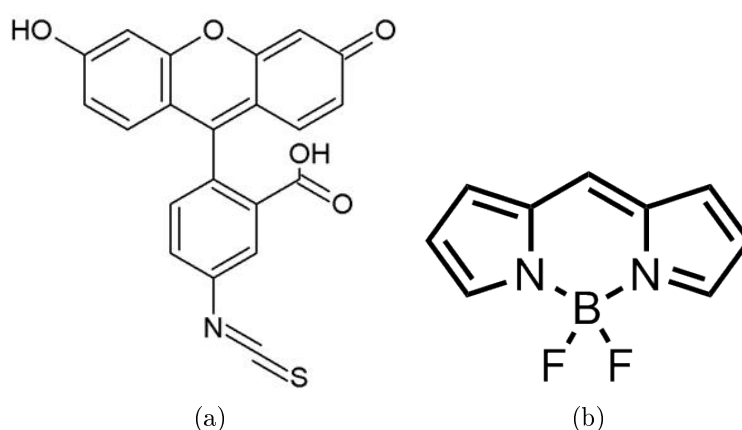


FIGURE 2.7.: Structures chimiques de deux fluorophores : (a) la molécule de fluorescéine isothiocyanate (FITC). (b) la molécule de boron-dipyrrrométhène (BODIPY) [69].

2.1.6. Les tensioactifs

Nous avons utilisé deux types de tensioactifs : de l'acide arichidique et des phospholipides. Les tensioactifs sont composés d'une tête hydrophile et d'une ou plusieurs chaînes hydrophobes.

L'acide arachidique a été utilisé comme modèle pour la calibration de la balance de Langmuir. Il est composé d'une tête hydrophile et d'une chaîne hydrophobe (figure 2.8).

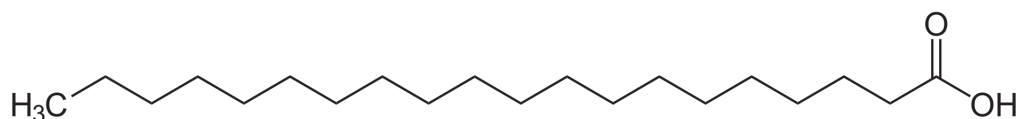


FIGURE 2.8.: *La structure chimique de l'acide arachidique : la tête hydrophile est composée de OH-C=O, une chaîne carbonée compose la partie hydrophobe.*

Les phospholipides sont nos molécules d'intérêt. Ils sont composés d'une tête polaire hydrophile et de deux chaînes carbonées hydrophobes (figure 2.15). Les phospholipides sont insolubles dans l'eau à cause de leurs chaînes carbonées mais solubles dans des solvants tels que le chloroforme ou l'éthanol. Deux phospholipides ont été utilisés : le DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) et du eggPC. Le eggPC est un mélange de phospholipides ayant pour tête polaire du phosphatidylcholine (PC) et des chaînes carbonées de longueurs variables. Le DOPC a pour tête polaire du phosphatidylcholine (figure 2.9).

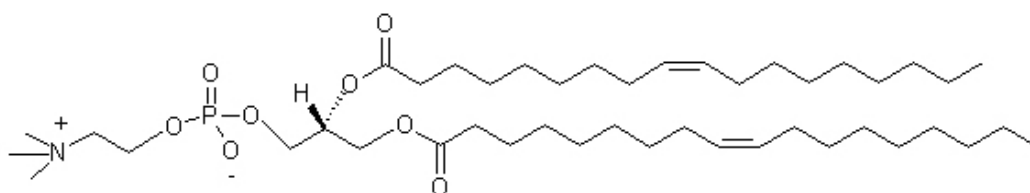


FIGURE 2.9.: *La structure chimique du DOPC. Il comporte une tête de phosphatidylcholine et deux chaînes carbonées.*

2.1.7. Les protéines

2.1.7.1. Les anticorps

Les anticorps sont des protéines qui sont capables de faire une liaison avec un antigène spécifique. Ce sont des éléments essentiels au fonctionnement du système immunitaire.

Structurellement, les anticorps sont des protéines formées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (H pour heavy) et deux chaînes légères (L pour light).

Les chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulphures. Les anticorps ont une forme qui ressemble à un Y. Les anticorps d'une même famille comportent une partie commune (en bleu sur la figure 2.10) et une partie spécifique appelée paratope. Cette partie permet de faire une liaison spécifique avec le site de reconnaissance de l'antigène, le péritope (en rouge). La formation du complexe antigène-anticorps est expliquée sur la figure 2.10.

Les anticorps peuvent être classés en deux catégories selon s'ils peuvent reconnaître un antigène ou plusieurs : dans le cas des anticorps monoclonaux, ils ne peuvent reconnaître qu'un seul épitope. Les anticorps pouvant reconnaître plusieurs épitopes sont polyclonaux.

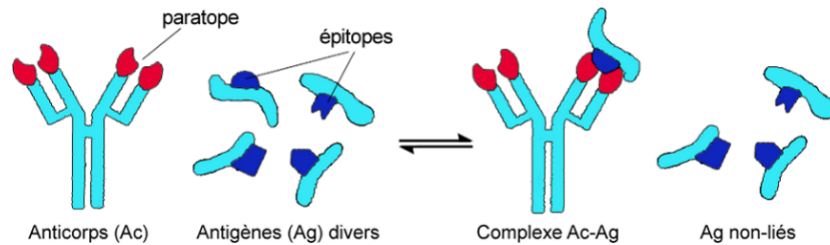


FIGURE 2.10.: *Formation d'un complexe anticorps-antigène [70]. L'anticorps est une molécule en forme de Y dont le paratope (en rouge) permet de faire une liaison spécifique avec une molécule de forme complémentaire présente sur l'antigène, l'épitope (bleu foncé). La formation d'un complexe anticorps-antigène n'est possible qu'entre un paratope et un épitope dont les structures chimiques sont parfaitement complémentaires.*

Les anticorps font partie de la famille des immunoglobulines (Ig). Ils sont séparés en classes ou isotopies qui dépendent de la structure des parties constantes des chaînes lourdes qu'ils comportent. Une des catégories comporte la famille des IgG. Des sous-classes existent pour les chaînes légères appelées kappa et lambda.

Une propriété intéressante des anticorps est qu'il est maintenant possible de produire artificiellement des anticorps qui peuvent se lier avec n'importe quelles protéines ou peptides donnés. Ici nous utilisons des anticorps contre des molécules d'adhésion cellulaire spécifiques qui jouent le rôle de ligands dans l'adhésion.

Les anticorps qui ont été utilisés sont :

- des anticorps monoclonaux de souris anti chaîne kappa -FITC. Ces anticorps ont un site de reconnaissance pouvant permettre de greffer des molécules d'adhésion sous forme d'anticorps comportant une chaîne kappa.
- des anticorps d'adhésion cellulaire anti CD 11. Ce sont des anticorps capables de reconnaître et de former une liaison spécifique avec le CD 11, présents sur la

2. Matériel et méthodes

surface cellulaire et impliqués dans l'adhésion de la cellule avec une surface.

- l'immunoglobuline G (IgG). Ce sont des anticorps passivant qui devraient permettre d'empêcher l'adhésion cellulaire de notre type de cellules d'intérêt.

2.1.7.2. La liaison avidine/streptavidine-biotine

La biotine a la propriété de faire une liaison forte avec l'avidine. Il est donc possible de faire des assemblages d'avidine-biotine. La biotine peut être greffée sur une autre molécule, par exemple de la BSA. La streptavidine peut faire le même type de liaison avec la biotine que l'avidine.

2.1.7.3. L'albumine de sérum bovin (BSA bovine serum albumine)

La BSA est habituellement utilisée pour empêcher l'adhésion cellulaire. C'est une molécule dont les avantages sont d'être peu onéreuse et facile à déposer par micro-contact printing. Nous avons utilisé de la BSA marquée avec une molécule fluorescente la fluorescéine ainsi que de la BSA marquée avec de la biotine.

2.1.8. Les cellules

Les cellules utilisées sont des lymphocytes T issus d'une lignée de cellules leucémiques, de la lignée Jurkat (J7720) [71]. Ce sont des cellules issues d'une lignée immortalisée établie en 1970 à partir de sang de leucémie, c'est à dire d'une lignée de cellules capables de se reproduire à l'infini. Les lymphocytes sont des cellules responsables de la réponse immunitaire dont les lymphocytes T sont une sous famille. Ces cellules sont des cellules sanguines. Comme nous l'avons expliqué au chapitre précédent, *in vivo*, elles vivent en milieu liquide. Elles ont donc la particularité d'adhérer sans produire de points d'adhésion focaux.

2.1.9. Les tampons

Le Tampon phosphate salin (PBS phosphate buffered saline) est une solution tampon dont le pH (7,4) et la molarité (150 mM) sont contrôlés pour être compatibles avec les molécules biologiques. Il est préparé à partir de pastilles vendues dans le commerce dissoutes dans de l'eau DI. Le PBS est utilisé pour le stockage et tous les rinçages de protéines

2.2. Les méthodes de nettoyage de substrats

2.2.1. Nettoyage chimique

Le substrat en silicium ou en verre est nettoyé chimiquement pour retirer les poussières de la surface. Il est soniqué 5 min dans l'acétone puis dans l'éthanol à 95 %. Enfin il est séché à l'azote.

2.2.2. Nettoyage au plasma oxygène

Ensuite, le substrat en silicium est nettoyé grâce à un plasma non directif généré par un système de gravure isotrope DSB-3 (Nanoplas, France). Cette machine produit un plasma "doux". Il comporte un générateur radio-fréquence (RF) de puissance 300 W et 13,54 MHz de fréquence. La machine est portée à une température de 160°C. L'oxygène est envoyé dans l'enceinte où le générateur RF permet de produire des radicaux d'oxygène : c'est à dire de casser la double liaison de O_2 pour obtenir deux radicaux d'atomes d'oxygène avec une liaison pendante qui les rend très réactifs. Les radicaux réagissent avec le carbone pour créer des molécules de CO et CO_2 qui vont ensuite être évacuées de l'enceinte sous forme gazeuse. Les radicaux réagissent aussi avec les atomes d'hydrogène présents dans les contaminants organiques en créant des molécules d'eau qui vont s'évaporer avec la chaleur. Le plasma doux permet donc de nettoyer les principaux contaminants organiques de la surface.

2.3. La gravure ionique réactive (RIE)

2.3.1. Principe de fonctionnement

Il existe plusieurs types de gravure :

- La gravure humide (chimique) est produite par immersion de l'échantillon dans un produit qui est choisi pour être sélectif du matériau constituant la surface : il attaque la surface tout en préservant le masque (résine photosensible par exemple). Normalement c'est une gravure isotrope c'est à dire que l'attaque chimique se fait à la même vitesse dans toutes les directions. Un inconvénient de cette méthode est l'attaque du matériau en dessous du masque de protection (figure 2.11) ce qui provoque un élargissement des motifs gravés.
- La gravure sèche (physique) est un bombardement de l'échantillon avec des ions énergétiques. La surface est érodée par les ions incidents. C'est une méthode très peu sélective : le masque et l'échantillon sont attaqués en même temps. Cette

2. Matériel et méthodes

méthode est anisotrope (figure 2.11) ce qui permet d'obtenir des bords verticaux. Cependant, les inconvénients sont : lenteur et non sélectivité des matériaux.

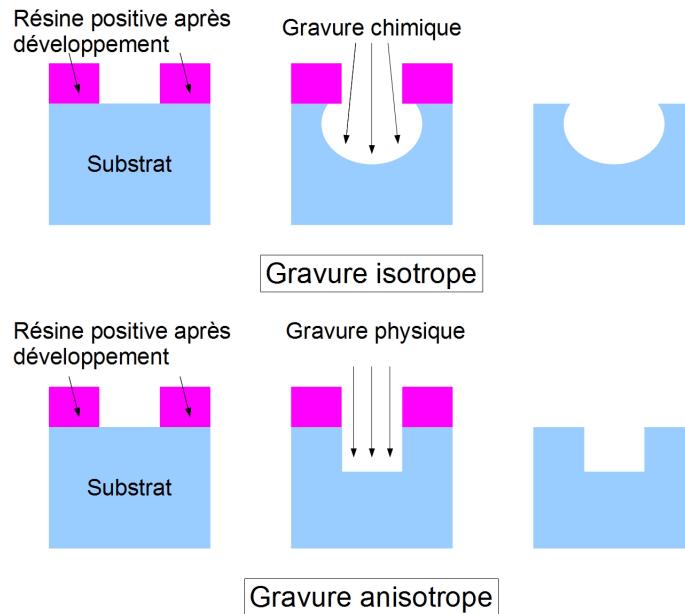


FIGURE 2.11.: Schéma de principe des gravures chimique et physique. La gravure chimique est isotrope, elle attaque le substrat avec la même vitesse dans toutes les directions ce qui induit un élargissement des motifs obtenus. La gravure physique est anisotrope donc attaque une direction préférentiellement mais il en résulte une lenteur dans la gravure.

- La gravure ionique réactive (RIE) permet d'allier les avantages des deux méthodes c'est à dire la vitesse, la sélectivité et l'anisotropie. C'est la combinaison d'une gravure chimique sous forme d'espèces réactives avec la surface et d'une gravure physique avec un bombardement d'ions.

L'échantillon est placé dans une enceinte sous vide dans laquelle est ensuite injecté un gaz réactif. Un générateur RF permet de créer un plasma par ionisation partielle du gaz. Le champ généré est alternatif est donc les électrons vont et viennent de haut en bas, en ionisant les atomes par collision. Les électrons ont une masse inférieure aux ions et se déplacent plus vite. Le plasma perd les électrons, ce qui permet la création d'un champ d'auto-polarisation. L'échantillon se trouve chargé négativement par rapport au plasma. Il se crée un champ d'auto-polarisation qui accélère les ions vers l'échantillon ce qui induit une gravure physique. Les ions réagissent avec les atomes de surface ce qui favorise la gravure en abaissant l'énergie de liaison des atomes de surface. Il faut jouer sur la pression et la puissance pour obtenir les vitesses de gravure optimales.

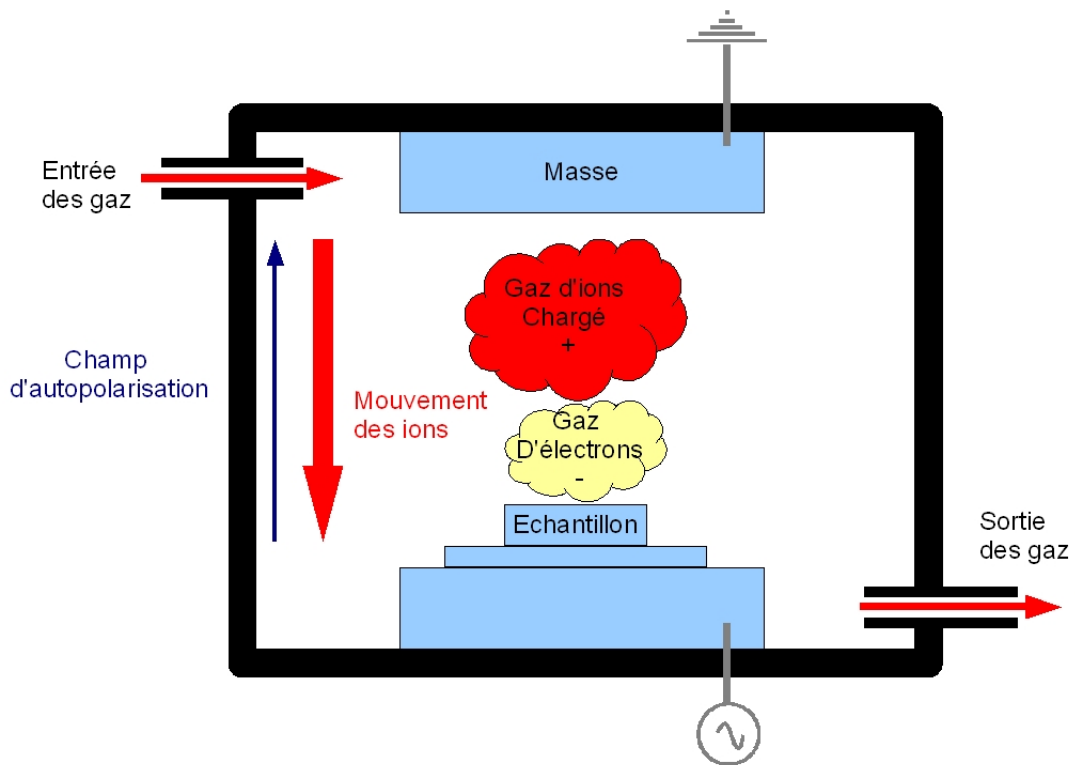


FIGURE 2.12.: Schéma de principe de la gravure ionique réactive (RIE). Le gaz est injecté dans la chambre sous vide. Un champ d'autopolarisation ionise le gaz et sépare les ions des électrons. Les radicaux formés sont accélérés vers la surface de l'échantillon ce qui crée une attaque physique par impact d'ions et chimique grâce aux radicaux réactifs.

2.3.2. Montage expérimental

Le plasma directif est généré par une machine conventionnelle MG-200. Un interféromètre laser permet de contrôler l'épaisseur de la gravure.

2.4. Les méthodes de dépôts

2.4.1. Le dépôt de polymères par spin-coating

Une tournette communément appelée “spincoateur” permet de déposer un liquide visqueux (par exemple un polymère en solution) de façon homogène sur une surface (figure 2.13). Le liquide est versé sur la surface en rotation, il s’étale sur celle-ci en produisant une couche homogène sur la surface.

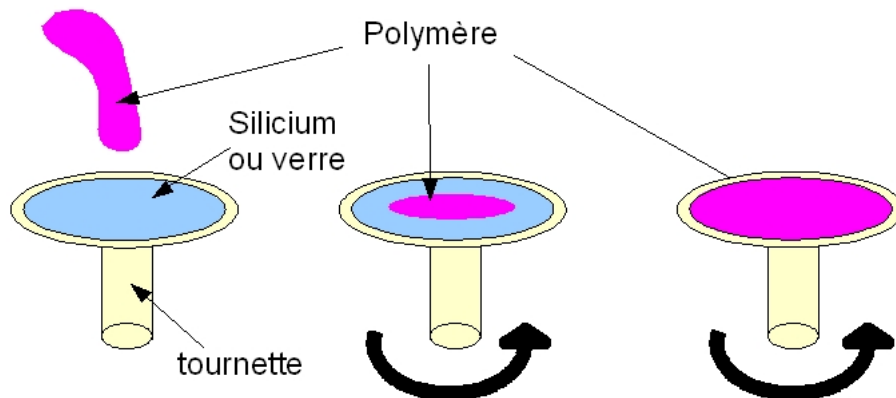


FIGURE 2.13.: *Le principe du spincoateur : un polymère est versé sur une surface rotative. Le polymère s’étale en créant une surface uniforme d’épaisseur contrôlée.*

2.4.2. Évaporation d’organo-amino-silanes

Les organo-silanes (OTS et APTES) peuvent être déposés en phase liquide (la surface est incubée avec la solution) ou en phase vapeur [72, 73]. Nous avons choisis la phase vapeur car les dépôts sont de meilleure qualité [74, 75, 76] et cela permet d’utiliser une faible quantité de produit. Afin de déposer les organo-silanes, nous utilisons un montage comprenant un dessiccateur en verre, une pompe primaire et une plaque chauffante (figure 2.14). La pompe primaire permet de faire le vide dans l’enceinte du dessiccateur. Une coupelle contenant l’organo-silane en large excès est placée au centre de l’enceinte. Lorsque le vide est fait, l’organo-silane passe en phase vapeur et remplit le dessiccateur, les molécules se déposent alors sur le substrat. La plaque chauffante permet de maintenir une température constante lors du dépôt.

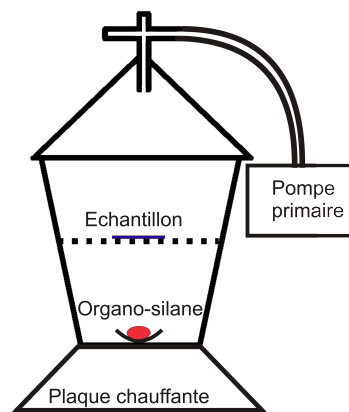


FIGURE 2.14.: Montage permettant le dépôt d'organo-silanes en phase vapeur. Un desiccateur en verre est placé sur une plaque chauffante. Une coupelle contenant l'organo-silane est posée au fond, l'échantillon est placé au milieu sur une plaque percée. Une pompe primaire permet de faire le vide.

2.4.3. Méthode de formation des bicouches lipidiques

2.4.3.1. Propriétés physiques des tensio-actifs

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles c'est à dire comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe (figure 2.15). Déposés sur une surface hydrophile, de l'eau par exemple, les tensioactifs vont s'auto-assembler : les têtes polaires vont se mettre au contact de l'eau alors que les chaînes carbonées se retrouveront en contact avec l'air (figure 2.15). L'assemblage inverse se produit s'ils sont en contact avec une surface hydrophobe : les chaînes carbonées se trouveront en contact avec la surface. Ces propriétés vont être la base de la préparation d'une monocouche de Langmuir par la méthode de Langmuir-Blodgett.

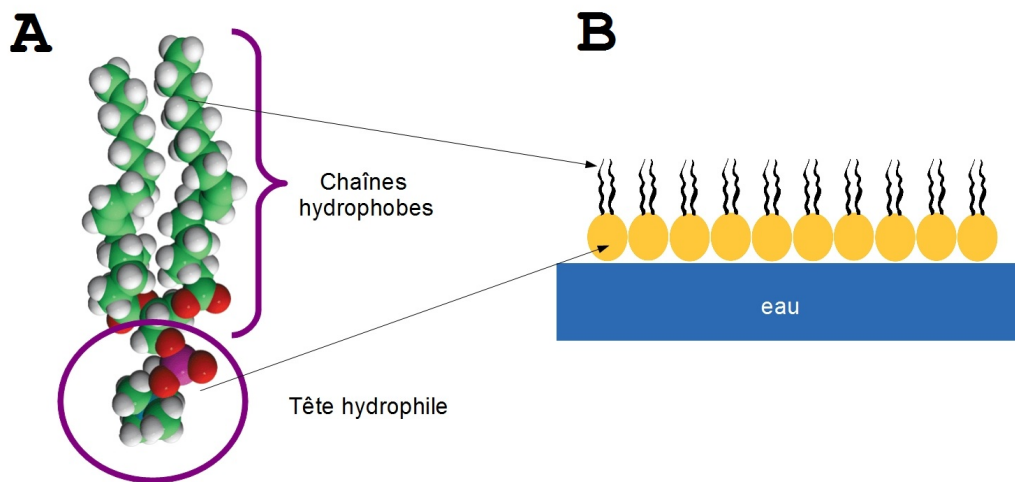


FIGURE 2.15.: *Un exemple de tensioactif : un phospholipide (le DOPC). A : structure chimique du DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, image de avanti polar lipid). Un phospholipide est composé d'une tête hydrophile et de deux chaînes hydrophobes. B : l'auto-organisation d'un phospholipide au contact de l'eau, la tête hydrophile se met en contact avec l'eau et les chaînes hydrophobes en contact avec l'air.*

En général on distingue trois phases lors de la formation de ce type de monocouches à l'interface air/eau :

- la phase gazeuse
- la phase liquide
- la phase solide

Ces phases sont assimilées aux phases d'un fluide à deux dimensions (figure 2.16). L'aire moléculaire permet de rendre compte de l'état de la molécule. Comme le nombre total

de molécules reste inchangé durant la compression, il est possible de calculer l'aire moléculaire en divisant la surface totale occupée par le film par le nombre total de molécules déposées.

La phase gazeuse : les molécules sont éloignées les unes des autres, les chaînes hydrophobes sont désorganisées, les molécules sont indépendantes. Les chaînes se trouvent couchées sur la surface de l'eau, l'aire moléculaire est maximale. Il n'y a donc aucune interaction entre les molécules.

La phase liquide : les molécules sont en interaction les unes avec les autres tout en restant désordonnées. Lors de la phase liquide expansée, les molécules conservent un fort degré de liberté. La monocouche devient cohérente. Les chaînes carbonées sont dans une configuration gauche et se redressent sur la surface de l'eau au fur et à mesure de la compression. On dit que les molécules sont en phase fluide.

Lorsque les molécules passent en phase liquide expansée puis solide cela se traduit par une meilleure organisation des chaînes sur la surface. Le film monomoléculaire va subir une forte cohésion moléculaire.

La phase solide : les molécules sont très ordonnées sur la surface. Les chaînes hydrophobes se redressent sur la surface de l'eau et sont en interaction de type Wan der Walls.

2.4.3.2. Préparation des bicouches par la méthode de Langmuir-Blogett et Langmuir-Shaeffer (LB/LS)

Il existe plusieurs méthodes permettant d'obtenir des bicouches lipidiques : comme par exemple la technique de fusion de vésicules [26] et le transfert de type Langmuir-Blodgett [78, 79, 80]. La technique de fusion de vésicules consiste à préparer des liposomes unilamellaires de petite taille (~ 25 nm de diamètre), c'est à dire des sphères composées d'une bicouche phospholipidique [81, 82]. Elles vont fusionner sur la surface traitée. Une des conditions nécessaires à la formation d'un liposome est la forme de la molécule amphiphile, tous les lipides ne le permettent pas [83]. En outre, certaines conditions sont nécessaires pour obtenir une fusion des vésicules. Il peut être nécessaire d'ajouter du calcium pour permettre la formation d'une bicouche [84]. Le traitement de surface et la nature du substrat sont aussi des conditions qui permettent d'obtenir ou non une bicouche [85]. Les désavantages de cette méthode sont l'impossibilité de contrôler la densité de lipides présents sur la surface, il peut donc se produire des multicouches. Cette méthode ne permet pas non plus de préparer des bicouches composées de phospholipides différents sur les deux couches.

La méthode de Langmuir-Blodgett (LB)/Langmuir-Schaeffer (LS) nécessite l'utilisation d'une balance de Langmuir (Nima, Royaume-Uni) (figure 2.17) [86]. Elle permet

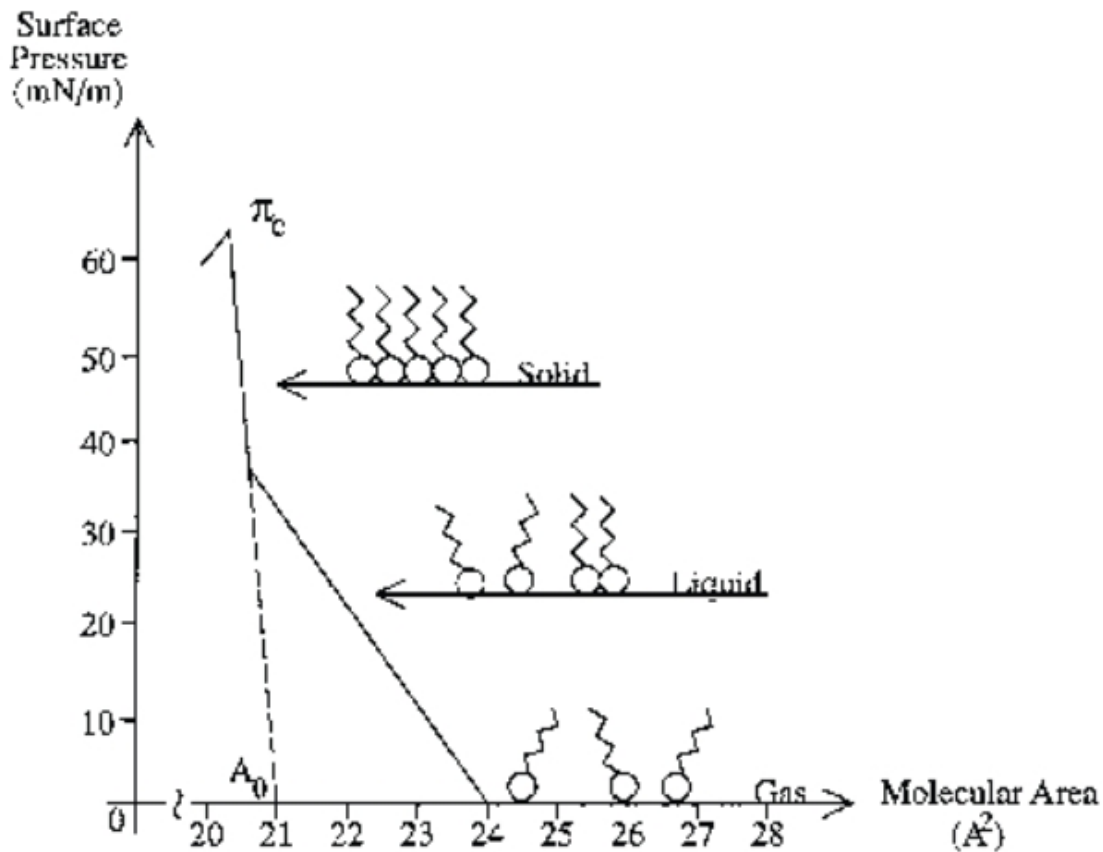


FIGURE 2.16.: Courbe montrant la variation de l'aire moléculaire des lipides lors de la compression. Le schéma montre l'auto-organisation des lipides sur la surface lors de la compression. Au départ, les lipides sont en phase gazeuse, les chaînes sont désordonnées et indépendantes. L'aire moléculaire du lipide est grande. La courbe de compression est une droite. Lors de la transition de phase, une rupture se produit sur la courbe. Les lipides passent en phase liquide et commencent à interagir les uns avec les autres. Enfin, ils passent en phase solide, les chaînes hydrophobes sont parfaitement organisées, l'aire moléculaire est minimum. [77].

un très bon contrôle des paramètres du dépôt comme la pression de dépôt et le nombre de molécules déposées. Elle permet aussi de faire des bicouches avec des molécules différentes sur chaque couche, ainsi que des monocouches sur des surfaces hydrophobes [79].

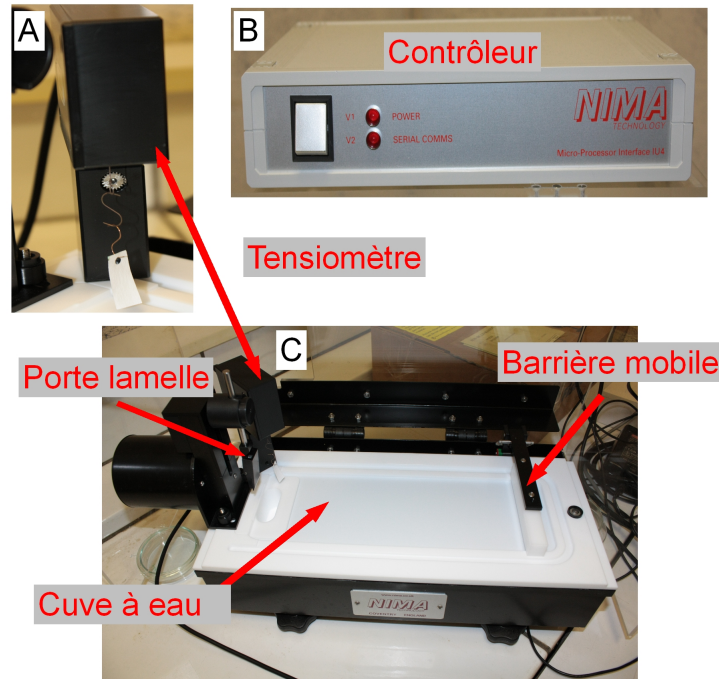


FIGURE 2.17.: *La balance de Langmuir. En (A), la balance de Wilhemy (tensiomètre). Elle permet la mesure de la tension de surface. En (B), le contrôleur numérique qui est contrôlé par l'ordinateur. En (C), la cuve à eau avec la barrière mobile et le porte lamelle. Les tensio-actifs sont déposés sur la surface de l'eau, ils s'auto-organisent en une monocouche. La barrière permet de contrôler l'aire occupée par une molécule et donc la phase dans laquelle les lipides se trouvent. Lors du dépôt, elle se ferme pour maintenir la pression de surface constante. Le porte lamelle permet de faire remonter la lamelle avec une vitesse contrôlée.*

Le montage se compose (figure 2.17) d'une cuve que l'on remplit d'eau sur laquelle les lipides sont déposés. Une barrière mobile permet la compression des lipides. Un tensiomètre ou balance de Wilhemy permet de mesurer la tension superficielle de l'eau. Un morceau de papier filtre rectangulaire est en partie immergée dans l'eau (figure 2.18).

Il permet de mesurer la tension de surface (ST). La somme des forces est : le poids du papier-la poussée d'archimède+tension de surface. L'équation 2.2 donne la somme des forces avec ρ_{eau} densité de l'eau, ρ_{papier} densité du papier, ϑ angle de contact, L =longueur du papier l =largeur, e =épaisseur, p =profondeur d'immersion, g =constante de gravitation

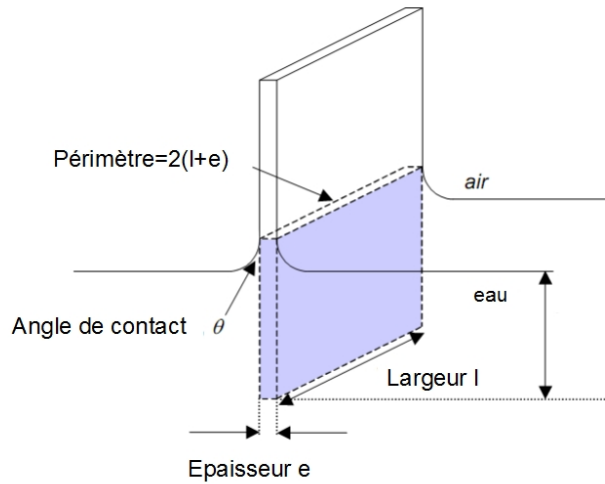


FIGURE 2.18.: Un rectangle de papier filtre est suspendu à l'interface air/eau. Ses dimensions sont L =longueur, l =largeur, e =épaisseur. Il est immergé à une profondeur p . Le ménisque d'eau fait un angle ϑ avec le papier. Il permet de mesurer la tension de surface.

$$F = (\rho_{\text{papier}} L l e)g - (\rho_{\text{eau}} p l e)g + 2(l+e)(ST)\cos\theta \quad (2.2)$$

Au temps initial, la mesure est amenée à 0, cela permet d'éliminer le poids. La poussée d'archimède est négligée car le papier reste à une hauteur constante durant l'expérience.

$$F = 2(l+e)(ST)\cos\theta \quad (2.3)$$

L'angle de contact est considéré comme nul ($\vartheta=0$). L'équation finale est donc :

$$F = 2(l+e)(ST) \quad (2.4)$$

La tension de surface est donc :

$$ST = \frac{F}{2(l+e)} \quad (2.5)$$

Traitement de surface

La propreté de la balance et des lamelles sont des conditions essentielles pour un dépôt de bonne qualité. Les lamelles sont traitées avec un tensio-actif. Elles sont nettoyées à plusieurs reprises puis parfaitement rincées à l'eau DI (voir Appendice B).

Une dizaine de rinçages successifs sont nécessaires pour obtenir une surface parfaitement propre. La balance est nettoyée au chloroforme puis rincée à l'eau une dizaine de fois. Un isotherme de l'eau est effectué, il doit être parfaitement plat au court du temps. La moindre poussière restante, peut induire une irrégularité sur la bicouche ou pire, empêche les phospholipides de se déposer correctement. En effet, les impuretés présentes dans le volume d'eau en faible quantité vont aller se déposer à l'interface air/eau. Le passage des quelques impuretés d'un volume à une surface va augmenter la concentration relative impuretés/molécule d'intérêt.

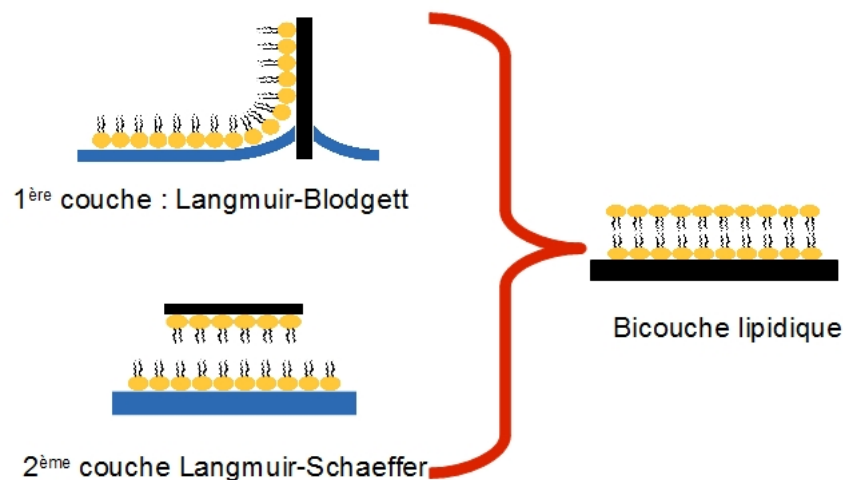


FIGURE 2.19.: Préparation de bicouche lipidique par la méthode de Langmuir. La première couche est préparée par la méthode de Langmuir-Blodgett : les lipides sont organisés sur la surface de l'eau en une monocouche, les lipides passent sur la lamelle de verre au fur et à mesure qu'elle remonte. La deuxième couche est déposée par la méthode de Langmuir-Schaeffer : la lamelle comportant une monocouche est re-déposée sur la surface d'eau de façon à ce que les chaînes hydrophobes se retrouvent en contacts. La lamelle est enfoncée dans l'eau puis la bicouche peut être récupérée.

Préparation de la première couche avec la méthode de Langmuir-Blodgett (LB)

La méthode de Langmuir-Blodgett permet d'obtenir une monocouche monomoléculaire insoluble. Initialement, les lipides sont en solution dans du chloroforme. La solution est déposée à la surface de l'eau. Au moment du dépôt, le solvant s'évapore, les molécules s'étalent à la surface de l'eau à cause de la tension de surface. Puis elles s'auto-organisent sur la surface : la partie hydrophile au contact de l'eau et la partie hydrophobe au contact de l'air. La monocouche peut alors être assimilée à un gaz en deux dimension : les lipides sont éloignés les uns des autres, les chaînes hydrophobes sont

désorganisées, les molécules sont indépendantes. La lamelle est plongée dans l'eau. Une barrière mobile comprime les lipides. Ils passent alors de la phase gazeuse à la phase liquide puis solide si ils en ont une. Les chaînes carbonées sont parfaitement ordonnées. La lamelle est remontée avec une vitesse constante et les lipides passent de la surface de l'eau à celle de la lamelle. La pression de surface diminuant, la barrière se ferme au fur et à mesure du dépôt pour maintenir la pression constante. Le taux de recouvrement doit être de 1 pour une monocouche de qualité. La température a aussi une influence, la variation de température peut aussi changer la phase des lipides.

Préparation de la deuxième couche avec la méthode de Langmuir-Schaeffer (LS)

La deuxième couche se prépare avec une méthode différente (figure 2.19), il s'agit de la méthode de Langmuir-Schaeffer. Les lipides sont comprimés à l'état fluide. La lamelle est déposée sur la surface de l'eau avec les chaînes carbonées dirigées vers la surface de l'eau. Une pression est effectuée et les chaînes fusionnent. La bicouche est immergée dans l'eau. Un porte échantillon permet de récupérer la lamelle tout en maintenant en milieu liquide. En effet, les monocouches peuvent être conservées à l'air mais pas les bicouches.

Une fine couche d'eau (~ 1 nm) se trouve entre la bicouche et la surface (figure 2.20) [27, 28, 29]. Elle permet aux lipides composants la bicouche de diffuser sur la surface. Les caractéristiques de la diffusion peuvent être mesurées à l'aide de différentes techniques qui seront présentées dans la section suivante.

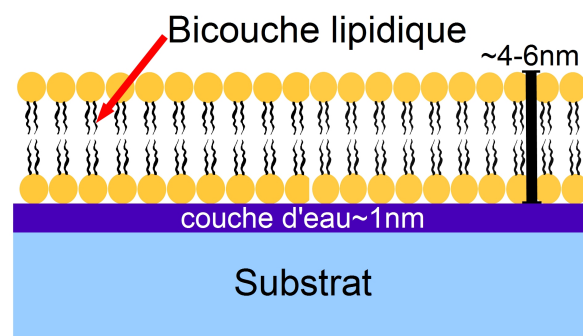


FIGURE 2.20.: Schéma d'une bicouche lipidique supportée. L'épaisseur de la bicouche est de 4 à 6 nm. Une couche d'eau donne aux phospholipides des propriétés de diffusion latérale. Le schéma n'est pas à l'échelle.

2.4.4. Le micro-contact printing de protéines

2.4.4.1. Préparation des timbres pour le microcontact printing

Le micro-contact printing est une technique de lithographie douce. Cette technique consiste à mouler un élastomère, le polydiméthilsiloxane (PDMS) dans un moule en silicium où des motifs sont gravés par lithographie ultraviolet (UV) [51]. Nous nous intéressons dans cette thèse au dépôt de protéines [87].

Nous allons expliquer la façon de préparer le moule en silicium nécessaire au moulage des timbres [50]. Celui-ci est préparé par photolithographie, une technique qui consiste à utiliser de la lumière pour imprimer l'image d'un masque dans un matériau photosensible.

Le masque

Un masque en chrome a été utilisé : les motifs désirés sont dessinés en chrome. Les parties chromées sont opaques au UV alors que le reste du masque est transparent. Lorsque la lumière est envoyée à travers le masque, seule une partie est transmise selon le motif présent.

Nettoyage et spincoating

Un wafer en silicium de 4 pouces est nettoyé par le plasma doux nanoplast. Il est ensuite enduit de la résine photosensible par spin-coating pour assurer une répartition uniforme de résine sur toute la surface puis recuit pour éliminer les résidus de solvant.

Insolation de la résine

Il existe deux types de résines : positive et négative ce sont des polymères qui sous l'influence de la lumière UV vont soit réticuler (négative) soit être dégradés (positive). Nous ne parlerons ici que du cas de la résine positive.

Le substrat en silicium est recouvert d'une résine positive (figure 2.21). Le masque, sur lequel sont dessinés les motifs, permet d'insoler seulement certaines parties choisies du substrat et donc d'altérer la résine en respectant les motifs désirés.

Révélation

Une fois la résine insolée, le wafer est plongé dans un solvant. Les parties de la résine soumises à l'insolation sont dissoutes alors que celles qui étaient protégées par le masque restent intactes. Le substrat en silicium est partiellement recouvert par de résine structurée selon les motifs du masque (figure 2.22).

2. Matériel et méthodes

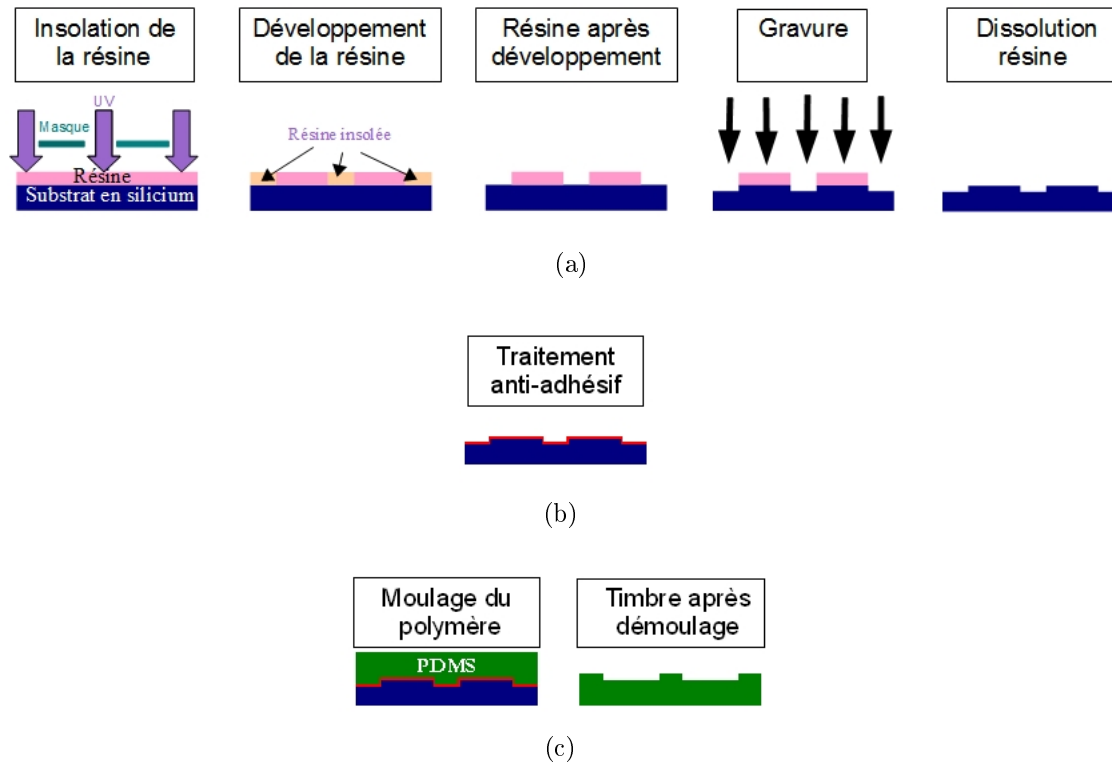


FIGURE 2.21.: *En a) : les étapes de fabrication du moule en silicium. La résine est déposée par spincoating sur la surface de silicium puis insolée à travers un masque. Les parties insolées sont retirées au moment du développement. La surface de silicium est donc recouverte de résine selon le motif inverse de celui du masque. Les parties protégées resteront intactes au moment de la gravure alors que les parties à nu seront gravées. Après retrait complet de la résine, le silicium composant le moule est structuré topographiquement avec les motifs voulus. En b) : un traitement anti-adhésif est nécessaire, une couche de molécule est déposée pour permettre le démoulage du polymère. En c) : le PDMS est versé dans le moule. C'est un liquide visqueux, il prend donc la forme des motifs présents. La réticulation le fait durcir, il peut alors être démoulé.*

La gravure ionique réactive

La résine est alors utilisée comme masque de gravure : les parties protégées par la résine restent intactes alors que le substrat à nu est attaqué. L'échantillon est soumis à une érosion ionique (RIE) qui va graver le silicium non protégé. Le reste de résine est alors dissout ce qui permet d'obtenir un moule avec des motifs gravés.

Traitement anti-adhésif

Une étape de traitement anti-adhésif est absolument nécessaire (figure 2.21b). Elle consiste à appliquer une couche de molécules, par exemple de l'OTS, qui permettront le démoulage du PDMS. Sans cette étape, des liaisons sont faites entre le silicium et le

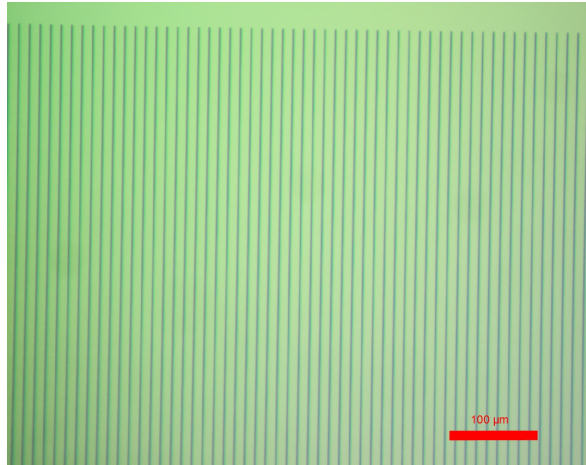


FIGURE 2.22.: *Image en microscopie optique de la résine photosensible déposée sur le silicium après révélation. Les lignes foncées sont les lignes de résine. Barre d'échelle 100 μm .*

PDMS rendant le démoulage impossible. Le PDMS ne fait pas de réactions chimiques avec l'OTS ce qui permet un démoulage du timbre.

Moulage du timbre

La préparation du PDMS se fait en mélangeant une base avec un agent réticulant (sous-section 2.1.4). Le mélange obtenu est visqueux, il peut alors être versé dans le moule en silicium (figure 2.21c). Il est dégazé sous vide pour éviter que des bulles d'air ne se forme dans le polymères. Dès que l'agent réticulant est en contact avec la base, la réaction de réticulation à lieu. La vitesse de la réaction dépend de la température : à température ambiante elle dure une journée. Nous avons choisi de la faire 5h à 80°C. Le polymère durcit en moulant la forme des motifs présents. Il est ensuite retiré, ce qui permet l'obtention d'un timbre en PDMS qui sert de « tampon encreur » pour le micro-contact printing.

2.4.4.2. Le micro-contact printing

La figure 2.23 montre les étapes du dépôt de protéines par micro-contact printing. Le timbre est encré avec une solution d'intérêt le temps nécessaire pour que les protéines se déposent sur la surface du PDMS. Une étape de séchage est nécessaire : les molécules utilisées doivent pouvoir supporter cette étape de séchage. Le timbre est mis en contact avec la surface à imprimer puis retiré. La surface se trouve alors structurée par les protéines.

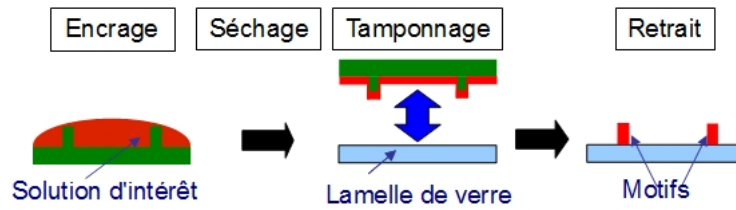


FIGURE 2.23.: Les étapes du micro-contact printing. Le timbre en PDMS est encré avec une solution d'intérêt, par exemple des protéines. Une étape de séchage est effectuée. Le timbre est mis en contact avec la surface à imprimer. Les molécules sont transférées sur la surface selon les motifs présents sur le timbre. Après retrait, des motifs de molécules sont sur la surface.

2.5. Les méthodes de caractérisation

2.5.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

2.5.1.1. Principe de fonctionnement

Le microscope électronique à balayage (MEB) utilise des électrons pour observer une surface. Un faisceau d'électrons balaye la surface à analyser, les électrons interagissent avec la matière et des particules sont réémises. L'analyse par différents détecteurs de ces particules permet d'obtenir des informations sur l'échantillon. Le MEB comporte des détecteurs permettant la détection des :

- électrons secondaires
- électrons rétrodiffusés
- photons X

Les échantillons ayant été observés grâce aux électrons secondaires, nous détaillerons uniquement cette technique. Un faisceau d'électrons est envoyé sur la surface à observer. Les électrons entrent en interaction avec les atomes de surface, plus précisément, le choc entre les électrons du faisceau et les électrons peu liés de la bande de valence de la surface, crée un transfert d'énergie qui ionise les électrons de surface. Les électrons réémis par l'atome sont des électrons secondaires. Ils sont de faible énergie et comme ils proviennent des couches de surface, ils sont très sensibles aux variations de la surface, ce qui permet de connaître avec précision la topographie de surface. Ils sont accélérés par une différence de potentiel puis récoltés par un détecteur qui les amplifie et permet d'obtenir une image de la topographie de surface d'une très grande précision avec un bon rapport signal sur bruit.

Le MEB utilisé est un modèle 6320F (Jeol) (figure 2.24) muni d'un canon à effet de champ à cathode froide. La gamme des tensions d'accélération possible est comprise entre 1 kV et 30 kV. Les échantillons étant isolants, nous avons choisis une tension d'accélération assez basse de 3 kV pour minimiser les problèmes de charge de l'échantillon.



FIGURE 2.24.: Photo du microscope électronique à balayage (modèle 6320F, Jeol) du CINaM.

2.5.1.2. Préparation d'échantillons

Les échantillons sont collés sur un porte échantillon en laiton, grâce à un film de carbone collant double face (Agar). L'alumine étant un matériau isolant, elle est rendue conductrice au cours d'une étape de métallisation : une fine couche d'or de 1,5 nm est déposée sur l'échantillon en utilisant un métalliseur par pulvérisation cathodique (Jeol). Les étapes de préparation (collage et métallisation) pour une observation au MEB modifient légèrement l'échantillon et le rendent non utilisable pour d'autres expériences.

2.5.2. Microscope à force atomique (AFM)

Inventé par Binnig et al. [88] en 1986, le microscope à force atomique (AFM *Atomic Force Microscopy*) est un microscope à sonde locale [89, 90].

2.5.2.1. Principe physique

La figure 2.25 représente un schéma du principe de fonctionnement de l'AFM à l'air. Une pointe fine en silicium se trouve accrochée sur un levier souple (cantilever). La pointe se déplace en balayant la surface de l'échantillon, elle est en interaction avec la

2. Matériel et méthodes

surface. Lors de son déplacement la pointe va monter et descendre selon la topographie de la surface en faisant monter et descendre le levier. Un laser est réfléchi sur la levier et envoyé vers une diode à quatre quadrants. Le laser va traduire le déplacement du levier en se déplaçant sur la diode. Une traitement informatique des données permet d'obtenir la topographie de la surface.

