



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Nanophysique*

Présentée et soutenue par *Aline CERF*
Le 17 septembre 2010

Titre : *Assemblage dirigé de nano-objets*

JURY

M. Azzedine BOUSSEKSOU, Président
M. Zev BRYANT, Examineur
M. Serge MONNERET, Examineur
M. Victor MUNOZ, Examineur
Mme. Clivia SOTOMAYOR, Examineur

Ecole doctorale : *Sciences de la Matière*
Unité de recherche : *Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS-CNRS)*
Directeur(s) de Thèse : *M. Christophe VIEU*
Rapporteurs : *M. Jean-Pierre AIME*
Mme. Anne-Marie HAGHIRI-GOSNET

*« Les idées ne sont pas faites pour être pensées mais vécues »
André Malraux, La condition humaine.*

« I am enough of an artist to draw freely upon my imagination. Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution ».--Albert Einstein

A mi madre y a mi padre

Remerciements

Je tiens à profiter de cette page blanche pour remercier en tout premier lieu mon directeur de thèse, Christophe Vieu, une personne aux qualités immenses, une personne hors du commun tant d'un point de vue scientifique qu'humain. Ces trois années de thèse ont été, grâce à lui, une période de ma vie extrêmement enrichissante. J'ai énormément appris auprès de lui et je lui en serai toujours reconnaissante. Grâce à lui, j'ai trouvé ma voie. Sa passion pour la science et la recherche, sa créativité débordante, sa curiosité scientifique qu'il nous communique au jour-le-jour sont la flamme qu'il dépose en nous et qui nous fait aimer ce métier où rien n'est impossible ; même à notre échelle, nous pouvons contribuer et apporter des briques aux progrès de la science dans des domaines essentiels tels que celui de la santé. Je le remercie profondément pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Je souhaite remercier le groupe NanoBioSystèmes, les anciennes générations que j'ai vu partir, Jean-Christophe, Jérôme, et les nouvelles qui prennent leurs marques seulement mais qui me manqueront cruellement également. Un grand merci à Christophe, Chil, Christel, Franck, pour leur soutien tout au long de ces trois années et leur amitié. Une mention spéciale s'adresse à mes collègues de bureau pour leur joie et bonne humeur. Je garderai toujours un très bon souvenir de ces trois années passées avec eux.

Tous les permanents, thésards, post-docs qui sont plus que des collègues de travail pour moi ; Tous et chacun d'eux sont désormais inscrits dans mon cœur et j'espère ne jamais les perdre de vue.

Un grand merci aux services du LAAS, à toutes les personnes que l'on côtoie dans cette enceinte et qui font du LAAS un endroit si chaleureux et convivial que l'on a du mal à quitter.

Mes remerciements les plus sincères vont au service TEAM pour leur aide précieuse et leurs conseils, à Xavier pour sa gentillesse, disponibilité et remarquable ingéniosité. Merci aux autres laboratoires, le LCC, le LISPB, le CEMES, l'IPBS, la plateforme biopuces, pour leur accueil, merci en particulier à Gabor, Lionel, Adilia, Marie-Ange, Emmanuelle, Véronique, Guillaume, Merci à eux.

Table des matières

Chapitre 1 Introductif	9
I. Etat de l'art des techniques « non conventionnelles » d'assemblage de solutions colloïdales.....	12
I. A. Auto-assemblage.....	12
I. A. 1. Assemblage par évaporation	12
I. A. 2. Assemblage par voie chimique.....	13
I. A. 3. Assemblage électrostatique.....	14
I. A. 4. Assemblage par guidage magnétique ou électrique	14
I. A. 5. Assemblage par forces capillaires.....	15
I. B. Assemblage assisté par un support.....	16
I. B. 1. Supports organiques/inorganiques	17
I. B. 2. Assemblage capillaire dirigé par motifs chimiques.....	17
I. B. 3. Assemblage dirigé par contraste de charge	19
I. B. 4. Assemblage capillaire dirigé par motifs topographiques	19
I. C. La lithographie par champ proche.....	22
I. D. Bilan.....	24
II. Positionnement des travaux.....	24
III. Références.....	26
Chapitre 2: Aspects technologiques de l'intégration de nano-objets sur une surface structurée.....	37
I. Première méthodologie : le contraste chimique	38
I. A. La fonctionnalisation chimique de surface	38
I. B. Une technique de lithographie douce : le microcontact printing.....	41
I. B. 1. Le moule	42
I. B. 2. Le timbre.....	44
I. B. 3. L'encre	44
I. C. Protocoles expérimentaux de fonctionnalisation de surface utilisés	45
I. D. Double fonctionnalisation du substrat.....	47
II. Deuxième méthodologie : l'assemblage capillaire dirigé par structuration topographique de surface	52
II. A. Notions sur l'assemblage capillaire dirigé.....	52
II. A. 1. Introduction sur la capillarité : la tension superficielle et la force capillaire	53
II. A. 2. Mouillage total et partiel.....	55
II. A. 3. Effet de la température.....	56
II. A. 4. Effet de la concentration des solutés.....	56
II. A. 5 Les flux dans les systèmes colloïdaux	57
II. B. Présentation de la plateforme expérimentale	62
II. C. La structuration topographique de surface.....	64

II. D. Mise en place de l'expérience.....	65
II. E. Transfert.....	66
II. F. Extensions : vers le multiplexage.....	67
III. Techniques de caractérisation utilisées.....	69
III. A. Les microscopies « conventionnelles ».....	69
III. A. 1. La Microscopie Optique : mode en champ sombre.....	69
III. A. 2. La Microscopie Optique en fluorescence.....	69
III. B. La Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	70
III. C. La Microscopie à Force Atomique (AFM).....	71
III. C. 1. Principe de fonctionnement.....	71
III. C. 2. Les différents modes d'imagerie.....	73
III. C. 3. Mesures de force : la nanomécanique.....	74
III. D. La microbalance à quartz (QCM).....	76
III. E. La spectroscopie Raman.....	78
IV. Conclusion.....	78
V. Références.....	79
 Chapitre 3: Assemblage dirigé de cellules individuelles vivantes.....	 81
I. Sujet d'étude et état de l'art.....	82
II. Stratégie mise en place.....	84
III. Biopatterning.....	86
III.A. Bactéries traitées.....	87
III.A.1. Fonctionnalisation des sites d'accroche.....	87
III.A.2. Immobilisation des bactéries traitées sur les surfaces chimiques.....	93
III.A.3. Détection de la viabilité des cellules par coloration.....	96
III. B. Bactéries non traitées.....	97
III.B.1. Fonctionnalisation des sites d'accroche.....	97
III. B. 2. Immobilisation des bactéries non traitées sur substrats chimiques.....	99
III. B. 3. Propriétés nanomécaniques de cellules mortes ou de cellules vivantes.....	100
III. B. 4. Contrôle du nombre de bactéries.....	103
III. B. 5. Y-a-t-il une adhésion orientée des bactéries ?.....	104
IV. Extensions et applications.....	105
V. Conclusion.....	106
VI. References.....	107
 Chapitre 4 : Assemblage ordonné et déterministe de molécules d'ADN uniques.....	 111
I. Généralités.....	112
I. A. Description « chimique » et « structurale » de l'ADN.....	112
I. B. Grandeurs biophysiques associées aux molécules d'ADN.....	114
II. Etat de l'art : méthodes d'étirement de la molécule d'ADN.....	115
III. Assemblage induit par des structures topographiques.....	118

III. A. Protocole expérimental.....	118
III. B. Résultats	119
III. B. 1. Influence du surfactant	122
III. B. 2. Influence de la température : vers un assemblage de molécules d'ADN simple brin.....	123
IV. Extensions et Applications.....	130
IV. A. Y-a-t-il une sélection par la taille des molécules ? Cas d'un mélange complexe.....	130
IV. B. Assemblage de molécules d'ADN plus courtes : les plasmides.....	133
IV. C. Assemblage d'un système plus complexe basé sur l'ADN : le système ADN-bille.....	134
IV. D. Lignes d'ADN comme réseau de diffraction.....	136
V. Conclusion	138
VI. Références.....	138
Chapitre 5 : Assemblage contrôlé de nanoparticules métalliques pour la production de substrats SERS : Vers une ingénierie des points chauds	143
I. Sujet d'étude : Généralités	144
II. Principe de l'effet Raman	144
III. Propriétés optiques des colloïdes métalliques.....	147
IV. La Spectroscopie Raman Exaltée de Surface (SERS).....	148
IV. A. Mécanismes de l'effet SERS.....	149
IV. A. 1. La contribution électromagnétique.....	149
IV. A. 2. La contribution chimique	150
IV. A. 3. Bilan sur les mécanismes d'exaltation	151
IV. A. 4. Vers un design des sites d'exaltation.....	152
IV. A. 5. Questions ouvertes et positionnement de notre travail.....	155
V. Assemblage de nanoparticules induit par des structures topographiques.....	156
V. A. Protocole expérimental.....	156
V. B. Résultats du nanocontact printing assisté par solvant après assemblage capillaire	158
V. C. Préparation des substrats pour les mesures Raman.....	161
V. D. Dispositif expérimental	161
VI. Comportement optique.....	163
VI. A. La résonance plasmon en solution	163
VI. B. La résonance plasmon sur les sites.....	163
VI. C. L'effet SERS	167
VII. Effet MEF	174
VII. A. Généralités	174
VII. B. Exaltation des processus optiques et photochimiques.....	175
VII. C. Application à l'exaltation de fluorescence.....	176
VIII. Extensions et applications.....	179
VIII. A. Exaltation du signal Raman de couches minces.....	179
VIII. B. Détection de molécules uniques	180
VIII. C. Assemblages de mélanges	181
VIII. D. Assemblage de nanoparticules à transition de spin	182

VIII. E. Nanoparticules comme masques de gravure.....	182
IX. Conclusion	183
X. Références.....	184
Conclusion et Perspectives.....	191

Chapitre 1 Introductif

Positionnement de la thèse

Aussi bien pour les nanoparticules que pour les protéines, les molécules ou les cellules, différentes problématiques visent à assembler en 2D ou 3D ces objets en suspension sur des surfaces solides ou des interfaces. Leur intégration de cette phase liquide sur la surface solide suivant un positionnement et un arrangement donnés, demeure une phase critique et sensible dans le développement de nombreux dispositifs fonctionnels utiles en nanoélectronique, spintronique, dans le domaine des capteurs ainsi que pour des études plus fondamentales en biologie. Ce nano-assemblage est une étape clé de nombreux procédés et un sérieux défi à relever. De manière générale, le nano-assemblage ou l'organisation d'objets nanométriques peut être accompli en utilisant des approches « top-down » telles que la lithographie ou des approches « bottom-up » basées sur l'auto-assemblage. Mais, ces techniques présentent des limitations. En effet, l'enjeu aujourd'hui est de pouvoir assembler des objets d'étude de façon simple, rapide, fiable, bas-coût et grande échelle, tout en permettant d'atteindre la résolution de l'objet unique. Dans ce premier chapitre, nous résumons les différentes méthodes d'assemblage « non-conventionnelles » existantes et les principes qui gouvernent ces procédés. Enfin, nous positionnerons nos travaux parmi les différentes stratégies présentées puis nous expliquerons nos choix.

Introductive Chapter 1

Positioning of the Ph.D. thesis

Different studies aim at assembling in 2D or 3D various objects in suspension onto solid surfaces or interfaces. These objects can range from nanoparticles, proteins, to molecules or cells. In any case, their integration from this liquid phase to the solid surface following a given arrangement remains a critical step in the development of various functional devices useful in nanoelectronics, spintronics, sensing, as well as in more fundamental biological studies. This nano-addressing is a key step in many technological processes and a serious challenge to overcome. In a general manner, the nano-addressing or the organization of nanometric objects can be accomplished by employing “top-down” approaches such as lithography, or “bottom-up” approaches based on self-assembly. However, these techniques present some limitations. In fact, the current stake is the assembly of objects of study in a simple, fast, reliable, low-cost and large-scale manner, with enough flexibility to reach single object resolution. In this first chapter, we will summarize the different existing methods for the assembly of objects and the principles which govern these processes. Then, we will position this work among the different strategies presented and we will explain our choices.

La biologie et la physique partagent un intérêt commun pour les petites structures. Un échange vigoureux au travers des frontières de ces deux domaines de la science se développe autour de nouveaux matériaux et outils, et autour de nouveaux phénomènes. L'intérêt scientifique dans ce croisement des disciplines est basé sur la perception selon laquelle les sciences physiques procurent des outils pour la fabrication de dispositifs permettant de mesurer les caractéristiques des cellules et pour la synthèse de matériaux utiles en biologie moléculaire et cellulaire. La biologie offre, quant à elle, une fenêtre ouverte sur un éventail de nanostructures fonctionnelles les plus sophistiquées qui soient [1]. Ainsi, dans cet échange, le développement des nanotechnologies a permis la découverte de nouvelles méthodes et de nouveaux instruments sans précédent en biologie. Citons par exemple les aiguilles, pores et canaux comme outils biologiques ; les échafaudages microstructurés à 3D pour l'ingénierie tissulaire ; les nanoparticules comme sondes ou moyens de détection, les surfaces structurées par des monocouches auto-assemblées pour guider l'adhésion, la croissance et la mobilité de cellules. Citons également les nouveaux systèmes optiques pour l'imagerie tels que le microscope à force atomique... Autant d'outils nouveaux qui permettront d'étudier des mécanismes fondamentaux (par exemple la biomécanique cellulaire, l'angiogénèse, l'apoptose, la division cellulaire...) qui sont à la base de nombreuses maladies ou dérèglements. C'est par le biais de connaissances nouvelles acquises grâce aux nanotechnologies rendant accessible ce qui est pour le moment invisible aux moyens d'investigation actuels, que les thérapies de demain seront possibles.

Une grande partie de l'enthousiasme initial pour le développement de la nanotechnologie provient de son importance dans le domaine de l'électronique. La *micro*électronique a sans aucun doute changé le monde au travers de son impact sur le traitement de l'information et des communications. Les évolutions de ce secteur peuvent être appréhendées par la loi de Moore [2] : à la suite de la réduction en taille des composants de la microélectronique, ceux-ci sont devenus de moins en moins onéreux, plus rapides, et portatifs.

D'ici quelques années, l'ère de la microélectronique cèdera très certainement sa place à l'ère de la *nano*électronique pour laquelle la plupart des nanodispositifs seront générés, du moins au début, par des technologies dérivées des méthodes existantes de la microélectronique actuelle.

Pour faciliter la discussion, les nanotechnologies peuvent être divisées en deux catégories : « top-down » et « bottom-up » [3]. Les stratégies top-down impliquent généralement l'utilisation de diverses formes de lithographie pour structurer des surfaces planes [4], tandis que les méthodes bottom-up cherchent à exploiter les interactions entre atomes, molécules ou nanoparticules pour générer des nanostructures à 2D ou 3D [5]. L'industrie des semi-conducteurs a jusqu'à aujourd'hui utilisé des approches top-down – photolithographie [6-7] et lithographie électronique [8-9] par exemple – pour fabriquer des dispositifs microélectroniques à très grande échelle et haute densité spatiale [10-12]. La photolithographie, ou lithographie optique, est la technique phare de la micro- et nanofabrication à l'heure actuelle. La photolithographie est de plus en plus utilisée dans de nombreux domaines de la science moderne et de la technologie, tels que les domaines des systèmes microélectromécaniques (MEMS), de la microfluidique, des biopuces et des systèmes optiques [13-18]. La photolithographie consiste à faire passer une lumière collimatée au travers d'un masque pour exposer une résine photosensible recouvrant la surface d'une galette de silicium ou « wafer » et ainsi générer une image latente dans la résine *via* une réaction photochimique [6, 11, 19]. La résine est ensuite développée dans un solvant conduisant à l'obtention d'une surface structurée avec des motifs, à l'image de ceux du

masque initial. La photolithographie est une méthode exceptionnelle qui a permis de maintenir la cadence prédite par la loi de Moore [2]. Ceci a permis de réduire le coût des composants tout en augmentant l'efficacité des dispositifs. En 2003, l'industrie des semi-conducteurs a tout d'abord commencé par la commercialisation et la fabrication de structures sub-100 nm, en utilisant des procédés de photolithographie basés sur la lumière UV à 193 nm [20]. Depuis, elle n'a cessé d'évoluer pour conduire à la fabrication de dispositifs dont la plus faible dimension peut atteindre aujourd'hui ~28 nm [21]. Les systèmes de photolithographie actuels de type « step-and-scan » peuvent structurer des wafers de silicium de 200 mm ou 300 mm de diamètre avec une résolution inférieure à 65 nm et à une vitesse supérieure à 130 wafers par heure [22].

Alors que la photolithographie permet une génération de motifs rapide et parallèle, le masque utilisé est généralement fabriqué en utilisant une autre technique plus lente et sérielle, la lithographie par balayage (« Scanning Probe Lithography »). La lithographie par balayage utilise un faisceau focalisé d'ions hautement énergétiques (FIB) [23-25], d'électrons (e-beam lithography ou lithographie électronique) [7, 8, 26], ou de photons (direct-write laser lithography) [27-29] pour générer des nanostructures sur un substrat [10]. Les lithographies par FIB ou faisceau d'électrons sont capables d'atteindre une résolution inférieure à 50 nm avec des résines conventionnelles. Des résolutions de ~10 nm ont pu être obtenues par lithographie électronique en utilisant du PMMA [30], des résines particulières [31, 32], ou des films inorganiques [33]. Le FIB peut atteindre des résolutions d'environ ~10 nm également en utilisant du PMMA [34] ou des résines inorganiques [35]. Ces méthodes sont la base des procédés les plus sophistiqués qui soient à l'heure actuelle dans l'industrie. Le besoin de structures de plus en plus complexes et sans défauts positionne la barre très haut pour la nouvelle vague de technologies. Cependant, malgré ce succès, la lithographie doit faire face à des coûts élevés en matière d'équipements et de production pour pouvoir suivre la réduction en taille des dispositifs imposée et rester compétitive [36]. La lithographie est également limitée à une fabrication planaire sur des substrats de formats relativement petits et n'est généralement pas adaptée à la structuration de matériaux fragiles tels que les échantillons biologiques [37]. Ces limitations ont motivé la recherche de techniques « non conventionnelles » et à bas-coût telles que la nano-impression [38, 39], le moulage [40, 41], l'impression par contact [15, 42]), la lithographie par champ proche [43, 44], et l'auto-assemblage [45-47]. Chacune de ces méthodes se veut prometteuse pour contourner les limitations techniques et de production actuelles des techniques « top down » conventionnelles [48, 49].

Parmi ces techniques « non conventionnelles », beaucoup ont été développées dans le but de pouvoir assembler des objets à partir de solutions colloïdales. Pour la plupart, elles ont été mises au point à partir d'objets d'école, les nanoparticules, aux propriétés optiques remarquables.

I. Etat de l'art des techniques « non conventionnelles » d'assemblage de solutions colloïdales

I. A. Auto-assemblage

L'auto-assemblage est le prototype des méthodes bottom-up [50-58]. Cette technique utilise les forces (Van der Waals, hydrophobe, ionique, etc) pour diriger l'organisation autonome des objets selon des motifs ou structures [59]. L'auto-assemblage est un outil important pour générer des dispositifs intégrés. Il s'agit d'une technique utilisée d'ailleurs de manière courante par la nature pour la création de structures biologiques complexes et multi-dimensions telles que les cellules. Lorsque les objets sont en suspension, leur comportement est gouverné par plusieurs forces notamment les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques, les forces capillaires et les forces hydrodynamiques. De nombreux travaux de recherche ont cherché à contrôler une ou plusieurs de ces forces et à les compenser de façon à pouvoir diriger cet assemblage et parvenir à positionner les objets colloïdaux sur de larges étendues. Dans ce contexte, de nombreuses méthodes d'assemblage non conventionnelles ont été conduites pour réaliser un agencement à l'échelle nanométrique, telles que les techniques de Langmuir-Blodgett, l'assemblage par séchage, l'assemblage chimiquement assisté, l'assemblage électrostatique ou encore par forces capillaires [30].

I. A. 1. Assemblage par évaporation

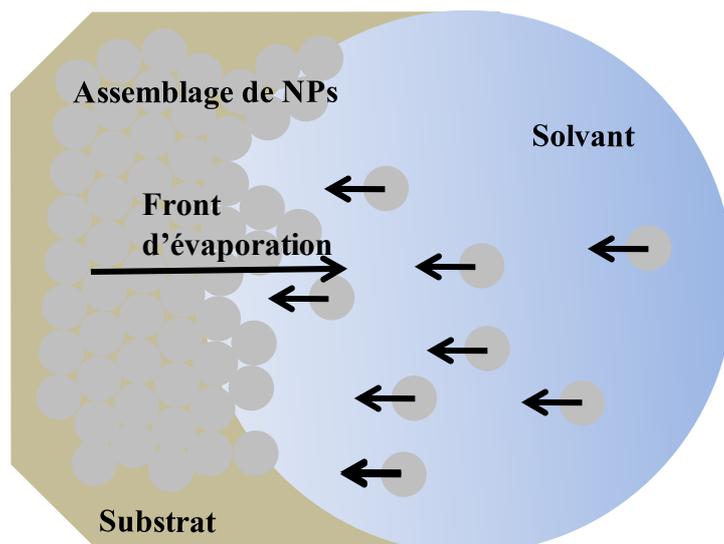


Figure 1. Schéma représentant le mécanisme d'assemblage par évaporation d'une solution de nanoparticules sur une surface [60].

L'assemblage par évaporation est la méthode la plus simple pour assembler des objets colloïdaux sur des surfaces. En effet, des objets soumis à une évaporation lente et irréversible

forment des motifs d'objets auto-assemblés hautement organisés sur les surfaces (figure 1). Les forces d'attraction relativement faibles entre les objets en solution prennent de l'importance lorsque le solvant est évaporé lentement, forçant les objets à s'organiser. Ce phénomène fut observé pour la première fois par Denkov et al. [61]. Cette étude a montré dans quelle mesure le choix du solvant, la taille des objets et l'état thermodynamique peut produire différentes morphologies des structures finales. Pilani et al. ont décrit ce processus de formation en réseaux en utilisant des nanoparticules d'Ag₂S [62]. Si la vitesse de diffusion des nanoparticules dans le liquide est plus lente que la vitesse d'évaporation du liquide en surface, on s'attend à ce que la concentration des nanoparticules augmente localement juste en dessous du liquide, conduisant à la formation d'une couche à deux dimensions auto-assemblée sur la surface. Au fur et à mesure que l'évaporation se poursuit, une deuxième couche peut se former à la surface de la première. Lorsque le front d'évaporation passe sur une surface hydrophile à un taux contrôlé, les particules dispersées en solution sont dirigées vers la ligne triple par convection et sont ensuite déposées lorsque le front d'évaporation devient très fin. De plus, le séchage de solutions colloïdales sur des surfaces conduit également à la formation d'anneaux concentriques avec une très bonne organisation. Ceci a été expliqué en se basant sur le « coffee stain effect ». Cette technique constitue une stratégie puissante pour créer des matériaux et dispositifs multi-fonctionnels hautement structurés. En somme, il a été démontré que l'évaporation confinée et contrôlée ainsi que le flux capillaire associé, peuvent être utilisés comme une stratégie simple, bon marché et robuste pour l'auto-assemblage d'objets. Ce processus repose sur les forces électrostatiques, les forces capillaires, la morphologie du substrat, et la taille et géométrie des objets, qui doivent présenter une très faible dispersion en taille.

Cette technique est intéressante car elle requiert des faibles quantités de suspension colloïdale (de l'ordre du μL). Cependant, la vitesse et la direction de retrait de la ligne de contact sont difficiles à contrôler avec cette méthode, et l'organisation finale peut être constituée de couches compactes d'objets à 2D ou 3D.

I. A. 2. Assemblage par voie chimique.

L'assemblage par voie chimique est une approche d'auto-assemblage puissante pour créer des motifs ou assemblages d'objets spécifiques hautement organisés [63]. Dans cette technique, les interactions covalentes et non covalentes des ligands recouvrant les objets sont exploitées. Cette approche est une approche de premier choix aussi bien en solution que sur des surfaces. Différentes techniques telles que l'assemblage électrostatique couche par couche, la structuration chimique, et les couches moléculaires auto-assemblées (SAMs), qui seront explicitées plus loin, sont les modes les plus utilisés. Typiquement, une fonctionnalisation appropriée des objets et des surfaces est réalisée. Ces fonctionnalités chimiques de surface interagissent par la suite, conduisant à l'assemblage et à l'organisation des objets. Par exemple, des nanoparticules d'Or peuvent être piégées ou greffées à des endroits spécifiques, en bénéficiant de l'affinité chimique existant entre la surface des objets et les fonctionnalités chimiques thiols ou amine des substrats [64]. Les groupes alcool, thiol, acide, amine, et azide sont généralement utilisés pour la fonctionnalisation des objets [65]. Des fonctionnalités uniques ou multiples des objets peuvent être exploitées pour créer des structures assemblées par conjugaison chimique. Des techniques plus avancées telles que la nanolithographie par Dip-pen (DPN) et le microcontact printing, que nous présenterons plus loin, utilisent les forces de conjugaison chimique indirectement pour attacher les objets sur des substrats

appropriés tels que l' Au ou le SiO₂ [64, 66]. De plus, ces substrats chimiquement fonctionnalisés offrent également un fort potentiel pour créer des assemblages d'objets versatiles car une large variété de méthodes pour la modulation chimique des substrats est disponible. Cependant, un inconvénient majeur est la formation de structures irrégulières étant donné que les accroches sont généralement robustes, ce qui interdit toute correction ultérieure d'erreurs ou incompatibilités [67]. Autrement dit, bien souvent, la localisation des objets par affinité chimique entre en conflit avec leur assemblage lequel requiert une réversibilité des interactions.

I. A. 3. Assemblage électrostatique

En dehors des forces de Van der Waals, les interactions électrostatiques offrent des voies simples et flexibles pour la création d'assemblages organisés de nanostructures de type couche-par-couche. En utilisant une approche de type couche-par-couche, un grand nombre de matériaux avec des propriétés optiques et électroniques uniques ont pu être créés tels que les diodes électroluminescentes (LEDs), les capteurs de dopamine, et les dispositifs à un électron [68]. Decher a été le premier à introduire l'approche couche-par-couche pour l'assemblage de polyélectrolytes [69]. Iler quant à lui [70] l'a décrite pour incorporer des colloïdes à l'échelle macrométrique. Par la suite, Kotov et al. ont adopté cette technique pour l'assemblage de nanoparticules [71]. Cette technique offre un potentiel immense pour organiser des matériaux de charges opposées sur des substrats plans [72-74]. Elle est également connue sous le nom d'« épitaxie moléculaire » et est caractérisée par son bas coût, son universalité, et sa facilité de fabrication [75]. Les objets peuvent être assemblés sur des surfaces courbes par exemple, tout en modulant l'épaisseur des couches. En utilisant des polyélectrolytes, des distances bien définies entre les couches peuvent être obtenues. En contrôlant les interactions entre les ligands et les objets, la distance entre objets est contrôlable. Les forces entropiques, de Van der Waals, stériques, et dipolaires ainsi que les charges électriques mises en jeu, déterminent la stoechiométrie des structures.

I. A. 4. Assemblage par guidage magnétique ou électrique

L'alignement d'objets en utilisant des champs magnétiques ou électriques a également été exploré. En appliquant des forces par champ électrique ou magnétique, il est possible, par exemple, de générer des monocouches de nanoparticules à forte symétrie [76]. Les nanoparticules magnétiques peuvent être arrangées selon des structures à 1D, 2D, ou 3D en utilisant un champ magnétique fort qui induit de fortes interactions inter-particule. En général, l'application d'un champ magnétique extérieur influence le processus d'organisation ou d'arrangement des objets [77]. En changeant la direction du champ magnétique appliqué, parallèlement ou perpendiculairement au substrat, les nanostructures peuvent croître de manière directionnelle [78]. Récemment, l'assemblage de nanoparticules assisté par champ électrique a été exploré. Hermanson et al. ont introduit une nouvelle voie pour créer des fils

de longueur micrométrique à partir de l'assemblage de nanoparticules métalliques en suspension dans de l'eau et soumises à un champ électrique [79]. L'assemblage est basé sur la mobilité et les interactions de particules provoquées par des champs électriques alternatifs (diélectrophorèse). En effet, l'application d'un champ électrique alternatif permet la manipulation et l'assemblage des particules en s'affranchissant des effets électro-osmotiques ou électro-chimiques que l'on trouve dans les systèmes sous champ continu. L'inconvénient de cette gamme de techniques est qu'elles sont limitées car elles ne s'appliquent qu'aux objets chargés ou magnétiques selon le cas.

I. A. 5. Assemblage par forces capillaires

Une approche élégante pour l'assemblage d'objets est basée sur l'assemblage aux interfaces. Il s'agit d'une voie simple et rapide pour des applications à grande échelle.

L'assemblage par forces capillaires a été conduit dans un premier temps par K. Nagayama et al. [80]. Son groupe de recherche a étudié aussi bien expérimentalement que théoriquement, les forces capillaires régissant la formation d'un assemblage de particules à 2D ou à 3D pendant l'évaporation d'une goutte de solution colloïdale. Ces importants résultats ont conduit à une nouvelle vague d'études visant à améliorer la qualité, la productivité et la reproductibilité des auto-assemblages de particules à 2D ou 3D en utilisant les forces capillaires de façon à éliminer les lacunes, les dislocations, et pour contrôler le nombre de couches et augmenter la vitesse de croissance des assemblages. A titre d'exemple nous pouvons citer la technique de Langmuir-Blodgett. Cette technique permet d'auto-organiser des objets en flottaison à l'interface air/liquide par émergence progressive d'une surface plongée dans un bain de solution. L'évaporation du solvant provoque un flux de particules ou de molécules vers la ligne triple. Le retrait de cette surface crée un film mince à l'intérieur duquel les forces capillaires agissent sur les solutés. Par auto-assemblage, une monocouche est adsorbée de façon homogène avec chaque étape d'émergence, et les films peuvent donc être formés avec une épaisseur contrôlée (figure 2). La vitesse de retrait de la surface doit être équivalente à la vitesse d'évaporation de la solution colloïdale de façon à éviter les cassures dans la formation du film ce qui rend le processus assez lent.

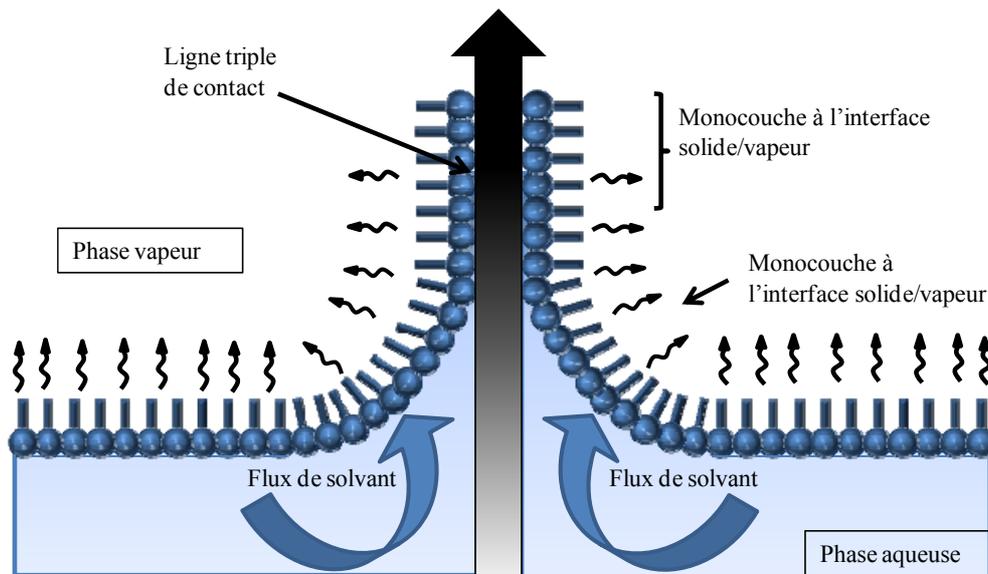


Figure 2. Assemblage par la technique de Langmuir-Blodgett : dépôt d'une monocouche flottante entre l'interface liquide/vapeur sur un solide lors du retrait de ce solide.

Il existe également une approche similaire où la goutte de solution colloïdale est confinée entre la surface d'accueil et une autre surface [81]. Lorsque l'une des deux surfaces est en déplacement, ceci engendre le déplacement de la ligne triple. Nous obtenons ainsi un meilleur contrôle du déplacement de la ligne triple sur la surface d'accueil et par conséquent un meilleur contrôle de l'assemblage en général. Ces méthodes permettent d'obtenir des couches cristallines denses à 2D ou 3D composées de particules de tailles comprises entre une dizaine de nanomètres et quelques micromètres [82].

I. B. Assemblage assisté par un support

Il apparaît que même si la chimie des solutions permet d'atteindre un certain niveau de perfection dans le processus d'auto-assemblage, cette approche est plus limitée que les techniques « top down » de lithographie conventionnelle pour la production de motifs ou structures nanométriques précises sur de larges étendues [83]. La fabrication de telles structures nécessite l'utilisation de supports pour diriger l'assemblage [84-99].

Un support ou « template » sert d'hôte aux objets permettant la création d'assemblages de structure contrôlée : c'est ce que l'on appelle l'assemblage dirigé.

Les techniques d'assemblage dirigé s'inspirent donc des méthodes d'auto-assemblage classiques (par dépôt électrophorétique, par évaporation d'un film, par retrait vertical d'un substrat immergé, par sédimentation et épitaxie colloïdale...). Ces nouveaux procédés sont dits « dirigés » car la surface et l'emplacement des zones d'assemblage sont définis préalablement par divers artifices propres à chaque technique. Dans de nombreuses approches, l'assemblage est dirigé par structuration de la surface du substrat avec des motifs physiques, chimiques ou organiques/inorganiques. Les structures physiques sont des motifs

topographiques en creux ou en relief. Les structures chimiques alternent des zones de composition chimique différente offrant soit un contraste de charge (cationique ou anionique), soit un contraste d'énergie de surface (hydrophile ou hydrophobe). Les motifs organiques ou inorganiques peuvent être des objets biologiques ou inorganiques préalablement déposés sur la surface et servant de « guide » pour l'assemblage.

I. B. 1. Supports organiques/inorganiques

La biorecognition est un moyen efficace pour contrôler l'assemblage de matériaux à l'échelle nanométrique. Des structures biologiques telles que les brins d'ADN, les peptides, les virus et les protéines sont utilisés pour l'organisation 1D de nano-objets [100]. Ici, des interactions supramoléculaires différentes telles que les interactions électrostatiques ou les liaisons hydrogène sont essentielles pour accrocher les nano-objets sur les échafaudages moléculaires de la surface. Aussi, les interactions de type antigène-anticorps, ou de type biotine-streptavidine sont utilisées fréquemment pour l'organisation des nano-objets [101]. La rigidité et la stabilité physicochimique de l'ADN permettent l'obtention de nanostructures robustes sur les surfaces. De plus, la fonctionnalisation chimique et la synthèse précise de l'ADN offrent la précision et la flexibilité requises pour moduler les nanostructures basées sur l'ADN. Par exemple, des architectures de type ADN-thiol ont été étudiées pour créer des motifs de nanoparticules d'Or sur des surfaces [102].

Les supports rigides inorganiques tels que les trous d'alumine, les nanofils inorganiques, ou les nanotubes de carbone sont également utilisés et fournissent une grande solidité pour l'assemblage de nano-objets.

I. B. 2. Assemblage capillaire dirigé par motifs chimiques

Cette technique consiste à reproduire des motifs chimiques à contraste d'énergie de surface permettant d'alterner des zones hydrophiles et des zones hydrophobes sur un substrat. Lorsque la ligne de contact d'une suspension colloïdale balaye la surface du substrat, la surface liquide mouille de manière sélective les zones hydrophiles, ce qui a pour effet de déformer localement la ligne de contact et d'inciter l'assemblage des objets dans ces régions. Ainsi, les zones hydrophiles représentent des sites préférentiels pour l'assemblage par forces de capillarité.

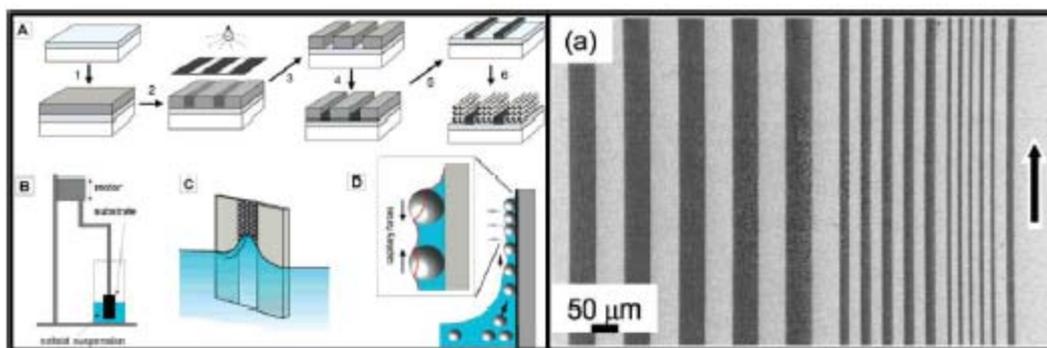


Figure 3. A gauche, fabrication de motifs chimiques par photolithographie et silanisation. A droite, image de microscopie électronique à balayage de lignes de particules de polystyrène de 250 nm sur une surface à contraste chimique par retrait vertical de la surface et mise en jeu des forces capillaires [103].

La littérature compte de nombreuses approches pour la fabrication de motifs à contraste d'énergie de surface [104-107]. La plupart des groupes de recherche qui se sont intéressés à l'assemblage par forces de capillarité dirigé par fonctionnalisation du substrat utilisent des monocouches moléculaires auto-assemblées (SAMs) [104-106]. Ces SAMs peuvent être déposées par une technique de lithographie douce. La lithographie douce repose sur l'utilisation d'un timbre élastomère, le plus souvent du polydiméthylsiloxane (PDMS). Ce matériau, liquide avant réticulation, peut reproduire la structure d'un moule présentant des motifs à sa surface. Ce matériau original permet d'imprimer des molécules sur une surface, à une échelle du micromètre au nanomètre, à des endroits localisés. En effet, par incubation du timbre en PDMS dans une solution contenant les molécules d'intérêt, la surface du timbre s'imprègne puis par simple contact entre ce timbre et un substrat, il est alors possible d'imprimer des motifs moléculaires [108]. Cette technique est connue sous le nom de microcontact printing (μ CP). Les motifs les plus petits qui aient été réalisés par microcontact mesurent 35 nm [109-110]. La résolution de cette technique est en fait limitée par la diffusion des molécules de l'encre et la déformation élastique du timbre en PDMS [111-113]. La flexibilité du timbre en PDMS autorise un contact conforme avec la surface et permet une structuration avec une haute résolution aussi bien sur des surfaces planes que des surfaces non planes. Des surfaces supérieures à 50 cm² ont pu être ainsi structurées par μ CP. Après la fabrication des motifs par μ CP, l'assemblage dirigé par forces de capillarité est effectué soit par retrait vertical d'un substrat immergé [103, 106, 114], soit par évaporation de gouttes [104, 107], ou encore par évaporation en milieu confiné [105]. Avec ces techniques, des colloïdes variés en matériaux et tailles ont été assemblés dans des motifs de diverses géométries et dimensions (Figure 3) [103, 106]. Gabor et al. ont combiné l'assemblage électrostatique à la fonctionnalisation chimique de surface de manière à localiser l'édifice moléculaire (couche par couche) sur des motifs précis. Ceci a été en particulier développé dans le cas de composés moléculaires à transition de spin [115].

En raison de sa simplicité de mise en œuvre, et de la qualité de l'assemblage qui peut être obtenu, c'est cette approche, utilisant des motifs chimiques à contraste d'énergie de surface fabriqués par lithographie par impression que nous avons retenue pour diriger l'assemblage d'un des systèmes qui a fait l'objet de cette thèse. Nous reviendrons sur cette technique plus en détail dans le chapitre 2.

I. B. 3. Assemblage dirigé par contraste de charge

L'assemblage de colloïdes dirigé par adsorption sélective sur des motifs chimiques à contraste de charge fut introduit par Aizenberg et al. [116]. Dans cette technique, les auteurs utilisent la technique de microcontact printing (μ CP), décrite dans la section précédente, afin de produire des motifs anioniques et cationiques alternés sur un substrat métallique. Celui-ci est ensuite immergé dans une suspension de particules chargées positivement ou négativement. Les colloïdes s'adsorbent sur les régions de charge opposée par attraction électrostatique et, par action des forces de capillarité d'immersion, s'auto-organisent en structures compactes. Ainsi, le groupe de recherche de Hammond [117-120] a assemblé des particules de polystyrène chargées (de 530 nm à 4,5 μ m en diamètre) en utilisant le μ CP pour reproduire des motifs alternant des régions de SAMs et des régions multicouches de polyélectrolyte. Jonas et coll. [121], quant à eux, ont utilisé des motifs silanisés obtenus par photolithographie et silanisation en phase vapeur pour induire l'adsorption sélective de colloïdes de polybutylméthacrylate (PBMA) carboxylés de 217 nm de diamètre.

I. B. 4. Assemblage capillaire dirigé par motifs topographiques

Les supports topographiques peuvent être des substrats rigides mais également des substrats souples fabriqués par une méthode de lithographie (photolithographie, lithographie par faisceau d'électrons et leurs dérivés : « step-and-flash imprint lithography » (SFIL) [37, 122-124], microtransfer molding (μ TM) [41, 125-128], micro-molding in capillary (MIMIC) [40, 129, 130], nanoimprint lithography (NIL) [38, 131-134]). Dans le cas des substrats souples, nous avons vu précédemment que le PDMS est un matériau qui peut reproduire la structure d'un moule présentant des motifs micro- ou nanométriques. Après réticulation et démoulage, ce timbre peut être utilisé directement comme support topographique pour diriger l'assemblage sur de larges étendues.

En 1996, Kim et al. ont été pionniers dans l'utilisation de motifs pour structurer des réseaux à 2D ou à 3D [135] (figure 4).

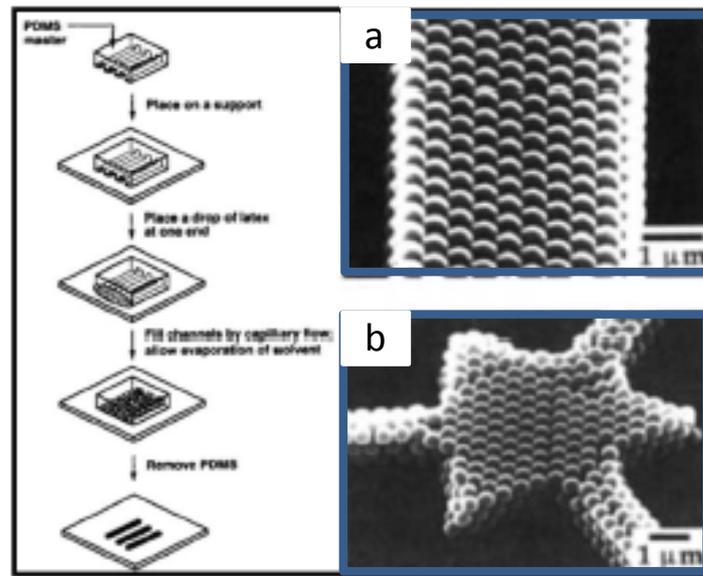


Figure 4. Exemple de réseaux cristallins de particules obtenus après assemblage dirigé par des structures topographiques à l'intérieur de canaux fluidiques [135].

Cette technique permet de créer des structures de taille et de géométrie bien définies. Dans cette approche, des motifs topographiques, généralement en creux, sont reproduits sur un substrat par une méthode de lithographie. Ensuite, une suspension colloïdale est démoillée ou évaporée sur la surface du substrat. Lorsque la ligne de contact balaye la surface du substrat, elle est localement déformée par la présence des motifs. La déformation de la ligne de contact génère des forces de capillarité qui confinent les particules dans les motifs.