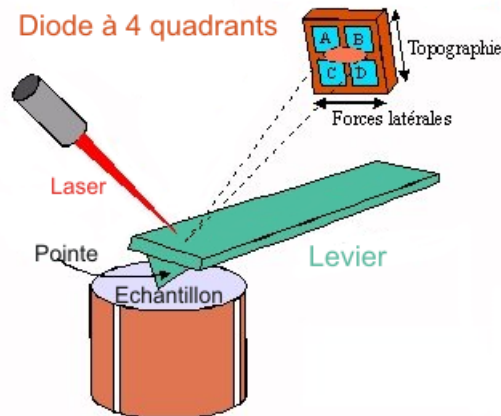


FIGURE 2.25.: Schéma décrivant le principe de fonctionnement de l'AFM à l'air. La pointe est accrochée sur le levier, un laser est réfléchi sur celui-ci au niveau de la pointe et envoyé au centre d'une photo-diode à 4 quadrants. Lorsque la pointe est déviée, le signal se déplace sur la diode.

Il existe plusieurs modes de fonctionnement. Dans le cas d'un AFM à l'air, les modes principaux sont le mode contact et le mode intermittent (tapping).

Le mode contact

Le mode contact est le plus simple à mettre en oeuvre. Il utilise les forces d'interaction à très faible distance entre une pointe fine et l'échantillon (figure 2.26). Les atomes de la pointe et ceux de la surface de l'échantillon sont soumis à des forces attractives de type Van Der Waals. Il en résulte une force d'attraction : la pointe est attirée vers la surface. Lorsqu'elle arrive très près de celle-ci, les forces de répulsions électrostatiques entrent en jeu et la pointe est repoussée. La pointe se déplace à la surface de l'échantillon, elle est portée par un levier très flexible qui joue le rôle d'un ressort. Ce sont les déformations du levier qui sont mesurées par un laser projeté sur la face supérieure de celui-ci et réfléchi sur une photo-diode à 4 quadrants. Initialement, le faisceau laser est réglé pour être positionné au centre des quadrants. Lorsque les forces d'interactions entre la pointe et la surface varient, un déplacement vertical et latéral de la pointe du levier est observé. Ces variations vont induire un déplacement du spot lumineux sur la diode. La déviation verticale du laser permet d'obtenir des informations sur la topographie de la surface. La déviation latérale du laser correspond aux forces de friction de la pointe sur

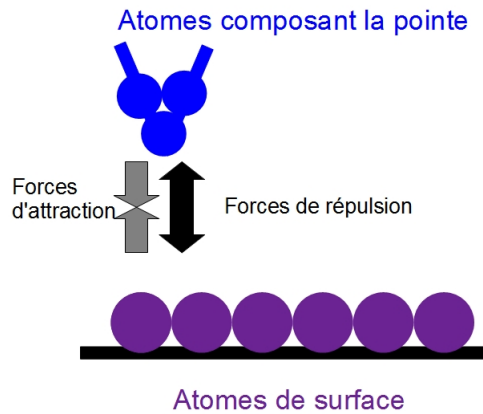


FIGURE 2.26.: Schéma de l'interaction entre les molécules composant le bout de la pointe de l'AFM et celle de la surface. Les molécules sont soumises à des forces d'attractions jusqu'au moment où les forces de répulsions prennent le dessus.

la surface et permet de connaître la différence de nature chimique de la surface. Comme la pointe se déplace très près de la surface (au niveau du mur répulsif de la surface) et “appuie” sur celle-ci cela peut entraîner la dégradation plus ou moins rapide de la pointe et/ou de l'échantillon. Lorsque la surface est très dure, la pointe s'use. Avec des échantillons “mous” de type biologiques la pointe peut être polluée par des molécules présentes sur la surface qui s'accrochent sur la pointe et perturbent l'observation. La pointe peut aussi dégrader la surface de l'échantillon en le modifiant.

Après un essai en mode contact, nous avons vu que ce mode abîmait notre échantillon et que la pointe était très vite polluée par les molécules d'organo-silanes. Nous l'avons définitivement abandonné au profit du mode intermittent.

Mode intermittent (tapping)

Le mode tapping [91, 92] permet d'observer plus aisément les échantillons biologiques [93, 94] et permet une plus grande longévité des pointes.

Le levier est mis en vibration à sa fréquence propre de résonance avec une certaine amplitude d'oscillation (figure 2.27).

Le levier vibre près du mur répulsif de la surface et viens l'effleurer brièvement : la fréquence de résonance est alors décalée par le gradient de force d'interaction ce qui fait diminuer l'amplitude. C'est la brièveté du contact qui permet de préserver l'échantillon plus facilement qu'en mode contact. L'amplitude est maintenue constante par une boucle de rétro-contrôle.

2. Matériel et méthodes

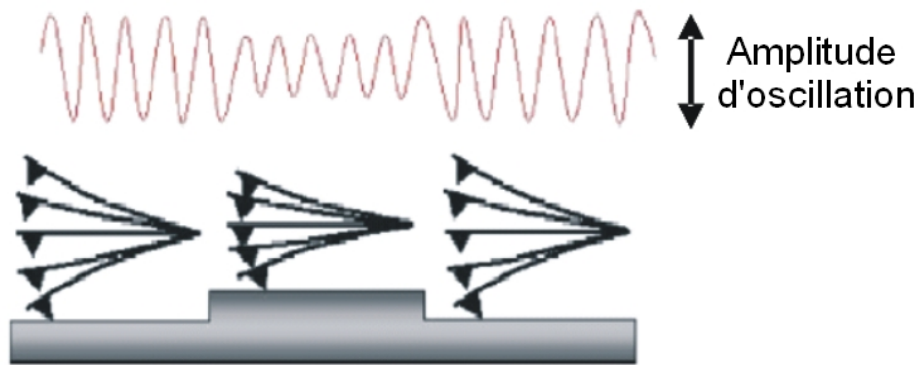


FIGURE 2.27.: Représentation schématique d'une pointe AFM, lors de son fonctionnement en mode tapping [95]. La pointe oscille à sa fréquence de résonance. Lorsqu'elle rencontre une marche, l'amplitude d'oscillation diminue puis redevient « normale » après la marche.

2.5.2.2. Montage

L'AFM utilisé est un Nanoscope III (Veeco/Digital instrument) (figure 2.28). Les images sont faites à l'air en utilisant le mode intermittent. Les leviers utilisés sont en silicium de la série : *NCS-35 Ultra Sharp*.



FIGURE 2.28.: L'AFM utilisé est un AFM à l'air de type nanoscope III.

Le tableau 2.2 récapitule les spécifications des leviers utilisés c'est à dire, la longueur, largeur, épaisseur, fréquence de résonance et la constante de force. L'échantillon est coupé avec une pointe diamantée, puis collé sur le porte échantillon magnétique.

2.5.2.3. Observation des échantillons et traitement des images

Lors de l'observation de chaque échantillon, nous avons analysé des zones différentes de la surfaces pour en vérifier l'homogénéité. Nous avons observé trois zones ou plus de chaque échantillon.

Levier	A			B			C		
Longueur (μm)	110 \pm 5			90 \pm 5			130 \pm 5		
Largeur (μm)	35 \pm 3			35 \pm 3			35 \pm 3		
Epaisseur (μm)	2,0 \pm 0,3			2,0 \pm 0,3			2,0 \pm 0,3		
Fréquence de résonance kHz	165	210	240	240	315	405	120	150	190
Constante de force (N/m)	3,5	7,5	12,5	6,5	14,0	27,5	2,5	4,5	8,5

TABLE 2.2.: Spécifications des leviers de la série NSC-35. Données du fabricant.

Les images sont traitées et analysées avec le logiciel libre WSxM [96]. Chaque image a été moyennée pour soustraire la déviation angulaire de l'échantillon.

Des mesures de rugosité sont effectuées sur les substrats non structurés partir du calcul de la rms (root mean square). Il s'agit du calcul de la taille quadratique moyenne des aspérités. Cette valeur apporte une information quantitative sur la rugosité du substrat.

2.5.3. Microscopie par contraste d'interférence (Reflection Interference Contrast Microscopy RICM)

2.5.3.1. Le principe

Lorsqu'un objet posé sur une lame de verre est éclairé par une lumière incohérente, une partie de la lumière est transmise et une partie est réfléchiée. Sur la figure 2.29, I_0 représente l'intensité initiale du rayon de lumière, I_1 est l'intensité réfléchiée par la lame de verre.

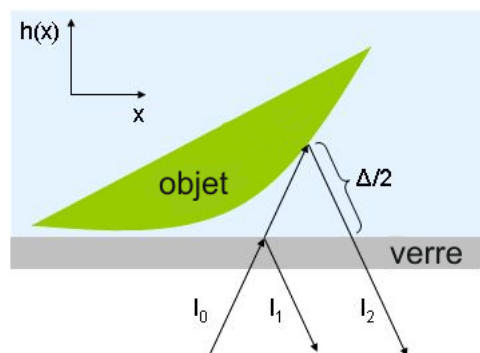


FIGURE 2.29.: Principe de RICM. La lumière est envoyée sur l'objet avec une intensité initiale I_0 , une partie est réfléchiée (I_1) et l'autre transmise puis réfléchi par l'objet (I_2). Il est alors possible d'obtenir des interférences entre I_1 et I_2 .

2. Matériel et méthodes

$$I_1 = r_{01}^2 I_0 \quad (2.6)$$

avec $r_{ij} = \frac{n_i - n_j}{n_i + n_j}$ ($i, j = 0, 1, 2$; $i < j$) les coefficients de réflexion, i et j sont le numéro de la réflexion et I_1 est l'intensité de la lumière réfléchiée par l'objet. Une partie du rayon incident traverse la lame de verre, est réfléchiée par l'objet puis retransverse le verre et émerge avec une intensité I_2 .

$$I_2 = r_{12}^2 (I_0 - I_1) = r_{12}^2 (I_0 - r_{01}^2 I_0) \quad (2.7)$$

$$I_2 = (1 - r_{01}^2) r_{12}^2 I_0 \quad (2.8)$$

I_1 et I_2 peuvent alors produire des franges d'interférences d'intensité :

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos[2kh(x, y) + \Phi] \quad (2.9)$$

avec $k = \frac{2\pi n_1}{\lambda}$ et $h(x, y)$ la hauteur entre l'échantillon et la lamelle de verre. Les valeurs de r_{10} et r_{12} sont très faibles, un montage est nécessaire pour les exploiter.

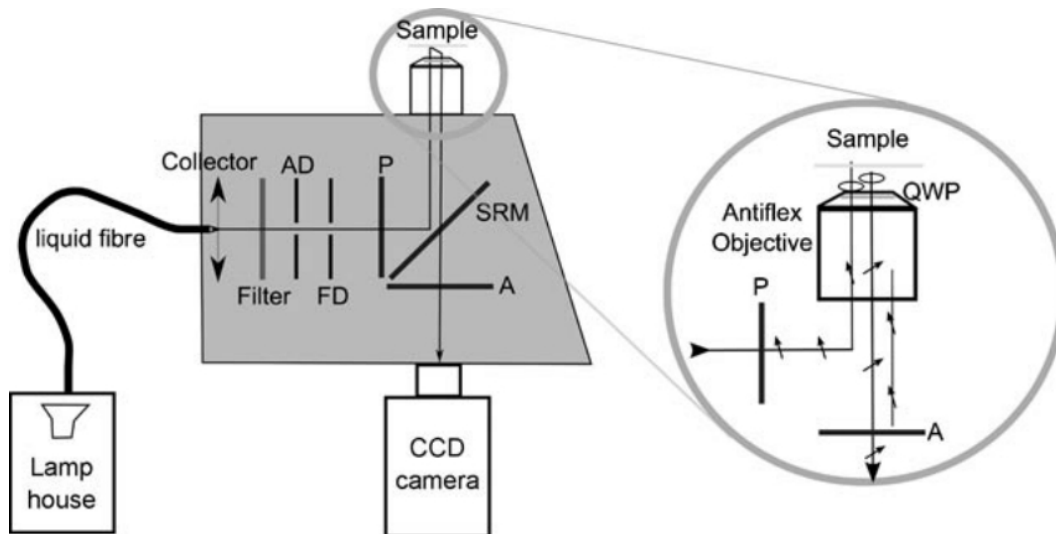


FIGURE 2.30.: Montage expérimental pour un microscope en RICM. AD : diaphragme d'ouverture, FD : diaphragme de champ, QWP : lamelle quart d'onde, SRM : miroir semi-réfléchissant, P : polariseur, A : analyseur. Dans le cercle : la méthode antiflex qui utilise la polarisation de la lumière pour augmenter le contraste. [97]

Issue de la technique d'IRM (interference reflection microscopy) introduite par Curtis en 1964 [98] qui permettait d'observer les cellules, le RICM a été utilisé pour la première fois par Sackmann et al. en 1980 pour observer de la matière molle et réaliser des mesures quantitatives. Cette technique permet l'observation en milieu liquide

de polymères, membranes lipidiques, vésicules unilamellaire géantes, billes micrométriques et cellules animales. Elle donne des informations sur la distance entre l'objet et la surface.

Le microscope utilisé est le même que pour la fluorescence (microscope inversé Zeiss). Une lampe à mercure est située dans une unité séparée du microscope pour éviter que la température ne perturbe l'échantillon en le chauffant. La lumière est envoyée sur l'échantillon grâce à une fibre optique. Le montage inclut un collecteur à l'entrée de la fibre, un filtre d'interférence protégé par un filtre anti-chaueur. Deux diaphragmes ajustables permettent d'obtenir une illumination de Köhler : le diaphragme d'ouverture et le diaphragme de champ. Le cube réflecteur est composé d'un polariseur, d'un miroir semi-réfléchissant (SRM) et d'un analyseur croisé (A). L'objectif antiflex (x63) est utilisé. Sans ce système, il serait difficile de récupérer les interférences car celles-ci sont très faibles en contraste. Un polariseur permet de polariser la lumière de l'éclairage. Une lamelle quart d'onde crée une polarisation circulaire, un anneau d'observation est là pour récupérer le signal polarisé (figure 2.30 zoom).

La figure 2.31 montre l'observation en RICM de quelques échantillons classiques :

- A : une bille de polystyrène de 10 μm de diamètre.
- B : une goutte de taille millimétrique.
- C : des vésicules phospholipidiques géantes adhérents partiellement au substrat, les zone d'adhésion sont signalées par une flèche.
- D : adhésion d'une cellule de type monocyte

L'observation se caractérise par une image comportant des zones sombres et claires qui permettent de savoir quelles parties sont en contact avec la substrat. Dans le cas qui nous intéresse, c'est-à-dire l'adhésion de cellules, la partie noire est bien adhérente et la partie claire n'adhère pas.

2.5.3.2. Les montages

Les bicouches lipidiques sont observées avec un microscope inversé Zeiss (figure 2.32). Il est équipé d'une lampe HAL 100 pour l'observation en transmission et d'une lampe X-Cite 120XL FL pour l'excitation en fluorescence. Un filtre permet l'observation du FITC et du BODIPY. Les observations sont faites grâce à plusieurs objectifs :

- un objectif à immersion à huile $\times 63$ antiflex Zeiss d'ouverture numérique 1,25. Il permet l'observation classique, en fluorescence et aussi en Reflection Interference Microscopy (sous-section 2.5.3).

2. Matériel et méthodes

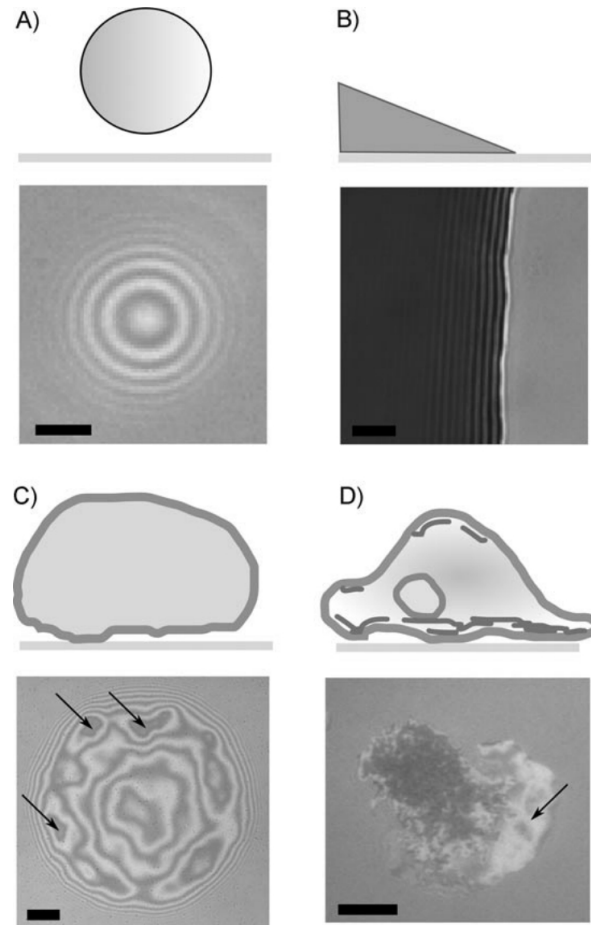
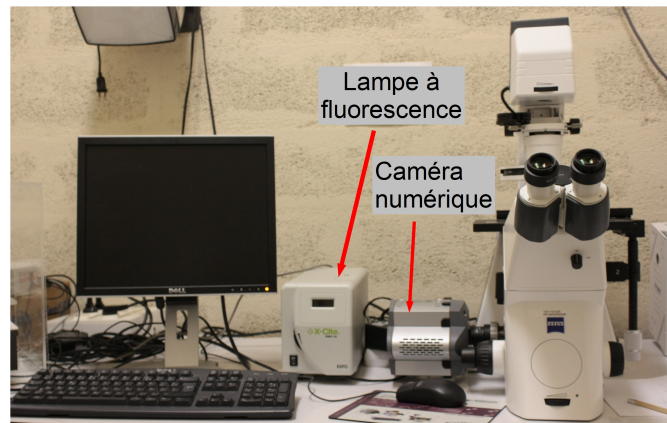


FIGURE 2.31.: *Exemples de quelques échantillons observés en RICM. A) Une bille de polystyrène ($10\mu\text{m}$ de diamètre) déposée sur un substrat, échelle $2\mu\text{m}$. B) B : une goutte de taille millimétrique contenant de l'actine, échelle $5\mu\text{m}$. C) des vésicules phospholipidiques géantes adhérant partiellement au substrat, les zone d'adhésion sont signalés par une flèche, échelle $5\mu\text{m}$. D) adhésion d'un monocyte, échelle $5\mu\text{m}$ [97]. Lors de l'observation d'objet uniforme (A et B) l'image donne des franges d'interférences en bord de zone. Les images sont en niveau de gris. Lors de l'adhésion de cellules ou vésicules, la partie en contact avec la surface apparaît en noir, alors que les parties qui ne sont pas en contact sont en niveau de gris selon leur éloignement du substrat.*

- un objectif $\times 10$ à l'air.

Une caméra EM-CCD (Andor) est disposée dans le plan conjugué du plan focal de l'objet.

Les cellules sont observées à partir du montage utilisé par nos collaborateurs. Le microscope est similaire au notre (voir sous-sous-section 2.5.3.2) (microscope inversé Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss, Allemagne). Seule la caméra est différente. Il s'agit d'une caméra trois couleurs C7780 pilotée par le logiciel Wasabi (Hamamatsu, Tokyo,

FIGURE 2.32.: *Le microscope optique de fluorescence.*

Japon).

2.5.4. Mesures de diffusion

2.5.4.1. Les techniques de mesure de la fluidité d'une bicouche lipidique

Il existe plusieurs techniques possibles pour mesurer la fluidité d'une bicouche :

- Le suivi de particule unique [99] (SPT, Single Particle Tracking). Cette méthode consiste à accrocher une particule, de l'ordre de grandeur de la centaine de nanomètres, sur un phospholipide marqué de la bicouche (figure 2.33). Cette particule est ensuite suivie en microscopie optique. L'analyse de la trajectoire de la particule permet de connaître la trajectoire du phospholipide sur lequel elle est accrochée. Le calcul du mouvement quadratique moyen à partir de la trajectoire de la molécule permet de connaître la constante de diffusion de la surface.
- Retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP, Fluorescence Recovery After Photobleaching) [100, 101]. Des phospholipides de la bicouche sont marqués avec des fluorophores. Une zone de la bicouche est photoblanchie grâce à un laser (figure 2.34a), les fluorophores de la zone sont alors éteints. Lorsque la bicouche est fluide, les phospholipides diffusent sur la surface en permanence : les fluorophores photoblanchis et non photoblanchis se mélangent. Dans la zone initialement photoblanchie, un retour de la fluorescence est observé. La vitesse du retour de la fluorescence permet de déduire la constante de diffusion (figure 2.34b).
- Photoblanchiment continu [102, 103] (CP, Continuous Photobleaching). Le principe est très similaire à celui du FRAP. C'est une méthode simple à mettre

2. Matériel et méthodes

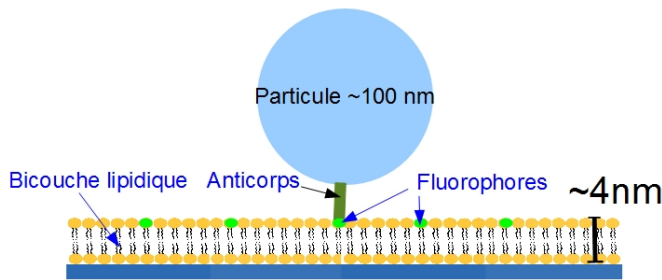


FIGURE 2.33.: *Le suivi de particule unique. Une particule est accrochée sur un lipide marqué grâce, par exemple à un anticorps. La particule suit le mouvement du phospholipide sur lequel elle est accrochée.*

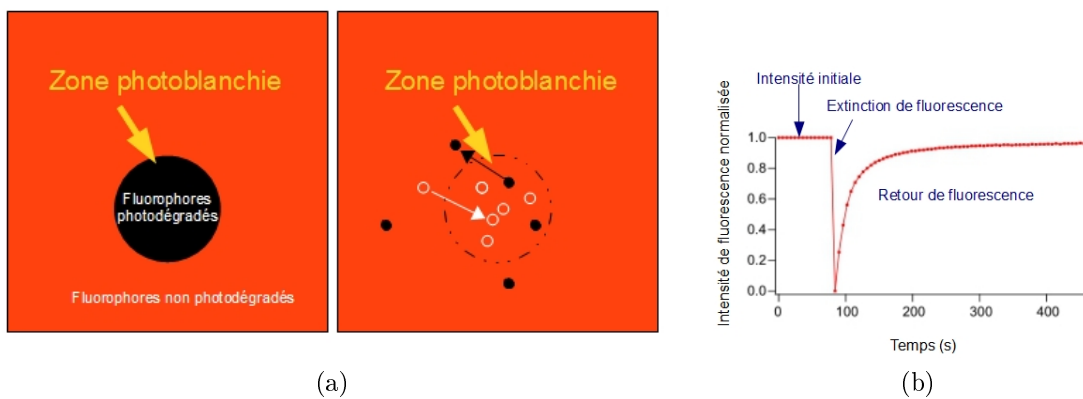


FIGURE 2.34.: *Le principe du FRAP. En a) : la fluorescence est éteinte sur une zone grâce à un faisceau laser. La fluorescence revient grâce à la diffusion des molécules sur la surface. En b) : la courbe d'intensité de fluorescence en fonction du temps. Avant le photoblanchiment, l'intensité est maximum, elle est ensuite éteinte. La tangente de la courbe de retour permet de remonter à la constante de diffusion.*

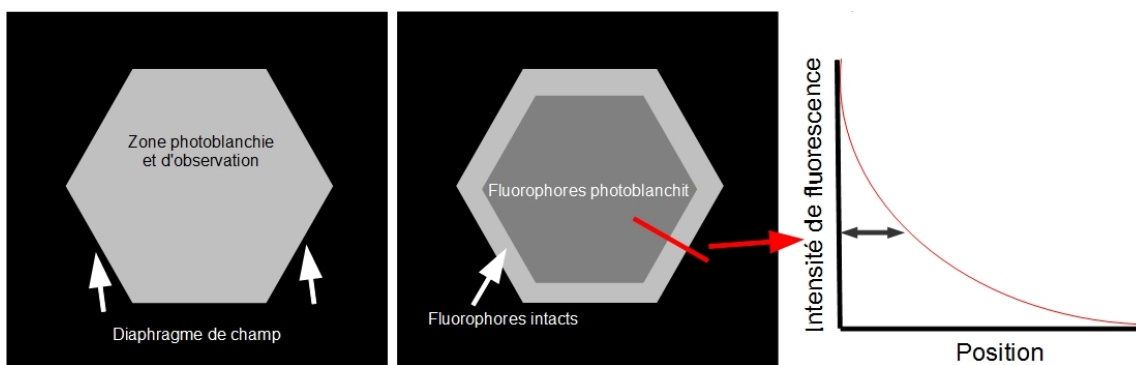


FIGURE 2.35.: *Le principe du photoblanchiment continu. Une zone limitée par le diaphragme de champ est photodégradée et observée en permanence. Une zone claire composée de lipides non dégradés apparaît en bord de diaphragme. L'intensité en fonction de la position est une exponentielle décroissante. Elle permet de déduire la constante de diffusion des lipides.*

en oeuvre avec un microscope optique car elle utilise une lampe de microscope classique pour photoblanchir les fluorophores au lieu d'un laser. Une zone de la bicouche limitée par le diaphragme est observée et photoblanchie en même temps de façon continue (figure 2.35). Les phospholipides entrent et sortent en permanence de la zone d'observation. Lorsqu'ils entrent dans la zone, la fluorescence est intacte, cela crée une zone claire tout le long du périmètre délimitant la zone d'observation. Les fluorophores sont dégradés avant l'arrivée des phospholipides au centre du diaphragme ce qui crée une zone sombre. La dimension de la zone claire est d'une largeur proportionnelle à la vitesse de déplacement des lipides et à la vitesse de dégradation des fluorophores. Lorsque la vitesse de dégradation des fluorophores est connue, la mesure de l'intensité de fluorescence en fonction de la position dans cette zone permet de déduire la constante de diffusion (équation 2.10).

$$I(x) = I_0 \exp\left(-x \sqrt{\frac{B}{D}}\right) + I_{Bg} \quad (2.10)$$

avec D constante de diffusion, B la constante de blanchiment, I_0 et I_{Bg} des paramètres obtenus par fit

- Spectroscopie par corrélation de fluorescence (*Fluorescent Correlation Spectroscopy* FCS). Les phospholipides se déplacent en permanence en deux dimensions sur la surface avec un mouvement aléatoire brownien. Certains d'entre eux sont marqués avec une molécule fluorescente. La fluorescence est excitée à l'aide d'un faisceau laser focalisé par un microscope sur l'échantillon. Les phospholipides entrent et sortent en permanence de la zone d'excitation qui est conjuguée avec la zone d'observation. Lorsqu'un phospholipide marqué entre dans le spot laser (figure 2.36), il émet un flux de photons. L'intensité de fluorescence est alors mesurée. Elle fluctue autour de la valeur moyenne en fonction des entrées et sorties des molécules fluorescentes dans le spot laser (figure 2.37a). Une fonction d'auto-corrélation est alors effectuée sur la fluctuation temporelle de l'intensité (équation 2.11). Un ajustement expérimental de cette fonction d'auto-corrélation à l'aide de l'équation 2.12 permet d'en déduire le temps de diffusion τ_D .

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2.11)$$

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \right) \quad (2.12)$$

avec τ_D temps de diffusion et N nombre de particules.

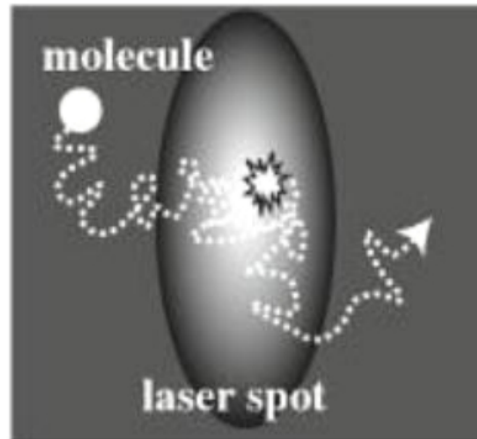


FIGURE 2.36.: Schéma décrivant le principe de la FCS. La molécule fluorescente entre dans le spot laser, elle est excitée par celui-ci et émet un flux de photons [104].

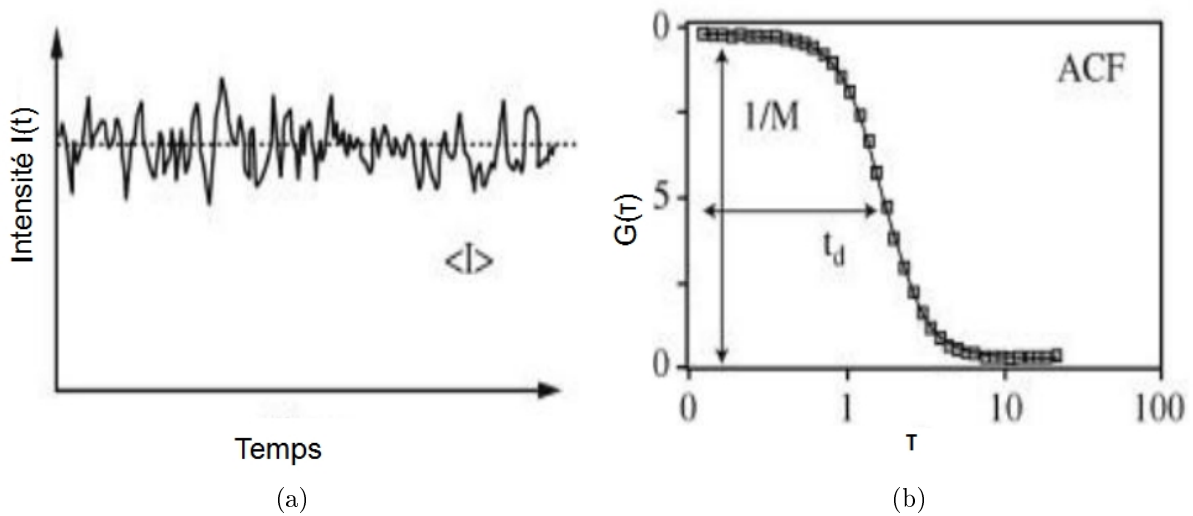


FIGURE 2.37.: L'intensité $I(t)$ varie autour de la position moyenne (graphe de gauche) $\langle I \rangle$. On en déduit une fonction d'auto-corrélation (ACF) $G(\tau)$ [104].

Dans le cas d'une diffusion libre en deux dimensions, un phospholipide composant la bicouche se déplace selon un mouvement brownien, celui-ci est décrit par l'équation d'Einstein [105] :

$$\langle r^2(t) \rangle = \langle (r(t) - r(0))^2 \rangle = 4Dt \quad (2.13)$$

$$D = \frac{\langle r^2(t) \rangle}{4t} \quad (2.14)$$

avec $\langle r^2(t) \rangle = \omega^2 t$ et $t = \tau_D$

$$D = \frac{\omega^2}{4\tau_D} \quad (2.15)$$

où $\langle r(t)^2 \rangle$ représente le mouvement quadratique moyen, D la constante de diffusion et t le temps. Il est alors possible de déduire le coefficient de diffusion de l'équation 2.15.

Le SPT permet des mesures dans des domaines plus petits et cette technique permet aussi de mesurer la constante de diffusion dans des domaines confinés. Cependant, la taille de la particule est une limite à la résolution de la technique. La particule est accrochée à un phospholipide, sa taille (~ 100 nm) est largement supérieure à celle du phospholipide. La taille de la particule ainsi que son déplacement en milieu liquide peuvent induire des forces de frottement qui ralentissent la particule ainsi que le lipide accroché. La constante de diffusion mesurée est alors inférieure à celle des lipides libres de la bicouche. Le FRAP, le CP et la FCS sont des méthodes basées sur la fluorescence. Le FRAP nécessite l'utilisation d'un microscope confocal ou d'un montage dédié. Il permet de connaître la constante de diffusion d'une zone de l'ordre du micron mais ne permet pas de voir si il y a des in-homogénéités. Le CP est une méthode très simple à mettre en oeuvre mais n'ayant pas une grande résolution spatiale. Cependant, lorsque nous avons besoin de mesurer qualitativement la fluidité de bicouches lipidiques simples, c'est une méthode très pratique. Nous avons besoin d'une méthode permettant de mesurer les propriétés des bicouches lipidiques étudiées mais aussi de détecter d'éventuelles inhomogénéités dans la bicouche. Nous avons donc choisi une méthode issue de la FCS, la FCS à rayon variable. Cette méthode va être expliquée en détails.

2.5.4.2. Spectroscopie par corrélation de fluorescence à rayon variable (FCSrv)

La spectroscopie de fluorescence à rayon variable a été mise au point à l'institut Fresnel [106, 107]. Cette méthode reprend le principe de base de la FCS. L'amélioration se trouve dans le fait que le rayon de la zone illuminée puis observée est variable. Un schéma du montage est observable sur la figure 2.38.

Un laser Ar⁺ ion envoie une longueur d'onde d'excitation de 488 nm. Le rayon de la tache laser est rendu de taille variable à l'aide d'un diaphragme en amont du microscope. Le rayon est focalisé sur l'échantillon par le microscope. Les fluorophores présents dans la zone illuminée sont excités puis la longueur d'onde est renvoyée vers le détecteur : une photodiode à avalanche. Un autocorrelateur permet de calculer la fonction d'autocorrélation. La fluctuation d'intensité est mesurée pour plusieurs valeurs de rayon du spot lumineux ($\omega \sim$ rayon du faisceau). Pour chaque valeur de ω , une fonction d'autocorrélation est effectuée (équation 2.11). Donc pour chaque valeur de ω mesurée, une valeur de τ_D est calculée ce qui permet de tracer la fonction $f(\omega^2) = \tau_D$.

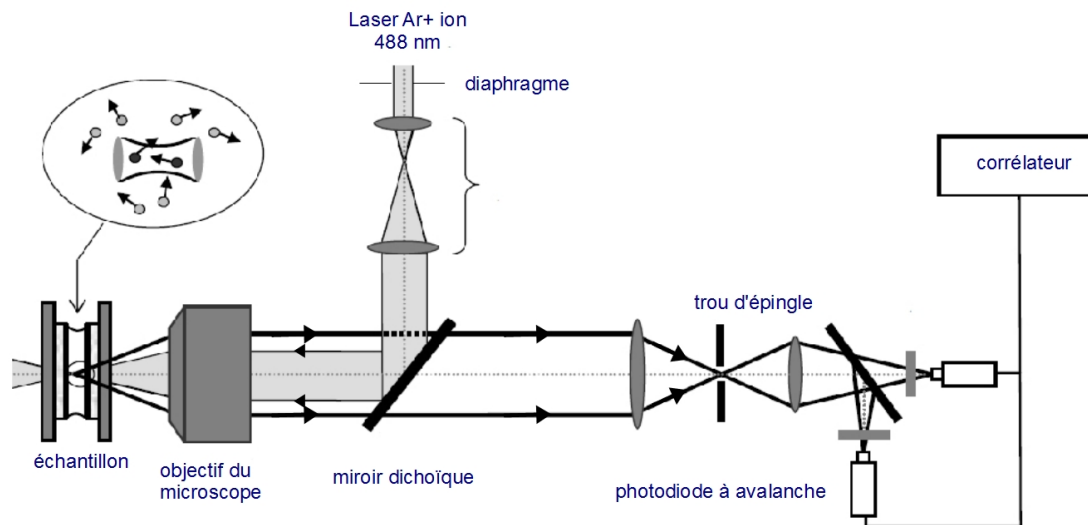
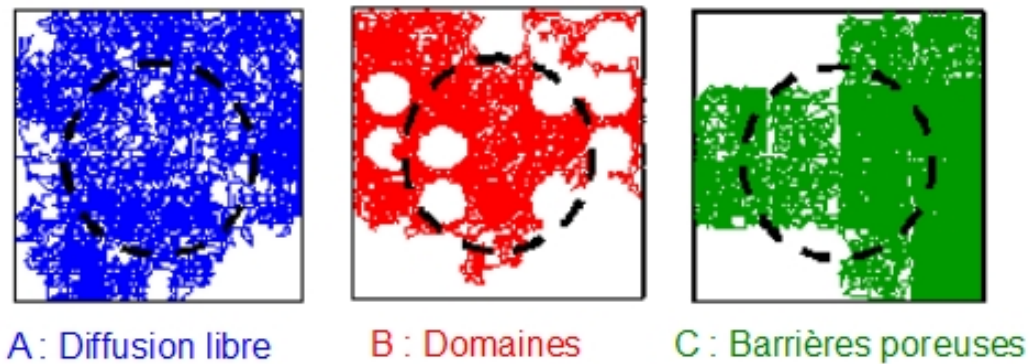


FIGURE 2.38.: *Le montage de FCSrv de Fresnel [108]. Les fluorophores sont excités par un laser Ar+ ion à 488 nm. Le faisceau d'excitation est focalisé par un objectif de microscope de forte ouverture numérique. Seul les fluorophores présents dans la zone illuminée sont excités. La fluorescence est collectée à travers le même objectif. Un miroir dichroïque permet de séparer la lumière d'émission de celle d'excitation. En effet, elles ont une longueur d'onde différentes à cause du déplacement de longueur d'onde de Stokes. Une photodiode à avalanche permet de détecter les photons. L'intensité de fluorescence est ensuite envoyée vers un corrélateur qui permet de faire une fonction d'autocorrélation.*

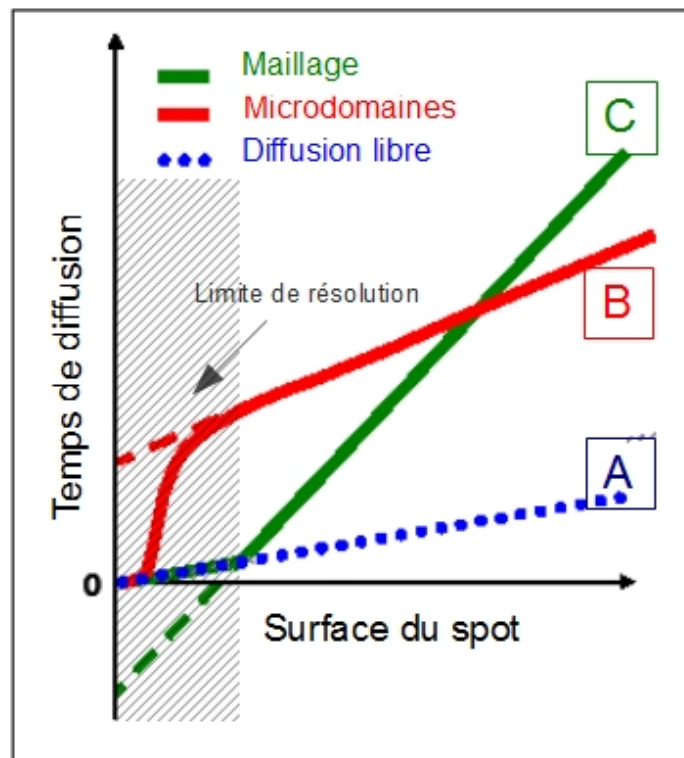
Le coefficient de diffusion est déduit à l'aide de la courbe tracée $f(\omega^2) = \tau_D$ à partir de la pente de la droite. Des études sur la fluidité de la membrane cellulaire ont montré une diffusion qui n'obéit pas à l'équation 2.13, elle est appelée diffusion anormale. Le comportement des molécules ne peut plus être considéré comme brownien mais de nombreux et divers types de déviations existent [109].

Le comportement d'une bicouche soumise à une mesure par FCS à rayon variable a été modélisé numériquement [106]. La figure 2.39a expose la trajectoire modélisée d'une molécule de phospholipide dans trois cas possibles : un cas de diffusion libre (A) et deux cas de diffusion confinée (B et C). Sur le graphe, la trajectoire de la molécule apparaît en couleur (bleu, rouge, vert selon le cas) et le cercle noir représente un rayon possible du faisceau laser.

- (A) Trajectoire d'un phospholipide dans une bicouche lipidique supportée. Il se déplace avec un mouvement brownien.
- (B) Microdomaines isolés. Les phospholipides sont dans des phases différentes dans les domaines. Les domaines sont statiques et de rayon r . Ils modélisent



(a)



(b)

FIGURE 2.39.: a) Trajectoire d'un phospholipide :

A : diffusion brownienne.

B : microdomaines. La probabilité d'entrée et de sortie du domaine est asymétrique. De plus, la constante de diffusion est différente à l'intérieur et à l'extérieur des microdomaines

C : barrières poreuses. Les domaines sont séparés par un maillage de barrières poreuses avec une probabilité P de passer la barrière et d'aller dans le domaine suivant. La constante de diffusion est la même dans chaque domaine.

b) Résultat de simulation de FCSrv sur les trajectoires précédentes. La courbe $f(\omega^2) = \tau_D$ est tracée dans chaque cas (unité arbitraire). La partie grisée est inaccessible expérimentalement. [110].

2. Matériel et méthodes

des différences de phases dans les lipides d'une cellule. Les phospholipides ont un mouvement brownien tant qu'ils restent dans la même phase. La probabilité d'entrer et sortir des domaines est asymétrique. Il y a une probabilité : P_{int} pour que la particule entre dans la zone et P_{out} pour que la molécule sorte du domaine. Les constantes de diffusion intérieures D_{int} et extérieures D_{out} aux domaines sont différentes.

- (C) Barrières poreuses. Un maillage régulier de barrière sépare les domaines lipidiques. Les molécules doivent franchir des barrières régulièrement espacées. Les molécules ont une diffusion brownienne tant qu'elles restent à l'intérieur du domaine. Les molécules ont une probabilité P de passer d'un domaine à l'autre, cette probabilité est symétrique.

La FCSrv est simulée pour chaque trajectoire : τ_D est calculé pour chaque valeur du rayon du laser (ω). La courbe $f(\omega^2)=\tau_D$ est tracée dans les trois cas. La figure 2.39b montre les courbes obtenues dans les trois cas. Théoriquement on observe :

- (A) Le mouvement est brownien, la courbe obtenue est une droite. D'après l'équation 2.15, $\omega^2 \propto \tau_D$. Le résultat attendu pour ce type de diffusion est une droite.
- (B) La constante de diffusion est différente dans les domaines et à l'extérieur. La probabilité de passage de l'extérieur vers le domaine est asymétrique. La première partie de la courbe est une droite, car nous mesurons une valeur de D effective sur une grande zone. lorsque le spot atteint un diamètre proche de celui des domaines, la constante de diffusion chute.
- (C) La constante de diffusion de tous les domaines est identique. Lorsque le rayon du spot laser est grand devant la taille des domaines ($\omega > r$), la constante de diffusion est une constante effective, qui n'obéit pas à l'équation 2.15. La courbe est une droite de pente différente de celle observée pour la diffusion libre. Pour un spot laser de l'ordre de grandeur du domaine ($\omega \sim r$), une cassure est observée. Pour un spot laser inférieur ($\omega < r$), on retrouve une droite de même pente que la diffusion libre, en effet, la zone mesurée correspond à l'intérieur d'un domaine dans lequel la diffusion est de de type brownienne.

Expérimentalement, le rayon minimum de la zone excitée est limité par les lois de diffraction optique, une partie de la courbe obtenue par simulation numérique ne peut pas être observée expérimentalement, cette zone est grisée sur le graphe. Lors des mesures, une fonction linéaire est obtenue dans les trois cas car la partie non linéaire

de la courbe est inaccessible à la mesure. Cette droite est prolongée dans la zone grisée (droite en pointillé). Dans le cas d'une diffusion libre (A), on obtient une droite passant par le point (0,0). Dans le cas d'une diffusion dans des microdomaines la droite obtenue par extrapolation coupe l'axe des ordonnées dans la partie positive. Dans le cas d'un maillage, la droite obtenue par extrapolation coupe l'axe des ordonnées dans la partie négative. Lors d'une excitation à 488 nm la taille du faisceau est comprise entre 200 nm et 300 nm.

A partir de la courbe obtenue nous pouvons déduire dans quel cas nous nous trouvons. Il est aussi possible de remonter vers la taille des domaines à partir de la courbe. Selon la partie de l'axe des ordonnées qui sera coupé par la courbe, nous pourrons en déduire dans lequel des trois cas nous nous trouvons.

3. Structuration topographique de substrats

3.1. Introduction

Dans ce chapitre nous décrivons l'utilisation des membranes d'alumine poreuses comme masque pour structurer des substrats de verre ou de silicium et peu créer des réseaux de nano-trous. Ce type de réseau peut avoir de nombreuses applications. Nous présenterons une de ces applications : il s'agit de préparer des bicouches lipidiques structurées. Nous présenterons les propriétés des membranes d'alumine poreuses. Nous expliquerons ensuite comment une surface de verre est nanostructurée en utilisant les propriétés des membranes d'alumine poreuses comme masque : nous présenterons le protocole utilisé pour mettre au point cette structuration de surface et nous étudierons les propriétés topographiques de cette surface par AFM. Ensuite, une bicouche lipidique est déposée sur cette surface à l'aide d'une balance de Langmuir. Les étapes de calibrage de la balance sont expliquées. Enfin, nous testerons les propriétés des bicouches lipidiques obtenues sur le substrat structuré par spectroscopie de corrélation de fluorescence à rayon variable (FCSrv). Les mesures sont effectuées en collaboration avec Cyril Favart et Hervé Rigeault de l'*Institut Fresnel* (CNRS-UMR 6133).

3.2. Membranes d'alumine poreuses

3.2.1. Morphologie

La figure 3.1 permet de visualiser une membrane d'alumine poreuse au travers d'une vue d'artiste. Les membranes d'alumine poreuses sont naturellement organisées sur plusieurs cm^2 en un réseau hexagonal [112, 113]. Des pores très verticaux de hauteur h traversent l'alumine. Ils sont fermés au fond par une couche d'alumine qui est du même ordre de grandeur que la largeur des pores. Les membranes d'alumine poreuses peuvent présenter un grand rapport d'aspect, c'est à dire que le ratio entre la hauteur des pores et la largeur des pores est grand.

3. Structuration topographique de substrats

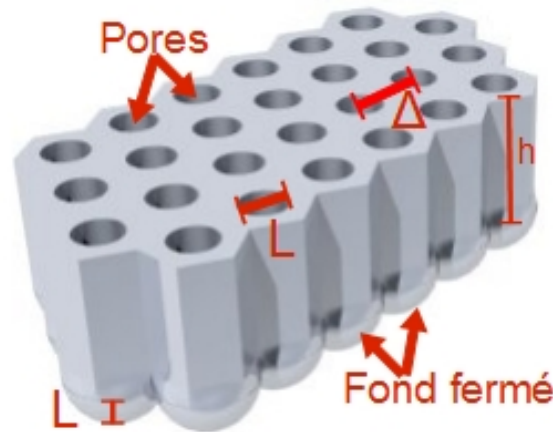


FIGURE 3.1.: Schéma d'une membrane d'alumine poreuse. L représente la largeur d'un pore, Δ la distance interpores, h la hauteur des pores. Le fond est fermé par une couche d'alumine d'épaisseur L . [111]

3.2.2. Le principe de la croissance de l'alumine

Les membranes d'alumine poreuses sont préparées par électrochimie. La figure 3.2 montre le principe de l'anodisation de l'aluminium. La croissance se fait à partir d'aluminium pur : un électrolyte, typiquement un acide est placé au dessus de l'aluminium. L'application d'un potentiel d'anodisation sur un échantillon d'aluminium immergé dans un bain d'acide génère la croissance d'oxyde d'aluminium. L'alumine croît à la surface de l'aluminium selon l'équation :



Cette équation provient du fait que les ions aluminiums sont produits à l'interface aluminium/solution par l'oxydation anodique de l'aluminium (équation 3.2). Les ions O^{2-} quant à eux sont générés à l'interface film/solution par dissociation de l'eau (équation 3.4). Au même moment les ions Al^{3+} de l'interface se dissolvent dans la solution (équation 3.3). Un champs électrique \vec{E} se crée dans la couche d'alumine (figure 3.2, figure de droite) provoquant la migrations des ions Al^{3+} et O^{2-} à travers la couche d'oxyde à la base des pores [115, 116].



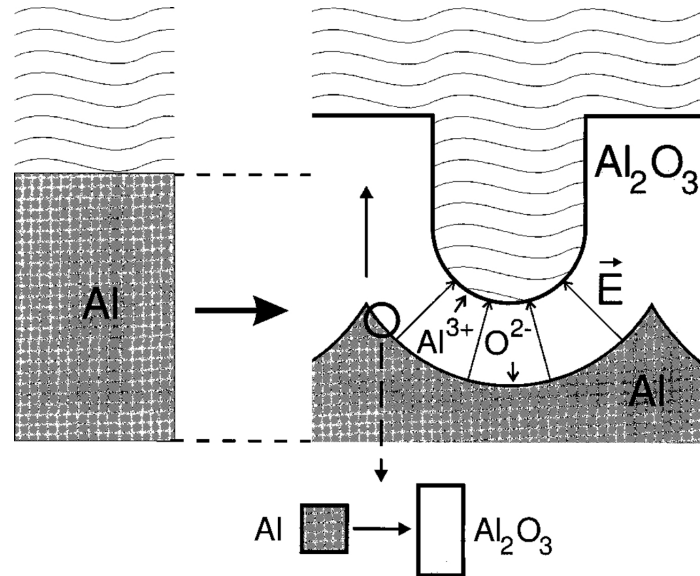


FIGURE 3.2.: *Le principe de l'anodisation. Un courant électrique est appliqué sur une plaque d'aluminium (gris foncé). La surface de l'aluminium est oxydée. Le champ électrique créé permet la migration des ions dans l'alumine [114].*

La forme des pores commence à se créer par le fait que deux molécules d'aluminium donnent une molécule d'oxyde d'aluminium. Des contraintes tendent à minimiser l'énergie du système en créant des dépressions qui donnent la forme aux pores. Au début, la structuration de la surface est très désordonnée. Petit à petit l'alumine va croître et les pores vont bien s'organiser. Plus le temps d'anodisation est long, plus l'organisation de surface sera grande. Pour obtenir une structuration de surface très bien organisée, avec des pores verticaux nous avons utilisé la méthode de double anodisation introduite par Masuda et Fukuda en 1995 [117]. Cette méthode nécessite deux étapes : une première étape de croissance qui crée des pores non verticaux. L'alumine est ensuite dissoute chimiquement. La structuration présente au niveau de l'interface reste, l'aluminium est pré-structuré. Lors de la deuxième anodisation, l'alumine va croître à partir de l'aluminium déjà structuré et produire des pores organisés et très verticaux. Les pores très verticaux ont un diamètre compris entre 10 et 200 nm et sont arrangés en un réseau hexagonal. Le diamètre des pores est proportionnel à la tension d'anodisation, cependant il n'est possible d'obtenir des membranes d'alumine bien organisées que pour des tensions d'anodisation spécifiques déterminées par l'acide utilisé [114]. Il existe une relation de proportionnalité entre la distance interpore (Δ) et la taille des pores (L) : la taille des pores est 30 % de la distance interpore. La valeur de la distance interpore Δ est fixée par la tension appliquée selon l'équation empirique [118] :

$$\Delta \propto 2,5 \times V \quad (3.5)$$

3. Structuration topographique de substrats

avec Δ en nm et V la tension d'anodisation en V.

La hauteur des pores h est variable, à une tension donnée, elle dépend du temps d'anodisation. Pour une anodisation à 195 V, la membrane croît à 2 $\mu\text{m}/\text{h}$. La hauteur maximum pouvant être réalisée est limitée par la hauteur de la plaquette d'aluminium utilisée ; c'est à dire 0,5 mm. La vitesse de croissance étant linéaire, il est théoriquement possible d'obtenir toutes les hauteurs de quelques nanomètres à plusieurs microns [119]. Pour notre utilisation, la manipulation de l'alumine nécessite une hauteur de l'ordre du micron.

3.2.3. Fabrication des membranes d'alumine

3.2.3.1. Montage expérimental

Les membranes d'alumine poreuses sont préparées par électrochimie à partir de plaquettes d'aluminium pur à 99,999 % de 4 cm de diamètre et 0,5 mm d'épaisseur. Des cellules en Téflon fabriquées au laboratoire sont utilisées pour la préparation (figure 3.3).

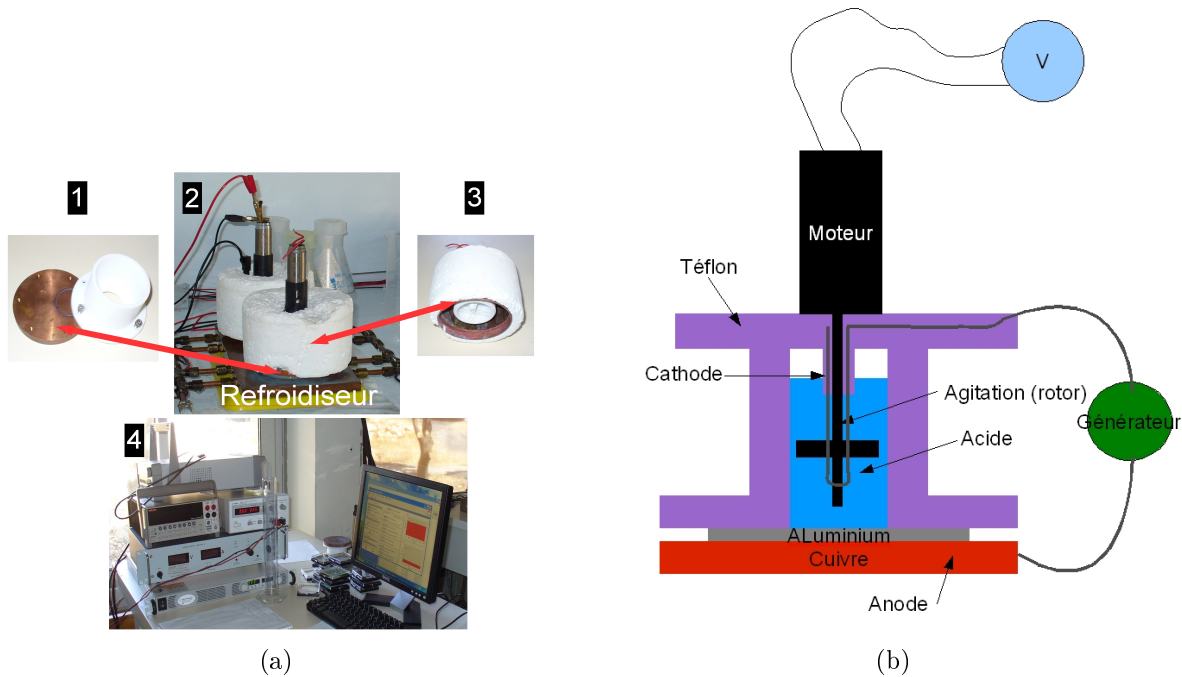


FIGURE 3.3.: (a) Montage expérimental permettant la préparation des membranes d'alumines poreuses : (1) la cellule contenant l'acide, (2) cellule en cours d'utilisation, (3) la cellule avec le fil de platine et le moteur, (4) les générateurs. (b) Schéma d'une cellule utilisée pour l'électropolissage et l'anodisation.

Le montage est composé : d'une cellule en Téflon dont le fond en cuivre sert d'électrode,

d'un couvercle en Téflon constitué d'un fil de platine qui sert d'électrode lorsqu'il est plongé dans l'acide, d'un moteur actionnant une partie rotative servant d'agitateur. Cette partie rotative homogénéise la solution. Deux types d'électrodes sont utilisées : une pour l'électropolissage et une thermiquement isolée pour les anodisations. La plaque d'aluminium est posée sur la plaque de cuivre puis la partie en Téflon est vissée sur celle-ci (figure 3.3,1). Après vérification de l'étanchéité, l'acide est introduit dans la cellule. Une plaque en cuivre reliée à un système de refroidissement permet de maintenir une température constante durant les deux anodisations.

3.2.3.2. L'électropolissage des plaquettes d'aluminium

Cette première étape est nécessaire pour retirer la couche d'oxyde naturellement présente sur l'aluminium. L'oxyde est un isolant qui peut empêcher une anodisation de qualité, cette couche risque aussi d'induire des défauts sur la surface de l'alumine. Un mélange chimique contenant 25% d'acide perchlorique et 75% d'éthanol est introduit dans la cellule. Le couvercle est placé dessus et le moteur est alimenté par une tension de 4 V. Une électrolyse de 5 min est faite grâce à une tension de 20 V. Les électrodes et la cellule sont ensuite rincées à l'eau, l'isopropanol et enfin l'eau. L'électrolyte est réutilisable. Une méthode simple permet de vérifier la qualité de l'électropolissage. La surface oxydée est gris mate, la surface de l'aluminium devient réfléchissante comme un miroir lorsque l'électropolissage est de bonne qualité.

3.2.4. Les types de membranes d'alumine préparés et leurs spécificités

Nous préparons trois types de diamètres de pores. Le tableau 3.1 regroupe les paramètres utilisés pour obtenir les trois types de membranes d'alumine organisés que nous pouvons préparer. Les diamètres théoriques sont donnés par la tension d'anodisation choisie. Par la suite, le type de membrane sera désigné par son diamètre théorique. Les membranes d'alumine poreuses de diamètre de pores théoriques de 25 nm sont préparées en utilisant de l'acide sulfurique et une tension de 25 V, nous ne donnerons pas plus de détails car elles n'ont pas été utilisées dans cette thèse.

3.2.4.1. Membranes anodisées à 40 V, diamètre 40 nm

Ces membranes sont les plus faciles à préparer. Le tableau 3.1 récapitule les paramètres optimaux pour obtenir des membranes avec une très bonne organisation. Elles sont peu sensibles aux variations des paramètres telle que la température de l'électrolyte. L'électrolyte utilisé est l'acide oxalique à la concentration de $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$.

3. Structuration topographique de substrats

Acide	H ₂ SO ₄	H ₂ C ₂ O ₂	H ₃ PO ₄
Concentration	0,3 mol.l ⁻¹	0,3 mol.l ⁻¹	0,5% puis 1% en masse
Température (°C)	6	6	0
Tension (V)	25	40	195
Distance interpore (nm)	60	120	500
Diamètre des pores (nm)	20	40	200

TABLE 3.1.: *Les paramètres nécessaires à l'obtention des trois tailles de diamètres de pores des membranes d'alumine poreuses.*

La première anodisation est effectuée durant un temps de 12 h, l'acide est refroidi puis maintenu à une température de 6°C. Lorsque la température est équilibrée, une tension d'anodisation de 40 V est appliquée. Une couche d'alumine va croître durant 12h permettant une pré-structuration.

La couche d'alumine est ensuite dissoute dans de l'acide chromique durant 12h à 45°C. Ce temps dépend du temps de la première anodisation c'est à dire de l'épaisseur de la couche d'alumine à dissoudre. Pour une anodisation de 1h, 30 min de dissolution sont nécessaires.

La deuxième anodisation est effectuée avec les mêmes paramètres que la première anodisation. Seule la durée varie, elle permet de contrôler l'épaisseur de l'alumine obtenue.

3.2.4.2. Membrane anodisées à 195 V, diamètre 200 nm

Les membranes de 200 nm sont plus difficiles à préparer car elles sont susceptibles de casser à cause du haut voltage appliqué pendant l'anodisation. Si le courant est trop élevé au niveau de l'interface aluminium/alumine, un point d'attaque se produit (« breakdown ») à cause d'une élévation locale de la température et se propage au reste de la surface. Le contrôle de la température est indispensable pour compenser l'augmentation de la température.

La solution d'acide phosphorique est refroidie durant environ 2h pour atteindre la température de 0°C. La première anodisation dure 12 h à une tension de 195 V. Elle est débutée avec une concentration d'H₃PO₄ de 0,5 % en masse pendant 3h. Puis, on ajoute 500 µl d'acide pour obtenir une concentration de 1 % durant les 9 h restantes. Cela permet d'avoir une tension moins importante au niveau de l'interface et de limiter les possibilités de breakdown.

Il a été montré dans la littérature qu'une fois anodisé, les chances de breakdown sont plus minimales. La seconde anodisation est réalisée avec une concentration de 1 % en masse dès le début. Comme précédemment, le temps de la seconde anodisation

détermine l'épaisseur de la membrane. Typiquement l'anodisation est de 25 min ce qui permet d'obtenir une épaisseur de l'ordre du micron. La vitesse de croissance de ce type de membrane est de $2\mu\text{m/h}$.

3.2.5. Observation des membranes d'alumine poreuses

Les membranes peuvent être observées en MEB ou en AFM. La vérification de l'organisation de surface est plus rapide à obtenir en MEB. Les membranes ont un diamètre de pores théorique de 40 nm et 200 nm. Ce diamètre peut varier lors de l'ouverture du fond des pores et il arrive que les pores soient plus larges. Dans la suite de la thèse, nous appellerons les membranes d'alumine poreuses par leur diamètre théorique : membrane 200 nm pour celles anodisées à 195 V et membrane 40 nm pour celles anodisées à 40 V. La figure 3.4 montre les membranes d'alumine poreuses observées en MEB : en a) les membranes sont anodisées à 40 V, le diamètre théorique des pores est de 40 nm, en b) et c) les membranes sont anodisées à 195 V et le diamètre théorique est de 200 nm.

La figure 3.4e montre une membrane anodisée à 195 V vue de dessous. Le fond des pores est fermé par une couche d'alumine dont l'épaisseur est la même que le diamètre des pores, c'est à dire 200 nm.

3. Structuration topographique de substrats

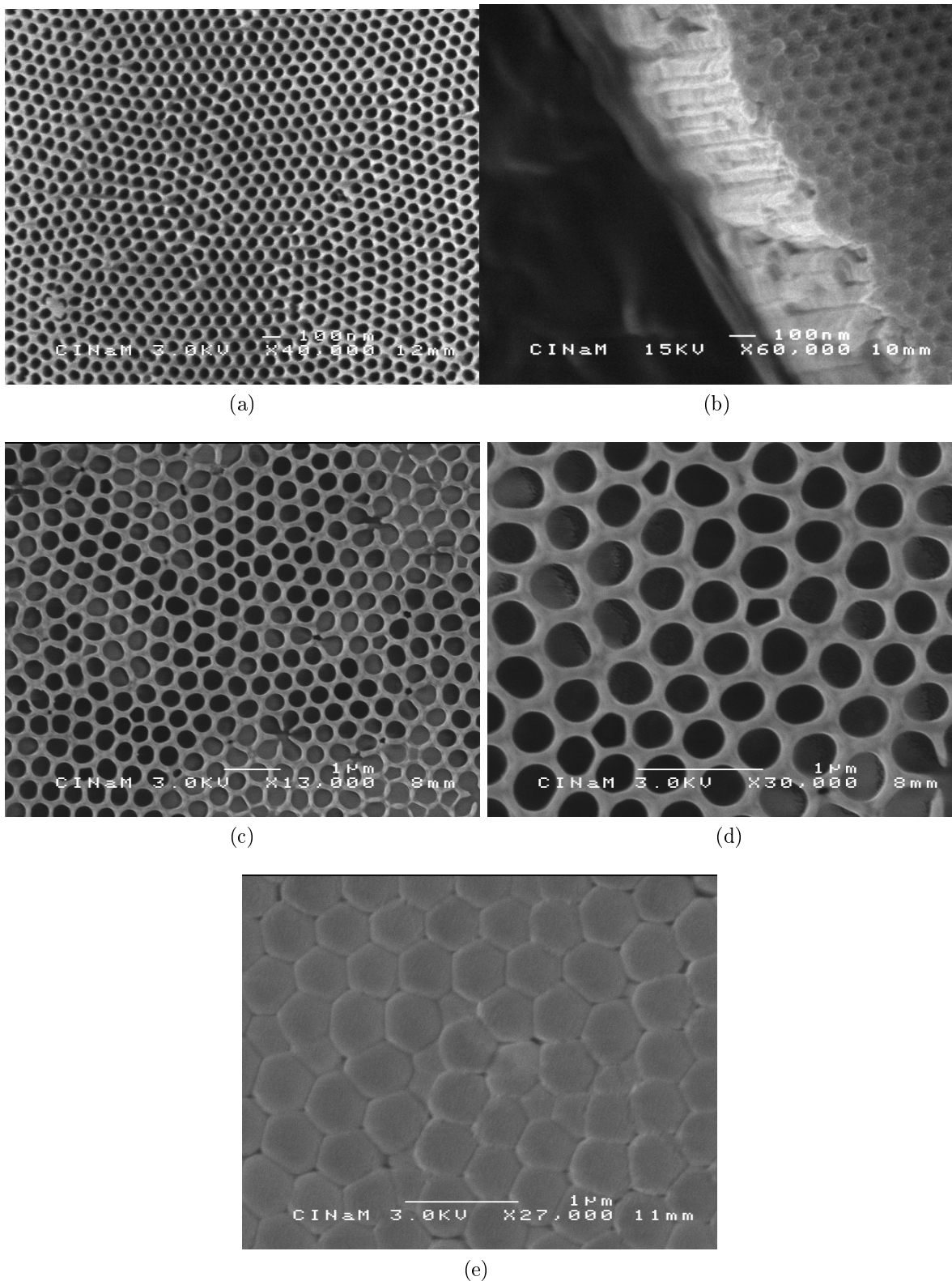


FIGURE 3.4.: Membranes d'alumine poreuses observées au MEB (a) et (b) Pores de 40 nm de diamètre théorique, (c) et (d) Pores de 180 nm de diamètre théorique, (c) zoom. (e) la membrane d'alumine poreuse vue de dessous, le diamètre théorique des pores est de 200 nm. Le fond des pores de l'alumine apparaît : les bosses correspondent à la couche d'alumine qui ferme les pores. L'épaisseur théorique de la couche d'alumine est de 200 nm.

3.2.6. Ouverture du fond des pores des membranes d'alumine poreuses

Comme nous l'avons expliqué précédemment, le fond des pores des membranes d'alumine est fermé par une couche d'alumine dont l'épaisseur est égale au diamètre des pores. Cette couche d'alumine doit être retirée pour permettre d'utiliser les membranes poreuses comme masque d'évaporation ou de gravure. De plus, un bon contrôle de l'ouverture permet d'avoir un masque de meilleure qualité.

La surface de la plaquette anodisée est composée d'alumine alors que la partie inférieure est toujours composée d'aluminium (figure 3.5). L'ouverture puis la récupération de la membrane d'alumine nécessite de dissoudre la couche d'aluminium encore présente. Une couche de polystyrène de quelques microns est déposée sur la surface de l'alumine pour la protéger de l'acide phosphorique. L'aluminium est dissout dans une solution de sulfate de cuivre (CuSO_4). Initialement, nous utilisons une solution de chlorure de cuivre mais elle attaquait aussi l'alumine. Après dissolution complète de l'aluminium, l'alumine couverte de polystyrène est récupérée dans le but d'ouvrir le fond des pores.

3. Structuration topographique de substrats

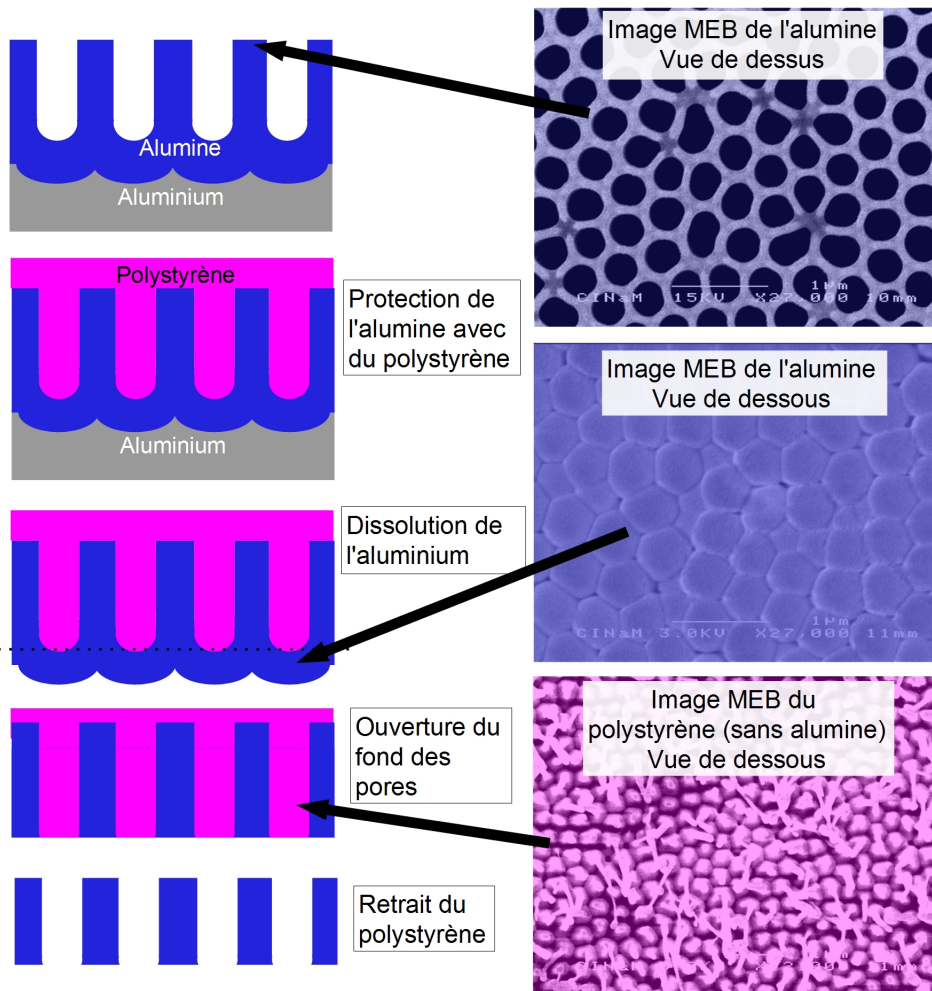


FIGURE 3.5.: Schéma récapitulatif du protocole d'ouverture du fond des pores de l'alumine. Des images MEB illustrent les étapes. Une couche de polystyrène est déposée par spin-coating sur l'alumine. L'aluminium est dissous dans du sulfate de cuivre. Enfin, le fond des pores est plongé dans de l'acide phosphorique pour permettre l'ouverture du fond. Après dissolution du polystyrène, on obtient une membrane ouverte de part et d'autre (le schéma n'est pas à l'échelle).

3.2.6.1. Ouverture du fond des pores

Le protocole classiquement utilisé pour l'ouverture du fond des pores est réalisée par immersion de l'alumine dans de l'acide phosphorique (H_3PO_4) à 10 %, à la température de 45°C sur deux membranes d'alumine poreuses anodisées à 195 V. La solution d'acide est placée dans une étuve thermalisée à 45°C, le temps que la température s'équilibre, puis l'alumine est déposée dans la solution. Le temps d'immersion est respectivement de 40 min pour la première membrane et de 45 min pour la deuxième. Après le temps voulu, la membrane est récupérée, rincée à l'eau deux fois puis la couche de polystyrène est enlevée par immersion dans une solution de chloroforme. La membrane est alors observée au MEB pour vérifier l'état d'ouverture des pores. Nous avons voulu effectuer un meilleur contrôle de l'ouverture des pores en contrôlant les paramètres.

La figure 3.6 montre le fond des pores observés en deux endroits de la même membrane après un temps d'ouverture de $T=40$ min pour les images (a) et (b) et $T=45$ min pour les images (c) et (d).

Sur l'image (a), nous pouvons voir qu'après 40 min, le fond des pores commence à s'ouvrir. Le diamètre moyen des pores mesurés sur l'image est $d_{\text{pore}}=138$ nm. Ce type d'image est majoritaire sur une membrane d'alumine donnée. Sur l'image (b) nous voyons que pour un temps égal, certaines zones ont les pores plus ouverts ($d_{\text{pore}}=367$ nm).

Sur l'image (c) nous pouvons voir qu'après 45 min, l'ouverture des pores est optimisée, cela est majoritaire sur une membrane donnée. Par contre sur l'image (d) nous pouvons voir que la totalité de l'alumine a été dissoute. On observe des zones où il ne reste que le polystyrène.

3. Structuration topographique de substrats

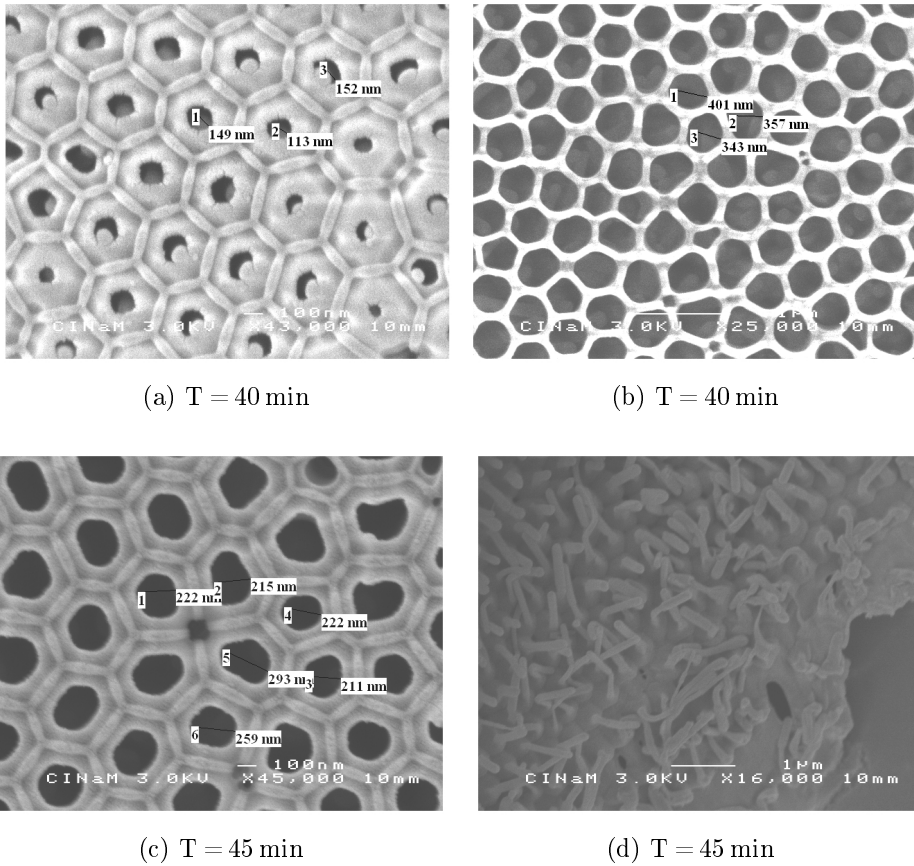


FIGURE 3.6.: Comparaison de l'ouverture du fond des pores d'une membrane d'alumine avec de l'acide phosphorique à 10% après 40 min (a et b) et 45 min (c et d) dans l'acide phosphorique à 10%. La membrane est observée par dessous. En (a) et (b) l'observation est faite après 40 min en deux endroits différents. En (a) les pores sont à peine ouverts alors qu'en (b) l'ouverture est complète. En (c) et (d), on observe deux endroits après 45 min. En (c) l'ouverture est complète alors qu'en (d), la totalité de la membrane a été dissoute et il ne reste que le polystyrène.

3.2.6.2. Changement de la concentration d'acide phosphorique

La maîtrise de la vitesse d'ouverture semble indispensable pour obtenir la maîtrise de la taille des pores, pour cela nous avons choisi de diminuer la concentration d'acide par deux. Les essais ont donc été faits en utilisant une solution à 5% et à la température de 45°C. La vitesse de dissolution reste sensiblement la même. En effet, au bout de 42 min on observe la dissolution complète de la membrane (figure 3.7).

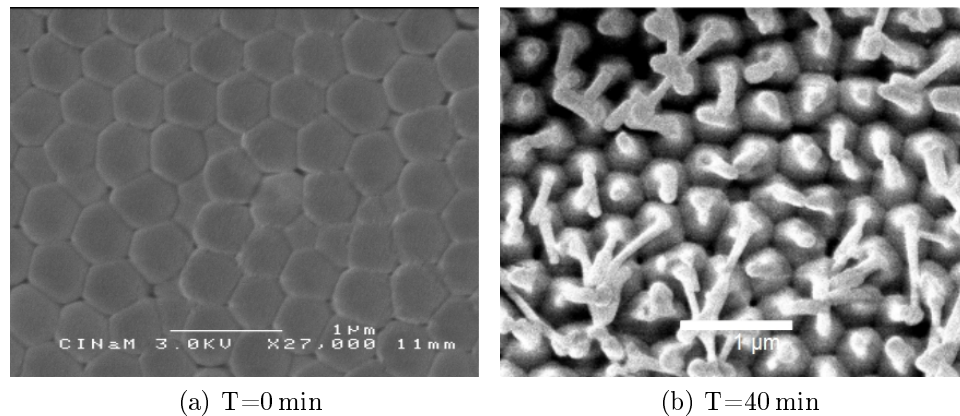


FIGURE 3.7.: Images MEB d'une membrane d'alumine vue de dessous. a) Au temps initial $T=0$, une couche d'alumine d'épaisseur théorique de 200 nm ferme le fond des pores de la membrane b) Après 45 min d'immersion dans l'acide phosphorique, toute l'alumine a été dissoute, il ne reste que la couche de polystyrène.

3.2.6.3. Changement de la température

Le contrôle de la température est une autre possibilité pour la maîtrise de la vitesse d'ouverture. La température de 4°C a été choisie afin d'obtenir une vitesse de dissolution très lente donc une maîtrise fine de l'ouverture. De plus le protocole nécessite seulement un réfrigérateur pour être réalisé. Les temps d'ouverture sont très longs à cette température. Après 15 h dans l'acide à 7%, les pores sont complètement ouverts (figure 3.8d). Des temps intermédiaires ont alors été testés en utilisant des temps d'ouverture fractionnés (figure 3.8) : immersion dans l'acide, rinçage, observation au MEB, ré-immersion dans l'acide. Après 5h40, les pores sont toujours fermés. Après 6h40, une partie des pores sont ouverts.

Nous avons donc testé un temps compris entre 6h40 et 15h. Après une immersion de 8h45 dans l'acide phosphorique (7%, 4°C), la figure 3.9 montre que la couche barrière qui ferme les pores est intacte.

3. Structuration topographique de substrats

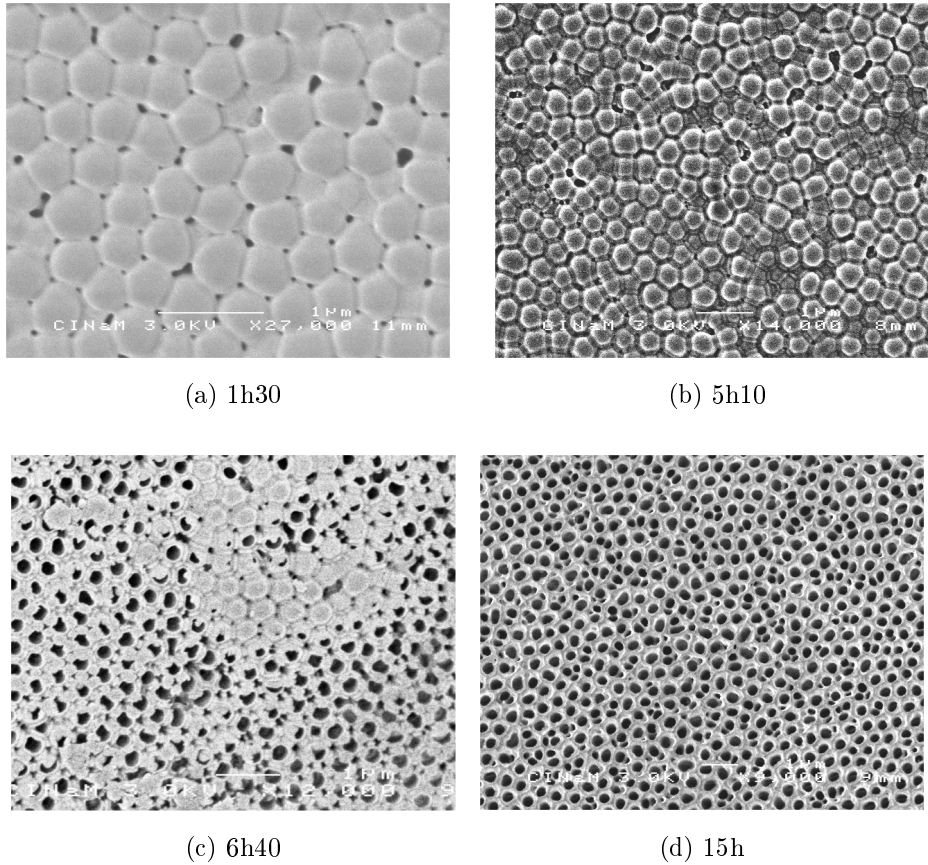


FIGURE 3.8.: *Images MEB de la couche d'alumine fermant les pores après plusieurs temps d'immersion fractionnés dans de l'acide phosphorique (7%, 4°C). a) Après 1h30 d'immersion. b) La même 3h40 après ré-immersion durant 3h40 (5h10 au total) c) La même après 1h30 de ré-immersion (6h40) d) une membrane après 15h.*

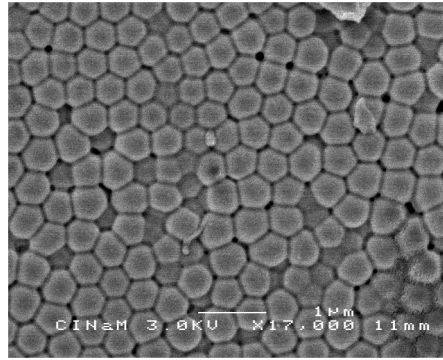


FIGURE 3.9.: *Après un temps d'immersion de 8h45 dans l'acide à 7%, le fond des pores est toujours fermé.*

Nous avons montré que le fait de fractionner les étapes de la dissolution change les résultats. Après l'immersion dans l'acide, l'alumine est rincée à l'eau DI à température ambiante. S'il reste de l'acide, il peut continuer à dissoudre l'alumine, ce qui expliquerait que les pores soient partiellement ouverts après 6h40 d'immersion dans l'acide effectuée en trois fois mais pas après 8h40 d'immersion. Cela tend à montrer que les temps d'ouverture à la température de 4°C sont très long. Lors de l'immersion de nos échantillons durant un temps très long (>6h) dans l'acide, le polystyrène se détache parfois de la surface de l'alumine. Celle-ci n'étant plus protégée, elle se retrouve attaquée et entièrement dissoute. La conclusion est que cette température n'est pas idéale pour contrôler l'ouverture.

Les paramètres d'ouverture choisis pour la suite sont 45 min à 45°C.

3.3. Nano-structuration topographique

Il n'existe pas beaucoup de méthodes pour structurer une surface à l'échelle nanométrique. Nous proposons d'utiliser l'alumine poreuse pour structurer une surface. Un substrat de verre a été privilégié pour faciliter les études biologiques cependant, la méthode peut être utilisée pour structurer différents types de matériaux.

Nous utilisons des membranes d'alumine poreuses anodisées à 195 V durant 30 min (d'épaisseur d'environ 1 μm) dont le fond des pores est ouvert selon les paramètres définis à la figure 3.2.6.3 (45 min à 45°C). Elles se présentent sous la forme de petits morceaux d'alumine de 1 μm d'épaisseur et de quelques cm^2 de surface.

La figure 3.10 résume les étapes du protocole.

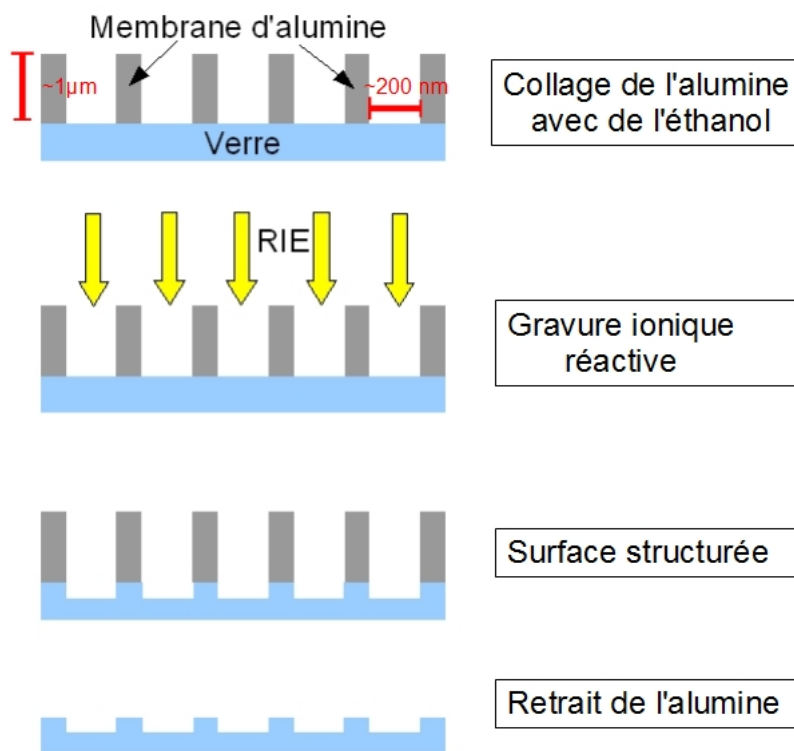


FIGURE 3.10.: Les étapes de la nano-structuration du verre. La membrane d'alumine est collée sur la surface. Une gravure ionique réactive est effectuée : les parties protégées par l'alumine restent intactes alors que le verre est attaqué. Après retrait de la membrane, la surface est structurée topographiquement.

3.3. Nano-structuration topographique

La membrane est collée sur la surface de verre nettoyée avec une goutte d'eau dé-ionisée (DI) ou une goutte d'éthanol : la membrane est déposée sur la surface puis une goutte de solvant est ajoutée, après évaporation du solvant, une liaison faible se produit entre la surface du substrat et la membrane. Le résultat est le même avec les deux types de collage, le collage à l'éthanol a été privilégié. La membrane d'alumine est ensuite utilisée comme masque de gravure. Une gravure ionique réactive directionnelle est effectuée sur l'échantillon. Les paramètres retenus sont : de l'oxygène comme gaz et une puissance de 80 W durant 1min 30. La partie protégée par la membrane reste intacte alors que la partie non protégée est percée.

La figure 3.11 présente une image AFM d'une surface de verre avant structuration : la surface est très peu rugueuse ($rms=0,2\text{ nm}$).

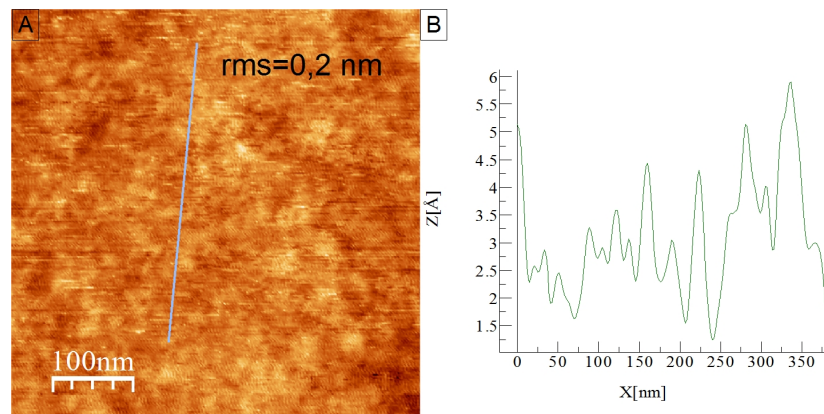


FIGURE 3.11.: A) Une lamelle de verre nettoyée observée à l'AFM à l'air. La rugosité est faible ($rms=0,2\text{ nm}$). B) Profil en z de la surface.

La figure 3.12 montre une image AFM d'une surface de verre structurée par la méthode de gravure ionique présentée précédemment. L'insert présente une image MEB du masque utilisé. On observe la présence d'un réseau hexagonal de trous comme ceux présents sur la membrane d'alumine poreuse utilisée.

3. Structuration topographique de substrats

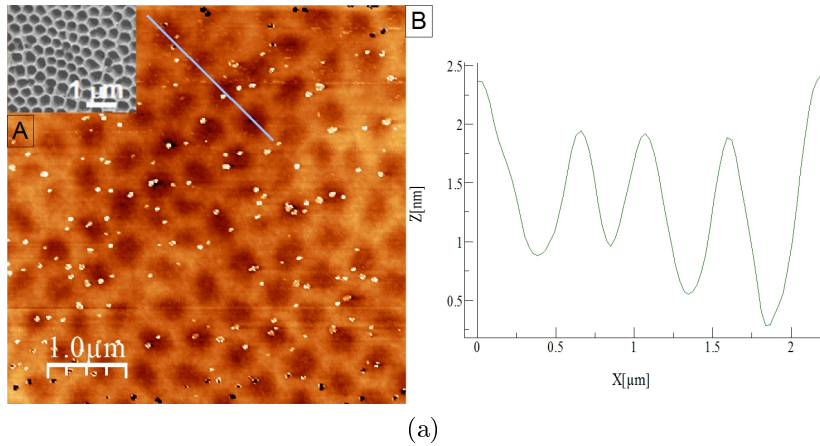


FIGURE 3.12.: Une surface de verre structurée en utilisant une membrane d'alumine comme masque de gravure ionique réactive caractérisée par AFM. A) Verre structuré, insert : image MEB de la membrane d'alumine utilisée. B) Profil en z d'une collection de trous. Les points blancs correspondent à des poussières dont la hauteur a été coupé lors du traitement d'image.

Nous avons effectué une transformée de Fourier FFT-2D de la surface de verre structurée. La figure 3.13 fait apparaître un anneau. Celui-ci met en évidence une organisation de la surface.

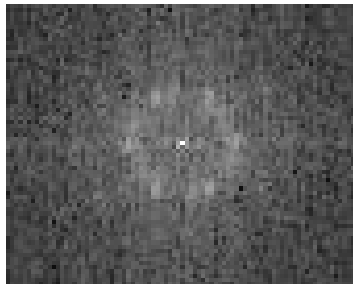


FIGURE 3.13.: Transformée de Fourier 2D de la surface de verre structurée. L'image dans l'espace de Fourier montre une bonne organisation de la surface de verre structurée.

La figure 3.14 montre deux images AFM d'une lamelle structurée : en (a) une image sur une large zone $8\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$, en (b) un zoom sur ces structures.

Nous avons effectué des mesures sur une collection de plus de 50 trous, à partir des profils en z obtenues d'après les images AFM. Ainsi, nous avons mesuré :

- la largeur à mi-hauteur des trous, elle nous donne le diamètre des trous
- la profondeur des trous
- la distance entre deux trous, elle nous donne le paramètre de maille du réseau

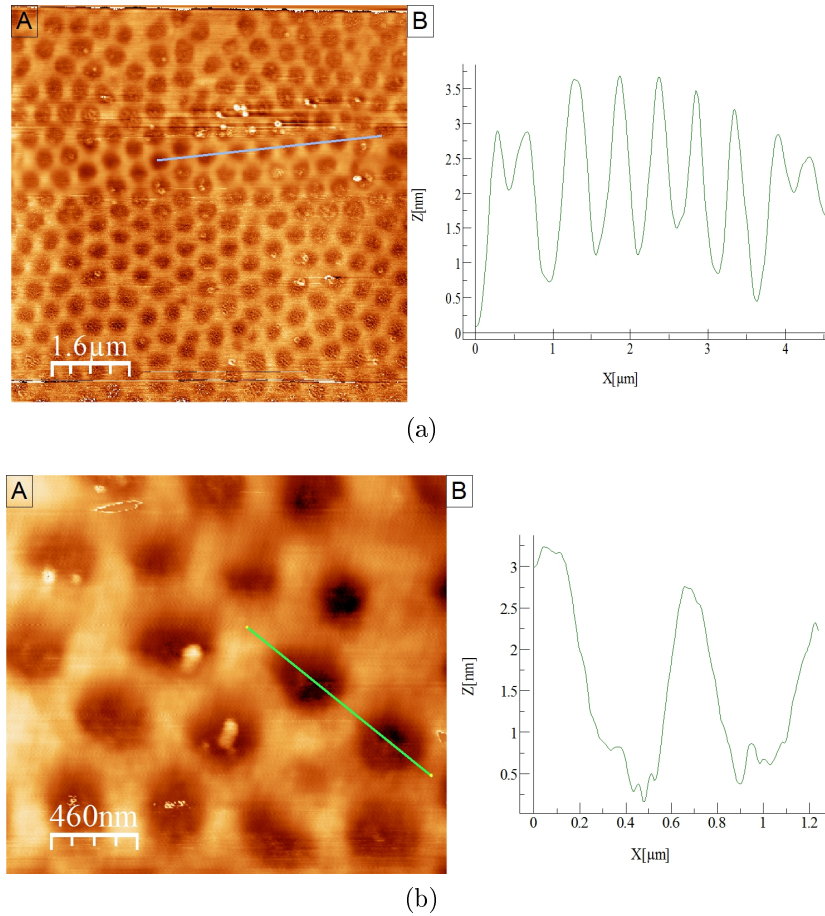


FIGURE 3.14.: A) Une lamelle de verre structurée caractérisée par AFM. B) Profil en z d'une collection de trous. (a) Image $8\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$ (b) Zoom sur les structures.

Le tableau 3.2 répertorie les moyennes obtenues. La figure 3.15 montre la distribution des valeurs mesurées. La profondeur moyenne d'un trou (a) est de $1,5\text{ nm} \pm 0,6\text{ nm}$. Le diamètre moyen des trous (b), obtenu à partir de la largeur à mi-hauteurs, est de $296\text{ nm} \pm 38\text{ nm}$. Enfin, le paramètre de maille du réseau hexagonal de trous (c) est de $518 \pm 48\text{ nm}$.

	Moyenne	Écart type
Largeur à mi-hauteur (nm)	296 nm	$\pm 38\text{ nm}$
Distance (nm)	518 nm	$\pm 48\text{ nm}$
Profondeur (nm)	1,5 nm	$\pm 0,6\text{ nm}$

TABLE 3.2.: Grandeurs caractéristiques moyennes des réseaux de trous obtenus, mesurées sur la lamelle de verre structurée.

3. Structuration topographique de substrats

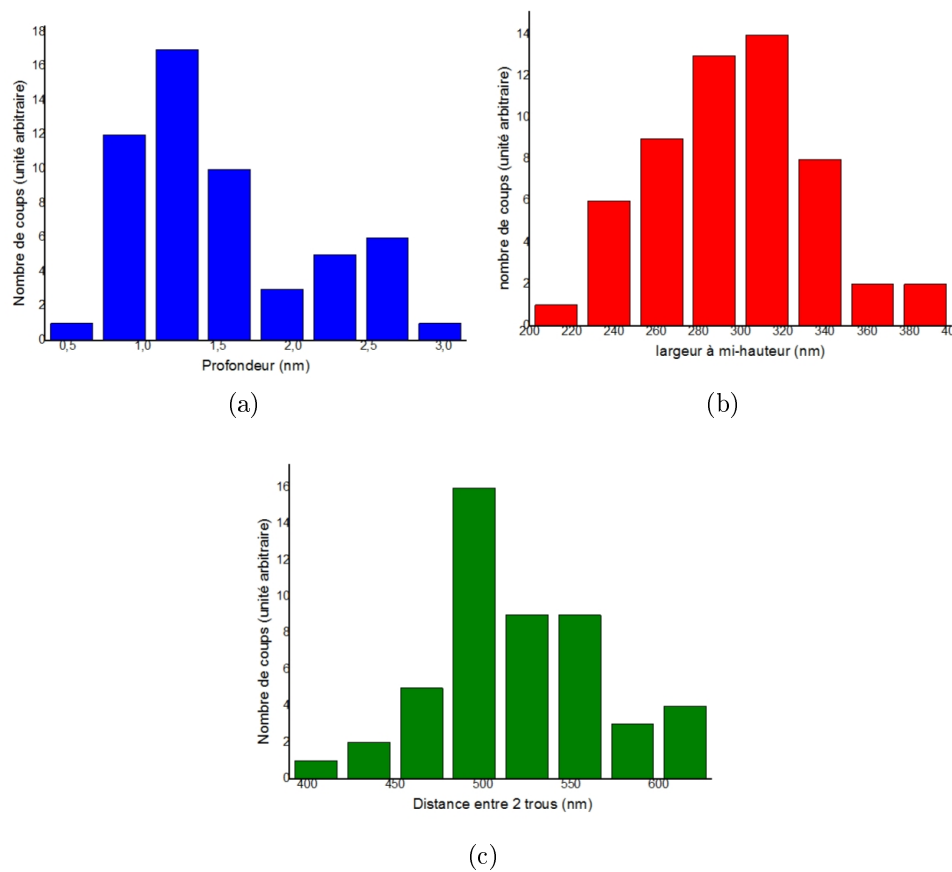


FIGURE 3.15.: *Statistique sur le verre structuré. En (a) la distribution de la profondeur des trous. En (b), la distribution du diamètre des trous obtenus en mesurant la largeur à mi-hauteur. En (c), la distribution du paramètre de maille distance entre les trous.*

3.4. Application des nanostructures pour la structuration de bicouches lipidiques

La surface nanostructurée va maintenant être utilisée pour préparer une bicouche lipidique structurée. Une bicouche lipidique est déposée sur la surface de verre par la méthode de Langmuir-Blodgett (LB), Langmuir-Shaeffer (LS) en utilisant une balance de Langmuir.

3.4.1. Mise au point du protocole d'utilisation de la balance de Langmuir

La balance de Langmuir a été mise en place. La balance est vendue calibrée mais il est indispensable de le vérifier. Des essais ont été faits avec de l'acide arachidique pour vérifier que l'étalonnage de la machine est correct (figure 3.16). Un dépôt de eggPC a ensuite été effectué pour vérifier que nous obtenons des bicouches fluides. Ces deux molécules sont parfaitement connues et servent de modèle. Sur l'isotherme de l'acide arachidique (A), nous voyons apparaître les transitions de phase gaz-liquide puis liquide-solide. Cette transition abrupte qui se produit à 25 mN/m est caractéristique [120]. Cela confirme que le calibrage est bon.

Dans le cas du Egg-PC, il n'y a pas de transition de phase franche car c'est un mélange de chaînes carbonées de longueurs différentes ce qui induit une transition de phase progressive (B).

Les courbes (C) et (D) sont celles qui correspondent au dépôt. La barrière se ferme ce qui comprime les molécules en faisant augmenter la pression. Lorsque la pression arrive à la pression de consigne (25 mN/m), la barrière s'arrête. La lamelle (22x22mm²) initialement plongée dans l'eau remonte avec une vitesse de 35 mm.s⁻¹, les molécules passent de la surface de l'eau à celle de la lamelle, ce qui fait diminuer la tension de surface. La barrière se ferme pour garder la pression de consigne. Il y a un léger décalage entre le moment du dépôt et la fermeture de la barrière, ce qui donne les pics entourés sur la courbe. Les isothermes et les courbes de dépôt correspondent à ce qui était attendu.

Une bicouche de Egg-PC a été préparée pour être observée en microscopie de fluorescence (figure 3.17). Des phospholipides marqués sont insérés dans la deuxième couche de lipides. Lors de nos observations au microscope, nous avons vu que les bicouches obtenues sont homogènes et fluides. La figure 3.17 permet de vérifier l'homogénéité de la bicouche.

3. Structuration topographique de substrats

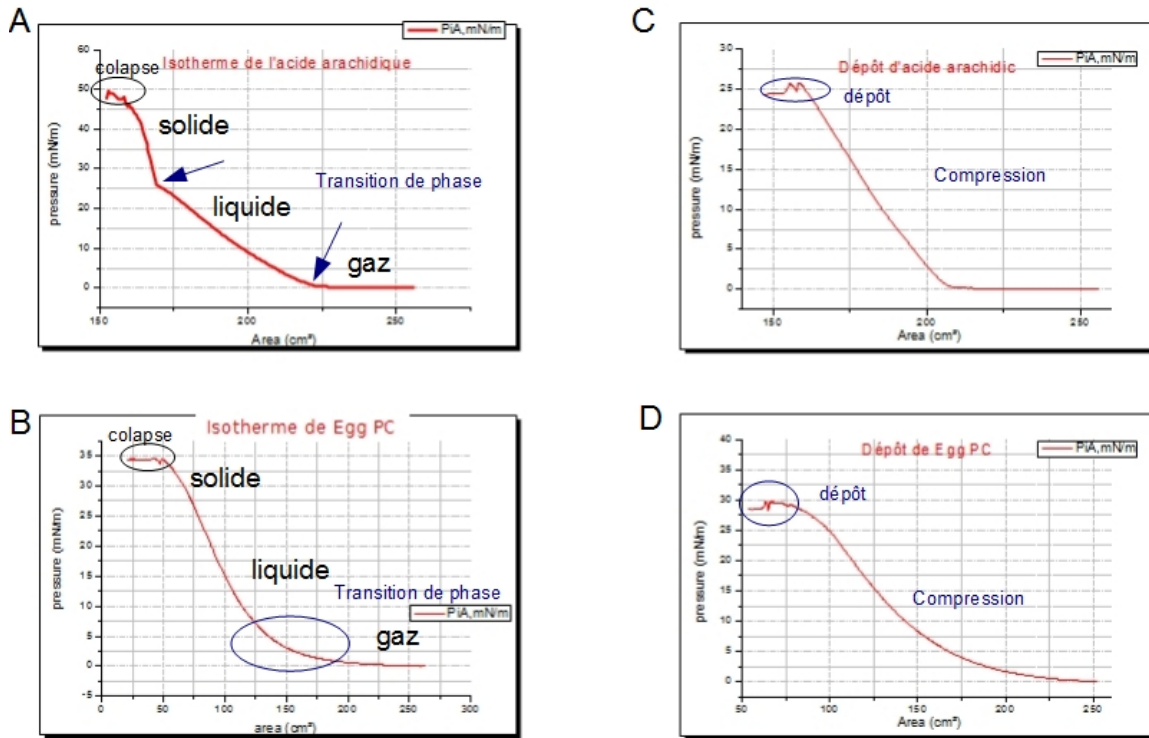


FIGURE 3.16.: A et B : isothermes de l'acide arachidique (A) et du Egg-PC (B). C et D : courbes de dépôts de l'acide arachidique (C) et du Egg-PC (D)

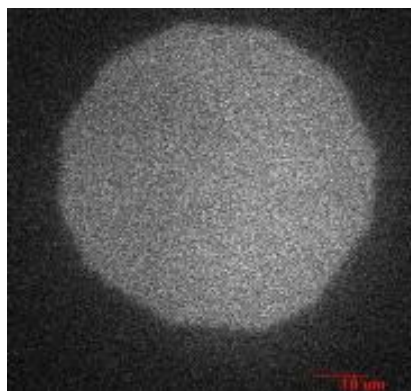


FIGURE 3.17.: Image en microscopie de fluorescence d'une bicouche lipidique supportée déposée sur du verre. La zone d'observation est limitée par le diaphragme de champ du microscope. La bicouche contient 1% de lipides fluorescent marqués avec du FITC.

3.4. Application des nanostructures pour la structuration de bicouches lipidiques

La figure 3.18a montre une image typiquement obtenue d'une bicouche lors d'un photoblanchiment continu. Les lipides photoblanchis se trouvent au centre de l'image. La zone en noir correspond au diaphragme de champ. Nous observons une zone claire en bord de diaphragme ce qui permet de conclure que la bicouche obtenue est fluide. La figure 3.18b montre un profil d'intensité de fluorescence en fonction de la position. Cette intensité est mesurée le long d'une ligne de coupe obtenue à partir de l'image (b). Cela montre que les phospholipides sont mobiles puisque des phospholipides non photoblanchis pénètrent dans la zone d'observation.

Une lamelle couverte de 20 μ l d'avidine fluorescente de concentration 1mg/ml durant 30 min a été préparée comme échantillon témoin. Nous savons que cette couche de protéine est fixe. Il ne doit donc pas y avoir de zone claire sur l'image. La figure 3.18c montre l'observation en photoblanchiment continu. Il n'y a pas de zone claire qui apparaît. Cela nous a permis de vérifier que la zone claire n'apparaît que pour une couche mobile.

3. Structuration topographique de substrats

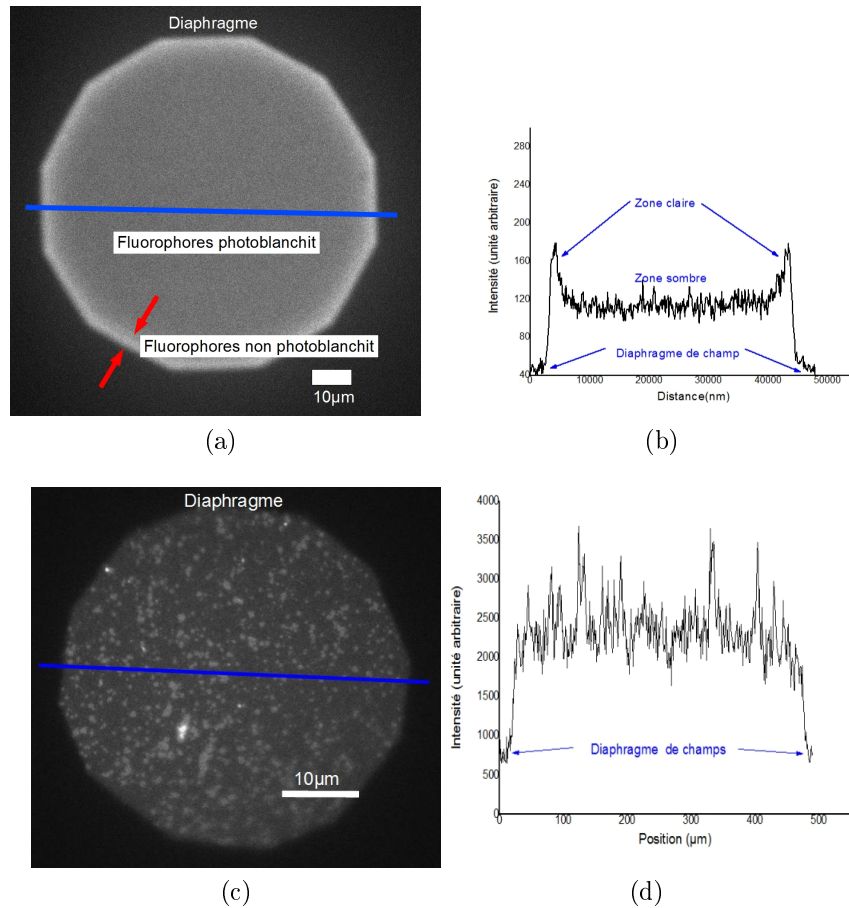


FIGURE 3.18.: (a) (b) Vérification par photoblanchiment continu de la fluidité d'une bicouche lipidique préparée avec du egg-PC et des lipides marqués au FITC. Le diaphragme limite aussi la zone photoblanchis. Les fluorophores éclairés sont dégradés. Au bord de la zone photodégradée, une zone claire apparaît, elle correspond aux fluorophores non photoblanchit qui entrent dans la zone grâce à la diffusion. (b) Profil d'intensité le long de la ligne en (a) : niveau de gris en fonction de l'intensité. La partie la plus sombre correspond au diaphragme de champ. Le gradient d'intensité est dû à l'entrée de phospholipides marqués avec des fluorophores non photoblanchis. (c) (d) Photoblanchiment continu sur une surface couverte d'avidine fluorescente pour la comparaison. La couche est fixe, il n'y a pas de zone claire. (b) Profil d'intensité le long de la ligne en (c).