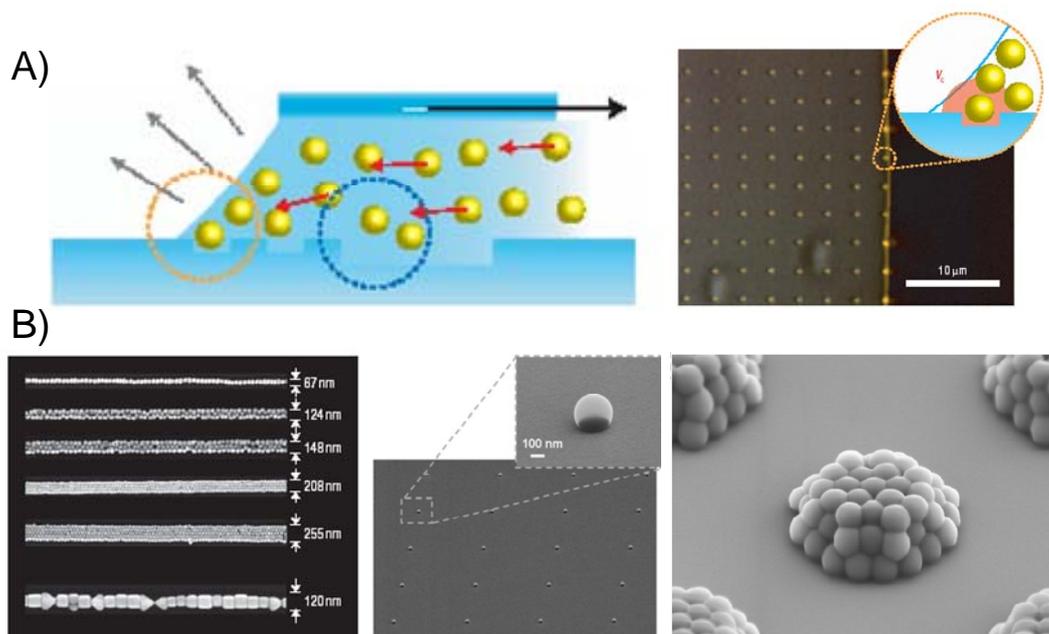


Figure 5. A. Représentation schématique de l'assemblage dirigé par démoillage forcé. Suivi in-situ de l'assemblage de particules d'or de 60 nm de diamètre. B. Images de microscopie électronique à balayage d'assemblages divers (à gauche, particules d'or de 60 nm et 120 nm de diamètre, et au centre et à droite, sphères de polystyrène de 500 nm de diamètre) [136, 137].

Dans la technique développée par Wolf et al. [136, 137], une goutte de suspension colloïdale posée sur un substrat en PDMS comportant des motifs topographiques est étirée à l'aide d'une spatule se déplaçant horizontalement. Le déplacement de la spatule induit le démouillage contrôlé de la ligne de contact et de façon contrôlée. Cet encrage haute précision permet l'obtention d'assemblages variés sur un substrat de PDMS (Figure 5). Les structures fabriquées peuvent être ensuite transférées vers un substrat en contrôlant les forces adhésives entre les particules et les différents substrats.

Un système expérimental d'assemblage capillaire a été développé et est opérationnel au LAAS. Ainsi, en raison de sa simplicité et des performances d'assemblage qui peuvent être obtenues, cette technique a été une technique de premier choix pour l'assemblage de deux des systèmes qui ont fait l'objet de cette thèse. Nous reviendrons plus en détail sur cette technique en particulier dans le Chapitre 2. 2.

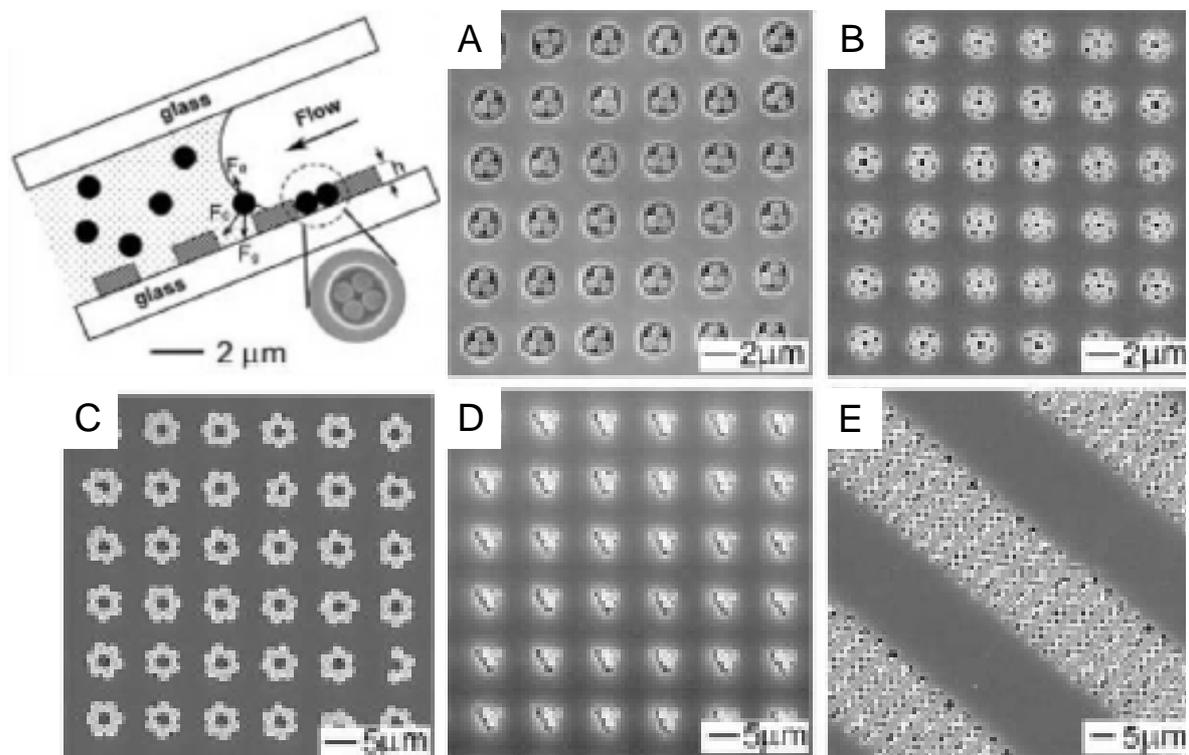


Figure 6. Assemblage par effet capillaire dirigé par des structurations topographiques confinées dans une cellule fluïdique [138]. (A-E) Images de microscopie électronique à balayage d'assemblages de sphères de polystyrène de différentes tailles et selon différentes géométries.

Xia et al. ont montré que l'assemblage pouvait avoir lieu en milieu confiné, dans une cellule microfluidique constituée de deux lamelles de verre [138]. La lamelle inférieure est structurée avec des motifs topographiques par photolithographie et la lamelle supérieure comporte une cavité permettant de remplir la cellule. Une suspension colloïdale est injectée dans la cellule ; cette dernière est légèrement inclinée de manière à inciter le démouillage de la suspension colloïdale. Les forces de capillarité engendrées par la déformation de la ligne de contact en présence des motifs pendant le démouillage du liquide entraînent les particules dans les motifs. Ainsi, le groupe de recherche de Xia a assemblé des billes de polystyrène de diamètres variés (150 nm – 2,5 μm) dans des motifs de diverses géométries et tailles [139-144] (figure 6). Le milieu confiné présente l'avantage de protéger le procédé d'assemblage du flux d'air

extérieur et d'éventuelles contaminations de la suspension colloïdale. Cependant, cette méthode rencontre des difficultés à intégrer des particules de taille inférieure à 150 nm. La méthode d'assemblage par champ électrique peut également être combinée à une structuration de surface topographique pour diriger la formation de réseaux suivant des motifs prédéfinis [104-105]. La large gamme de formes, de profondeurs, et d'orientations possibles des structures topographiques permettent un contrôle accru de l'assemblage.

Une autre technique non conventionnelle qui repose sur la capillarité est le « Dip Pen ».

I. C. La lithographie par champ proche

Parmi la nouvelle vague d'outils issus de la physique, on trouve la catégorie des techniques d'écriture sérielle dites « de champ proche ». La technologie de Nanolithographie par Dip Pen (DPN abréviation anglaise de Dip Pen Nanolithography) constitue l'une des techniques phares de cette catégorie pour le dépôt d'objets micro- ou nanométriques variés notamment biologiques sur une surface [145, 146].

La technique DPN utilise une pointe AFM encrée pour déposer des matériaux souples ou rigides (encres moléculaires, nanoparticules, sol gels) sur une surface via un ménisque de solvant avec une résolution inférieure à 50 nm [145]. Le principe de cette méthode est illustré sur la figure 7. La technique DPN est ainsi une technique souple, qui ne modifie pas mécaniquement le substrat comme le font d'autres méthodes de lithographie plus « physiques » [147] : elle utilise la capillarité comme moyen de dépôt contrôlé. Il existe plusieurs paramètres qui peuvent avoir une influence sur la taille des motifs réalisés par DPN. La température et l'humidité, par exemple, ont montré avoir une influence sur le transport de l'encre de la pointe vers la surface et jouent donc un rôle sur les dimensions finales des motifs [148, 149]. Le contrôle de l'humidité relative pourrait ainsi permettre de moduler les propriétés de surface à une échelle inférieure à 50 nm. La diffusion de surface [149, 150, 151] ainsi que la vitesse de balayage de la pointe (équivalente au temps de dépôt) [152, 153] sont également des facteurs clé qui influencent la résolution des motifs réalisés par DPN. En général, une vitesse de balayage importante produit des motifs plus réduits en taille [43, 154] ou discontinus [148, 149, 153]. En outre, le choix du substrat a une grande importance en DPN. En effet, la taille de grain du substrat peut affecter la résolution de la technique autant que la texturation d'une feuille affecterait notre écriture. L'un des avantages majeurs de cette technique est qu'elle permet à l'utilisateur de former et d'imager les nanostructures générées en une seule expérience. Ceci offre la possibilité d'entrevoir la génération de nanostructures composées de différents matériaux avec un alignement quasi-parfait. L'idée de générer des motifs multiples par DPN provient de stratégies analogues développées en lithographie électronique au travers de marques d'alignement. L'avantage du DPN est qu'il ne requiert pas l'utilisation de résine et la pointe peut être utilisée pour générer et localiser en même temps les marques d'alignement. Cet avantage est important car le DPN est moins invasif que la lithographie électronique en particulier, vis-à-vis des matériaux souples. La technique de DPN offre une haute résolution. Des réseaux de motifs de 45 nm de diamètre et de périodes comprises entre 12 nm et 100 nm peuvent être fabriqués lorsque le DPN est combiné à une technique de gravure humide [155]. La résolution peut être portée au-delà en utilisant des pointes à haut facteur de forme fabriquées à l'aide de nanotubes de carbone (NTCs) [156]. Le DPN peut être utilisé pour générer des motifs aussi bien positifs que négatifs [157, 158]. La

technique de DPN permet également le dépôt direct de nanomatériaux sur un substrat de manière flexible. L'intermédiaire pour réaliser le dépôt peut être une pointe AFM pyramidale, des pointes creuses, ou encore des pointes montées sur des leviers actionnés thermiquement. Cette technique présente une grande flexibilité de fabrication d'une diversité de structures de tailles bien définies et de façon reproductible.

Cependant, l'écriture de motifs nanométriques avec une pointe unique est un procédé lent, spécialement lorsqu'il est question de couvrir de larges étendues. Une parallélisation de la technique DPN, et plus généralement des techniques par champ proche, s'avère aujourd'hui nécessaire de façon à augmenter leur rendement. Des développements récents vers un instrument à sondes multiples requièrent que chaque sonde ou pointe soit équipée d'un système de rétro-contrôle indépendant [159-161]. Ce besoin a augmenté de façon considérable la complexité et le coût du système. Récemment, une parallélisation sur une grande surface a été possible en utilisant une conception plus simple sans l'utilisation d'asservissement à l'aide d'un réseau de 55000 pointes [162]. La procédure peut être réalisée en moins de 30 minutes ce qui est déjà une avancée majeure, mais le réseau de pointes demeure fragile et coûteux dans sa fabrication, et reste inadapté pour une utilisation de masse en industrie [159-162]. La disponibilité de combinaisons d'encre appropriées et les impacts de la diffusion des adsorbats sur la stabilité des motifs sont des domaines de recherche actuels en DPN [163]. Aussi, l'usure ou la contamination des pointes, et la réduction de la fiabilité des motifs qui en résulte, ont conduit aujourd'hui à orienter les recherches vers l'utilisation de pointes rigides, notamment en diamant [164].

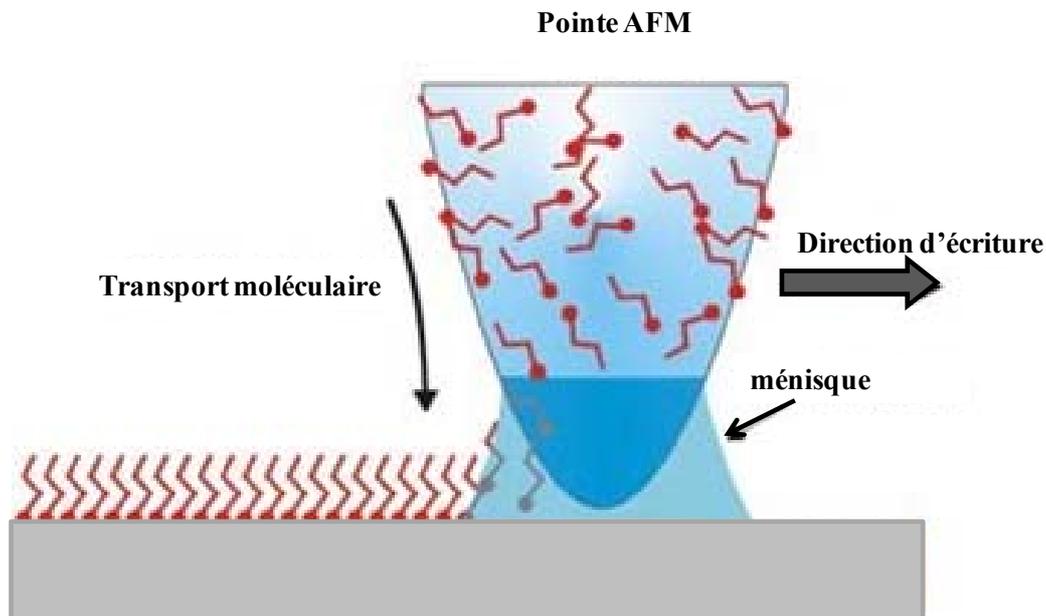


Figure 7. Principe de la technologie Dip Pen. Une pointe AFM dépose une encre moléculaire sur une surface via un ménisque de solvant.

Ainsi, dans un contexte où il est question de la recherche de techniques rapides, grande échelle et bas-coût, cette technique présente un inconvénient majeur : celui d'être une technique très lente à mettre en œuvre avec une parallélisation impliquant un surcoût non négligeable.

Nous découvrirons à la lueur de cette thèse l'analogie entre cette technique et les solutions technologiques que nous avons explorées.

I. D. Bilan

Aujourd'hui nous avons donc besoin d'une technologie non conventionnelle bas-coût qui puisse être compatible avec tous les objets d'étude : aussi bien des particules, que des objets chargés, biologiques ou inorganiques. Nous avons besoin d'une technique qui soit également flexible et modulable pour permettre un contrôle du nombre d'objets à étudier. Finalement, il faut que cette technique soit grande échelle, simple et rapide à mettre en œuvre tout en étant fiable, de façon à être compétitive et à haut rendement.

II. Positionnement des travaux

Outre les nanoparticules, d'autres objets d'intérêt sont au cœur de nombreuses études aussi bien en biologie qu'en physique.

Les objets d'étude au cœur de ce recouvrement multidisciplinaire sont très divers. De manière non exhaustive, il s'agit par exemple de nanotubes ou de nanofils métalliques. Mais également de cellules ou encore d'objets encore plus petits et élémentaires tels que les molécules individuelles (in/organique, chromophores, biomolécules comme les protéines ou l'ADN).

La cellule est le cœur de la biologie : il s'agit de la plus petite unité du vivant. De façon quelque peu réductrice, la cellule est un compartiment dans lequel un grand nombre de réactions ont lieu. Une cellule peut se mouvoir, se répliquer ou se détruire, recueillir de l'énergie ou la générer sous des formes utiles en brûlant du glucose et du dioxygène, appliquer des forces, transmettre des signaux, ressentir son environnement, l'apprivoiser, le cerner, emmagasiner ou transmettre des informations. Ces réactions forment ensemble un réseau avec des propriétés remarquables que l'on appelle 'la vie'. La science des biomolécules étudiées *ex-vivo*, en solution dans des buffers, est très avancée, tandis que la science qui étudie ces comportements au niveau cellulaire l'est moins.

La science moléculaire conventionnelle étudie et utilise des molécules en solution. La molécule unique est, en quelque sorte, la nanostructure ultime. La chimie, par nécessité, a longtemps fonctionné en se basant sur l'hypothèse selon laquelle le comportement moyen d'une molécule unique, observé sur une longue période temporelle, est le même que le comportement d'un ensemble de molécules. La sensibilité des méthodes d'analyse a été telle que seuls les ensembles pouvaient être étudiés de façon collective. La capacité croissante (basée sur les avancées récentes en matière de lasers et détecteurs) d'observer des molécules uniques en utilisant une microscopie haute résolution, et d'examiner les fluctuations dans le comportement de ces molécules sur un court laps de temps, est en train de révéler de nouvelles informations, cruciales, sur la dynamique moléculaire en biologie. Un effort

considérable a été consacré à l'observation de l'activité catalytique des enzymes car la possibilité qu'elles puissent contribuer au contrôle des voies métaboliques ou de transduction du signal est un nouvel élément à considérer dans les systèmes biologiques. Les nanostructures fonctionnelles d'étude peuvent être également des 'nanomachines biologiques' (le ribosome, le nanomoteur flagellaire de la bactérie, les complexes de réplication de l'ADN, les micromoteurs linéaires des muscles ou microtubules qui organisent la cellule et qui lui permettent de se mouvoir...) qui sont d'autres structures de la cellule remarquablement complexes et sophistiquées. Ainsi, un grand nombre de méthodes qui incluent des outils expérimentaux d'imagerie ou de détection (détection basée sur la diffraction, sur la plasmonique) ont été développées. Les microscopes confocaux, les systèmes optiques champ-proche, les microscopes Raman, sont des exemples du progrès fulgurant qui a été réalisé pour caractériser les nanostructures en utilisant la microscopie basée sur la lumière.

Pour toutes et chacune de ces études, il est désormais intéressant de rechercher des méthodes capables d'assembler ces différents objets de nature biologique sur des supports solides permettant leur analyse statique ou dynamique. L'assemblage de ces entités biologiques en réseaux ordonnés d'objets individuels est même à la base de nouvelles approches expérimentales en biologie.

Ainsi, dans le cadre de cette thèse, nous avons essayé de relever un défi ambitieux qui consiste à développer un volet technologique alternatif de nano-adressage simple et à bas-coût qui puisse permettre une organisation déterministe et minutieuse de micro- ou nano-objets uniques variés sur une surface tout en explorant le plus vaste champ applicatif possible.

Ce travail de recherche de nature applicative s'inscrit donc dans un vaste tissu de collaborations sans lesquelles peu de choses auraient été possibles.

Plus précisément, notre intérêt s'est porté vers les cellules bactériennes, les molécules d'ADN et les nanoparticules métalliques en particulier, en vue d'applications très distinctes que nous introduirons dans la suite du manuscrit. Parmi toutes les techniques précédemment énumérées, nous avons choisi l'assemblage dirigé par structuration surfacique par contraste chimique dans le cas des cellules, puis l'assemblage dirigé par structuration topographique dans le cas des molécules et des particules. Ces techniques reposent toutes deux sur l'utilisation d'un timbre en PDMS. La constante qui relie ces deux techniques est donc la lithographie douce, technique phare du groupe NanoBioSystèmes.

Dans la suite du manuscrit nous présenterons les différentes stratégies qui ont été choisies et développées puis nous aborderons ensuite les champs applicatifs explorés divisés en trois grands axes : les cellules, les molécules et les particules.

Le chapitre 2 détaillera les deux stratégies expérimentales qui ont été développées dans le cadre de cette thèse : la lithographie douce et l'assemblage dirigé sur motifs topographiques. Ce chapitre permettra au lecteur de se familiariser avec les notions importantes liées à ces deux techniques. Nous présenterons les différents mécanismes physico-chimiques mis en jeu ainsi que les différents protocoles expérimentaux. Finalement, nous ferons état des différents moyens de caractérisation utilisés dans le développement de ce travail de thèse.

Le chapitre 3 concernera la première stratégie expérimentale basée sur la lithographie douce et son application dans le cas de l'assemblage de cellules bactériennes. Dans ce chapitre axé « biopatterning », nous décrirons, étape par étape, la démarche scientifique suivie pour le dépôt contrôlé des entités biologiques, traitées et non traitées, sur une surface à haute

résolution, tout en préservant leur viabilité. Nous présenterons ensuite les études de nanomécanique réalisées sur cellule unique par microscopie à force atomique.

Les chapitres 4 et 5 concerneront, quant à eux, la deuxième stratégie développée dans le cas de l'assemblage de molécules d'ADN puis dans le cas de l'assemblage de nanoparticules métalliques respectivement. Ce deuxième volet expérimental est basé sur l'assemblage capillaire dirigé sur motifs topographiques. Le chapitre 4 présentera l'assemblage de brins d'ADN permettant leur peignage organisé sur une surface. Nous démontrerons ensuite la versatilité de cette méthodologie au travers de différentes études complémentaires ainsi que les applications directes que ce type de substrats permet d'entrevoir. Le chapitre 5 démontrera comment les forces capillaires combinées à la technique de lithographie douce peuvent être également exploitées pour la fabrication de réseaux ordonnés de nanoparticules pour des applications dans le domaine de la détection biologique et des capteurs. En effet, nous étudierons les propriétés optiques de ces substrats par spectroscopie Raman puis optique. Nous mettrons en évidence les propriétés remarquables de ce type de substrats pour la détection de molécules à faible concentration. Nous discuterons des différentes extensions et applications de cette méthode ainsi que des différentes collaborations nées à l'issue de ces résultats.

Ces démonstrateurs applicatifs s'inscrivent au sein de projets soutenus par l'ITAV (Institut des Technologies Avancées pour les sciences du Vivant) et par la commission européenne.

III. Références

- [1] G. M. Whitesides, *Nature Biotechnology* (**2003**), 21, 1161 – 1165.
- [2] G. E. Moore, *Electronics* (**1965**), 38(8), 114–118.
- [3] B. Yu, M. Meyyappan, *Solid State Electron.* (**2006**), 50(4), 536–544.
- [4] W. M. Moreau, *Semiconductor lithography: principles, practices, and materials (microdevices)*, 1st ed., **1988**, (Springer, New York), 952.
- [5] G. M. Whitesides, C. J. Love, *Sci. Am.* (**2001**), 285(3), 38–48.
- [6] K. Ronse, *C. R. Phys.* (**2006**), 7(8), 844–857.

- [7] M. Rothschild, *Materials Today* (2005), 8(2), 18–24.
- [8] T. R. Grover, D. Pickard, B. Rafferty, N. Crosland, D. Adam, G. Schubert, *Microelectron. Eng.* (2002), 61–62, 285–293.
- [9] V. A. Zlobin, *Proc. SPIE* (2005), 5824, 23–32.
- [10] B. E. Deal, J. M. Early, *J. Electrochem. Soc.* (1979), 126(1), 20C–32C.
- [11] G. M. Wallraff, W. D. Hinsberg, *Chem. Rev.* (1999), 99(7), 1801–1821.
- [12] S. Hector, *AIP Conf. Proc.* (2005), 788(60), 359–368.
- [13] C. A. Mirkin, *ACS Nano* (2007), 1, 79.
- [14] K. Salaita, Y. H. Wang, C. A. Mirkin, *Nat. Nanotechnol.* (2007), 2, 145.
- [15] D. S. Ginger, H. Zhang, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2004), 43, 30.
- [16] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* (1998), 37(5), 550–575.
- [17] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Mater. Sci.* (1998), 28, 153.
- [18] M. Qi, et al., *Nature* (2004), 429, 538.
- [19] M. J. Madou, *Fundamentals of microfabrication: the science of miniaturization*. Second ed., 2002 (CRC Press, Boca Raton, Florida).
- [20] G. M. Blumenstock, C. Meinert, N. R. Farrar, A. Yen, *Proc. SPIE* (2005), 5645, 188–195.
- [21] The international technology roadmap for semiconductors: 2006 update (www.itrs.net). In 2006.
- [22] www.asml.com/. In 2006.
- [23] R. L. Gerlach, M. Utlaut, *Proc. SPIE* (2001), 4510, 96–106.
- [24] J. Melngailis, *Nucl. Instrum. Meth. B* (1993), 80–81(2), 1271–1280.
- [25] A. A. Bettiol, T. C. Sum, F. C. Cheong, C. H. Sow, S. V. Rao, J. A. van Kan, E. J. Teo, K. Ansari, F. Watt, *Nucl. Instrum. Meth. B* (2005), 231(1–4), 364–371.
- [26] G. Owen, *Rep. Prog. Phys.* (1985), 48(6), 795–851.
- [27] E. Forsen, S. G. Nilsson, P. Carlberg, G. Abadal, F. Perez-Murano, J. Esteve, J. Montserrat, E. Figueras, F. Campabadal, J. Verd, L. Montelius, N. Barniol, A. Boisen, *Nanotechnol.* (2004), 15(10), S628–S633.

- [28] T. K. S. Wong, S. Gao, X. Hu, H. Liu, Y. C. Chan, Y. L. Lam, *Mat. Sci. Eng. B-Solid* (1998), 55(1–2), 71–78.
- [29] C. Schomburg, B. Hofflinger, R. Springer, R. WijnaendtsvanResandt, *Microelectron. Eng.* (1997), 35(1–4), 509–512.
- [30] C. Vieu, F. Carcenac, A. Pepin, Y. Chen, M. Mejias, A. Lebib, L. Manin-Ferlazzo, L. Couraud, H. Launois, *Appl. Surf. Sc.* (2000), 164(1–4), 111–117.
- [31] K. Yamazaki, H. Namatsu, *Jpn. J. Appl. Phys.* (2004), 43(6B), 3767–3771.
- [32] M. J. Word, I. Adesida, P. R. Berg, *J. Vac. Sci. Technol. B* (2003), 21(6), L12–L15.
- [33] M. Isaacson, A. Murray, *J. Vac. Sci. Technol.* (1981), 19(4), 1117–1120.
- [34] R. L. Kubena, J. W. Ward, F. P. Stratton, R. L. Joyce, G. M. Atkinson, *J. Vac. Sci. Technol. B.* (1991), 9(6), 3079–3083.
- [35] J. Gierak, C. Vieu, M. Schneider, H. Launois, G. Ben Assayag, A. Septier, *J. Vac. Sci. Technol. B* (1997), 15(6), 2373–2378.
- [36] L. J. Myron, L. Gershtein, G. Gottlieb, B. Burkhardt, A. Griffiths, D. Mellenthin, K. Rentzsch, S. MacDonald, G. Hughes, *Proc. SPIE* (2005), 5752, 384–391.
- [37] V. N. Truskett, M. P. C. Watts, *Trends Biotechnol.* (2006), 24(7), 312–317.
- [38] S. Y. Chou, P. R. Krauss, P. J. Renstrom, *Appl. Phys. Lett.* (1995), 67(21), 3114–3116.
- [39] S. Matsui, Y. Igaku, H. Ishigaki, J. Fujita, M. Ishida, Y. Ochiai, H. Namatsu, M. Komuro, *J. Vac. Sci. Technol. B* (2003), 21(2), 688–692.
- [40] E. Bystrenova, M. Facchini, M. Cavallini, M. G. Cacace, F. Biscarini, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2006), 45(29), 4779–4782.
- [41] X. M. Zhao, Y. Xia, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* (1996), 8(10), 837–840.
- [42] J. A. Rogers, R. G. Nuzzo, *Mater. Today* (2005), 8(2), 50–56.
- [43] R. D. Piner, J. Z. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin, *Science* (1999), 283(5402), 661–663.
- [44] G. J. Leggett, *Chem. Soc. Rev.* (2006), 35(11), 1150–1161.
- [45] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* (1982), 99(2), 237–247.
- [46] X. F. Wu, Y. A. Dzenis, *J. Chem. Phys.* (2006), 125(17), 174707/ 1–174707/10.
- [47] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* (2005), 105(4), 1103–1170.

- [48] W. Conley, J. Bendik, *Proc. SPIE* (2004), 5376, 16–20.
- [49] T. A. Brunner, *J. Vac. Sci. Technol. B.* (2003), 21(6), 2632–2637.
- [50] J. M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.* (1990), 29(11), 1304–1319.
- [51] S. Leininger, B. Olenyuk, P. J. Stang, *Chem. Rev.* (2000), 100(3), 853–907.
- [52] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. Seto, *Science* (1991), 254(5036), 1312–1319.
- [53] M. Brucale, G. Zuccheri, B. Samori, *Trends Biotechnol.* (2006), 24(5), 235–243.
- [54] M. J. Fasolka, A. M. Mayes, *Annu. Rev. Mater. Res.* (2001), 31, 323–355.
- [55] C. Lin, Y. Liu, S. Rinker, H. Yan, *ChemPhysChem* (2006), 7(8), 1641–1647.
- [56] G. A. Ozin, S. M. Yang, *Adv. Funct. Mater.* (2001), 11(2), 95–104.
- [57] N. C. Seeman, P. S. Lukeman, *Rep. Prog. Phys.* (2005), 68(1), 237–270.
- [58] Y. Yin, Y. Lu, B. Gates, Y. Xia, *J. Am. Chem. Soc.* (2001), 123(36), 8718–8729.
- [59] G. M. Whitesides, B. Grzybowski, *Science* (2002), 295(5564), 2418–2421.
- [60] S. Kinge, M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, *Chem. Phys. Chem.* (2008), 9, 20–42.
- [61] a) N. D. Denkov, O. D. Velev, P. A. Kralchevsky, I. B. Ivanov, H. Yoshimura, K. Nagayama, *Nature* (1993), 361, 26; b) P. Kralchevsky, K. Nagayama, *Langmuir* (1994), 10, 23–36.
- [62] L. Motte, F. Billoudet, D. Thiaudière, A. Naudon, M. P. Pileni, *J. Phys. III* (1997), 5, 517–527.
- [63] a) S. W. Chung, D. S. Ginger, M. W. Morales, Z. F. Zhang, V. Chandrasekhar, M. A. Ratner, C. A. Mirkin, *Small* (2005), 1, 64–69; b) S. T. Liu, R. Maoz, J. Sagiv, *Nano Lett.* (2004), 4, 845–849; c) J. Fendler, *Chem. Mater.* (2001), 13, 3196–3210.
- [64] H. X. He, H. Zhang, Q. G. Li, T. Zhu, S. F. Y. Li, Z. F. Liu, *Langmuir* (2000), 16, 3846–3851.
- [65] X. M. Li, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *J. Mater. Chem.* (2004), 14, 2954–2971.
- [66] H. Zhang, K. B. Lee, Z. Li, C. A. Mirkin, *Nanotechnology* (2003), 14, 1113–1117.
- [67] a) V. Mahalingam, S. Onclin, M. Peter, B. J. Ravoo, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* (2004), 20, 11756–11762; b) A. Mulder, S. Onclin, M. Peter, J. P. Hoogenboom, H. Beijleveld, J. ter Maar, M. F. Garcia-Parajo, B. Ravoo, J. Huskens, N. F. van Hulst, D. N. Reinhoudt, *Small* (2005), 1, 242–253; c) A. Mulder, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Org. Biomol. Chem.* (2004), 2, 3409–3424; d) O. Crespo-Biel, A. Jukovi, M. Karlsson, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Isr. J. Chem.* (2005), 45, 353–362.

- [68] a) H. Mattoussi, M. F. Rubner, F. Zhou, J. Kumar, S. K. Tripathy, L. Y. Chiang, *Appl. Phys. Lett.* (2000), 77, 1540–1542; b) D. S. Koktysh, X. Liang, B. G. Yun, I. Pastoriza-Santos, R. L. Matts, M. Giersig, C. Serra-Rodriguez, L. M. Liz-Marza'n, N. A. Kotov, *Adv. Funct. Mater.* (2002), 12, 255–265.
- [69] G. Decher, *Science* (1997), 277, 1232–1237.
- [70] R. K. Iler, *J. Colloid Interface Sci.* (1966), 21, 569–594.
- [71] a) A. Kotov, I. De'ka'ny, J. H. Fendler, *J. Phys. Chem.* (1995), 99, 13065–13069; b) F. Caruso, H. Mçhwald, *Langmuir* (1999), 15, 8276–8281; c) T. Sennerfors, G. Bogdanovic, F. Tilber, *Langmuir* (2002), 18, 6410–6415.
- [72] E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. A. Devis, H. Mçhwald, *Angew. Chem.* (1998), 110, 2323–2327; *Angew. Chem. Int. Ed.* (1998), 37, 2201–2205.
- [73] a) F. G. Aliev, M. A. Correa-Duarte, A. Mamedov, J. W. Ostrander, M. Giersig, L. Z. Liz-Marza'n, N. A. Kotov, *Adv. Mater.* (1999), 11, 1006–1010; b) F. Caruso, M. Spasova, A. Susha, M. Giersig, R. A. Caruso, *Chem. Mater.* (2001), 13, 109–116.
- [74] S. W. Keller, H. N. Kim, T. E. Mallouk, *J. Am. Chem. Soc.* (1994), 116, 8817–8818.
- [75] a) M. Giersig, M. Hilgendorff, *J. Phys. D* (1999), 32, L111–L113; b) M. Hilgendorff in *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* (Ed.: H. Nalwa), American Scientific, Stevenson Ranch, 2004, 213–233.
- [76] D. Lacoste, T. C. Lubensky, *Phys. Rev. E* (2001), 64, 41506–41 514.
- [77] Y. Chushkin, L. Chitu, S. Luby, E. Majkova, A. Satka, V. Holy, J. Ivan, M. Giersig, M. Hilgendorff, T. Metzger, O. Konovalov, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* (2005), 877E, S 6.18.
- [78] a) K. D. Hermanson, S. O. Lumsdon, J. P. Williams, E. W. Kaler, O. D. Velev, *Science* (2001), 294, 1082–1086; b) J. Sun, Z. Guo, C. Wang, N. Gu, *ChemPhysChem* (2005), 6, 2485–2488; c) N. Ranjan, H. Vinzelberg, M. Mertig, *Small* (2006), 2, 1490–1496.
- [79] A. S. Dimitrov, K. Nagayama, *Langmuir* (1996), 12, 1303–1311.
- [80] B. G. Prevo, O. D. Velev, *Langmuir* (2004), 20(6), 2099–2107.
- [81] A. D. Ormonde, E. C. M. Hicks, J. Castillo, R. P. Van Duyne, *Langmuir* (2004), 20(16), 6927–6931.
- [82] B. Gates, D. Qin, Y. Xia, *Adv. Mat.* (1999), 11(6), 466–469.
- [83] B. D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C. G. Willson, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* (2005), 105(4), 1171–1196.
- [84] R. A. Segalman, H. Yokoyama, E. J. Kramer, *Adv. Mater.* (2001), 13(15), 1152–1155.

- [85] J. Y. Cheng, C. A. Ross, E. L. Thomas, H. I. Smith, G. J. Vancso, *Appl. Phys. Lett.* (2002), 81(19), 3657–3659.
- [86] D. Sundrani, S. B. Darling, S. J. Sibener, S. J. *Nano Lett.* (2004), 4(2), 273–276.
- [87] J. Y. Cheng, A. M. Mayes, C. A. Ross, *Nat. Mater.* (2004), 3(11), 823–828.
- [88] V. P. Chuang, J. Y. Cheng, T. A. Savas, C. A. Toss, *Nano Lett.* (2006), 6(10), 2332–2337.
- [89] J. Heier, E. J. Kramer, S. Walheim, G. Krausch, *Macromolecules* (1997), 30(21), 6610–6614.
- [90] R. D. Peters, X. M. Yang, T. K. Kim, P. F. Nealey, *Langmuir* (2000), 16(24), 9620–9626.
- [91] J. Heier, J. Genzer, E. J. Kramer, F. S. Bates, S. Walheim, G. Krausch, *J. Chem. Phys.* (1999), 111(24), 11101–11110.
- [92] P. Mansky, T. P. Russell, C. J. Hawker, M. Pitsikalis, J. Mays, *Macromolecules* (1997), 30(22), 6810–6813.
- [93] E. Huang, T. P. Russell, C. Harrison, P. M. Chaikin, R. A. Register, C. J. Hawker, J. Mays, *Macromolecules* (1998), 31(22), 7641–7650.
- [94] S. Ouk Kim, H. H. Solak, M. P. Stoykovich, N. J. Ferrier, J. J. de Pablo, P. F. Nealey, P. F. *Nature* (2003), 424 (6947), 411–414.
- [95] S. Ouk Kim, B. Hoon Kim, K. Kim, C. Min Koo, M. P. Stoykovich, P. F. Nealey, H. H. Solak, *Macromolecules* (2006), 39(16), 5466–5470.
- [96] J. P. Hoogenboom, C. Rétif, E. de Bres, M. van de Boer, A. K. van Langer-Suurling, J. Romijn, A. Blaaderen, *Nano Lett.* (2004), 4(2), 205–208.
- [97] A. van Blaaderen, R. Ruel, P. Wiltzius, *Nature* (1997), 385(6614), 321–324.
- [98] B. J.-Y. Tan, C.-H. Sow, K.-Y. Lim, F.-C. Cheong, G.-L. Chong, A. T.-S. Wee, C.-K. Ong, *J. Phys. Chem. B* (2004), 108(48), 18575–18579.
- [99] M. E. Kiziroglou, X. Li, D. C. Gonzalez, C. H. de Groot, A. A. Zhukov, P. A. J. de Groot, P. N. Bartlett, *J. Appl. Phys.* (2006), 100(11), 113720/1–113720/5.
- [100] S. Mann, W. Shenton, M. Li, S. Connolly, D. Fitzmaurice, *Adv. Mater.* (2000), 12, 147–150.
- [101] C. Niemeyer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2000), 4, 609–618.
- [102] J. Sharma, R. Chhabra, Y. Liu, Y. Ke, H. Yan, *Angew. Chem.* (2006), 118, 744–749; *Angew. Chem. Int. Ed.* (2006), 45, 730–735.

- [103] C.-A. Fustin, G. Glasser, H. W. Spiess, U. Jonas, *Langmuir* (2004), 20(21), 9114-9123.
- [104] F. Fan, K. J. Stebe, *Langmuir* (2004), 20(8), 3062-3067.
- [105] A. M. Brozell, M. A. Muha, A. N. Parikh, *Langmuir* (2005), 21(25), 11588-11591.
- [106] P. Maury, M. Escalante, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Adv. Mat.* (2005), 17, 2718-2723.
- [107] Q. Guo, C. Arnoux, R. E. Palmer, *Langmuir* (2001), 17(22), 7150-7155.
- [108] A. Kumar, G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* (1993), 63(14), 2002-2004.
- [109] J. L. Wilbur, A. Kumar, E. Kim, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* (1994), 6(7-8), 600-604.
- [110] H. A. Biebuyck, N. B. Larsen, E. Delamarche, B. Michel, *IBM J. Res. Dev.* (1997), 41(1-2), 159-170.
- [111] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* (1995), 7(5), 471-473.
- [112] Delamarche, E., Schmid, H., Michel, B., and Biebuyck, H. *Adv. Mater.*, 1997, 9(9), 741-746.
- [113] Hui, C. Y., Jagota, A., Lin, Y. Y., and Kramer, E. J. *Langmuir*, 2002, 18(4), 1394-1407.
- [114] C.-A. Fustin, G. Glasser, H. W. Spiess, U. Jonas, *Adv. Mat.* (2003), 15(12), 1025-1028.
- [115] G. Molnar, S. Cobo, J. A. Real, F. Carcenac, E. Daran, C. Vieu, A. Bousseksou, *Adv. Mater.* (2007), 19, 2163
- [116] J. Aizenberg, P. V. Braun, P. Wiltzius, *Phys. Rev. Lett.* (2000), 84(13), 2997-3000 ; J. Aizenberg, *Adv. Mat.* (2004), 16(15), 1295-1302 ; J. Aizenberg, A. J. Black, G. M. Whitesides, *Nature* (1999), 398, 495-498.
- [117] K. M. Chen, X. Jiang, L. C. Kimerling, P. T. Hammond, *Langmuir* (2000), 16(20), 7825-7834.
- [118] I. Lee, H. Zheng, M. F. Rubner, P. T. Hammond, *Adv. Mat.* (2002), 14(8), 572-577.
- [119] H. Zheng, I. Lee, M. F. Rubner, P. T. Hammond, *Adv. Mat.* (2002), 14(8), 569-572.
- [120] H. Zheng, M. F. Rubner, P. T. Hammond, *Langmuir* (2002), 18(11), 4505-4510.
- [121] U. Jonas, A. del Campo, C. Krüger, G. Glasser, D. Boos, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2002), 99(8), 5034-5039.

- [122] D. Bratton, D. Yang, J. Dai, C. K. Ober, *Polym. Adv. Technol.* (**2006**), 17(2), 94–103.
- [123] M. Colburn, S. Johnson, M. Stewart, S. Damle, T. Bailey, B. Choi, M. Wedlake, T. Michaelson, S. V. Sreenivasan, J. Ekerdt, C. G. Willson, *Proc. SPIE* (**1999**), 3676, 379–389.
- [124] N. V. Le, W. J. Dauksher, K. A. Gehoski, K. J. Nordquist, E. Ainley, P. Mangat, *Microelectron. Eng.* (**2006**), 83(4–9), 839–842.
- [125] C. N. LaFratta, L. Li, J. T. Fourkas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**2006**), 103(23), 8589–8594.
- [126] C. Thibault, C. Severac, E. Trévisiol, C. Vieu, *Microelectron. Eng.* (**2006**), 83(4–9), 1513–1516.
- [127] X.-M. Zhao, Y. Xia, G. M. Whitesides, *J. Mater. Chem.* (**1997**), 7(7), 1069–1074.
- [128] J.-H. Lee, C.-H. Kim, K.-M. Ho, K. Contant, *Adv. Mater.* (**2005**), 17(20), 2481–2485.
- [129] E. Kim, Y. Xia, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* (**1996**), 118(24), 5722–5731.
- [130] E. Kim, Y. Xia, G. M. Whitesides, *Nature* (**1995**), 376(6541), 581–584.
- [131] A. A. Yasserli, S. Sharma, T. I. Kamins, Q. Xia, S. Y. Chou, R. F. W. Pease, *Appl. Phys. Lett.* (**2006**), 89(15), 153121/1–153121/3.
- [132] H. Schiff, A. Kristensen, Nanoimprint Lithography. In *Springer Handbook of Nanotechnology*, Bhushan, B., Ed., **2007** (Springer, New York), 239–278.
- [133] L. J. Guo, *J. Phys. D: Appl. Phys.* (**2004**), 37(11), R123–R141.
- [134] D. J. Wagner, A. H. Jayatissa, *Proc. SPIE* (**2005**), 6002, 136–144.
- [135] E. Kim, Y. Xia, G. M. Whitesides, *Adv. Mat.* (**1996**), 8(3), 245–247.
- [136] T. Kraus, L. Malaquin, E. Delamarche, H. Schmid, N. D. Spencer, H. Wolf, *Adv. Mat.* (**2005**), 17, 2438–2442.
- [137] T. Kraus, L. Malaquin, H. Schmid, W. Riess, N. D. Spencer, H. Wolf, *Nature Nanotechnol.* (**2007**), 2, 570–576.
- [138] Y. Xia, Y. Yin, Y. Lu, J. Mclellan, *Adv. Func. Mat.* (**2003**), 13, 907–918.
- [139] Y. Yin, Y. Lu, B. Gates, Y. Xia, *JACS* (**2001**), 123(36), 8718–8729.
- [140] Y. Lu, Y. Yin, Y. Xia, *Adv. Mat.* (**2001**), 13(1), 34–37.
- [141] Y. Yin, Y. Lu, Y. Xia, *JACS* (**2001**), 123(4), 771–772.

- [142] Y. Yin, Y. Lu, Y. Xia, *Journal of Materials Chemistry* (2001), 11, 987-989.
- [143] Y. Yia, Y. Xia, *Adv. Mat.* (2001), 13(4), 267-271.
- [144] Y. Yin, Y. Xia, *JACS* (2003), 125(8), 2048-2049.
- [145] D. S. Ginger, H. Zhang, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2004), 43(1), 30-45.
- [146] R. Garcia, R. V. Martinez, J. Martinez, *Chem. Soc. Rev.* (2006), 35(1), 29-38.
- [147] Y.-J. Chen, J.-H. Hsu, H.-N. Lin, *Nanotechnol.* (2005), 16(8), 1112-1115.
- [148] S. Rozhok, R. Piner, C. A. Mirkin, *J. Phys. Chem. B* (2003), 107(3), 751-757.
- [149] P. V. Schwartz, *Langmuir* (2002), 18(10), 4041-4046.
- [150] P. E. Sheehan, L. J. Whitman, *Phys. Rev. Lett.* (2002), 88(15), 156104/1-156104/4.
- [151] E. Antoncik, *Surf. Sci.* (2005), 599(1-3), L369-L371.
- [152] J. R. Hampton, A. A. Dameron, P. S. Weiss, *J. Phys. Chem. B* (2005), 109(49), 23118-23120.
- [153] J. Jang, S. Hong, G. C. Schatz, M. A. Ratner, *J. Chem. Phys.* (2001), 115(6), 2721-2729.
- [154] B. L. Weeks, A. Noy, A. E. Miller, J. J. De Yoreo, *Phys. Rev. Lett.* (2002), 88(25), 255505/1-255505/4.
- [155] H. Zhang, S.-W. Chung, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* (2003), 3(1), 43-45.
- [156] H. Dai, N. Franklin, J. Han, *Appl. Phys. Lett.* (1998), 73(11), 1508-1510.
- [157] J. Hyun, J. Kim, S. L. Craig, A. Chilkoti, *J. Am. Chem. Soc.* (2004), 126(15), 4770-4771.
- [158] K. S. Salaita, S. W. Lee, D. S. Ginger, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* (2006), 6(11), 2493-2498.
- [159] M. Lutwyche, C. Andreoli, G. Binnig, J. Brugger, U. Drechsler, W. Häberle, H. Rohrer, H. Rothuizen, P. Vettiger, G. Yaralioglu, C. Quate, *Sens. Actuators A* (1999), 73(1-2), 89-94.
- [160] S. C. Minne, J. D. Adams, G. Yaralioglu, S. R. Manalis, A. Atalar, C. F. Quate, *Appl. Phys. Lett.* (1998), 73(12), 1742-1744.
- [161] P. Vettiger, J. Brugger, M. Despont, U. Drechsler, U. Dürig, W. Häberle, M. Lutwyche, H. Rothuizen, R. Studz, R. Widmer, G. Binnig, *Microelectron. Eng.* (1999), 46(1-4), 11-17.

- [162] K. Salaita, Y. Wang, J. Fragala, R. A. Vega, C. Liu, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2006), 45(43), 7220–7223.
- [163] D. Wouters, U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2004), 43(19), 2480–2495.
- [164] K.-H. Kim, N. Moldovan, C. Ke, H. D. Espinosa, X. Xiao, J. A. Carlisle, O. Auciello, *Small* (2005), 1(8–9), 866–874.

Chapitre 2

Aspects technologiques de l'intégration de nano-objets sur une surface structurée

Dans le cadre de cette thèse nous avons souhaité assembler et organiser différentes entités sur une surface pour différentes applications. Le présent chapitre expose les deux principales stratégies qui ont été retenues suivant les cas étudiés. Ainsi, dans le cas des cellules, nous avons développé une méthodologie combinant une technique de lithographie douce, le microcontact printing, suivi d'une simple incubation afin d'obtenir une double fonctionnalisation de la surface d'accueil avec un contraste hydrophile/hydrophobe. Ensuite, pour l'étude concernant les molécules d'ADN ainsi que pour celle concernant les particules métalliques, nous avons eu recours à une deuxième stratégie combinant la technique de lithographie douce et une technique d'assemblage capillaire dirigé. Les deux stratégies ainsi développées et optimisées, permettent toutes deux d'obtenir des organisations contrôlées d'objets micrométriques ou nanométriques sur une large étendue et avec une très bonne reproductibilité.

Chapter 2

Technological aspects relative to the integration of nano-objects on a patterned surface

In the frame of this Ph.D. thesis, our objective was to organize different objects onto a surface for various applications. The present chapter presents the two main strategies that were selected depending on the cases studied. In the case of cells, we developed a methodology combining a soft-lithography technique, microcontact printing, with a simple incubation technique to chemically engineer the surface with hydrophilic/hydrophobic contrast. Then, for the study regarding DNA molecules as for the study related to metallic nanoparticles, we resorted to a second strategy: a methodology combining again soft-lithography but this time with a directed capillary assembly technique. The two strategies developed and optimized both allow obtaining controlled assemblies of micrometric or nanometric objects over large areas and with very good reproducibility.

I. Première méthodologie : le contraste chimique

I. A. La fonctionnalisation chimique de surface

La modification idéale des propriétés chimiques superficielles d'un substrat passe souvent par le dépôt d'un film monomoléculaire. Cette méthode présente l'avantage d'être compatible avec de nombreux procédés de microfabrication.

Les films monomoléculaires auto-organisés ou SAMs (Self-Assembled Monolayers) sont fixés de manière covalente à la surface par chimisorption ce qui leur confère une forte résistance. Ils peuvent être réalisés par dépôt en phase liquide ou en phase gazeuse. La formation de ces films moléculaires est gouvernée par une thermodynamique assurant la formation de monocouches stables et solides. Sur une surface plane et bien préparée, ils présentent l'avantage de former des revêtements homogènes quasiment exempts de tout défaut de couverture. On obtient ainsi des zones dont la réactivité chimique peut être contrôlée par le choix des molécules greffées. Combinée aux méthodes de lithographie, la fonctionnalisation des surfaces par des monocouches moléculaires permet la réalisation de surfaces présentant des contrastes chimiques abrupts. On parle alors d'ingénierie chimique des surfaces. Les molécules utilisées pour former ces couches possèdent une structure permettant **un greffage covalent à la surface** du substrat. On parle de groupement d'accroche ou de tête greffante, **un arrangement ordonné sur la surface** par interactions de Van der Waals entre les chaînes alkyles $-(CH_2)_n-$ ou fluorés $-(CF_2)_n-$ qui les constituent, et **l'apparition d'une terminaison chimique contrôlée**, située à l'opposé de la tête greffante contrôle la réactivité finale du substrat revêtu (voir fig. 1). Le contrôle de la longueur de la chaîne reliant la tête greffante au groupement de surface permet d'ajuster l'épaisseur de la couche produite ainsi que l'éloignement du groupe de surface par rapport à la surface (ingénierie des encombrements stériques).

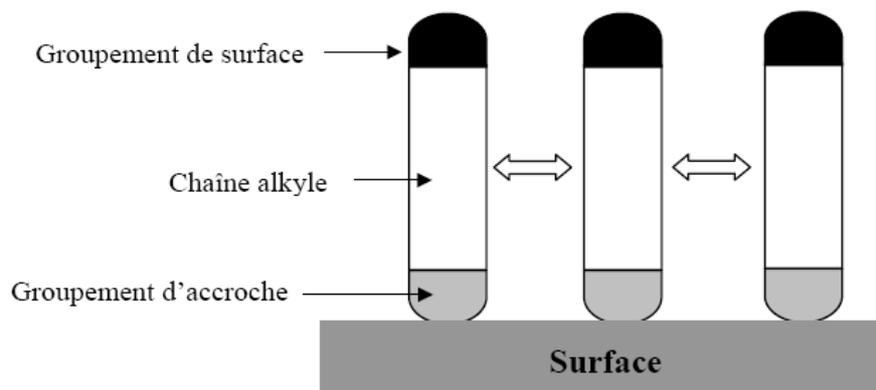


Figure 1. Schéma présentant le greffage de molécules de type alcane formant des SAMs

Les interactions d'accroche sur le substrat sont de différents types : on peut citer à titre d'exemple la réaction des thiols (R-SH) avec une surface métallique telle que l'or mais aussi les réactions de silanisation qui permettent l'accroche de molécules appelées silanes possédant un atome de Si avec des surfaces terminées par des groupements hydroxyles (-OH).

Les substrats SiO_2 ou Si étant favorables à la présence de groupements hydroxyles, les silanes sont les candidats idéaux pour traiter les lames de verre de la biologie ou les substrats monocristallins de la microélectronique.

Comme cela est illustré sur la figure 2, R_n (avec $n = 1, 2, 3$) est soit un groupement d'accroche facilement hydrolysable qui servira à la création de liaisons Si-O-Si utiles au greffage des molécules sur la surface, soit un groupe alkyl quelconque ($-\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$) n'entrant pas en jeu dans l'étape de greffage.

Selon le nombre de groupements hydrolysables nous parlons de molécules tri- (trois groupements hydrolysables), bi- (deux groupements hydrolysables) ou monofonctionnelles (un seul groupement hydrolysable). La différence entre ces trois groupes de silanes est le nombre de liaisons covalentes possible entre la molécule et la surface ou entre les molécules entre elles au cours du greffage. On comprend facilement que le greffage sera d'autant plus robuste que chaque liaison sera énergétique et que leur nombre sera grand.

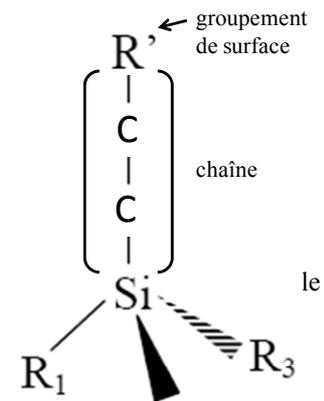


Figure 2. Formule générale d'un silane.

Les silanes majoritairement utilisés pour fonctionnaliser les surfaces de SiO_2 sont les trichlorosilanes ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{Cl}$), les triméthoxysilanes ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OCH}_3$) et les triéthoxysilanes ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OC}_2\text{H}_5$). De chacune de ces trois catégories, les silanes que nous avons utilisés dans le cadre de cette thèse sont l'OctadécylTrichloroSilane (OTS), le 3-Glycidoxypropyl-triméthoxysilane (silane époxyde) et le (3-AminoPropyl)TriÉthoxySilane (APTES) respectivement.

En effet, l'OTS est un alkylsilane ayant une longue chaîne aliphatique (18 atomes de carbone) dont la terminaison méthyle permet de passiver les surfaces en leur conférant un caractère hydrophobe (angle de contact égal à 110°). De plus, la faible énergie de liaison Si-Cl ($E_{\text{liaison}}(\text{Si-Cl}) = 380 \text{ kJ/mol}$) confère à cette molécule silane l'avantage de subir une condensation plus rapide et meilleure sur les surfaces de SiO_2 : les surfaces ne présentent donc aucun comportement à dépendance temporelle. Cependant, les molécules d'OTS ont tendance à diffuser et la forte réactivité de la liaison Si-Cl à l'hydrolyse rend l'OTS très sensible aux traces d'eau. En ce qui concerne le silane époxyde, malgré une $E_{\text{liaison}}(\text{Si-O}) = 110 \text{ kJ/mol} < E_{\text{liaison}}(\text{Si-Cl})$, l'élaboration de monocouches d'époxyde a l'avantage d'être facilement reproductible et s'avère en pratique moins délicate que celle d'OTS. Finalement, l'APTES quant à lui est un silane trifonctionnel constitué de trois groupements d'accroche éthoxy ($-\text{OC}_2\text{H}_5$) qui permettent d'assurer un greffage solide sur les surfaces de SiO_2 . En effet, aussi bien la déformation structurelle que la diffusion des molécules d'APTES sont moindres que celles des molécules d'OTS. De façon générale, les surfaces auto-assemblées d'APTES sont donc de meilleure qualité.

Au niveau dimensionnel, les molécules d'OTS mesurent 2,5 nm de long, les silanes APTES 0,7 nm et les silanes époxyde 1 nm environ.

Pour la partie concernant l'assemblage de cellules dans laquelle on souhaite organiser des cellules individuelles par dépôt sélectif sur une surface (Chapitre 3), nous avons opté pour une double fonctionnalisation chimique du substrat d'accueil :

- un traitement chimique de la surface permettant de créer des zones répulsives où le dépôt sera interdit. Cette modification chimique de la surface doit donc avoir lieu sur toute

l'étendue du substrat, à l'exception des zones où l'on veut que les bioentités se déposent préférentiellement.

- une adaptation chimique localisée afin de créer une affinité entre le ligand ciblé et la zone où l'on souhaite déposer les bioentités. Nous devons donc choisir une chaîne R' et un groupement de surface qui favorise l'accroche des ligands.

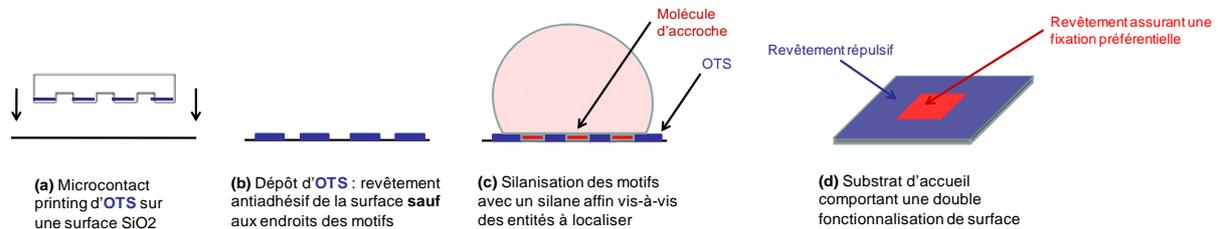


Schéma 1. Procédé expérimental retenu pour une double fonctionnalisation de la surface d'accueil à l'aide du microcontact printing.

De part les propriétés et les caractéristiques des silanes présentées précédemment, nous avons choisi de les utiliser de la façon suivante :

Pour la zone répulsive :

- l'OTS que l'on déposera par microcontact printing

Pour la zone d'accroche :

- le silane terminaison amine (APTES). Le groupement amine (NH_2) de l'APTES a une affinité pour les groupements aldéhyde (CHO) de certaines biomolécules, et est chargé positivement en solution pour un $\text{pH} < \text{pKa}$ du couple $\text{NH}_3^+/\text{NH}_2$ soit $\text{pH} < 9,5$, il peut donc assurer une accroche électrostatique avec des bioentités chargées négativement

OU

- le silane terminaison époxyde, la terminaison époxyde présentant une affinité pour les groupements aminés des biomolécules.

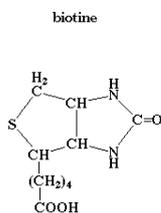


Figure 3. Structure chimique d'une molécule de biotine.

Pour la zone d'accroche, nous avons également exploré la possibilité d'utiliser des biomolécules, plus particulièrement le couple biotine/streptavidine.

La **biotine**, mieux connue sous le nom "vitamine H", est une molécule biologique de 13 kDa qui mesure 1 nm-1,2 nm environ. On la trouve recroquevillée (en pelote) à l'état naturel (Figure 3).

La **streptavidine**, quant à elle, est une protéine d'une masse moléculaire de 60 kDa obtenue à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii*. Sa forme ressemble à un sablier mesurant 54x58x48 Å environ. La molécule est un homo-tetramère dont toutes les sous-unités peuvent faire la liaison avec une seule molécule de biotine à la fois (Figure 4).

La streptavidine est le plus souvent marquée avec des fluorochromes pour une détection par microscopie en fluorescence.

Le couple streptavidine-biotine est devenu un modèle communément utilisé pour la reconnaissance moléculaire en raison des propriétés particulières des deux molécules :

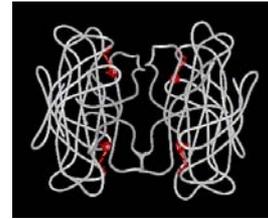


Figure 4. Complexe streptavidine (en blanc)-biotine (en rouge).

1. La liaison une fois formée est très robuste et stable. L'affinité entre ces deux molécules biologiques est très élevée (la constante d'association est d'environ 10^{15} M^{-1}).
2. Il est facile de produire des dérivés biotine; dans notre cas, nous avons utilisé l'ester de la N-hydroxysuccinimide (NHS) biotine comme agent de biotinylation. Ce produit réagit avec les amines primaires (N terminal) des protéines de façon covalente.
3. La streptavidine possède quatre sites de liaison pour la biotine, deux par côté, qui permettent d'utiliser cette molécule pour la liaison en croix des dérivés biotine.

Pour la zone d'accroche, aussi bien les silanes que les biomolécules seront déposés par incubation (Schéma 1).

I. B. Une technique de lithographie douce : le microcontact printing

La lithographie douce est une technique de lithographie qui utilise un élastomère, le plus souvent du polydiméthylsiloxane (PDMS). Ce matériau, liquide avant réticulation, peut reproduire la structure d'un moule plat ou présentant des motifs de toutes dimensions, par exemple du micromètre au nanomètre, à sa surface. Le microcontact printing (μCP) est une forme de lithographie par impression comme celle qui fut utilisée au XV^e siècle par Gutenberg, dans laquelle on utilise ce matériau original pour imprimer des molécules sur une surface à une échelle du micromètre au nanomètre. Cette technique fut introduite par G. Whitesides et al. [1].

La technique de μCP a de nombreux avantages. Il s'agit d'une technique simple et à bas-coût, qui peut être réalisée dans n'importe quel laboratoire. La flexibilité du timbre en PDMS et sa capacité à permettre un contact conforme avec la surface permettent une structuration haute résolution aussi bien sur des surfaces planes que non planes. Des surfaces supérieures à 50 cm^2 ont pu être structurées par microcontact printing, sans défauts [2]. Le principe de cette technique est celui du tampon encreur. Il comprend les quatre étapes suivantes :

1. La réalisation d'un **moule** généralement en silicium (réutilisable)
2. Le moulage sur celui-ci d'un élastomère (**PDMS**)
3. L'**encrage** de ce réplikat en PDMS ou timbre par les molécules chimiques ou biologiques que l'on souhaite déposer
4. L'**impression** du timbre c'est-à-dire le transfert des molécules sur le substrat d'accueil

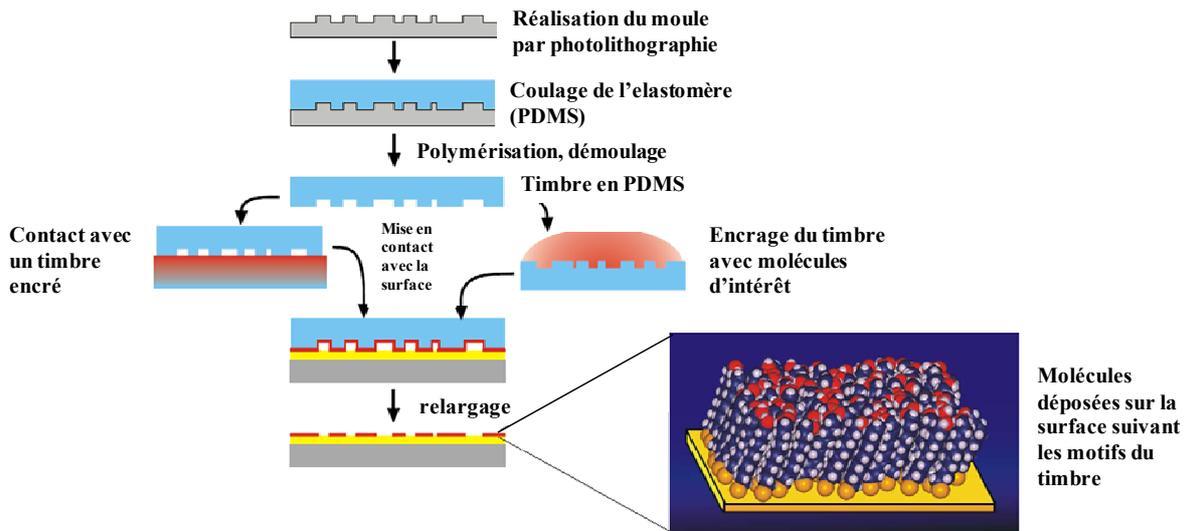


Figure 5. Les différentes étapes du procédé de microcontact printing.

Le timbre en PDMS est premièrement « encré » avec la solution à déposer. L'encrage consiste dans la majorité des cas à déposer une goutte de solution sur la surface structurée du timbre, puis après un laps de temps dépendant de la solution, de retirer cette goutte et de sécher le timbre sous un flux d'azote. L'encrage est une étape clé du contact printing : de l'uniformité et de la nature du dépôt de la molécule sur le timbre dépendront la qualité et la nature du dépôt final. Le timbre encré est ensuite amené en contact avec le substrat. Idéalement, lors de ce contact, seul le sommet des motifs topographiques du timbre entre en contact avec le substrat. Les molécules adsorbées à la surface du timbre sont donc transférées sur le substrat par contact si elles présentent une plus grande affinité avec le substrat qu'avec le timbre. Le timbre peut finalement être retiré, laissant ainsi les motifs de l'encre déposés sur le substrat (figure 5).

Le contact printing a été utilisé pour de nombreuses applications et peut être utilisé avec une large variété de molécules.

I. B. 1. Le moule

La première étape du procédé consiste à réaliser un moule en silicium. Cette étape peut être réalisée soit par une technique de lithographie électronique, soit par une technique de lithographie optique (Schéma 2).

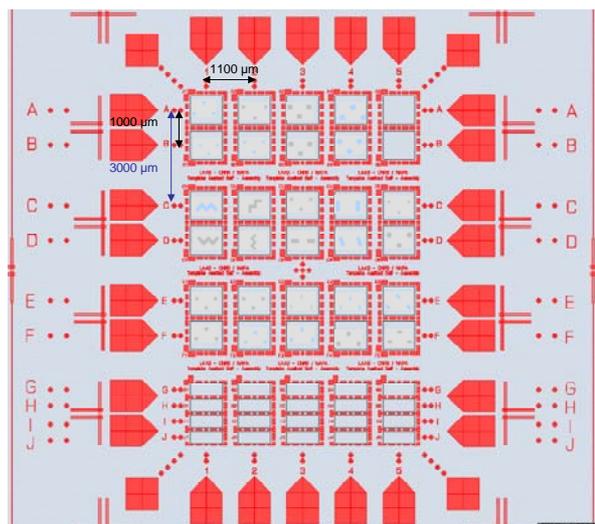


Schéma 2. Exemple du layout d'un des moules micrométriques utilisés [3].

- Fabrication des moules

Les moules en silicium structurés sont fabriqués par lithographie optique ou photolithographie pour des motifs dont les dimensions latérales sont supérieures au micromètre et par lithographie électronique pour des motifs submicroniques. Le procédé de photolithographie utilisé commence par l'application d'une résine photosensible positive de type « novolak cresol » (AZ® 1529) sous forme d'un film fin de 2,7 μm d'épaisseur sur la surface d'une galette (« wafer ») en silicium. La résine est ensuite exposée à une radiation lumineuse dans l'UV à une longueur d'onde de 405 nm pendant 12s à 20 mW/cm². Lors de cette étape, l'utilisation d'un masque, formé de zones opaques et transparentes, permet de définir le motif que l'on souhaite reproduire sur la plaquette. L'exposition crée des réactions au sein de la résine et engendre des modifications chimiques. Le mécanisme de formation des images dans la résine positive est donc basé sur la différence de solubilité des zones exposées, ou non, au rayonnement lumineux. Les solvants spécifiques contenus dans le développeur (solution alcaline, AZ developer®), permettent de dissoudre les parties exposées du film de résine, et de mettre à nu la plaquette à ces endroits-là. L'étape suivante, la gravure sèche, permet d'éliminer la couche du substrat (ici SiO₂) dans toutes les régions non recouvertes de résine ; les motifs du masque sont alors reproduits sur la couche inférieure.

La lithographie électronique est une méthode performante mais onéreuse. Elle repose, quant à elle, sur l'utilisation d'un faisceau d'électrons pour tracer des motifs sur la surface d'un « wafer » en silicium recouvert d'un film mince de résine électrosensible (d'une épaisseur de 150 nm), ici le polyméthylmétacrylate ou PMMA. Ensuite par gravure ionique réactive (RIE) nous obtenons le moule par transfert de ces motifs nanométriques dans le silicium d'une profondeur de 120 nm. Le moule est obtenu après élimination complète de la résine. Par rapport à la photolithographie, l'avantage de cette technique est qu'elle permet de repousser les limites de la diffraction de la lumière et de dessiner des motifs avec une résolution pouvant aller jusqu'à quelques nanomètres [4, 5].

Les moules ainsi structurés sont finalement recouverts d'une fine couche anti-adhésive : ils subissent une étape de silanisation en utilisant de l'octadécyltrichlorosilane (OTS) en phase liquide, pour permettre le démoulage ultérieur du polydiméthylsiloxane (PDMS).

Dans le cadre de cette thèse nous avons utilisé essentiellement 3 moules : 2 moules micrométriques et un moule nanométrique. Le premier moule micrométrique est constitué de réseaux de motifs de géométries variées (carrés, ronds, ovales, motifs en forme de « M »...) et de dimensions allant de 3 à 40 μm de diamètre ou de côté. Chaque motif mesure 5 μm de haut et a une périodicité de 20 à 40 μm . Le deuxième moule micrométrique comporte des ronds de 5 μm , 8 μm , 12 μm et 15 μm de diamètre avec une large gamme de périodicités (10 μm , 12 μm , 15 μm , 18 μm , 20 μm , 25 μm et 30 μm). Le deuxième moule a été conçu spécialement pour l'étude de l'influence de la périodicité des motifs sur l'assemblage de l'ADN (Chapitre 4 section IV. D).

Le moule nanométrique utilisé comporte 20 matrices (100 μm x 100 μm) de carrés de 140, 200, 250, 300 et 370 nm de côté avec des périodes de 1,5, 2, 3, et 5 μm et une hauteur des structures de 120 nm. Quelques images de ces moules sont présentées plus loin, figure 17.

I. B. 2. Le timbre

Le timbre que l'on utilise pour le microcontact printing est fait en polymère. Pour la mise en œuvre de la technique, le timbre doit pouvoir adsorber les molécules sans réagir avec ces dernières, il doit être suffisamment souple pour permettre un contact uniforme avec la surface et en même temps assez rigide pour que les motifs ne soient pas déformés.

Au sein du groupe NanoBioSystèmes, le polymère de prédilection utilisé pour la fabrication du timbre est le **PDMS** (polydiméthylsiloxane, Sylgard® 184 de Dow Corning, figure 6).

En effet, le PDMS remplit parfaitement ces critères : il s'agit d'un élastomère inerte naturellement hydrophobe, d'énergie surfacique critique très basse (angle de contact avec l'eau $\sim 110^\circ$) et qui est de plus biocompatible. Les interactions de type hydrophobe étant plus fortes que les interactions de Van der Waals (10 à 100 fois selon le cas) et ayant un effet à plus longue distance, les molécules sont donc attirées par le timbre et peuvent être ensuite relarguées sur une surface avec laquelle les forces d'attraction sont encore plus fortes. Le PDMS se présente sous forme liquide à basses températures et sous forme solide à hautes températures.

Comme la plus grande partie des « Polydiméthylsiloxanes », le Sylgard® 184 doit être préparé en mélangeant, dans un rapport de 10 :1, une base contenant l'oligomère PDMS et un agent de réticulation (Figure 6) qui lui est formé de deux composés : un catalyseur au platine et un oligomère hydrogéné. En pratique, une fois le mélange préparé, on étale une couche de PDMS sur les moules fabriqués puis le tout est placé dans une étuve à 60°C pendant 12 heures. Après réticulation, le timbre est décollé et peut être utilisé.

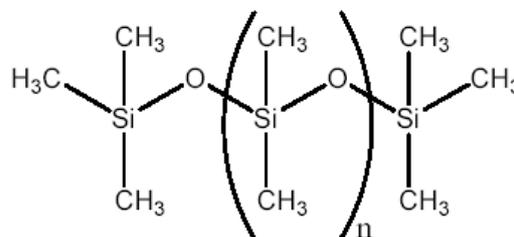


Figure 6. Structure chimique de base du PDMS (polydiméthylsiloxane).

I. B. 3. L'encre

L'étape d'encre débute par le dépôt d'une goutte de la solution contenant les molécules sur le timbre pendant un temps donné, suivi de son séchage.

Dans notre étude, l'encre utilisée est une solution d'OTS dissout dans du trichloroéthylène. Le dépôt de cette molécule permettra comme nous l'avons vu précédemment d'assurer le revêtement répulsif de la surface. Des travaux précédents ont montré l'efficacité de ce type de motifs chimiques, combinés à des techniques de peignage, pour la localisation d'événements d'adsorption [6-11], mais ont aussi mis en évidence la faible définition des motifs d'OTS obtenus par microcontact printing [12]. La difficulté ici réside dans le fait que les molécules d'OTS polymérisent rapidement sous l'effet de l'humidité ambiante et le trichloroéthylène est un solvant agressif pour le PDMS car il s'infiltre dans le PDMS et le déforme. De plus, ces molécules diffusent rapidement en surface ce qui rend difficile la maîtrise de la définition des bords de motifs. Ceci rend la technique difficile à mettre en œuvre car la résolution des motifs ainsi définis est médiocre. Pour le dépôt de molécules d'OTS par μCP nous avons utilisé le moule micrométrique décrit précédemment puis nous avons mis en place un protocole

expérimental permettant de palier à l'inadéquation du trichloroéthylène vis-à-vis du timbre en PDMS.

I. C. Protocoles expérimentaux de fonctionnalisation de surface utilisés

Pour le dépôt de molécules d'OTS par microcontact printing, nous avons été amenés à étudier minutieusement l'influence de chacun des paramètres entrant en jeu dans la technique de microcontact printing (temps d'encre, de séchage, d'impression) et à les optimiser. Une étape d'optimisation du protocole a donc été nécessaire.

Comme nous l'avons vu précédemment, la présence d'une forte densité de groupements hydroxyles (-OH) est indispensable pour obtenir un bon greffage des molécules de silanes sur SiO_2 . En effet, la présence de groupements -OH sur un substrat de SiO_2 rend sa surface très hydrophile (grande énergie de surface, faible angle de contact). La qualité du nettoyage du substrat est donc d'une grande importance. Le protocole que nous avons retenu consiste à rincer le substrat en silicium (lamelle de verre de SiO_2 ou wafer Si) avec dans l'ordre, du trichloroéthylène, de l'acétone, de l'éthanol puis de l'eau déionisée. Ensuite il consiste à sécher le substrat sous flux d'azote (gaz inerte) puis à placer le substrat sous plasma O_2 (800W, 1000mL/min, pendant 5 minutes). En effet, ce nettoyage physique présente l'avantage d'éliminer tout contaminant organique présent à la surface du substrat et d'augmenter la densité de surface des groupements silanols Si-OH indispensables à un bon greffage des silanes. La surface du substrat devient très hydrophile avec des angles de contact dans l'eau se rapprochant de 0° . Il est à noter néanmoins que les substrats ainsi nettoyés se re-contaminent relativement vite à l'air. Ce traitement a donc été systématiquement appliqué à tous les substrats, juste avant la réalisation du microcontact printing.

La réussite du microcontact printing repose sur trois paramètres clé :

- Le temps d'encre : le but est de définir le temps nécessaire minimum pour que suffisamment de molécules se déposent à la surface du timbre et que la couche soit uniforme
- Le temps de séchage : pour limiter la diffusion des molécules notamment dans le cas de l'OTS où cette diffusion est importante, pour permettre l'évaporation du solvant et pour limiter la contamination de la surface. Le séchage s'effectue usuellement avec un flux azote.
- Le temps de contact : afin de réguler la quantité de molécules déposées sur la surface. Le temps de contact ne doit pas être trop court pour permettre à un nombre suffisant de molécules de migrer vers la surface

Ces trois paramètres doivent être ajustés au cas par cas, selon la nature des molécules à déposer. En effet, ces paramètres jouent un rôle majeur dans l'obtention d'un dépôt de qualité par microcontact printing.

Le protocole expérimental une fois optimisé est mis en œuvre comme suit. Nous plaçons le timbre microstructuré sur une tournette puis nous déposons une goutte de solution d'OTS à 1% en volume dans du trichloroéthylène pendant 30 secondes. Ce temps d'encrage est bien calibré car en deçà de cette valeur, le timbre commence à se déformer. Ensuite nous lançons la tournette à une vitesse de rotation de 3000 rotations par minute, de façon à ce que la couche moléculaire d'OTS se répartisse uniformément sur le timbre, puis nous séchons pendant 1 minute sous un flux d'azote afin d'évaporer le solvant responsable de la déformation du timbre. Le timbre est alors amené en contact pendant une durée de 3 minutes avec le support en silicium (lamelle de verre ou wafer en silicium) préalablement activé au plasma oxygène. Ce temps de contact est également une valeur à respecter qui assure le dépôt d'une monocouche. Finalement le timbre est retiré.

L'état de surface des échantillons générés a été évalué par AFM. L'imagerie a été essentiellement réalisée à l'air en mode tapping avec des pointes symétriques en silicium MPP 11100 ($k = 20-80 \text{ N/m}$, $f_0 = 261-297 \text{ kHz}$) et MPP 21100 ($k=3 \text{ N/m}$, $f_0 = 75 \text{ kHz}$) de la société VEECO.

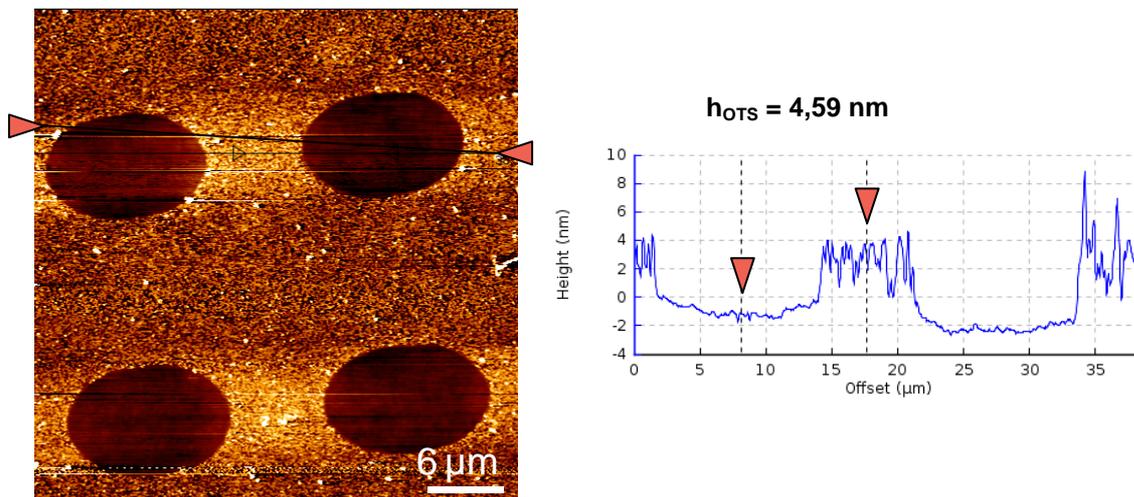


Figure 7. Microcontact printing d'OTS : Image AFM topographique d'une région de $40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$ avec des motifs ovales de $12\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$ et la section correspondante.

En suivant ce protocole expérimental, le résultat présenté figure 7 montre que ce protocole de μCP d'OTS reproduit la structuration du timbre initial de façon fidèle et avec une résolution micrométrique sur une large étendue (cm^2).

L'image AFM ci-dessus (figure 7) et la section correspondante mettent en évidence que nous obtenons une couche moléculaire de 4,5 nm de hauteur en moyenne. Sachant que la rugosité moyenne mesurée (RMS pour *Root Mean Square*) est d'environ 2 nm, ceci indique que nous avons bien déposé un film dont l'épaisseur est proche de celle d'une monocouche. Il est toutefois important de noter que cette couche ne présente pas une qualité cristalline comparable avec celle rapportée par exemple pour les SAMs d'alcane/thiol sur surfaces d'Au [1].

Ce résultat montre qu'après le μCP d'OTS nous avons déposé une couche dense, homogène et hydrophobe d'OTS sans aucune diffusion décelable des molécules d'OTS à l'intérieur des

motifs où l'on souhaite ultérieurement immobiliser les entités d'intérêt. En effet, le résultat présenté sur la figure 7 fait suite à une étude systématique qui n'est pas décrite dans ce manuscrit. Nous avons sélectionné des paramètres expérimentaux (encrage, séchage, impression) qui nous permettent de déposer sur la surface une épaisseur légèrement supérieure à la monocouche. Ce choix réalise un bon compromis entre : i) une bonne définition des motifs (détériorés pour des couches plus épaisses) et ii) un revêtement dense sans zones découvertes (situation observée pour des épaisseurs plus fines, plus proches de la monocouche).

En ayant validé cette étape, nous avons pu étudier ensuite la fonctionnalisation des motifs ainsi définis avec une molécule d'accroche adéquate.

I. D. Double fonctionnalisation du substrat

Pour réaliser la double fonctionnalisation du substrat, nous avons mis en œuvre un procédé expérimental combinant la technique de microcontact printing présentée précédemment et le dépôt de molécules en phase liquide afin d'ingénierer au mieux et de façon locale la surface d'accueil.

Le dépôt de monocouches auto-assemblées de silanes ou de biomolécules se fait généralement en phase liquide. Dans ce cas, l'espèce chimique ou biologique est dissoute dans un solvant ou un buffer approprié puis le substrat est directement plongé dans ce mélange avant d'être rincé et séché. La concentration de la solution, le temps d'immersion et la technique de nettoyage sont les paramètres qui contrôlent l'obtention d'un dépôt homogène et uniforme. Il est à noter que dans le cas d'un dépôt chimique, celui-ci peut également se faire en phase vapeur ("Chemical Vapor Deposition" ou CVD). Dans ce cas, le principe consiste à évaporer l'espèce chimique qui se re-condense sur le substrat. C'est une méthode très efficace pour obtenir des monocouches parfaitement uniformes, qui présentent en général une meilleure qualité structurale que celles obtenues par la voie liquide.

Pour la fonctionnalisation locale des motifs, nous avons utilisé deux types de silanes : l'APTES et un silane époxyde.

L'Aminopropyltriéthoxysilane (APTES) est une molécule d'une grande utilité pour de nombreuses applications. Elle constitue souvent une des premières briques élémentaires d'un édifice moléculaire de surface. Nous l'utilisons principalement pour sa capacité à se charger en solution au niveau de l'amine terminale. Cette propriété permet notamment de fixer de manière électrostatique des espèces chargées négativement comme les bactéries Gram négatives, l'ADN, etc....

Aussi bien pour une fonctionnalisation locale (après μ CP d'une première molécule, l'OTS par exemple (cf Chapitre 3) que pour une fonctionnalisation pleine plaque des substrats (cas de l'ADN Chapitre 4 par exemple), l'activation par plasma préalable des substrats est suivie d'une immersion en phase liquide dans une solution à 1% en volume d'APTES dans un mélange éthanol/eauDI (95 % / 5 %) pendant 15 minutes. Ensuite on procède à un rinçage à l'éthanol puis à l'eau DI suivi d'un recuit à 140°C pendant 5 min. L'APTES forme ainsi une couche dense à la surface du substrat.

Voici les résultats obtenus dans le cas du dépôt localisé de molécules d'APTES. Nous avons caractérisé à l'AFM la surface obtenue après μ CP d'OTS puis incubation des molécules d'APTES.

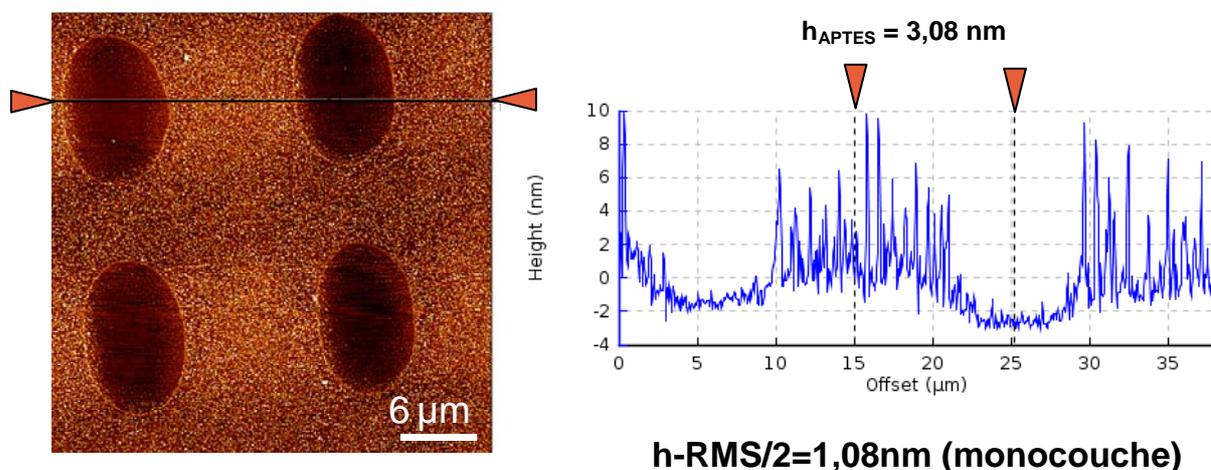


Figure 8. Surface microstructurée par μ CP d'OTS après incubation des molécules d'APTES. Image AFM topographique avec la section correspondante.

L'image AFM ci-dessus (figure 8) rend compte du résultat obtenu et illustre l'évolution de la topographie de surface après silanisation avec des molécules APTES par dépôt en phase liquide. Par comparaison directe avec la figure 7 précédente, nous pouvons observer que le relief topographique est moins important que dans le cas du microcontact printing d'OTS ($h_{\text{APTES}} < h_{\text{OTS}}$). Cette observation indique que les molécules d'APTES se sont bien déposées de façon sélective à

l'intérieur des motifs car la différence de hauteur est moins importante. Cependant, pour consolider cette hypothèse nous avons eu recours à une expérience permettant d'élucider la localisation exacte des molécules d'APTES et de valider la pertinence de notre protocole de fonctionnalisation locale. Pour ce faire, nous avons exploité l'interaction électrostatique entre l'APTES et des colloïdes d'or chargés négativement. Les colloïdes utilisés sont des nanoparticules d'or stabilisées en solution colloïdale par répulsion électrostatique grâce à des ligands organiques présentant des terminaisons COO^- . Dans notre expérience, ces colloïdes vont reconnaître sélectivement les motifs d'APTES en raison de l'attraction électrostatique exercée par les terminaisons NH_3^+ présentes sur les molécules aminées fixées sur la surface au pH de la solution. Idéalement, les colloïdes se fixent aux motifs d'APTES et n'ont, au contraire, qu'une très faible affinité pour les molécules d'OTS ou pour les groupements silanols (SiOH). Nous avons utilisé des colloïdes d'un diamètre moyen de 40 nm afin de pouvoir évaluer qualitativement mais aussi quantitativement le dépôt des colloïdes qui reflète donc par la même occasion le dépôt des molécules d'APTES.

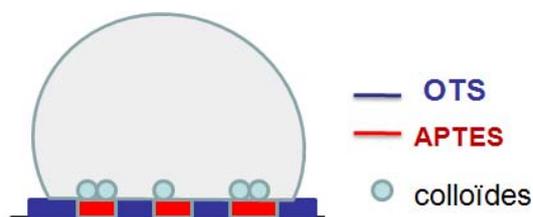


Schéma 3. Schéma de validation de la fonctionnalisation des motifs avec des molécules d'APTES par incubation de colloïdes

l'interaction électrostatique entre l'APTES et des colloïdes d'or chargés négativement. Les colloïdes utilisés sont des nanoparticules d'or stabilisées en solution colloïdale par répulsion électrostatique grâce à des ligands organiques présentant des terminaisons COO^- . Dans notre expérience, ces colloïdes vont reconnaître sélectivement les motifs d'APTES en raison de l'attraction électrostatique exercée par les terminaisons NH_3^+ présentes sur les molécules aminées fixées sur la surface au pH de la solution. Idéalement, les colloïdes se fixent aux motifs d'APTES et n'ont, au contraire, qu'une très faible affinité pour les molécules d'OTS ou pour les groupements silanols (SiOH). Nous avons utilisé des colloïdes d'un diamètre moyen de 40 nm afin de pouvoir évaluer qualitativement mais aussi quantitativement le dépôt des colloïdes qui reflète donc par la même occasion le dépôt des molécules d'APTES.