3.4.2. Bicouche lipidique sur une surface plane

Une fois que la calibration de la balance de Langmuir est effectuée, nous pouvons l'utiliser pour préparer des bicouches avec notre molécule d'intérêt, le DOPC. Nous avons préparé des bicouches lipidiques supportées sur un substrat de verre puis nous avons étudié les propriétés de cette bicouche en FCSrv à l'Institut Fresnel. Ainsi nous pouvons comparer les résultats obtenus sur verre et sur verre structuré.

Une bicouche lipidique est préparée par la technique de LB/LS. Cette bicouche est préparée à base de DOPC et d'un lipide marqué avec du BODIPY. La première couche est déposée par la méthode de LB. Le dépôt est effectué à température ambiante : 10 μ l de solution de DOPC sont déposés sur la surface de l'eau dans la cuve. La barrière mobile se ferme pour compresser les phospholipides jusqu'à ce qu'ils soient en phase fluide à la pression de 25 mN/m. La lamelle de verre est remontée à la vitesse de 35 mm.s⁻¹. La deuxième couche est préparée par la méthode de LS. La cuve est nettoyée puis 10 μ l de solution de DOPC sont déposés dans la cuve puis compressés à 25 mN/m. La lamelle est alors mise en contact avec la surface de l'eau de façon à ce que les chaînes hydrophobes des monocouches soient en contact. Une pression est effectuée sur la lamelles pour faire fusionner les chaînes et obtenir une bicouche. La lamelle est alors plongée dans la cuve puis mise dans un porte échantillon qui lui permet de rester en milieu liquide. Les lamelles sont alors transportées dans la glace puis analysées par FCSrv à l'institut Fresnel.

Une courbe typiquement obtenue après traitement des données de FCSrv est présentée sur la figure 3.19 (insert à droite, les courbes théoriques). Les points proches de la limite de résolution ne sont pas valables et ont donc été supprimés. Nous observons une droite passant par l'origine. La courbe montre une diffusion libre de type mouvement brownien sur la surface, nous sommes donc en présence d'une bicouche stable. La constante de diffusion de la bicouche est déduite de la courbe $D = 1,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

3. Structuration topographique de substrats

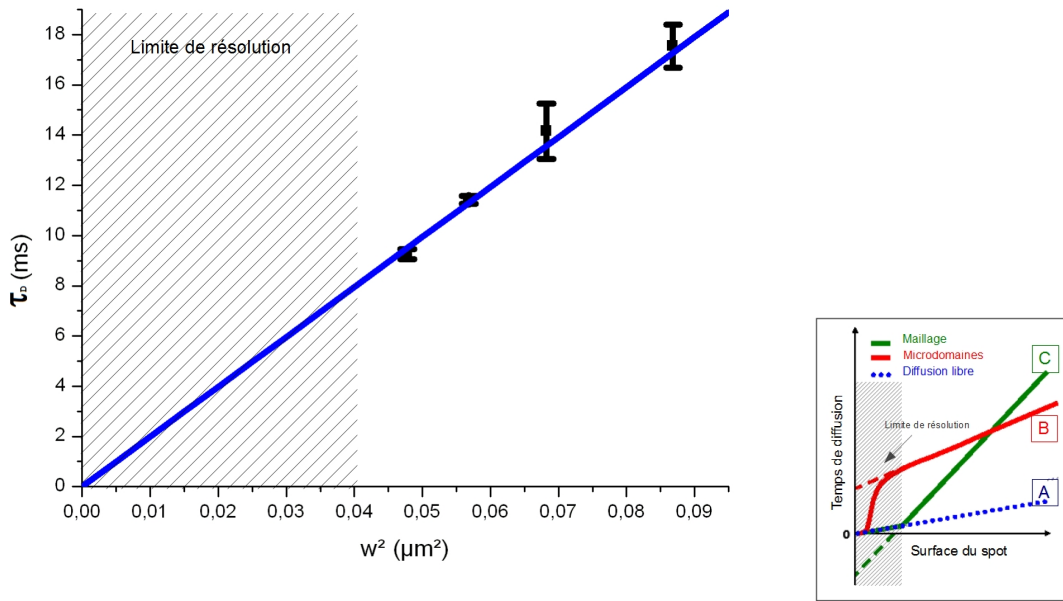


FIGURE 3.19.: *Mesure de la diffusion par FCSrv sur une bicouche fluide. La droite bleue est une extrapolation linéaire des mesures obtenues. Elle passe par 0. Pour chaque diamètre de laser, quatre mesures ont été faites, τ_D est obtenu par fit de la fonction d'autocorrélation. La moyenne des 4 valeurs donne τ_D , l'écart-type donne la barre d'erreur.*

3.4.3. Bicouche sur une surface nanostructurée

Nous avons utilisé les surfaces nanostructurées pour préparer une bicouche lipidique supportée structurée. Cette bicouche lipidique structurée permettrait de modéliser la membrane cellulaire structurée. Nous attendons donc que les mesures en FCSrv nous signalent des hétérogénéités qui montreraient une structuration de la bicouche.

Après l'analyse de la bicouche sur un substrat de verre, nous utilisons un substrat de verre structuré. La surface du verre est structurée grâce à la méthode mise au point à la section 3.3. Les lamelles de verre obtenues sont ensuite nettoyées selon la méthode expliquée précédemment (voir aussi Appendice B).

3.4.3.1. Caractéristiques de la surface utilisée

Nous avons analysé les caractéristiques du substrat de verre percé lors de la mise au point du protocole. Dans ce paragraphe nous caractérisons le substrat utilisé pour préparer la bicouche. La figure 3.20 montre une image AFM d'une lamelle de verre gravée avec la même membrane d'alumine que celle utilisée pour déposer les bicouches lipidiques supportées. Comme précédemment, nous avons effectué les mesures sur une collection de plus de 50 trous, d'après les profils en z obtenues à partir des images

3.4. Application des nanostructures pour la structuration de bicouches lipidiques

AFM. Nous avons mesuré :

- la largeur à mi-hauteur des trous
- la profondeur des trous
- la distance entre deux trous

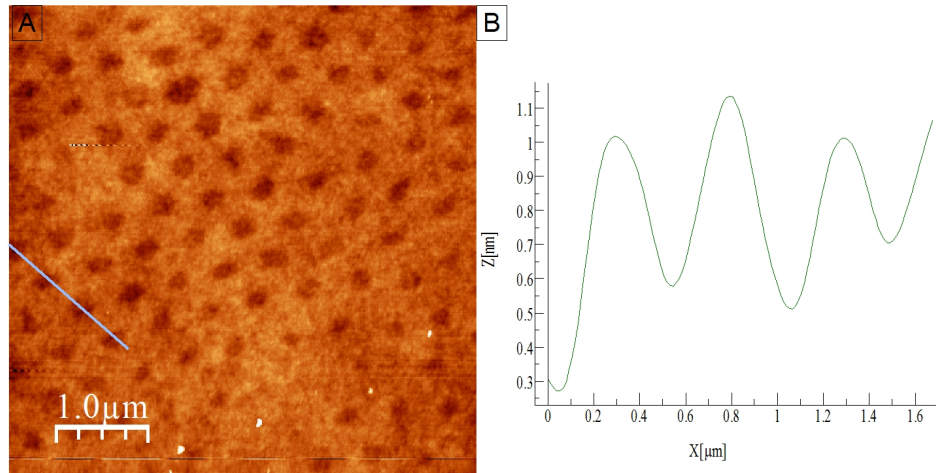


FIGURE 3.20.: A) Une lamelle de verre structurée observée par AFM. B) Profil en z d'une collection de trous.

Le tableau 3.3 regroupe les valeurs moyennes calculées à partir des grandeurs mesurées. La figure 4.9 montre un histogramme des distributions. La largeur à mi-hauteur moyenne est de 230 ± 30 nm. La profondeur des trous est de $0,7 \pm 0,2$ nm. Le paramètre de maille du réseau est de 458 ± 81 nm.

	Moyenne	Écart type
Largeur à mi-hauteur (nm)	230 nm	± 30 nm
Distance (nm)	458 nm	± 81 nm
Profondeur (nm)	0,7 nm	$\pm 0,2$ nm

TABLE 3.3.: Grandeurs caractéristiques moyennes mesurées sur les lamelles de verre structurées.

Le diamètre des trous ainsi que leur profondeur sont légèrement inférieur à ceux obtenus sur les lamelles ayant été utilisées pour la mise au point du protocole.

3. Structuration topographique de substrats

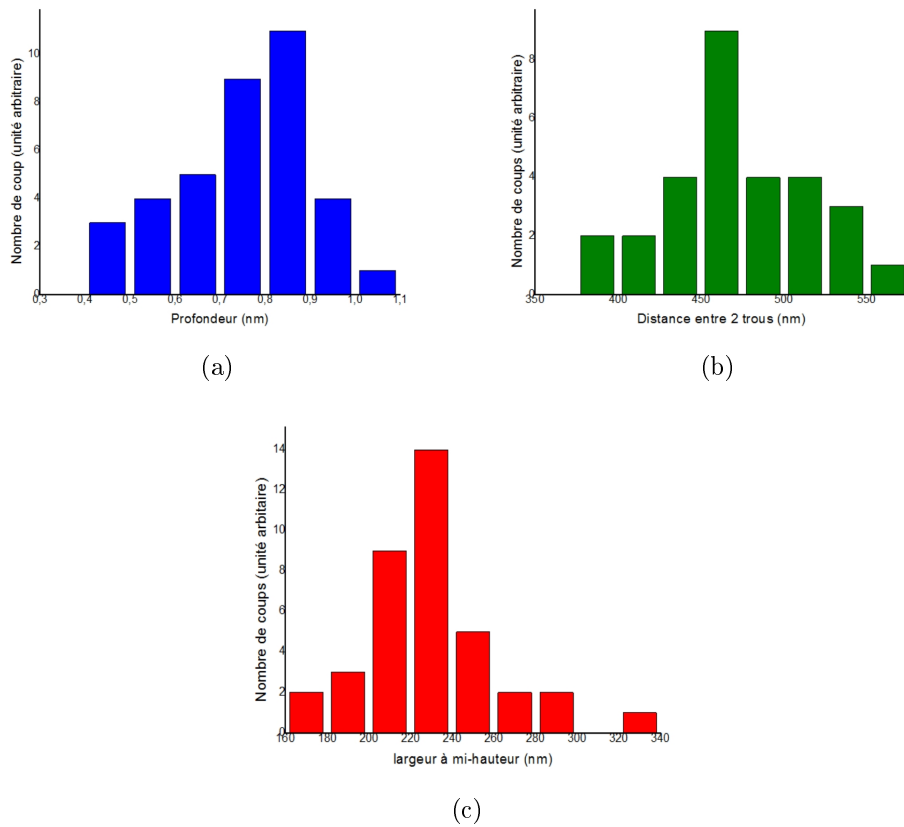


FIGURE 3.21.: *Statistique sur le verre percé. En (a) la distribution de la profondeur des plots. En (b) la distribution des diamètres des trous obtenus en mesurant la largeur à mi-hauteur. En (c) la distribution du paramètre de maille.*

3.4.3.2. Caractéristiques de la bicouche lipidique

Une bicouche de DOPC est déposée par LB-LS selon des paramètres exactement identiques à ceux utilisés pour le dépôt sur une lamelle de verre plane (figure 3.22b). La figure 3.22b montre la courbe de dépôt du DOPC. De la même façon que nous l'avons expliqué précédemment, l'échantillon est transporté puis analysé par FCSrv à l'institut Fresnel.

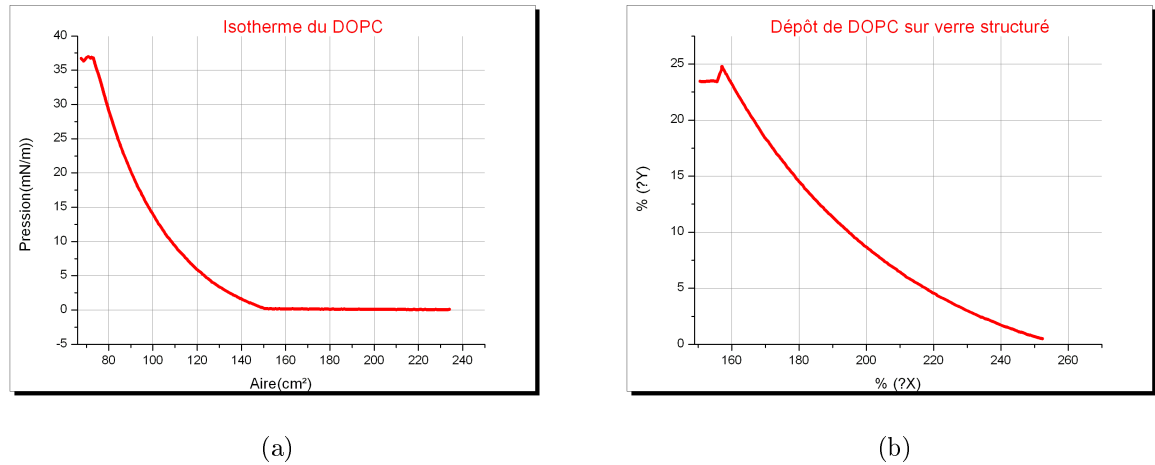


FIGURE 3.22.: a) Isotherme du DOPC, b) courbe de dépôt du DOPC

Les résultats obtenus par FCSrv sur une bicouche déposée sur substrat structuré apparaissent sur la figure 3.23. La courbe tracée est $\tau_D=f(\omega^2)$. La droite en vert est une régression linéaire effectuée sur les mesures. La droite coupe l'axe des ordonnées dans la partie négative de celui-ci (voir figure 2.39). Cela montre donc que la diffusion est non brownienne comme nous l'avons attendue.

La figure 3.24 montre un schéma récapitulatif des deux types de diffusions non browniennes envisagées : en (a) la probabilité passer d'un domaine à l'autre est asymétrique ; en (b) un maillage sépare les domaines, la probabilité d'entrée et de sortie est symétrique. La figure figure 3.25 illustre une possibilité envisagée de morphologie de la bicouche supportée dans chacun des cas. La courbe est similaire aux courbes obtenues par simulation numérique dans la cas d'une bicouche lipidique qui serait compartimentée par des barrières poreuses. Nous pensons donc être en présence de structures dans la bicouche lipidique qui obéiraient à la loi (B). Les phospholipides sont soumis à un réseau de barrières dont la probabilité de traverser est non nulle. On peut imaginer que les lipides de la bicouche se déplacent dans les structures avec une constante de diffusion D et « sautent » du trous vers la surface (figure 3.25). En effet, la taille moyenne des trous est de 230 nm et la distance interpore est de 458 nm ce qui donne une distance de 228 nm pour la surface de verre entre les trous.

3. Structuration topographique de substrats

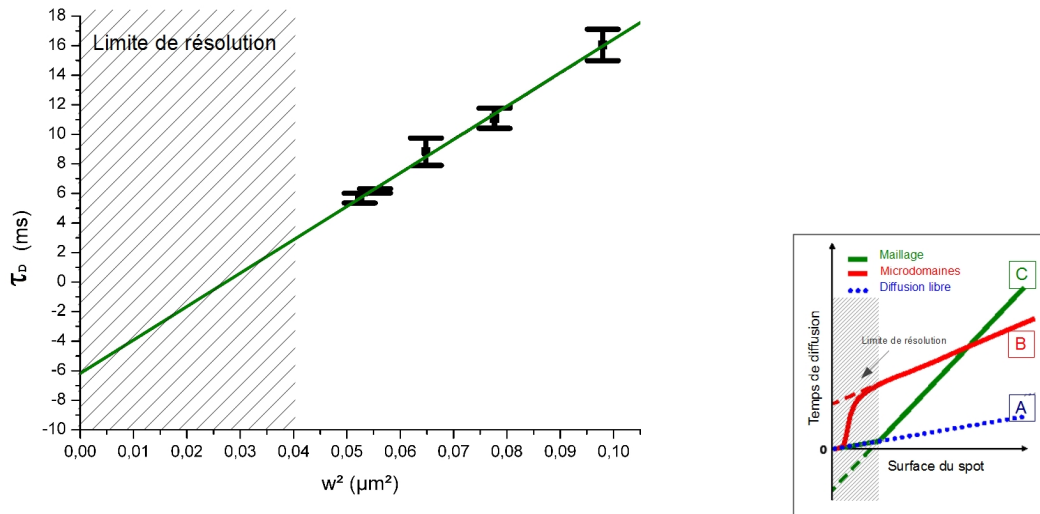


FIGURE 3.23.: *Mesure des propriétés de diffusion par FCSrv sur une bicouche lipidique supportée déposée sur une lamelle de verre structurée. La droite verte est une extrapolation linéaire des mesures obtenues. La courbe coupe l'axe des ordonnées dans la partie négative de la courbe. Pour chaque diamètre de laser, quatre mesures ont été faites, τ_D est obtenu par fit de la fonction d'autocorrélation. La moyenne des 4 valeurs donne τ_D , l'écart-type donne la barre d'erreur.*

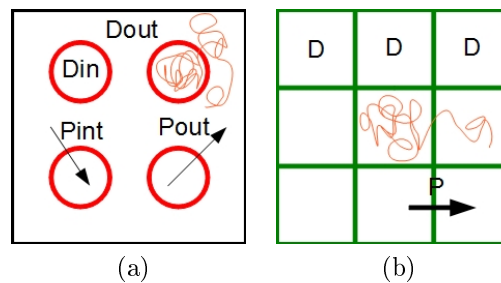


FIGURE 3.24.: *Schéma récapitulatif des deux modèles numériques de comportement de bicouches en FCSrv pour des surfaces hétérogènes. a) Des domaines dont la probabilité d'entrée et sortie est asymétrique. b) Un maillage sépare des domaines où la probabilité d'entrée et de sortie est symétrique.*

3.4. Application des nanostructures pour la structuration de bicouches lipidiques

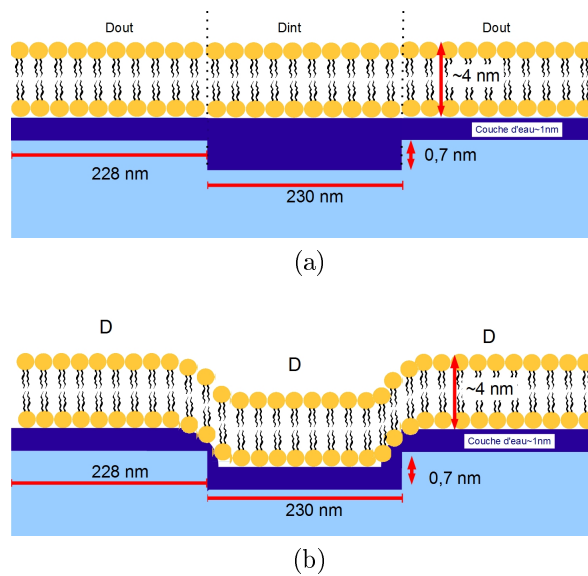


FIGURE 3.25.: Schémas montrant deux configurations possibles pour la bicouche phospholipides sur la surface de verre structurée. En (a), la bicouche est plus « proche » du verre en dehors des structures et plus éloignée en dehors. Il est alors envisageable que la constante de diffusion soit inférieure lorsque la bicouche est ralentie par le verre, c'est à dire hors des structures et plus grande dans les structures. En (b), la bicouche est toujours à la même distance du verre, la constante de diffusion est la même dans les deux cas. La « marche » constitue la barrière franchissable pour les lipides.

3.5. Discussion conclusion et perspectives

Nous venons de vous présenter le procédé mis au point pour obtenir des surfaces de verre nanostructurées dont nous nous sommes ensuite servis pour une application biologique. Le substrat structuré est utilisé pour préparer une bicouche lipidique comportant des hétérogénéités pouvant par exemple imiter les radeaux cellulaires. Dans ce but, nous avons mis au point un protocole permettant la structuration de surfaces de verre en utilisant un masque d'alumine poreuse.

Le masque est préparé par anodisation de l'aluminium puis l'ouverture des pores de part et d'autre. Le protocole de fabrication est parfaitement reproductible pour la fabrication de membranes d'alumine anodisées à 40 V (le diamètre théorique du pore : 40 nm) et très peu sensible à de faibles variations des paramètres de préparation. En effet, la variation de quelques degrés n'a pas montré de différences de structuration et celle de quelques volt non plus. La 1ère anodisation a duré 12 h mais nous avons pu observer qu'une 1ère anodisation de 1 h permet de pré-structurer suffisamment l'alumine pour obtenir des membranes suffisamment organisées. A partir de là, la dissolution de l'alumine dans l'acide chromique est très rapide (15 min à 70°C) et des membranes peuvent être préparées très rapidement (environ 2h). Le protocole de préparation des membranes d'alumine anodisées à 195 V (diamètre théorique de 200 nm) est moins reproductible. En effet, elles sont soumises à des « breakdown » qui sont fortement dépendants de la température. Nous avons vérifié que l'augmentation de la température de la solution de 1°C induit un point d'attaque immédiat sur la surface d'aluminium. De plus une variation de la tension en tout début d'anodisation crée aussi une attaque. Il arrive parfois des « breakdown » dont la cause demeure inconnue. Environ une membrane d'alumine sur 5 est abîmée suite à une attaque de la surface en cours d'anodisation. Elles ne sont pas forcément inutilisables pour autant, si le « breakdown » à lieu assez tard au cours de la deuxième anodisation, l'alumine est déjà organisée et donc utilisable. L'ouverture du fond des pores est faite avec de l'acide phosphorique. Nous avons pu vérifier que cette ouverture n'est pas homogène. Nous avons un contrôle partiel sur cette ouverture. L'ouverture à 45°C est trop rapide pour être facile à maîtriser, à 4°C, l'ouverture est trop lente et cela induit des problèmes. En outre, la couche de polystyrène qui protège la surface de l'alumine peut se détacher en fonction de la durée d'immersion dans l'acide. L'alumine se retrouve donc attaquée de part et d'autre. La variation de la concentration en acide n'a pas montré de différences. Pour améliorer cela, il faudrait obtenir soit une température intermédiaire entre 45°C et 4°C à l'aide d'un contrôleur de température. Une autre solution envisagée serait d'utiliser une solution d'acide très diluée. Il a été aussi envisagé d'agiter la solution pour l'homogénéiser cependant la fragilité l'alumine ne le permet pas. De plus nous avons remarqué que

l'ouverture dans l'acide provoque un élargissement des pores. Le diamètre réel après ouverture est plus grand que le diamètre théorique. La méthode d'ouverture du fond des pores par voie chimique n'est donc pas bien adaptée à une ouverture contrôlée. La mise au point d'une nouvelle technique d'ouverture du fond des pores par l'utilisation d'une tension électrique appliquée après l'anodisation pourrait permettre de mieux contrôler cette étape [121, 122].

Les membranes d'alumine poreuses sont polydomaines organisées selon un réseau hexagonal. Une technique permet d'améliorer encore l'organisation de surface. Il s'agit d'effectuer un nanoimprint sur la surface de l'aluminium avec des motifs. La croissance de l'alumine se fera alors à partir de cette pré-structuration de la surface et la croissance sera bien organisée [123, 124].

Le protocole permettant le transfert des motifs présents sur le masque d'alumine vers la surface de verre est reproductible. Il a été fait sur un nombre significatif d'échantillons. La largeur des trous varie selon l'état d'ouverture du fond des pores de la membrane d'alumine. Les lamelles de verre sont réutilisables un grand nombre de fois. Le protocole nécessite peu d'alumine pour être réalisé : plusieurs échantillons peuvent être préparés avec un seul morceau d'alumine d'environ 1cm^2 . L'alumine est érodée par la gravure mais beaucoup moins vite que le verre. De plus, son épaisseur est grande ($1\ \mu\text{m}$) ce qui veut dire que même lorsque quelques dizaines nanomètres sont érodés, la membrane est toujours utilisable. Elle est décollée en soufflant délicatement de l'air comprimé après la gravure. En effet, comme la membrane adhère faiblement sur le verre, elle se détache et elle peut être utilisée pour préparer un nouvel échantillon. Nous avons testé l'utilisation du même morceau d'alumine cinq fois. Nous n'avons pas essayé de profondeur de trous différents car nous voulions qu'ils soient d'un ordre de grandeur proche de l'épaisseur des membranes cellulaires. La profondeur de gravure du verre est limitée par la différence de vitesse de gravure verre/alumine. Lorsque la totalité de l'alumine est attaqué, il n'est plus possible d'utiliser le masque.

La mise en place du protocole a été faite pour la préparation de bicouches lipidiques structurées. Nous avons calibré la balance de Langmuir pour pouvoir l'utiliser pour un dépôt de bicouches lipidiques de bonne qualité. Nous avons préparé des bicouches lipidiques supportées stables sur un substrat structuré. Les études préliminaires de diffusion effectuées en FCSrv ont mis en évidence des hétérogénéités dans la bicouche lipidique correspondantes au modèle numérique de domaines séparés par des barrières poreuses. Les premiers essais montrent une tendance vers une structuration correspondant à des domaines séparés par une barrière dont la probabilité d'entrée et de sortie est la même. Des mesures en AFM en milieu liquide sont nécessaires pour connaître la morphologie de la bicouche lipidique. Le modèle numérique en FCSrv doit être affiné

3. Structuration topographique de substrats

pour rendre compte des observations. Enfin, il est important d'effectuer des mesures en FCSrv sur un grand nombre d'échantillons pour être statistiquement valables. Une fois ces propriétés bien connues ce substrat structuré pourrait être utilisé pour étudier l'adhésion de vésicules géantes ou bien de cellules.

L'utilisation de bicouches lipidiques structurées peut permettre de mimer des structures biologiques réelles telles que les hétérogénéités de la membrane cellulaire mais pas seulement [125]. Une grande partie de cette recherche est développée dans le but de pouvoir créer un jour des « puces à récepteurs membranaires » [126] dont la fonction en présence de divers agonistes ou produits pharmacologiques pourrait ensuite être testée de façon efficace par les entreprises pharmaceutiques .

4. Structuration biochimique de substrats

4.1. Introduction

Dans ce chapitre nous proposons de préparer un substrat structuré biofonctionnalisé permettant de simuler l'adhésion cellule-matrice extracellulaire. Pour cela nous utilisons comme masque les membranes d'alumine poreuses. Nous décrirons dans ce chapitre les étapes du protocole mis en place pour nanostructurer une surface avec des protéines. Les deux organo-silanes : l'OTS et l'APTES, molécules faisant une liaison covalente avec la surface et une liaison peptide avec les protéines sont utilisés pour nanostructurer la surface. La fonction amine est utilisée pour accrocher des anticorps modèles.

Des études sur des cellules vivantes ont été effectuées à l'échelle du micron, dans le but de se familiariser avec l'adhésion de cellules sur des surfaces structurées. Pour cela, nous utilisons le micro-contact printing pour le dépôt structuré de protéines et nous observons l'adhésion de cellules sur ces structures fonctionnalisées.

Le chapitre se partagera donc en deux parties. La première partie expliquera les étapes nécessaires à la préparation de notre substrat d'intérêt, c'est à dire le substrat structuré à l'échelle nanométrique. Nous expliquerons les étapes de structuration de la surface avec de l'OTS qui amèneront ensuite à la bio-fonctionnalisation. La deuxième partie présente la préparation d'une structuration à l'échelle micrométrique. Nous décrirons la mise en place du micro-contact printing, son utilisation pour structurer la surface et enfin la mise en contact de cette surface avec des cellules vivantes..

4.2. Préparation d'un gabarit pour la nano-structuration chimique

4.2.1. Dépôt direct à travers l'alumine poreuse

Au chapitre précédent, nous avons utilisé des membranes d'alumine poreuses dont le fond était ouvert comme masque de gravure. Nous proposons maintenant de les utiliser de la même façon comme masque d'évaporation pour les organo-silanes. La figure 4.1a décrit le protocole utilisé.

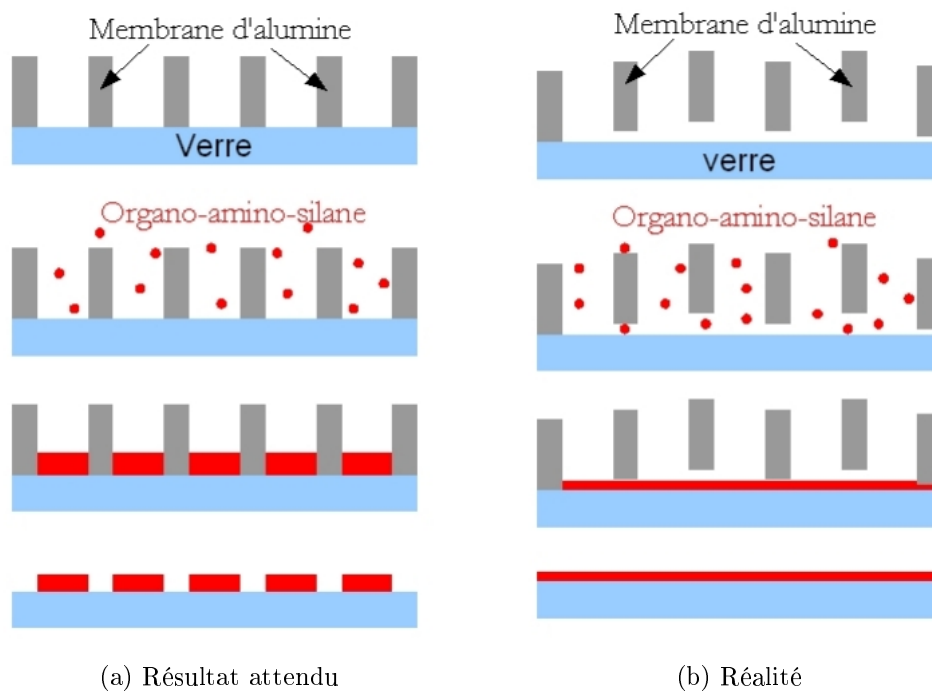


FIGURE 4.1.: *Protocole mis en place pour le dépôt d'organo-amino-silanes. La membrane d'alumine est collée sur la surface de SiO_2 avec une goutte de solvant. (a) Les organo-amino-silanes sont évaporés à travers la membrane et se déposent sur le substrat non protégé. Après retrait de la membrane, il est attendu une structuration de surface. (b) Cependant la surface de la membrane est rugueuse, elle n'adhère pas sur la surface de façon homogène. Les silanes passent en dessous et s'étalent sur toute la surface. Le schéma n'est pas à l'échelle.*

La membrane d'alumine est collée avec une goutte d'éthanol. L'OTS est déposé dans une coupelle puis placée dans le dessiccateur avec l'échantillon, le vide est fait durant 30 min et le tout est chauffé à 45°C. L'organo-amino silane devrait se déposer sur les parties non protégées par l'alumine. Après retrait de l'alumine par soufflage d'air comprimé, la surface devrait être structurée. Lors des observations en AFM aucune structuration de surface n'a été observée. Pour comprendre, nous avons observé l'interface entre la membrane d'alumine poreuse et la surface du silicium au MEB.

La figure 4.2a représente une image MEB de l'interface entre la membrane et le substrat. Il apparaît que l'alumine de la membrane n'adhère pas complètement à la

4.2. Préparation d'un gabarit pour la nano-structuration chimique

surface. La figure 4.2b est une vue de la surface de la membrane où nous pouvons observer que la surface n'est pas plane mais forme des "cloques".

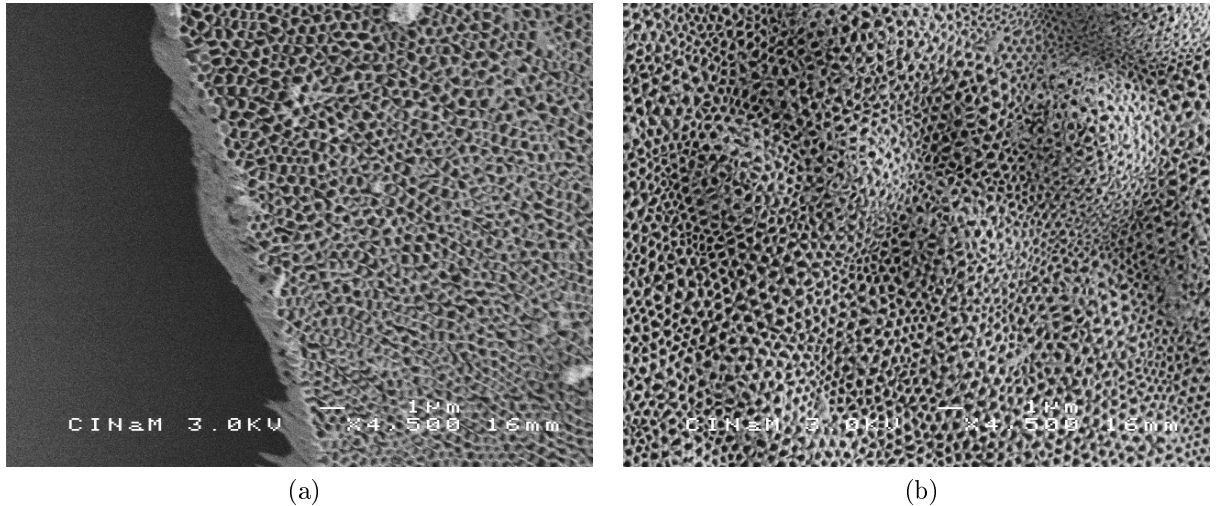


FIGURE 4.2.: Image MEB d'une membrane d'alumine collée avec une goutte d'éthanol sur une surface de verre. (a) Adhésion en bord de membrane (inclinaison à 30°). (b) Vue de la surface de la membrane.

La surface de l'alumine est rugueuse, l'alumine n'adhère pas parfaitement sur la surface de SiO_2 (figure 4.1b). L'évaporation de molécules à travers cette membrane donne une couche homogène alors que nous voulons des nano-structures. Il a donc été nécessaire d'avoir recours à une méthode plus complexe. Nous avons dû mettre au point un protocole dans lequel la rugosité de la membrane est compensée par une couche de polymère.

4.2.2. Préparation de gabarits composites

4.2.2.1. Préparation de gabarits avec des membranes 200 nm

Une goutte de PMMA dissous dans éthyl-lactate à 2% est déposée par spin-coating sur le substrat propre (section 2.2). La couche de PMMA doit être la plus fine possible tout en collant la membrane. La membrane d'alumine dont les pores sont ouverts de part et d'autre est posée sur la couche de PMMA qui sert à la fois de colle et compense les irrégularités de la surface et de la membrane. Le substrat est chauffé pendant 10 min à 160°C pour polymériser le PMMA et évaporer les solvants. La RIE est réalisée à travers la membrane d'alumine qui joue le rôle de masque (figure 4.3). Le gaz injecté pour la RIE est de l'oxygène. Deux paramètres de la RIE doivent être contrôlés avec soin : la puissance de la radio-fréquence et le temps d'exposition. S'ils sont trop élevés, le

4. Structuration biochimique de substrats

plasma d'oxygène attaque aussi la surface du substrat par impact des ions d'oxygène. Nous obtenons alors des trous dans le substrat (figure 4.4).

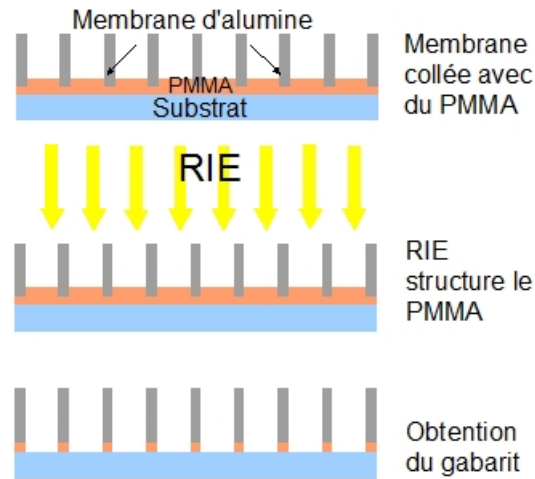


FIGURE 4.3.: Méthode de préparation d'un gabarit composé d'une membrane d'alumine et de PMMA. La membrane d'alumine est collée grâce à une couche de PMMA spincoatée. La RIE est faite : le PMMA protégé par l'alumine reste intact alors que celui non protégé est retiré. Un gabarit est obtenu. Le schéma n'est pas à l'échelle.

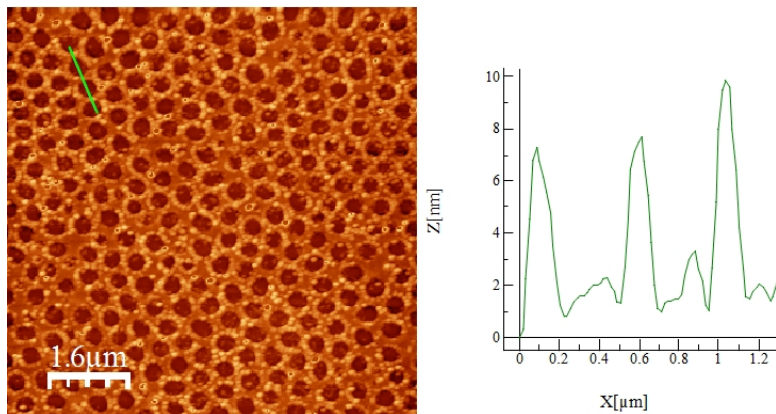


FIGURE 4.4.: Image AFM d'un substrat percé par un impact d'ions. Le fond des trous contient de l'amino-silane.

Nous utilisons des membranes d'alumine poreuses anodisées à 195 V, 0°C durant 25 min (seconde anodisation) dont le diamètre théorique est de 200 nm. Le substrat utilisé est un wafer de silicium. Nous avons essayé deux épaisseurs de PMMA : 50 nm et 100 nm. Pour 50 nm, l'adhésion n'est pas assez forte. Les paramètres de la RIE sont : 30 W, 1 min 30.

4.2. Préparation d'un gabarit pour la nano-structuration chimique

Nous avons voulu savoir si le PMMA était structuré et s'il avait bien été retiré jusqu'à l'interface avec le silicium. En effet la surface peut être structurée mais il peut rester une couche de PMMA au fond des structures qui nous empêche de déposer notre molécule d'intérêt (figure 4.5A).

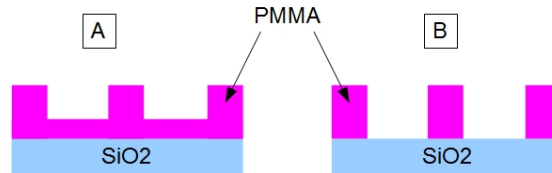
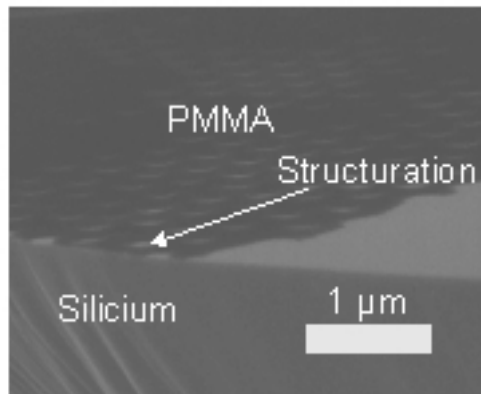


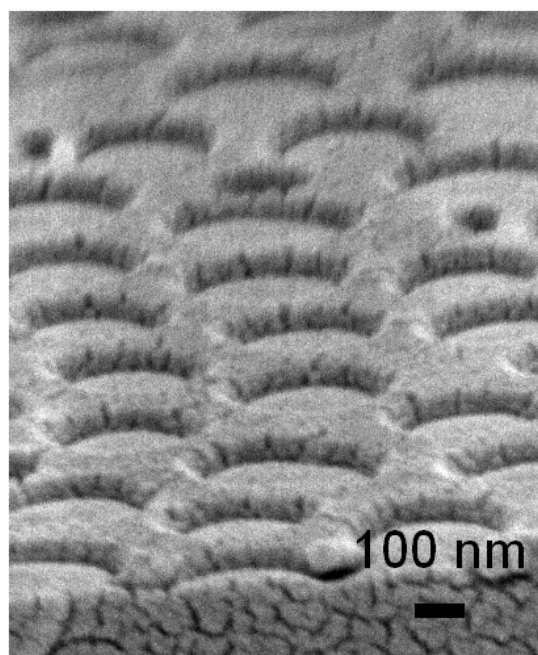
FIGURE 4.5.: (A) PMMA structuré en surface mais la gravure est incomplète. (B) La gravure est complète et permet un dépôt éventuel de molécule sur le substrat de SiO_2 .

Pour caractériser nos échantillons, nous utilisons le MEB. Le silicium est un matériau qui évacue bien les charges, il ne charge pas au contact des électrons et apparaît en gris clair. Le PMMA, au contraire, est un isolant, il évacue mal les électrons et il apparaît en noir. Nous voulons vérifier au MEB que le fond des pores est gris clair. Avant l'observation au MEB, nous devons retirer l'alumine et cliver le silicium au niveau de la couche de PMMA. L'échantillon est immergé quelques minutes dans l'azote liquide pour enlever la membrane d'alumine et obtenir des bords nets au moment du clivage. L'échantillon est incliné pour voir au MEB l'interface entre la surface en silicium et le dépôt de PMMA. Sur la figure 4.6a nous observons sur la partie inférieure le wafer de silicium préalablement clivé (partie claire), au dessus en sombre apparaît la couche de PMMA sur laquelle on voit apparaître la structuration effectuée par la RIE. La partie claire à l'intérieur des pores montre le retrait total du PMMA dans les pores (figure 4.5B). Sur la figure 4.6b, une couche d'or a été ajoutée sur l'échantillon pour permettre une meilleure observation. On voit nettement la structuration du PMMA. Nous avons donc vérifié que nous avons un gabarit prêt pour l'évaporation d'organosilanes.

4. Structuration biochimique de substrats



(a)



(b)

FIGURE 4.6.: Images MEB d'une couche de PMMA structurée sur substrat de silicium. En (a), vue inclinée de 30° d'un échantillon sans aucun traitement de surface. Le silicium clivé apparaît en gris clair, le PMMA apparaît en noir. En (b), une couche d'or a été déposée sur la surface pour faciliter l'observation : zoom sur la structuration.

4.2.2.2. Préparation de gabarits sur silicium avec des membranes 40 nm

Des essais pour créer des structures plus petites ont été effectués avec des membranes d'alumine poreuses anodisées à 45 V, 6°C durant 45 min (seconde anodisation) dont le diamètre théorique est de 40 nm. La membrane d'alumine est collé comme précédemment par une couche de PMMA de 100 nm. Plusieurs puissances de RIE ont été testé allant de 15 W à 80 W. Après retrait de la membrane d'alumine, la couche de PMMA est visible a l'oeil nu sur la surface du silicium : une différence de couleur est observée entre la zone protégée par l'alumine et la zone non protégée. La surface du PMMA est observée en MEB. Il n'apparaît aucune structuration lors de l'observation au MEB même pour des puissances plus élevées en RIE (80 W) ainsi qu'avec d'autres gaz (SF6 et oxygène) (figure 4.7).

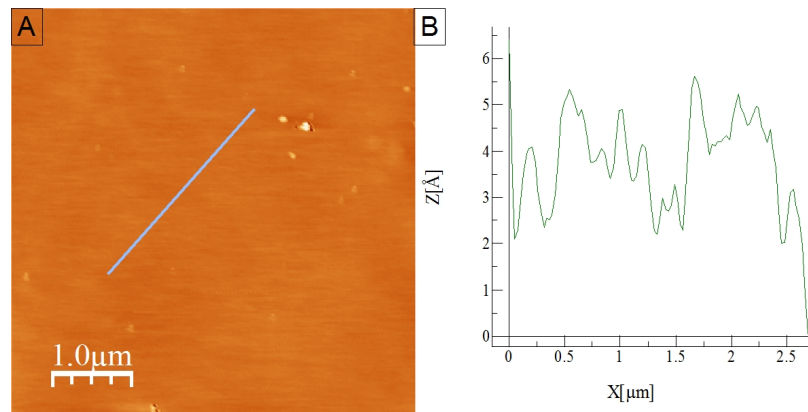


FIGURE 4.7.: *Essai de la structuration avec des membranes d'alumine comportant des pores de diamètre théorique de 40 nm. Image AFM de la couche de PMMA sur un wafer de silicium après le passage à la RIE : la surface est plane, il n'y a pas eu de structuration. La rugosité est très faible ($rms=0,26$ nm).*

Le rapport d'aspect des pores de la membrane semble être un paramètre important pour pouvoir structurer la surface à travers l'alumine. Il est défini par la hauteur divisée par le diamètre du pore. La hauteur des pores des membranes utilisées est de l'ordre du micron auquel s'ajoute l'épaisseur de PMMA de 100 nm, nous avons donc un rapport d'aspect d'environ 27. Dans le cas des membranes anodisées à 195 V nous avons 100 nm de PMMA plus 1000 nm d'alumine pour un diamètre de pores d'environ 400 nm soit un rapport d'aspect d'environ 2,75 ou 5,5 avec le diamètre théorique (200 nm). D'après Kanamori et al. [127], il est possible de graver une surface de silicium en utilisant une membrane d'alumine comme masque de gravure. Ils utilisent des membranes comportant des pores de 60 nm de diamètre avec une hauteur de 700 nm ce qui donne un rapport d'aspect de 12. Avec des membranes de diamètre de pores de 50 nm, il serait donc possible de graver à travers des pores de 600 nm de hauteur, c'est

4. Structuration biochimique de substrats

à dire 500 nm d'alumine plus 100 nm de PMMA. La manipulation d'une membrane de cette épaisseur est très difficile.

4.2.2.3. Préparation de gabarits sur verre avec des membranes 200 nm

Plusieurs épaisseurs de PMMA ont été testées : 100 nm, 200 nm, 400 nm et 500 nm. A partir d'un dépôt de PMMA d'épaisseur de 500 nm, la membrane d'alumine adhère. La RIE a été faite avec plusieurs puissances : 15 W, 30 W et 80 W (pression 20 mTorr). Le verre et le PMMA chargent au contact des électrons : cela ne permet pas d'obtenir un contraste suffisant entre les deux lorsqu'ils sont caractérisés en MEB. Nous avons donc réalisé des observations à l'AFM. L'alumine est retirée en envoyant de l'air à haute pression sur l'échantillon pour permettre l'observation directe de la surface de PMMA (figure 4.8). L'AFM permet de vérifier que la surface du PMMA est structurée mais ne permet pas d'être sûr que le PMMA a été retiré jusqu'au contact de la surface de verre (figure 4.5).

La figure 4.8 montre la surface du PMMA après traitement par la RIE au travers du masque d'alumine ($P=15\text{ W}$, $\Delta t=2\text{ min}30$). On observe la formation d'un réseau hexagonal de trous dont nous avons mesuré les paramètres sur plus de 50 trous obtenus à partir des images AFM.

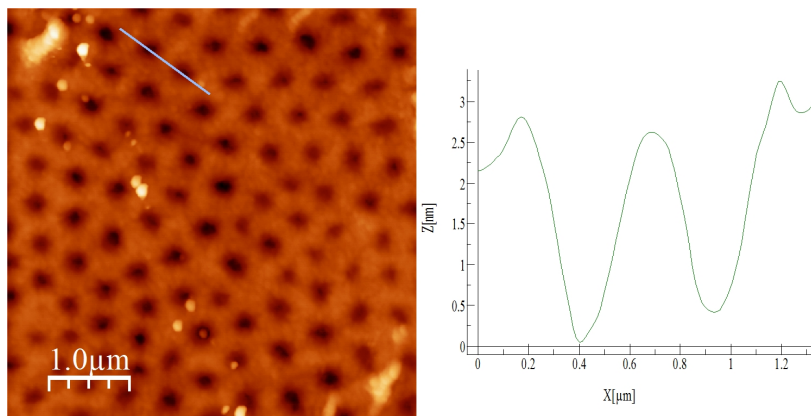


FIGURE 4.8.: *Un couche de PMMA de 500 nm déposée sur un substrat de verre et structurée par la RIE (caractérisé par AFM à l'air). On observe une structuration comportant un réseau hexagonal de trous similaire aux motifs du masque d'alumine utilisé.*

Nous avons mesuré :

- la largeur à mi-hauteur de la profondeur des pores
- la distance entre deux pores
- la profondeur d'un pore

4.2. Préparation d'un gabarit pour la nano-structuration chimique

Les tailles moyennes sont répertoriées dans le tableau 4.1. La figure 4.9 présente les distributions des différentes grandeurs mesurées. La profondeur moyenne mesurée est de 2,2 nm, la distance entre les pores est de 510 nm. La largeur d'un pore est de 229 nm.

	Pores	Écart-type
Largeur à mi-hauteur (nm)	229	± 47
Distance (nm)	510	± 41
Profondeur (nm)	2,2	$\pm 0,4$

TABLE 4.1.: Mesures des grandeurs caractéristiques du PMMA structuré.

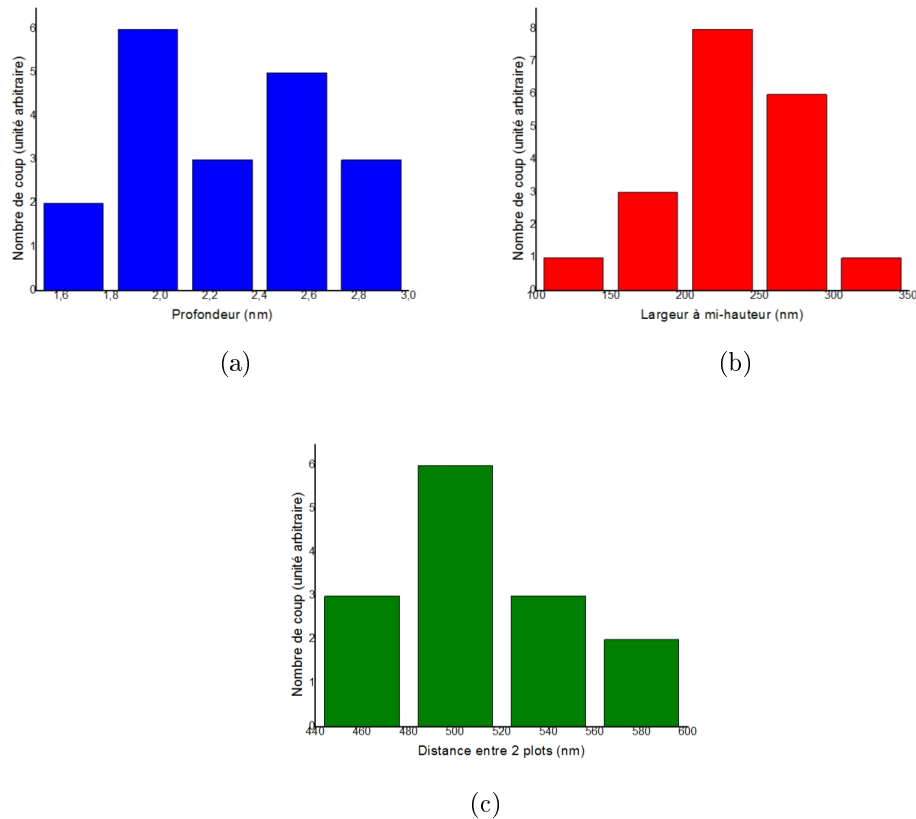


FIGURE 4.9.: Statistique sur le PMMA structuré déposé sur verre. En (a) la distribution des profondeurs de trous. En (b), la distribution des largeurs des trous en mesurant de la largeur à mi-hauteur. En (c), la distribution des distances entre les trous.