Avant la réalisation de cette expérience, il nous a été nécessaire d'effectuer une expérience dite « de contrôle » afin d'évaluer quantitativement le dépôt non spécifique des colloïdes sur

les régions d'OTS. Pour calculer ce taux de non spécificité, nous avons utilisé l'outil d'analyse de particules du logiciel libre « *ImageJ* » [13]. Nous avons obtenu un taux de 2% ce qui correspond à un dépôt non spécifique de 10,5 particules / μm^2 en moyenne.

Nous avons pu ensuite procéder à la vérification du dépôt des molécules d'APTES par incubation d'une solution de nanoparticules d'or ($9,0 \times 10^{10}$ particules/mL dans de l'eau déionisée) pendant une heure sur les substrats structurés avec motifs APTES. Les images ci-dessous réalisées avec trois techniques de caractérisation différentes montrent les résultats ainsi obtenus (figures 9, 10, 11).

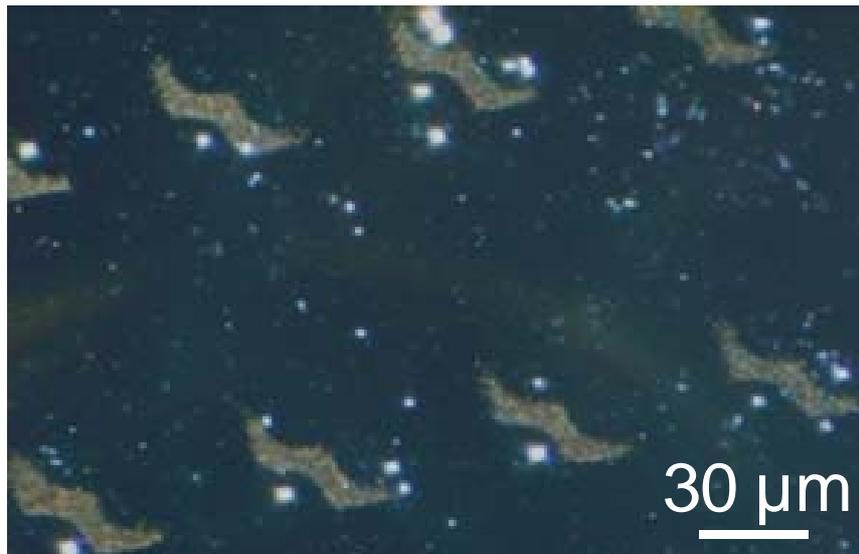


Figure 9. Image champ sombre d'un substrat microstructuré par μCP d'OTS ayant des motifs APTES après incubation de colloïdes d'or de 40 nm.

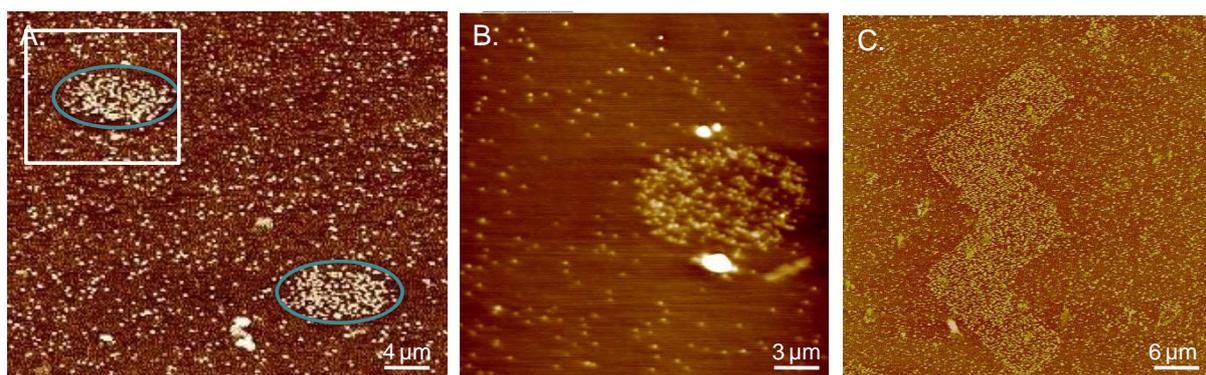


Figure 10. Images AFM d'un substrat microstructuré par μCP d'OTS ayant des motifs APTES après incubation de colloïdes d'or de 40 nm. Les images A, B et C correspondent à différentes régions du même substrat.

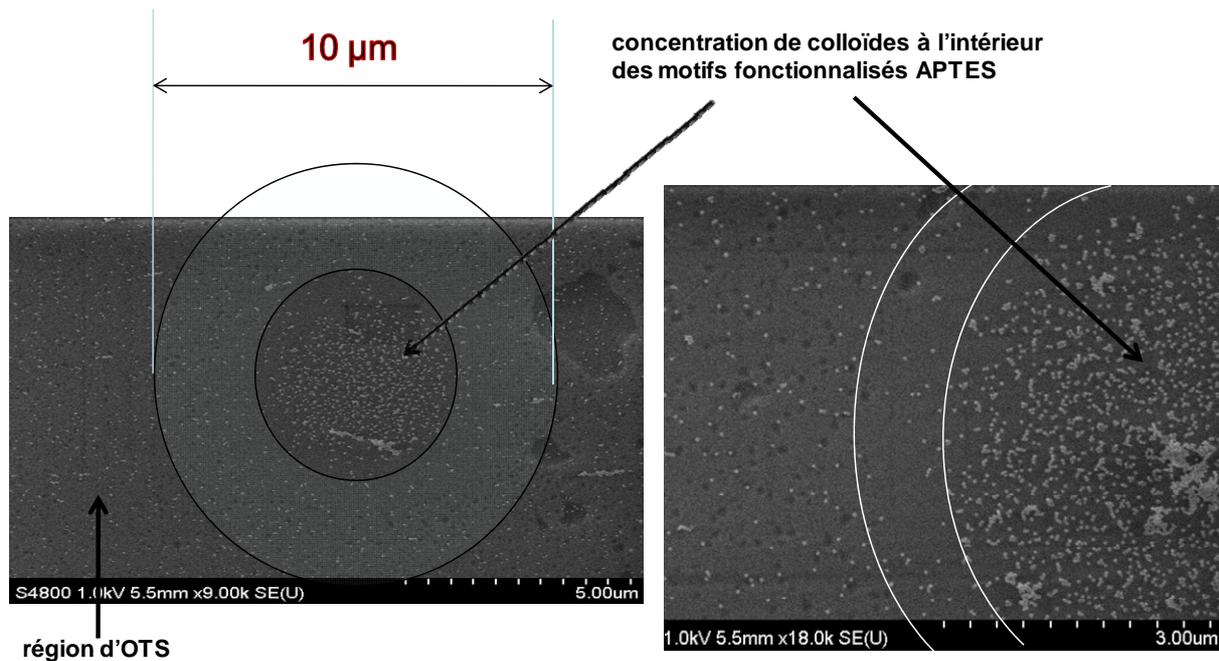


Figure 11. Images MEB d'un substrat microstructuré par μ CP d'OTS ayant des motifs APTES après incubation de colloïdes d'or de 40 nm. Le cercle extérieur correspond à la dimension théorique du motif. Le cercle intérieur délimite la zone de forte densité de nanoparticules. Ceci met en évidence une concentration des colloïdes uniquement dans la région centrale des motifs.

Aussi bien au travers des images en champ sombre que des images AFM ou MEB (figures 9-11), nous constatons que les colloïdes se sont effectivement et clairement déposés à l'intérieur des motifs. Grâce au logiciel « *ImageJ* » nous avons évalué le taux de dépôt non spécifique à l'extérieur des motifs (10 nanoparticules / μm^2). Cette valeur correspond au dépôt non-spécifique estimé sur l'échantillon de contrôle (μ CP d'OTS) sans molécules d'APTES. Nous avons également calculé la densité de particules à l'intérieur des motifs et nous avons obtenu 61 nanoparticules / μm^2 ce qui représente pratiquement une densité six fois plus importante de particules à l'intérieur des motifs qu'à l'extérieur. Cette expérience nous a donc permis de co-localiser les molécules d'APTES. Ces mesures ont donc renforcé notre interprétation initiale: la monocouche d'APTES est bien localisée à l'intérieur des motifs et celle-ci est vraisemblablement chargée positivement en solution.

Par ailleurs, ces images mettent en évidence un phénomène intéressant : nous pouvons remarquer sur les images AFM et MEB que les colloïdes se regroupent en forte concentration au centre des motifs laissant le pourtour des motifs déplété en nanoparticules.

L'interprétation de ce résultat est assez complexe et nous proposons trois types de phénomènes pour le discuter :

- La présence d'une grande densité de colloïdes au centre des motifs pourrait impliquer une meilleure fixation des molécules d'APTES lors de la silanisation en phase liquide dans cette région. Il est possible que les molécules d'OTS adjacentes créent une forme de potentiel d'interaction entre les molécules d'APTES et la surface présentant un minimum d'énergie au centre des motifs.

- La deuxième explication possible considère la forme du champ électrique produite par une répartition de charges positives de surface suivant les motifs d'APTES. Cette allure pourrait en effet expliquer une répartition non homogène des nanoparticules sur le motif. Un

calcul simple montre toutefois que si ce phénomène était prépondérant les nanoparticules devraient se concentrer en bord des motifs et non au centre.

- Le troisième phénomène méritant d'être mentionné est la possibilité que cette concentration des nanoparticules au centre du motif soit engendrée lors du séchage de la goutte de solution colloïdale. Le passage du ménisque au travers du motif hydrophile (APTES) / hydrophobe (OTS) pourrait conduire par effet de capillarité à un drainage des nanoparticules de la solution au centre des motifs.

Dans le cas des molécules époxyde (3-Glycidyloxypropyltriméthoxysilane) le dépôt est effectué par immersion du substrat dans une solution contenant des silanes époxyde dilués à 2,5 % en volume dans de l'éthanol pendant 30 minutes. Les substrats sont ensuite rincés à l'éthanol, puis séchés sous flux azote.

Ci-dessous sont présentées quelques images AFM illustrant ce que l'on obtient après incubation de molécules époxyde sur une surface microstructurée par microcontact printing d'OTS.

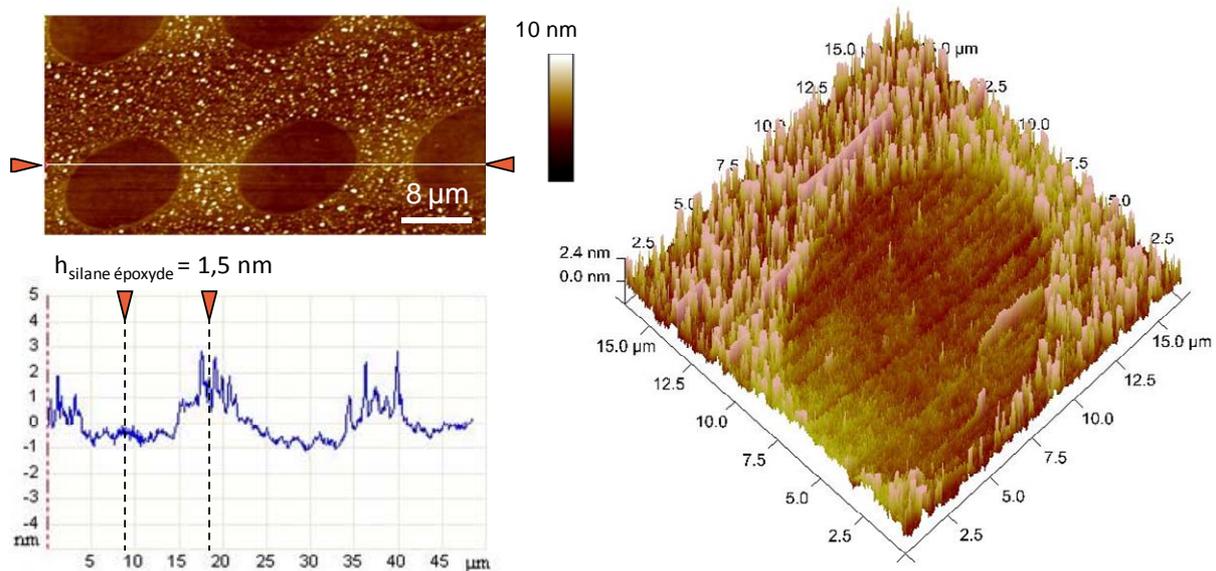


Figure 12. Images AFM (topologie, section et 3D) de la fonctionnalisation époxyde des motifs.

L'image AFM présentée figure 12 illustre l'évolution de la topographie de surface après silanisation avec des molécules époxyde. En comparant cette figure avec la figure 7, on observe clairement que le dépôt des molécules époxyde a lieu de façon sélective à l'intérieur des motifs vierges. Comme la longueur nominale de la molécule époxyde utilisée est plus courte que celle des molécules d'OTS, nous observons tout de même une marche de 1-2 nm dans la section AFM présentée figure 12. Ceci indique que le silane époxyde s'est déposé à l'intérieur des motifs et que la couche d'OTS passive le reste de la surface convenablement.

En se basant sur les images AFM, nous pouvons également observer que la monocouche d'époxyde semble être dense et uniforme à l'intérieur des motifs.

En ce qui concerne les biomolécules (streptavidine) nous avons procédé à leur dépôt par incubation également. Nous avons incubé une goutte de 300 μl de molécules de streptavidine en solution (200 μg/ml) sur la surface pendant 45 minutes. Ensuite nous avons rincé abondamment avec un tampon phosphate salin (PBS) puis séché sous un flux d'azote. Il est à

noter que cette biomolécule se dépose très bien par microcontact printing sur une surface également. Ce point sera abordé de façon plus concrète ultérieurement.

	Concentration	Solvant	Dépôt par μ CP	Dépôt en phase liquide	Rinçage	Recuit
OTS	1% (v/v)	Trichloroéthylène	30'' d'encrage 120'' tournette 1' séchage N ₂ 3' contact	X	X	X
APTES	1% (v/v)	47,5 mL Ethanol 2,5 mL Eau DI	X	5min d'hydrolyse 15min de polymérisation	Ethanol+eau DI	5min à 140 C
Colloïdes	9.10 ¹⁰ part/mL (40 nm) 5. 10 ⁹ part/mL (100 nm)	Eau	Film mince éthanol ou eau DI Contact 20'' (dans étuve à 110 C)	1 hr	Eau DI fort débit	X
Biotine NHS	10 mM	DMSO	X	2 hrs	PBS (1X)	X
Streptavidine	200 μ g/mL	PBS	10' encrage 30'' séchage N ₂ 3' contact	45 min	PBS (1X)	X
Silane époxyde	2,5% (v/v)	Ethanol	X	30 min	Ethanol	X

Tableau 1. Récapitulatif des protocoles expérimentaux retenus.

Le tableau 1 présente un récapitulatif des différents protocoles expérimentaux retenus.

II. Deuxième méthodologie : l'assemblage capillaire dirigé par structuration topographique de surface

II. A. Notions sur l'assemblage capillaire dirigé

L'assemblage par forces de capillarité met en jeu des mécanismes physiques complexes. En effet, il est principalement lié aux notions de tension superficielle, capillarité, mouillage, évaporation et convection. Nous définirons ici comment et dans quelles conditions les phénomènes capillaires et convectifs conduisent à l'assemblage dirigé de nano-objets au sein de motifs topographiques inscrits à la surface d'un substrat.

II. A. 1. Introduction sur la capillarité : la tension superficielle et la force capillaire

Le début du XIXe siècle fut marqué par la naissance de la science de la capillarité grâce à Pierre Simon de Laplace (1749-1827) et Thomas Young (1773-1829). La capillarité est l'étude des interfaces entre deux liquides non miscibles, c'est-à-dire entre un liquide et l'air ou entre un liquide et une surface. Elle est mise en œuvre lorsque les buvards aspirent l'encre, les éponges s'imbibent d'eau ou bien lorsqu'un sucre trempe dans une tasse de café (figure 13).



Figure 13. Capillarité. Montée capillaire dans un sucre qui trempe dans une tasse de café (à gauche). L'eau monte le long du tube par capillarité, et à l'inverse, l'air descend dans le tube en repoussant le mercure par capillarité. Plus le tube est fin et plus la montée capillaire est importante (à droite).

La tension qui existe à la surface de séparation de deux milieux s'appelle la tension superficielle ou de surface. Elle permet par exemple aux insectes de marcher sur l'eau (voir figure 14).

La surface d'un liquide est lisse à l'échelle atomique, et est très peu déformable. La surface d'un liquide est donc comme une membrane tendue, caractérisée par une tension superficielle qui s'oppose aux déformations. La tension superficielle explique ainsi la formation des bulles de savon et explique qu'un liquide à forte tension superficielle remonte contre la gravité dans un tube très fin, dit tube capillaire (voir figure 13). En effet, la tension superficielle γ dépend de la nature du liquide et de celle du gaz en contact avec lui. Elle est proportionnelle à la force de cohésion intermoléculaire du liquide concerné et est inversement proportionnelle à la taille moléculaire. Ainsi, plus les molécules du liquide ont une cohésion forte, plus le liquide est susceptible d'être transporté par capillarité. Cette tension de surface est donc à l'origine des phénomènes capillaires [14-16].



Figure 14. La tension superficielle. Effet lotus (à gauche) et un Gerridé se déplaçant à la surface de l'eau.

La tension superficielle est donc une énergie par unité de surface notée γ (exprimée en mJ/m^2) mais également une force par unité de longueur [17]. Son unité est le N.m^{-1} . C'est cette force qui s'exerce sur les objets lors de l'assemblage par forces de capillarité.

Liquide	Trichloroéthylène	Acétone	Ethanol	Glycérol	Eau	Mercure
γ (mN/m)	29,3	23,5	22,0	62,5	72,0	485,5

Tableau 2. Tensions de surface de quelques solvants et autres liquides courants à 25°C. On remarque que l'eau a une tension de surface relativement élevée par rapport à d'autres liquides usuels. Les tensions de surface les plus élevées correspondent à celles des métaux liquides tels que le mercure [18].

La tension superficielle peut être mise en évidence par la mesure de l'angle de contact.

Méthode de la mesure de l'angle de contact

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'ensemble des points de contact où se rejoignent les trois phases solide-liquide-gaz est appelé la ligne de contact (ou ligne triple). A cet endroit, chaque interface agit de manière à minimiser son énergie, et pour ce faire, réduit sa surface. La combinaison des tensions interfaciales de chaque interface (γ_{SG} , γ_{SL} , γ_{LG}) détermine l'angle de contact θ_E qui correspond à l'angle défini par l'interface liquide-gaz et l'interface solide-liquide d'un liquide en contact avec un substrat solide.

Le schéma 4 représente un agrandissement de la ligne de contact solide-liquide-gaz. $\vec{\gamma}_{SG}$, $\vec{\gamma}_{SL}$ et $\vec{\gamma}_{LG}$ sont les forces de capillarité par unité de longueur qui s'exercent sur la ligne de contact.

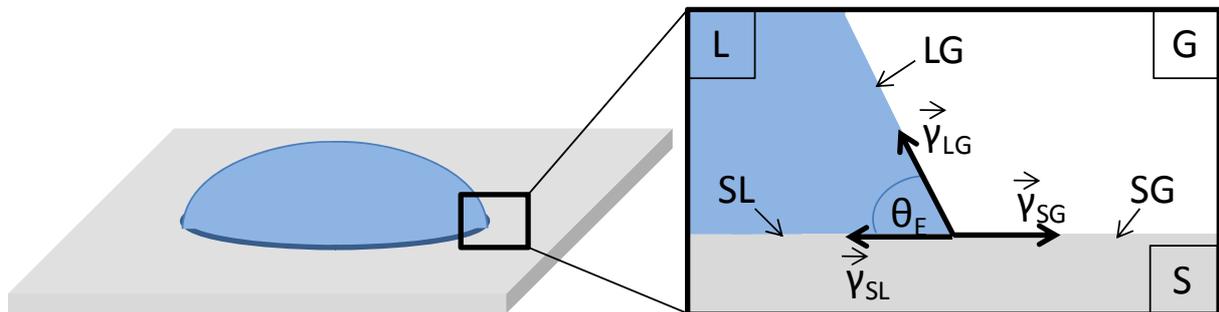


Schéma 4. Schéma d'une goutte de liquide déposée sur une surface solide plane. Au point triple solide-liquide-gaz, les interfaces solide-liquide (SL) et liquide-gaz (LG) définissent un angle de contact θ_E qui correspond à l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide.

La mesure de cet angle nous donne trois types d'information :

- Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie surfacique) ou hydrophile (petit angle, grande énergie surfacique) de la surface.
- Si on utilise plusieurs liquides de référence différents, on peut accéder à l'énergie libre de la surface
- Si on mesure l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et au retrait de la goutte on obtient des renseignements sur la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

En pratique, une goutte de liquide, en général de l'eau ultra-pure, est déposée à l'aide d'une seringue sur la surface de l'échantillon à analyser.

La mesure de l'angle se fait à partir d'images capturées par un PC *via* une caméra. Un logiciel permet de numériser le contour de la goutte par traitement des images. Il détermine ensuite l'angle de contact grâce à des méthodes d'interpolation.

Un système motorisé permet de faire des mesures d'angles à l'avancée et au retrait de la goutte, l'aiguille de la seringue étant alors maintenue dans la goutte. Une enceinte en plexiglas permet d'isoler le système goutte/échantillon de l'air et des contaminations extérieures.

II. A. 2. Mouillage total et partiel

Le mouillage caractérise l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur la surface d'un solide. Grâce au mouillage, on peut expliquer qu'une goutte d'eau s'étale sur une surface de verre propre, alors qu'elle adopte une forme quasi-sphérique sur une surface de téflon selon l'angle θ_E .

L'expression du paramètre d'étalement s'écrit :

$$S = \gamma_{SG} - (\gamma_{SL} + \gamma_{LG})$$

S représente la différence d'énergie entre le substrat sec (γ_{SG}) et le substrat mouillé ($\gamma_{SL} + \gamma_{LG}$). Le signe du paramètre d'étalement permet alors de définir deux régimes de mouillage [17, 20, 21] : le mouillage total pour lequel $S \geq 0$, et le mouillage partiel pour lequel $S < 0$. Lorsque le paramètre de mouillage est positif, le liquide s'étale complètement sur le solide en formant un film d'épaisseur nanoscopique pour abaisser son énergie de surface. En conséquence, l'angle de contact θ_E est nul. A l'inverse, pour un paramètre de mouillage négatif, le liquide en contact avec le solide adopte une forme de calotte sphérique avec un angle de contact θ_E non nul (Tableau 3).

Un liquide possédant une forte tension superficielle aura donc tendance à dé mouiller la surface et à présenter des angles de contact élevés.

$S \geq 0$	$S < 0$		
Mouillage total	Mouillage partiel		Mouillage nul
$\theta_E = 0^\circ$	$0^\circ < \theta_E \leq 90^\circ$	$90^\circ < \theta_E < 180^\circ$	$\theta_E = 180^\circ$
			

Tableau 3. Régimes de mouillage selon le signe du paramètre d'étalement S et l'angle de contact θ_E .

Nous pouvons alors distinguer deux différents types de surfaces solides en fonction de ce critère de mouillabilité :

- les surfaces dites mouillantes ($\theta_E=0^\circ$) car de nombreux liquides s'y étalent (surfaces de silicium, surfaces de verre, surfaces avec des traitements de surface hydrophiles par exemple).
- les surfaces très peu mouillables ($90^\circ < \theta_E \leq 180^\circ$) car de nombreux liquides ne s'y étalent pas ou peu (plastiques, surfaces avec des traitements hydrophobes (OTS), PDMS par exemple).

II. A. 3. Effet de la température

La température a un effet considérable sur la tension superficielle. En effet, cette dernière diminue avec l'augmentation de la température. Quand la température augmente, l'angle de contact diminue et la goutte aura tendance à beaucoup plus s'étaler sur le solide, et inversement. Une relation semi-empirique relie les deux paramètres [18, 22] :

$$\gamma = \gamma^* (1 - T/T_c)^n$$

où γ^* correspond à la tension superficielle du liquide à une température de 0°C , T_c est la température pour laquelle la tension superficielle devient nulle et n est un paramètre empirique (pour les liquides organiques, n est proche de 1). Par exemple, dans le cas de l'eau, $\gamma^*=75,7$ mN/m, $T_c=231,6^\circ\text{C}$ et $n=0,445$.

II. A. 4. Effet de la concentration des solutés

La présence de solutés (impuretés, molécules, tensioactifs, colloïdes) dans un liquide fait également varier la tension superficielle. Par exemple, les tensioactifs (ou surfactants), molécules amphiphiles comportant deux fonctionnalités opposées (une tête polaire hydrophile et une chaîne apolaire lipophile), modifient la tension superficielle et en particulier celle de l'eau. La figure 15 représente l'évolution de l'angle de contact d'une goutte d'eau déionisée

en fonction du pourcentage en agent tensioactif (ici du Triton X-100) mesuré sur différentes surfaces. On constate que la dissolution du Triton X-100 diminue l'angle de contact et par conséquent diminue la tension superficielle du liquide. Entre 0,1% et 1% de Triton X-100, l'angle de contact ne varie plus de façon significative. De façon générale, l'angle de contact diminue avec l'augmentation en concentration de l'agent tensioactif [18].

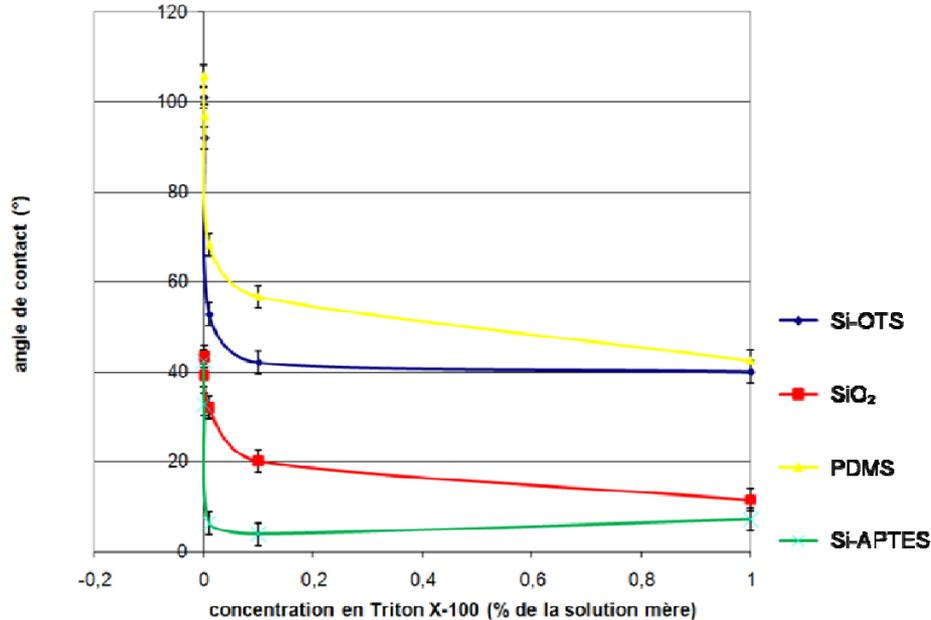


Figure 15. Angle de contact d'une goutte d'eau déionisée mesuré sur différentes surfaces en fonction de sa concentration en Triton X-100.

Les tensioactifs sont couramment ajoutés dans les suspensions colloïdales afin d'éviter la formation d'agrégats.

II. A. 5 Les flux dans les systèmes colloïdaux

L'évaporation du solvant d'une goutte engendre différents flux au sein du liquide.

II. A. 5. 1. Les phénomènes convectifs

Dans un fluide au repos, des instabilités peuvent être induites par des phénomènes gravitationnels, capillaires, thermiques, etc. Ces instabilités se manifestent souvent par des phénomènes convectifs.

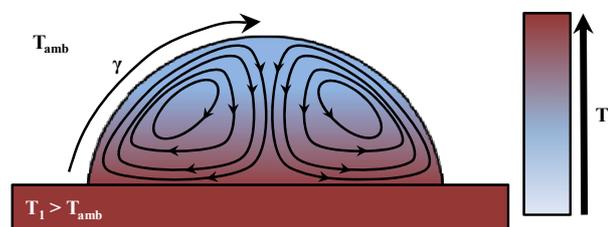


Schéma 4. Schéma du flux convectif induit par effet Marangoni lorsqu'une goutte est posée sur un substrat de température supérieure à celle de l'air ambiant. Le flux est dirigé vers le sommet de la goutte, puis vers l'intérieur de la goutte car la tension superficielle est plus élevée au sommet.

L'instabilité thermocapillaire de Bénard-Marangoni est un exemple typique d'instabilité thermique. Cet effet se manifeste lorsqu'une couche mince de liquide (< 4 cm) au repos est chauffée par la plaque sur laquelle elle repose. On observe alors des cellules hexagonales de convection. Son origine est liée à la présence de gradients de tension superficielle (dérivés de gradients de température par exemple) sur la surface libre du liquide [23]. Les phénomènes thermiques ne sont pas les seuls phénomènes responsables de l'apparition d'un flux dans une goutte posée. L'évaporation est un autre phénomène qui peut donner naissance à un flux. Hu et Larson ont étudié l'évaporation d'une goutte posée dont la ligne de contact est ancrée [24]. Leur théorie démontre que le flux d'évaporation d'une goutte posée est particulièrement important aux bords de celle-ci. En effet, afin de maintenir la ligne de contact ancrée, les forces de capillarité créent un flux en direction de la ligne de contact de manière à compenser la perte de solvant à cet endroit.

II. A. 5. 2. Dynamique générale des flux et des forces mises en jeu lors de l'ancrage de la ligne de contact

Jusqu'à présent, nous avons implicitement considéré que les gouttes reposaient sur une surface idéale exempte de défauts. Dans la pratique, les surfaces solides présentent des irrégularités physiques (rugosités, poussières) ou chimiques. Lorsque la ligne de contact se déplace et rencontre l'un de ces défauts, celle-ci est retenue (ancrée) par le défaut et la ligne de contact se déforme (voir figure 16). Ce phénomène crée un film mince et augmente aussi bien le taux d'évaporation du solvant à l'interface liquide/air, que le flux de solvant à l'intérieur de la goutte compensant l'évaporation (J_w).

Lorsqu'on tire suffisamment sur la ligne de contact par exemple en déplaçant la goutte sur la surface ou en déplaçant la surface par rapport à la goutte, celle-ci se décroche du défaut en dissipant de l'énergie.

Lorsque l'on considère non plus une goutte d'eau idéale mais une goutte de suspension colloïdale, la localisation de la distribution des objets en suspension lors de l'évaporation du solvant devient possible en tirant avantage de la présence de défauts à la surface du solide [17, 21, 25-27].

Le concept de l'assemblage dirigé repose sur la création intentionnelle de « défauts » organisés sur la surface grâce aux méthodes de lithographie, nous parlerons alors de motifs, pour diriger et localiser les objets en solution. On distingue deux catégories de motifs, les motifs topographiques et les motifs chimiques. Dans le cadre de cette thèse, nous privilégierons des motifs topographiques. Ce sont alors les effets de bord causés par les changements brutaux de topographie à la surface hydrophobe d'un solide qui vont accrocher et piéger la ligne triple sur ces motifs.

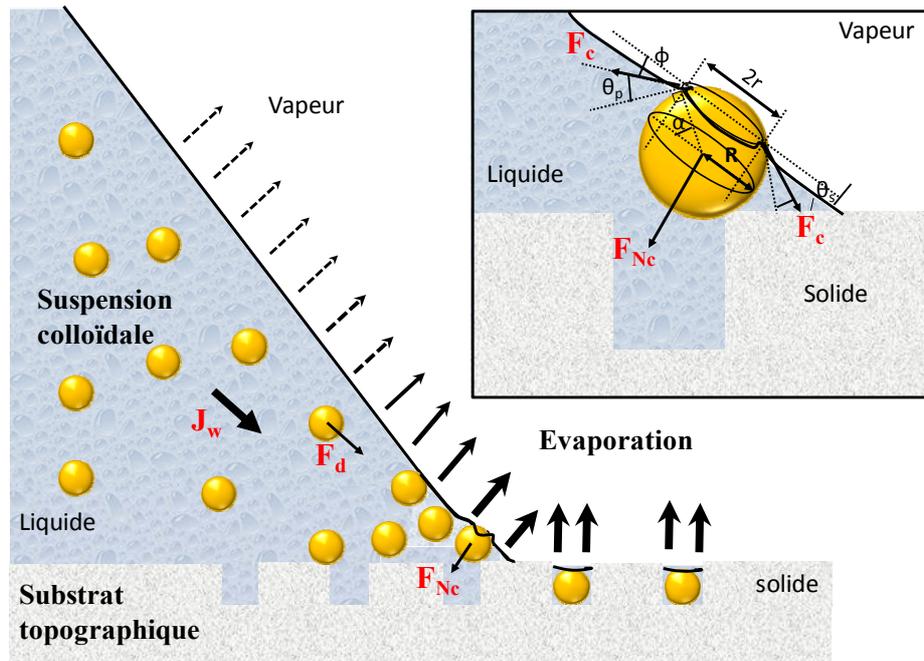


Figure 16. Vue schématique de l'assemblage par forces de capillarité dirigé par des motifs topographiques. R est le rayon de la particule, ϑ_p et ϑ_s sont les angles de contact de l'eau avec la particule et le substrat respectivement. α est l'angle d'immersion de la particule, r est le rayon du cercle décrit par la ligne de contact autour de la particule et ϕ est l'angle de la pente du ménisque formé par la particule. J_w correspond au flux de solvant induit par l'évaporation. F_d est la force hydrodynamique d'entraînement, F_c est la force de capillarité exercée à l'interface particule/solvant/air et F_{Nc} est la force de capillarité nette qui confine les particules dans les motifs.

Les principales forces mises en jeu dans le procédé d'assemblage dirigé par forces de capillarité sont la force hydrodynamique d'entraînement qui dirige les objets en suspension vers la ligne de contact et la force de capillarité qui positionne les objets dans les motifs (figure 16). Dans le cas d'une goutte de solution colloïdale, l'origine de la force hydrodynamique d'entraînement (F_d) est attribuée à des phénomènes convectifs induits par l'augmentation de l'évaporation à la ligne de contact. Pour une particule sphérique, l'expression de cette force s'écrit [28] :

$$F_d = 6 \pi \mu R v_p$$

Où R est le rayon de la particule, μ est la viscosité dynamique du milieu de dispersion et v_p est la vitesse de la particule. Ainsi, la force hydrodynamique d'entraînement est d'autant plus grande que la viscosité dynamique du milieu de dispersion et la vitesse des particules sont grandes. De plus, la force hydrodynamique est inversement proportionnelle à l'angle de contact : elle augmente avec la diminution de l'angle de contact puisque, lorsque l'angle de contact diminue, le ménisque est aminci et l'évaporation et le mouvement convectif qui compense la perte de liquide à la ligne de contact sont accentués.

La force de capillarité (F_c) à l'interface particule/solvant/air d'une particule partiellement immergée est donnée par la relation [28] :

$$F_c = 2\pi r \gamma$$

Où r est le rayon de la ligne triple de contact sur la surface de la particule ($0 \leq r \leq R$) et γ est la tension superficielle du solvant. La force de capillarité est normale à la ligne de contact particule/solvant/air et tangente au ménisque formé par la particule. La force de capillarité nette (F_{Nc}) qui s'exerce sur la particule est la force de capillarité intégrée sur la ligne de

contact particule/solvant/air. Cette force est normale au plan défini par la ligne de contact particule/solvant/air et son expression simplifiée est :

$$F_{Nc} = 2 \pi r \gamma \sin\varphi = 2 \pi r \gamma \cos(\theta_p + \alpha)$$

Où φ est l'angle de la pente du ménisque formé autour de la particule par rapport au plan décrit par sa ligne de contact, θ_p est l'angle de contact que forme le solvant sur la surface de la particule et α est l'angle d'immersion de la particule ($-\pi/2 \leq \alpha \leq \pi/2$).

Nous pouvons remarquer que l'amplitude de la force de capillarité nette est d'autant plus grande que la tension superficielle du liquide est grande.

Lorsque nous effectuons le bilan des forces en action sur la particule, nous constatons qu'un des paramètres les plus influents reste l'angle de contact de la suspension colloïdale (θ_E) sur le substrat. Bien que l'amplitude de la force de capillarité nette soit indépendante de cet angle, celui-ci joue un rôle majeur dans l'assemblage par forces de capillarité dirigé car il affecte aussi bien la force de capillarité que la force d'entraînement. En effet, l'angle de contact détermine la direction de la force de capillarité nette. Ainsi, lorsque l'angle de contact est trop faible (typiquement $\theta_E \ll 45^\circ$), la composante verticale de la force de capillarité nette prédomine sur sa composante horizontale et la force d'entraînement est prépondérante, ce qui peut conduire au dépôt prématuré de la particule sur le substrat. Lorsque l'angle de contact est trop élevé ($\theta_E \gg 45^\circ$), la composante horizontale de la force de capillarité nette est plus grande que sa composante verticale ce qui peut empêcher le piégeage de la particule dans le motif. Aussi, si la force d'entraînement est trop faible ou nulle, les objets du centre de la suspension colloïdale ne sont plus dirigés vers la ligne de contact ce qui peut conduire à l'échec de la localisation de la particule dans le motif, notamment dans le cas des petites particules fortement soumises au mouvement Brownien. Par contre, pour un angle de contact modéré ($\sim 30^\circ$), la force d'entraînement est suffisante pour diriger les solutés vers l'interface substrat/solvant/air et la direction de la force de capillarité nette est propice au bon positionnement du soluté dans le motif [3, 29].

Dans le cas précis du déplacement de la ligne triple sur un substrat en PDMS constitué de cavités topographiques, les différents mécanismes, étape par étape, qui conduisent à un assemblage des solutés dans les motifs topographiques s'opèrent de la façon suivante (Schéma 5).

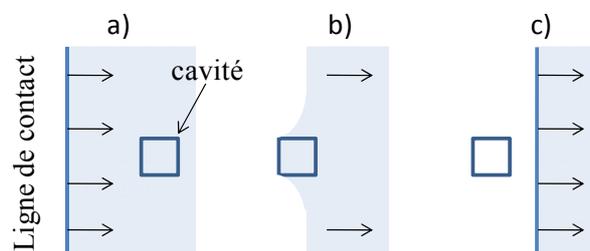


Schéma 5. Description schématique du mécanisme d'ancrage de la ligne triple sur un motif topographique. (a) la ligne de contact balaye la surface. (b) la ligne de contact est retenue par la structure topographique. (c) la ligne de contact se libère de la structure.

Approche du ménisque vers un motif.

L'angle de contact reste élevé durant le déplacement du ménisque sur le substrat car celui-ci présente une faible énergie de surface (surface non mouillante). Le flux de solvant (J_w) crée alors un flux de soluté circulaire et fermé qui amène les solutés vers l'interface liquide/vapeur, puis vers le centre du liquide. Il n'y a donc pas de dépôt de soluté sur la surface du substrat. L'assemblage n'est pas initié et les forces capillaires agissant sur les solutés sont inopérantes.

Ancrage et déformation du ménisque.

La ligne triple est retenue localement par le motif puis étirée progressivement en raison du déplacement de la goutte. L'angle de contact diminue et le liquide forme alors un film très mince. Localisée au voisinage de la ligne de contact en mouvement par rapport au substrat, l'évaporation du solvant provoque un flux de solvant (J_w) se dirigeant vers le front du ménisque qui alimente ce dernier. Les solutés migrent de l'intérieur du liquide vers le front du ménisque et leur mécanisme d'assemblage débute alors : ils sont piégés à l'intérieur des cavités par les forces capillaires (F_{Nc}).

Claquage et Relaxation du ménisque.

Le déplacement du substrat pousse la ligne triple à atteindre sa limite d'élasticité. Le ménisque est libéré du défaut. Ce phénomène peut être plus ou moins rapide et brutal. La ligne triple dissipe l'énergie accumulée en se relaxant et redevient droite. L'angle de contact revient à sa valeur d'origine, la direction des flux de solvant (J_w) ne permet plus d'alimenter le ménisque en solutés (J_w redevient circulaire et en boucle fermée). Un film mince recouvre et confine alors les particules restées dans les motifs. Les forces capillaires sont toujours en action. Elles vont rapprocher les particules entre-elles sous l'action de l'évaporation du solvant.

Il est donc à noter que pour un assemblage contrôlé des solutés, il est primordial de choisir des surfaces de travail parfaitement planes et propres pour ne pas avoir de défauts devenant des zones d'accroche non désirées en dehors des motifs.

Il est à noter que pour des objets de taille supérieure à 100 μm on bascule dans un régime de sédimentation : la densité massique des objets devient trop importante et ces derniers ne subissent plus les forces hydrodynamiques de la même façon. Pour pouvoir parvenir à les assembler par cette méthode, il faut leur redonner un mouvement en apportant une agitation fluïdique supplémentaire. Le cas de ces objets et plus particulièrement leurs mécanismes d'assemblage doit être étudié sous un autre angle.

Conclusion

Le point clé de l'assemblage par forces de capillarité réside dans le contrôle des forces hydrodynamiques d'entraînement et de capillarité lors de l'expérience. Toute la difficulté de cette technique réside dans ce contrôle afin que les autres forces présentes dans les suspensions colloïdales, en particulier le mouvement Brownien soient négligeables. Les solutés d'intérêt peuvent être des brins d'ADN, des NTCs, des bactéries, des nano-particules... Cependant, pour qu'ils soient assemblés sur une surface solide d'accueil, grâce aux forces capillaires, ils doivent être amenés jusqu'au front du ménisque. Cela peut être rendu possible par la conjugaison adéquate de différents paramètres expérimentaux. On peut alors citer: la température, la tension de surface de l'interface liquide/vapeur (concentration en agent tensioactif), l'énergie de surface de la surface solide d'accueil, la concentration en soluté. Nous avons vu aussi le rôle important que pouvaient jouer des motifs de surface sur le piégeage du ménisque. Nous pouvons dire que les structurations de surface (chimiques ou topographiques) combinées au contrôle fin des paramètres expérimentaux peuvent conduire les forces capillaires et hydrodynamiques à diriger et localiser l'assemblage sur de larges étendues.

Il reste maintenant à déterminer une méthode expérimentale qui permette de déplacer la ligne triple au dessus d'une surface comportant des motifs, tout en permettant le contrôle fin de ces paramètres. C'est l'objet de la plateforme expérimentale que nous allons maintenant décrire.

II. B. Présentation de la plateforme expérimentale

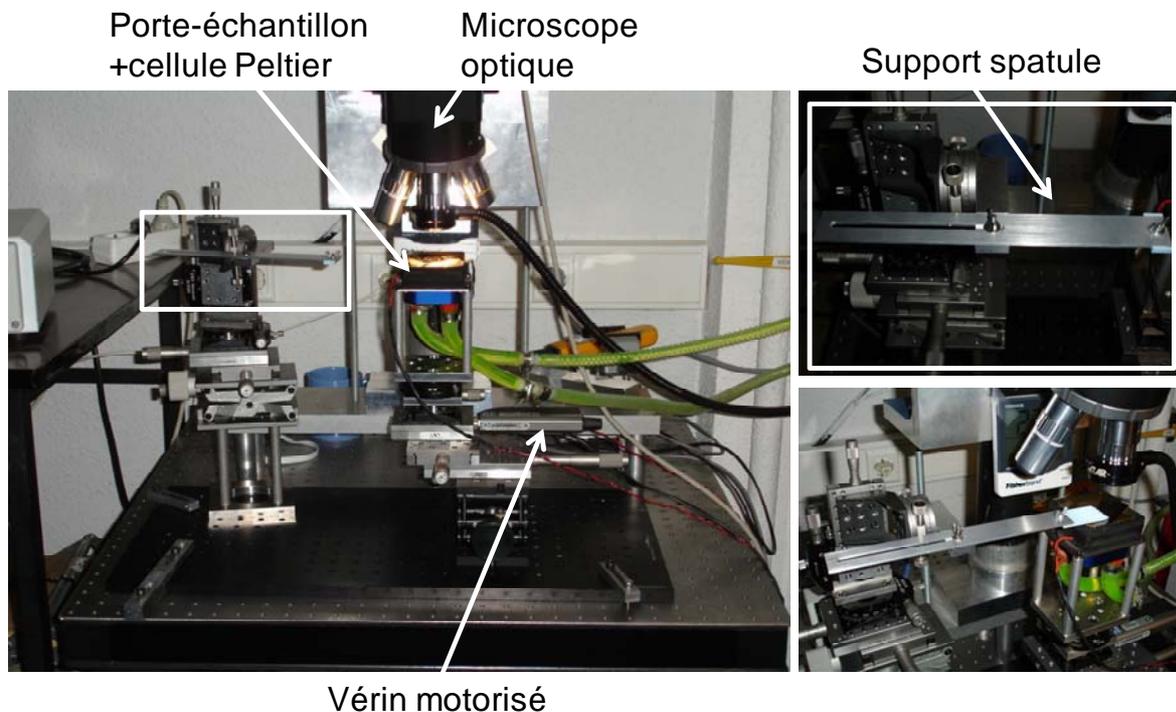


Figure 16. Photographies du dispositif expérimental d'assemblage capillaire dirigé (à gauche le montage, et à droite des zooms sur le bras de soutien de la spatule fixe).

Guider de manière précise le positionnement d'objets colloïdaux d'intérêt est un verrou technologique important qui conditionne leur intégration au sein de systèmes fonctionnels. Les phénomènes capillaires peuvent être utilisés afin de diriger en parallèle ces objets vers des sites choisis et suivant des arrangements contrôlés. La plateforme expérimentale mise en place au LAAS par Mike Geneviève, ancien doctorant du groupe [3], a la capacité de répondre à ce verrou technologique. Le principe du montage expérimental est présenté sur la figure 16. Il permet d'organiser sur de grandes surfaces solides un grand nombre d'objets initialement en suspension dans une solution.

Le principe du système d'assemblage dirigé d'objets par effet capillaire et convectif est simple. Le substrat d'accueil sur lequel on souhaite assembler les objets est placé sur une cellule Peltier permettant de réguler le substrat en température, elle-même placée sur une platine en translation suivant l'axe x. Cette platine peut être mise en translation à vitesse contrôlée (de 100 nm/s à 1mm/s) par un vérin motorisé assisté par ordinateur avec une précision de positionnement de 10 nm. Une goutte de 30 μ l de la solution contenant les objets que l'on souhaite assembler en suspension est déposée sur ce substrat d'accueil. Ensuite, une spatule en verre fixe est placée horizontalement sur la goutte et maintenue à une hauteur fixe d'environ 1mm au dessus du substrat par adhésion capillaire. Il est à noter que le bras de soutien de la spatule est fabriqué en plexiglas flexible ce qui permet que la spatule soit placée sur la goutte sans exercer de contraintes. La goutte est ainsi confinée entre la spatule de verre et le substrat et c'est donc l'adhésion capillaire qui gardera par la suite la distance spatule-substrat constante. Le substrat d'accueil pouvant se mouvoir par rapport à la spatule de verre fixe, le ménisque de liquide parcourt de la même façon le substrat sur toute son étendue. Le substrat d'accueil peut être une surface en silicium, une lamelle de verre, un timbre en PDMS ou n'importe quel support présentant un contraste chimique ou topographique de façon à induire la localisation des objets aux endroits désirés. En effet, ces structures vont accrocher localement le ménisque en déplacement par rapport à la surface d'accueil pendant un temps caractéristique que l'on appelle temps d'« ancrage ». Pendant ce temps, en fixant la température de la surface d'accueil à une valeur de consigne donnée, les phénomènes d'évaporation vont induire des flux convectifs créant à leur tour un transfert de masse (solutés et solvant) vers la ligne triple. Là, sous l'action des forces capillaires, les solutés ou objets vont alors s'organiser uniquement sur les structures ou motifs.

Une table de travail antivibratoire type M-IG supporte l'ensemble du montage expérimental : le porte échantillon, le bras ou support de la spatule de verre, et le microscope optique. Il s'agit d'une table d'optique de 59 mm d'épaisseur pour une planéité surfacique de $\pm 0,15$ mm par carré de 600 mm. Elle est placée sur quatre pneumatiques permettant une très bonne isolation des vibrations du sol. Le porte-échantillon et le support de la spatule ont la particularité de déplacer l'échantillon et la spatule dans toutes les directions de l'espace. En effet, dans le cas du porte-échantillon, celui-ci est posé sur des platines de déplacement ayant une précision de positionnement proche du micron. La température du porte-échantillon est régulée grâce à la cellule Peltier qui est contrôlée par un régulateur PID avec une précision de $\pm 0,002^\circ\text{C}$ et une plage de température allant de $+5^\circ\text{C}$ à $+55^\circ\text{C}$. Un système d'observation et de contrôle par microscopie optique relié à une caméra CCD et couplé à un système informatique permet de détecter et de suivre en temps réel le front du ménisque, de contrôler les déplacements de l'échantillon et enfin d'enregistrer des paramètres environnementaux comme la température ou l'humidité relative durant les expériences au travers d'une sonde placée proche du front du ménisque.

L'interface de commande du vérin en translation a été programmée sous LabWindows CVI. Elle permet de contrôler la vitesse et la position de l'échantillon de façon manuelle ou automatique.

II. C. La structuration topographique de surface

Nous avons vu précédemment que l'organisation et la distribution des objets sur une surface solide est basée sur le piégeage du ménisque par des motifs particuliers capables de diriger les phénomènes de convection vers le front du ménisque. Pour obtenir cet ancrage, il faut avoir un motif de surface adéquat. Ici le motif n'est pas aléatoire mais au contraire parfaitement maîtrisé de façon à piéger le ménisque de façon contrôlée à des endroits bien spécifiques et définis. Il existe alors deux voies possibles : soit on utilise des motifs à contraste chimique, soit on utilise des motifs topographiques. De façon très personnelle, j'ai opté pour l'utilisation de motifs topographiques pour l'ensemble des applications qui seront exposées postérieurement. En effet, les différentes expériences que j'ai menées en utilisant des surfaces à contraste chimique ont donné des assemblages avec un taux d'assemblage non spécifique assez élevé. L'utilisation de motifs topographiques présente l'avantage de n'induire aucun dépôt des solutés en dehors des motifs.

Les motifs topographiques peuvent être en forme de creux ou de bosse en utilisant des timbres de PDMS dits « positifs » ou « négatifs » à partir tout simplement de répliquations de moules en silicium « négatifs » ou « positifs » respectivement (voir I.B). La conception des motifs demande une réflexion quant à leur disposition, leurs dimensions, leur profondeur et leur orientation. En effet, la taille des motifs, par exemple, détermine le nombre et la disposition des objets qui y seront assemblés pour des assemblages de géométrie contrôlée. Bien évidemment, en raison de la dispersion en taille des objets en suspension, les motifs peuvent être intentionnellement élargis afin de faciliter cet assemblage en compensant les fluctuations de taille d'un objet à l'autre. La profondeur des motifs est également un paramètre géométrique clé car elle détermine le nombre de couches qui seront déposées à l'intérieur des motifs. Pour obtenir une couche d'objets et pour qu'ils puissent également être transférés facilement par la suite, la profondeur des motifs doit être de l'ordre du diamètre des objets. L'orientation préférentielle des motifs par rapport à la ligne de contact est déterminée par la déformation de cette dernière lorsqu'elle balaye la surface. La règle de conception que nous avons retenue est que la déformation de la ligne de contact doit être minimisée afin d'éviter un décrochage brusque et précoce, ceci de manière à ce que les forces mises en jeu puissent réunir le plus d'objets et remplir les motifs de façon adéquate. Une dernière règle à prendre en compte concerne le choix de l'emplacement des repères ou marques d'alignement. En effet, ceux-ci sont généralement fabriqués dans la même étape de lithographie pour faciliter le repérage des motifs : il s'agit donc le plus souvent de structures assez larges. Il faut bien entendu les disposer suffisamment loin des structures où l'on souhaite assembler les objets car ces repères risquent de déformer fortement la ligne de contact et de provoquer une perturbation majeure de l'assemblage sur les motifs. De la même manière, la périodicité des motifs doit être suffisamment grande afin que la ligne triple puisse s'ancrer sur chaque rangée de motifs sans en sauter une, phénomène qui peut se produire lorsque le décrochement de la ligne triple d'une rangée de motifs est brutal (phénomène observé pour les grandes vitesses de déplacement).

Lors des études qui ont été menées dans le cadre de cette thèse, nous avons observé que les motifs en creux permettent le piégeage des objets à l'intérieur des structures. Nous nous sommes donc limités à l'utilisation de ce type de structures uniquement.

La figure 17 présente le layout des moules micrométriques et nanométriques utilisés, respectant les règles de conception précédemment citées, pour l'assemblage de molécules d'ADN et de nanoparticules métalliques respectivement. Ces résultats obtenus avec la stratégie utilisant l'assemblage capillaire seront décrits dans les chapitres 4 et 5 suivants.

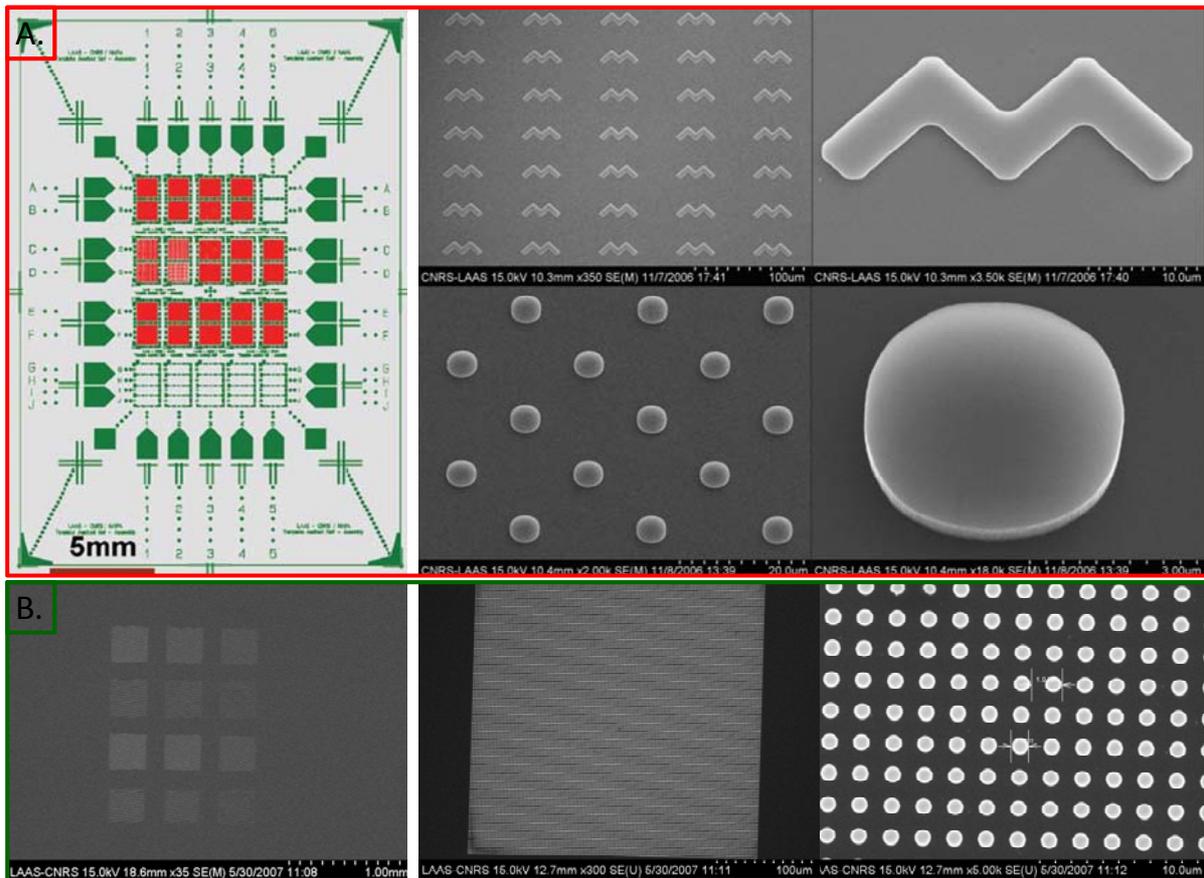


Figure 17. A) Moule en silicium micrométrique utilisé. A gauche layout ou design du moule, à droite images MEB de quelques exemples de structures micrométriques de ce moule. B) Moule en silicium nanométrique utilisé. Images MEB des structures nanométriques d'un des réseaux de ce moule. Les moules A) et B) ont été utilisés pour la fabrication de motifs en PDMS micrométriques et nanométriques respectivement.

II. D. Mise en place de l'expérience

Dans la pratique, le montage expérimental d'assemblage capillaire se trouve dans une pièce de travail isolée par des rideaux opaques de façon à travailler dans des conditions stables.

Toutes les expériences ont été conduites à une température ambiante ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) avec une humidité relative ambiante moyenne de 40%.

Voici les différentes étapes pour la mise en place d'une expérience type d'assemblage capillaire dirigé par structuration topographique de surface :

1. On place le timbre en PDMS micro- ou nanostructuré sur le porte-échantillon
2. On fixe la température du timbre, donc le taux d'évaporation grâce au régulateur PID. On attend stabilisation.
3. On aligne le bord de la spatule de verre par rapport aux motifs du timbre à l'aide du microscope optique (objectif x50) et des platines de déplacement.
4. On dépose une goutte (30 μl) de suspension des objets à déposer entre la surface du timbre et la spatule de verre fixe.
5. On descend horizontalement la spatule jusqu'à effleurer la goutte et former un pont capillaire.
6. On détermine une vitesse de déplacement du substrat grâce à l'interface logiciel et on lance l'application.

II. E. Transfert

Les timbres en PDMS obtenus par moulage sur des moules micro/nanostructurés en silicium peuvent être utilisés comme substrat pour l'assemblage capillaire dirigé. Il est alors possible d'imaginer le transfert de ces assemblages depuis ce timbre vers une surface d'accueil par contact printing (voir schéma 6). Les principales questions scientifiques posées par ce procédé sont : Est-ce que le transfert est efficace ? Est-ce que lors du transfert, la précision de la localisation des objets et la forme de leur assemblage est conservée ?

Selon la nature des objets à transférer, ceux-ci vont nécessiter ou non d'une étape supplémentaire pour assurer leur transfert. De façon générale, les objets micrométriques, assemblés dans des motifs micrométriques ou assemblés selon des lignes sont plus faciles à transférer et en règle générale, leur transfert s'effectue par simple contact entre le timbre et une surface hydrophile (lamelle de verre fonctionnalisée APTES par exemple, suivant le protocole décrit I.D). La préférence chimique pour la surface d'accueil ainsi que la surface de contact des objets est alors suffisante pour permettre leur transfert. Ce n'est pas le cas par contre dans le cas des nanoparticules ou d'objets assemblés dans des motifs nanométriques. Ici, l'assemblage se faisant « à sec », il faut « forcer » leur transfert en utilisant un film liquide comme intermédiaire. En pratique, la méthode que nous avons mise au point consiste à déposer une goutte d'éthanol ou d'eau DI sur le substrat d'accueil préalablement activé ou rendu hydrophile. La goutte s'étale jusqu'à former un film très mince à la surface du substrat. Ensuite le timbre contenant les objets assemblés est mis en contact avec cette surface et le tout est placé dans une étuve à $100\text{-}110^{\circ}\text{C}$. Nous avons observé que plus on laisse l'échantillon dans l'étuve, donc plus le solvant est évaporé, plus le transfert est optimal (typiquement à partir de 20 minutes environ) [30]. Cette méthode de transfert sera illustrée dans le cas de nanoparticules métalliques au Chapitre 5.

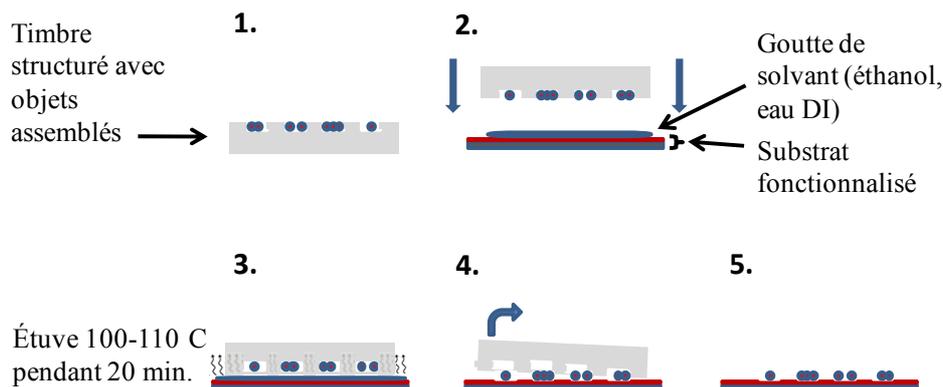


Schéma 6. Méthodologie mise en place pour le transfert de nanoparticules ou nano-objets assemblés, du timbre vers une surface d'accueil en utilisant un film mince de liquide comme intermédiaire de transfert.

II. F. Extensions : vers le multiplexage

La technique d'assemblage capillaire précédemment décrite présente l'avantage de pouvoir être adaptée suivant les applications. Une de ces adaptations majeures est son évolution vers le multiplexage.

En effet, l'un des besoins auxquels nous avons été confrontés est celui exprimé par les chercheurs réalisant des expériences sur des molécules uniques. L'intérêt des techniques de molécules uniques est qu'il s'agit de techniques puissantes pour étudier les forces et mouvements associés aux biomolécules et à une activité enzymatique [31-32]. En étudiant les réactions chimiques à l'échelle d'une molécule unique, nous avons accès à une mesure directe de leurs propriétés plutôt qu'à une mesure moyennée. Les systèmes étudiés se composent généralement d'une molécule d'ADN attachée à une bille et le tout est manipulé avec des pinces magnétiques ou optiques. De nos jours, ces systèmes ADN-billes sont construits par une succession d'incubations et le résultat est un dépôt aléatoire et non maîtrisé de ces systèmes sur la surface avec très peu de systèmes fonctionnels à étudier. De par ce fait, ces expériences sont généralement très coûteuses en temps, peu reproductibles et aucune analyse statistique ne peut être effectuée. De plus, l'expérience ne peut pas être réalisée sous différentes conditions à la fois, en testant plusieurs inhibiteurs ou plusieurs substrats enzymatiques simultanément par exemple.

Ainsi, pour répondre à ce besoin, nous avons remplacé la spatule de verre fixe utilisée dans le montage d'assemblage capillaire par une spatule « multiplexée » avec quatre canaux indépendants reliés chacun à un réservoir (voir figure 18). Les canaux sont distants de 300 μm et le volume pouvant être accueilli par les réservoirs est de 5 μl seulement. Cette réduction en volume est avantageuse en biologie où les volumes manipulés sont très faibles. Les premiers prototypes ont été fabriqués en polyuréthane par Xavier Dollat, ingénieur responsable de l'atelier mécanique du LAAS. La version finale a été ensuite réalisée en aluminium (figure 19) car ce matériau présente l'avantage d'être naturellement hydrophile et d'avoir un bon état de surface (lisse, non poreux).

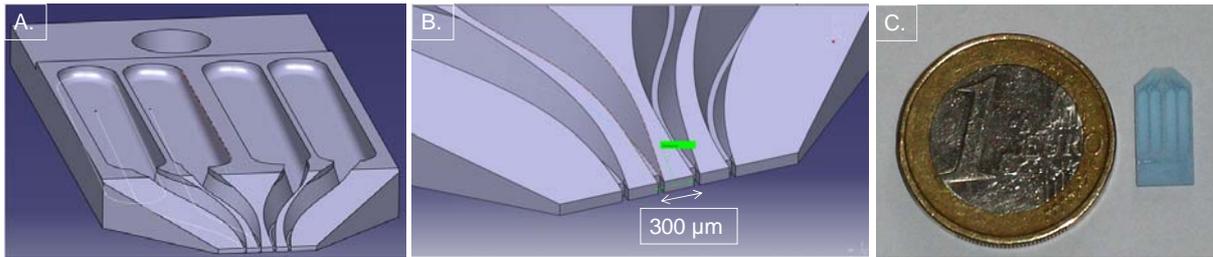


Figure 18. Représentation 3D (réalisée avec le logiciel Catia) du prototype de la spatule multicanaux (A, B) puis photographie de la pièce usinée en polyuréthane (C).

Grâce à cette solution technologique, nous pouvons donc imaginer assembler simultanément quatre solutions d'ADN, avec quatre séquences différentes par exemple. Cette perspective pourrait permettre de grandes avancées et des gains de temps considérables pour des études statistiques et plus représentatives dans le domaine des moteurs moléculaires.

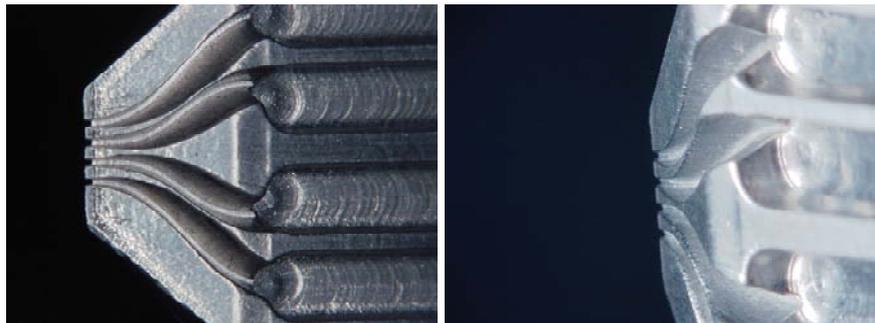


Figure 19. Spatule multicanaux usinée en aluminium.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 20, cette pièce peut également être fabriquée sous une autre version dans laquelle les réservoirs sont remplis au travers de capillaires directement branchés à l'arrière de la pièce.

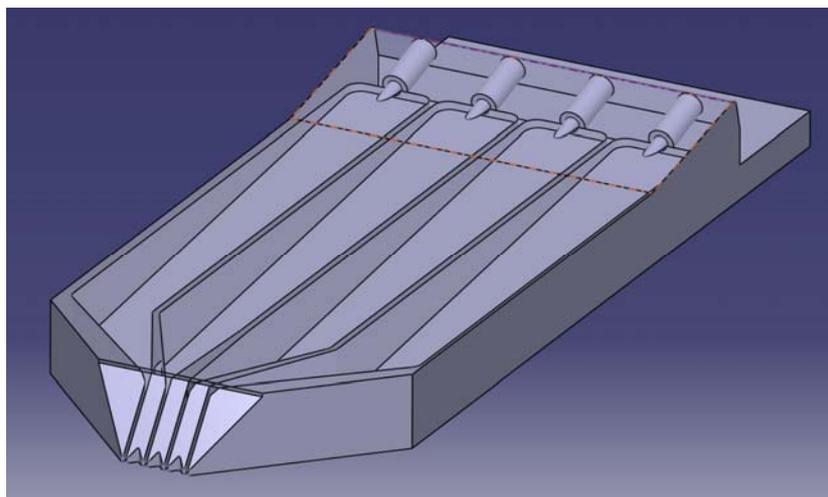


Figure 20. Deuxième version du prototype de la spatule multicanaux avec possibilité d'injection des solutions par le biais de capillaires reliés en amont.

De manière générale, cette évolution technique de la méthode d'assemblage capillaire permettra d'assembler simultanément plusieurs types d'objets différents tout en conservant un contrôle maximum sur les paramètres d'assemblage.

III. Techniques de caractérisation utilisées

Pour caractériser l'ensemble de nos échantillons nous avons eu recours à des techniques de microscopie et de quantification dynamique diverses. Ces caractérisations sont menées aux différentes étapes du procédé, avant l'assemblage, après l'assemblage, et éventuellement après le transfert.

III. A. Les microscopies « conventionnelles »

III. A. 1. La Microscopie Optique : mode en champ sombre

En éclairant un échantillon sous incidence rasante, tout objet sur la surface diffusant la lumière de manière isotrope va apparaître clair sur fond sombre. On obtient donc un contraste dit « en champ sombre » (*dark field*).

Cette technique sert essentiellement à obtenir une première approche qualitative des échantillons. Elle permet uniquement d'observer la qualité globale de l'état de surface après assemblage ou transfert de l'échantillon car la résolution est très limitée.

III. A. 2. La Microscopie Optique en fluorescence

La microscopie en fluorescence (ou en *épi*fluorescence) est une technique utilisant un microscope optique en tirant profit du phénomène de fluorescence et de phosphorescence, au lieu de, ou en plus de l'observation classique par réflexion ou absorption de la lumière. La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie en fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise.

Cependant, la majorité des objets d'intérêt ne sont pas fluorescents et il est alors nécessaire de les modifier afin de leur greffer une molécule fluorescente. Par exemple, l'observation de molécules d'ADN peut être réalisée en intercalant ces groupements fluorescents au sein de la double hélice.

III. B. La Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules (électrons secondaires et photons X). Différents détecteurs permettent d'analyser ces particules et de reconstruire une image de la surface (la résolution se situe entre 1 nm et 20 nm).

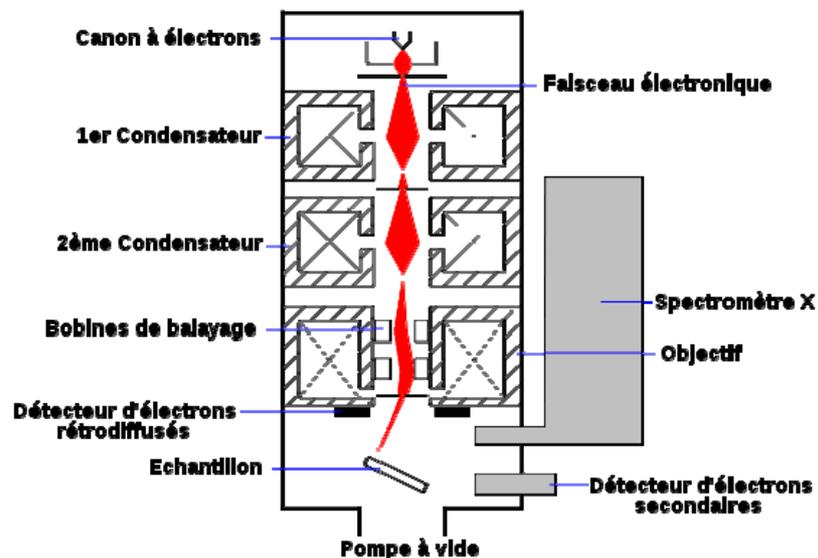


Figure 21. Principe de fonctionnement du MEB. Une sonde électronique fine est projetée sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre la sonde électronique et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

Le MEB fournit des données semi-quantitatives qui sont particulièrement utiles, de par sa résolution, en complément des informations fournies par les autres techniques de caractérisation.

III. C. La Microscopie à Force Atomique (AFM)

Le moyen de caractérisation que nous avons utilisé préférentiellement pour caractériser les substrats à chaque étape des procédés technologiques présentés précédemment a été la microscopie à force atomique (AFM). L'AFM est une technique récente issue du développement des Nanotechnologies. Cette technique d'analyse de surface non destructive développée par G. Binnig *et al.* en 1986 permet de visualiser des reliefs topographiques avec une résolution de l'ordre du nanomètre sur tous types d'échantillons aussi bien conducteurs que non conducteurs. L'utilisation de ces microscopes reste assez confinée au domaine des matériaux et des dispositifs électroniques. Toutefois, des systèmes récents permettent d'étudier finement la matière vivante (cellules, bactéries, protéines, ADN...) en milieu liquide, à l'échelle moléculaire.

Ces systèmes AFM sont couplés à des microscopes optiques équipés pour l'observation d'échantillons en fluorescence. Cette combinaison permet une étude complète et multi-échelle des échantillons biologiques allant de leur morphologie jusqu'à la mesure des propriétés d'adhésion à l'échelle moléculaire. Ces nouveaux AFM se sont donc avérés particulièrement bien adaptés aussi bien à la caractérisation des dépôts localisés de monocouches de silane qu'à l'imagerie de cellules à l'état vivant ou de molécules d'ADN.

Les AFM en question sont deux microscopes installés au LAAS puis à l'ITAV : un NanoWizard II BioAFM de la société allemande *JPK Instruments* et un BioScope II de la société nord américaine *VEECO*.

L'imagerie AFM de ce travail de thèse a été essentiellement réalisée à l'air et en milieu liquide, en mode tapping et en mode contact, avec des pointes symétriques en silicium MPP 32100 ($k=0.1$ N/m, $f_0 = 10$ kHz), MPP 21100 ($k=3$ N/m, $f_0 = 75$ kHz), puis triangulaires en nitrure de silicium MLCT-AUHW ($k = 0.03$ N/m, $f_0 = 10-20$ kHz) de la société *VEECO*.

III. C. 1. Principe de fonctionnement

Le principe de fonctionnement de l'AFM repose sur la détection des forces s'exerçant entre la surface de l'échantillon et une pointe de quelques micromètres de hauteur.

Il faut savoir qu'à l'échelle nanométrique, les forces interatomiques (forces électrostatiques, de Van der Waals, etc) ne sont plus négligeables et elles doivent être prises en compte dans le principe de mesure. La microscopie à force atomique fait mieux que cela : elle s'appuie sur ces forces pour caractériser l'état de surface des matériaux et certaines de leurs propriétés physico-chimiques (électriques, magnétiques, etc).

Le principe de l'AFM est présenté sur la figure suivante :

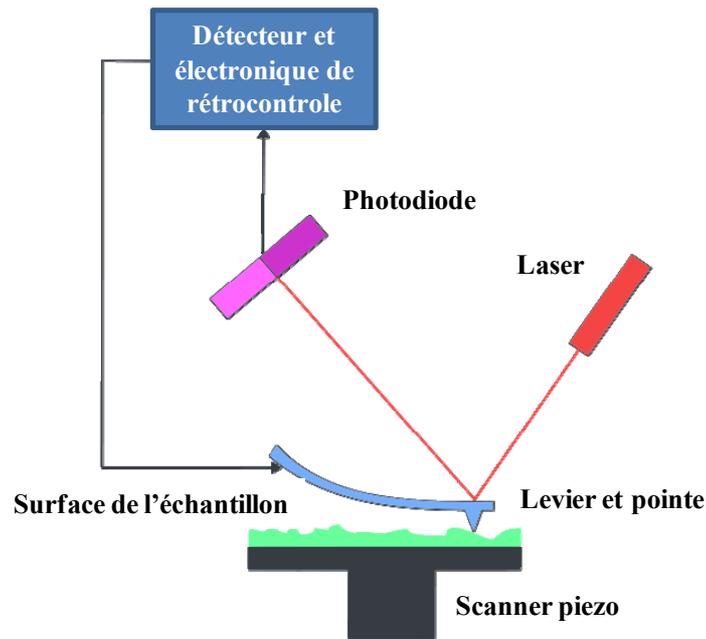


Figure 22. Schéma de principe d'un microscope à force atomique

Un capteur de force miniaturisé se déplace au voisinage de la surface de l'échantillon. Les dimensions du capteur et sa proximité avec la surface permettent une localisation spatiale de la grandeur physique mesurée. Le capteur utilisé en AFM est un ressort lame (le cantilever ou encore le levier) muni d'une pointe très fine (jusqu'à 10 nm de rayon et 10 μm de hauteur) qui interagit avec la surface de l'échantillon. Un faisceau laser se réfléchit sur le dos du levier, et permet de mesurer ses déformations sous l'effet des forces d'interaction : le déplacement du spot sur une cellule photoélectrique divisée en quatre cadrans renseigne sur la déflexion et la torsion du levier. Les déplacements de la pointe imageante sont en général assurés par la déformation d'un tube piézoélectrique. En pratique, on peut aussi bien rencontrer des systèmes où l'échantillon se déplace par rapport au capteur fixe (VEECO), que des systèmes où c'est le capteur qui balaye la surface (JPK). Le système peut fonctionner à l'air, dans le vide ou dans un liquide et peut réaliser des mesures à différentes températures.

On peut former une image en portant une ou plusieurs des caractéristiques du levier en interaction (déflexion, torsion, amplitude de vibration...) en chaque point de l'échantillon. On peut aussi asservir la distance entre le levier et la surface à une valeur constante d'une de ces caractéristiques, en jouant sur le déplacement z du tube piézoélectrique. Les valeurs de la hauteur permettent de générer une image 3D de la topographie de l'échantillon.

Le levier et la pointe constituent naturellement des éléments-clé de l'instrument. Comme la résolution spatiale des mesures est liée au rayon de courbure de l'extrémité de la pointe, on cherche à miniaturiser la taille de la pointe. Pour les produire, on utilise des procédés de micro-fabrication développés pour la microélectronique. Suivant les modes de fonctionnement de l'AFM, on utilise des leviers dont les caractéristiques sont un peu différentes. Le levier est caractérisé par deux grandeurs, sa constante de raideur k et sa fréquence de résonance f , qui s'expriment par les relations suivantes :

$$k = (E/4) \times W \times T^3 / L^3$$

$$f = 0,162 \times \sqrt{(E/\rho)} \times (T/L^2)$$

où E est le module d'élasticité (module d'Young) du matériau utilisé, W la largeur du levier, T son épaisseur, L sa longueur et ρ la densité du matériau ($2,33 \text{ g/cm}^3$ dans le cas du silicium).

Ainsi, plus le levier est long, plus il est souple (et plus il est épais, plus il est rigide). Le type de levier est déterminé par l'application à laquelle il est destiné, et donc par le mode de mesure utilisé. A chaque mode correspondent une certaine constante de raideur et une certaine fréquence de résonance du levier (les valeurs standards sont de $0,2 \text{ N/m}$ et 13 kHz pour le mode contact, et 42 N/m et 300 kHz pour le tapping). Suivant les applications on privilégie l'un ou l'autre des modes de mesure. Le levier est habituellement constitué de silicium, mais l'on peut aussi trouver des leviers plus souples en nitrure de silicium, notamment pour les mesures en phase liquide (en électrochimie) ou sur des échantillons biologiques.

Ainsi, grâce à différents modes de fonctionnement et des leviers adaptés, il est possible de tirer, en plus des images représentant la topographie des surfaces, des informations supplémentaires sur les propriétés physico-chimiques de surface comme les forces d'adhésion, les propriétés chimiques, mécaniques, tribologiques, magnétiques, ou électrostatiques de la surface.

III. C. 2. Les différents modes d'imagerie

Dans le **mode contact**, le premier développé, la pointe « touche » la surface comme dans un dispositif palpeur. Sans faire vibrer le levier, on module la position verticale de l'échantillon et on enregistre les déflexions du levier. Les torsions du levier nous donnent également une mesure de la force latérale, détectée comme un déplacement du spot laser dans le plan horizontal : on peut obtenir alors des informations sur la nature chimique de la surface balayée (tribologie, adhésion, énergie de dissipation).

Sur certains échantillons cependant, l'usure et les déformations engendrées par la pointe perturbent la qualité des images. Ce mode est rapide, facile à utiliser et il est souvent couplé à des mesures simultanées de frottement, d'adhérence ou de raideur de contact.

Le **mode tapping** ou contact intermittent consiste à faire osciller le levier à sa fréquence de résonance avec une amplitude variable (de 10 à 100 nm). A chaque oscillation, la pointe entre en contact intermittent avec l'échantillon. Ce contact entraîne une diminution de l'amplitude des oscillations. Un système de rétroaction ajuste la distance pointe-échantillon de façon à garder l'amplitude des oscillations constante et génère ainsi l'image 3D de la topographie. Les forces appliquées sur les surfaces peuvent être fortement réduites et le temps de contact très court n'induit pratiquement pas de forces de frottement. On évite ainsi les déformations de certains échantillons et l'usure toujours possibles en mode contact. De plus, à cause de la brièveté du contact, l'adhésion n'a pas le temps de se développer. Les dimensions du contact sont petites même sur des échantillons très déformables tels que les biomolécules, conférant à ce mode une bonne résolution latérale. Quand la hauteur de l'échantillon est asservie à une amplitude constante, le déphasage entre l'excitation et l'oscillation du levier est caractéristique des dissipations du système. Les images de phase peuvent ainsi révéler de légères hétérogénéités des surfaces correspondant à des propriétés viscoélastiques, d'adhésion ou de mouillages différents.

III. C. 3. Mesures de force : la nanomécanique

Dans le cas de la fonctionnalisation de surface, le faible relief topographique en surface des échantillons complexifie le discernement des différentes espèces chimiques présentes. Il existe un mode particulier de l'AFM qui permet d'effectuer un cycle d'approche-retrait de la pointe sur une région localisée de la surface afin d'évaluer la signature de la surface obtenue lors de l'interaction entre la pointe et les molécules en surface : c'est ce que l'on appelle un test de force qui peut ainsi révéler des zones ayant des propriétés chimiques de surface différentes.

Une courbe de déflexion, ou courbe de force (figure 23), est l'enregistrement de la déflexion du microlevier en fonction du déplacement oscillant en z de la surface par rapport à la pointe; la courbe de force est obtenue grâce à la loi de Hooke, qui relie la force F exercée sur le microlevier, sa raideur k et la déflexion z mesurée: $F = k \times z$

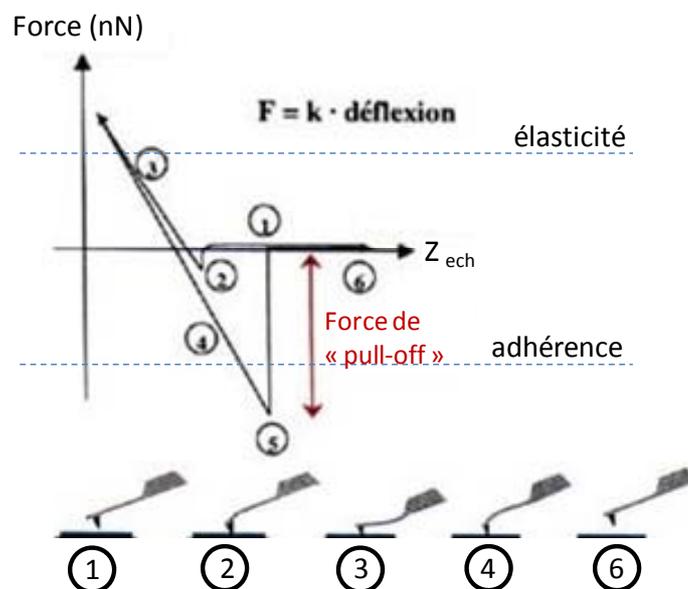


Figure 23. Une courbe de force sur un matériau indéformable idéalisée. La déflexion du levier est portée en fonction de la position verticale de l'échantillon.

La courbe de force idéale représentée ci-dessus (figure 23) représente les variations de la déflexion du levier en fonction de la hauteur de l'échantillon. Un cycle approche-retrait est présenté. Lorsque le levier est loin de la surface, la déflexion est nulle (1). Il subit les interactions à longue distance attractives comme les forces électrostatiques et les forces de Van der Waals. Lorsque ces forces attractives entrent en jeu, le levier est défléchi jusqu'à la valeur limite fixée par sa constante de raideur k finie. Lorsque le gradient des forces devient supérieur à la valeur de k , à une distance très proche de la surface, une instabilité apparaît: la pointe entre brusquement en contact avec l'échantillon, c'est le « jump to contact » (2). Si on continue encore de déplacer l'échantillon vers la pointe, la déflexion du levier est inversée: la pointe est pressée contre le matériau par l'élasticité du levier. Elle peut alors s'enfoncer dans l'échantillon (indentation), et la déflexion enregistrée est moindre que celle qui serait obtenue

sur un échantillon infiniment rigide. La forme et la pente de cette partie de la courbe sont susceptibles de fournir des informations sur les propriétés mécaniques du matériau. En effet, on peut réaliser une mesure locale du module d'élasticité de la surface. Lorsque le mouvement s'inverse (3), la pointe adhère sur la surface et une hystérésis est généralement observée ; la pointe reste collée à la surface lorsque l'on dépasse le point de contact (4). Lorsque la force de retrait est supérieure à la force d'adhésion ou force de « pull off » qui est donnée par la déflexion négative maximale atteinte (5), le levier est libéré de la surface puis de toute interaction (6). D'après ces remarques, on conçoit que l'AFM soit sensible aussi bien aux propriétés physico-chimiques des surfaces qu'aux propriétés mécaniques de l'échantillon.

A partir de la pente de la portion linéaire de la courbe, il est possible de déterminer la constante de raideur du matériau sondé (en N/m) en utilisant la formule [33-34] :

$$k_B = -k_c \frac{s}{(k_c + s)}$$

Où k_c correspond à la constante de raideur du levier et s est la pente négative. Il est également possible de déterminer k_B à partir de la courbe d'indentation en utilisant la l'équation suivante:

$$F = \frac{2}{\Pi} \frac{E}{(1-\nu^2)} \tan(\alpha) \times \delta^2 + k_B \delta + A$$

Où α est l'angle du cône d'ouverture, E correspond au module d'élasticité ou module de Young, ν est le coefficient de Poisson et A est une constante.

Cette équation décrivant la courbe d'indentation combine le modèle de Hertz et la loi de Hooke pour tenir compte du comportement non linéaire et linéaire de la force. Elle relie la force à la profondeur d'indentation. Il est à noter que le modèle de Hertz est largement utilisé pour décrire la réponse élastique de cellules biologiques indentées par une pointe AFM [35-36].

Les courbes de forces sont utilisées pour mesurer les forces d'adhésion entre la pointe et l'échantillon (dans le cas d'un levier de faible raideur), mais aussi pour obtenir des courbes d'indentation (dans le cas d'un levier de raideur importante). Les mesures de forces d'adhésion se font souvent en milieu liquide afin de s'affranchir des grandes forces de capillarité et des forces électrostatiques, souvent présentes sur les surfaces isolantes.

Intéressons nous maintenant au mode *cartographie de force* de l'AFM. Il s'agit d'une cartographie locale du comportement élastique en surface. En effet, l'AFM permet d'effectuer un test de force (approche-retrait) sur les endroits correspondant à chaque pixel de l'image. On peut jouer soit sur la force appliquée par la pointe sur l'échantillon, soit sur la distance pointe-échantillon. On peut également fixer une consigne pour se placer soit dans le mode d'élasticité, soit dans le mode d'adhérence (figure 23). Dans ce cas, une boucle d'asservissement calcule en chaque point l'écart de chaque courbe par rapport à cette consigne et la cartographie ainsi obtenue peut être interprétée en termes de raideur de contact ou de propriétés chimiques des molécules en surface.

Dans notre cas, nos substrats à la base rigides (lamelle de verre ou wafer en silicium), sont recouverts d'une couche non plus élastique mais viscoélastique (biomolécules, cellules...). Cet édifice hétérogène rend la tâche plus ardue. En effet, la spectroscopie de force à évaluer est donc un mélange des deux réponses et reste loin de la figure canonique présentée figure 23. L'interprétation et l'utilisation de ce type d'information reste donc complexe et à prendre

avec précaution. De plus, ce type de cartographies de force est réalisé sur des régions très réduites de l'échantillon ce qui rend toute interprétation délicate étant donné que nous ne sommes pas en mesure d'avoir une vue d'ensemble de l'échantillon.

Pour obtenir une caractérisation plus quantitative de nos échantillons, nous avons eu recours à une autre technique non plus du domaine de la microscopie mais du domaine des capteurs biologiques.

III. D. La microbalance à quartz (QCM)

Cette quatrième méthode de caractérisation est la microbalance à quartz (QCM). En mesurant la fréquence de résonance mécanique d'un quartz, la technologie QCM permet de caractériser la formation de films minces (quelques nanomètres) de protéines, de polymères ou de cellules adsorbés à la surface du quartz en milieu liquide. L'analyse de la dissipation mécanique du système permet également de remonter à des informations sur la nature viscoélastique des films.



Figure 24. Image du système Quartz Crystal Microbalance – Dissipation (Q-SENSE E4). Ce système permet de faire des études comparatives de cinétiques de greffage biomoléculaire (sensibilité de l'ordre de 20 ng/cm²). Il contient 4 cellules fluidiques qui peuvent être utilisées en série ou en parallèle pour s'adapter à une large variété de protocoles expérimentaux.