L'épaisseur de la couche de PMMA est de 500 nm. Il est possible que la surface du PMMA soit structurée alors que le PMMA n'a pas été complètement retiré jusqu'à la surface du substrat de verre. Il n'est pas possible de mesurer une profondeur de pores

4. Structuration biochimique de substrats

trop importante à l'AFM lorsqu'il s'agit de trous. D'après les données du constructeur, la pointe mesure 133 nm de large à la hauteur de 500 nm. Elle pourrait donc donner accès à la structure des pores jusqu'au fond des pores. Cependant, la profondeur moyenne mesurée est de 2,2 nm ce qui est très faible et laisse penser que le PMMA est structuré en surface seulement (figure 4.5A). Une méthode possible permettant de vérifier que seule la surface est structurée est le dépôt de molécules. Nous avons donc évaporé de l'OTS sans obtenir de structuration lors de l'observation à l'AFM.

4.3. Structuration avec des organo-silanes

4.3.1. Détection d'organo-silanes

Nous voulons vérifier que nous effectuons un dépôt d'organo-silane avec le protocole présenté. Pour cela, nous avons fait un dépôt d'APTÉS sur une surface de verre et de silicium. Nous avons déposé l'APTÉS en phase vapeur à la température de 45°C durant 30 min (voir sous-section 2.4.2). Nous savons que la surface devient hydrophobe après la silanisation. Nous avons ensuite effectué trois tests :

- l'observation de la surface en AFM.
- l'observation de l'interface air/eau d'une goutte d'eau déposée sur la surface silanisée observée en RICM.
- la mesure de l'angle de contact (mesure effectuée en collaboration avec Anne Charrier, CINaM).

La figure 4.10 montre une image AFM d'un substrat de silicium couvert d'APTÉS. La couche est homogène d'une faible rugosité.

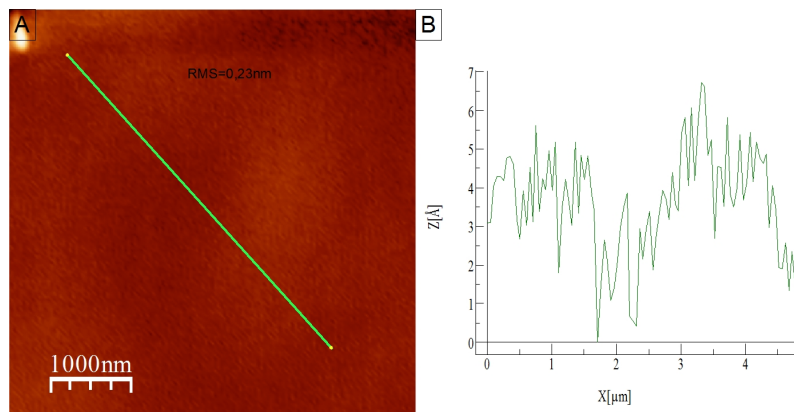


FIGURE 4.10.: Image AFM à l'air d'une monocouche d'APTÉS sur wafer de silicium. A) La surface. B) Profil en z

Nous préparons deux lamelles de verre. La première est couverte d'APTES, alors que la deuxième est très bien nettoyée pour être hydrophile. Une goutte d'eau est déposée sur la surface de chacune des lamelles. L'interface entre la goutte d'eau et l'air est observée en RICM. La figure 4.11 montre le résultat obtenu. Les franges d'interférences sont très proches dans le cas de la lamelle silanisée alors qu'elles sont très nombreuses et éloignées dans le cas de la lamelle de verre simple. Les franges observées à partir de la lamelle silanisée sont éloignées en moyenne de 533 nm. Dans le cas de la lamelle de verre, les franges sont espacées en moyenne de 2,5 μm . Leur nombre est élevé : on en compte en moyenne 24 dans la zone d'observation limitée par le diaphragme de champs. La comparaison entre les deux lamelles montre l'hydrophobicité de la lamelle après dépôt d'organo-silanes. Cette méthode permet de vérifier l'hydrophobicité de la lamelle mais ne permet pas de mesurer un angle de contact réel. En effet, la taille de la goutte d'eau est trop importante, elle s'étale non seulement selon le degré d'hydrophilicité de la surface mais aussi selon son poids. Pour faire une mesure quantitative, il faut pouvoir contrôler très précisément la taille de la goutte d'eau déposée.

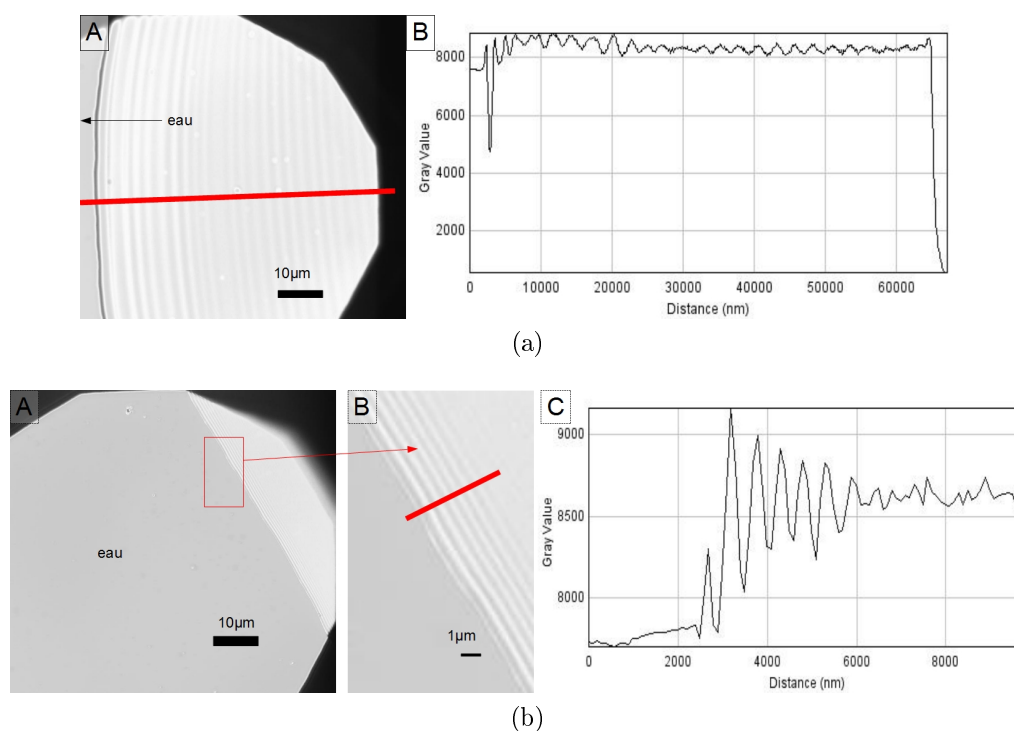


FIGURE 4.11.: a) Image en RICM d'une goutte d'eau sur une surface de verre propre : (A) Image d'interface (B) Profil de l'intensité en niveau de gris. b) Image en RICM d'une goutte d'eau sur une surface couverte d'APTES : (A) Image d'interface (B) Zoom (C) Profil de l'intensité en niveau de gris.

Sur la figure 4.12 apparaît l'image d'une goutte d'eau de 2 μl sur une surface de verre puis de verre silanisé. L'angle de contact a été mesuré à partir d'un FIT numérique. Il

4. Structuration biochimique de substrats

est trop faible pour être mesuré dans le cas du verre. Pour la lamelle silanisée, il est de 53° . Cela correspond bien aux valeurs attendues [70].

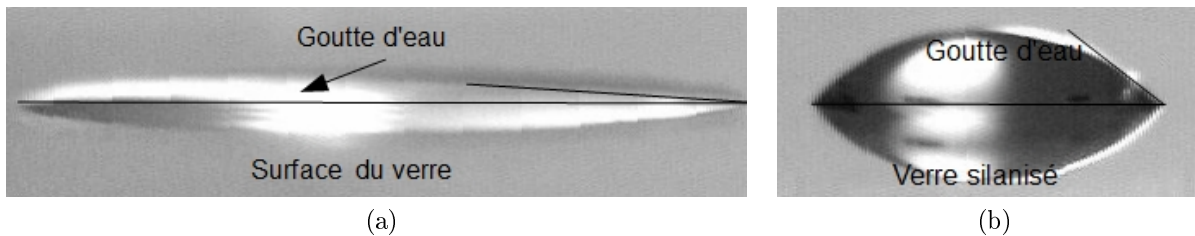


FIGURE 4.12.: *Mesure de l'angle de contact. L'angle est mesuré à partir de l'image de la goutte. La goutte est réfléchiée sur la surface. a) Sur verre b) Sur verre silanisé.*

Les trois tests effectués précédemment nous permettent de valider le protocole de dépôt d'APTES. Pour la suite, nous n'avons pas fait de mesures systématiques lors des dépôts d'APTES et OTS. Nous avons utilisé le RICM pour vérifier qualitativement les dépôts d'organo-silanes.

4.3.2. Structuration de surfaces avec de l'OTS

Le gabarit sur silicium préparé comme décrit à la sous-sous-section 4.2.2.1 est utilisé pour le dépôt d'organo-silane en phase vapeur. La figure 4.13 montre les étapes du protocole.

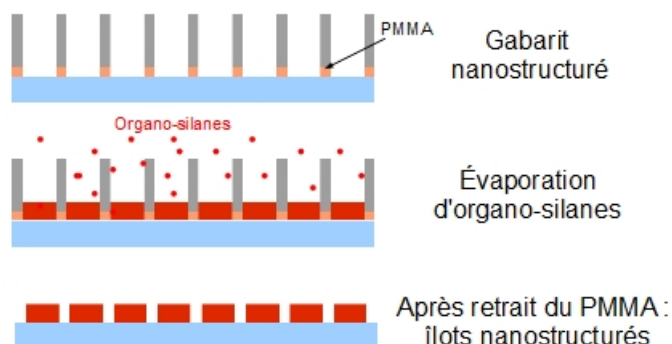


FIGURE 4.13.: *Nano-structuration de la surface par évaporation d'organo-silanes à travers le gabarit. Après retrait du PMMA des îlots d'OTS sont obtenus.*

L'OTS est déposé dans la coupelle, le vide est fait durant 30 min à température de 40°C . L'échantillon est placé dans une solution de chloroforme durant 2h. La solution est changée 2 fois pour un rinçage optimal. L'échantillon est enfin séché sous flux

d'azote. Un papier filtre permet de récupérer la membrane d'alumine qui est réutilisable. La figure 4.14 montre la surface caractérisée par AFM. Des plots organisés selon un réseau hexagonal similaire à celui de la membrane d'alumine sont observés. La figure 4.15 laisse apparaître un zoom sur la structure hexagonale.

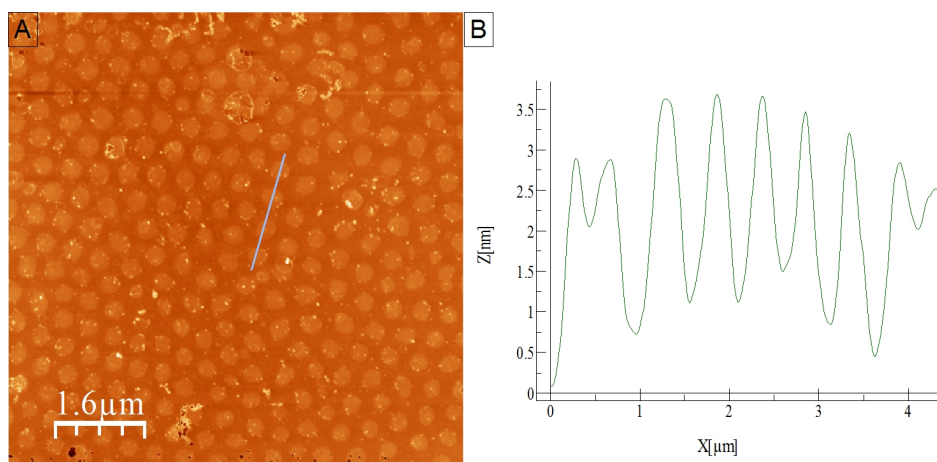


FIGURE 4.14.: A) Image AFM de la structuration de surface sur silicium par des plots d'OTS. B) Profil en z d'une collection de plots d'OTS.

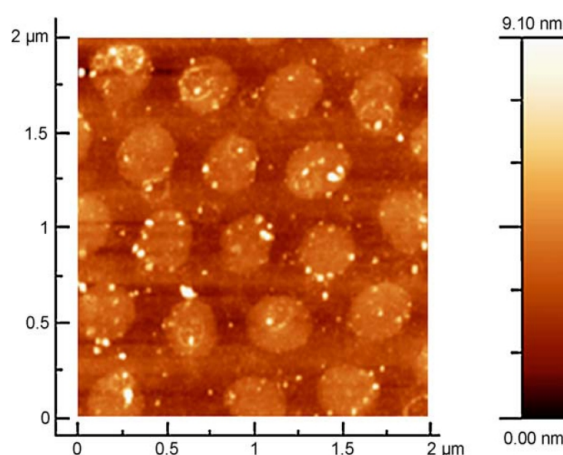


FIGURE 4.15.: Image AFM (zoom) de la structuration de surface sur silicium par des plots d'OTS.

Nous avons effectué la transformée de Fourier (FFT2D) de la surface de silicium structurée avec des plots d'OTS. La figure 4.16 montre l'image obtenue. La présence d'un anneau met en évidence la présence d'une organisation des plots.

Nous avons tracé le profil en z d'une collection de plots d'OTS mettant en évidence différents paramètres du réseau hexagonal de plots d'OTS :

- la distance entre deux plots

4. Structuration biochimique de substrats

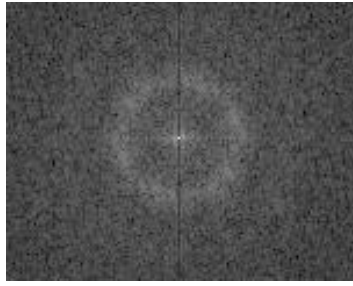


FIGURE 4.16.: Image dans l'espace de Fourier de la surface structurée avec des plots d'OTS. Un anneau montre une tendance à l'organisation.

- la hauteur des plots
- la largeur à mi-hauteur des plots

Les mesures sont effectuées sur une population de plus de 50 plots d'OTS observés sur les trois images AFM. Le tableau 4.2 répertorie les moyennes calculées. La figure 4.17 montre la répartition des 3 valeurs mesurées. Ainsi, nous constatons que nous avons la formation d'un réseau hexagonal de plots d'OTS très bien organisé dont la paramètre de maille est de 510 ± 28 nm. Les plots d'une hauteur moyenne de $2,0 \pm 0,4$ nm et d'une largeur moyenne de 309 nm ont une faible dispersion en taille de ± 48 nm c'est à dire 17%. La hauteur mesurée montre que les plots sont composés de monocouches d'OTS.

	Moyenne	Écart-type
Largeur à mi-hauteur (nm)	309	± 48
Distance (nm)	510	± 28
Hauteur (nm)	2	$\pm 0,4$

TABLE 4.2.: Tableau récapitulatif la distance moyenne entre deux plots d'OTS, de leur hauteur moyenne et de leur largeur à mi-hauteur.

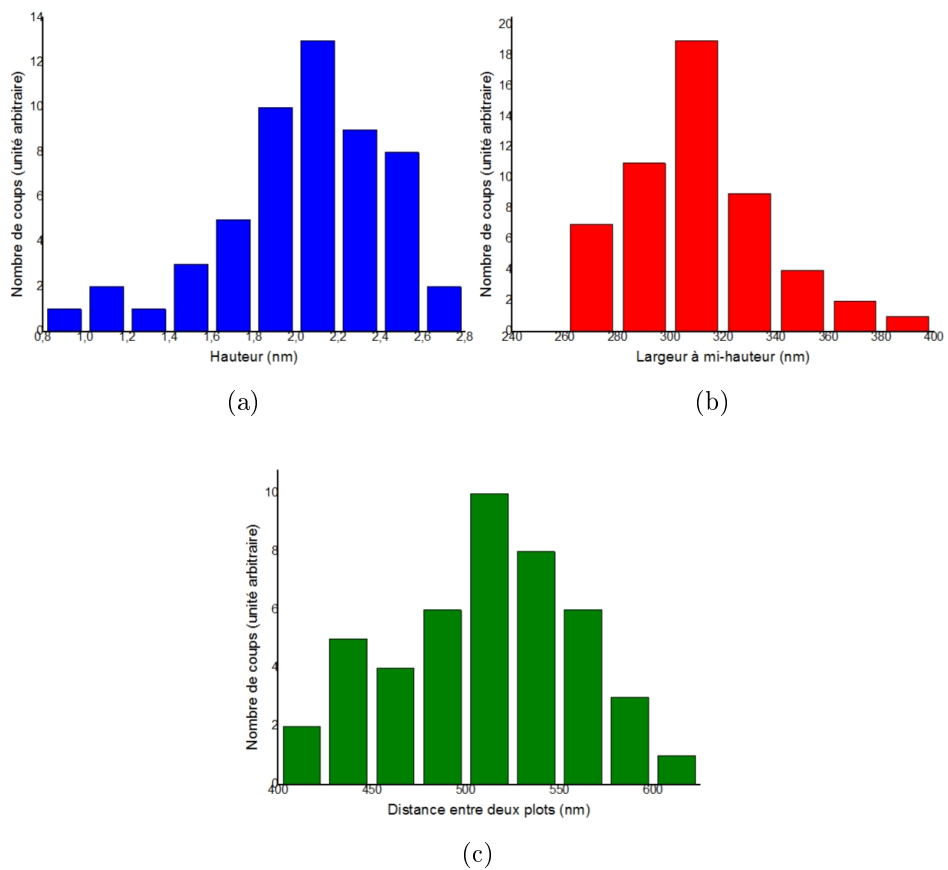


FIGURE 4.17.: Statistique sur les plots d'OTS déposés sur silicium. En (a) la distribution des hauteurs de plots. En (b), la distribution des diamètres des plots obtenus en mesurant de la largeur à mi-hauteur. En (c), la distribution des distances entre les plots.

4.3.3. Variation de la taille des plots d'OTS

L'évaporation de la molécule d'OTS a été faite à travers deux membranes dont les pores possèdent un diamètre variable. Comme nous l'avons montré (sous-section 3.2.6), le diamètre d'ouverture du fond des pores peut varier. La figure 4.18 présente deux images AFM montrant un réseau hexagonal de plots d'OTS sur un wafer de silicium.

Sur la figure 4.18a les plots sont plus larges que ceux de la figure 4.18b car les pores de la membrane utilisée pour créer ce réseau de plots d'OTS étaient plus ouverts. La largeur entre deux plots (L), la largeur à mi-hauteur d'un plot (Δ) et la hauteur en z (h) ont été mesurées à partir de trois images AFM de chaque type de motifs (tableau 4.3). La figure 4.19b montre un zoom sur les structures d'OTS. Le tableau 4.3 récapitule les mesures obtenues sur les plots « larges » et les plots « fins » présents sur les deux images de la figure 4.18.

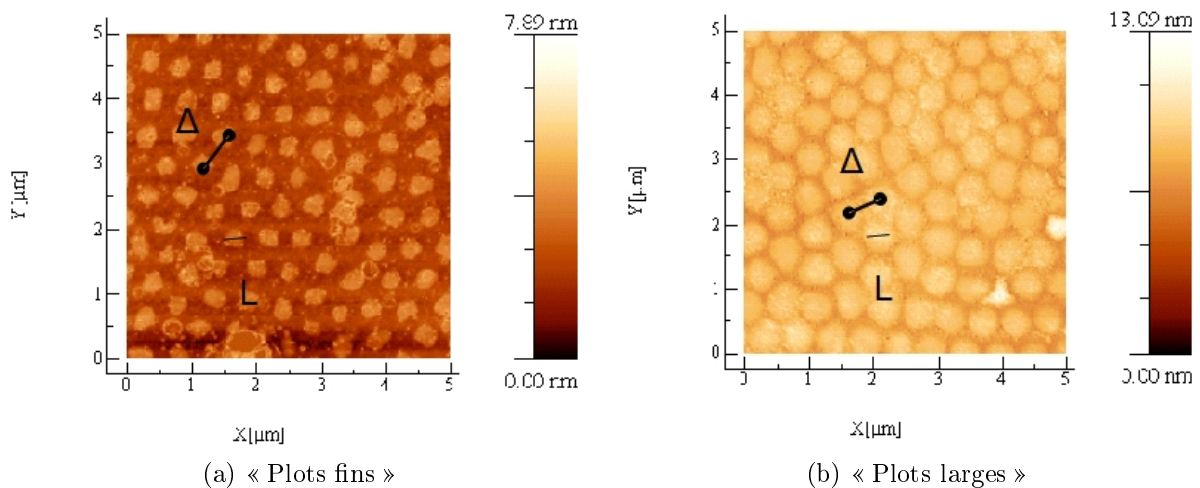


FIGURE 4.18.: Comparaison de deux images AFM de substrats de silicium structurés avec des plots d'OTS de tailles différents. a) la largeur moyenne est de 320 nm, b) de 411 nm (AFM).

	« Plots fins »		« Plots larges »	
	Moyennes	Écart-type	Moyennes	Écart-type
Largeur à mi-hauteur L_{moy} (nm)	309	± 48	411	± 29
Distance Δ (nm)	510	± 28	55	± 34
Hauteur h_{moy} (nm)	2	$\pm 0,4$	1,9	$\pm 0,6$

TABLE 4.3.: Tableau comparatif de la distance moyenne entre deux plots d'OTS, de leur hauteur moyenne et de leur largeur à mi-hauteur pour chacune des images AFM de la figure 4.18.

Le protocole mis en place pour organiser en réseau des plots d'OTS, est validé et

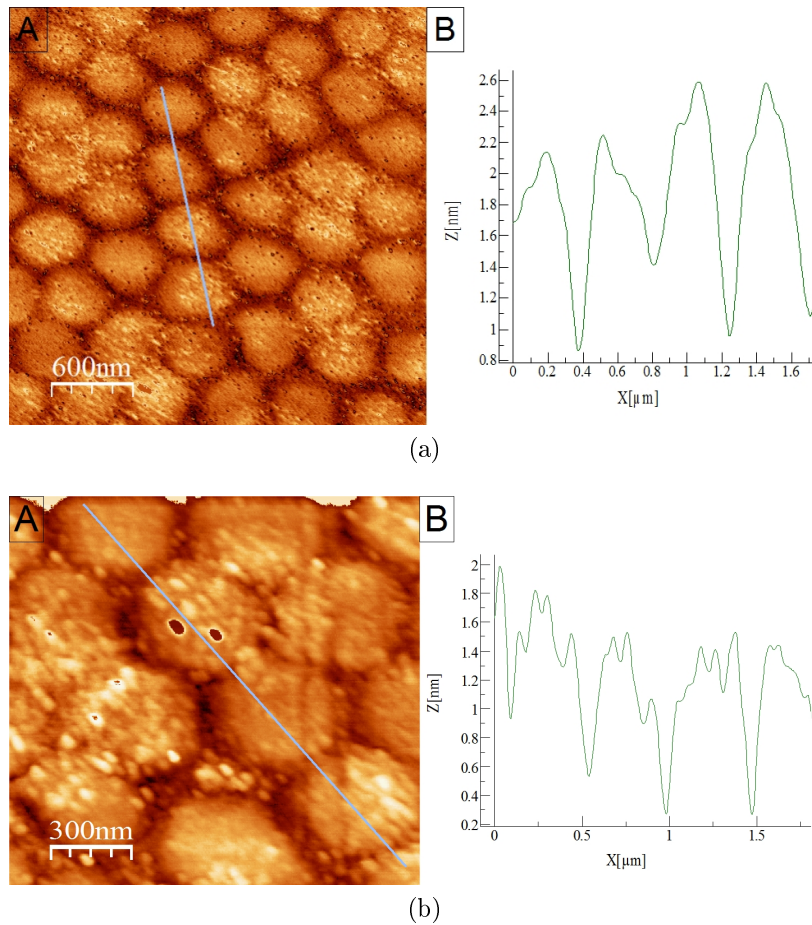


FIGURE 4.19.: (a) A) Image AFM de la structuration de surface sur silicium par des plots d'OTS. B) Profil en z d'une collection de plots d'OTS. (b) Zoom

reproductible. La taille des plots cependant peut être légèrement variable et dépend de l'état d'ouverture du fond des pores de la membrane d'alumine utilisée pour le dépôt. Ainsi par cette méthode de préparation, nous pouvons contrôler le dépôt suivant la paramètre de la membrane utilisée (diamètre des pores, ouverture des pores, paramètre du réseau de pores) à la fois la taille des plots d'OTS mais aussi le paramètre du réseau formé.

De plus, nous avons caractérisé à l'AFM un échantillon d'OTS deux mois après sa préparation, conservé à l'air et à température ambiante. Nous observons un réseau hexagonal de plots d'OTS qui prouve leur stabilité à la fois dans le temps mais aussi dans des conditions réelles d'utilisation (pression et température).

4.3.4. Structuration de surface avec de l'APTES

Pour obtenir une structuration de surface avec de l'APTES, nous avons utilisé le protocole mis en place et validé pour structurer une surface avec de l'OTS. Nous avons

4. Structuration biochimique de substrats

évaaporé de l'APTES dans les gabarits composés d'alumine et de PMMA. L'APTES est déposé en phase vapeur durant 30 min à 40°C. Le PMMA est ensuite dissous dans une solution de chloroforme. L'échantillon est séché à l'azote puis observé à l'AFM à l'air. La figure 4.20 montre une image AFM de l'échantillon.

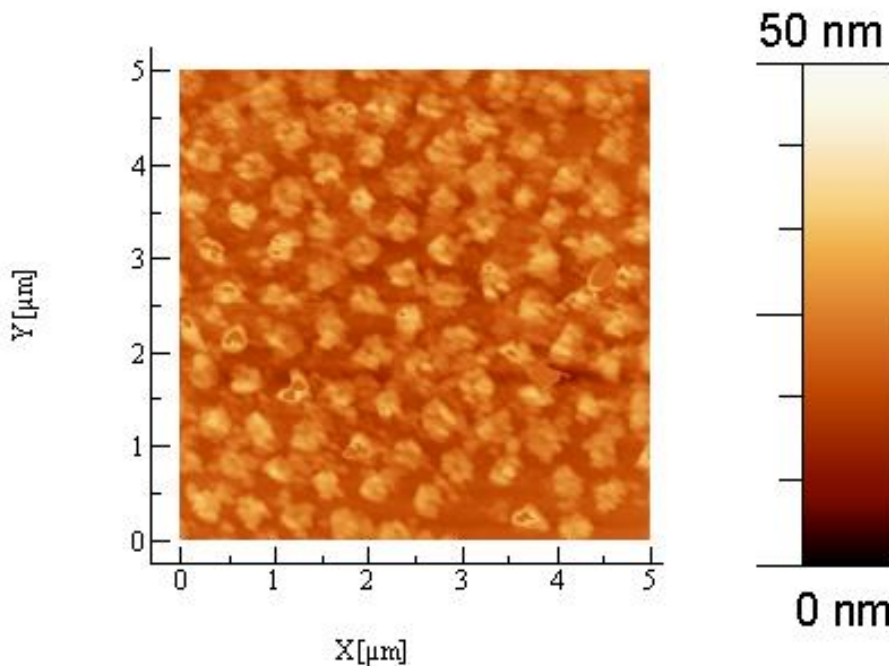


FIGURE 4.20.: *La surface structurée avec de l'APTES est révélée grâce à la fonctionnalisation avec du PMMA (image AFM).*

Nous retrouvons une structuration qui correspond à celle des membranes d'alumine c'est à dire un réseau hexagonal. La forme des structures est beaucoup moins bien définie que dans le cas de l'OTS.

La hauteur des plots, la distance entre les plots et la largeur à mi-hauteur ont été mesurées à partir des plots présents sur l'image AFM présentée. On retrouve les valeurs obtenues ainsi que les écart-types correspondant dans le tableau 4.4 Nous obtenons un réseau hexagonal de plots dont le paramètre de maille est : $\Delta_{\text{moy}} = 500 \text{ nm}$. La largeur à mi-hauteur du plot est $L_{\text{moy}} = 296 \text{ nm}$ et la hauteur est $h_{\text{moy}} = 14,5 \text{ nm}$.

La distance entre les plots et la largeur à mi-hauteur sont très similaires à ce que nous observions avec l'OTS. Par contre, les molécules d'APTES ont une hauteur inférieure au nanomètre, nous nous attendions à arborer des structures petites, or d'après la figure 4.20 nous observons un réseau de plots d'APTES dont la hauteur moyenne (h) est de 15 nm (tableau 4.4).

	Moyenne	Écart-type
Largeur à mi-hauteur (nm)	296	$\pm 9,5$
Distance (nm)	500	± 36
Hauteur (nm)	14,5	$\pm 1,4$

TABLE 4.4.: Tailles moyennes des îlots d'APTES.

Les différences observés entre l'OTS et l'APTES est la fonction amine très réactive de l'APTES. Des travaux relatés dans la littérature notamment ceux de Choi et al., montrent l'utilisation d'une couche d'APTES pour fixer un polymère, le polystyrène, sur une surface [128]. Nous pensons que c'est ce qui s'est passé dans notre cas. Lorsque l'échantillon est déposé dans le chloroforme, le PMMA est dissous dans le chloroforme. Il est possible qu'il réagisse avec les fonctions amines de l'APTES en faisant une liaison peptide avec la fonction NH_2 de l'APTES. Une autre possibilité est que nous ayons des multicouches d'APTES qui soit restée malgré les bains dans la solution de chloroforme, le rinçage et le séchage.

Ceci ne permet pas de valider le protocole pour l'APTES puisque notre but est d'accrocher une molécule fonctionnelle et que dans ce cas, la fonction amine risque d'être déjà utilisée.

4.3.5. Dépôt d'APTES en milieu liquide

La réaction entre l'APTES et le PMMA empêche l'utilisation directe du protocole décrit précédemment. Il semble nécessaire de déposer les protéines sur l'APTES de façon à ce que la fonction amine ne soit plus active. L'étape de dissolution de PMMA se fait donc après le dépôt de la protéine. Nous avons envisagé la possibilité que le passage de la protéine dans une solution de chloroforme puisse la dégrader. Un protocole similaire a été trouvé dans la littérature [56] et il a été montré que la protéine ne se dégrade pas.

Le gabarit est plongé dans la solution d'APTES durant 20 min puis rincé à l'eau DI. Il est ensuite plongé dans la solution de glutaraldéhyde à 10 % durant 20 min et rincé à l'eau. Il est enfin plongé dans la solution de protéines. Enfin le PMMA est dissous. L'échantillon est rincé au PBS puis séché avant d'être observé à l'AFM. Les images obtenues ne montrent pas de structuration de la surface. Il est très probable que la solution aqueuse ne pénètre pas dans les trous nanométriques du PMMA hydrophobe.

4.4. Fonctionnalisation avec des protéines

4.4.1. Dépôt de protéines sur une surface structurée avec de l'OTS

Comme nous l'avons expliqué précédemment l'OTS possède une longue chaîne carbonée qui le rend inerte chimiquement, nous prévoyons donc de l'utiliser comme passivant. Nous espérons qu'il empêche les protéines d'adhérer car il ne possède pas de fonction NH_2 , permettant de faire de liaison peptide. Cependant, les protéines ont aussi la possibilité d'adhérer sur une surface de façon non spécifique c'est à dire en s'adsorbant sur la surfac, par interactions électrostatiques avec la surface. L'adsorption dénature la protéine. L'adsorption de protéines sur l'APTES dépend de la présence plus ou moins de la présence de domaines hydrophobes dans la protéine. Il est nécessaire de vérifier que cette adsorption non spécifique de protéines est assez faible pour être négligeable en comparaison des protéines faisant une liaison peptide avec l'APTES.

Nous avons voulu savoir comment les protéines s'organisent sur la surface structurée par des plots d'OTS. Nous voulions savoir si les protéines peuvent s'auto-organiser sur ce type de surface uniquement avec de l'absorption non spécifique. Pour cela nous avons mis une surface nanostructurée par de l'OTS en contact avec une solution d'avidine à $20\mu\text{g}/\text{ml}$ durant 20 min, rincé au PBS puis séché à l'azote. La figure 4.21 montre un dépôt de protéines effectué sur une surfaces nanostructurée d'OTS. Les protéines semblent se mettre entre les plots d'OTS, en priorité et sur les plots de façon ponctuelle. Les images obtenues ne montre pas de tendance à une organisation des protéines en structures sur des surfaces préalablement structurées par des plots d'OTS.

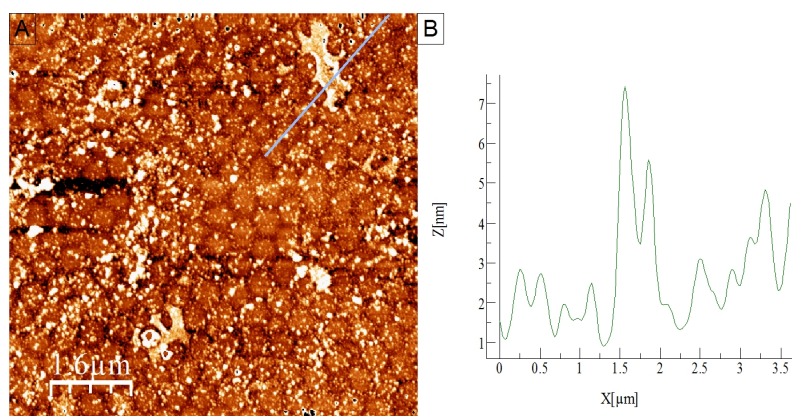


FIGURE 4.21.: A) Image AFM d'une surface nanostructurée avec de l'OTS sur lequel un dépôt non spécifique d'avidine a été fait. B) Profil en z d'une collection de plots d'OTS.

4.4.2. Dépôt de protéines sur une surface structurée par des plots d'OTS et de l'APTES

L'OTS étant inerte chimiquement, il est utilisé ici pour passiver la surface. Le protocole mis en place, validé précédemment pour l'OTS (sous-section 4.3.2) est utilisé. Il est déposé par évaporation, à travers les pores de l'alumine et structure le substrat (a). Le PMMA est alors dissous en emportant la membrane d'alumine. L'APTES est alors déposé par évaporation. Nous voulons qu'il se dépose alors entre les îlots d'OTS. La bio-fonctionnalisation glutaraldéhyde et protéine est faite. La solution de glutaraldéhyde à 1% est déposée sur l'échantillon durant 20 min puis rincée au PBS. Ensuite les anticorps monoclonaux de souris, en solution dans du PBS (20 μ g/ml), sont mis en contact avec la surface durant 30 min puis rincés au PBS et séché pour la caractérisation à l'AFM.

Deux échantillons sont préparés simultanément (tableau 4.5). L'échantillon A servira de référence. L'OTS est évaporé sur les deux échantillons (A et B) en même temps. Le PMMA est dissous. L'échantillon de référence est immédiatement observé à l'AFM. L'échantillon est replacé dans le dessiccateur avec de l'APTES en large excès et le vide est fait durant 1h. La bio-fonctionnalisation avec des anticorps est faite en milieu liquide. L'échantillon est séché puis observé à l'AFM.

Échantillon	OTS	APTES	glutaraldéhyde	protéine	image AFM
Avant dépôt de protéines (A)	30 min	-	-	-	figure 4.22
Après dépôt de protéines (B)	30 min	1h	20 min	30 min	figure 4.24

TABLE 4.5.: *Tableau récapitulant le protocole effectué pour la préparation des échantillons A et B.*

Une image AFM de l'échantillon de référence (A) est présenté sur la figure 4.22. La surface est structurée par des plots d'OTS, présentant une structure hexagonale similaire aux pores de la membrane d'alumine utilisée.

4. Structuration biochimique de substrats

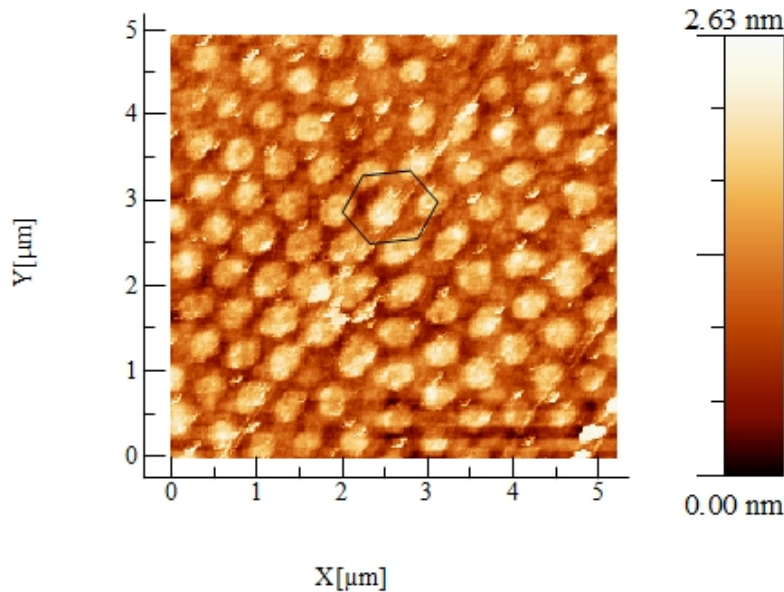


FIGURE 4.22.: L'image AFM montre l'échantillon test (A) : on retrouve le réseau hexagonal de plots d'OTS sur silicium.

Bien que la statistique ai déjà été faite sur les réseaux de plots d'OTS, nous présentons ici une étude statistique de l'échantillon servant de référence. Les tailles moyennes mesurées sur plus de 50 plots à partir de deux images AFM sont répertoriées dans le tableau 4.6.

	Moyenne	Écart type
Largeur à mi-hauteur (nm)	333 nm	± 51 nm
Distance (nm)	512 nm	± 80 nm
Profondeur (nm)	1,1 nm	$\pm 0,3$ nm

TABLE 4.6.: Grandeurs caractéristiques moyennes mesurées sur les plots d'OTS sur silicium.

La figure 4.23 récapitule la distribution de chaque valeurs mesurées. La plus grande répartition des diamètres de plots se situe entre 300 et 350 nm, la moyenne étant de 333 ± 51 nm. La plus grande répartition des distance entre deux plots se situe entre 475 et 525 nm, la moyenne étant de 512 ± 81 nm. Enfin, la majorité des hauteurs de plots est située entre 1 et 1,2 nm, la moyenne étant de $1,1 \pm 0,3$ nm. La faible hauteur obtenue par rapport à la hauteur attendue peut s'expliquer par la qualité de l'image.

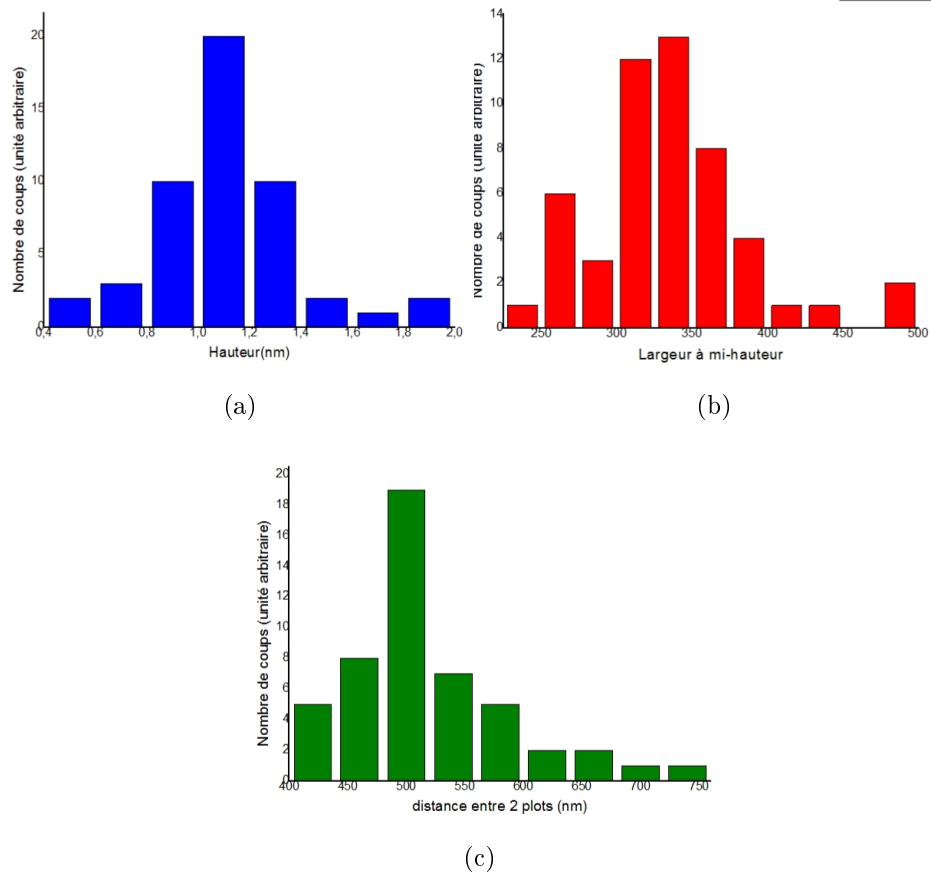


FIGURE 4.23.: *Statistique sur les plots d'OTS. En (a) la distribution de hauteur des plots. En (b), la distribution des diamètres des plots obtenus en mesurant la largeur à mi-hauteur. En (c), la distribution des distances entre les plots.*

4. Structuration biochimique de substrats

La figure 4.24 montre une image AFM de l'échantillon B après le dépôt de protéines. Une série d'agrégats apparaissent en contraste clair, les motifs sont différents de ceux de l'échantillon de référence.

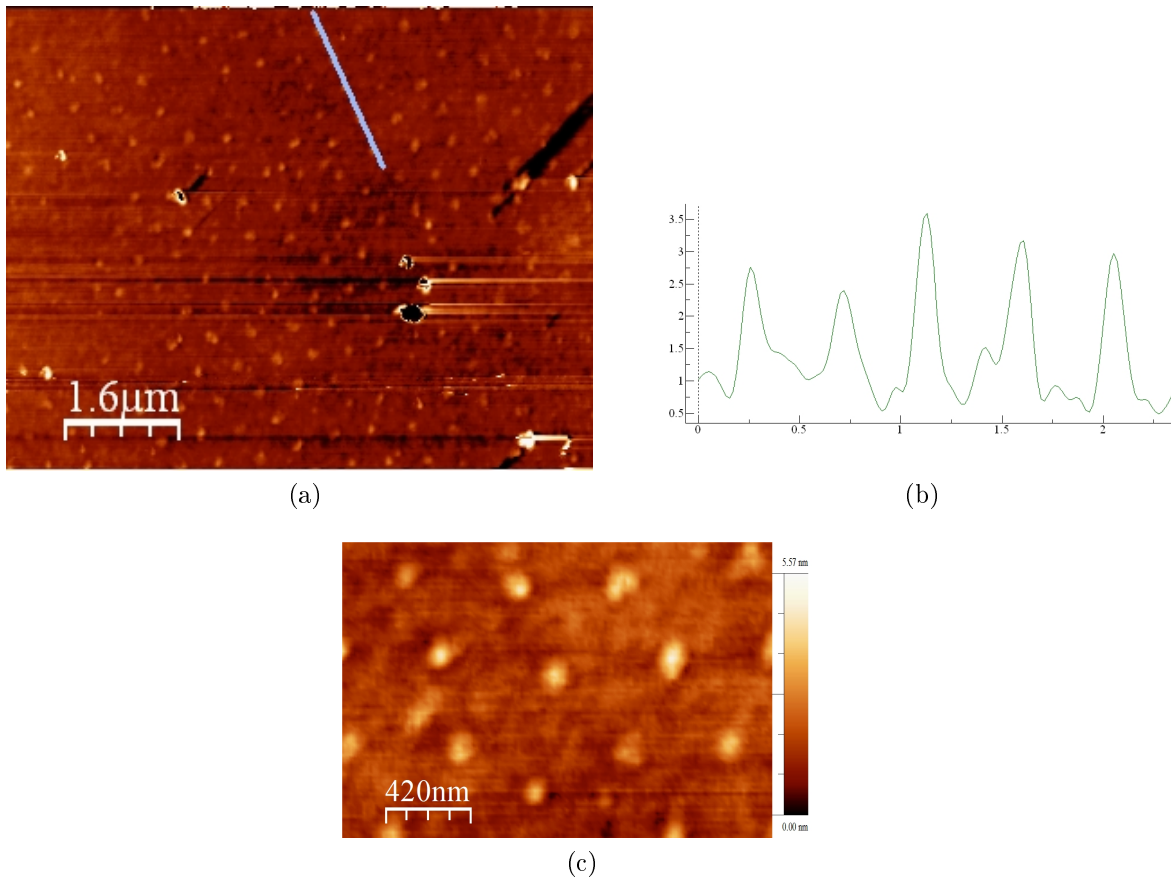


FIGURE 4.24.: *En (a) l'image AFM de l'échantillon mis en contact avec les protéines. En (b), profil en z d'une collection d'agrégats. En (c), zoom sur une structure hexagonale.*

Nous avons caractérisé en détail le réseau d'agrégats de protéines mettant en évidence les différents paramètres : leur hauteur moyenne, leur diamètre moyen en prenant la largeur à mi-hauteur, et le paramètre de maille du réseau en mesurant la distance entre deux plots. Le tableau 4.7 répertorie les valeurs obtenues. Nous avons un réseau hexagonal d'agrégats réparti sur $8 \mu\text{m}^2$, le paramètre de maille du réseau est de $464 \pm 48 \text{ nm}$. Les agrégats ont une hauteur moyenne $2,7 \pm 0,4 \text{ nm}$ et un diamètre moyen de $128 \pm 55 \text{ nm}$.

	Grandeurs moyennes	Écart-type
Largeur à mi-hauteur (nm)	128	± 55
Distance (nm)	464	± 48
Hauteur (nm)	2,7	$\pm 0,4$

TABLE 4.7.: *Taille moyenne des agrégats de protéines.*

La figure 4.25(a) montre la dispersion des hauteurs, diamètres et paramètres de maille des agrégats. La hauteur moyenne est de 2,7 nm. La majorité des agrégats ont des hauteurs situées entre 2 nm et 4 nm ce qui est supérieur à ce que nous avons mesuré pour le réseau de plots d'OTS sur l'échantillon test. En (b), sur la figure apparaît la distribution des diamètres d'agrégats. La dispersion des largeurs est très piquée, les diamètres se situent entre 90 et 128 nm.

Nous pensons que l'APTES s'est déposé entre les plots d'OTS puis que les protéines se sont déposées en formant des agrégats dans des sites préférentiels de l'APTES. Le résultat obtenu pourrai correspondre à la formation d'un réseau organisé d'agrégats de protéines. Nous pensons que l'organisation des agrégats selon une disposition hexagonale est due à l'existence d'une direction préférentielle lors de formation du réseau hexagonal de plots d'OTS due au fait que les plots sont légèrement ovales (figure 4.22). La hauteur moyenne d'un anticorps est d'environ 10 nm. La largeur de la partie en « Y » est d'environ 3 nm. Il est probable que les anticorps soit couchés sur la surface. Dans ce cas chaque agrégats de protéines peut être composé d'environ une centaine d'anticorps.

Il est aussi possible que le traitement par la solution de glutaraldéhyde puis protéine effectué après le dépôt de l'OTS est réduit le diamètre moyen des plots d'OTS. En effet, les distances entre les plots et l'organisation en un réseau hexagonal sont similaires a ceux obtenus pour les réseaux d'OTS.

4. Structuration biochimique de substrats

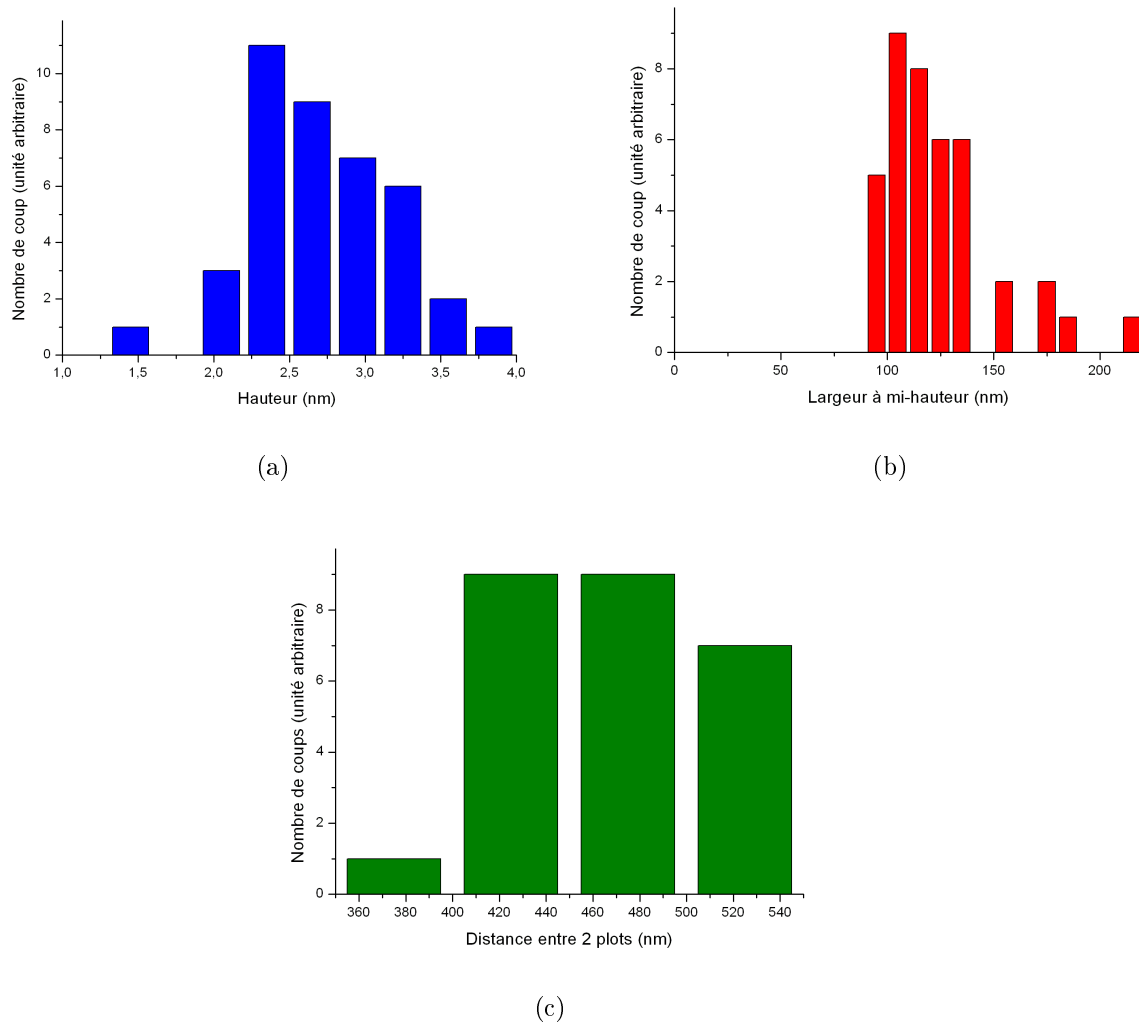


FIGURE 4.25.: *Statistique sur les agrégats de protéines structurés déposés sur verre. En (a) la dispersion des hauteurs des agrégats. En (b), la dispersion des largeurs obtenues en mesurant la largeur à mi-hauteur. En (c), la dispersion des distances entre les agrégats.*

4.5. Études d'adhésion cellulaire sur substrats structurés

En parallèle à la préparation d'un substrat nanostructuré biocompatible, nous avons effectué des recherches à l'échelle micrométrique pour nous mettre au point la biochimie nécessaire au contrôle de l'adhésion de cellules immunitaires. La structuration de la surface est alors faite à l'aide de la technique du micro-contact printing.

4.5.1. La mise en place du micro-contact-printing

4.5.1.1. Traitement anti-adhésif du moule

Le moule en silicium obtenu doit être traité avec un anti-adhésif. En l'absence de ce traitement, le démoulage du PDMS réticulé est impossible, celui-ci crée des liaisons avec le silicium. Plusieurs solutions sont envisageables pour le traitement anti-adhésif du moule. Nous avons choisi un traitement en phase vapeur, qui est utilisé pour le dépôt de silane (voir sous-section 2.4.2). Ce traitement permet d'obtenir une monocouche homogène.

Le traitement anti-adhésif est possible avec plusieurs types de molécules comme le fluorosilane ou bien l'octadécyltrichlorosilane (OTS). Les deux molécules rendent les réactions chimiques entre le moule traité et le PDMS impossible. Les deux molécules marchent. Nous avons choisi l'OTS comme passivant.

Le traitement du moule a été fait en déposant une quantité d'OTS dans une coupelle, un vide primaire est ensuite fait dans l'enceinte où le moule est déposé (figure 2.14). Le temps de dépôt est de 12 h.

4.5.1.2. La préparation des timbres

La fabrication du timbre en PDMS est faite par réticulation d'une base et d'un réticulant dans le moule traité. Le ratio réticulant base doit être choisi avec soin sinon le PDMS sera trop mou pour le dépôt ou bien trop rigide. Nous avons choisi un ratio réticulant/base de 1 :10. La polymérisation se fait à la température de 60° durant une nuit. Le PDMS devient rigide, il est découpé le long d'un motif pour obtenir un timbre. Plusieurs timbres d'environ 1 cm² de surface sont obtenus (figure 4.26). Ils sont ensuite utilisés pour le μ CP.