Le principe de fonctionnement est simple : un cristal piézoélectrique subit une oscillation suite à une stimulation électrique appliquée par des électrodes. La fréquence de résonance du cristal est corrélée à sa masse. Tout ajout ou retrait de masse provoque un glissement de la fréquence de résonance ; en mesurant cette différence de fréquence Δf , on peut calculer la différence de masse Δm grâce à la relation de Sauerbrey :

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

où f_0 est la fréquence de résonance intrinsèque du cristal, A la surface active du cristal (entre les électrodes), ρ_q la densité du matériau (par exemple le quartz) et μ_q le module de cisaillement du matériau.

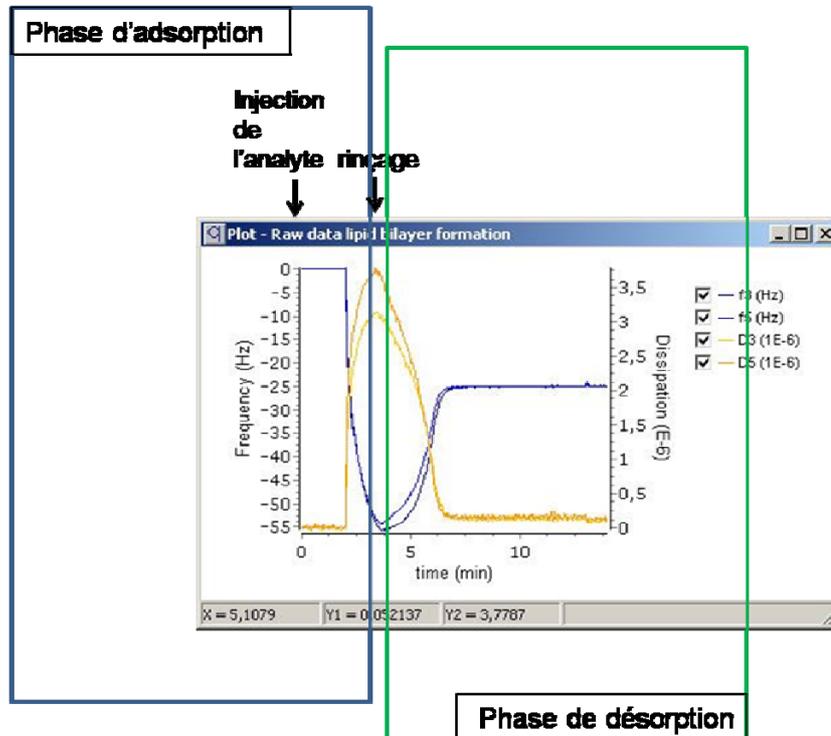


Figure 25. Courbes type d'adsorption et de désorption d'un analyte obtenues avec la technologie QCM : en bleu la variation de la fréquence de résonance, en jaune la dissipation.

Plus précisément, l'ajout externe d'une masse moléculaire ou biologique à la surface du quartz se traduit par une diminution de sa fréquence de résonance. En suivant les variations de la fréquence de résonance, on peut donc implicitement suivre en temps réel l'adsorption et la désorption des espèces et avoir accès en simultanément à des informations sur la conformation de la couche ajoutée en surface (courbe de dissipation). En effet, dans ce dernier cas, si la variation de dissipation augmente, cela nous indique que la couche adsorbée est molle (viscoélastique). À l'inverse, si la courbe de dissipation diminue, la couche adsorbée est plutôt de nature rigide. En bref, cette technique permet de quantifier l'interaction et la reconnaissance chimique existant entre les espèces en surface du quartz et les espèces d'intérêt injectées dans la chambre fluide.

L'avantage d'un biocapteur est qu'il reflète uniquement l'interaction ligand-récepteur en traduisant cette reconnaissance en un signal physiquement mesurable. Lorsqu'on analyse avec ce type de système la formation d'un complexe moléculaire en surface (interaction cible/sonde) on peut accéder à des grandeurs thermodynamiques telles que l'affinité ou les constantes d'association et de dissociation.

Cependant, les points faibles de cette technique est que l'on ne peut pas savoir si la masse est uniformément adsorbée en surface, le quartz s'abîme assez facilement et au cours de la mesure on peut avoir des artefacts expérimentaux imprévisibles tels que des bulles d'air à l'intérieur de la connectique fluide qui faussent immédiatement les données.

III. E. La spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman, ou spectrométrie Raman, est une méthode non-destructive permettant de caractériser la composition moléculaire et la structure d'un matériau.

La méthode consiste à focaliser (avec une lentille) un faisceau de lumière monochromatique (un faisceau laser) sur l'échantillon à étudier et à analyser spectralement la lumière diffusée. Cette lumière est recueillie à l'aide d'une autre lentille et envoyée dans un spectromètre. Son intensité est alors mesurée avec un détecteur (multicanal type CCD). Plusieurs géométries de diffusion sont possibles. On collecte en général la lumière diffusée soit à 180° , soit à 90° . On peut également jouer sur la polarisation des faisceaux incidents et diffusés.

La spectroscopie Raman est une technique de mesure locale : en focalisant le faisceau laser sur une petite partie du milieu, on peut sonder les propriétés de ce milieu sur un volume de quelques microns cube.

Les différents pics Raman observés sur un spectre révèlent les modes vibrationnels de la matière dont on peut se servir pour identifier la présence de divers types de molécules ou de matériaux.

IV. Conclusion

Dans le cadre de cette thèse nous avons souhaité assembler, organiser différents objets sur une surface pour différentes applications. Le présent chapitre a présenté les deux principales stratégies qui ont été retenues suivant les cas étudiés tout au long de la thèse. En effet, nous nous sommes intéressés à l'assemblage de cellules, de molécules d'ADN, et de nanoparticules métalliques. Pour la première partie, présentée dans le chapitre 3 concernant l'assemblage de cellules, nous avons développé une méthodologie combinant une technique de lithographie douce, le microcontact printing, et une technique d'incubation afin d'obtenir une double fonctionnalisation de la surface d'accueil avec un contraste hydrophile/hydrophobe. Ensuite, pour l'étude concernant les molécules d'ADN ainsi que pour celle concernant les particules métalliques (Chapitres 4 et 5), nous avons eu recours à une deuxième stratégie : une méthode combinant la technique de lithographie douce et cette fois-ci une technique d'assemblage capillaire dirigé. Dans ce chapitre, nous avons décrit de façon détaillée les différentes techniques et les différents phénomènes physico-chimiques mis en jeu, puis nous avons présenté les différents protocoles expérimentaux utilisés. Finalement, nous avons introduit les différents moyens de caractérisation mis en œuvre dans cette thèse pour l'étude des échantillons ainsi fabriqués.

Les chapitres suivants feront l'objet de la mise en œuvre de ces deux stratégies afin de diriger et contrôler l'assemblage de différents nano-objets en solution sur des motifs précis et en vue d'applications très distinctes.

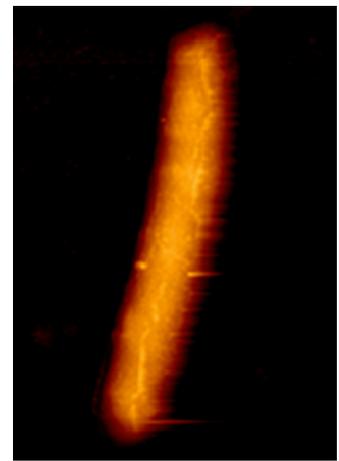
V. Références

- [1] A. Kumar, G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* (1993), 63, 2002-2004.
- [2] Y. Xia, D. Qin, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* (1996), 8(12), 1015–1017.
- [3] M. Geneviève, Assemblage dirigé d'objets à partir de solutions colloïdales, Université de Toulouse, (2009).
- [4] Madou, 1997. Fundamental of microfabrication CRC Press
- [5] C. Vieu, F. Carcenac, A. Pepin, Y. Chen, M. Mejias, A. Lebib, L. Manin-Ferlazzo, L. Couraud, H. Launois, *Appl. Surf. Sc.* (2000), 164(1-4), 111-117.
- [6] M. Shin, C. Kwon, S. K. Kim, H. J. Kim, Y. Roh, B. Hong, J. B. Park, H. Lee, *Nano Lett.* (2006), 6(7), 1334-1338.
- [7] M. Takizawa, Y.H. Kim, T. Urisu, *Chem. Phys. Lett.* (2004), 385(3-4), 220-224.
- [8] M. E. Hasenbein, T. T. Andersen, R. Bizios, *Biomaterials* (2002), 23(19), 3937-3942.
- [9] F. C. M. J. M. van Delft, F. C. van den Heuvel, A. E. T. Kuiper, P. C. Thüne, J. W. Niemantsverdriet, *Microelec. Eng.* (2004), 73-74, 202-208.
- [10] M. Takizawa, Y.-H. Kim, T. Urisu, *Chem. Phys. Lett.* (2004), 385(3-4), 220-224.
- [11] J. Fang, C. M. Knobler, *Langmuir* (1996), 12(5), 1368-1374.
- [12] N. L. Jeon, K. Finnie, K. Branshaw, R. G. Nuzzo, *Langmuir* (1997), 13, 3382-3391.
- [13] <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- [14] G. L. Gaines, Insoluble monolayers at the liquid-gas interface, Wiley Interscience, New York, (1966).
- [15] A. W. Adamson, Physical Chemistry of Surfaces, Wiley & Sons, New York, (1976).
- [16] D. J. Shaw, Introduction to Colloid and Surface Chemistry. 4th Edition, (1992), 312.
- [17] P.-G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, D. Quéré, Gouttes, bulles perles et ondes. Belin: Paris, (2002).
- [18] J. Berthier, Microdrops and Digital Microfluidics. William Andrew: Norwich, (2008).
- [19] Contact Angle, Wettability and Adhesion. American Chemical Society: Washington D. C., (1964).
- [20] D. Quéré, *Physica A* (2002), 313, 32-46.

- [21] P.-G. de Gennes, *Reviews of Modern Physics* (1985), 57 (3), 827-863.
- [22] E. A. Guggenheim, *Journal of Chemical Physics* (1945), 13, 253-261.
- [23] A. A. Nepomnyashchy, M. G. Velarde, P. Colinet, *Interfacial Phenomena and Convection*. Boca Raton: London, (2002).
- [24] H. Hu, R. G. Larson, *J. Phys. Chem. B* (2002), 106, 1334-1344.
- [25] G. D. Nadkarni, S. Garoff, *Europhysics Letters* (1992), 20(6), 523-528.
- [26] J. A. Liddlea, Y. Cui, P. Alivisatos, S. Garoff, *American Vacuum Society B* (2004), 22(6), 3409-3414.
- [27] G. D. Nadkarni, S. Garoff, *Langmuir* (1994), 10, 1618-1623.
- [28] Y. Cui, M. T. Björk, J. A. Liddle, C. Sönnichsen, B. Boussert, A. P. Alivisatos, *Nano Lett.* (2004), 4(6), 1093-1098.
- [29] T. Pinedo Rivera, *Assemblage convectif de colloïdes par forces de capillarité en milieu confiné : applications en plasmonique*, Université de Grenoble, (2009).
- [30] A. Cerf, C. Vieu, *Colloids and Surfaces A* (2009), 342(1-3), 136-140.
- [31] V. Muñoz, *Protein folding, misfolding and aggregation: classical themes and novel approaches*, *Biomolecular Sciences RCS publishing* (2008).
- [32] J. Gore, Z. Bryant, M. D. Stone, M. Nöllmann, N. R. Cozzarelli, C. Bustamante, *Nature* (2006), 439(7072), 100-104.
- [33] S. B. Velegol, B. E. Logan, *Langmuir* (2002), 18, 5256–5262.
- [34] X. Yao, J. Walter, S. Burke, S. Stewart, M. H. Jericho, D. Pink, R. Hunter, T. J. Beveridge, *Colloids Surf. B* (2002), 23, 213–230.
- [35] A. E. Pelling, S. Sehati, E. B. Gralla, J. S. Valentine, J. K. Gimzewski, *Science* (2004), 305, 1147–1150.
- [36] A. Touhami, B. Nysten, Y. F. Dufrêne, *Langmuir* (2003), 19, 4539–4543.

Chapitre 3

Assemblage dirigé de cellules individuelles vivantes



Dans ce chapitre, un procédé technologique simple et fiable permettant de fabriquer des motifs présentant des propriétés de surface différentes a été mis en place, afin d'induire l'adsorption spécifique de bactéries *E. coli* à des endroits prédéfinis. En effet, une microstructuration chimique de substrats en silicium oxydé a été développée en utilisant le microcontact printing d'OTS comme couche inerte de passivation hydrophobe. Des bactéries individuelles vivantes ont ainsi pu être fixées sur chacun des sites chimiques attractifs avec, pour la première fois, un taux de réussite proche de 100%.

Cette méthode offre la possibilité de contrôler avec exactitude le nombre et l'organisation des bactéries adsorbées en surface, sur une étendue dépassant le millimètre carré. Cette technique peut être facilement transposée à l'assemblage d'autres microorganismes en utilisant une chimie de surface appropriée. Par extension, cette technologie pourrait permettre d'envisager, plus tard, la réalisation d'une interface couplant un microorganisme vivant à un microsystème ou pour des études plus fondamentales de microbiologie.

Chapter 3

Directed assembly of individual living cells

In this chapter, we present a fast, simple and reproducible procedure enabling us to produce reliable chemical patterns exhibiting different surface properties to induce selective bacteria adsorption in liquid media at registered positions. A chemical microstructuration of silicon oxide substrates was performed using the microcontact printing of OTS molecules as a hydrophobic and passivating inert layer. We have evidenced a selective adsorption of bacteria on these local chemical patterns producing highly ordered arrays of single living bacteria with a success rate close to 100%. The immobilization process also offers the possibility to tightly control the number and exact arrangement of bacteria deposition over a millimetre scale area, allowing us to draw bacteria patterns. By creating a pattern of surface structures or properties, our method involving soft lithography and chemical patterning can further be adapted to other applications. Further extension of the technique could easily lead to generating arrays of any kind of microorganisms by simply using the appropriate pattern functionalization, for fundamental studies in microbiology but also in view of coupling these living microorganisms with artificial microsystems.

I. Sujet d'étude et état de l'art

Les cellules sur lesquelles nous avons focalisé notre étude sont des bactéries : les *Escherichia coli* (*E. coli*). Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes, caractérisés par une absence de noyau et d'organites. La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique, le peptidoglycane. Les bactéries mesurent quelques micromètres de long et peuvent présenter différentes formes : des formes sphériques (coques), des formes allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées. La grande diversité de formes est déterminée par la paroi cellulaire et le cytosquelette. Les différentes formes de bactéries peuvent influencer leur capacité d'acquérir des nutriments, de s'attacher aux surfaces, de nager dans un liquide et d'échapper à la prédation. En dépit de leur apparente simplicité, les bactéries peuvent aussi former des associations complexes. Elles peuvent s'attacher aux surfaces et former des agrégations appelées biofilms.

Les *E. coli* sont des bacilles mobiles mesurant 3µm de long x 1µm de large. Les *E. coli* sont des bactéries *gram négatif* ayant une structure qui s'organise en trois grandes parties (de l'extérieur vers l'intérieur) :

- La membrane externe
- L'espace périplasmique (espace de stockage d'enzymes, de nutriments et de production des protéines)
- La membrane plasmique (contenant des complexes protéiques indispensables au métabolisme de la bactérie)

La membrane externe est en contact direct avec le milieu extérieur. Elle est principalement composée de phospholipides organisés en bicouche (partie hydrophile à l'extérieur et partie lipophile à l'intérieur) mais contient aussi de nombreuses protéines intrinsèques, notamment les protéines de transport appelées porines. Des chimiorécepteurs de nature protéique sont présents au niveau de la membrane plasmique des bactéries et peuvent détecter différentes substances attractives ou nocives. Les bactéries mobiles peuvent en effet réagir à des stimuli, être attirées par des substances nutritives comme les sucres, les acides aminés, l'oxygène, ou être repoussées par des substances nuisibles : c'est le phénomène de chemotaxie. Elles peuvent se déplacer grâce à une ou plusieurs structures extra-cellulaires : les flagelles mis en mouvement par un nanomoteur rotatif inséré dans les membranes. Les flagelles des bactéries sont de longs appendices protéiques flexibles. Leur nombre et leur position peuvent différer selon les espèces de bactéries. Dans le cas des *E. coli*, des flagelles sont produites sur toute la surface cellulaire.

Les *E. coli* ont également la capacité d'adhérer aux surfaces. Les structures bactériennes responsables de l'adhésion sont des adhésines fimbriaires (fimbriae ou pili) ou afimbriaires. Exposées à la surface des bactéries, ces adhésines interagissent avec des récepteurs de la membrane des cellules cibles. C'est ainsi que des souches d'*E. coli* pathogènes sont capables en partie grâce à leurs adhésines de coloniser des biotopes.

Contrairement aux micro- et nanosystèmes artificiels actuels (MEMS / NEMS) qui souffrent d'un manque d'efficacité mécanique et d'autonomie énergétique, les cellules, en particulier les bactéries, présentent des performances fascinantes en termes de motilité et de transduction des gradients chimiques en énergie mécanique ou électrique [1, 2]. En effet, l'un des plus petits et des plus performants moteurs biologiques connus ((12 000 tours/min) est celui que

l'on rencontre dans les membranes des bactéries à flagelle. Ce nano moteur rotatif ne fait que 45 nanomètres de diamètre et assure le mouvement du flagelle. Bien que connu des biologistes depuis plus de 30 ans, sa structure et son fonctionnement restent encore un mystère. L'étude de ce nano moteur prend donc toute sa place dans les thématiques de recherche du groupe NanoBioSystèmes. En effet, l'un des buts de l'équipe est de proposer un modèle permettant d'expliquer les capacités exceptionnelles de ce moteur en essayant de le reconstruire artificiellement sur une surface en adoptant une approche de type bottom-up [3]. Ainsi, par exemple, la compréhension du fonctionnement "mécanique" de ce moteur passe nécessairement par la maîtrise de la fixation des bactéries à flagelle et de leur auto-organisation locale aux endroits désirés d'un substrat afin de pouvoir les examiner de façon statistique et d'appréhender le nanomoteur en question. En effet, immobiliser des micro-organismes vivants en préservant leur conformation, en d'autres termes sans les dénaturer, est une étape indispensable permettant l'étude fine de leur structure, composition et organisation sub-cellulaire.

De manière plus générale, il est de nos jours possible d'explorer des cellules vivantes à l'échelle nanométrique, grâce au Microscope à Force Atomique (cf chapitre 2) utilisé en milieu liquide. Le principal verrou est l'immobilisation de l'échantillon biologique et sa préservation. Une des alternatives, très utile d'ailleurs dans le cas de cellules sphériques, est l'utilisation de membranes Isopore en polycarbonate [4]. Les cellules peuvent alors être piégées mécaniquement dans les pores du filtre et imagées par AFM. Grâce à cette méthode, une large variété d'expériences biophysiques (élasticité [5], hydrophobicité [6-8], rugosité de surface [9], spectroscopie de force sur molécule unique [10-11]) a été réalisée sur des cellules vivantes. Cependant, cette méthode en particulier, ainsi que la technique par piégeage mécanique dans un gel d'agarose [12] produisent un résultat aléatoire. L'endroit où la cellule est immobilisée n'est pas contrôlé. Celle-ci s'accroche indifféremment sur la surface ou dans les pores du filtre. Dès lors, ce type d'immobilisation non déterministe conduit à une très faible occupation des pores, rendant l'analyse AFM très fastidieuse.

Outre les piégeages mécaniques, la fixation d'une entité biologique d'intérêt peut se faire sur des surfaces traitées chimiquement grâce à des molécules permettant son accroche : on parle alors de fonctionnalisation biologique de surface ou bio-fonctionnalisation. Par exemple, en créant des surfaces chargées positivement, les microorganismes chargés négativement peuvent être immobilisés de façon électrostatique [13]. Le positionnement contrôlé de l'entité biologique peut se faire alors par une méthode de dépôt capable de déposer un petit volume de la solution biologique à des positions localisées. Des dispositifs automatisés permettant de déposer des rangées de gouttes sont utilisés régulièrement dans la technologie des biopuces avec une résolution spatiale atteignant la dizaine de microns. Parallèlement, les microtechnologies offrent de nouvelles méthodes afin d'atteindre des résolutions spatiales supérieures [14, 15]. Xu et al. ont proposé une méthode où les bactéries sont directement déposées par microcontact printing sur un substrat d'agar principalement pour des études biologiques sur leur organisation spatiale et sur l'interaction entre entités individuelles parmi une large population de bactéries [16]. Cette méthode présente l'inconvénient d'exposer les bactéries à l'air pendant leur transfert sur la surface ainsi que de rendre incompatible leur interfaçage avec des dispositifs silicium. La méthodologie proposée par Holz et al. [17] quant à elle, utilise une surface fabriquée par ingénierie physique afin de piéger les bactéries. Mais cette technique de microfabrication est coûteuse et chronophage.

Une approche alternative consiste à fonctionnaliser la surface avec des motifs chimiques capables d'induire l'adsorption des bio-entités en solution. De cette façon, la solution

biologique peut être incubée sans avoir recours à un système de dépôt spatialement résolu car la surface fonctionnalisée localise elle-même les événements d'immobilisation à des endroits prédéfinis adaptés à la taille des bioentités. Des procédés technologiques qui permettent de fabriquer de façon fiable des motifs d'une résolution proche de quelques microns présentant des propriétés de surface différentes sont donc nécessaires afin de localiser et de manipuler les micro-organismes en solution.

II. Stratégie mise en place

Le défi que nous avons tenté de relever ici est de proposer une solution alternative pour déposer des micro-organismes sur une surface, avec une haute résolution, sans extraire les espèces de leur milieu naturel, c'est-à-dire sans courir le risque de les dénaturer. Pendant la première phase, il a été question d'optimiser le protocole permettant la réalisation de la surface d'accueil des bactéries à flagelle *Escherichia coli*. Cette phase a été réalisée par le biais d'une fonctionnalisation chimique de surface localisée. L'approche que nous avons mise en place consiste à combiner des techniques de lithographie douce, de chimie de surface et d'imagerie à l'échelle moléculaire par microscopie à force atomique ; l'objectif étant de réaliser sur le substrat des zones chimiquement différenciables par ces micro-organismes pour qu'ils viennent préférentiellement se fixer sur les régions avec lesquelles ils possèdent la plus grande affinité.

En pratique, l'approche développée consiste à structurer la surface avec des motifs chimiques capables d'induire l'adsorption localisée des bactéries incubées. Afin d'augmenter la sélectivité de l'adsorption, une fonctionnalisation complémentaire de la surface a été effectuée autour de ces zones de manière à repousser les bactéries et ainsi les confiner dans les zones sélectionnées.

La stratégie et le protocole expérimental adoptés sont ceux décrits dans le chapitre 2.I. Pour la présente étude, nous n'avons pas choisi d'adopter la stratégie présentée dans la section 2.II utilisant l'assemblage capillaire car nous ne voulions pas exposer les bactéries à l'air et souhaitions les conserver dans un environnement liquide.

Nous avons ainsi étudié la microstructuration chimique de surfaces oxydées de silicium en utilisant le microcontact printing de molécules d'OTS (octadécyltricholosiène) comme couche inerte hydrophobe et passivante.

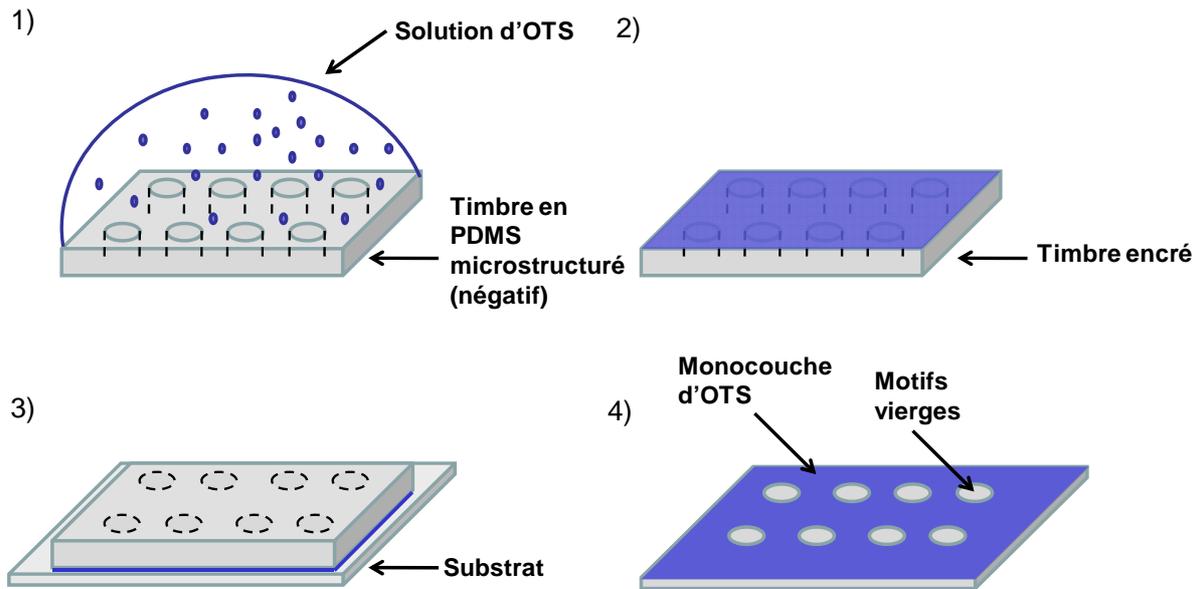


Schéma 1. Rappel de la technique de dépôt d'OTS sur une surface SiO_2 par microcontact printing avec un timbre négatif. Le dépôt d'OTS assure un revêtement antiadhésif de la surface sauf aux endroits des motifs.

Cette structuration de surface par microcontact printing a été optimisée de façon à minimiser la diffusion en surface des molécules d'OTS et ainsi obtenir des monocouches denses et homogènes indispensables à la réussite de notre procédé. En effet, dans notre cas, la qualité de la couche de silane antiadhésive est essentielle à la réussite de la stratégie que nous avons choisi d'adopter. Un revêtement antiadhésif inhomogène et parsemé de trous en surface constitue un risque potentiel de piégeage des autres silanes, des protéines d'accroche ou des bactéries elles-mêmes. Notre objectif pour cette étape s'est donc résumé à l'obtention d'une monocouche d'épaisseur égale à la longueur théorique d'une molécule d'OTS greffée (2,5 nm) (voir résultats et images AFM Chapitre 2.I).

Les motifs ainsi définis ont été ensuite fonctionnalisés chimiquement par incubation de façon à présenter des propriétés de surface adéquates pour induire des événements d'immobilisation localisée des bactéries.

Pour réaliser cette fonctionnalisation locale, nous avons décidé de diviser le projet en deux axes d'étude. Ainsi, pour le premier axe d'étude, nous avons exploité la forte constante d'association existant entre deux protéines, la biotine et la streptavidine, afin de fixer les bactéries. Nous avons donc fonctionnalisé la surface des bactéries avec de la N-hydrosuccinimid ester biotine (NHS-biotine) [18] et nous avons réalisé une fonctionnalisation des motifs avec de la streptavidine pour greffer les bactéries biotinylées sur ces motifs au travers d'une liaison biotine-streptavidine. Pour le deuxième axe, nous avons fixé des bactéries *E. coli* n'ayant subi aucun traitement particulier sur un substrat structuré fonctionnalisé avec des molécules sélectionnées de façon à avoir une affinité pour les protéines membranaires des bactéries ou par interaction électrostatique. Pour qualifier la qualité de la surface chimiquement microstructurée et démontrer ainsi la pertinence de notre protocole de bi fonctionnalisation de surface, nous avons utilisé un large éventail d'outils de caractérisation complémentaires. Les différents échafaudages moléculaires ainsi obtenus ont été imagés par microscopie AFM en milieu liquide et à l'air, ainsi qu'au Microscope Electronique à Balayage (MEB). En biologie, le support utilisé de manière conventionnelle est le support en verre (lamelles de verre...). C'est donc sur ce type de substrats que nous avons mis en œuvre cette méthode.

III. Biopatterning

Les cellules bactériennes utilisées sont des *E. coli* DH5 alpha en phase exponentielle, modifiées pour exprimer la GFP (protéine fluorescente verte, excitation à 485 nm, émission à 505 nm) de façon à pouvoir évaluer plus aisément leur dépôt.

Pour la partie utilisant des bactéries traitées, ces bactéries marquées en fluorescence ont été biotinylées chimiquement selon le protocole expérimental de Taro Q. P. Uyeda et al. [18]. Bactéries traitées et non traitées ont été centrifugées à 5000g pendant 2 minutes. Le surnageant a été retiré et les cellules ont été remises en suspension dans du PBS. Ensuite une goutte de 300 μ l a été incubée pendant 20 minutes sur les substrats structurés. En procédant uniquement par incubation de la solution de bactéries, nous nous sommes aperçus que le dépôt de bactéries ne se faisait pas de façon optimale. Nous avons donc opté pour l'idée de « forcer leur dépôt » en utilisant une lamelle couvre-objet. En effet, en plaçant une lamelle couvre objet au-dessus de la goutte, le volume est réduit et on obtient une fine couche de bactéries ce qui permet d'augmenter l'efficacité de leur dépôt. Ensuite la lamelle couvre objet est retirée en pipetant délicatement un faible volume de PBS de manière à séparer la lamelle couvre objet du substrat (schéma 2).

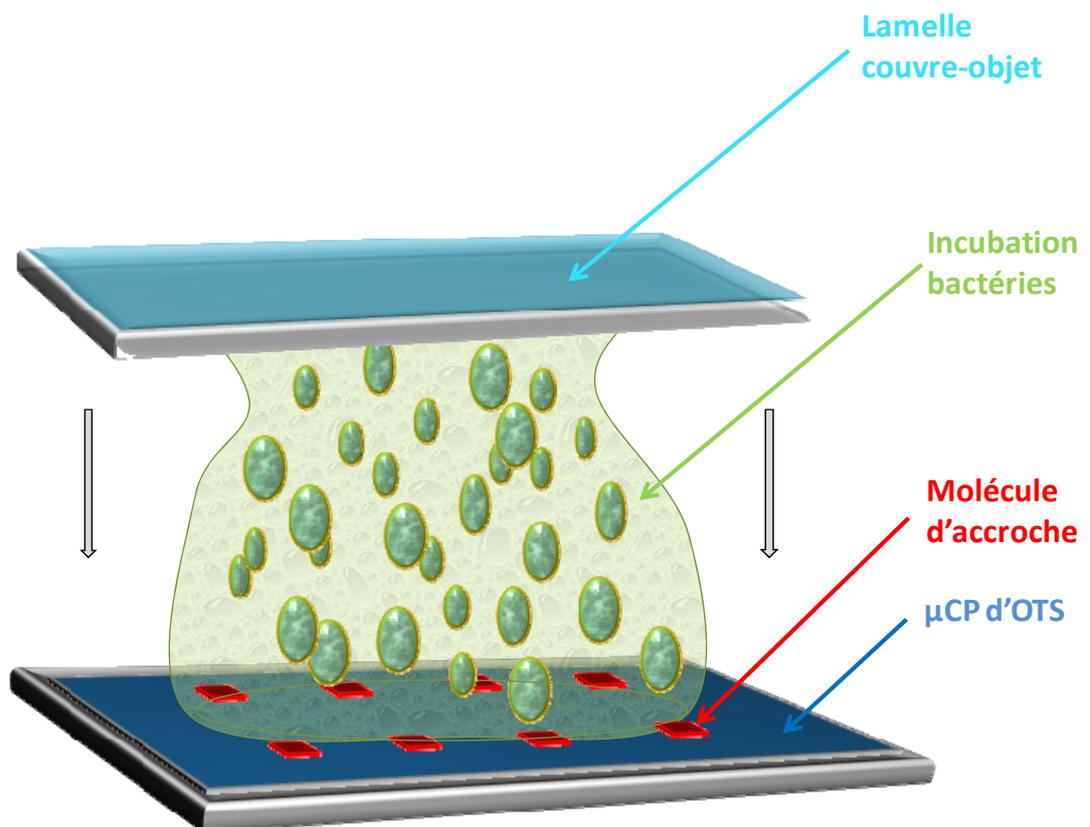


Schéma 2. Schéma explicatif de la stratégie mise en place pour réaliser du biopatterning de cellules bactériennes.

III.A. Bactéries traitées

III.A.1. Fonctionnalisation des sites d'accroche

III. A.1.1. Méthodologie (3 candidats : SiO₂, APTES, époxyde)

Comme nous l'avons vu précédemment, le substrat structuré a été fabriqué par microcontact printing de façon à générer des zones micrométriques d'adsorption préférentielle des bactéries. Dans le cas des bactéries fonctionnalisées avec de la biotine, l'objectif est de fonctionnaliser les motifs laissés vacants dans la couche d'OTS avec des molécules de streptavidine afin de pouvoir fixer ces bactéries par le biais d'une interaction biotine-streptavidine. Pour faciliter l'étude, nous avons marqué les molécules de streptavidine avec de la fluorescéine isothiocyanate (FITC, $\lambda_{\text{ex}} = 490\text{nm}$ / $\lambda_{\text{abs}} = 525\text{nm}$) afin de vérifier le dépôt des molécules à l'aide d'un microscope optique en fluorescence.

Pour accrocher de façon robuste les molécules de streptavidine aux endroits des motifs en SiO₂, nous avons évalué plusieurs molécules candidates pouvant servir d'intermédiaires.

Nous nous sommes tout d'abord penchés sur le cas de la biotine-NHS comme molécule intermédiaire entre les motifs laissés vierges et les molécules de streptavidine que l'on souhaite accrocher sur ces motifs. En effet, cette molécule a été la première que nous avons souhaité tester car sa terminaison NHS permet de s'accrocher aux amines et l'interaction biotine/streptavidine est forte. Cependant, après quelques expériences, nous avons vu très vite les limites et les difficultés de cette approche. En effet, la faible taille de la biotine-NHS (de l'ordre de 3 Å) rend la caractérisation AFM peu concluante. Il est impossible de discerner toute variation de topographie avant et après incubation des molécules de biotine-NHS puis de la streptavidine. Il est donc impossible de vérifier si le dépôt des molécules de biotine-NHS a bien lieu à l'intérieur des motifs. Il est également difficile de contrôler le dépôt en microscopie par fluorescence car comme nous le verrons plus loin, la streptavidine étant une protéine complexe, elle a des affinités pour la plupart des surfaces hydrophiles candidates (SiO₂, surfaces amine, époxyde). Il est donc extrêmement difficile de savoir dans quelle mesure la biotine facilite l'accroche des molécules de streptavidine, sachant que ces dernières s'accrochent déjà sans nécessité d'intermédiaire. De plus, la biotine-NHS que l'on trouve dans le commerce est le plus souvent en solution dans du DMSO, solvant qui est incompatible avec les matériaux qui constituent les tuyauteries fluidiques de la microbalance à quartz. Toute étude quantitative à l'aide de la microbalance à quartz est donc à mettre de côté. N'étant donc pas en mesure d'assurer si le dépôt de biotine-NHS avait bien lieu, nous avons écarté l'utilisation de la biotine-NHS : cette partie ne sera donc pas approfondie davantage dans ce manuscrit.

Nous avons donc choisi de porter toute notre attention sur les autres molécules candidates : SiO₂, APTES, silane époxyde. Le schéma 3 présente les expériences réalisées.

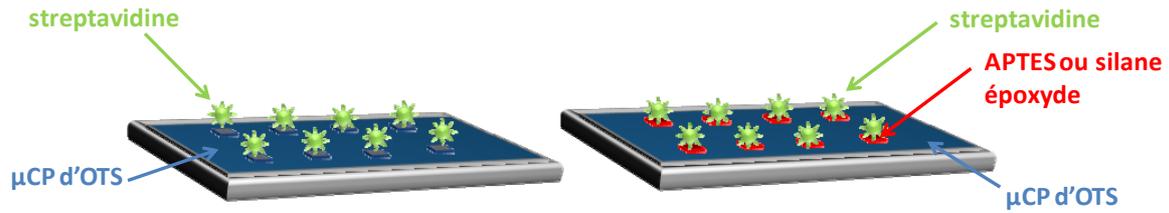


Schéma 3. Schéma des expériences mises en place pour le dépôt des molécules de streptavidine.

Nous avons tout d'abord incubé directement les molécules de streptavidine sur le substrat structuré (μCP d'OTS) composé donc de motifs SiO_2 . Cette expérience constitue en quelque sorte notre expérience de contrôle, c'est-à-dire sans molécules d'accroche intermédiaires entre les molécules de streptavidine et les motifs SiO_2 .

Ensuite nous avons réalisé deux autres expériences : la première en incubant les molécules de streptavidine sur des substrats structurés ayant des motifs APTES, la deuxième en incubant les molécules de streptavidine sur des substrats structurés ayant des motifs époxyde de manière à évaluer lequel de ces deux candidats constitue le meilleur intermédiaire d'accroche des molécules de streptavidine.

III. A.1. 2. Analyse QCM

Tout d'abord, nous avons évalué au travers d'une analyse par Microbalance à Quartz, l'interaction entre les molécules de streptavidine et les différentes chimies de surface candidates : surface OTS, surfaces SiO_2 vierges, puis surfaces SiO_2 silanisées avec soit des amino-silanes, soit des silanes époxyde.

Comme nous l'avons vu dans les chapitres d'introduction, la microbalance à quartz est une technique qui a l'avantage d'être fiable en termes d'analyse quantitative. En effet, même si chacun des quartz est unique avec une fréquence de résonance qui lui est propre, l'allure générale des cinétiques est reproductible d'un quartz à l'autre.

Dans notre cas, l'analyte à injecter est la streptavidine. C'est le dépôt de cette molécule que nous avons souhaité quantifier ici.

La figure 1 regroupe les courbes obtenues (nous ne nous sommes intéressés qu'aux variations de fréquence) :

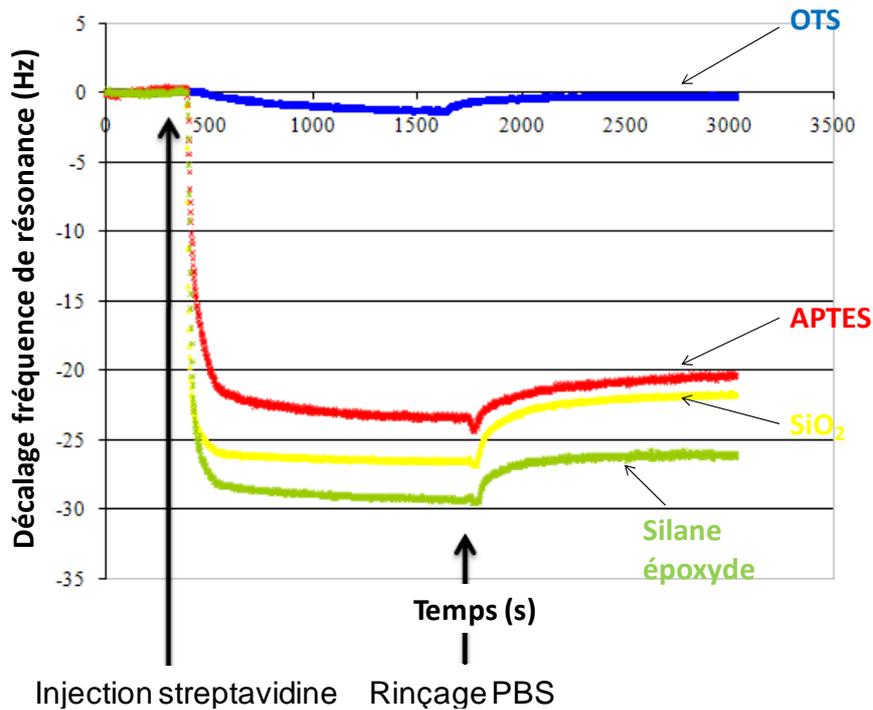


Figure 1. Cinétiques d'absorption et de désorption des molécules de streptavidine sur différents substrats ($T=25^{\circ}\text{C}$). Quatre quartz fonctionnalisés OTS, APTES, SiO_2 puis époxyde respectivement sont placés en parallèle. La streptavidine est ensuite injectée à une concentration de $20\ \mu\text{g/ml}$.

A partir de ces mesures réalisées en dynamique, nous avons pu observer plus précisément l'interaction des molécules de streptavidine avec chacune des couches moléculaires mises en jeu dans notre étude laissant un des quartz vierge (SiO_2) puis en fonctionnalisant les trois autres quartz avec : des molécules d'OTS, des silanes terminaison amine (APTES) et des silanes terminaison époxyde. Dans les trois cas, les protocoles de fonctionnalisation des quartz par incubation ont été les mêmes que ceux optimisés et décrits précédemment (voir Chapitre 2.I, Tableau 1).

La différence Δf (en Hz) de la fréquence de résonance du quartz entre le palier initial avant adsorption de l'analyte (molécules de streptavidine) et le palier final après rinçage et désorption des molécules faiblement accrochées, nous renseigne sur le degré d'interaction streptavidine/surface. Cette interaction, plus précisément la masse de molécules de streptavidine adsorbées, est importante dans le cas d'une surface époxyde et n'est pas significative dans le cas d'une surface hydrophobe d'OTS. En effet, nous constatons que l'interaction entre les molécules de streptavidine et la surface d'OTS est très faible ($\Delta f = 0,2\ \text{Hz}$). Après rinçage, le niveau en fréquence, donc implicitement la masse du quartz, est sensiblement la même qu'avant injection de l'analyte : les molécules de streptavidine ne se sont pas fixées. Ceci valide la technique puisque la surface d'OTS est antiadhésive. En ce qui concerne les autres cas de figure, nous pouvons observer que la masse adsorbée est plus importante dans le cas de la surface fonctionnalisée époxyde que dans celui des surfaces amine ou silanol ($|\Delta f_{\text{OTS}}| < |\Delta f_{\text{APTES}}| < |\Delta f_{\text{SiO}_2}| < |\Delta f_{\text{époxyde}}|$). Il est à noter également que la cinétique d'interaction des molécules de streptavidine avec les molécules d'APTES est plus lente car la pente aux zones d'inflexion de la courbe correspondante est plus faible que dans le cas des silanes époxyde ou des groupements silanols.

Cette technique QCM suggère donc que l'interaction des molécules de streptavidine est quantitativement plus forte avec les silanes époxyde : la masse moléculaire adsorbée est plus importante et la couche formée est donc plus dense.

III.A.1.3. Vérification par microscopie en fluorescence et AFM

Une fois les informations obtenues par microbalance à quartz, nous avons souhaité corroborer les résultats par microscopie en fluorescence et AFM. Cette fois-ci nous considérons donc des substrats structurés par microcontact printing d'OTS, et les motifs laissés vierges sont fonctionnalisés soit SiO_2 , soit APTES, soit époxyde. Les molécules de streptavidine sont incubées sur chacun de ces substrats.

1^{er} candidat : SiO_2

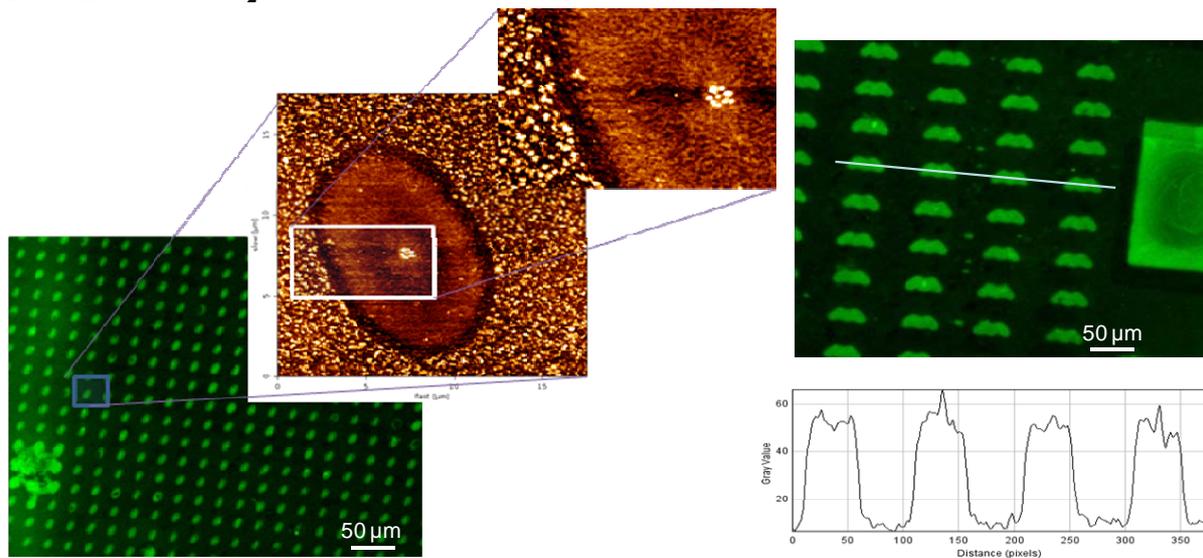


Figure 2. Images AFM de topographie et les images en fluorescence associées d'un substrat structuré par μCP d'OTS suivi d'une incubation de molécules de streptavidine.

Dans le cas d'une incubation des molécules de streptavidine sur substrat structuré avec motifs vierges (SiO_2), la figure 2 montre aussi bien sur les images de fluorescence que les images AFM, que la streptavidine s'est fixée sélectivement à l'intérieur des motifs et a donc une affinité pour les groupements silanols du substrat sur lequel nous avons effectué le microcontact printing d'OTS. A partir des images en fluorescence, le profil d'intensité de fluorescence en bas à droite de la figure démontre bien que l'intensité mesurée (en unités arbitraires) est pratiquement 10 fois plus importante à l'intérieur des motifs qu'à l'extérieur. La couche d'OTS joue donc son rôle de passivant et les molécules de streptavidine ne se déposent pas sur l'OTS : le dépôt est spécifique. Il est à noter que sur les images AFM, on remarque une surconcentration des molécules au centre des motifs. Ceci est caractéristique d'un dépôt par incubation et rejoint le phénomène déjà observé dans le cas de l'incubation de colloïdes d'or sur APTES (Chapitre 2, section I.D). Par contre l'accroche de la streptavidine n'est pas robuste : les molécules se désorbent facilement après rinçages successifs au PBS.

Deuxième candidat : silane amine (APTES)

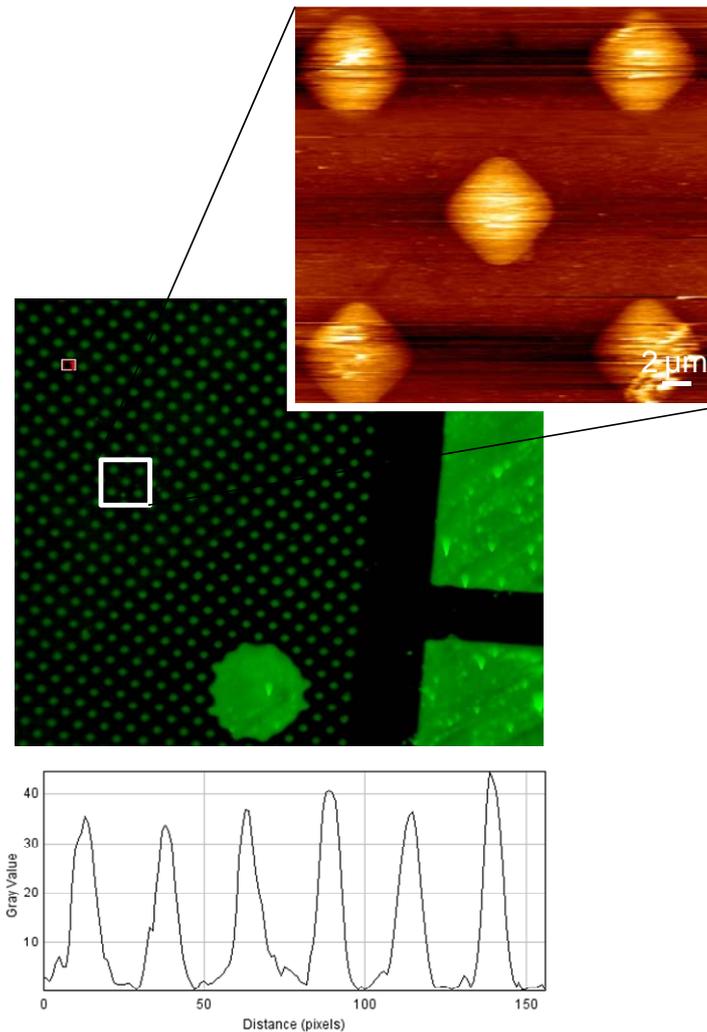


Figure 3. Images AFM de topographie associées à l'image en fluorescence d'un substrat structuré par microcontact printing d'OTS ayant des motifs APTES-streptavidine.

La figure 3 montre les résultats obtenus après incubation des molécules de streptavidine sur un substrat structuré par microcontact printing d'OTS avec des motifs d'APTES.

De la même manière, l'image en fluorescence montre que les motifs initialement APTES apparaissent fluorescents une fois les molécules de streptavidine FITC incubées. La région extérieure aux motifs est noire suggérant qu'il n'y a pas de dépôt non spécifique des molécules de streptavidine. Le profil d'intensité correspondant montre que l'intensité mesurée au centre des motifs est 10 fois plus importante qu'à l'extérieur. Ces observations sont confirmées par les images AFM de topographie. L'image de hauteur montre une marche positive à l'intérieur des motifs qui rend bien compte du dépôt local et sélectif des molécules de streptavidine. Les motifs d'OTS adjacents empêchent l'adsorption non spécifique des molécules de streptavidine.

Il est à noter que cette fois-ci, les molécules de streptavidine résistent aux rinçages donc l'accroche est plus robuste que dans le cas de surfaces SiO_2 .

Troisième candidat : Silane terminaison époxyde

Après incubation des molécules de streptavidine sur une surface structurée avec motifs époxyde, nous avons vérifié leur accroche sur les motifs époxyde en combinant la cartographie de force par AFM et la microscopie en fluorescence. Comme dans le cas précédent, l'image en fluorescence fig. 4A démontre que les molécules de streptavidine s'accrochent de façon robuste sur les motifs époxyde également. Là encore, nous pouvons observer que l'intensité de fluorescence de fond est très faible ce qui implique qu'il n'y a pas de dépôt non-spécifique des molécules de streptavidine. La figure 4B montre les images AFM de topographie et de cartographie de force associées, réalisées sur l'un des motifs fluorescents de la figure 4A. Nous avons utilisé une pointe en nitrure de silicium ayant une constante de raideur K_c de 0,05 N/m.

Par comparaison avec les images AFM des substrats structurés par microcontact printing d'OTS avec motifs époxyde du Chapitre 2, figure 12, l'imagerie AFM indique ici que les molécules de streptavidine ont tendance à s'agglomérer au centre des motifs. La figure 4B, b) et c), correspondent aux mesures de spectroscopie de force effectuées. L'histogramme (c) représente une distribution des mesures d'adhésion effectuées sur une zone extérieure au motif (OTS) puis sur la région intérieure du motif correspondant à la zone fluorescente (figure 4A). La force d'adhésion moyenne mesurée dans la région centrale des motifs est située autour de 7 nN et est donc largement plus significative que celle mesurée dans la région extérieure au motif (~5 nN). On peut donc dire que la molécule déposée au centre des motifs a une nature différente que celle se trouvant à l'extérieur. Ces cartographies d'adhésion viennent donc appuyer les observations faites par microscopie à fluorescence et nous confortent dans l'idée que les molécules de streptavidine sont bien déposées uniquement à l'intérieur des motifs. Par contre, l'agglomération des molécules est un phénomène que l'on peut observer uniquement grâce à l'AFM. En effet, les molécules de streptavidine FITC au centre des motifs diffusent la lumière et au microscope à fluorescence les motifs apparaissent entièrement remplis et de façon homogène. Pour apporter plus d'éléments de réponse par rapport au phénomène observé, nous avons encré un timbre plat avec des molécules de streptavidine pendant 10 minutes puis nous avons mis en contact ce timbre avec un substrat structuré par microcontact printing d'OTS avec motifs époxyde pendant 3 minutes. Après retrait, nous avons constaté à l'AFM que les molécules de streptavidine ne sont plus concentrées au centre des motifs mais plutôt réparties de façon homogène sur toute l'étendue du motif. L'effet de concentration est donc attribué à un effet capillaire et d'évaporation lié à l'incubation puis retrait de la goutte. Cet effet est d'autant plus intéressant dans la perspective de la localisation ultérieure de bactéries uniques au centre même des motifs. Finalement, il est à noter que les molécules de streptavidine sur motifs époxyde résistent aux rinçages.

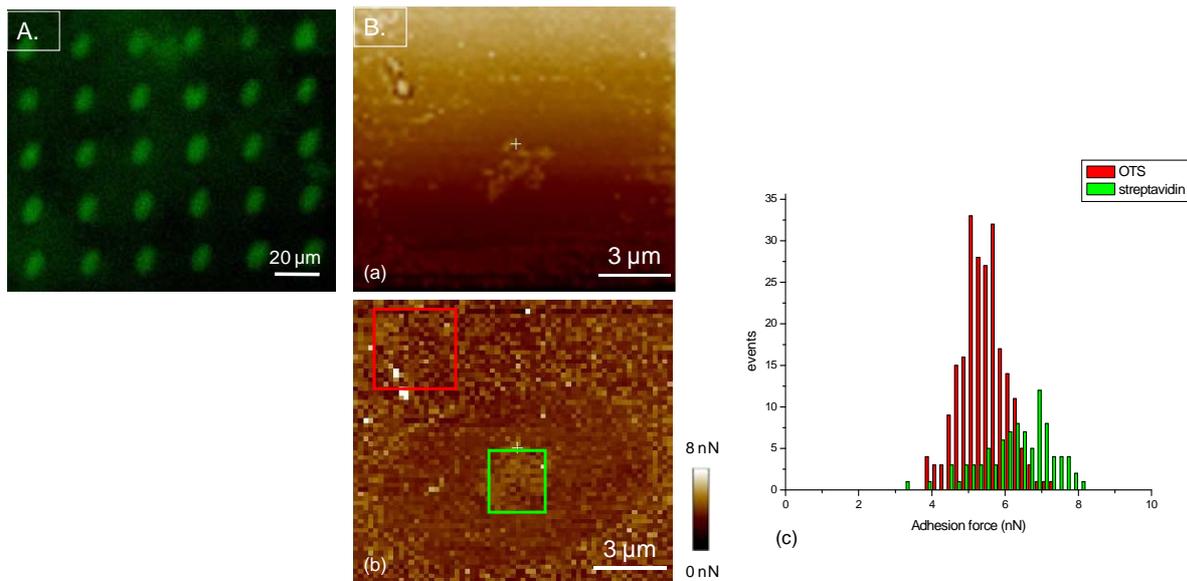


Figure 4. Images en fluorescence (A) puis AFM (B) de topographie (a), et d'adhésion (b) d'un substrat OTS-silane époxyde-streptavidine. L'encart rouge délimite la zone d'OTS, puis l'encart vert celui de la région époxyde. L'histogramme (c) représente une distribution des mesures d'adhésion effectuées sur chacune de ces deux zones.

Ainsi nous pouvons dire en rassemblant l'ensemble des résultats que la fixation de la streptavidine s'est effectuée aussi bien sur les motifs SiO_2 que sur les motifs silanisés avec des molécules d'APTES ou époxyde avec tout de même une accroche plus robuste dans les deux derniers cas. Aussi bien l'analyse par QCM que l'AFM couplé à la fluorescence indiquent que la streptavidine semble donc avoir une affinité pour tous les cas de figure de fonctionnalisation des motifs étudiés. De plus, elle semble se fixer aux couches moléculaires APTES et époxyde par une liaison forte car même après de nombreux rinçages, le complexe ainsi formé reste intact.

Les différents tests de fonctionnalisation chimique des motifs d'accueil de la streptavidine ont montré que le dépôt localisé des molécules de streptavidine sur des surfaces silanol ou silane est adapté et ne nécessite pas l'utilisation d'un complexe biotine NHS intermédiaire.

Pour l'incubation des cellules biotinylées, nous avons choisi d'utiliser le silane époxyde en nous basant essentiellement sur les courbes QCM obtenues afin de fixer de façon la plus robuste les molécules de streptavidine sur les motifs locaux.

III.A.2. Immobilisation des bactéries traitées sur les surfaces chimiques

Ainsi, l'échafaudage finalement sélectionné pour fonctionnaliser les motifs d'accueil des bactéries biotinylées est la bicouche composée d'une couche de silanes époxyde suivie d'une couche de molécules de streptavidine. Après incubation pendant 20 minutes d'une solution contenant des bactéries biotinylées sur la surface microstructurée choisie avec motifs époxyde-streptavidine, les images optique champ clair et de fluorescence, figure 5, révèlent

que l'accroche entre les bactéries biotinylées et les motifs époxyde-streptavidine a lieu de façon sélective.

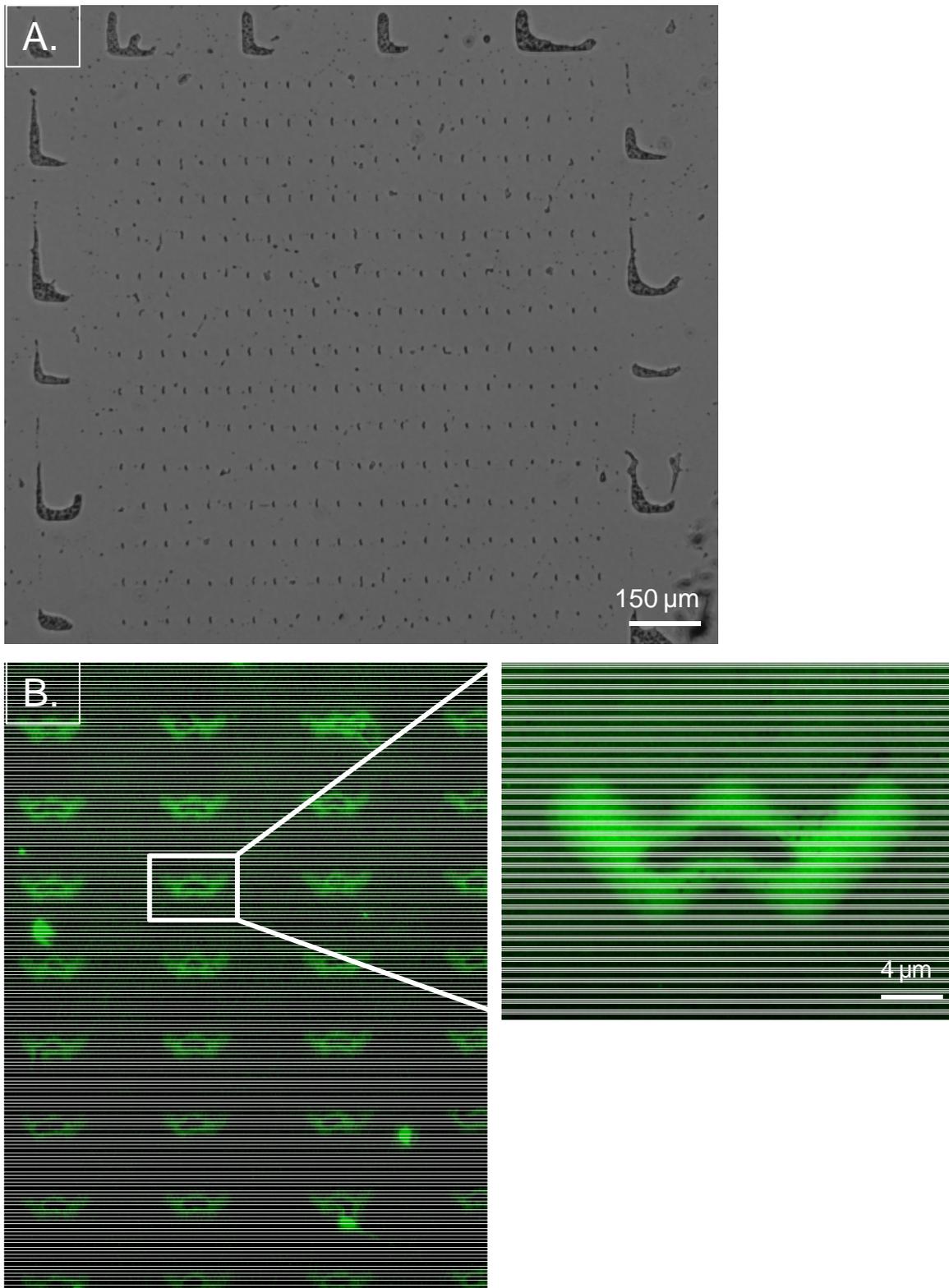


Figure 5. Dépôt de bactéries biotinylées sur une surface microstructurée par μ CP d'OTS, avec motifs époxyde-streptavidine (A. Image optique 1100 μ m x 1100 μ m champ clair et B. l'image en fluorescence correspondante _Andor Ixon 512x512, objectif à huile x100).

En outre, la figure 5 montre que ce résultat d'événements d'adsorption uniques est obtenu avec un fort taux de réussite. Sur les 100 sites d'adsorption montrés sur la figure 5, tous sont équipés avec une bactérie unique. Dans le cas des motifs en forme de « M » on observe que les bactéries prennent même la forme du motif. Il est à noter que les dimensions de la souche bactérienne utilisée lors de l'expérience sont plus importantes que les dimensions nominales de *E. coli*. Nous obtenons donc des cellules uniques sur des motifs pourtant 4 fois plus importants. Il est néanmoins à noter que ces réseaux ont été obtenus également pour des motifs de 10 μm de long avec le même taux de réussite. Par contre l'assemblage n'a plus lieu en dessous de cette taille de motifs limite. Il ne faut pas oublier, en effet, que les molécules de streptavidine se concentrent au centre des motifs, donc la surface « effective » ou de reconnaissance accessible aux cellules biotinylées est plus réduite en réalité que la taille théorique des motifs.

Ces résultats démontrent que la chimie de surface que nous avons développée est vraiment très efficace pour produire des réseaux de bactéries organisées avec la résolution d'une bactérie unique, sur une large étendue. Sur plusieurs images on observe par ailleurs la division cellulaire qui s'opère même après l'accroche des cellules à l'intérieur des motifs si elles sont maintenues dans un environnement liquide (figure 6). Cette observation importante semble montrer que les bactéries attachées sélectivement sur la surface sont vivantes et non endommagées.

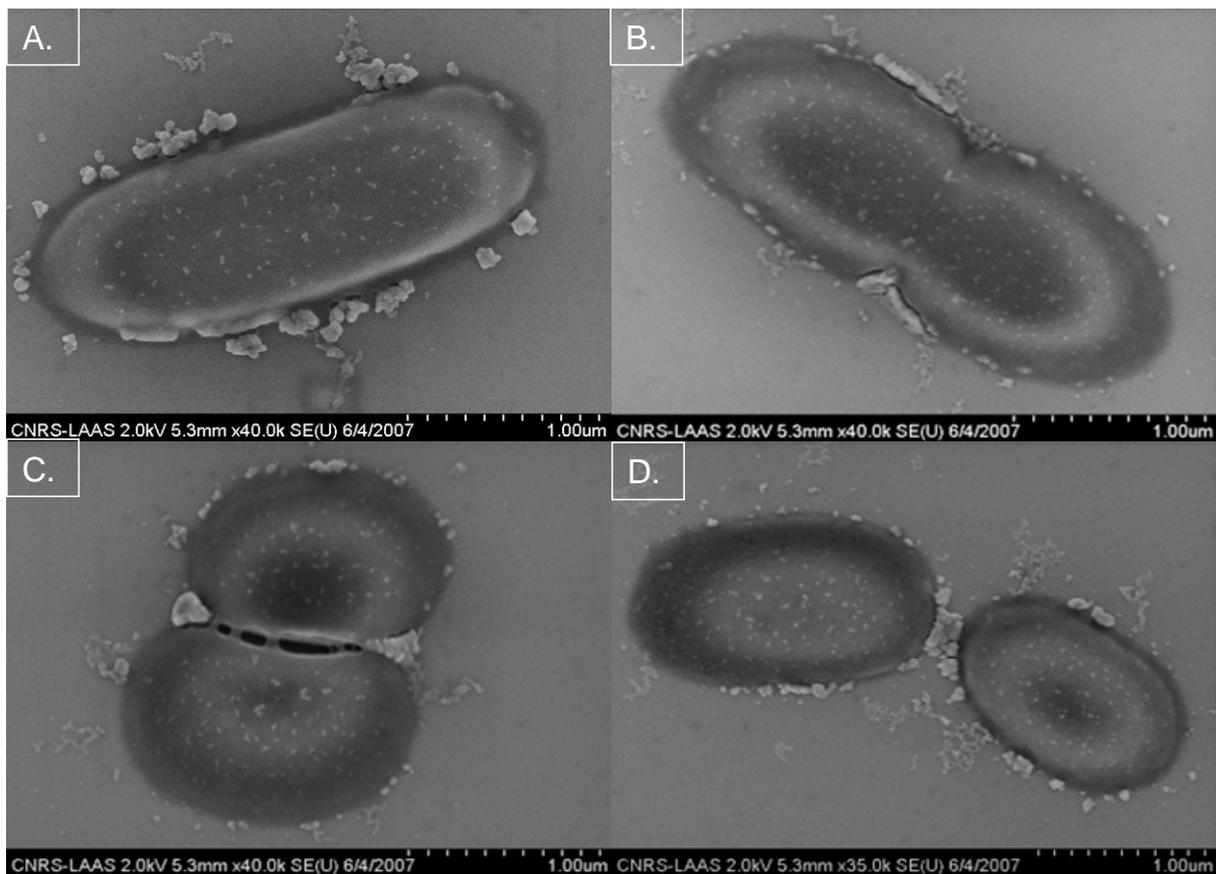


Figure 6. Images MEB. Bactéries sur un wafer silicium fonctionnalisé époxyde pleine plaque. Le mode de multiplication favori des bactéries est la multiplication par mitose aboutissant à une colonie de clones.

III.A.3. Détection de la viabilité des cellules par coloration

Etant donné que l'on travaille avec des cellules, une question cruciale à laquelle nous nous devons de répondre est celle de leur viabilité. En effet, toute organisation de cellules pour une étude ultérieure, impose une non-modification des entités biologiques. Pour apporter une réponse argumentée à cette question et vérifier si les cellules sont préservées, nous avons donc eu recours à une technique de coloration en fluorescence. Ces techniques sont effectivement des outils puissants pour contrôler la viabilité des cellules et l'état de leur membrane pendant les traitements impliquant de nouveaux procédés technologiques.

Pour démontrer que notre technique de dépôt de bactéries sur une surface chimique et structurée par microcontact printing n'endommage pas leur membrane et ne compromet pas leur viabilité, nous avons utilisé un agent intercalant des acides nucléiques, l'iodure de propidium (IP). L'IP est couramment utilisé comme marqueur de l'ADN afin de marquer le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Une fois attaché à l'ADN, il fluoresce dans le rouge (excitation à 490 nm, émission à 635 nm) [19]. Les cellules déposées sur les substrats structurés ainsi que les cellules de contrôle ont été marquées en les incubant avec de l'IP à 100 μ M (5% v/v) pendant 15 minutes. Les bactéries ainsi marquées ont ensuite subi le même protocole expérimental et les échantillons ainsi générés ont été contrôlés au microscope à fluorescence. Il est à noter que les cellules marquées à l'IP n'ont pas été modifiées pour exprimer la GFP.

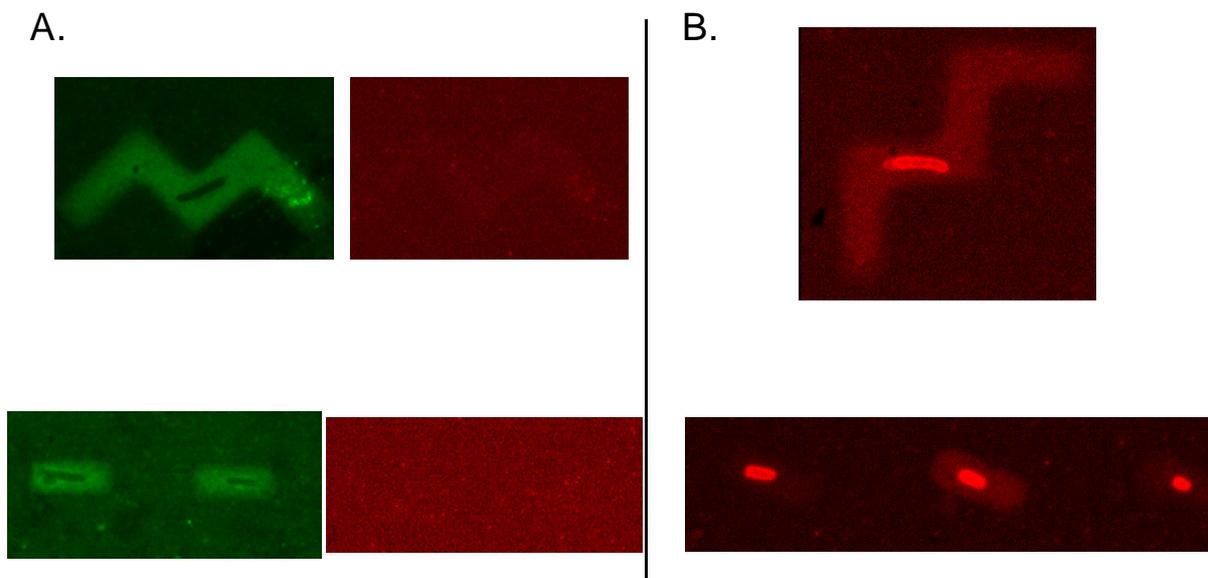


Figure 7. Détection de la viabilité des cellules par coloration. A. Image en fluorescence d'*E. coli* marquées à l'IP et déposées sur une surface microstructurée d'OTS avec motifs époxyde-streptavidine. B. Image en fluorescence de ce même substrat exposé à l'air et placé sur une plaque chauffante à 180°C.

Les images en fluorescence des bactéries marquées à l'IP et déposées suivant le protocole expérimental décrit précédemment ont été comparées avec celles prises sur des substrats où les bactéries ont été volontairement endommagées. Pour endommager la membrane des cellules bactériennes, le substrat de contrôle a été placé pendant 5 minutes sur une plaque chauffante à 180°C puis observé en fluorescence. La figure 8 démontre que le traitement thermique que l'on fait subir aux cellules endommage la membrane cellulaire à partir de 35°C.

La figure 7B montre que dans le cas du substrat de contrôle pour lequel les bactéries ont été volontairement endommagées thermiquement, les bactéries apparaissent rouges avec une intensité de fluorescence atteignant 881 unités (unités arbitraires), alors que dans le cas de l'expérience d'intérêt (figure 10A) la coloration se traduit par une fluorescence résiduelle de fond atteignant 600 unités seulement, sans pouvoir distinguer de cellule fluorescente. Cette observation confirme l'hypothèse qu'après fixation, les cellules bactériennes ne sont pas endommagées et demeurent vivantes. En effet, étant donné que la fluorescence est une mesure de la reconnaissance intercalant-acide nucléique de la cellule, et que l'IP ne peut pénétrer que dans des cellules endommagées ou mortes, ces résultats confortent l'idée que la fixation des bactéries sur une surface structurée chimiquement ne provoque ni une détérioration de la membrane ni la mort des cellules.

Cependant, la biotinylation des bactéries est une manipulation délicate à mettre en œuvre. En effet, la biotine NHS se fixe sur les protéines membranaires des bactéries ce qui a tendance à les fragiliser. Ceci nous a poussés à étudier plus en profondeur le cas des bactéries non traitées.

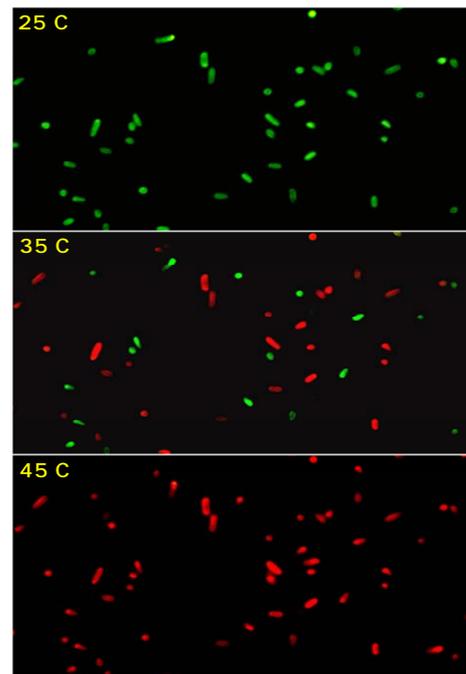


Figure 8. Cellules *E. coli* marquées au SYTO 9 et à l'IP et fixées sur une surface. Ces bactéries sont ensuite soumises progressivement à différentes températures (25°C, 35°C, 45°C). La coloration verte correspond à une cellule vivante et la coloration rouge correspond à une cellule morte ayant une membrane endommagée (Berquand, Dague, Poster AFM Biomed, Monterrey 2008).

III. B. Bactéries non traitées

III.B.1. Fonctionnalisation des sites d'accroche

Dans la section précédente nous avons exploité le couple biotine-streptavidine entre des bactéries biotinylées et des surfaces fonctionnalisées avec des molécules de streptavidine. Ici, nous avons choisi d'étudier différentes fonctionnalisations des motifs pour isoler, organiser et immobiliser des bactéries uniques mais sans avoir recours à une fonctionnalisation chimique des cellules.

Pour cette partie, nous avons utilisé le même substrat de base à savoir un substrat microstructuré par microcontact printing de molécules d'OTS. L'idée est la même : avoir une surface passivante excepté aux endroits des sites d'accueil des bactéries. Afin de nous affranchir de la fonctionnalisation chimique des cellules, nous avons ici exploré d'autres alternatives pour fonctionnaliser localement les sites d'accueil et conserver cette adsorption préférentielle des bactéries (schéma 4).

Ainsi, pour induire une sélectivité entre les cellules *E. coli* non traitées et les motifs vierges, nous avons tout d'abord évalué au travers d'une analyse par microbalance à

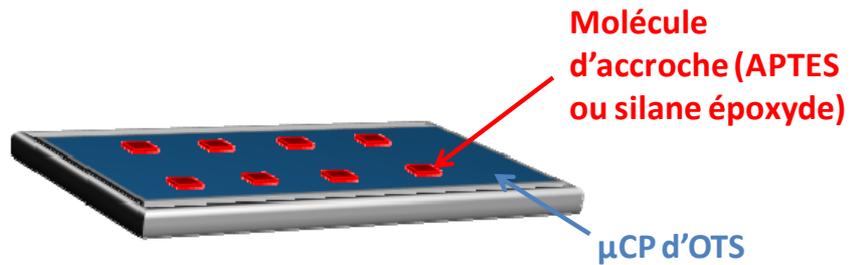


Schéma 4. Silanisation des motifs (sites d'accroche des bactéries) en phase liquide.

quartz, l'interaction entre bactéries non traitées et différentes chimies de surface candidates : OTS et SiO_2 utilisées comme références, et des surfaces SiO_2 silanisées soit avec un silane amine chargé positivement (APTES) soit avec un silane terminaison époxyde.

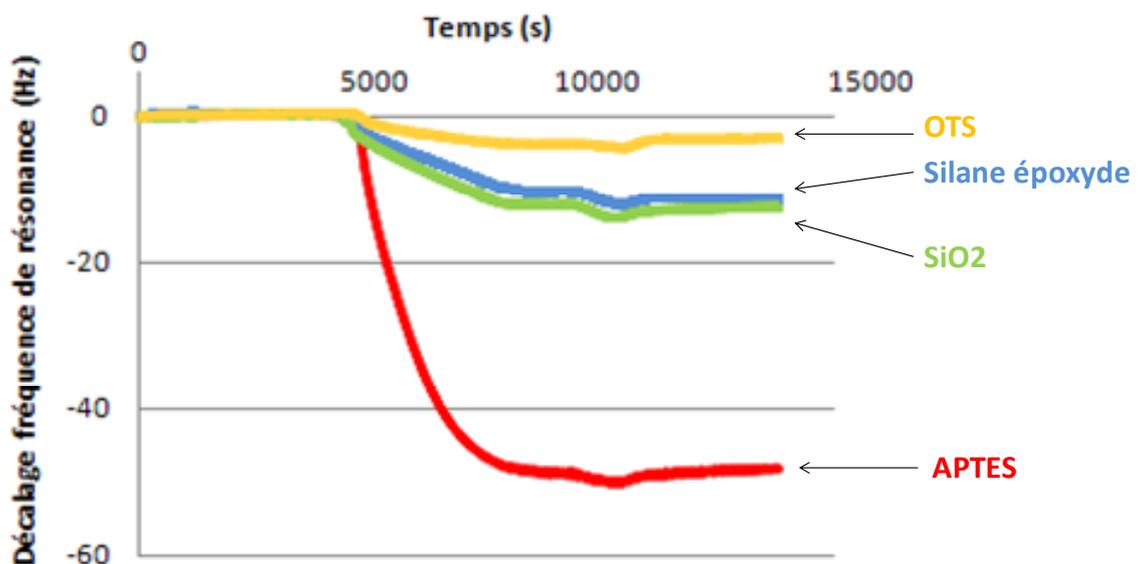


Figure 9. Comparaison des cinétiques d'adsorption et de désorption de bactéries *E. coli* non traitées sur des substrats SiO_2 présentant différentes chimies de surface ($T=25^\circ\text{C}$). Décalage de la fréquence de résonance (Δf) en fonction du temps lors de l'exposition d'une couche d'OTS (courbe jaune), d'une couche époxyde (courbe bleue), d'une surface SiO_2 (courbe verte) et d'une couche d'APTES (courbe rouge) à l'injection d'*E. coli* non traitées.

Le décalage de la fréquence de résonance (figure 9) enregistré entre le palier initial avant adsorption des bactéries non traitées et le palier final après rinçage et désorption des bactéries faiblement accrochées, est utilisé comme indicateur du degré d'interaction entre les bactéries injectées et la surface. On observe que les *E. coli* ont une interaction avec la surface de SiO_2 , la surface d'époxyde et la surface d'APTES. L'interaction avec les surfaces SiO_2 et époxyde est comparable mais demeure faible comparée avec l'interaction mesurée dans le cas d'une surface d'APTES. En effet, cette interaction, plus précisément la masse de cellules *E. coli* adsorbées est 5 fois plus importante dans le cas d'une interaction électrostatique entre les bactéries chargées négativement et la surface d'APTES, chargée positivement. Par ailleurs, on observe qu'il n'y a pas d'interaction significative entre les *E. coli* et la surface hydrophobe fonctionnalisée OTS : la fréquence de résonance revient pratiquement à sa valeur initiale après rinçage. Il est à noter que l'analyse par microbalance à quartz renseigne uniquement sur l'interaction entre les bactéries et les différentes surfaces fonctionnalisées (planes) mais ne

rend compte en aucun cas de l'effet de la microstructuration de la surface. La molécule que nous avons finalement choisie pour réaliser la fonctionnalisation des motifs d'accueil des bactéries non traitées a donc été l'APTÉS.

III. B. 2. Immobilisation des bactéries non traitées sur substrats chimiques.

Pour structurer la surface de façon à présenter un fort contraste d'adsorption, nous avons donc fonctionnalisé les motifs vierges après μ CP d'OTS avec des molécules d'APTÉS par simple incubation. Nous avons ensuite incubé pendant 20 minutes une solution contenant des bactéries non traitées sur cette surface. Les images champ sombre (figure 10) révèlent une accroche sélective des bactéries non traitées sur les motifs APTÉS : l'interaction électrostatique que nous attendions basés sur l'analyse QCM s'est produite et notre analyse QCM s'est avérée juste. La passivation OTS empêche efficacement l'adsorption non-spécifique des bactéries sur la surface.

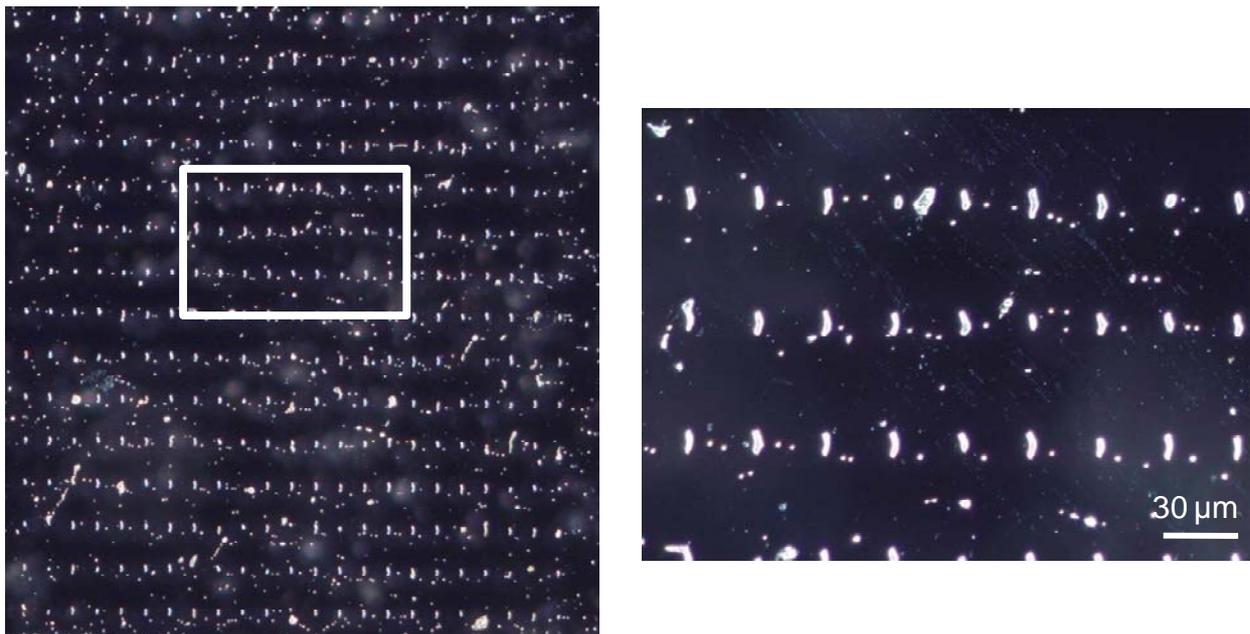


Figure 10. Dépôt de bactéries non traitées sur une surface microstructurée avec motifs APTÉS. Image champ sombre 1100 μ m x 1100 μ m (à gauche) avec le zoom correspondant (à droite).

La figure 10 témoigne que l'on obtient des événements d'adsorption de bactéries uniques avec un taux de réussite élevé. Ces réseaux de bactéries distribuées de façon régulière s'étendent sur une surface de plusieurs millimètres et sont obtenus de façon reproductible.

En outre, des expériences complémentaires d'incubation de bactéries non traitées réalisées sur des surfaces microstructurées avec motifs SiO_2 ou époxyde ont montré que l'adsorption sélective des cellules sur ces motifs a lieu également avec le même taux de réussite mais avec

une accroche beaucoup moins robuste que celle sur motifs APTES. En effet, après rinçage des substrats, on observe la désorption des cellules comme cela a été observé par QCM.

Ces observations nous permettent d'avancer que la microstructuration de surface induit un piégeage des bactéries dans leur milieu natif et facilite ou contribue à la dynamique d'assemblage des bactéries en réseaux ordonnés : la structuration elle-même de la surface est responsable du processus d'adsorption sélective. En effet, ce même type de structuration de surface peut induire aussi bien le piégeage de bactéries traitées que de bactéries non traitées. Ainsi, toute fonctionnalisation chimique locale additionnelle aura uniquement une influence sur la robustesse de l'accroche des bactéries sur la surface mais n'en aura pas une sur leur localisation.

Ceci démontre que la structuration de surface développée est réellement efficace pour la création de réseaux de bactéries uniques sans nécessiter d'une fonctionnalisation chimique des espèces.

De la même façon que pour les bactéries traitées, nous avons réalisé des colorations et nous avons vérifié la viabilité des cellules. Ces expériences ne sont pas rapportées ici par souci de concision (voir référence [20]).

III. B. 3. Propriétés nanomécaniques de cellules mortes ou de cellules vivantes

Nous avons souhaité démontrer que le processus d'immobilisation déterministe que nous avons mis au point permet de réaliser des caractérisations AFM de ces micro-organismes. Nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la rigidité de ces cellules. Le processus d'immobilisation mis au point permet en effet de réaliser de véritables études statistiques sur cellules individuelles.

Nous avons donc utilisé la spectroscopie de force (se référer au Chapitre 2 sur les moyens de caractérisation) (SF) pour étudier les propriétés élastiques des cellules *Escherichia coli* présentant des membranes endommagées ou intactes. En effet, la SF a été employée sur des plaquettes humaines [21], des macrophages vivants [22], des globules rouges [23], ainsi que sur des diatomées [24] et différentes bactéries ou *Fungi* [25-30]. En ce qui concerne les *E. coli*, Eaton et al. [31] ont récemment testé l'impact des chitosans (un composé antibactérien) sur l'élasticité de la paroi cellulaire. Etant donné que la préparation de l'échantillon AFM impliquait une étape de séchage, cette équipe a trouvé des modules de Young compris entre 180-220 MPa. Dans notre étude, les cellules ne sont jamais exposées à l'air et les expériences de SF sont réalisées en milieu liquide (PBS) afin d'éviter les interactions électrostatiques qui peuvent se produire dans des buffers à faible force ionique [32]. Volle et al. quant à eux [33] ont travaillé sur l'élasticité des *E. coli* lors de leur prédation par un *Bdellovibrio bacteriovorus*. Ils montrent que les cellules envahies sont moins rigides (constante de raideur : 0.064 N/m) que les cellules saines (0.23 N/m). Cette tendance a également été observée dans le cas de cellules cancéreuses [34]. Pour mesurer la constante de raideur, il faut se concentrer sur la fin de la courbe d'indentation correspondant en d'autres termes, à de fortes forces appliquées. Le comportement de la cellule dans cette plage est connu pour être directement lié à sa pression osmotique [35, 36]. En conséquence, la modification observée par Volle et al.

est essentiellement due à une forte diminution de la pression de turgescence de la cellule durant le processus de prédation et non pas à une modification de la paroi cellulaire.

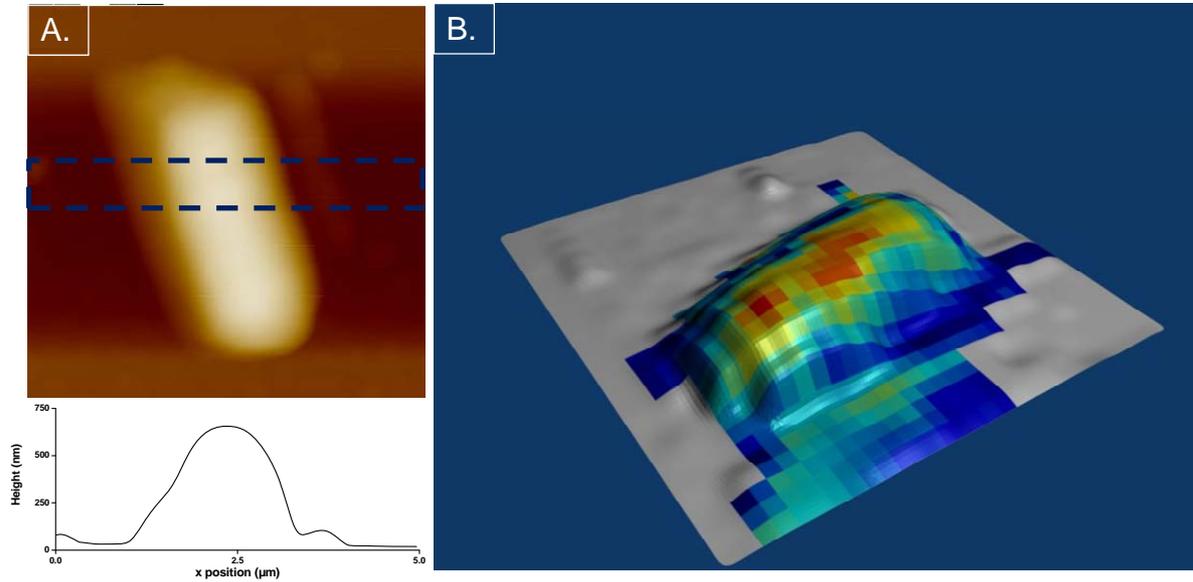


Figure 11. Dépôt de bactéries non traitées sur une surface microstructurée d'OTS avec motifs APTES. A gauche (A) image AFM de hauteur et sa section correspondante et à droite (B) image reconstituée en 3D (logiciel VEECO en cours de développement).