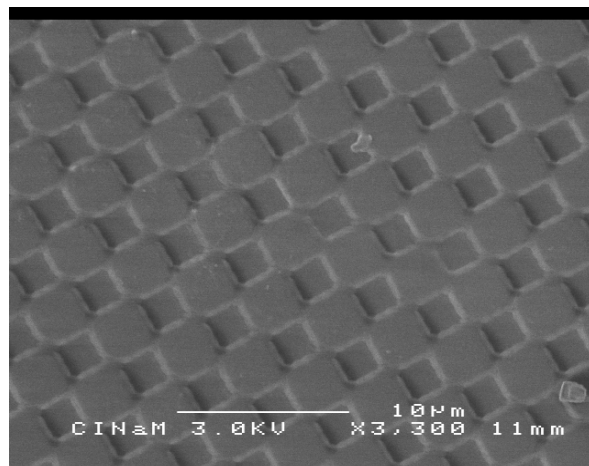


FIGURE 4.26.: Image MEB d'un timbre en PDMS.

4.5.1.3. La mise en place du μ CP

Bien que le μ CP soit une technique éprouvée, celle-ci n'avait jamais été mise en place au laboratoire CINaM. Nous avons donc fait des essais pour optimiser les dépôts. Ceux-ci ont été effectués par utilisation de la BSA-FITC comme protéine de dépôt. Les paramètres qui entrent en jeu pour optimiser le dépôt sont :

- la concentration de la solution : si la solution est trop peu concentrée, le dépôt risque de ne pas être homogène par contre si elle est trop concentrée, nous pouvons avoir des dépôts trop importants. Lorsque les solutions sont coûteuses, comme lorsque nous utilisons des anticorps, il est avantageux d'en utiliser peu. Le prix n'est pas un problème dans le cas de la BSA. Il faut donc optimiser la concentration pour obtenir un dépôt de qualité avec le moins de solution possible.
- le traitement du PDMS : le PDMS est naturellement hydrophobe, il peut empêcher les molécules en solution dans des solutions aqueuses de se déposer sur la surface du timbre.
- le temps de contact : s'il est trop court le transfert de molécules n'a pas le temps de se faire. S'il est trop long, il est possible d'avoir des agrégats de molécules.
- la pression appliquée sur le tampon. Une pression trop forte, déforme les motifs.

Les premiers essais ont été effectués avec des timbres non traités. Les dépôts étaient de mauvaise qualité et très peu homogènes (figure 4.27). Nous observons tout de même sur quelques zones les motifs du timbre. L'hydrophobicité du timbre peut empêcher le dépôt d'être de bonne qualité. Plusieurs traitements de la surface de PDMS sont possibles [64] : le traitement par plasma réactifs et l'immersion dans l'eau DI durant

plusieurs heures. Nous avons donc traité le PDMS par immersion dans de l'eau DI durant 2h. Cela facilite l'adhésion des protéines sur le PDMS.

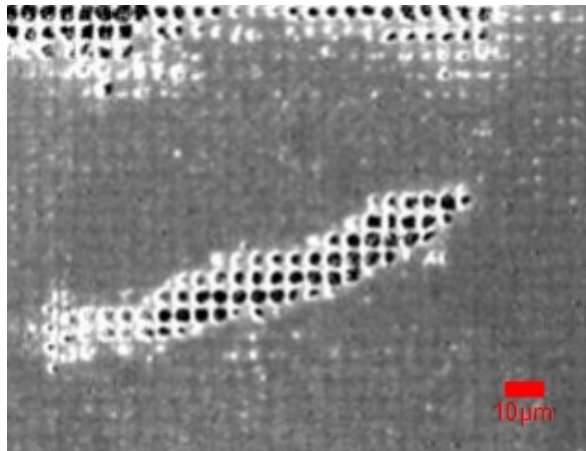


FIGURE 4.27.: *Image en microscopie de fluorescence d'un dépôt de BSA FITC par μ CP. Le dépôt est de très mauvaise qualité. Les motifs sont correct dans certaines zones.*

Nous avons fait des dépôts de BSA marquée au FITC avec des timbres de formes différentes puis observé le résultat en microscopie de fluorescence. Après plusieurs essais les paramètres retenus ont été :

- la concentration 1 mg/ml.
- le traitement du PDMS par immersion dans l'eau DI, 2 h minimum
- le temps de contact (2 min).
- une légère pression appliquée sur le tampon

La figure 4.28 montre une image en microscopie de fluorescence d'une collection de motifs. La partie claire correspond au dépôt de BSA : nous sommes en présence d'une grande zone de BSA comportant des motifs réguliers sans BSA. La distance moyenne entre deux motifs est de $6,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$, la largeur d'un motif est de $4,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$.

La figure 4.29 montre un motif unique choisi parmi une collection et observé à l'AFM. La largeur du motif est de $6,4 \mu\text{m}$ espacés de $2 \mu\text{m}$. La hauteur du dépôt montre que nous ne sommes pas en présence d'une monocouche.

4. Structuration biochimique de substrats

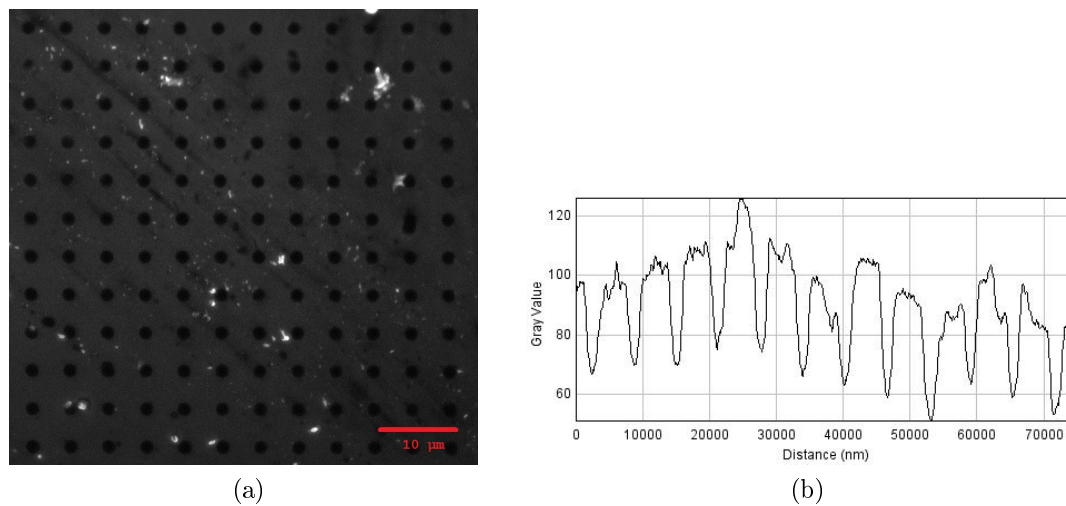


FIGURE 4.28.: Image en microscopie de fluorescence d'une lamelle de verre structurée avec de la BSA-FITC déposée par micro-contact printing.

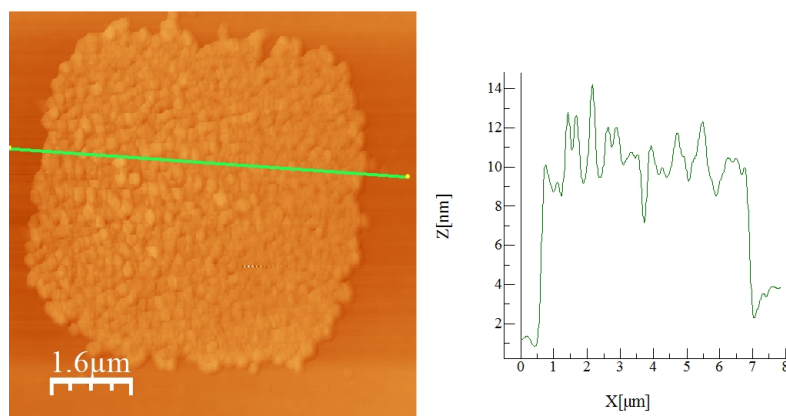


FIGURE 4.29.: Image AFM (à gauche) d'un dépôt de BSA par micro-contact printing. A droite, la hauteur moyenne du dépôt est d'une dizaine de μm.

4.5.2. Mise en place de la biochimie

Le principe est de créer une fonctionnalisation avec une alternance de protéines facilitant l'adhésion cellulaire et des protéines empêchant l'adhésion cellulaire. La surface comporte donc des parties « actives » et « passives ».

4.5.2.1. Premier protocole

Dans beaucoup d'études reportées dans la littérature, la BSA est utilisée comme protéine passivante. Cependant dans le cas de cellules immunitaires que nous avons ici, cette passivation simple n'est pas suffisante. Les travaux antérieurs à notre collaboration ont montré que l'IgG1 est une molécule empêchant l'adhésion de cellules immunitaires (figure 4.30)[129, 130]. Crétel et al. ont montré que les cellules n'adhèrent pas sur une surface couverte de façon homogène d'IgG1. Ils ont aussi montré que l'IgG1 empêche le dépôt de molécules d'adhésion. Lors d'un dépôt de molécules d'adhésion après le dépôt d'une couche d'IgG1, les cellules immunitaires n'adhèrent pas. Nous avons décidé d'utiliser cette molécule comme passivant pour la structuration de surface.

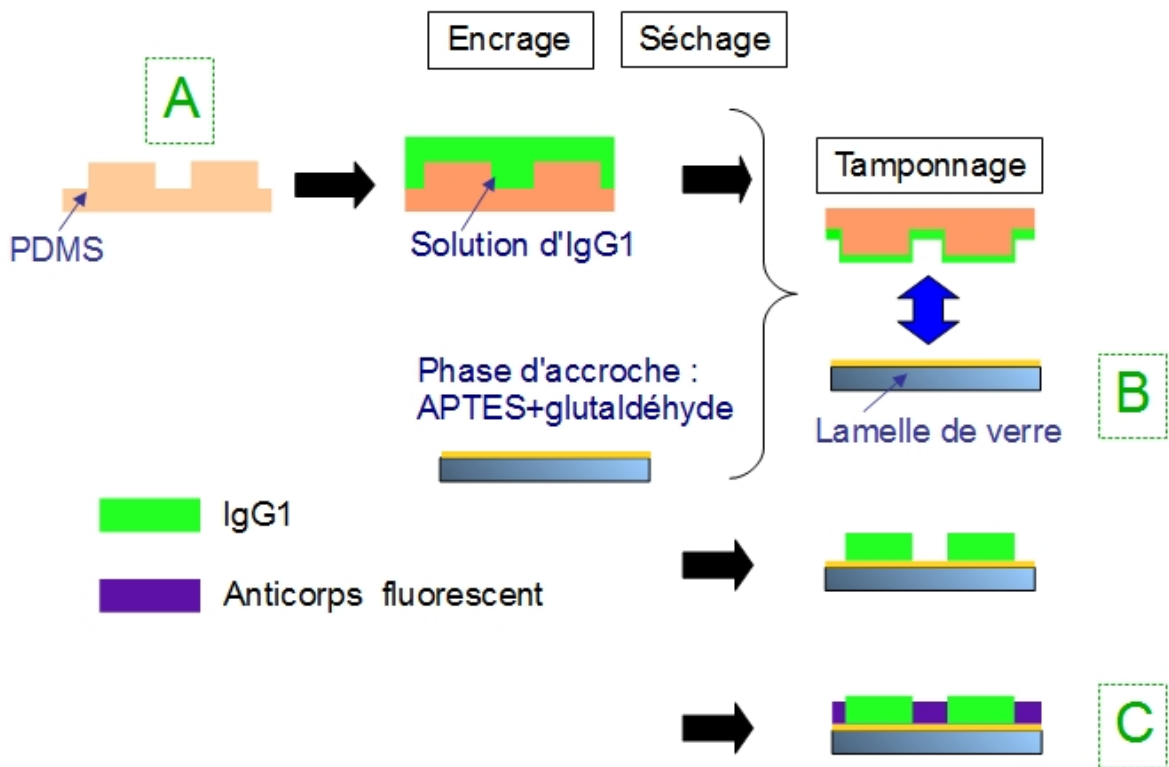


FIGURE 4.30.: *Protocole de fonctionnalisation. Ce protocole n'a pas eu le résultat attendu*

4. Structuration biochimique de substrats

Une lamelle de verre est recouverte d'une solution d'APTES à 1% durant 20 min, puis rincée à l'eau DI plusieurs fois, elle est ensuite plongée dans une solution de glutaraldéhyde 1% et rincée. Cette étape est une étape d'accroche qui permet de fixer les protéines. L'IgG1 est déposé sur le timbre de PDMS durant 20 min, il est séché puis déposé par micro-contact printing sur la lamelle de verre préparée. L'anticorps d'adhésion est fluorescent. Il devrait se déposer par absorption non spécifique là où il n'y a pas d'IgG1.

La figure 4.31 montre la fonctionnalisation obtenue : les lignes d'IgG1 apparaissent en noir. La molécule fluorescente déposée ultérieurement s'est déposée entre les lignes d'IgG1 (figure 4.31). La faible différence de contraste entre les lignes fluorescentes et les lignes sombres laisse penser que l'anticorps d'adhésion s'est déposé partout sur la surface. L'IgG1 déposé par micro-contact printing n'est pas un bon passivant. Il est possible que le séchage des protéines pour le micro-contact printing dénature trop l'IgG1 pour permettre à cette molécule d'être un bon passivant. Pour palier à ce problème, un deuxième protocole plus complexe a dû être mis au point.

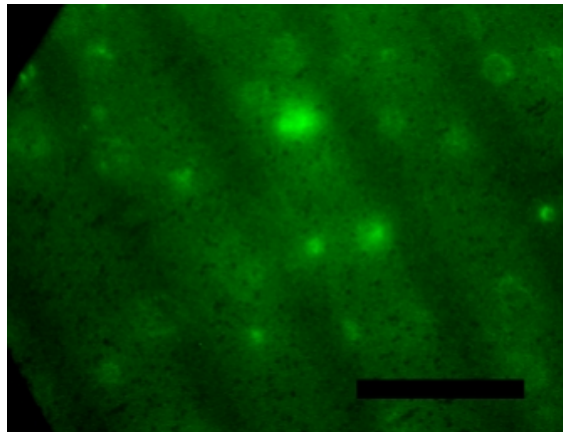


FIGURE 4.31.: *Image en microscopie de fluorescence de la bio-structuration. Les lignes fonctionnalisées d'IgG1 déposés par micro-contact printing apparaissent en noir. L'anticorps fluorescent est en vert clair. Une fluorescence résiduelle est observée sur les lignes d'IgG1. La barre d'échelle représente 100 μ m.*

4.5.2.2. Deuxième protocole

La figure 4.32 présente les étapes successives nécessaires à la fonctionnalisation de la surface de verre. La lamelle de verre est traitée comme précédemment (sous-section 4.5.2.1). Le micro-contact printing (figure 4.32B) permet ensuite de déposer la BSA-biotine selon les motifs micrométriques choisis. Le timbre de PDMS est recouvert d'une solution de BSA biotine à 1 mg/ml durant 15 min séché puis mis en contact avec la lamelle préparée, durant 2 min avec une légère pression.

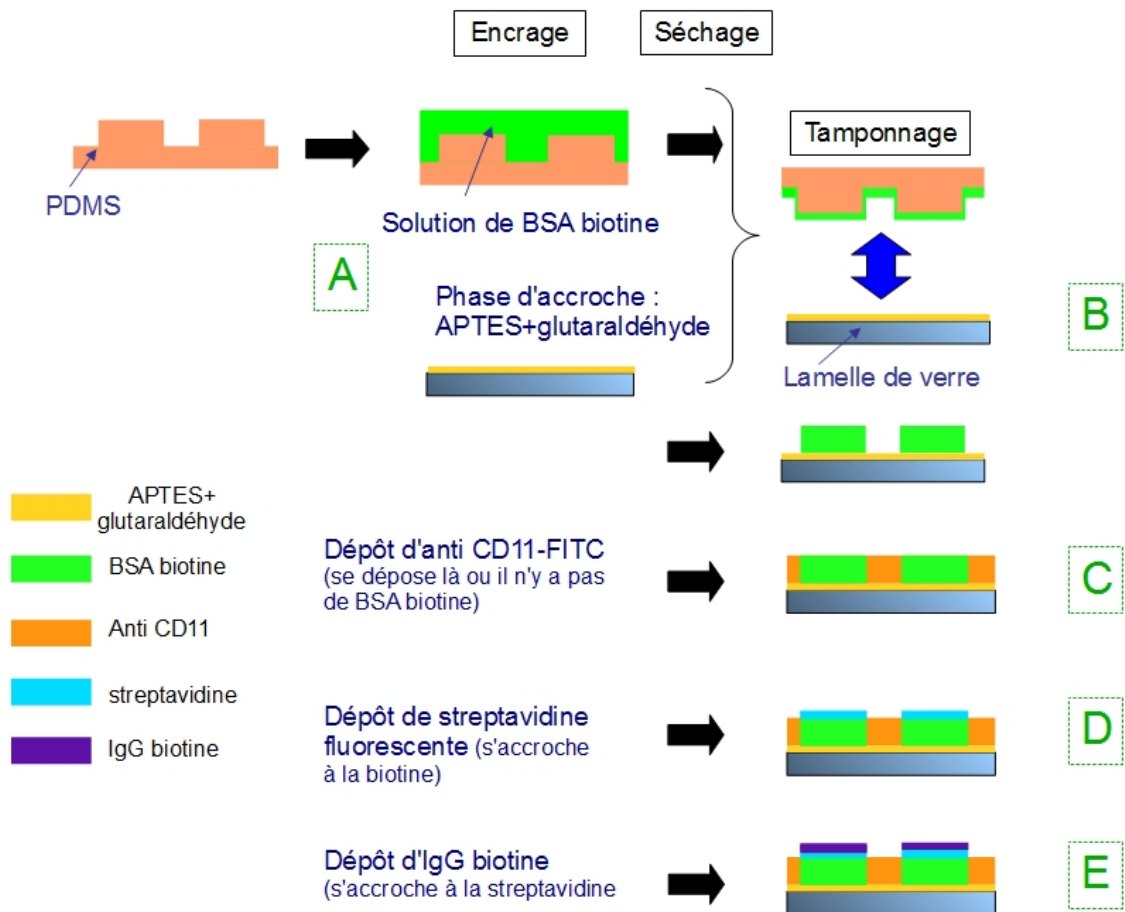


FIGURE 4.32.: *Protocole de fonctionnalisation. A : Préparation de la surface et du timbre. En B : micro-contact printing de BSA biotine. En C : Ajout de l'anticorps anti CD11-FITC. En D : L'avidine s'accroche sur la biotine. En D : L'IgG biotine s'accroche sur la streptavidine. Le schémas n'est pas à l'échelle.*

4. Structuration biochimique de substrats

Les dépôts successifs de protéines sont fait selon le protocole suivant : dépôt de la solution sur la surface, incubation puis rinçage au PBS en restant toujours en milieu liquide pour ne pas dénaturer les protéines. Les étapes de dépôt après le micro-contact printing de BSA-biotine sont :

- l'anticorps d'adhésion cellulaire anti CD11 à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ est déposé sur la surface pendant 20 min puis rincé au PBS. Il permet de passiver les parties de la surface où il n'y a pas de BSA-biotine (figure 4.32C). Pour valider cette étape nous avons déposé de l'anticorps d'adhésion marqué au FITC. La figure 4.33a montre la surface après le dépôt : les motifs en blanc correspondent à l'anticorps d'adhésion. Cette étape est donc validée. Nous avons utilisé plusieurs types de motifs pour les dépôts. Les motifs présents sur la figure font $2\mu\text{m}$ de large espacés de $3\mu\text{m}$.
- streptavidine à 1 mg/ml pendant 20 min (figure 4.32D). Elle fait une liaison avec la biotine de la BSA. Nous avons déposé de la streptavidine fluorescente pour l'observation. La figure figure 4.33b montre une image complémentaire à la précédente. Cette étape est donc validée.
- IgG-biotine à 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ durant 30 min (figure 4.32E). Elle fait une liaison avec la streptavidine

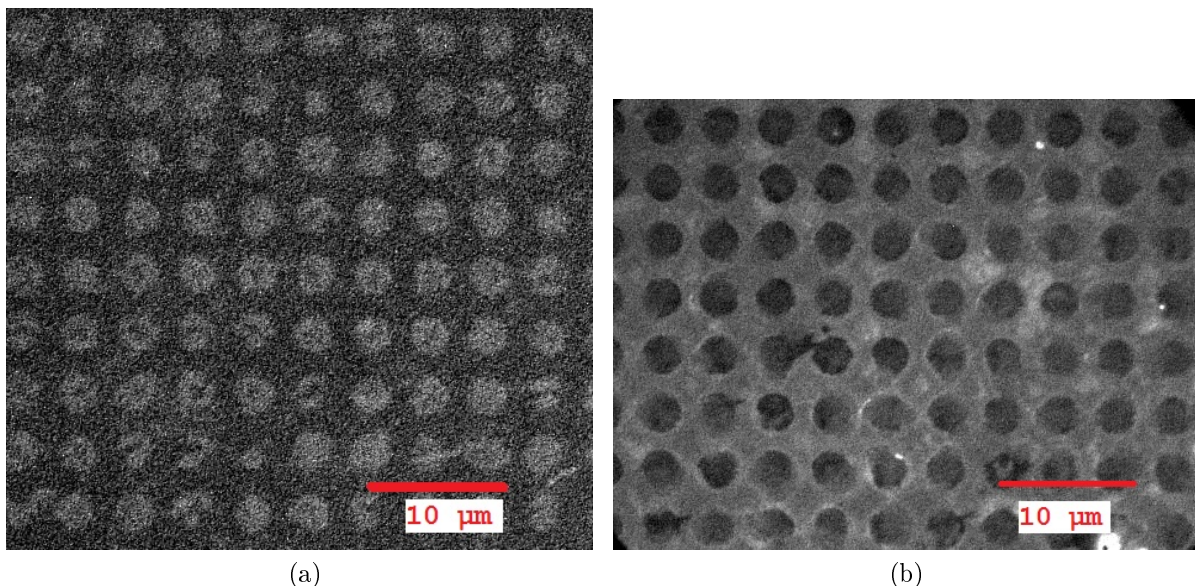


FIGURE 4.33.: Image en microscopie de fluorescence d'une surface de verre structurée par : a) de la BSA-biotine déposée par micro-contact printing. L'anticorps d'adhésion est déposé après la BSA, c'est la molécules fluorescente qui apparaît en blanc. b) La streptavidine fluorescente est déposée sur la surface. Elle se met en évidence le dépôt de BSA-biotine.

4.5.3. L'adhésion de cellules vivantes

Les cellules sont incubées pendant 30 min sur la surface puis rincées. L'observation simultanée des lignes de protéines en microscopie de fluorescence et des cellules en RICM permet de connaître la position exacte des cellules par rapport aux lignes fonctionnalisées. Sur les images en RICM la partie de la cellule qui adhère sur la surface apparaît en noir. Sur la figure 4.34 : a) on observe les lignes d'APTES fonctionnalisées avec des protéines d'adhésion en microscopie optique de fluorescence, b) on observe que les cellules sont alignées le long de ces lignes : 90 % des cellules sont soit dans les lignes, soit adaptées à la forme de la ligne, soit dépassant de part et d'autres et 10 % sont en dehors des lignes.

Le tableau 4.8 explique le comportement des cellules sur le substrat : sur une population de 279 cellules, 250 sont dans les lignes et 29 en dehors des lignes. Les mesures ont été effectuées sur plus de 10 images. Les cellules adhèrent bien le long des motifs fonctionnalisés.

Nombre total de cellules	279	100 %
Nombre de cellules dans les lignes	250	90 %
Nombre en dehors des lignes	29	10 %

TABLE 4.8.: Répartition des cellules en fonction de leurs comportements au contact des lignes bio-fonctionnalisées, en nombre de cellules puis en pourcentage.

Le but de cette étape à l'échelle micrométrique était de mettre en place une biochimie nécessaire à l'adhésion cellulaire et de se familiariser au travail avec des cellules in vitro. Nous avons mis en place le micro-contact printing au laboratoire puis utilisé cette technique pour préparer des surfaces pour l'adhésion de cellules de type lymphocytes T.

4. Structuration biochimique de substrats

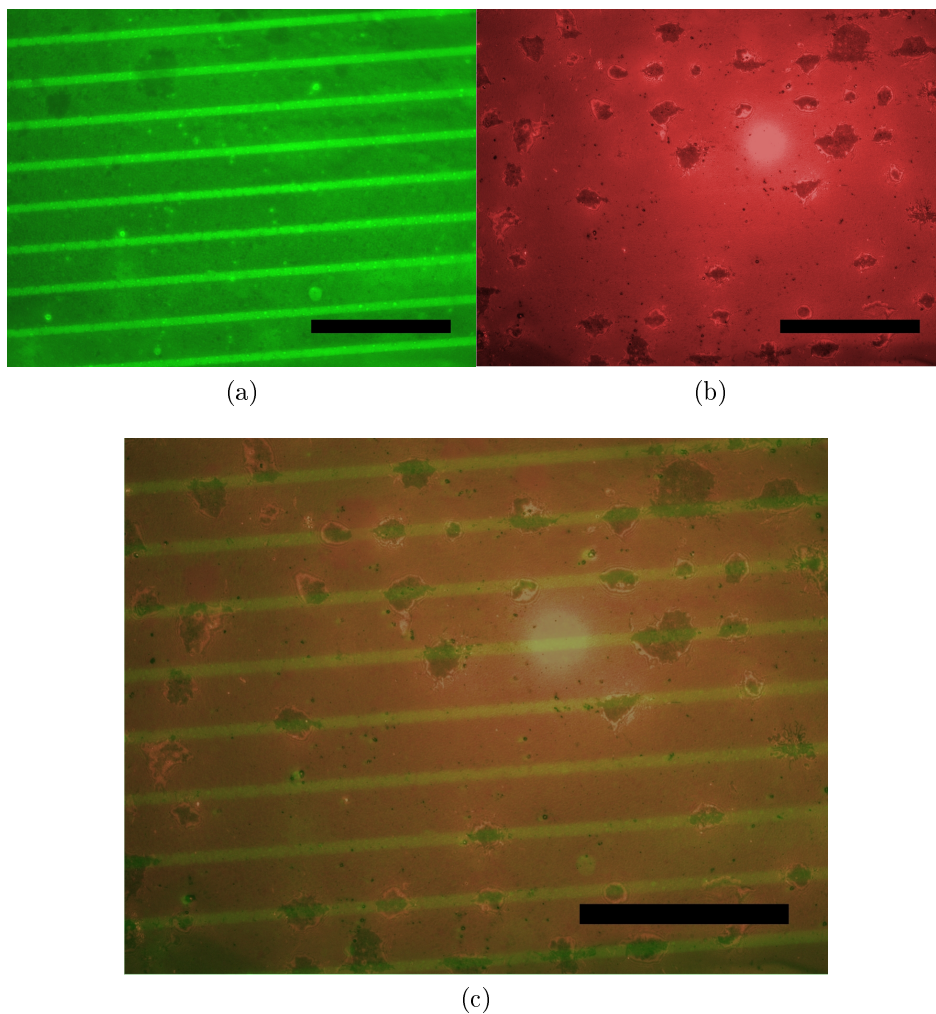


FIGURE 4.34.: *En (a) : image en fluorescence. Les lignes fluorescentes d'IgG apparaissent en vert clair. En (b) on retrouve l'image en RICM correspondante sur laquelle la partie de la cellule qui adhère à la surface apparaît en noir. En (c) : superposition des deux images précédentes en transparence : l'image (b) est colorée en fausse couleur rouge. Sur un total de 279 cellules 250 sont soit dans les lignes, soit leur forme est adaptée aux lignes, et 29 sont en dehors des lignes. La barre d'échelle mesure 10 μm .*

4.6. Discussion, conclusion et perspectives

Dans ce chapitre nous avons utilisé les membranes d'alumine poreuses pour structurer une surface dans le but de préparer un substrat pour l'adhésion cellules-matrice extracellulaire. Pour cela, nous avons réalisé en parallèle des essais à l'échelle micrométrique en utilisant le micro-contact printing de protéines et nanométrique en utilisant les membranes d'alumine poreuses comme masque. Nous avons utilisés le micro-contact printing de protéines pour mettre en place une biochimie efficace. Nous avons ensuite utilisé cette surface pour étudier l'adhésion de cellules de type lymphocytes T. Les résultats montrent que les cellules adhèrent bien dans les lignes fonctionnalisées.

En parallèle, nous nous sommes intéressés à la structuration de surfaces par des organo-silanes. Nous avons pu préparer des substrats structurés avec de l'OTS puis avec de l'APTES sur substrat de silicium. Nous avons mis au point un protocole permettant de structurer une surface de silicium avec un réseau hexagonal de plots d'OTS en utilisant une membrane d'alumine poreuse comme masque. Nous avons vérifié que le protocole de structuration de surface par évaporation d'OTS à travers le masque est reproductible. Par contre, les résultats montrent que la largeur moyenne des plots d'OTS peut varier d'un échantillon à l'autre. Le diamètre des motifs dépend de l'état d'ouverture du fond des pores de la membrane d'alumine poreuse utilisée pour le dépôt. Les hauteurs moyennes des plots mesurées (2 nm) montrent que nous avons déposés des monocouches d'OTS. La surface structurée est stable. Après un mois, la structuration n'a pas évoluée, les molécules ne diffusent pas sur la surface. Nous avons utilisé un protocole similaire pour structurer la surface avec un réseau hexagonal de plots d'APTES. Nous avons enfin préparé une surface utilisant les propriétés des deux organo-silanes en même temps. Nous avons déposés un anticorps modèle via une étape de fixation. Nous avons obtenu un réseau organisé d'agrégats dont la largeur moyenne est de 123 nm et le pas de 500 nm. Si les agrégats sont composés d'anticorps, les hauteurs obtenues laissent penser que les anticorps sont couchés sur la surface. En effet, les hauteurs moyennes mesurées sont de 2,7 nm. Il y aurait donc une centaine de molécules sur chaque agrégats.

Nous avons essayé de réduire la largeur des plots d'OTS en utilisant des membranes d'alumine poreuses dont le diamètre théorique des pores est 40 nm. La caractérisation en AFM n'a pas montré de structuration sur la surface de PMMA. Nous pensons que le diamètre des pores est trop faible par rapport à l'épaisseur de la membrane d'alumine utilisée ce qui ne permet pas à la RIE de structurer la surface.

Nous avons commencé des essais en vu du transfert de la technique de dépôt d'OTS sur verre. Nous avons observé que la couche de PMMA nécessaire au collage de l'alumine est de 500 nm contre 100 nm pour le silicium. Le PMMA est structuré en surface mais l'évaporation de molécules d'OTS ne donne pas de structuration de surface. Nous

4. Structuration biochimique de substrats

pensons que l'épaisseur totale : PMMA plus celle de l'alumine, empêche le retrait du PMMA jusqu'au niveau du verre. Il faudra réduire cette épaisseur pour obtenir un gabarit à partir du substrat de verre. La chimie du verre est assez similaire à celle silicium oxydé sauf que la surface peut comporter des impuretés. L'évaporation d'OTS ne devrait pas nécessiter de mise au point supplémentaire pour structurer la surface d'autant que nous avons déjà vérifié que le dépôt d'OTS marche sur le verre.

5. Conclusion générale

Le but de cette thèse était de préparer des substrats bio-structurés pouvant être ensuite utilisés dans des études d'interaction cellules-substrats. Ces surfaces devaient avoir pour caractéristiques d'être versatiles c'est à dire permettant de changer les distances et la taille des motifs, peu onéreuses et bio-compatibles. Pour cela nous avons utilisé les propriétés d'auto-assemblage de la matière en utilisant des membranes d'alumines poreuses comme gabarits. Par le passé, ce type de membranes a déjà été utilisés comme masque de gravure et d'évaporation dans des applications à la nanostructuration [59] mais jamais dans un contexte d'applications en biologie ou biotechnologie.

Pour pouvoir utiliser les membranes d'alumine poreuses comme masques de gravure, nous avons amélioré le procédé d'ouverture des pores présents sur les membranes d'alumines poreuses pour essayer de mieux maîtriser les paramètres du masque. Nous avons ensuite utilisé ces membranes d'alumine poreuses comme masque de gravure et d'évaporation. Cela nous a permis de préparer deux types de substrats structurés : topographiquement et chimiquement. Nous avons pour cela utilisé des membranes d'alumine comportant des pores de deux tailles différentes : 200 nm espacés de 500 nm et 40 nm espacés de 120 nm.

L'utilisation de l'alumine comme masque de gravure nous a permis de préparer des surfaces nano-structurées topographiquement. Contrairement au travaux précédents, nous avons utilisé des lamelles de verre compatibles avec des applications en microscopie optique. Nous avons mis au point un protocole permettant cette structuration. Ce protocole est reproductible et utilise peu d'alumine. Un morceau d'un centimètre carré permet de préparer plusieurs substrats d'un centimètre carré. Nous avons utilisé ces substrats pour déposer des bicouches lipidiques supportées servant de membranes cellulaires simplifiées modèles. Nous avons mis en place la balance de Langmuir permettant le dépôt de bicouches lipidiques. Nous avons envisagé que les structures présentes sur le substrat permettent de structurer la bicouche lipidique pour nous permettre d'imiter les inhomogénéités dans la membrane cellulaire. Pour mettre en évidence les hétérogénéités, nous avons effectué des mesures pour connaître les propriétés de fluidité des bicouches. Les bicouches ont été analysées par spectroscopie de corrélation de fluorescence à rayons variables. Les premières expériences nous ont permis de mettre

5. Conclusion générale

en évidence une diffusion non brownienne qui montrerait des hétérogénéités dans la bi-couche. Maintenant, un grand nombre d'échantillons devront être analysés pour nous permettre d'obtenir des résultats plus quantitatifs.

Nous avons ensuite utilisé les membranes d'alumine poreuses comme masque pour la préparation d'un gabarit permettant de préparer un réseau organisé d'agrégats de protéines. Une couche de polymère le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) est déposée sur une surface de silicium puis structurée par gravure à travers la membrane d'alumine. Cela donne un masque composite comportant la membrane d'alumine et le PMMA qui a été structuré jusqu'à la surface de silicium. Le PMMA structuré sur substrat sert ensuite de gabarit pour l'évaporation d'organo-silanes. Des essais ont été faits pour préparer un réseau organisé d'OTS sur verre mais des problèmes supplémentaires doivent encore être éliminés pour permettre à la technique d'être validée. En effet, la couche de PMMA nécessaire à l'adhésion de la membrane d'alumine sur le verre est de 500 nm contre 100 nm sur le silicium. Il s'avère que le rapport d'aspect des pores de l'alumine devient trop important pour que la structuration du PMMA aille jusqu'à la surface du verre. Il faut trouver un moyen de réduire cette épaisseur. La viscosité du PMMA pourrait aussi être un facteur à prendre en compte. Sur du silicium nous avons essayé de structurer le PMMA en utilisant des membranes comportant des pores de diamètre de 40 nm sans succès. Un rapport d'aspect trop grand peut expliquer que cela n'ait pas marché. Il faudrait réduire l'épaisseur de la membrane d'alumine tout en trouvant un montage permettant de la manipuler sans la casser.

En tout cas, nous avons pu structurer la surface de silicium avec les deux organo-silanes OTS (octadécyltrichlorosilane) et APTES (aminopropyltriéthoxysilane) séparément. Puis nous avons utilisé les deux sur le même substrat dans le but de créer un réseau organisé d'agrégats de protéines en utilisant la fonction amine de l'APTES.

En parallèle, nous avons aussi étudié les propriétés bio-chimiques nécessaires pour contrôler l'adhésion de cellules de type lymphocytes T. Pour cela nous avons mis en place une biofonctionnalisation micrométrique à l'aide du micro-contact printing. Nous avons mis au point un protocole permettant de contrôler l'adhésion de cellules immunitaire sur une surface. Ce type de cellule se trouve *in vivo* en milieu liquide de façon normale et elles ont des comportements d'adhésion différents par rapport aux cellules habituellement non mobiles qui font une adhésion focale. L'étude de l'adhésion a été faite en RICM, technique permettant de mettre en évidence l'état de l'adhésion des cellules sur une surface. En perspective, nous espérons pouvoir faire converger le modèle à l'échelle micrométrique vers l'échelle nanométrique pour pouvoir utiliser nos substrats comme modèles pour étudier l'interaction cellule-substrat nanostructuré.

En supplément des développements technologiques discutés précédemment nous al-

lons présenter des questions ouvertes qui doivent être résolues lors de travaux ultérieurs.

Pour mieux comprendre les résultats concernant la bicouche lipidique sur un substrat nanostructuré, des études en AFM en milieu liquide seraient indispensables. A partir de ces observations, le modèle numérique rendant compte de la diffusion des lipides dans la bicouche pourrait être affiné pour rendre compte parfaitement du comportement des bicouches lipidiques supportées sur verre structuré. Des mesures de FCSrv complémentaires doivent être effectuées pour faire des comparaisons quantitatives. Des substrats comportant des structurations de tailles différentes doivent être étudiés.

Dans le contexte du dépôt de protéines, la structuration de gabarits est bien établie. Par contre, les étapes de dépôt des protéines reste encore à comprendre. Bien que nous obtenions un réseau très bien organisé d'agrégats, la raison pour laquelle les agrégats se mettent dans cette conformation ne va pas de soi compte tenu de la forme du gabarit utilisé. Nous avons conclut que deux éventualités sont possibles. La première est que le dépôt de protéine n'a pas marché et qu'au lieu de cela, le gabarit originel d'OTS a été modifié par la procédure de dépôt. La deuxième possibilité est que nous avons déposé des protéines organisés en agrégats hexagonaux et nous devons alors expliquer comment les agrégats s'arrangent en un réseau hexagonal plutôt que hexagonal centré. Il apparaît clairement une direction préférentielle pour le dépôt, sûrement introduite lors de la préparation de l'échantillon. Cela donne une réseau hexagonal centré. Pourquoi les anticorps se mettent-ils dans cette partie des structures ? Davantage d'expérimentations permettraient de mieux comprendre ce modèle. Les images AFM ayant été effectuées à l'air, une dénaturation des protéines se produit au moment du séchage. Que se passe-t-il réellement en milieu liquide ? Des observations à l'AFM en milieu liquide permettront peut-être de comprendre cette organisation.

Pour les surfaces micro-structurées, un grand nombre d'études complémentaires doivent être réalisées en faisant varier la taille et la forme des structures. Il serait intéressant de savoir comment les cellules de ce type réagissent à des structures de plus en plus petites par rapport à la taille moyenne de la cellule. Nous avons vu que certaines cellules ont adaptées leurs formes aux lignes. Jusqu'à quel point sont telles capables de le faire ? Le micro-contact printing nous permet d'étudier l'adhésion cellulaire à l'échelle micrométrique. Le substrat structuré nanométriquement permettrait de continuer notre étude à l'échelle suivante. Enfin, des études d'autres paramètres entrant en jeu dans l'adhésion peuvent être envisagées comme par exemple l'étude de la variation du cytosquelette d'actine.

En conclusion, nous avons présenté dans cette thèse les protocoles pour une nanostructuration facile du verre : topographique, avec des trous dans la verre et chimique, avec des organo-silanes. Nous avons aussi présenté des expériences de type pilote pour

5. Conclusion générale

l'exploitation de ce type de substrats. D'abord pour la préparation de bicouches lipidiques supportées dans le but d'étudier des propriétés fondamentales des membranes cellulaires. Ensuite comme gabarit pour le dépôt de protéines dans le but de structurer le substrat pour d'éventuelles études d'adhésion cellulaire.

Cependant, les applications de ce type de substrats sont beaucoup plus larges : par exemple pour préparer des puces à ADN [45], des puces à protéines [46, 125], ou bien des implants [131]. Notre méthode de nanostructuration pourrait devenir largement utilisée en technologie et en laboratoire pour la préparation de substrats dans des applications fondamentales.

Table des figures

1.1.	<i>Vue schématique en coupe d'une cellule animale. On peut y voir les principaux organelles de la cellule. La largeur de la cellule est de 10 à 30 μm [2].</i>	4
1.2.	<i>Vue d'artiste d'une membrane cellulaire. On y voit notamment la bicouche lipidique qui compose la membrane et les diverses protéines intégrées dans la bicouche.</i>	5
1.3.	<i>L'adhésion cellulaire sur un substrat recouvert de protéines de matrice extracellulaire. En rouge on retrouve les complexes d'adhésion ligand-protéines. En bleu, les fibres de stress [23].</i>	7
1.4.	<i>Effet de la structuration de surface sur la cellule. En haut, le schéma représente les micro-structures de protéines d'adhésion. En bas, les cellules adhèrent en prenant la forme pour les structures plus grande que la cellule, n'adhèrent pas sur les plus petites et meurent sur celles du même ordre de grandeur [13].</i>	8
1.5.	<i>La cellule adapte sa forme à la micro-structure de fibronectine [13]. . .</i>	9
1.6.	<i>Adhésion cellulaire sur un substrat micro-structuré . Une cellule de mélanome cultivée durant 1 heure sur un substrat bio-fonctionnalisé par de la fibronectine. En A, vue de l'immunofluorescence de la fibronectine en microscopie de contraste d'interférence. Le substrat détermine la forme des cellules : elle est rectangulaire. En B, les filaments d'actine apparaissent, ils partent des plots de fibronectine [37].</i>	9
1.7.	<i>Cellules mitotiques sur des microstructures de fibronectine de formes différentes (1ère ligne, en rouge). Les pôles sont en rouge, les chromosomes en bleu, les micro-tubules en vert. b) Représentation schématique des micro-structures, les points d'encrage des micro-tubules (ligne orange foncé) [39].</i>	10

1.8. Image de l'adhésion cellulaire sur une surface obtenue en microscopie de contraste de phase. En (A), la surface est couverte de façon homogène par des peptides RGD. En (B) et (C) on retrouve des nano-structures de peptides RGD de respectivement 58 nm (B) et 108 nm de distance (C) [40].	11
1.9. Quelques exemples de structurations de surfaces [53]. Les techniques dip-pen utilisent la pointe d'un AFM pour le dépôt de molécules sur la surface (A,B). La nanoshaving utilise une pointe d'AFM pour retirer des molécules d'une couche de résine préalablement déposée sur la surface (C). Le nanografting utilise une pointe AFM pour remplacer les molécules d'une monocouche auto-assemblée par une autre molécule ayant une plus grande affinité avec la surface (D,E). La lithographie électronique permet d'insoler une résine sensible avec des électrons (F,G). Le nano-contact printing (voir microcontact printing) permet de déposer des molécules à l'aide d'un timbre (H). Toutes ces techniques, sauf le nano-contact printing, sont des étapes préalables à une gravure ou le dépôt de d'autres molécules (I,J ,L,M)	15
1.10. Structuration de surface grâce à des billes de latex. Les billes sont collées sur la surface puis les organo-amino-silanes sont évaporés à travers [55]. En A, B, C, E ce sont des images AFM à différentes échelles caractérisant la structuration de la surface. En D, profil en z obtenu à partir de l'image C.	16
1.11. Vue schématique de la technique de retrait de l'aluminium. Un fin film d'aluminium est structuré par une technique de lithographie classique sur une surface de verre. La fibronectine est attachée par une liaison covalente à la fonction amine du silane. L'aluminium est dissous. Une bicouche lipidique est déposée sur le substrat laissé à nu [56].	17
1.12. Structures hybrides protéines lipides produites par lithographie électronique. (A) Mesure de la hauteur du gabarit d'aluminium par AFM. (B) Ligne de balayage le long de l'image (A). Image de fluorescence d'une bicouche lipidique (en rouge) formée après retrait de l'aluminium. (D) Image de fibronectine correspondante (vert) [56].	18
1.13. Technique de préparation d'une surface structurée avec des plots d'or [57]. 19	
1.14. Image AFM de plots d'or sur une surface. A gauche, vues de la surface structurée par les plots d'or. A droite, profils en z des surfaces de gauche. [57].	19

2.1.	<i>La molécule d'OTS et la réaction de liaison entre l'OTS sur le silicium. [64].</i>	24
2.2.	<i>La liaison peptide : la fonction NH_2 d'un acide aminé se greffe sur la fonction acide carboxylique COOH. Une liaison covalente se crée.</i>	25
2.3.	<i>Le dépôt d'APTES sur une surface de SiO_2 (verre) ou oxyde de surface d'un wafer en silicium.[56]</i>	25
2.4.	<i>Formule chimique de la molécule de méthacrylate de méthyle. Elle est répétée n fois pour obtenir le polyméthacrylate de méthyle.</i>	26
2.5.	<i>Le PDMS de chez Sylgard®. En A, la formule chimique de l'oligomère composant la base.. En B, la formule chimique de l'oligomère composant l'agent réticulant. En C, la réaction de réticulation du PDMS. Les chaînes carbonées insaturées de la base vont faire une liaison covalente avec les groupes hydrosilanes de l'agent de réticulation sous l'action du catalyseur platine. Il y a formation des ponts réticulés qui</i>	28
2.6.	<i>Schéma montrant les transferts radiatifs ayant lieu lors de la fluorescence. S_0, S'_1, S_1 sont les états électroniques : initial-après excitation-après désexcitation radiative. Un photon incident fait passer l'état électronique initial (S_0) vers un état excité. A cause des transfert radiatifs, l'énergie de l'état excité diminue (S'_1). Le photon réémit lors de la désexcitation électronique a une énergie inférieure à celle du photon initial. Le décalage d'énergie entre les photons incidents et réémis permet l'observation en microscopie optique.</i>	29
2.7.	<i>Structures chimiques de deux fluorophores : (a) la molécule de fluorescéine isothiocyanate (FITC). (b) la molécule de boron-dipyrromethene (BODIPY) [69].</i>	29
2.8.	<i>La structure chimique de l'acide arachidique : la tête hydrophile est composée de OH-C=O, une chaîne carbonée compose la partie hydrophobe.</i>	30
2.9.	<i>La structure chimique du DOPC. Il comporte une tête de phosphatidylcholine et deux chaînes carbonées.</i>	30
2.10.	<i>Formation d'un complexe anticorps-antigène [70]. L'anticorps est une molécule en forme de Y dont le paratope (en rouge) permet de faire une liaison spécifique avec une molécule de forme complémentaire présente sur l'antigène, l'épitope (bleu foncé). La formation d'un complexe anticorps-antigène n'est possible qu'entre un paratope et un épitope dont les structures chimiques sont parfaitement complémentaires.</i>	31

Table des figures

- 2.11. *Schéma de principe des gravures chimique et physique. La gravure chimique est isotrope, elle attaque le substrat avec la même vitesse dans toutes les directions ce qui induit un élargissement des motifs obtenus. La gravure physique est anisotrope donc attaque une direction préférentiellement mais il en résulte une lenteur dans la gravure.* 34
- 2.12. *Schéma de principe de la gravure ionique réactive (RIE). Le gaz est injecté dans la chambre sous vide. Un champ d'autopolarisation ionise le gaz et sépare les ions des électrons. Les radicaux formés sont accélérés vers la surface de l'échantillon ce qui crée une attaque physique par impact d'ions et chimique grâce aux radicaux réactifs.* 35
- 2.13. *Le principe du spincoateur : un polymère est versé sur une surface rotative. Le polymère s'étale en créant une surface uniforme d'épaisseur contrôlée.* 36
- 2.14. *Montage permettant le dépôt d'organo-silanes en phase vapeur. Un dessiccateur en verre est placé sur une plaque chauffante. Une coupelle contenant l'organo-silane est posée au fond, l'échantillon est placé au milieu sur une plaque percée. Une pompe primaire permet de faire le vide. . . .* 37
- 2.15. *Un exemple de tensioactif : un phospholipide (le DOPC). A : structure chimique du DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, image de avanti polar lipid). Un phospholipide est composé d'une tête hydrophile et de deux chaînes hydrophobes. B : l'auto-organisation d'un phospholipide au contact de l'eau, la tête hydrophile se met en contact avec l'eau et les chaînes hydrophobes en contact avec l'air.* 38
- 2.16. *Courbe montrant la variation de l'aire moléculaire des lipides lors de la compression. Le schéma montre l'auto-organisation des lipides sur la surface lors de la compression. Au départ, les lipides sont en phase gazeuse, les chaînes sont désordonnées et indépendantes. L'aire moléculaire du lipide est grande. La courbe de compression est une droite. Lors de la transition de phase, une rupture se produit sur la courbe. Les lipides passent en phase liquide et commencent à interagir les uns avec les autres. Enfin, ils passent en phase solide, les chaînes hydrophobes sont parfaitement organisées, l'aire moléculaire est minimum. [77].* 40

- 2.17. *La balance de Langmuir. En (A), la balance de Wilhemy (tensiomètre). Elle permet la mesure de la tension de surface. En (B), le contrôleur numérique qui est contrôlé par l'ordinateur. En (C), la cuve à eau avec la barrière mobile et le porte lamelle. Les tensio-actifs sont déposés sur la surface de l'eau, ils s'auto-organisent en une monocouche. La barrière permet de contrôler l'aire occupée par une molécule et donc la phase dans laquelle les lipides se trouvent. Lors du dépôt, elle se ferme pour maintenir la pression de surface constante. Le porte lamelle permet de faire remonter la lamelle avec une vitesse contrôlée.* 41
- 2.18. *Un rectangle de papier filtre est suspendu à l'interface air/eau. Ses dimensions sont L =longueur, l =largeur, e =épaisseur. Il est immergé à une profondeur p . Le ménisque d'eau fait un angle ϑ avec le papier. Il permet de mesurer de mesurer la tension de surface.* 42
- 2.19. *Préparation de bicouche lipidique par la méthode de Langmuir. La première couche est préparée par la méthode de Langmuir-Blodgett : les lipides sont organisés sur la surface de l'eau en une monocouche, les lipides passent sur la lamelle de verre au fur et à mesure qu'elle remonte. La deuxième couche est déposée par la méthode de Langmuir-Schaeffer : la lamelle comportant une monocouche est re-déposée sur la surface d'eau de façon à ce que les chaînes hydrophobes se retrouvent en contacts. La lamelle est enfoncée dans l'eau puis la bicouche peut être récupérée. . .* 43
- 2.20. *Schéma d'une bicouche lipidique supportée. L'épaisseur de la bicouche est de 4 à 6 nm. Une couche d'eau donne aux phospholipides des propriétés de diffusion latérale. Le schéma n'est pas à l'échelle.* 44
- 2.21. *En a) : les étapes de fabrication du moule en silicium. La résine est déposée par spincoating sur la surface de silicium puis insolée à travers un masque. Les parties insolées sont retirées au moment du développement. La surface de silicium est donc recouverte de résine selon le motif inverse de celui du masque. Les parties protégées resteront intactes au moment de la gravure alors que les parties à nu seront gravées. Après retrait complet de la résine, le silicium composant le moule est structuré topographiquement avec les motifs voulus. En b) : un traitement anti-adhésif est nécessaire, une couche de molécule est déposée pour permettre le démoulage du polymère. En c) : le PDMS est versé dans le moule. C'est un liquide visqueux, il prend donc la forme des motifs présents. La réticulation le fait durcir, il peut alors être démoulé.* 46

Table des figures

2.22. Image en microscopie optique de la résine photosensible déposée sur le silicium après révélation. Les lignes foncées sont les lignes de résine. Barre d'échelle 100 μm 47

2.23. Les étapes du micro-contact printing. Le timbre en PDMS est encre avec une solution d'intérêt, par exemple des protéines. Une étape de séchage est effectuée. Le timbre est mis en contact avec la surface à imprimer. Les molécules sont transférées sur la surface selon les motifs présents sur le timbre. Après retrait, des motifs de molécules sont sur la surface. 48

2.24. Photo du microscope électronique à balayage (modèle 6320F, Jeol) du CINaM. 49

2.25. Schéma décrivant le principe de fonctionnement de l'AFM à l'air. La pointe est accrochée sur le levier, un laser est réfléchi sur celui-ci au niveau de la pointe et envoyé au centre d'une photo-diode à 4 quadrants. Lorsque la pointe est déviée, le signal se déplace sur la diode. 50

2.26. Schéma de l'interaction entre les molécules composant le bout de la pointe de l'AFM et celle de la surface. Les molécules sont soumises à des forces d'attractions jusqu'au moment où les forces de répulsions prennent le dessus. 51

2.27. Représentation schématique d'une pointe AFM, lors de son fonctionnement en mode tapping [95]. La pointe oscille à sa fréquence de résonance. Lorsqu'elle rencontre une marche, l'amplitude d'oscillation diminue puis redevient « normale » après la marche. 52

2.28. L'AFM utilisé est un AFM à l'air de type nanoscope III. 52

2.29. Principe de RICM. La lumière est envoyée sur l'objet avec une intensité initiale I_0 , une partie est réfléchi (I_1) et l'autre transmise puis réfléchi par l'objet (I_2). Il est alors possible d'obtenir des interférences entre I_1 et I_2 53

2.30. Montage expérimental pour un microscope en RICM. AD : diaphragme d'ouverture, FD : diaphragme de champ, QWP : lamelle quart d'onde, SRM : miroir semi-réfléchissant, P : polariseur, A : analyseur. Dans le cercle : la méthode antiflex qui utilise la polarisation de la lumière pour augmenter le contraste. [97] 54

2.31. Exemples de quelques échantillons observés en RICM. A) Une bille de polystyrène ($10\mu\text{m}$ de diamètre) déposée sur un substrat, échelle $2\mu\text{m}$. B) B : une goutte de taille millimétrique contenant de l'actine, échelle $5\mu\text{m}$. C) des vésicules phospholipidiques géantes adhérant partiellement au substrat, les zone d'adhésion sont signalés par une flèche, échelle $5\mu\text{m}$. D) adhésion d'un monocyte, échelle $5\mu\text{m}$ [97]. Lors de l'observation d'objet uniforme (A et B) l'image donne des franges d'interférences en bord de zone. Les images sont en niveau de gris. Lors de l'adhésion de cellules ou vésicules, la partie en contact avec la surface apparaît en noir, alors que les parties qui ne sont pas en contact sont en niveau de gris selon leur éloignement du substrat.	56
2.32. Le microscope optique de fluorescence.	57
2.33. Le suivi de particule unique. Une particule est accrochée sur un lipide marqué grâce, par exemple à un anticorps. La particule suit le mouvement du phospholipide sur lequel elle est accrochée.	58
2.34. Le principe du FRAP. En a) : la fluorescence est éteinte sur une zone grâce à un faisceau laser. La fluorescence revient grâce à la diffusion des molécules sur la surface. En b) : la courbe d'intensité de fluorescence en fonction du temps. Avant le photoblanchiment, l'intensité est maximum, elle est ensuite éteinte. La tangente de la courbe de retour permet de remonter à la constante de diffusion.	58
2.35. Le principe du photoblanchiment continu. Une zone limitée par le diaphragme de champ est photodégradée et observée en permanence. Une zone claire composée de lipides non dégradés apparaît en bord de diaphragme. L'intensité en fonction de la position est une exponentielle décroissante. Elle permet de déduire la constante de diffusion des lipides.	58
2.36. Schéma décrivant le principe de la FCS. La molécule fluorescente entre dans le spot laser, elle est excitée par celui-ci et émet un flux de photons [104].	60
2.37. L'intensité $I(t)$ varie autour de la position moyenne (graphe de gauche) $\langle I \rangle$. On en déduit une fonction d'auto-corrélation (ACF) $G(\tau)$ [104].	60

2.38. *Le montage de FCSrv de Fresnel [108]. Les fluorophores sont excités par un laser Ar+ ion à 488 nm. Le faisceau d'excitation est focalisé par un objectif de microscope de forte ouverture numérique. Seul les fluorophores présents dans la zone illuminée sont excités. La fluorescence est collectée à travers le même objectif. Un miroir dichroïque permet de séparer la lumière d'émission de celle d'excitation. En effet, elles ont une longueur d'onde différentes à cause du déplacement de longueur d'onde de Stokes. Une photodiode à avalanche permet de détecter les photons. L'intensité de fluorescence est ensuite envoyée vers un corrélateur qui permet de faire une fonction d'autocorrélation. 62*

2.39. a) *Trajectoire d'un phospholipide :*
A : diffusion brownienne.
B : microdomaines. La probabilité d'entrée et de sortie du domaine est asymétrique. De plus, la constante de diffusion est différente à l'intérieur et à l'extérieur des microdomaines
C : barrières poreuses. Les domaines sont séparés par un maillage de barrières poreuses avec une probabilité P de passer la barrière et d'aller dans le domaine suivant. La constante de diffusion est la même dans chaque domaine.
b) Résultat de simulation de FCSrv sur les trajectoires précédentes. La courbe $f(\omega^2)=\tau_D$ est tracée dans chaque cas (unité arbitraire). La partie grisée est inaccessible expérimentalement. [110]. 63

3.1. *Schéma d'une membrane d'alumine poreuse. L représente la largeur d'un pore, Δ la distance interpores, h la hauteur des pores. Le fond est fermé par une couche d'alumine d'épaisseur L. [111] 68*

3.2. *Le principe de l'anodisation. Un courant électrique est appliqué sur une plaque d'aluminium (gris foncé). La surface de l'aluminium est oxydée. Le champs électrique créé permet la migration des ions dans l'alumine [114]. 69*

3.3. *(a) Montage expérimental permettant la préparation des membranes d'alumines poreuses : (1) la cellule contenant l'acide, (2) cellule en cours d'utilisation, (3) la cellule avec le fil de platine et le moteur, (4) les générateurs. (b) Schéma d'une cellule utilisée pour l'électropolissage et l'anodisation. 70*

3.4.	<i>Membranes d'alumine poreuses observées au MEB (a) et (b) Pores de 40 nm de diamètre théorique, (c) et (d) Pores de 180 nm de diamètre théorique, (c) zoom. (e) la membrane d'alumine poreuse vue de dessous, le diamètre théorique des pores est de 200 nm. Le fond des pores de l'alumine apparaît : les bosses correspondent à la couche d'alumine qui ferme les pores. L'épaisseur théorique de la couche d'alumine est de 200 nm.</i>	74
3.5.	<i>Schéma récapitulatif du protocole d'ouverture du fond des pores de l'alumine. Des images MEB illustrent les étapes . Une couche de polystyrène est déposée par spin-coating sur l'alumine. L'aluminium est dissous dans du sulfate de cuivre. Enfin, le fond des pores est plongé dans de l'acide phosphorique pour permettre l'ouverture du fond. Après dissolution du polystyrène, on obtient une membrane ouverte de part et d'autre (le schéma n'est pas à l'échelle).</i>	76
3.6.	<i>Comparaison de l'ouverture du fond des pores d'une membrane d'alumine avec de l'acide phosphorique à 10 % après 40 min (a et b) et 45 min (c et d) dans l'acide phosphorique à 10 %. La membrane est observée par dessous. En (a) et (b) l'observation est faite après 40 min en deux endroits différents. En (a) les pores sont à peine ouverts alors qu'en (b) l'ouverture est complète. En (c) et (d), on observe deux endroits après 45 min. En (c) l'ouverture est complète alors qu'en (d), la totalité de la membrane a été dissoute et il ne reste que le polystyrène.</i>	78
3.7.	<i>Images MEB d'une membrane d'alumine vue de dessous. a) Au temps initial $T=0$, une couche d'alumine d'épaisseur théorique de 200 nm ferme le fond des pores de la membrane b) Après 45 min d'immersion dans l'acide phosphorique, toute l'alumine a été dissoute, il ne reste que la couche de polystyrène.</i>	79
3.8.	<i>Images MEB de la couche d'alumine fermant les pores après plusieurs temps d'immersion fractionnés dans de l'acide phosphorique (7%, 4°C). a) Après 1h30 d'immersion. b) La même 3h40 après ré-immersion durant 3h40 (5h10 au total) c) La même après 1h30 de ré-immersion (6h40) d) une membrane après 15h.</i>	80
3.9.	<i>Après un temps d'immersion de 8h45 dans l'acide à 7%, le fond des pores est toujours fermé.</i>	81
3.10.	<i>Les étapes de la nano-structuration du verre. La membrane d'alumine est collée sur la surface. Une gravure ionique réactive est effectuée : les parties protégées par l'alumine restent intactes alors que le verre est attaqué. Après retrait de la membrane, la surface est structurée topographiquement.</i>	82

Table des figures

3.11. A) Une lamelle de verre nettoyée observée à l'AFM à l'air. La rugosité est faible ($rms=0,2\text{ nm}$). B) Profil en z de la surface.	83
3.12. Une surface de verre structurée en utilisant une membrane d'alumine comme masque de gravure ionique réactive caractérisée par AFM. A) Verre structuré, insert : image MEB de la membrane d'alumine utilisée. B) Profil en z d'une collection de trous. Les points blancs correspondent à des poussières dont la hauteur à été coupé lors du traitement d'image.	84
3.13. Transformée de Fourier 2D de la surface de verre structurée. L'image dans l'espace de Fourier montre une bonne organisation de la surface de verre structurée.	84
3.14. A) Une lamelle de verre structurée caractérisée par AFM. B) Profil en z d'une collection de trous.(a) Image $8\mu\text{m}\times 8\mu\text{m}$ (b)Zoom sur les structures.	85
3.15. Statistique sur le verre structuré. En (a) la distribution de la profondeur des trous. En (b), la distribution du diamètre des trous obtenus en mesurant la largeur à mi-hauteur. En (c), la distribution du paramètre de maille distance entre les trous.	86
3.16. A et B : isothermes de l'acide arachidique (A) et du Egg-PC (B). C et D : courbes de dépôts de l'acide arachidique (C) et du Egg-PC (D) . . .	88
3.17. Image en microscopie de fluorescence d'une bicouche lipidique supportée déposée sur du verre. La zone d'observation est limitée par le diaphragme de champ du microscope. La bicouche contient 1% de lipides fluorescent marqués avec du FITC.	88
3.18. (a) (b) Vérification par photoblanchiment continu de la fluidité d'une bicouche lipidique préparée avec du egg-PC et des lipides marqués au FITC. Le diaphragme limite aussi la zone photoblanchis. Les fluorophores éclairés sont dégradés. Au bord de la zone photodégradée, une zone claire apparaît, elle correspond aux fluorophores non photoblanchit qui entrent dans la zone grâce à la diffusion. (b) Profil d'intensité le long de la ligne en (a) : niveau de gris en fonction de l'intensité. La partie la plus sombre correspond au diaphragme de champ. Le gradient d'intensité est du à l'entrée de phospholipides marqués avec des fluorophores non photoblanchis. (c) (d) Photoblanchiment continu sur une surface couverte d'avidine fluorescente pour la comparaison. La couche est fixe, il n'y a pas de zone claire. (b) Profil d'intensité le long de la ligne en (c).	90

3.19. <i>Mesure de la diffusion par FCSrv sur une bicouche fluide. La droite bleue est une extrapolation linéaire des mesures obtenues. Elle passe par 0. Pour chaque diamètre de laser, quatre mesures ont été faites, τ_D est obtenu par fit de la fonction d'autocorrélation. La moyenne des 4 valeurs donne τ_D, l'écart-type donne la barre d'erreur.</i>	92
3.20. <i>A) Une lamelle de verre structurée observée par AFM. B) Profil en z d'une collection de trous.</i>	93
3.21. <i>Statistique sur le verre percé. En (a) la distribution de la profondeur des plots. En (b) la distribution des diamètres des trous obtenus en mesurant la largeur à mi-hauteur. En (c) la distribution du paramètre de maille. .</i>	94
3.22. <i>a) Isotherme du DOPC, b) courbe de dépôt du DOPC</i>	95
3.23. <i>Mesure des propriétés de diffusion par FCSrv sur une bicouche lipidique supportée déposée sur une lamelle de verre structurée. La droite verte est une extrapolation linéaire des mesures obtenues. La courbe coupe l'axe des ordonnées dans la partie négative de la courbe. Pour chaque diamètre de laser, quatre mesures ont été faites, τ_D est obtenu par fit de la fonction d'autocorrélation. La moyenne des 4 valeurs donne τ_D, l'écart-type donne la barre d'erreur.</i>	96
3.24. <i>Schéma récapitulatif des deux modèles numériques de comportement de bicouches en FCSrv pour des surfaces hétérogènes. a) Des domaines dont la probabilité d'entrée et sortie est asymétrique. b) Un maillage sépare des domaines où la probabilité d'entrée et de sortie est symétrique. . .</i>	96
3.25. <i>Schémas montrant deux configurations possibles pour la bicouche phospholipides sur la surface de verre structurée. En (a), la bicouche est plus « proche » du verre en dehors des structures et plus éloignée en dehors. Il est alors envisageable que la constante de diffusion soit inférieure lorsque la bicouche est ralentie par le verre, c'est à dire hors des structures et plus grande dans les structures. En (b), la bicouche est toujours à la même distance du verre, la constante de diffusion est la même dans les deux cas. La « marche » constitue la barrière franchissable pour les lipides. .</i>	97

Table des figures

4.1.	<i>Protocole mis en place pour le dépôt d'organo-amino-silanes. La membrane d'alumine est collée sur la surface de SiO₂ avec une goutte de solvant. (a) Les organo-amino-silanes sont évaporés à travers la membrane et se déposent sur le substrat non protégé. Après retrait de la membrane, il est attendu une structuration de surface. (b) Cependant la surface de la membrane est rugueuse, elle n'adhère pas sur la surface de façon homogène. Les silanes passent en dessous et s'étalent sur toute la surface. Le schéma n'est pas à l'échelle.</i>	102
4.2.	<i>Image MEB d'une membrane d'alumine collée avec une goutte d'éthanol sur une surface de verre. (a) Adhésion en bord de membrane (inclinaison à 30°). (b) Vue de la surface de la membrane.</i>	103
4.3.	<i>Méthode de préparation d'un gabarit composé d'une membrane d'alumine et de PMMA. La membrane d'alumine est collée grâce à une couche de PMMA spincoatée. La RIE est faite : le PMMA protégé par l'alumine reste intact alors que celui non protégé est retiré. Un gabarit est obtenu. Le schéma n'est pas à l'échelle.</i>	104
4.4.	<i>Image AFM d'un substrat percé par un impact d'ions. Le fond des trous contient de l'amino-silane.</i>	104
4.5.	<i>(A) PMMA structuré en surface mais la gravure est incomplète. (B) La gravure est complète et permet un dépôt éventuel de molécule sur le substrat de SiO₂.</i>	105
4.6.	<i>Images MEB d'une couche de PMMA structurée sur substrat de silicium. En (a), vue inclinée de 30° d'un échantillon sans aucun traitement de surface. Le silicium clivé apparaît en gris clair, le PMMA apparaît en noir. En (b), une couche d'or a été déposée sur la surface pour faciliter l'observation : zoom sur la structuration.</i>	106
4.7.	<i>Essai de la structuration avec des membranes d'alumine comportant des pores de diamètre théorique de 40 nm. Image AFM de la couche de PMMA sur un wafer de silicium après le passage à la RIE : la surface est plane, il n'y a pas eu de structuration. La rugosité est très faible (rms=0,26 nm).</i>	107
4.8.	<i>Un couche de PMMA de 500 nm déposée sur un substrat de verre et structurée par la RIE (caractérisé par AFM à l'air). On observe une structuration comportant un réseau hexagonal de trous similaire aux motifs du masque d'alumine utilisé.</i>	108

4.9.	<i>Statistique sur le PMMA structuré déposé sur verre. En (a) la distribution des profondeurs de trous. En (b), la distribution des largeurs des trous en mesurant de la largeur à mi-hauteur. En (c), la distribution des distances entre les trous.</i>	109
4.10.	<i>Image AFM à l'air d'une monocouche d'APTES sur wafer de silicium. A) La surface. B) Profil en z</i>	110
4.11.	<i>a) Image en RICM d'une goutte d'eau sur une surface de verre propre : (A) Image d'interface (B) Profil de l'intensité en niveau de gris. b) Image en RICM d'une goutte d'eau sur une surface couverte d'APTES : (A) Image d'interface (B) Zoom (C) Profil de l'intensité en niveau de gris.</i>	111
4.12.	<i>Mesure de l'angle de contact. L'angle est mesuré à partir de l'image de la goutte. La goutte est réfléchiée sur la surface. a) Sur verre b) Sur verre silanisé.</i>	112
4.13.	<i>Nano-structuration de la surface par évaporation d'organo-silanes à travers le gabarit. Après retrait du PMMA des îlots d'OTS sont obtenus.</i>	112
4.14.	<i>A) Image AFM de la structuration de surface sur silicium par des plots d'OTS. B) Profil en z d'une collection de plots d'OTS.</i>	113
4.15.	<i>Image AFM (zoom) de la structuration de surface sur silicium par des plots d'OTS.</i>	113
4.16.	<i>Image dans l'espace de Fourier de la surface structurée avec des plots d'OTS. Un anneau montre une tendance à l'organisation.</i>	114
4.17.	<i>Statistique sur le plots d'OTS déposés sur silicium. En (a) la distribution des hauteurs de plots. En (b), la distribution des diamètres des plots obtenus en mesurant de la largeur à mi-hauteur. En (c), la distribution des distances entre les plots.</i>	115
4.18.	<i>Comparaison de deux images AFM de substrats de silicium structurés avec des plots d'OTS de tailles différents. a) la largeur moyenne est de 320 nm, b) de 411 nm (AFM).</i>	116
4.19.	<i>(a) A) Image AFM de la structuration de surface sur silicium par des plots d'OTS. B) Profil en z d'une collection de plots d'OTS. (b) Zoom .</i>	117
4.20.	<i>La surface structurée avec de l'APTES est révélée grâce à la fonctionnalisation avec du PMMA (image AFM).</i>	118
4.21.	<i>A) Image AFM d'une surface nanostructurée avec de l'OTS sur lequel un dépôt non spécifique d'avidine à été fait. B) Profil en z d'une collection de plots d'OTS.</i>	120

Table des figures

4.22. L'image AFM montre l'échantillon test (A) : on retrouve le réseau hexagonal de plots d'OTS sur silicium.	122
4.23. Statistique sur les plots d'OTS. En (a) la distribution de hauteur des plots. En (b), la distribution des diamètres des plots obtenus en mesurant la largeur à mi-hauteur. En (c), la distribution des distances entre les plots.	123
4.24. En (a) l'image AFM de l'échantillon mis en contact avec les protéines. En (b), profil en z d'une collection d'agrégats. En (c), zoom sur une structure hexagonale.	124
4.25. Statistique sur les agrégats de protéines structurés déposés sur verre. En (a) la dispersion des hauteurs des agrégats. En (b), la dispersion des largeurs obtenues en mesurant la largeur à mi-hauteur. En (c), la dispersion des distances entre les agrégats.	126
4.26. Image MEB d'un timbre en PDMS.	128
4.27. Image en microscopie de fluorescence d'un dépôt de BSA FITC par μ CP. Le dépôt est de très mauvaise qualité. Les motifs sont correct dans certaines zones.	129
4.28. Image en microscopie de fluorescence d'une lamelle de verre structurée avec de la BSA-FITC déposée par micro-contact printing.	130
4.29. Image AFM (à gauche) d'un dépôt de BSA par micro-contact printing. A droite, la hauteur moyenne du dépôt est d'une dizaine de μ m.	130
4.30. Protocole de fonctionnalisation. Ce protocole n'a pas eu le résultat attendu	131
4.31. Image en microscopie de fluorescence de la bio-structuration. Les lignes fonctionnalisées d'IgG1 déposés par micro-contact printing apparaissent en noir. L'anticorps fluorescent est en vert clair. Une fluorescence résiduelle est observée sur les lignes d'IgG1. La barre d'échelle représente 100 μ m.	132
4.32. Protocole de fonctionnalisation. A : Préparation de la surface et du timbre. En B : micro-contact printing de BSA biotine. En C : Ajout de l'anticorps anti CD 11-FITC. En D : L'avidine s'accroche sur la biotine. En D : L'IgG biotine s'accroche sur la streptavidine. Le schémas n'est pas à l'échelle.	133
4.33. Image en microscopie de fluorescence d'une surface de verre structurée par : a) de la BSA-biotine déposée par micro-contact printing. L'anticorps d'adhésion est déposé après la BSA, c'est la molécules fluorescente qui apparaît en blanc. b) La streptavidine fluorescente est déposée sur la surface. Elle se met en évidence le dépôt de BSA-biotine.	134

4.34. *En (a) : image en fluorescence. Les lignes fluorescentes d'IgG apparaissent en vert clair. En (b) on retrouve l'image en RICM correspondante sur laquelle la partie de la cellule qui adhère à la surface apparaît en noir. En (c) : superposition des deux images précédentes en transparence : l'image (b) est colorée en fausse couleur rouge. Sur un total de 279 cellules 250 sont soit dans les lignes, soit leur forme est adaptée aux lignes, et 29 sont en dehors des lignes. La barre d'échelle mesure 10 μm .* 136

Liste des tableaux

2.1.	<i>Paramètres de dépôt nécessaires pour maîtriser l'épaisseur de la couche de PMMA déposée : données du fabricant.</i>	26
2.2.	<i>Spécifications des leviers de la série NSC-35. Données du fabricant. . .</i>	53
3.1.	<i>Les paramètres nécessaires à l'obtention des trois tailles de diamètres de pores des membranes d'alumine poreuses.</i>	72
3.2.	<i>Grandeurs caractéristiques moyennes des réseaux de trous obtenus, mesurées sur la lamelle de verre structurée.</i>	85
3.3.	<i>Grandeurs caractéristiques moyennes mesurées sur les lamelles de verre structurées.</i>	93
4.1.	<i>Mesures des grandeurs caractéristiques du PMMA structuré.</i>	109
4.2.	<i>Tableau récapitulatif la distance moyenne entre deux plots d'OTS, de leur hauteur moyenne et de leur largeur à mi-hauteur.</i>	114
4.3.	<i>Tableau comparatif de la distance moyenne entre deux plots d'OTS, de leur hauteur moyenne et de leur largeur à mi-hauteur pour chacune des images AFM de la figure 4.18.</i>	116
4.4.	<i>Tailles moyennes des îlots d'APTES.</i>	119
4.5.	<i>Tableau récapitulant le protocole effectué pour la préparation des échantillons A et B.</i>	121
4.6.	<i>Grandeurs caractéristiques moyennes mesurées sur les plots d'OTS sur silicium.</i>	122
4.7.	<i>Taille moyenne des agrégats de protéines.</i>	125
4.8.	<i>Répartition des cellules en fonction de leurs comportements au contact des lignes bio-fonctionnalisées, en nombre de cellules puis en pourcentage.</i>	135

Annexe

A. Produits chimiques et matériel utilisés

- Plaquettes d'aluminium pures à 99,999 % *Goodfellow* (Allemagne)
- Acide oxalique, acide phosphorique, acide chromique, HClO_4 *Sigma-Aldrich* (France)
- Wafers de silicium orientés (100) dopé n *Siltronix* (France)
- Polyméthacrylate de méthyle (PMMA) *Allresist* (Allemagne)
- Polydiméthylsiloxane (PDMS) *Sylgard™ 184* (Dow Corning, Etats Unis)
- Octadécyltrichlorosilane (OTS) et aminopropyltriéthoxysilane (APTES) *Sigma-Aldrich* (France)
- EggPC, DOPC *Avanti polar lipid* (France)
- Gravure ionique réactive MG-200 *Plassys* (France)
- Microscope inversé Zeiss Axiovert 200 *Carl Zeiss* (Allemagne)
- Balance de Langmuir *Nima* (Angleterre)
- Microscope électronique à balayage *6320F Jeol* (Japon)
- Acide arachidique *Nima* (Angleterre)
- Protéines *Invitrogen* (France)
- Anticorps monoclonaux de souris Kappa CHAIN -FITC IMMUNOTECH Cat. no : 0138 *Beckman Coulter* (France)

B. Protocole de nettoyage des lamelles pour le Langmuir

- Solution à 2 % de tensio-actif (2 ml dans 100 ml d'eau), 30min au bain à ultrasons
- Rincer 5 fois à l'eau DI (dé-ionisée)
- Solution à 2 % de tensio-actif , 30 min au bain à ultrasons
- Rincer 10 fois à l'eau DI
- 30 min au bain à ultrasons dans l'eau DI
- Rincer 10 fois à l'eau DI
- 30 min au bain à ultrasons dans l'eau DI
- Rincer 10 fois à l'eau DI

C. Liste des publications

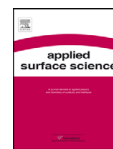
1. S.Massou, L. Masson, I Ozerov, E. Moyen, K. Sengupta and M. Hanbücken
Large scale ordered topographical and chemical nano-features from anodic alumina templates.
Ap.Su.Sc. 256 (2009) 395–398
2. E. Moyen, M. Macé, S. Massou, H. Sahaf, L. Masson, K. Sengupta, M. Hanbucken.
Selective functionalization of substrates through assembled nanostructures : From physics to biology.
Ap.Su.Sc. 256 (2009) 414–418
3. P. Moretto-Capelle, A. Le Padellec, G. Brière, S. Massou, and F. Franceries
Energetics and metastability of the adenine dication observed in proton-adenine collisions.
J.Chem.Phy. 127, 234311 2007
4. V.Anton-Leberre, E.Haanappel, N.Marsaud, L.Trouilh, L.Benbadis, H.Boucherie, S.Massou, JM.François
Exposure to high static or pulsed magnetic fields does not affect cellular processes in the yeast Saccharomyces cerevisiae.
Bioelectromagnetics, 2010 Jan, 31(1) :28-38.

Texte des publications relatives à
cette thèse



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc

Large scale ordered topographical and chemical nano-features from anodic alumina templates

Sophie Massou, Laurence Masson, Igor Ozerov, Eric Moyen, Kheya Sengupta*, Margrit Hanbücken

CNRS, Aix-Marseille Université, CINaM UPR 3118, Campus de Luminy, Case 913, 13288 Marseille, Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 21 June 2009

Keywords:
Nano-patterning
Anodic alumina
Nano-topography
Ordered organic nano-features

ABSTRACT

We have used ordered anodic alumina membranes as masks to create large scale ordered arrays of either holes or chemical islands on silica. Regularly spaced holes were obtained by direct etching of silica/silicon or glass substrates through the membranes used as etching masks. To create an array of chemically functional islands, the membrane is first glued on the substrate using a soft polymer and subsequently the polymer is etched gently through the mask. Finally organo-silane molecules are deposited through the alumina/polymer hybrid mask and the mask is removed chemically leaving nanoislands on the substrate. We anticipate that this technique will be useful in future biological and biomedical applications.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last decade, ordered micro arrays of DNA and proteins have found wide application in making micro-chips for genomic and proteomic assays and micro-biosensors. Recent trend is to go from micro- to nano-scale [1–3]. In addition, there is a huge interest in creating ordered islands of adhesive protein islands in a sea of passivated surface for cell biological studies. In the past years it has become increasingly clear that living cells respond not only to the biochemical nature of the molecules presented to them but also to the way these molecules are presented. Single molecules of ligands that are separated by distances larger than a cut-off length scale of about 100 nm fail to support cell spreading and their subsequent proliferation and growth [4]. Similarly, the nano-topography of the surface also influences cell behaviour [5]. Even more intriguingly, the randomness of the pattern seems to play a role in cell spreading [6].

In this context there is a real need of developing easily accessible methods of creating protein nano-islands. One of most extensively used current techniques is micro contact printing. Here, a silicon mould prepared by conventional UV-lithography is used to prepare a soft polymer stamp which is then inked with a protein solution which is dried and stamped on glass [7]. This technique has now been extended to the nano-scale with certain

variations and is called nano-contact printing [8]. The two main drawbacks of this techniques are the following: first, the resolution of the technique is limited by optical considerations and therefore the smallest pattern size reliably achieved is about 200 nm at the present time and second, a more fundamental drawback is that the protein is dried before stamping—a process which may denature the protein. Another promising technique is dip-pen and parallel dip-pen lithography where an AFM like device is used to deposit protein islands [9]. However, even the parallel case where one whole row of islands is deposited at once is rather slow and painstaking. Variation to dip-pen lithography like nano-shaving based on the idea of selective removal rather than deposition of material has been proposed (see [10] and references therein) but instances of practical applications are limited.

A very important requirement for any patterning technique to be used for cellular studies is that of large coverage, hence various techniques based on self-assembly provide a promising alternative route. A versatile technique, already used for detailed cell studies is that based on self-assembly of gold nano-particles assisted by di-block copolymers [4]. Here, gold is precipitated from a solution into lacuna of di-block copolymer micelles which are then deposited on the substrate. The copolymer is subsequently removed by plasma etching leaving the gold particles arranged in a regular array. The gold is subsequently functionalized by thiol-chemistry. A slightly different approach is adapted in colloidal bead lithography where polystyrene colloids self-assembled on the substrate act as mask for deposition of organo-amino-silanes [11]. Functionalization with proteins is usually achieved through the amine function. The main drawback of this technique is the limitations on size and shape imposed by the colloid geometry.

* Corresponding author. Tel.: +33 660302862; fax: +33 491826297.

E-mail addresses: massou@cinam.univ-mrs.fr (S. Massou), masson@cinam.univ-mrs.fr (L. Masson), ozarov@cinam.univ-mrs.fr (I. Ozerov), moyen@cinam.univ-mrs.fr (E. Moyen), sengupta@cinam.univ-mrs.fr (K. Sengupta), margrit.hanbuecken@cinam.univ-mrs.fr (M. Hanbücken).

In the present paper we propose an alternative to the above techniques for functionalising glass or silica. Instead of self-assembled colloids, we use porous ordered anodic alumina (OAA) membranes as masks. Since their discovery [12], OAA membranes have been improved upon and have found various applications in nano-science [13–18]. We are able to make ordered arrays of holes as well as islands of chemical structures. Using this technique, we shall eventually be able to create islands of size down to 20 nm [14] but the current size limit is about 180 nm.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and substrates

Commercially available aluminium wafers (Goodfellow, Germany) of 99.999% purity were used to produce the OAA membranes. Silicon (100)-oriented 2 and 4 inch n-type wafers (Siltronix, France) or thickness corrected glass cover-slides (Assistant, Karl Hecht KG, Germany) were used as substrates for patterning. All chemicals for production of anodic alumina membranes, all organic solvents, as well as OTS (octadecyltrichloro silane) were from Sigma–Aldrich (France). Poly methyl-methacrylate (PMMA) dissolved in ethyl-lactate at 2% concentration was from Allresist (Germany).

2.2. Electron microscopy and atomic force microscopy

For electron microscopy, samples were coated either with gold or with graphite and were imaged with a scanning electron microscope (JSM 6320F, Jeol, Japan). Atomic force microscope (AFM) studies were conducted using a Nanoscope III (Veeco/Digital Instruments, USA). The patterned silicon or glass substrates were cut to the required size before use. Imaging was done in air in the non-contact (tapping) mode using ultra sharp silicon NSC-35 cantilevers. Images were treated and analysed using the freely available software WsxM (Nanotec Electronica S.L., Spain) [19]. All the images presented here have been flattened to remove global tilt. Figs. 4 and 5 were additionally treated to remove specks corresponding to point like dust particles.

2.3. Reactive ion etching

Directed ion etching was carried out using a conventional RIE machine MG-200 (Plassys, France). The samples were etched by oxygen plasma at a pressure of about 2 kPa. The thickness of the etched layers was monitored *in situ* by a laser interferometer. The spot of the laser interferometer was pointed to an area on the substrate covered by polymer situated outside the mask.

Non-directed plasma was generated using an isotropic etching system DSB-3 (Nanoplas, France). We used oxygen radical flux at a pressure of 90 Pa. Both systems are equipped with 300 W radiofrequency (RF) generators operated at 13.54 MHz.

3. Results and discussion

We use the well known self-ordering of anodic alumina membranes as the starting point. Ordered anodic alumina membranes, with defined pore spacing are obtained as described before [18]. The typical thickness of the OAA membranes, controlled by the time of anodization, is chosen to be about 1 μm . The alumina backing is removed by chemical etching with CuSO_4 . The pores are then opened by careful and controlled etching with 10% H_3PO_4 . This yields a porous sheet made of alumina. The inset in Fig. 1 shows an electron micrograph of a typical example of ordered porous anodic alumina membrane used in this study.

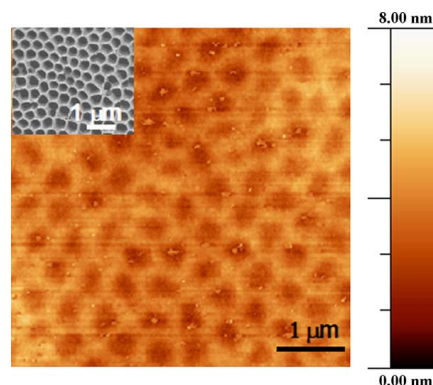


Fig. 1. AFM of array of holes etched on glass using ordered anodic alumina membrane as mask. Inset: electron microscopic image of a typical ordered anodic alumina membrane used in this study.

To produce ordered holes, the OAA membrane is used as an etching mask. The glass cover-slides or silicon wafers (with a thin layer of native silicon-oxide on top) are cleaned successively in acetone and ultra pure water. They are then exposed to non-directed oxygen plasma for 10 min. The OAA mask is stuck on the clean substrate with a drop of water or alcohol. This ensures weak contact so that the membrane is held in place. The bonding is however not mechanically strong nor is the surface-to-surface alignment perfect. This assembly is then exposed to directed oxygen plasma in a RIE chamber (80 W, 2 kPa) for 30 s. AFM images of this kind of topographically patterned substrate are shown in Fig. 1. We have verified that the presence of these nano-holes does not distort optical imaging even in surface sensitive modes like reflection interference contrast microscopy [20] (data not shown). A similar technique has been used before to produce ordered arrays of holes in silicon carbide using fluorine-containing etchants [17]. In our case, neither the glass nor silicon substrates are etched by exposure to non-directed oxygen plasma. After the etching process, the membrane can be mechanically removed with minimal force and can be recovered for subsequent use.

For our first attempt to chemically pattern the substrate, we grafted octadecyltrichloro silane (OTS) on glass using classical vapour phase deposition and then tried to etch away the OTS using a technique similar to the one described above. This however was not successful, since as discussed above, the contact between the substrate and the mask is weak. The mask is not strongly adhered to the substrate, resulting in a small gap between the two surfaces. The plasma can leak through this gap and thus etches away the OTS everywhere. Conversely, an attempt to deposit OTS from vapour phase directly through the OAA mask stuck with a drop of water failed for similar reason of leakage.

Finally, we adopted a protocol where a stronger contact between the substrate and the mask was established. A drop of PMMA dissolved in ethyl-lactate, which is commercially available as a resist for e-beam lithography, is spin-coated on a glass cover slip or Si wafer, cleaned as described above. The spinning speed and time is adjusted to obtain a layer of about 100 nm thickness. The open alumina membrane is placed on the PMMA layer and the whole assembly is baked at 160 °C for 10 min on a precision hot plate. This effectively glues the membrane in place. The whole assembly is then transferred to a plasma etching chamber and etched in directed oxygen plasma (RIE) at very low RF power (30 W, 2 kPa, 45 s). This etching removes the exposed PMMA thus

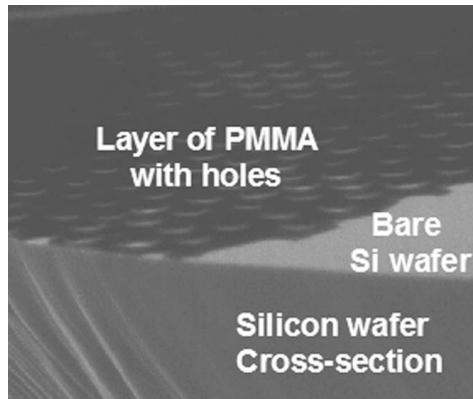


Fig. 2. Electron microscopic image of a thin layer of PMMA on a silicon wafer. The rough cross-section and the edge of the piece of silicon wafer can be seen. The PMMA layer spin-coated on the smooth face of the wafer is seen to partially cover the surface and holes etched in the PMMA are visible.

creating an array of holes in the PMMA layer under the membrane. An electron micrograph of the PMMA with holes is shown in Fig. 2. The wafer/PMMA/alumina assembly is then placed in a desiccator at about 30 °C under low vacuum in presence of a drop (about 500 μ l) of OTS. The molecules of the organo-silane are thus vapour-deposited onto the exposed parts of the wafer, forming

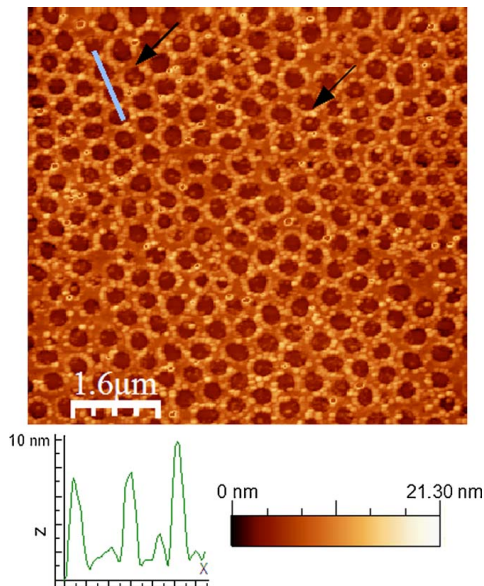


Fig. 3. AFM of array of holes etched on glass using PMMA/alumina mask. Organo-silane molecules were subsequently deposited and can be seen as dots inside the holes (two such dots are marked with arrows). The vertical (z) cross-section along the marked line (1.2 μ m long) shows clearly the deposited organic material within the holes.

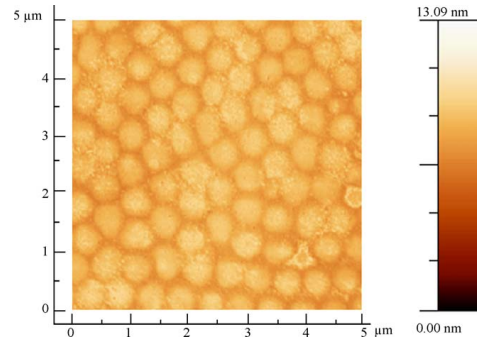


Fig. 4. AFM of large (about 400 nm) islands of organo-silane, with inter-island distance of about 550 nm deposited on a silicon/silica wafer using ordered anodic alumina membrane as mask.

islands of organo-silanes. The PMMA is then removed using chloroform as a solvent. If care is taken, the fragile alumina mask can sometimes be recovered for subsequent use. After removal of the mask and the PMMA, ordered nanoscopic islands of OTS, separated by base silicon or glass are left on the substrate.

The protocol is robust in the sense that minor variations in the values of parameters like the thickness of the PMMA layer, temperature and time of the deposition of OTS, etc. do not have any effect on the final structure. There are however, two important parameters that have to be carefully controlled. One is the RF power and the other is the time of exposure to oxygen plasma. If the power is too high or the exposure time is too long, the oxygen plasma slightly etches the substrate surface because of ion impacts, thus again creating an array of holes. Indeed, the holes can then be filled with organo-silanes, thus obtaining hybrid topochemical structures (Fig. 3). The other parameter that influences the motifs is the pore size on the OAA mask. As described before, after anodization, the pores in the alumina membrane are closed at one end. These are opened by prolonged exposure to diluted orthophosphoric acid. Depending on various parameters like the temperature, the time of exposure and the precise concentration, the pores may be opened to greater or lesser extent. This gives us a way to control the motif size while at the same time retaining the same inter-motif distance.

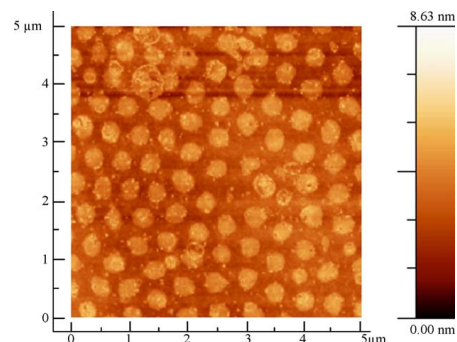


Fig. 5. AFM of small (about 310 nm) islands of organo-silane, with inter-island distance of about 550 nm deposited on a silicon/silica wafer using ordered anodic alumina membrane as mask.

In Figs. 4 and 5 we compare two different arrays of OTS, obtained using two different masks with different pore sizes, on a silicon/silica wafer. In Fig. 4, the motifs consist of large islands of OTS of average size 411 ± 34 nm separated by an average distance of 551 ± 29 nm. The average height of these islands is 1.9 ± 0.6 nm. In Fig. 5, the motifs are smaller, at average size 320 ± 23 nm but the average distance of separation remains similar at 545 ± 28 nm. In this case, the height of the islands is 2.2 ± 0.2 nm. The height of about 2 nm in each case is consistent with the chemical structure of OTS. We have verified that the islands are stable for up to two months in air. Like the holes in the mask, the motifs are ordered in a hexatic lattice which exhibits a high degree of orientational ordering.

4. Conclusions

We have presented a novel technique for preparing ordered arrays of topographically and/or chemically patterned substrates using anodic alumina membranes as masks. We have shown that it is possible to obtain chemically functional islands of different sizes while retaining the same inter-island distance. The same deposition technique can be used to graft organo-amino-silane molecule, which can then be functionalized with biologically functional proteins, deposited from aqueous solution, by exploiting the amine function.

In the current work we use the classical anodization technique for producing the OAA masks which yield pores that have long-range orientational but not positional order. In other words, the obtained arrays are arranged in two-dimensional multi-domains rather than in a large single mono-domain array. This drawback can be overcome by pre-patterning of the aluminium, as has been demonstrated recently [21]. Furthermore, a better control on pore opening, and hence the motif size, can be achieved by opening the pores by electrical rather than chemical means or by chemical vapour deposition [22]. While the alumina masks used in this work are produced in the laboratory, anodic alumina membranes are also currently available commercially, making this technique widely accessible. Thus it can be anticipated that the proof-of-the-principal demonstration presented here will become the technique of choice for flexible, facile and cost effective large scale nano-patterning of substrates.

Acknowledgements

We thank Alan Ranguis for technical help with AFM imaging and Serge Nitsche/Damien Chaudanson for help with electron microscopy. KS thanks Frank Thibaudau for useful discussions.

References

- [1] P.M. Mendes, C.L. Yeung, J.A. Preece, Bio-nanopatterning of surfaces, *Nanoscale Res. Lett.* 2 (2007) 373–384.
- [2] E. Reimhult, K. Kumar, Membrane biosensor platforms using nano- and microporous supports, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 82–89.
- [3] G. Shekhawat, S.H. Tark, V.P. Dravid, MOSFET-embedded microcantilevers for measuring deflection in biomolecular sensors, *Science* 311 (2006) 1592–1595.
- [4] (a) J.P. Spatz, B. Geiger, Molecular engineering of cellular environments: cell adhesion to nano-digital surfaces, *Methods Cell Biol.* 83 (2007) 89–111; (b) E.A. Cavalcanti-Adam, T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, J.P. Spatz, Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands, *Biophys. J.* 92 (2007) 2964–2974.
- [5] (a) A.S.G. Curtis, N. Gadegaard, M.J. Dalby, M.O. Riehle, C.D.W. Wilkinson, G. Aitichison, Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings, *IEEE Trans. Nanobiosci.* 3 (2004) 61–65; (b) M.J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M.O. Riehle, P. Herzyk, C.D. Wilkinson, R.O. Oreffo, The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder, *Nat. Mater.* 6 (2007) 997–1003; (c) A.I. Teixeira, G.A. Abrams, P.J. Bertics, C.J. Murphy, P.F. Nealey, Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 1881–1892.
- [6] (a) A.S.G. Curtis, a.B. Caseyb, J.O. Gallaghera, D. Pasquic, M.A. Wooda, C.D.W. Wilkinson, Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells, are symmetry or regularity of nanotopography important? *Biophys. Chem.* 94 (2001) 275–283; (b) C. Selhuber-Unkel, M. López-García, H. Kessler, J.P. Spatz, Cooperativity in adhesion cluster formation during initial cell adhesion, *Biophys. J.* 95 (2008) 5424–5431.
- [7] B.D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C.G. Willson, G.M. Whitesides, New approaches to nanofabrication: molding, printing, and other techniques, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1171–1196.
- [8] (a) S.Y. Chou, P.R. Krauss, P.J. Renstrom, *Science* 85 (1996) 272; (b) H. Gao, H. Tan, W. Zhang, K. Morton, S.Y. Chou, Air cushion press for excellent uniformity, high yield, and fast nanoimprint across a 100 mm field, *Nano Lett.* 6 (2006) 2438–2441.
- [9] (a) K.B. Lee, S.J. Park, C.A. Mirkin, J.C. Smith, M. Mrksich, Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography, *Science* 295 (2002) 1702–1705; (b) S. Hong, J. Zhu, C.A. Mirkin, Multiple ink nanolithography: toward a multiple-pen nano-plotter, *Science* 286 (1999) 523–525.
- [10] (a) J.L. Guo, *Adv. Mater.* 19 (2007) 495; (b) H. Schiff, *J. Vac. Sci. Technol. B* 26 (2008) 458; (c) H. Schiff, A. Kristensen, in: B. Bhushan (Ed.), *Handbook of Nanotechnology*, second ed., Springer Verlag, Berlin, Germany, 2007.
- [11] (a) U.C. Fischer, H.P. Zingsheim, *J. Vac. Sci. Technol.* 19 (1981) 881–885; (b) C. Haynes, R.P. VanDuyne, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 5599–5611; (c) J.R. Li, J.C. Garno, Elucidating the role of surface hydrolysis in preparing organosilane nanostructures via particle lithography, *Nano Lett.* 8 (2008) 1916–1922.
- [12] (a) F. Keller, M.S. Hunter, D.L. Robinson, Structural features of oxide coatings on aluminum, *J. Electrochem. Soc.* 100 (1953) 411; (b) H. Masuda, K. Fukuda, Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina, *Science* 268 (1995) 1466.
- [13] A.P. Li, F. Müller, A. Birner, K. Nielsch, U. Gösele, Hexagonal pore arrays with a 50–420 nm interpore distance formed by self-organization in anodic alumina, *J. Appl. Phys.* 84 (1998) 6023–6026.
- [14] K. Nielsch, J. Choi, K. Schwirn, R.B. Wehrspohn, U. Gösele, Self-ordering regimes of porous alumina: the 10% porosity-rule, *Nano Lett.* 2 (2002) 677–683.
- [15] B. Wolfrum, Y. Mourzina, D. Mayer, D. Schwaab, A. Offenhäuser, Fabrication of large-scale patterned gold-nanopillar arrays on a silicon substrate using imprinted porous alumina templates, *Small* 2 (2006) 1256–1260.
- [16] (a) M. Steinhart, R. Wehrspohn, U. Gösele, J.H. Wendorff, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 1334; (b) M. Steinhart, J.H. Wendorff, A. Greiner, R.B. Wehrspohn, K. Nielsch, J. Schilling, J. Choi, U. Gösele, *Science* 2002 (1997) 296.
- [17] (a) E. Moyer, W. Wulfhekel, W. Lee, A. Leycuras, K. Nielsch, U. Gösele, M. Hanbücken, Etching nanoholes in silicon carbide using catalytic platinum nanoparticles, *Appl. Phys. A* 84 (2006) 369–372 (Rapid communication); (b) W. Lee, E. Moyer, W. Wulfhekel, A. Leycuras, K. Nielsch, U. Gösele, M. Hanbücken, Vertical nano-patterning of 6H-SiC(0001) surfaces using metal nanotube membrane lithography, *Appl. Phys. A* 83 (2006) 361.
- [18] K. Sengupta, E. Moyer, M. Mace, A.M. Benoliel, A. Pierres, F. Thibaudau, L. Masson, L. Limozin, P. Bongrand, M. Hanbücken, Large scale ordered plastic nano-pillars for quantitative live-cell imaging, *Small* 5 (2009) 449–453.
- [19] I. Horcas, R. Fernandez, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, A.M. Baro, *Rev. Sci. Instrum.* 78 (2007) 013705.
- [20] (a) A.S.G. Curtis, in: P. Bongrand, P. Claesson, A. Curtis (Eds.), *Interference Reflection Microscopy and Related Microscopy and Cell Adhesion*, Springer, Heidelberg, 1994, pp. 185–193; (b) J. Radler, E. Sackmann, Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid-vesicles at solid-surfaces, *J. Phys.-II* 3 (1993) 727–748; (c) L. Limozin, K. Sengupta, Modulation of vesicle adhesion and spreading kinetics by hyaluronan cushions, *Biophys. J.* 93 (2007) 3300–3313.
- [21] (a) W. Lee, K. Schwirn, M. Steinhart, E. Pippel, R. Scholz, U. Gösele, Structural engineering of nanoporous anodic aluminium oxide by pulse anodization of aluminium, *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 234–239; (b) W. Lee, R. Ji, C.A. Ross, U. Gösele, K. Nielsch, Wafer-scale Ni imprint stamps for porous alumina membranes based on interference lithography, *Small* 2 (2006) 978–982.
- [22] (a) W. Lee, W. Ji, U. Gösele, U.K. Nielsch, *Nat. Mater.* 5 (2006) 741; (b) V. Miiikkulainen, T. Rasilainen, E. Puukilainen, M. Suvanto, T.A. Pakkanen, *Langmuir* 24 (2008) 4473.



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc

Selective functionalization of substrates through assembled nanostructures: From physics to biology

Eric Moyen, Magali Macé, Sophie Massou, Houda Sahaf, Laurence Masson, Kheya Sengupta, Margrit Hanbücken*

CNRS, Aix - Marseille University, CINaM - UP83118, Campus Luminy, Case 913 F-13288 Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 11 June 2009

Keywords:
Nanopatterning
Nanostructures
Self-assembling
Biophysics
Chemical functionalization

ABSTRACT

The fabrication and use of various nano-patterned substrates as templates in physics (growth experiments) and biophysics (adhesion of living cells) will be presented. Vicinal silicon surfaces which transform under thermal treatment into an array of parallel steps are used to grow high density, metallic nanostructures subsequently employed as a chemically neutral template to grow magnetic nanodots. SiC substrates are used to develop out-of-plane nanopatterning. In a different set of experiments, Ag(110) substrates are first functionalized with silicon nanostructures and serve subsequently as templates for the growth of one-dimensional cobalt nano-lines. Finally, porous alumina membranes are used as moulds to fabricate an array of ordered nano-pillars from photopolymers which subsequently serve to study the adhesion of living cells on nano-patterned surfaces.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Many different in-plane and out-of-plane structural reorganisations can now be obtained on metal and semiconductor surfaces. Large scale regular ordering is obtained using top-down, bottom-up and combined experimental methods. The re-arrangement processes are governed by intrinsic properties of materials. The most frequently used bottom-up approach consists of re-organising surfaces under ultra high vacuum (10^{-10} mbar) to obtain new regular in-plane surface nanostructures with periodicities different from that in the bulk material. These are then used as templates to grow adsorbates in regular patterns. Nice examples are published data by the group of Rousset on reconstructed gold surfaces [1]. A complementary bottom-up approach takes advantage of the regular reorganisation of vicinal surfaces when annealed under ultra high vacuum. Depending on the polar and azimuthal misorientation, many different surface re-arrangements can be prepared. On Au-surfaces two different morphologies with typical periods are obtained [2]. Vicinal silicon surfaces cut in opposite azimuthal directions like $[1\ 1\ 2]$ and $[\bar{1}\ \bar{1}\ 2]$, break up in two very different morphologies [3,4]. Equidistant terraces are separated by step bunches in the first and by mono- or triple-layer heights steps in the second misorientation. A novel, nearly universal vicinal support has been prepared by simply dimple-grinding Si and SiC substrates [5–7]. In this preparation method, silicon planes are cut under

continuously changing polar angles in all azimuthal directions. The obtained concave surface breaks up, under ultra high vacuum treatment, into a large number of new surfaces, vicinal to the initial (hkl) orientation. New stable surfaces have been observed due to this method on initially Si(111) [5,6], Si(100) [8] and 6H-SiC(0001) [9] surfaces. Out-of-plane nanostructures, arranged perpendicular to the surface, are obtained with top-down methods. Etching techniques like focused ion beam and reactive ion etching (RIE) or lithography followed by chemical treatment, are currently used. A combination of bottom-up and top-down methods was used on vicinal Si(111) [10,11] and on 6H-SiC(0001) [12] and produced new surface structures arranged in a two-dimensional array. All described substrates are subsequently used as templates for the growth of dense arrays of nanoparticles [13]. More recently, porous material like alumina membranes have been used to transfer a controlled periodicity onto chosen surfaces. Sequential techniques are herewith replaced by massively parallel processes since alumina membranes can be obtained on several square centimetres. The membranes can be used as evaporation masks in growth experiments [14,15], etching masks in RIE experiments [16] or moulds to fabricate arrays of ordered nano-pillars [17].

In the present paper we will summarize some of our recent work on as-prepared templates and their functionalization. Some applications in physics and biology will also be presented.

2. Experimental

All experiments were performed under UHV (10^{-8} Pa range pressure) in different experimental set-ups equipped with a

* Corresponding author.
E-mail address: margrit.hanbucken@cinam.univ-mrs.fr (M. Hanbücken).

scanning tunnelling microscope (STM), several evaporation sources, low energy electron diffraction and Auger electron spectroscopy. The vicinal Si(1 1 1) samples (n-type, resistivity 0.5–1 Ω cm) have a miscut of 1.5° towards the [1 1 2] direction. Si samples were prepared under UHV following the Himpel method [18]. This cleaning procedure enables the formation of equally spaced terraces, exhibiting the (7 × 7) reconstruction, typical for clean Si(1 1 1). High purity 5N gold was evaporated from a crucible. The coverage was calibrated by imaging known Au-reconstructions in the 0.1–1 monolayer range (ML, 1 ML is defined as 7.84×10^{14} atoms/cm²). For all experiments, the deposition rate was kept constant at 1×10^{-3} ML/s. STM images were obtained in the constant current mode. Ex situ transmission electron microscopy (TEM) observations were performed in a JEOL 3010 microscope at an acceleration voltage of 300 kV (point to point resolution of 0.21 nm). Samples were observed in a cross-sectional view along the [1 $\bar{1}$ 0] direction. The 6H-SiC(0 0 0 1) samples were cut from an on-axis, nitrogen-doped, n-type (resistivity 0.03–0.12 Ω m⁻¹) silicon-terminated wafer. The Ag(1 1 0) sample was prepared by repeated cycles of Ar⁺ ion sputtering and annealing at 400 °C. Silicon was deposited from a piece of silicon wafer heated to 1250 °C after preoutgassing at 800 °C for several hours. The Co deposition was performed using a commercial evaporator. The presence of Co atoms on the surface has been checked by measuring the CoMNN (53 eV) Auger transition. For moulding polymers, ordered alumina membranes with pore diameters of 180 nm were prepared by electrochemistry using the well known self-ordering procedure previously published [19]. A photopolymer with a suitable viscosity and a refractive index close to that of glass, the substrate material for the subsequent characterization with optical microscopy (not shown here), was used. Imaging was done in a scanning electron microscope (SEM) after additional gold deposition.

3. Results

In the present paper, some recent results obtained in our group on ordered templates will be summarized. Over the last decade we developed several different experimental methods for template fabrication, exhibiting 1D and 2D lateral ordering. For some, the template fabrication is based on the interaction of the self-organisations induced through the intrinsic material properties, like on vicinal surfaces, with those governed by additionally imposed arrays of perturbations. Fig. 1 shows two results obtained on Si(1 1 1) in (a) and 6H-SiC(0 0 0 1) in (b). Depending on the azimuthal direction of misorientation, vicinal Si(1 1 1) surfaces reorganise under UHV-heat treatment into two different morphologies. When disoriented along the [$\bar{1}$ $\bar{1}$ 2] direction, small terraces

separated by mono- and triple-layer high steps are formed [20]. For misorientations along the opposite [1 1 $\bar{2}$] direction, vicinal surfaces transform into larger terraces, separated by step bunches. In (a) presented results were obtained on the latter misorientations with formation of step bunch. Regular hole pattern with holes of 2 μ m diameter and varying pitches were etched into the Si(1 1 1) surface with optical lithography followed by chemical treatment. An angle of about 30° was introduced between hole alignment and the crystallographic [1 1 $\bar{2}$] direction in the (1 1 1) plane. The as-prepared surface was subsequently heated under UHV. Fig. 1a shows a STM image obtained on this surface in a region with a pitch width of 2 μ m after a heat treatment of 90 s to 1200 °C and an anneal to 1100 °C for 5 min, the image was taken at 600 °C. The observed morphology can be explained by an overlap of the initially etched hole pattern and the temperature-driven morphological reorganisation. The wavy bunches indicate the location of one part of the inner wall of the pre-patterned holes. After this initial heat treatment, the surface still shows a strong zig-zag corrugation along the step bunches. The original step bunch formation gives rise to minor step bunches crossing the terraces. Additional heating of the same sample to 1100 °C for another 5 min flattens the in-plane corrugation of all step bunches, major and minor ones. This type of template has been used by Homma et al. to grow regular arrays of Au-deposits [21]. Similar experiments were performed on 6H-SiC(0 0 0 1) substrates. An array of nanometer-sized holes was transferred to the substrate by RIE through an alumina membrane [15]. Subsequent hydrogen etching led to characteristic reorganisations of the holes and the flat SiC surface as shown in Fig. 1b. Each central hole is surrounded by six facets, formed during hydrogen etching. Due to crystallography, two types of local bond environments are present at the step edges in 6H-SiC(0 0 0 1), leading to a strong anisotropy in the surface etching with hydrogen and the fabrication of terraces separated by steps. The characteristic SiC surface-reorganisation into steps and terraces can be seen between the holes in Fig. 1b. An alternation of large and small terraces, separated by steps of 0.75 nm heights (height of half the 6H polytype, three bi-layers) is observed. Again a 2D surface-reorganisation can be obtained.

Out-of-plane hole patterns were prepared on SiC substrates with different experimental methods. In Fig. 2, two examples are represented for the 6H-SiC(0 0 0 1) substrate. The hole pattern of an alumina membrane was transferred by RIE to a pore pattern in the SiC substrate. The holes patterned in the SiC surface were subsequently etched in a hot wall hydrogen reactor at 1800 °C [14], giving rise to typical morphological reorganisations. The holes transform into hexagonally shaped trough with regular shape as shown in the SEM image in Fig. 2a for a cleaved SiC substrates. Six

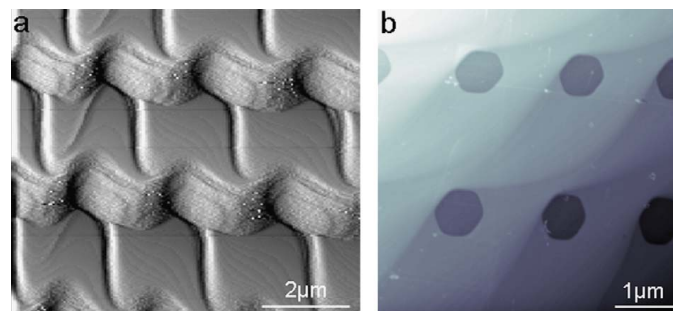


Fig. 1. (a) STM image taken at high substrate temperature on a vicinal Si(1 1 1) surface disoriented by 1.5° along the [112] direction and additionally patterned with a perturbation of hole-arrays. The sample was heated to 1200 °C and subsequently 10 min at 1100 °C. A similar preparation procedure was used in (b) on 6H-SiC(0 0 0 1).

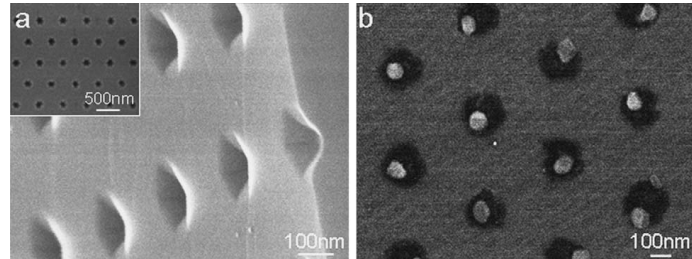


Fig. 2. (a) Scanning Electron Microscopy image of a periodic hole-network in SiC after hydrogen etching in cross-sectional view, the inset reproduces the top view. (b) SEM image of an array of nanoholes in SiC obtained through catalytic H-etching with Pt.

facets with sides running along $[1\ 1\ \bar{2}]$ directions are arranged around a flat $(0\ 0\ 0\ 1)$ -oriented basal plane. The morphological shape-reorganisation is independent of the initial hole size and shape and only varies in diameter. Steps and step bunches visible between different holes are due to the pinning of individual steps at the holes during the surface erosion process [9,22]. Thus, the hydrogen etching transformed the irregular pores into well-defined pores.

An additional set of experiments was performed by using the catalytic reaction of platinum during a hydrogen etching process for vertical nanopatterning of silicon carbide substrates [14]. A regular and monosized distribution of Pt patches was obtained by sputter deposition of Pt through a membrane serving as a contact mask. After the lift-off of the mask, the hydrogen etching revealed the onset of well-controlled vertical patterned holes on the SiC surface. In the SEM image in Fig. 2b Pt patches are visible and are arranged in a regular, hexagonal pattern reflecting the pattern of the contact mask. The distance between the patches is about 500 nm and the extension of each patch is between 100 and 300 nm. The Pt particles are seen as bright islands. Each particle is surrounded by a darker grey circle corresponding to the etched hole. The shape of the Pt patches changes under etching to form the observed islands. A disordering of the initial pattern has not been observed, indicating that membrane patterns can be replicated with this technique into SiC surfaces. The erosion temperatures during the hydrogen reduction experiments could be lowered by a factor of two compared to the previous experiments [9] described above.

In addition to structural reorganisations or topographical nanostructures on substrates, we elaborated different templates exhibiting chemical patterning. Nano-patterned vicinal Si(1 1 1) and Ag(1 1 0) were here used as a initial substrates. The idea in these experiments is to prepare nanoparticles with well-defined sizes, shapes, ordering and crystal structure by using the knowledge of crystal growth [23]. In the Stranski–Krastanov (SK) growth mode, for example, 3D islands are formed and separated by a 2D layer. A difference in the chemical reactivity of the 2D thin film compared to the 3D islands is used to laterally pattern a variety of physical properties. Au epitaxy on Si(1 1 1) is one of the systems we studied in our group [13]. Gold grows on a Si(1 1 1) substrate via the SK growth mode forming distinct Au islands on the intermediate layer. On vicinal surfaces, these islands can naturally be aligned in a 1D lattice as is shown in Fig. 3a. Combined STM and TEM characterizations of the islands have revealed that each island is composed of a metal rich Au_xSi-silicide in the bulk as well as in the surface layer. The topographic STM image in Fig. 3b shows a typical rounded island, obtained after 1.5 ML Au deposition at 400 °C. A mesh of atoms with a centered unit cell of $0.79 \times 0.83\text{ nm}^2$ (black arrows in the inset of Fig. 3b) was resolved on the islands. Due to their metallic character, these islands were subsequently used to grow magnetic, cobalt overlayers. This chemical patterning was used to perform subsequent magnetic patterning. Magnetic properties were measured at room temperature and for densities as low as 10^9 dots/in^2 . In plane magnetic hysteresis loops measured by AGFM at room temperature after the silicidation of a 15 ML thick Co film deposited on the Au–Si

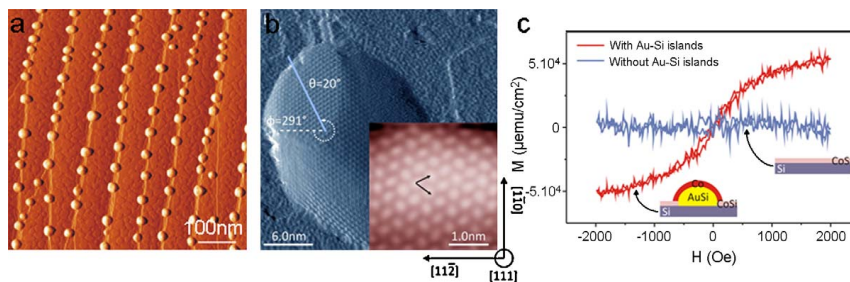


Fig. 3. (a) STM image ($I = 0.5\text{ nA}$, $V = +2\text{ V}$), taken after deposition of 3.5 ML Au at 370 °C onto of a vicinal Si(1 1 1) surface miss-cut by 1.5° along direction. The substrate is composed of equally sized terraces separated by step bunches. Au-rich islands are aligned along these bunches with a density of $2.5 \times 10^{11}\text{ in}^{-2}$. Images sizes are $500 \times 500\text{ nm}^2$. (b) STM image of an Au–Si particle and a zoom showing details of the surface arrangement. (c) Out-of-plane magnetic hysteresis loops of the MOKe rotation measured in polar configuration at room temperature after the silicidation of a 3.6 ML thick Co film deposited on the Au–Si islands-functionalized substrate and on a reference substrate without the islands. Only the islands-functionalized substrate exhibits a magnetic signal, after subtraction of the diamagnetic contributions of silicide film and Si substrate (identical for both samples).

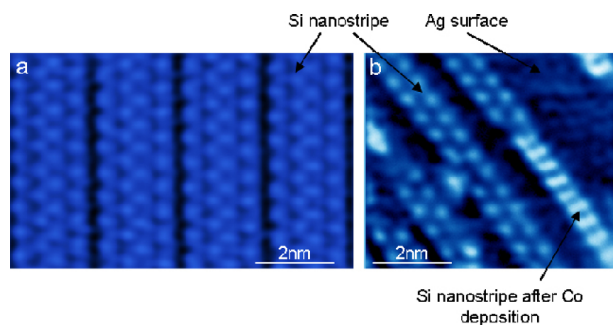


Fig. 4. (a) STM images showing a fraction of four Si nanostructures part of the 1D grating on Ag(110), $I = 3.2$ nA, $V = 1.5$ V (empty states). Each protrusion corresponds to a group of three Si-adatoms. (b) STM image (17 nm 2) of a low coverage of Co deposited at RT on Ag(110) partially covered by Si-nanostructures: $I = 1.3$ nA, $V = 0.55$ V (empty states).

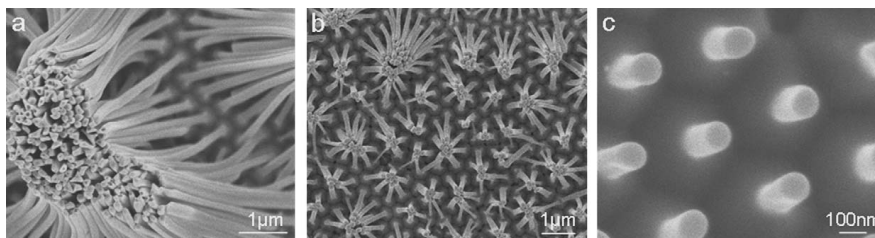


Fig. 5. SEM images of a topographical template consisting of an ordered array of photopolymers obtained through moulding with an alumina membrane. Images (a–c) show decreasing pillar lengths from 6 μm in (a) over 2 μm in (b) to 0.5 μm in (c).

droplets-functionalized substrate and on a reference substrate without the droplets. Only the droplets-functionalized substrate exhibits a ferromagnetic behavior, with a saturated value of the magnetic moment per surface area equal to 6 ± 1 μ emu/cm 2 .

Further experiments were performed on Ag(110) substrates [24]. One-dimensional Si nanostructures were grown onto these substrates and the obtained, new nanostructured system subsequently used as a template to grow Co nano-lines. Before Co deposition, the self-assembled Si nanostructures were characterized by high-resolution scanning tunnelling microscopy and an example is given in Fig. 4a. The presented STM image shows a fraction of four Si nanostructures which are part of the 1D grating on Ag(110).

The early stages of the Co deposition at room temperature on the Si nanostructures have then been studied by scanning tunnelling microscopy, enabling the localization of adsorbed Co atoms. We show that Co is preferentially adsorbed on top of the Si nanostructures with respect to the surrounding Ag(110) surface. Thus, the chemical functionalization of the Ag substrate with 1D Si nanostructures allows the formation of Co nano-lines. Measurements on the magnetic properties of these Co-lines are actually underway.

Substrates with patterns on the nanometer-scale are of increasing importance for biomedical applications. To study the influence of topographically nanostructured substrates on cell adhesion, we have developed specific templates. Alumina membranes were used as moulds to fabricate regular nanometer-scale polymer pillars [17]. Several pore diameters were used and the membrane thickness adapted individually. A polyurethane/mercaptoester-based photopolymer was used and its refractive index

chosen to be that of glass, the substrate material in these experiments. Results obtained with a membrane consisting of pores with 180 nm diameter are shown in Fig. 5. The structured surface covers several square centimetres. SEM images of nano-pillars with decreasing lengths are shown from Fig. 5a–c. Alumina membranes were used as masks for depositing organo-silane molecules to create chemically nanostructured substrates (see Fig. 6). The alumina mask was glued to the substrate via a soft polymer-glue which was then etched through the mask to create a

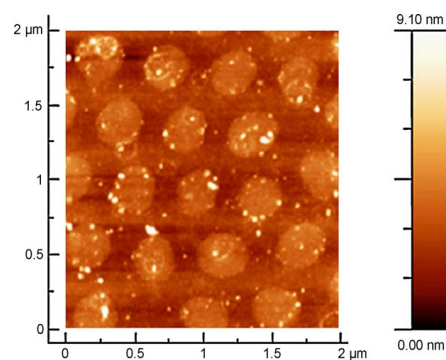


Fig. 6. Regular arrays of organo-silane islands created using anodic alumina membranes with pore separation of 550 nm as evaporation masks.

hybrid polymer/alumina mask for deposition. Such organo-silane islands can be further functionalized with a desired protein or DNA to create ordered arrays of biologically active nanostructures.

4. Conclusions

Several different template preparation methods developed over the years in our group have been presented. In-plane and out-of-plane, 1D and 2D nanopatterning has been used to produce original topographical templates. Adatom adsorption of pre-patterned substrates has been used to obtain chemically patterned templates. Some first applications of the templates in physics and biology have been described. Gold-rich Au-silicides, grown on vicinal Si(1 1 1) have successfully been functionalized with cobalt giving rise to magnetic nanoparticles. In biomedical applications, first cell adhesion experiments were performed on templates formed of arrays of photopolymer nano-pillars. Vertical nanostructures, arranged in arrays of nanoholes and nanotubes are obtained in 6H-SiC(0 0 1) and in alumina. Their subsequent use as evaporation masks in growth experiments and contact masks in etching experiments have led to novel nano-patterned systems.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the collaboration and many fruitful discussions with all colleagues, co-authors of the cited joint papers. The skilful help of the technical staff in CINaM, Marseille is also underlined. This work was funded through the French Foreign Ministry (PAI-PROCOPE n°07639QK), the French Research Ministry (ACNN Grant n°NR056 and Grant NR017) and the French National Research Agency through ANR-06-NANO-0089 and ANR-2006-SEST-24 06. Financial support of a thesis grant by the Provence-Alpes-Côte d'Azur region is gratefully acknowledged.

References

- [1] V. Repain, G. Baudat, H. Ellmer, S. Rousset, *Europhys. Lett.* 58 (2002) 730.
- [2] (a) N. Weiss, T. Cren, M. Epple, S. Rusponi, G. Baudot, S. Rohart, A. Tejada, V. Repain, S. Rousset, P. Ohresser, F. Scheurer, P. Bencok, H. Brune, *Phys. Rev. Lett.* 95 (2005) 157204-1;
(b) S. Rousset, F. Pourmir, J.M. Berroir, J. Klein, J. Lecoeur, P. Hecquet, B. Salanon, *Surf. Sci.* 422 (1999) 33.
- [3] W. Ranke, *Phys. Rev. B* 41 (1990) 5243.
- [4] X. Tong, P.A. Bennet, *Phys. Rev. Lett.* 67 (1991) 259.
- [5] M. Hanbücken, B. Röttger, R. Kliese, I. Vianey, H. Neddermeyer, *Europhys. Lett.* 23 (1993) 573.
- [6] M. Hanbücken, I. Vianey, A. Degiovanni, C. Jourdan, B. Röttger, R. Kliese, H. Neddermeyer, *Appl. Surf. Sci.* 72 (1995) 79.
- [7] (a) B. Röttger, M. Hanbücken, I. Vianey, R. Kliese, H. Neddermeyer, *Surf. Sci.* 307–309 (1994) 656;
(b) Pierre-David Szkutnik, Dirk Sander, Frédéric Dulot, François Arnaud d'Avitaya, Margrit Hanbücken, *J. Vac. Sci. Technol. B* 20 (2002) 960.
- [8] (a) M. Hanbücken, B. Röttger, H. Neddermeyer, *Surf. Sci.* 331–333 (1995) 1028;
(b) M. Hanbücken, B. Röttger, H. Neddermeyer, *Appl. Surf. Sci.* 164 (2000) 91;
(c) B. Röttger, M. Hanbücken, H. Neddermeyer, *Appl. Surf. Sci.* 162–163 (2000) 595.
- [9] (a) Wulf Wulfhchel, Dirk Sander, Serge Nitsche, Frédéric Dulot, André Leycuras, Margrit Hanbücken, *Surf. Sci.* 550 (2004) 8;
(b) Frédéric Dulot, Louay Mansour, André Leycuras, Wulf Wulfhchel, Dirk Sander, François Arnaud d'Avitaya, Margrit Hanbücken, *Appl. Surf. Sci.* 187 (2002) 319.
- [10] (a) T. Ogino, H. Hibino, Y. Homma, *Jpn. J. Appl. Phys.* 34 (1995) L668;
(b) *Appl. Surf. Sci.* 107 (1996) 1;
(c) T. Ogino, H. Hibino, K. Prabhakaran, *J. Vac. Sci. Technol. B* 14 (1996) 4134.
- [11] A. Kraus, R. Kulla, H. Neddermeyer, W. Wulfhchel, D. Sander, T. Maroutian, F. Dulot, A. Martinez-Gil, M. Hanbücken, *Appl. Surf. Sci.* 234 (2004) 307.
- [12] Dirk Sander, Wulf Wulfhchel, Margrit Hanbücken, Serge Nitsche, Jean-Pierre Palmari, Frédéric Dulot, François Arnaud d'Avitaya, André Leycuras, *Appl. Phys. Lett.* 81 (2002) 3570.
- [13] (a) E. Moyen, M. Macé, G. Agnus, A. Fleurence, T. Maroutian, F. Houzé, A. Stupakiewicz, L. Masson, B. Bartenlian, W. Wulfhchel, P. Beauvillain, M. Hanbücken, *Appl. Phys. Lett.*, 94 (2009) 233.
(b) A. Fleurence, G. Agnus, T. Maroutian, B. Bartenlian, P. Beauvillain, E. Moyen, M. Hanbücken, *Appl. Surf. Sci.* 254 (2008) 3147;
(c) A. Rota, A. Martinez-Gil, G. Agnus, E. Moyen, T. Maroutian, Bartenlian B., R. Mégy, M. Hanbücken, P. Beauvillain, *Surf. Sci.* 600 (2006) 1207–1212.
- [14] E. Moyen, W. Wulfhchel, Woo Lee, A. Leycuras, K. Nielsch, M.U. Gösele, M. Hanbücken, *Appl. Phys. A Rapid Commun.* 84 (2006) 369.
- [15] C. Kim, T. Loedding, S. Jang, H. Zeng, *Appl. Phys. Lett.* 91 (2007) 172508.
- [16] E. Woo Lee, W. Moyen, A. Wulfhchel, K. Leycuras, U. Nielsch, M. Gösele, Hanbücken, *Appl. Phys. A* 83 (2006) 361.
- [17] Khaya Sengupta, Eric Moyen, Magali Mace, Anne-Marie Benoliel, Anne Pierres, Frank Thibaudau, Laurence Masson, Laurent Limozin, Pierre Bongrand, Margrit Hanbücken, *Small* 5 (2009) 449.
- [18] F.K. Men, F. Liu, P.J. Wang, C.H. Chen, D.L. Cheng, J.L. Lin, F. Himpel, *Phys. Rev. Lett.* 88 (2008) 096105.
- [19] (a) K. Nielsch, J. Choi, K. Schwirn, R.B. Wehrspohn, U. Gösele, *Nano Lett.* 2 (2002) 677;
(b) J. Choi, K. Nielsch, M. Reiche, R.B. Wehrspohn, U. Gösele, *J. Vac. Sci. Technol. B* 21 (2003) 763.
- [20] H.C. Jeong, E.D. Williams, *Surf. Sci. Rep.* 34 (1999) 171.
- [21] Y. Homma, P. Finnie et, T. Ogino, *J. Elect. Microsc.* 49 (2000) 225.
- [22] V. Ramachandran, M.F. Brady, A.R. Smith, R.M. Feenstra., *J. Electron Mater.* 27 (1998) 308.
- [23] VenablesF J.A., G. Spiller, M. Hanbücken, *Rep. Prog. Phys.* 47 (1984) 399.
- [24] H. Sahaf, C. Léandri, E. Moyen, M. Macé, L. Masson, M. Hanbücken, *Europhys. Lett.* 86 (2009) 28006.

Bibliographie

- [1] Julian Lewis Martin Raff Keith Roberts James Watson Bruce Alberts, Dennis Bray, editor. *Molecular biology of the cell, third edition*. Garland, 1994.
- [2] <http://www.afblum.be/bioafb/intrcyto/cellule2.jpg>.
- [3] Kai Simons Paul Verkade. Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells. *Histochem. Cell. Biol.*, 108 :211–220, 1997.
- [4] Teymuras V Kurzchalia and Robert G Partan. Membrane microdomains and caveolae. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(4) :424 – 431, 1999.
- [5] Christopher J. Fielding. Caveolae and signaling. *Current Opinion in Lipidology*, 12(3) :281–287, 2001.
- [6] J. B. Helms and C. Zurzolo. Lipids as targeting signals : lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*, 5(4) :247–254, 2004.
- [7] Kai Simons and Gerrit Van Meer. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17) :6197–6202, 1988.
- [8] D. Lingwood and K. Simons. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961) :46–50, 2010.
- [9] Anne K Kenworthy. Fleeting glimpses of lipid rafts : how biophysics is being used to track them. *J Investig Med*, 53(6) :312–317, Sep 2005.
- [10] Arun Yethiraj and James C. Weisshaar. Why are lipid rafts not observed in vivo? *Biophys J*, 93(9) :3113–3119, November 2007.
- [11] Francesc Gomez J FAU Sagues, Ramon Sagues F FAU Reigada, and Reigada R. Effect of integral proteins in the phase stability of a lipid bilayer : application to raft formation in cell membranes. *J. Chem. Phys.* 132, 135104 (2010); doi :10.1063/1.3381179, 132(0021-9606 (Linking)) :135104, 2010.

Bibliographie

- [12] Jay T. Groves and Michael L. Dustin. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *Journal of Immunological Methods*, 278(1-2) :19 – 32, 2003.
- [13] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber. Geometric control of cell life and death. *Science*, 276(5317) :1425–1428, May 1997.
- [14] Joana Vitte, Anne-Marie Benoliel, Anne Pierres, and Pierre Bongrand. Regulation of cell adhesion. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 33(3) :167–188, January 2005.
- [15] Damien Cuvelier, Manuel Théry, Yeh-Shiu Chu, Sylvie Dufour, Jean-Paul Thiéry, Michel Bornens, Pierre Nassoy, and L. Mahadevan. The universal dynamics of cell spreading. *Curr Biol*, 17(8) :694–699, April 2007.
- [16] Manus J. P. Biggs, R. Geoff Richards, and Matthew J. Dalby. Using immunoscanning electron microscopy for the observation of focal adhesion-substratum interactions at the nano- and microscale in s-phase cells. 695 :53–60, 2011.
- [17] Dennis E. Discher, Paul Janmey, and Yu-li Wang. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751) :1139–1143, 2005.
- [18] Chun-Min Lo, Hong-Bei Wang, Micah Dembo, and Yu-li Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79(1) :144–152, July 2000.
- [19] Alexandre Saez, Marion Ghibaudo, Axel Buguin, Pascal Silberzan, and Benoît Ladoux. Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20) :8281–8286, 2007.
- [20] Adam J. Engler, Shamik Sen, H. Lee Sweeney, and Dennis E. Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4) :677–689, August 2006.
- [21] Christian Roy Kefeng Ren, Thomas Crouzier and Catherine Picart. Polyelectrolyte multilayer films of controlled stiffness modulate myoblast cells differentiation. *Adv Funct Mater.*, pages 1378–1389, 2008.
- [22] Guillaume Blin, Nassrine Lablack, Marianne Louis-Tisserand, Claire Nicolas, Catherine Picart, and Michel Puce. Nano-scale control of cellular environment to drive embryonic stem cells selfrenewal and fate. *Biomaterials*, 31 :1742–1750, 2010.

- [23] Alexandre Saez, Marion Ghibaudo, Benoît Ladoux, Axel Buguin, and Pascal Silberzan. Les cellules vivantes répondent à la rigidité de leur substrat. *Images de la physique*, pages 94–100, 2007.
- [24] Jennifer S. Hovis and Steven G. Boxer. Patterning and composition arrays of supported lipid bilayers by microcontact printing. *Langmuir*, 17 :3400–3405, 2001.
- [25] Jay T. Groves and Steven G. Boxer. Micropattern formation in supported lipid membranes. *Acc. Chem. Res.*, 35 :149–157, 2002.
- [26] L. K. Tamm and H. M. McConnell. Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.*, 47 :105–113, 1985.
- [27] G. Kim J. Kim and P. Cremer. Investigations of water structure at the solid/liquid interface in the presence of supported lipid bilayers by vibrational sum frequency spectroscopy. *Langmuir*, 17(23) :7255–7260, 2001.
- [28] E. Evans R. Merkel, E. Sackmann. Molecular friction and epitactic coupling between monolayers in supported bilayers. *J. Phys. France*, pages 1535–1555, 1989.
- [29] S.J. Johnson, T.M. Bayerl, D.C. McDermott, G.W. Adam, A.R. Rennie, R.K. Thomas, and E. Sackmann. Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular reflection of neutrons. *Biophys J*, 59(2) :289–294, feb 1991.
- [30] A. S. Curtis, B. Casey, J. O. Gallagher, D. Pasqui, M. A. Wood, and C. D. Wilkinson. Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. are symmetry or regularity of nanotopography important? *Biophys Chem*, 94(3) :275–283, Dec 2001.
- [31] Elisabetta Ada Cavalcanti-Adam, Tova Volberg, Alexandre Micoulet, Horst Kessler, Benjamin Geiger, and Joachim Pius Spatz. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys J*, 92(8) :2964–2974, Apr 2007.
- [32] Elisabetta Ada Cavalcanti-Adam, Pascal Tomakidi, Martin Bezler, and Joachim Pius Spatz. Geometric organization of the extracellular matrix in the control of integrin-mediated adhesion and cell function in osteoblasts. *Prog Orthod*, 6(2) :232–237, 2005.

- [33] Elisabetta A Cavalcanti-Adam, Alexandre Micoulet, Jacques Blümmel, Jörg Auernheimer, Horst Kessler, and Joachim P Spatz. Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. *Eur J Cell Biol*, 85(3-4) :219–224, Apr 2006.
- [34] Elisabetta Ada Cavalcanti-Adam, Daniel Aydin, Vera Catherine Hirschfeld-Warneken, and Joachim Pius Spatz. Cell adhesion and response to synthetic nanopatterned environments by steering receptor clustering and spatial location. *HFSP J*, 2(5) :276–285, Oct 2008.
- [35] Jung Park, Sebastian Bauer, Klaus von der Mark, and Patrik Schmuki. Nanosize and vitality : Tio2 nanotube diameter directs cell fate. *Nano Lett*, 7(6) :1686–1691, Jun 2007.
- [36] L. Kam and S. G. Boxer. Cell adhesion to protein-micropatterned-supported lipid bilayer membranes. *J Biomed Mater Res*, 55(4) :487–495, Jun 2001.
- [37] Dirk Lehnert, Bernhard Wehrle-Haller, Christian David, Ulrich Weiland, Christoph Ballestrem, Beat A Imhof, and Martin Bastmeyer. Cell behaviour on micro-patterned substrata : limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci*, 117(Pt 1) :41–52, Jan 2004.
- [38] Manuel Thery, Victor Racine, Anne Pepin, Matthieu Piel, Yong Chen, Jean-Baptiste Sibarita, and Michel Bornens. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol*, 7(10) :947–953, October 2005.
- [39] Manuel Thery, Andrea Jimenez-Dalmaroni, Victor Racine, Michel Bornens, and Frank Julicher. Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature*, 447(7143) :493–496, May 2007.
- [40] Alexandre Micoulet Horst Kessler Benjamin Geiger Elisabetta Ada Cavalcanti-Adam, Tova Volberg and Joachim Pius Spatz. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophysical Journal*, 92 :2964–2974, 2007.
- [41] A. S G Curtis, N. Gadegaard, M. J. Dalby, M. O. Riehle, C. D W Wilkinson, and G. Aitchison. Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings. *IEEE Trans Nanobioscience*, 3(1) :61–65, Mar 2004.
- [42] Chenxiang Lin, Yan Liu, and Hao Yan. Self-assembled combinatorial encoding nanoarrays for multiplexed biosensing. *Nano Lett*, 7(2) :507–512, Feb 2007.

- [43] F. Bertucci, P. Viens, and D. Birnbaum. Profils d'expression génique sur puces à adn en cancérologie mammaire : principes et applications pronostiques. *Pathologie Biologie*, 54(1) :49 – 54, 2006.
- [44] C. I. Smith, A. Bowfield, M. C. Cuquerella, C. P. Mansley, T. Farrell, P. Harrison, D. S. Martin, D. G. Fernig, C. Edwards, J. E. Butler, R. J. Hamers, B. Sun, X. Wang, and P. Weightman. Detection of dna hybridisation on a functionalised diamond surface using reflection anisotropy spectroscopy. *EPL (Europhysics Letters)*, 85(1) :18006, 2009.
- [45] Helmut Zarbl. Dna microarrays : An overview of technologies and applications to toxicology. *Current Protocols in Toxicology*, 2001.
- [46] Heng Zhu and Michael Snyder. Protein chip technology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(1) :55 – 63, 2003.
- [47] Byron D Gates, Qiaobing Xu, Michael Stewart, Declan Ryan, C. Grant Willson, and George M Whitesides. New approaches to nanofabrication : molding, printing, and other techniques. *Chem Rev*, 105(4) :1171–1196, Apr 2005.
- [48] Zhiwei Li, Yanni Gu, Lei Wang, Haixiong Ge, Wei Wu, Qiangfei Xia, Changsheng Yuan, Yanfeng Chen, Bo Cui, and R. Stanley Williams. Hybrid nanoimprint-soft lithography with sub-15 nm resolution. *Nano Lett*, 9(6) :2306–2310, Jun 2009.
- [49] Philippe Houdy Marcel Lahmani, Claire Dupas, editor. *Les nanosciences 1. Nanotechnologies et nanophysique*. Belin, 2007.
- [50] D. Mailly C. Vieu, editor. *Les nanosciences : Nanotechnologies et nanophysique Chapitre 1*. Belin, 2007.
- [51] Younan Xia and George M. Whitesides. Soft lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37 :550–575, 1998.
- [52] Jian Gu, Xiaoyin Xiao, Bharath R Takulapalli, Michael E Morrison, Peiming Zhang, and Frederic Zenhausern. A new approach to fabricating high-density nanoarrays by nanocontact printing. *J Vac Sci Technol B Microelectron Nanometer Struct Process Meas Phenom*, 26(6) :1860–1865, Nov 2008.
- [53] Jon A. Preece Paula M. Mendes, Chun L. Yeung. Bio-nanopatterning of surfaces. *Nanoscale Res Lett*, 2 :373–384, 2007.
- [54] S. Park R. Eckert H. Schiff J. Gobrecht R. Barbucci D. Falconnet, D. Pasqui and M. Textor. A novel approach to produce protein nanopatterns by combining

Bibliographie

- nanoimprint lithography and molecular self-assembly. *Nano letters*, 4(10) :1919–1914, 2004.
- [55] Jie-Ren Li and Jayne C. Garino. Elucidating the role of surface hydrolysis in preparing organosilane nanostructures via particle lithography. *Nano letters*, 8(7) :1916–1922, june 2008.
- [56] Bryan L. Jackson and Jay T. Groves. Hybrid protein-lipid patterns from aluminum templates. *Langmuir*, 23 :2052–2057, 2007.
- [57] Joachim P Spatz and Benjamin Geiger. Molecular engineering of cellular environments : cell adhesion to nano-digital surfaces. *Methods Cell Biol*, 83 :89–111, 2007.
- [58] D. L. Robinson F. Keller, M. S. Hunter. Structural features of oxide coatings on aluminum. *J. Electrochem. Soc.*, 100 :411–419, 1953.
- [59] Yong Lei, Weiping Cai, and Gerhard Wilde. Highly ordered nanostructures with tunable size, shape and properties : A new way to surface nano-patterning using ultra-thin alumina masks. *Progress in Materials Science*, 52 :465–539, 2007.
- [60] Bernhard Wolfrum, Yulia Mourzina, Dirk Mayer, Daniel Schwaab, and Andreas Offenhäusser. Fabrication of large-scale patterned gold-nanopillar arrays on a silicon substrate using imprinted porous alumina templates¹³. *Small*, 2(11) :1256–1260, 2006.
- [61] Guofang Chen, Steven A Soper, and Robin L McCarley. Free-standing, erect ultrahigh-aspect-ratio polymer nanopillar and nanotube ensembles. *Langmuir*, 23(23) :11777–11781, Nov 2007.
- [62] Monika Pfanmçller Ulrich Rothe Annika Thormann, Nico Teuscher and Andreas Heilmann. Aluminum oxide membranes nanoporous aluminum oxide membranes for filtration and biofunctionalization. *Small*, 3 :1032, 2007.
- [63] A. T. Almeida, M. C. Salvadori, and D. F. S. Petri. Enolase adsorption onto hydrophobic and hydrophilic solid substrates. *Langmuir*, 18(18) :6914–6920, September 2002.
- [64] Hélène Lalo. *R ealisation d’une plateforme biopuce sans marquage, bas ee sur la lithographie douce*. PhD thesis, Université de Toulouse, 2009.

- [65] Y. Han, A. Offenhäusser, and S. Ingebrandt. Detection of dna hybridization by a field-effect transistor with covalently attached catcher molecules. *Surface and Interface Analysis*, 38(4) :176–181, 2006.
- [66] Judith Stein, L. N. Lewis, Y. Gao, and R. A. Scott. In situ determination of the active catalyst in hydrosilylation reactions using highly reactive pt(0) catalyst precursors. *Journal of the American Chemical Society*, 121(15) :3693–3703, 1999.
- [67] Ralf Richter Alain Brisson Agnès Girard-Egrot, Loïc Blum. *Les nanosciences 3. Nanobiotechnologies et nanobiologie chap 2*, volume 3. Belin, 2007.
- [68] Massou, Albigot, and Prats. Carboxyfluorescein fluorescence experiments. *Biochem Educ*, 28(3) :171–173, May 2000.
- [69] <http://www.gbiosciences.com/researchuploads/researchproductsimages/mediumimages/fit>
- [70] Guillaume LAMOUR. *Influence de la nanostructuration énergétique des substrats dans l'adhésion et la différenciation des cellules neuronales modèles pc12*. PhD thesis, Université Paris VII, 2010.
- [71] Ulrich Schneider, Hans-Ulrich Schwenk, and Georg Bornkamm. Characterization of ebv-genome negative null and t cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer*, 19(5) :621–626, 1977.
- [72] Fengxiang Zhang and M. P. Srinivasan. Self-assembled molecular films of amino-silanes and their immobilization capacities. *Langmuir*, 20(6) :2309–2314, March 2004.
- [73] Sandra Gilles. *Chemical modification of silicon surfaces for the application in soft lithography*. PhD thesis, Technischen Universität Bergakademie Freiberg, 2006.
- [74] John F. Rabolt Patrick W. Hoffmann, Martin Stelzle. Vapor phase self-assembly of fluorinated monolayers on silicon and germanium oxide. *Langmuir*, 1877-1880, 1997.
- [75] Edwin W H Jager Carl-Fredrik Mandenius Danny van Noort, Jens Rumberg. Silicon based affinity biochips viewed with imaging ellipsometry. *Meas. Sci. Technol*, 11 :801, 2000.
- [76] Gun-Young Jung, Zhiyong Li, Wei Wu, Yong Chen, Deirdre L. Olynick, Shih-Yuan Wang, William M. Tong, and R. Stanley Williams. Vapor-phase self-

Bibliographie

- assembled monolayer for improved mold release in nanoimprint lithography. *Langmuir*, 21(4) :1158–1161, February 2005.
- [77] P. Martin and M. Szablewski. *Langmuir-blodgett troughs operating manual 6th edition*. NIMA technology, 2004.
- [78] Katharine B. Blodgett and Irving Langmuir. Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Phys. Rev.*, 51(51) :964–982, 1937.
- [79] Jonathan M Crane, Volker Kiessling, and Lukas K Tamm. Measuring lipid asymmetry in planar supported bilayers by fluorescence interference contrast microscopy. *Langmuir*, 21(4) :1377–1388, Feb 2005.
- [80] H. Möhwald. *Structure and dynamics of membranes*. Elsevier, 1995.
- [81] A. D. Bangham and R. W. Horne. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.*, 8 :660–668, May 1964.
- [82] C. A. Keller, K. Glasm¨ ;star, V. P. Zhdanov, and B. Kasemo. Formation of supported membranes from vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 84(23) :5443–5446, jun 2000.
- [83] E. Shechter. *Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels*. Masson Paris, 1993.
- [84] Ralf P Richter, Rémi Bérat, and Alain R Brisson. Formation of solid-supported lipid bilayers : an integrated view. *Langmuir*, 22(8) :3497–3505, Apr 2006.
- [85] Ralf P Richter, Nicolas Maury, and Alain R Brisson. On the effect of the solid support on the interleaflet distribution of lipids in supported lipid bilayers. *Langmuir*, 21(1) :299–304, Jan 2005.
- [86] Suzanne Fenz. *Cell-cell adhesion mediated by mobile receptor-ligand pairs : a biomimetic study*. PhD thesis, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2008.
- [87] Jennifer S. Hovis Li A. Kung, Lance Kam and Steven G. Boxer. Patterning hybrid surfaces of proteins and supported lipid bilayers. *Langmuir*, 16 :6773–6776, 2000.
- [88] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56(9) :930–933, March 1986.

- [89] Ricardo García and Rubén Pérez. Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*, 47(6-8) :197 – 301, 2002.
- [90] Chritian Frétigny, editor. *Les nanosciences : Nanotechnologies et nanophysique Chapitre 4*. Belin, 2007.
- [91] C. C. Williams Y. Martin and H. K. Wickramasinghe. Atomic force microscope-force mapping and profmng on a sub 100a scale. *J. Appl. Phys.* 61, 4723; (7 pages), 61 :4723, 1987.
- [92] D. Horne T. R. Albrecht, P. Grütter and D. Rugar. Frequency modulation detection using high-q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity. *J. Appl. Phys.*, 69 :668, 1991.
- [93] C. Möller, M. Allen, V. Elings, A. Engel, and D. J. Müller. Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces. *Biophys J*, 77(2) :1150–1158, Aug 1999.
- [94] Robert M. Henderson J. Michael Edwardson Calum S. Neish, Ian L. Martin. Direct visualization of ligand-protein interactions using atomic force microscopy. *British Journal of Pharmacology*, 135 :1943–1950, 2002.
- [95] Andrea Alessandrini and Paolo Facci. Afm : a versatile tool in biophysics. *Measurement Science and Technology*, 16, 2004.
- [96] I. Horcas, R. Fernández, J. M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, and A. M. Baro. Wsxm : a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum*, 78(1) :013705, Jan 2007.
- [97] Laurent Limozin and Kheya Sengupta. Quantitative reflection interference contrast microscopy (ricm) in soft matter and cell adhesion. *Chemphyschem*, 10(16) :2752–2768, Nov 2009.
- [98] A. S. Curtis. The mechanism of adhesion of cells to glass. a study by interference reflection microscopy. *J Cell Biol*, 20 :199–215, Feb 1964.
- [99] M. Yamamoto A. Kusumi, Y. Sako. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophysical journal*, 65(5) :2021–40, Nov 1993.
- [100] M Edidin, Y Zagyanaky, and TJ Lardner. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science*, 191(4226) :466–468, 1976.

Bibliographie

- [101] D. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W.W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.*, 16(9) :1055–1069, sep 1976.
- [102] C. Dietrich, R. Merkel, and R. Tampé. Diffusion measurement of fluorescence-labeled amphiphilic molecules with a standard fluorescence microscope. *Biophys J*, 72(4) :1701–1710, Apr 1997.
- [103] Susanne F Fenz, Rudolf Merkel, and Kheya Sengupta. Diffusion and intermembrane distance : case study of avidin and e-cadherin mediated adhesion. *Langmuir*, 25(2) :1074–1085, Jan 2009.
- [104] Emilie Roncali et al. *Nanoscience : Nanobiotechnology and Nanobiology*. Springer, 2007.
- [105] Radek Machan and Martin Hof. Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, Feb 2010.
- [106] Laure Wawrezinieck, Hervé Rigneault, Didier Marguet, and Pierre-François Lenne. Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the sub-micron cell membrane organization. *Biophys J*, 89(6) :4029–4042, Dec 2005.
- [107] Pierre-François Lenne, Laure Wawrezinieck, Fabien Conchonaud, Olivier Wurtz, Annie Boned, Xiao-Jun Guo, Hervé Rigneault, Hai-Tao He, and Didier Marguet. Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J*, 25(14) :3245–3256, Jul 2006.
- [108] Laure Wawrezinieck, Pierre-Francois Lenne, Didier Marguet, and Herve Rigneault. Fluorescence correlation spectroscopy to determine diffusion laws : application to live cell membranes. volume 5462, pages 92–102. SPIE, 2004.
- [109] Elliot L Elson, Eliot Fried, John E Dolbow, and Guy M Genin. Phase separation in biological membranes : integration of theory and experiment. *Annu Rev Biophys*, 39 :207–226, Jun 2010.
- [110] Didier Marguet, Pierre-François Lenne, Hervé Rigneault, and Hai-Tao He. Dynamics in the plasma membrane : how to combine fluidity and order. *EMBO J*, 25(15) :3446–3457, Aug 2006.
- [111] <http://www.pa.ibf.cnr.it/nabla/t08.html>.

- [112] Jerrod E Houser and Kurt R Hebert. The role of viscous flow of oxide in the growth of self-ordered porous anodic alumina films. *Nat Mater*, 8(5) :415–420, May 2009.
- [113] Jonathan L Hardin, Nathan A Oyler, Erich D Steinle, and Gary A Meints. Spectroscopic analysis of interactions between alkylated silanes and alumina nanoporous membranes. *J Colloid Interface Sci*, Nov 2009.
- [114] F. Müller O. Jessensky and U. Gösele. Self-organized formation of hexagonal pore arrays in anodic alumina. *Applied Physics Letters*, 72(10) :1173–1175, 1998.
- [115] VI Sherhulsky V.P. Parkhutik. Theoretical modelling of porous oxide growth on aluminium. *J. Phys.D : Appl. Phys.*, 25 :1258–1263, 1992.
- [116] C.E. Blanco-Pinzon P. Skeldon G.E.Thomson P.Campestrini S. J. Garcia-Vergara, L. Iglesias-Rubianes. Mechanical instability and pore generation in anodic alumina. *Proc. R. Soc. A*, 462 :2345–2358, 2006.
- [117] Hideki Masuda and Kenji Fukuda. Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina. *Science*, 268(5216) :1466–1468, 1995.
- [118] Kathrin Schwirn-Ralf B. Wehrspohn Kornelius Nielsch, Jinsub Choi and Ulrich Gösele. Self-ordering regimes of porous alumina : the 10 porosity rule. *Nano letters*, 7(7), 2002.
- [119] Woo Lee, Ran Ji, Ulrich Gösele, and Kornelius Nielsch. Fast fabrication of long-range ordered porous alumina membranes by hard anodization. *Nat Mater*, 5(9) :741–747, Sep 2006.
- [120] R. Castillo, S. Ramos, J. Ruíz-García, and C. Varea. Langmuir films of mixtures of c70 and arachidic acid. *Fluid Phase Equilibria*, 110(1-2) :129–135, September 1995.
- [121] A. Santos, L. Vojkuvka, J. Pallarés, J. Ferré-Borrull, and L.F. Marsal. In situ electrochemical dissolution of the oxide barrier layer of porous anodic alumina fabricated by hard anodization. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 632(1-2) :139 – 142, 2009.
- [122] Hiroshi Nakashima, Kazuaki Furukawa, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, Youichi Shinozaki, and Keiichi Torimitsu. Pattern formation and molecular transport of histidine-tagged gfps using supported lipid bilayers. *Langmuir*, 26(15) :12716–12721, 2010.

Bibliographie

- [123] M. Reiche-R.B. Wehrspohn J. Choi, K. Nielsch and U. Gösele. Fabrication of monodomain alumina pore arrays with an interpore distance smaller than the lattice constant of the imprint stamp. *J. Vac. Sci. Technol. B.*, 21 :763–766, 2003.
- [124] Woo Lee, Ran Ji, Caroline A Ross, Ulrich Gösele, and Kornelius Nielsch. Wafer-scale ni imprint stamps for porous alumina membranes based on interference lithography. *Small*, 2(8-9) :978–982, Aug 2006.
- [125] Lance C. Kam. Capturing the nanoscale complexity of cellular membranes in supported lipid bilayers. *Journal of Structural Biology*, 168(1) :3 – 10, 2009. Supported Membranes.
- [126] Victoria Yamazaki, Oksana Sirenko, Robert J Schafer, Luat Nguyen, Thomas Gutschmann, Lore Brade, and Jay T Groves. Cell membrane array fabrication and assay technology. *BMC Biotechnol*, 5 :18, 2005.
- [127] Y. Kanamori, K. Hane, H. Sai, and H. Yugami. 100 nm period silicon antireflection structures fabricated using a porous alumina membrane mask. *Appl. Phys. Lett.*, 78 :142, 2001.
- [128] Sung-Hwan Choi and Bi-min Zhang Newby. Suppress polystyrene thin film dewetting by modifying substrate surface with aminopropyltriethoxysilane. *Surface Science*, 600(6) :1391–1404, March 2006.
- [129] Elodie Crétel, Anne Pierres, and Pierre Bongrand. Adhésion de cellules immunitaire sur une surface couverte d'igg1. Non publié.
- [130] Elodie Crétel Durand. *Interaction initiale des lymphocytes t avec des surfaces contrôlées application à l'étude du déclin immunitaire chez le sujet agé*. PhD thesis, Université de la méditerranée, 2010.
- [131] Sandrine Lavenus, Jean-Charles Ricquier, Guy Louarn, and Pierre Layrolle. Cell interaction with nanopatterned surface of implants. *Nanomedicine*, 5(6) :937–947, 2010.

Résumé :

Les substrats structurés aux échelles micrométriques et nanométriques sont intéressants pour des applications biomédicales, par exemple dans des puces à ADN/préotéines, pour la miniaturisation des « lab-on-chip » ou pour préparer des implants permettant le contrôle de l'adhésion de cellules. Dans la dernière décennie des études ont montrées, que les cellules vivantes peuvent détecter la présence de nano-structures sur les substrats sur lesquels elles adhèrent. Bien que ces mécanismes soient étudiés depuis une dizaine d'années, les mécanismes fondamentaux sont encore en cours d'études. Tant pour une étude au niveau fondamental que dans le but d'applications concrètes, il est important de développer des techniques simples pour structurer des substrats sur de grandes surfaces. Nous avons réalisé une nouvelle méthode alliant un faible coût de fabrication et la biocompatibilité pour structurer et biofonctionnaliser des substrats à l'échelle nanométrique en utilisant des membranes d'alumine poreuses comme masque. Les membranes d'alumine poreuses, préparées par électrochimie, sont naturellement organisées en un réseau hexagonal sur une surface de quelques cm². Nous les utilisons comme masque pour la structuration de surfaces. Des trous réguliers sont gravés dans le substrat à travers les membranes d'alumine poreuses. Ce substrat est ensuite utilisée lors d'une application biologique : une bicouche lipidique est déposée sur le substrat structuré pour imiter les hétérogénéités de la membrane cellulaire. La mobilité de la bicouche est étudiée par corrélation de spectroscopie de fluorescence à rayon variable. Une autre série d'expériences est faite en utilisant des membranes d'alumine poreuses comme masque d'évaporation pour créer des réseaux organisés d'îlots d'organo-silanes. Deux molécules sont utilisées elles possèdent soit une fonction amine réactive soit une longue chaîne carbonée inerte. La bio-fonctionnalisation est ensuite effectuée en utilisant la fonction amine pour accrocher un anticorps. Des études sont effectuées en parallèle, sur des substrats bio-fonctionnalisés à l'échelle micrométrique grâce au micro-contact printing. Le but de cette étude est de mettre au point une biochimie de surface permettant le contrôle de l'adhésion de cellules immunitaires, avec le but de transférer ensuite la biochimie à l'échelle nanométrique.

Mots clés :

Nanostructuration chimique, biostructuration, membranes d'alumine poreuses, organo-silanes, lithographie non conventionnelle, agrégats de protéines

Abstract :

Substrates patterned at the micro-scale and nano-scale are interesting for biomedical applications, for example, in DNA/protein nano-arrays, for miniaturized lab-on-chip applications or for making smart implants that can control adhesion of cells. In the last decade, some studies showed that living cells can detect nano-scale structures on substrates to which they adhere. Although this behaviour has been observed now for over a decade, the fundamental detection mechanism is still under investigation. Both for fundamental studies and for applications, it is important to develop facile techniques to pattern substrates on a large scale. We have realized a novel technique for patterning and bio-functionalizing substrates at the nano-scale using porous anodic alumina membranes as masks. The ordered porous anodic alumina membranes, prepared by classical electro-chemistry, are naturally organized in an hexagonal array over surface area of few square centimeters. Here we use them as mask for surface patterning. To create an array of nano holes, the substrate is dry etched through the alumina pores. In a biologically relevant application, a lipid bilayer is deposited on the patterned substrate to mimic a heterogeneous cell membrane. The mobility of the bilayer is studied by fluorescent correlation spectroscopy. In a different set of experiments, the porous alumina membranes are used as evaporation mask to create an organized array of alkyl-silane islands - either with a short carbon chain and with a reactive amine group or with a long carbon chain and non-reactive. Afterwards, biochemical functionalization is achieved by exploiting the amino-function of the amino-silane to bind an antibody. In parallel, we have started some studies of adhesion on a pattern substrate at micro-scale with immunological cells. The substrate is pattern by micro contact printing and the cell adhesion is observed by RICM. The aim of this studies is to prepare the biochemistry for the immunological cells adhesion, with the aim or transferring this to the nano-scale.

Key words :

Chemical nano-structure, bio-fuctionalization, ordered porous alumina membrane, alkyl-silanes, unconventional lithography, protein islands