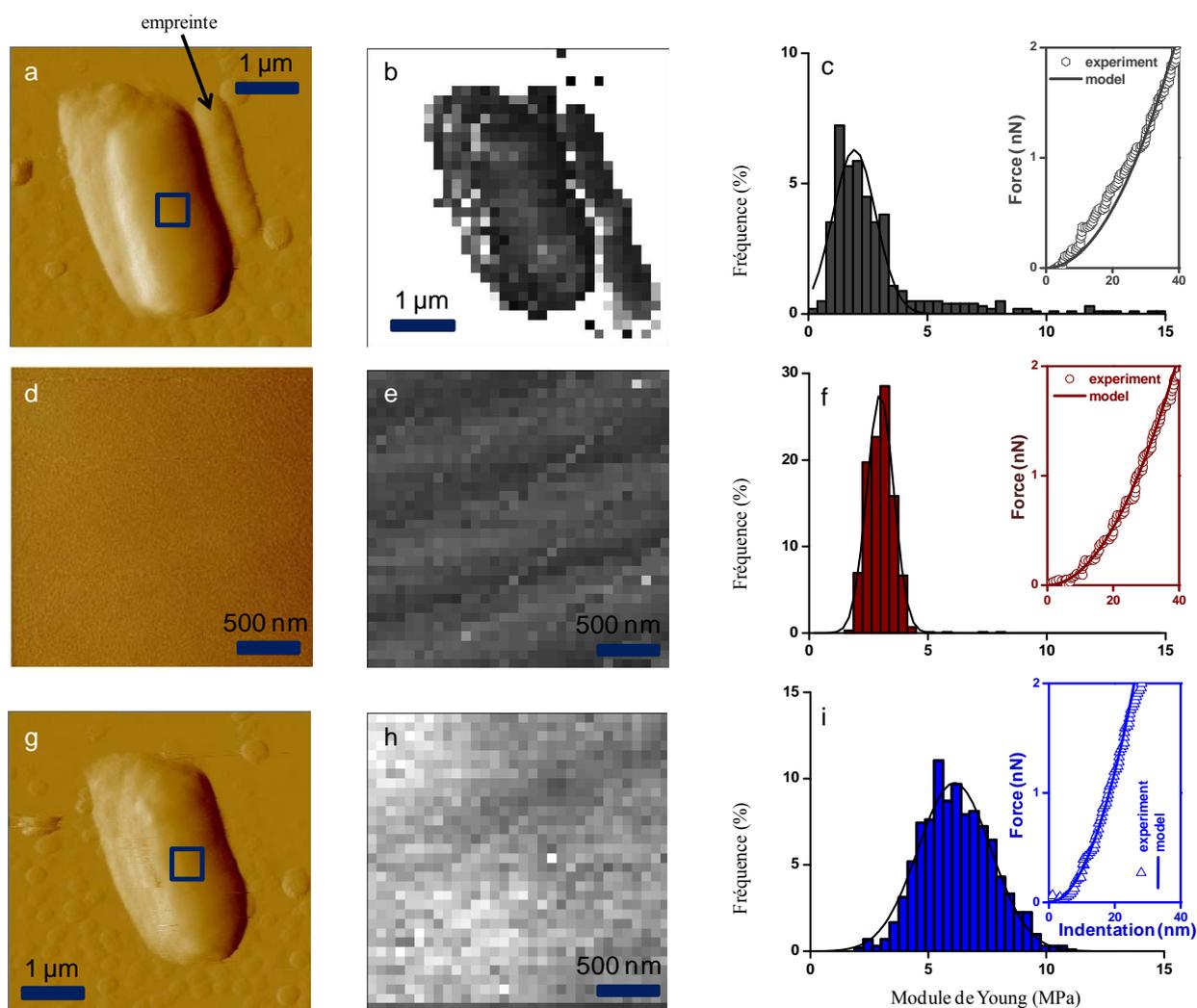


Figure 12. Propriétés mécaniques d'une cellule vivante ou morte.

- a: Image AFM de déflexion d'une bactérie *E. coli* unique vivante. On aperçoit une empreinte à droite de la cellule ;
d: Image AFM de déflexion correspondant à l'encart bleu sur a ;
g: Image AFM de déflexion de la même cellule unique morte suite à un traitement thermique (20 min, 45°C). L'empreinte a disparu ;
b, e, h: cartographies d'élasticité (échelle en $z = 10$ MPa) correspondant respectivement à a, d, et à l'encart de g ;
c, f, i: distribution des mesures d'élasticité et leurs courbes de force type correspondant à b, e et h respectivement.

La figure 12 présente une même cellule imagée par AFM en mode contact avant (a, d) et après chauffage pendant 20 minutes à 45°C (g). La cellule mesure approximativement 600 nm de hauteur (figure 11) ce qui correspond à la valeur classique d'une bactérie gram négative imagée en mode contact [37] mais cette valeur n'est pas modifiée par le traitement thermique. En effet, il est à noter que ni la hauteur ni l'aspect de surface ne sont modifiés par ce traitement. Cependant, l'empreinte visible Fig 12a disparaît sur la Fig 12g ce qui suggère que la chaleur peut induire la désorption de substances accrochées faiblement à la surface. Les Figs 12b, 12e et 12h sont des cartographies d'élasticité enregistrées sur la cellule vivante (b, e) et sur la cellule une fois morte (h). Les modules de Young sont représentés selon une échelle de couleur comprise entre 0 et 10 MPa. En d'autres termes, plus les pixels sont clairs, plus le module de Young est élevé. Pour éviter tout artéfact par effet de bord [38], les

cartographies de force ont été enregistrées sur de petites zones ($500 \times 500 \text{ nm}^2$) au centre de la cellule (e, h) ce qui se traduit par une répartition homogène des modules de Young (f, i). Dans la cartographie de force b, le module de Young de la cellule et de l'empreinte est de $1.9 \pm 0.9 \text{ MPa}$, tandis que pour le reste de la surface il est de $150 \pm 13 \text{ MPa}$. Dans la cartographie de force e, réalisé exclusivement sur la partie supérieure de la cellule, on mesure un module de Young de $3.0 \pm 0.6 \text{ MPa}$. Cependant, après chauffage (force volume h et histogramme i), le module élastique augmente jusqu'à $6.1 \pm 1.5 \text{ MPa}$.

Nous avons donc démontré que les cellules ayant des membranes endommagées présentent un module de Young plus élevé ($6.1 \pm 1.5 \text{ MPa}$) que celui de cellules vivantes ($3.0 \pm 0.6 \text{ MPa}$).

Ainsi, s'il est impossible de distinguer une cellule vivante d'une cellule morte uniquement à partir des images AFM, il est cependant possible de le faire à partir de l'étude de leurs propriétés mécaniques.

III. B. 4. Contrôle du nombre de bactéries

La figure 13 montre quelques exemples des résultats que l'on peut obtenir en utilisant des motifs de géométries différentes. Afin de mieux visualiser les motifs, ceux-ci ont été fonctionnalisés avec des molécules de streptavidine marquées en fluorescence. Comme le montre la figure, les bactéries peuvent être confinées le long d'une spirale (figure 13A) ou suivant un damier (figure 13B). Leur assemblage peut également être guidé le long de lignes continues (figure 13 C et D). En fait, en modulant la concentration des bactéries et la taille des motifs, on est capables de contrôler le nombre de bactéries ou de créer des arrangements beaucoup plus complexes. La technique que nous avons développée donne donc à l'utilisateur une flexibilité non négligeable qui permet d'entrevoir de nombreuses configurations expérimentales intéressantes.

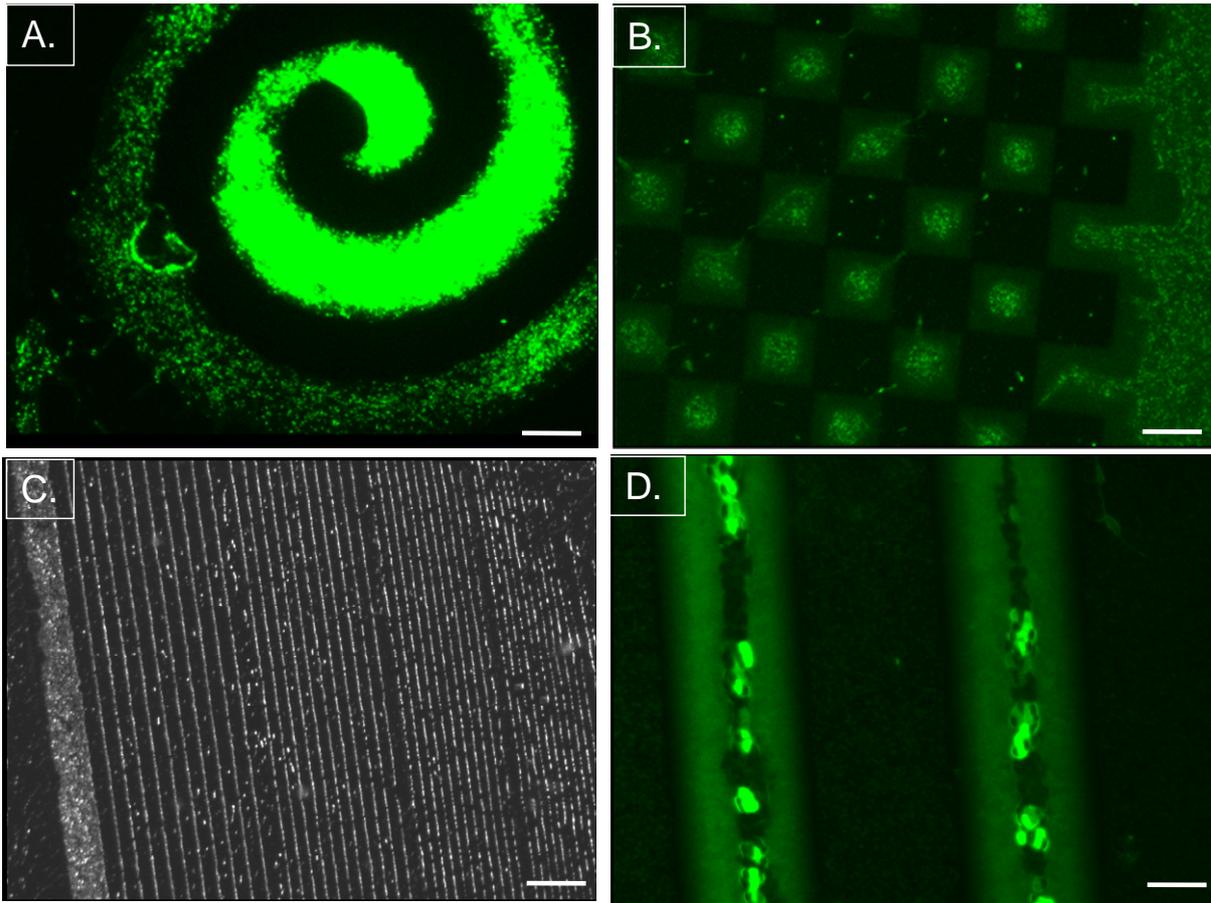


Figure 13. Dépôt de bactéries GFP non traitées sur un substrat microstructuré avec motifs streptavidine présentant des géométries variées. Images en fluorescence prises avec un filtre vert (A, B et D) et sans filtre C (les barres d'échelle correspondent à 20 μm pour A, B et C et à 10 μm pour D).

III. B. 5. Y-a-t-il une adhésion orientée des bactéries ?

Une question scientifique qui est très en vogue actuellement est le fait de comprendre les mécanismes d'adhésion des bactéries. Certains auteurs parlent de l'existence d'une polarité des cellules qui orienterait leur adhésion. Il est vrai que dans l'ensemble des résultats présentés nous avons constaté que les bactéries étaient toutes disposées dans le même sens, suivant une même orientation mais nous avons attribué ceci à un effet de piégeage purement mécanique exercé par les motifs chimiques. L'une des expériences réalisées a attiré notre attention.

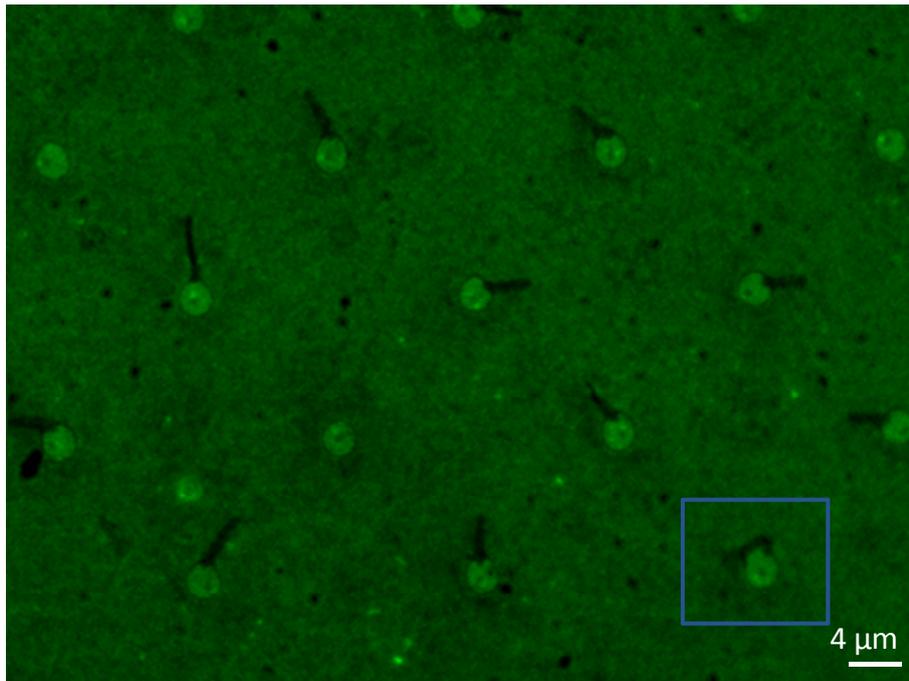


Figure 14. Substrat microstructuré par μ CP d'OTS fonctionnalisé localement avec des motifs streptavidine par mise en contact avec un timbre plat encre avec des molécules de streptavidine. Les bactéries incubées sur ce substrat à contraste chimique sont non traitées.

Il s'agit d'un substrat structuré par microcontact printing sur lequel nous avons déposé la streptavidine non pas par incubation mais par microcontact printing à l'aide d'un timbre plat. Sur la région de motifs présentée figure 14, dont la taille (3 μ m de diamètre) est en théorie trop petite pour accueillir des cellules uniques, nous pouvons observer qu'après retrait de la goutte, les bactéries sont restées accrochées aux motifs par leurs extrémités avec des orientations aléatoires. L'adhésion se fait majoritairement par une extrémité à la fois, mais quelques fois elle se fait par les deux (encart bleu). Ceci laisse sous-entendre que les cellules bactériennes s'accrochent par leurs extrémités et non par l'ensemble de leur membrane extérieure (protéines membranaires) au travers d'une interaction chimique comme nous aurions pu le penser. Dans notre cas y-a-t-il un effet lié à la structuration de surface? L'accroche des bactéries est-elle dirigée uniquement par leurs extrémités comme certains auteurs le suggèrent? Comment est leur répartition/distribution de charges en surface? Ces questions restent ouvertes mais de tels substrats pourraient peut-être permettre d'obtenir de nouvelles données d'un point de vue plus fondamental.

IV. Extensions et applications

Cette méthodologie de biopatterning cellulaire est actuellement utilisée au sein du groupe NBS du LAAS dans l'étude du comportement de macrophages humains en collaboration avec l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale. D'autres applications sont en cours, notamment le biopatterning de virus, de levures, et de cellules neuronales.

D'autres méthodes et outils restent encore à explorer. La fonctionnalisation chimique des pointes AFM est une méthode intéressante à développer au sein du groupe NanoBioSystèmes afin d'apporter des informations supplémentaires quant à la caractérisation chimique des couches atomiques (Thèse Eric Jauvert dans le groupe). Une autre technique à privilégier également pourrait être la silanisation par dépôt en phase vapeur. En effet, cette technique permet d'obtenir des couches moléculaires uniformes et de meilleure qualité encore.

En outre, les micromoteurs artificiels présentant une efficacité très limitée en raison de la prédominance de la friction par rapport aux forces d'actuation électriques et électromagnétiques à l'échelle micro- et nanométrique, interfacer ces micro- ou nanosystèmes avec des bactéries pourrait constituer un moyen d'augmenter leurs performances. Dans le cas des microsystèmes, les bactéries micrométriques vivantes ainsi intégrées pourraient être exploitées directement pour générer du mouvement [18] ou pour la génération d'énergie dans les biocarburants [40]. Pour les nanosystèmes, des parties spécifiques du nanomoteur flagellaire pourraient être assemblées et interfacées avec des NEMS [41].

V. Conclusion

En conclusion, l'objectif de cette étude a été atteint. Nous avons mis en place une procédure simple et fiable qui permet de générer des motifs chimiques présentant des propriétés de surface différentes afin d'induire l'adsorption sélective de bactéries traitées et non traitées à des endroits prédéfinis et en milieu liquide. L'ingénierie chimique de surface de ces substrats a été préparée en combinant deux techniques, la lithographie douce et une simple technique d'incubation. Nous avons optimisé le μ CP d'OTS de manière à obtenir une microstructuration de surface de qualité. Ainsi, nous avons démontré que le procédé technologique développé permet d'obtenir des monocouches denses et homogènes d'OTS qui permettent de passiver la surface sauf aux endroits prédéfinis.

Différentes fonctionnalisations des motifs (simples et doubles) ont été ensuite évaluées, et nous avons démontré la pertinence des protocoles par le biais de plusieurs moyens de caractérisation. Nous avons mis en évidence une adsorption sélective des cellules sur chacun de ces sites chimiques localisés et nous avons réussi à fabriquer des réseaux ordonnés de bactéries uniques et vivantes avec un taux de réussite proche de 100%. Ce procédé peut être utilisé pour positionner chaque bactérie sans l'exposer à l'air ou tout autre environnement agressif qui pourrait l'endommager. Ces résultats suggèrent en outre que la structuration chimique de la surface est responsable du processus d'adsorption sélective. En effet, la microstructuration réalisée par microcontact printing induit l'adsorption aussi bien de bactéries traitées que de bactéries non traitées. Ainsi, le choix des molécules utilisées pour fonctionnaliser les motifs a essentiellement une influence sur la solidité de l'accroche des bactéries sur la surface plutôt que sur leur localisation.

Cette méthodologie peut facilement être adaptée pour générer des réseaux de tout type de microorganismes en fonctionnalisant les motifs de manière appropriée.

Cette méthodologie peut être utilisée pour mener des études fondamentales des mécanismes intra-cellulaires et organisation sub-cellulaire, mais aussi pour interfacer à terme des cellules vivantes avec des microsystèmes artificiels. Elle est compatible avec tous types de substrats,

aussi bien du silicium pour l'intégration de microsystèmes, que des surfaces de verre pour des études biologiques plus fondamentales sur cellules individuelles et pourrait être étendue à des matériaux polymères.

VI. References

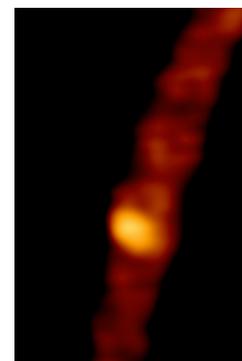
- [1] H.C. Berg, *Anu. Rev. Biochem.* (2003), 72, 19-54.
- [2] S. Kojima, D. F. Blair, *Biochemistry* (2001), 40, 13041-13050; P. N. Brown, C. P. Hill, D. F. Blair, *EMBO J.* (2002), 21, 3225-3234.
- [3] J. Chalmeau, Contributions des nanotechnologies à l'étude et à l'assemblage du Nano-Moteur flagellaire des bacteries, Université de Toulouse, (2009).
- [4] E. Dague, A. Delcorte, J. P. Latge, Y. F. Dufrene, *Langmuir* (2008), 24(7) 2955-2959.
- [5] G. Francius, B. Tesson, E. Dague, V. Martin-Jézéquel, Y. F. Dufrêne, *Environmental Microbiology* (2008), 10, 1344-1356.
- [6] E. Dague, D. Alsteens, J.-P. Latge, Y. Dufrene Y, *Biophys J.* (2008), 94, 1-5.
- [7] E. Dague, D. Alsteens, J. P. Latge, C. Verbelen, D. Raze, A. R. Baulard, Y. F. Dufrêne, *Nano Lett.* (2007), 7, 3026-3030.
- [8] D. Alsteens, E. Dague, P. G. Rouxhet, A. R. Baulard, Y. F. Dufrene, *Langmuir* (2007), 23, 11977-11979.
- [9] D. Alsteens, C. Verbelen, E. Dague, D. Raze, A. R. Baulard, Y. F. Dufrêne, *Eur. J. Physiol.* (2008), 456, 117-125.
- [10] F. Kienberger, C. Rankl, V. Pastushenko, R. Zhu, D. Blaas, P. Hinterdorfer, *Structure* (2005), 13, 1247-1253.
- [11] P. Hinterdorfer, Y. F. Dufrêne, *Nature Methods* (2006), 3, 347-355.
- [12] C. Verbelen, V. Dupres, D. Raze, C. Bompard, C. Locht, Y. F. Dufrene, *J. Bacteriol.* (2007), 189, 8801-8806.
- [13] R. J. Karreman, E. Dague, F. Gaboriaud, F. Quilès, J. F. L. Duval, G. G. Lindsey, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins & Proteomics* (2007), 1774, 131-137.
- [14] R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin, *Science* (1999), 283, 661.
- [15] P. Belaubre, M. Guirardel, V. Leberre, J. B. Pourciel, C. Bergaud, *Sensors & Actuators A: Physical* (2004), 110(1-3), 130-135.

- [16] L. Xu, L. Robert, Q. Ouyang, F. Taddei, Y. Chen, A. B. Lindner, D. Baigl, *Nano Letters* (2007), 7(7), 2068 -2072.
- [17] S. Rozhok, Z. Fan, D. Nyamjav, C. Liu, C. A. Mirkin, R. C. Holz, *Langmuir* (2006), 22, 11251-11254.
- [18] Y. Hiratsuka, M. Miyata, T. Tada, T. Q. P. Uyeda *PNAS* (2006), 103(37), 13618-13623
- [19] R. Unal, A. E. Yousef, C. P. Dunne, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* (2002), 3(3), 247-254.
- [20] A. Cerf, J.-C. Cau, C. Vieu, *Colloids Surf. B: Biointerf.* (2008), 65, 285.
- [21] M. Radmacher, M. Fritz, C. M. Kacher, J. P. Cleveland, P. K. Hansma, *Biophys. J.* (1996), 70, 556.
- [22] C. Rotsch, F. Braet, E. Wisse, M. Radmacher, *Cell. Biol. Int.* (1997), 21, 685.
- [23] K. E. Bremmell, A. Evans, C. A. Prestidge, *Colloids Surf. B: Biointerf.* (2006), 50, 43.
- [24] N. Almqvist, Y. Delamo, B. L. Smith, N. H. Thomson, A. Bartholdson, R. Lal, M. Brzezinski, P. K. Hansma, *J. Microscopy* (2001), 202, 518.
- [25] F. Gaboriaud, S. Bailet, E. Dague, F. Jorand, *J. Bacteriol.* (2005), 187, 3864.
- [26] V. Vadillo-Rodriguez, T. J. Beveridge, J. R. Dutcher, *J. Bacteriol.* (2008), 190, 4225.
- [27] O. Stoica, A. Tuanyok, X. Yao, M. H. Jericho, *Langmuir* (2003), 19, 10916.
- [28] P. Schaer-Zammaretti, J. Ubbink, *Ultramicroscopy* (2003), 97, 199.
- [29] A. Touhami, B. Nysten, Y. F. Dufrêne, *Langmuir* (2003), 19, 4539.
- [30] E. Dague, Y. Gilbert, C. Verbelen, G. Andre, D. Alsteens, Y. F. Dufrêne, *Yeast* (2007), 24, 229.
- [31] P. Eaton, J. C. Fernandes, E. Pereira, M. E. Pintado, F. Xavier Malcata, *Ultramicroscopy* (2008), 108, 1128.
- [32] F. Gaboriaud, M. L. Gee, R. Strugnell, J. F. L. Duval, *Langmuir* (2008), 24, 10988.
- [33] C. B. Volle, M. A. Ferguson, K. E. Aidala, E. M. Spain, M. E. Nunez, *Langmuir* (2008), 24, 8102.
- [34] S. E. Cross, Y. S. Jin, J. Y. Rao, J. K. Gimzewski, *Nature Nanotech.* (2007), 2, 780-783.
- [35] M. Arnoldi, E. Bäuerlein, M. Radmacher, E. Sackmann, A. Boulbitch, *Phys. Rev. E.* (2000), 62, 1034.

- [36] X. Yao, J. Walter, S. Burke, S. Stewart, M. H. Jericho, D. Pink, R. Hunter, T. J. Beveridge, *Colloids Surf. B: Biointerf.* (2002), 23, 213.
- [37] F. Gaboriaud, E. Dague, S. Bailet, F. Jorand, J. Duval, F. Thomas, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2006), 50, 123-131.
- [38] F. Gaboriaud, B. S. Parcha, M. L. Gee, J. A. Holden, R. A. Strugnell, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2008), 62, 206-213.
- [39] J. F. Jones, J. D. Feick, D. Imoudu, N. Chukwumah, M. Vigeant, D. Velegol, *Appl. Env. Microbio.* (2003), 69(11), 6515-6519.
- [40] D. H. Park, G. Zeikus, *Applied and Environmental Microbiology* (2000), 66, 1292-1297
- [41] J. Chalmeau, L. Salomé, C. Thibault, C. Severac, C. Vieu, *Microelectronic Engineering* (2007), 84, 1754.

Chapitre 4

Assemblage ordonné et déterministe de molécules d'ADN uniques



La présente étude démontre que les forces capillaires peuvent être exploitées sur des surfaces structurées pour générer des réseaux ordonnés de molécules d'ADN uniques avec un taux de réussite proche de 100%, de façon automatisée et reproductible. Les molécules d'ADN peignées sont homogènes en longueur et en orientation, et sont positionnées sur une étendue de 1mm² en quelques secondes. La technique d'assemblage capillaire semble sur-étirer les molécules de 50% par rapport à leur longueur nominale. Le contrôle des quatre paramètres clé à savoir la concentration, la température, l'angle de contact, et la vitesse de déplacement du substrat permet d'avoir la main mise sur le mécanisme d'assemblage et permet une augmentation de la complexité structurale des motifs moléculaires. Cette technique est compatible avec des molécules aussi bien longues (dizaines de kbp) que courtes (quelques milliers de bp), avec des objets plus complexes directement en suspension, sans aucune sélection en taille, et permet d'entrevoir de nombreuses applications.

Chapter 4

Deterministic and ordered assembly of single DNA molecules

This study proves that capillary forces and convective flows can be exploited on structured surfaces to produce highly ordered arrays of single DNA molecules with a coverage rate of 99% in an automatized and highly reproducible way. The stretched DNA molecules are homogeneous in length and orientation and are precisely positioned over a millimetre-scale area in just a few seconds. The capillary assembly method is observed to extend the length of phage lambda DNA molecules to 50% of their contour length. The control of four experimental parameters, namely, the temperature, the contact angle, the substrate velocity and the DNA molecules' concentration, provides full control of the assembly process and permits an increase of the structural complexity of the produced molecular features. This technique can handle long (tens of kbp) but also short (a few thousands of bp) molecules, and bulk-functionalized molecules or complex objects directly in suspension to allow the construction of future 1D nanoscale building templates.

I. Généralités

I. A. Description « chimique » et « structurale » de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique, ou ADN, est une molécule retrouvée dans toutes les cellules vivantes qui renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. C'est aussi le support de l'hérédité car il est transmis lors de la reproduction, de manière intégrale ou non. Il porte donc l'information génétique, et constitue ainsi le génome des êtres vivants.

La découverte de la structure chimique de l'ADN s'est faite en plusieurs étapes. En 1869, le Suisse Friedrich Miescher isole une substance riche en phosphore dans le noyau des cellules, qu'il nomme nucléine (du latin nucleus, le noyau). En 1889, l'Allemand Altmann sépare à partir de la nucléine, des protéines et une substance acide, l'acide nucléique puis en 1896, l'Allemand Kossel découvre dans l'acide nucléique les 4 bases azotées A, C, T, G. Levene et Jacobs (USA) identifient alors le désoxyribose en 1928 : on parle alors d'acide désoxyribonucléique. En 1944, l'américain Avery découvre que l'ADN est responsable de la transformation génétique des bactéries, et que ce serait bien le support de l'hérédité. Mais, certains scientifiques restent sceptiques, et n'abandonnent pas l'idée que les protéines puissent porter l'information génétique. Finalement, en 1952, l'expérience de Hershey et Chase invalide définitivement cette dernière hypothèse.

La structure de l'ADN a été identifiée en 1953 par Watson et Crick dans le laboratoire Cavendish de Cambridge grâce à la technique de diffraction des rayons X sur des cristaux d'ADN [1]. Cette découverte valut à ces deux physiciens le prix Nobel de physiologie et de médecine, le 31 octobre 1962. Confirmée par Maurice Wilkins, cette découverte ne fut rendue possible que par le travail de Rosalind Elsie Franklin notamment par son cliché, le numéro 51, élément nécessaire à Watson, Wilkins et Crick pour attester le bien fondé de la structure de la double hélice de l'ADN. En effet ce cliché révèle la structure en double hélice, ainsi que la distance entre les bases azotées.

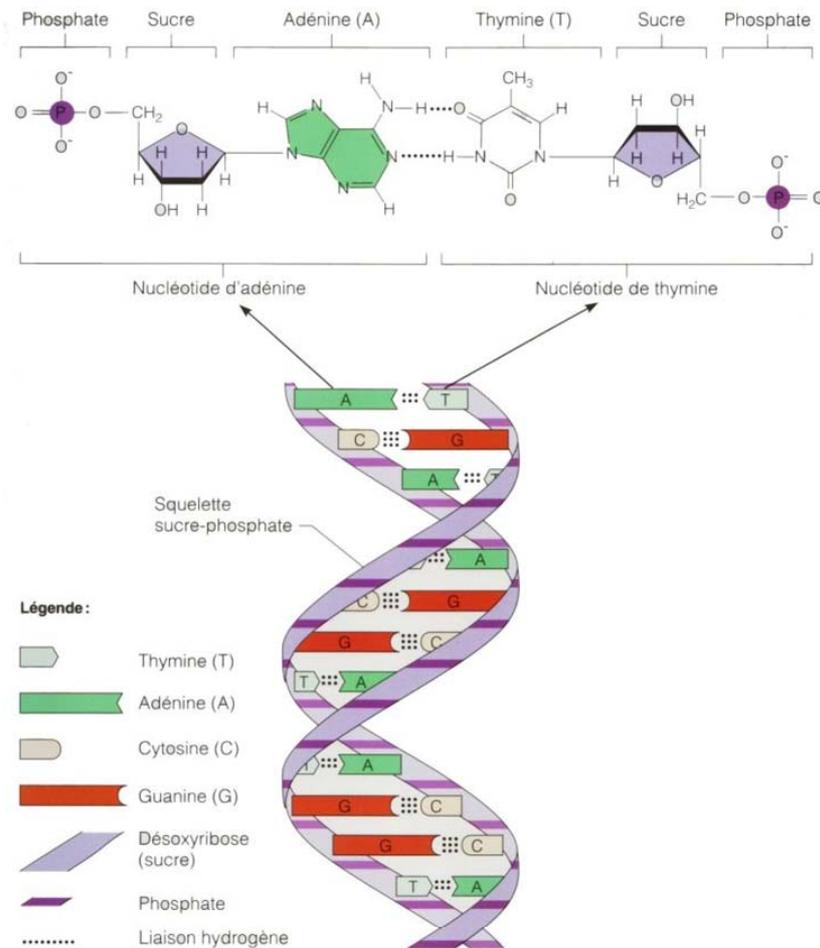


Schéma 1. Représentation schématique de la structure de l'acide désoxyribonucléique ou ADN [2].

Dans sa forme habituelle, la molécule d'ADN est formée par l'enchevêtrement de deux brins de polymères qui s'apparient entre eux pour former une structure régulière en forme de double hélice.

Plus précisément, chaque brin est un hétéropolymère composé d'une succession ou séquence de monomères appelés nucléotides. Chaque nucléotide est identiquement composé de trois éléments liés entre eux:

- un groupe phosphate lié à
- un sucre, le désoxyribose, lui-même lié à
- une base azotée.

Il existe quatre bases azotées différentes: l'adénine (notée A), la thymine (notée T), la cytosine (notée C) et la guanine (notée G). Chaque base est fixée sur un désoxyribose pour former un nucléoside. Lorsqu'un nucléoside est lié à un ou plusieurs phosphates, on dit qu'il s'agit d'un nucléotide. Dans l'ADN, les nucléotides sont reliés entre eux selon une certaine séquence grâce à des liaisons impliquant un groupe phosphate, qu'on appelle des liaisons 3'-5' phosphodiester. Pour fabriquer un brin d'ADN, il suffit donc d'enchaîner des nucléotides en les reliant par ce type de liaisons fortes.

L'appariement de nucléotides complémentaires appartenant à chacun des deux brins est à l'origine de la structure en double hélice. Les deux brins antiparallèles d'ADN sont toujours étroitement reliés entre eux par des liaisons hydrogène (appelées également « ponts hydrogène » ou encore simplement « liaisons H » ou « ponts H ») formées entre les bases complémentaires A-T et G-C (schéma 1). Grâce à l'alternance des 4 bases azotées A, C, T, G, aussi appelées « lettres », ces lettres mises bout à bout, constituent le texte -ou la séquence- de l'ADN. Ce message codé porte les informations génétiques. En effet, l'ordre, la nature, et le nombre de nucléotides déterminent l'information génétique. Le lien entre l'information génétique, et les caractères de l'organisme (le phénotype), est gouverné par le code génétique.

Comme expliqué précédemment, deux molécules d'ADN sont appariées via les liaisons hydrogènes entre leurs bases azotées pour former la double-hélice d'ADN (ADN sous forme double-brin). C'est sous cette forme stable que l'ADN est présent dans les organismes vivants. Pourtant cette double-hélice peut être ouverte afin de permettre l'exécution de processus biologiques fondamentaux (tels que la réplication ou la transcription) générant ainsi de l'ADN sous forme simple brin. Suivant les conditions du milieu, ces deux formes d'ADN (simple et double brin) peuvent voir leur structure varier. Ces structures sont dans l'ensemble rares, et leur fonctions biologiques (si elles en ont) mal connues.

I. B. Grandeurs biophysiques associées aux molécules d'ADN

La forme canonique en double hélice de l'ADN (notée B) caractérisée par une hélicité de 1 tour/10.5 pb possède une largeur physique (w) d'environ 2 nm et une longueur nominale $L = Na$, où N correspond au nombre de paires de bases et a est la distance entre les paires de bases (1 pb = 0,34 nm). A titre d'exemple, la longueur nominale d'un ADN de phage lambda (48,5 kpb) correspond donc à 16,49 μm . En solution, l'ADN se trouve sous forme de « pelote ». Le diamètre de la pelote d'ADN équivaut environ à 1/10 de la longueur nominale de l'ADN une fois déroulé (1,65 μm pour un ADN phage lambda par exemple). L'ADN est une molécule chargée négativement. La densité linéaire de charge due aux groupes phosphates PO_3^- constituant son squelette équivaut à $-2q/a \approx -6q/\text{nm}$, avec q la charge de l'électron (soit une densité de charge de $\approx -9,4 \cdot 10^{-10} \text{ C/m}$). La molécule d'ADN est considérée comme un polymère semi-flexible, en d'autres termes, et de façon qualitative, elle présente une flexibilité sur une longue distance, et une rigidité sur des courtes distances. La longueur seuil est appelée « longueur de persistance » (L_p). La longueur de persistance décrit la rigidité de courbure des polymères. Elle représente la distance caractéristique sur laquelle est conservée leur orientation. Pour l'ADN cette longueur L_p vaut 50 nm environ (soit 150 paires de bases). L'ADN est donc essentiellement rigide sur des distances inférieures à L_p , et essentiellement flexible sur des distances supérieures. Cette distance dépend de la densité de charge linéique et par conséquent du pouvoir ionique de la solution. La force requise pour étirer la molécule de 30% par rapport à sa longueur nominale a été mesurée comme étant équivalente à 40 fN [3].

Pour pouvoir visualiser aisément les molécules d'ADN, celles-ci sont le plus souvent rendues fluorescentes par marquage avec un intercalant de type YOYO-1 (dimère d'oxazole jaune, *Molecular Probes*, figure 1). Ce fluorophore est chargé positivement et possède des cycles aromatiques. Il interagit de façon attractive avec l'ADN chargé négativement et s'intercale le long des molécules d'ADN via ces cycles ; il devient alors beaucoup plus fluorescent (de l'ordre de 1000 fois) qu'en solution. Dans des conditions usuelles d'utilisation, il a été démontré que cet intercalant augmente la longueur nominale de l'ADN de 30 à 35% environ [4]. Certains auteurs affirment que la longueur de persistance est également augmentée dans les mêmes proportions mais ce point est encore sujet à débat.

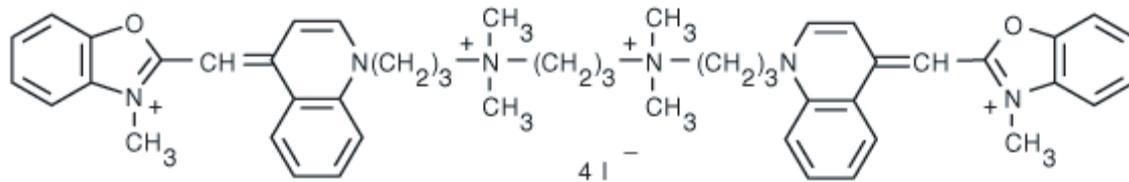


Figure 1. Structure chimique du YOYO-1.

II. Etat de l'art : méthodes d'étirement de la molécule d'ADN.

La fabrication de réseaux ordonnés de molécules d'ADN sur une surface est importante pour le développement de biocapteurs pour le diagnostic [5], et pour le développement de dispositifs dédiés à l'électronique moléculaire [6]. L'ADN est un matériau très prometteur pour construire des puces avec une précision nanométrique en raison de ses capacités de reconnaissance, de sa stabilité physicochimique, et de sa rigidité mécanique [7, 8-10].

Les puces à ADN sont une nouvelle technologie répandue et puissante qui promet d'être largement utilisée en biologie moléculaire et en médecine dans les années à venir. A l'échelle de la molécule unique, l'ADN a déjà été peigné pour le séquençage du génome [11] et pour le diagnostic médical [12]. Cependant, la tendance actuelle est d'être capable d'organiser des molécules d'ADN individuelles peignées en réseaux réguliers afin de pouvoir effectuer une lecture optique rapide et performante. Dans un autre contexte, la fabrication de cet assemblage contrôlé pourrait servir de base ou support pour la construction des dispositifs du futur. En effet, les chaînes d'ADN peuvent être métallisées [13-17], ou fonctionnalisées avec des nanoparticules [18], et cette capacité à fabriquer des structures nanométriques à 1D de façon contrôlée à des endroits prédéfinis d'un substrat pourraient laisser entrevoir la fabrication d'assemblages plus complexes.

Aussi bien pour le séquençage que pour des applications d'assemblage supramoléculaire, il est nécessaire de déplier l'ADN et de l'immobiliser sur une surface. Dans la littérature, de nombreuses études portant sur le peignage moléculaire ont été conduites [19-21]. La technique de " peignage moléculaire ", introduite en 1993, consiste à obtenir à partir de la molécule d'ADN en " pelote ", forme sous laquelle elle se trouve naturellement en solution,

des filaments alignés et étirés, beaucoup plus faciles à étudier que sous leur forme compactée. Cette technique permet d'étirer parallèlement un grand nombre de molécules d'ADN sur une surface. Le peignage est une technique simple à mettre en œuvre puisqu'il ne requiert aucune modification chimique des molécules d'ADN. En pratique, une lame de verre traitée chimiquement est plongée dans une solution contenant les molécules d'ADN. Chaque molécule se fixe à la lame par l'une de ses extrémités. La surface de verre est ensuite lentement retirée et ce mouvement provoque, par capillarité, l'étirement des molécules qui se collent à la lame, sous forme de fils étirés de même orientation.

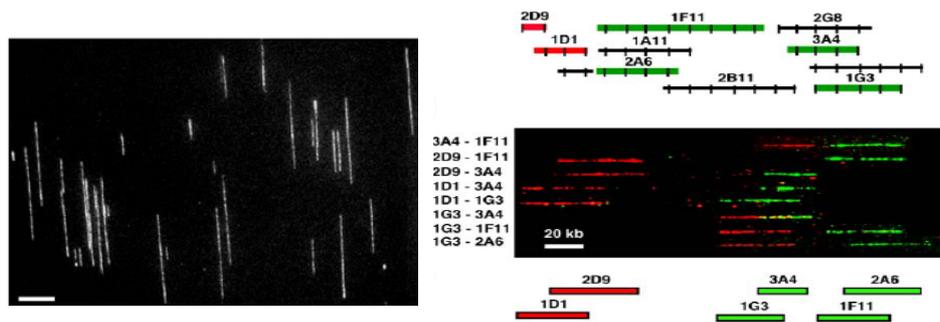


Figure 2. *A gauche, image en fluorescence de molécules d'ADN de phage marquées en fluorescence puis peignées sur des surfaces traitées à l'aide de dérivés du silane. Le champ de vue photographié à l'aide d'une caméra intensifiée contient une majorité de segments de 25 µm environ. Les fragments plus petits sont dus à des cassures aléatoires qui ont lieu avant ou lors de la préparation. La barre d'échelle correspond à 10 µm. A droite, exemple de cartographie physique sur ADN peigné [20].*

Ainsi, certains groupes de recherche ont mis au point des étirements de brins d'ADN sur des surfaces de différentes natures [22-25] dans le but de pouvoir les analyser par la suite, ou dans le but de réaliser des puces à ADN (figure 2). Les brins d'ADN ont été séparés grâce à des nanopiliers sous un champ électrique [26]. L'ADN a également été peigné en faisant circuler une solution d'ADN au travers de canaux microfluidiques [27]. Opitz et al. ont peigné les molécules d'ADN en les accrochant à des motifs chargés positivement [28]. D'autres groupes de recherche ont peigné les molécules d'ADN sur des substrats en PDMS modifiés ou non modifiés [29-32]. Cependant, la plupart du temps, les molécules sont peignées aléatoirement sur la surface sans origine prédéterminée et ne sont donc pas distribuées de façon contrôlée comme le montre la figure 2. Ceci constitue un réel inconvénient pour une exploitation compétitive de ces lames.

Guan et Lee ont été les premiers à générer des réseaux ordonnés de molécules d'ADN peignées sur une surface [32]. Dans cette étude, ils mettent en contact manuellement un timbre en PDMS structuré par lithographie avec une goutte d'ADN en solution. Ensuite, ils exercent une pression à l'arrière du timbre pendant quelques secondes et le retirent (figure 3). Enfin, les molécules sont transférées depuis ce timbre vers une lame de verre ou de mica. Cependant, dans cette référence, les molécules d'ADN finalement assemblées ne sont pas uniques et la technique présente l'inconvénient d'être manuelle donc difficilement contrôlable et reproductible. Le non contrôle précis du nombre de molécules d'ADN déposé par site rend impropre cette méthode pour un grand nombre d'applications en biologie. En revanche, ce travail nous a orientés vers la piste de l'assemblage capillaire sur des timbres de PDMS puis leur transfert par contact printing.

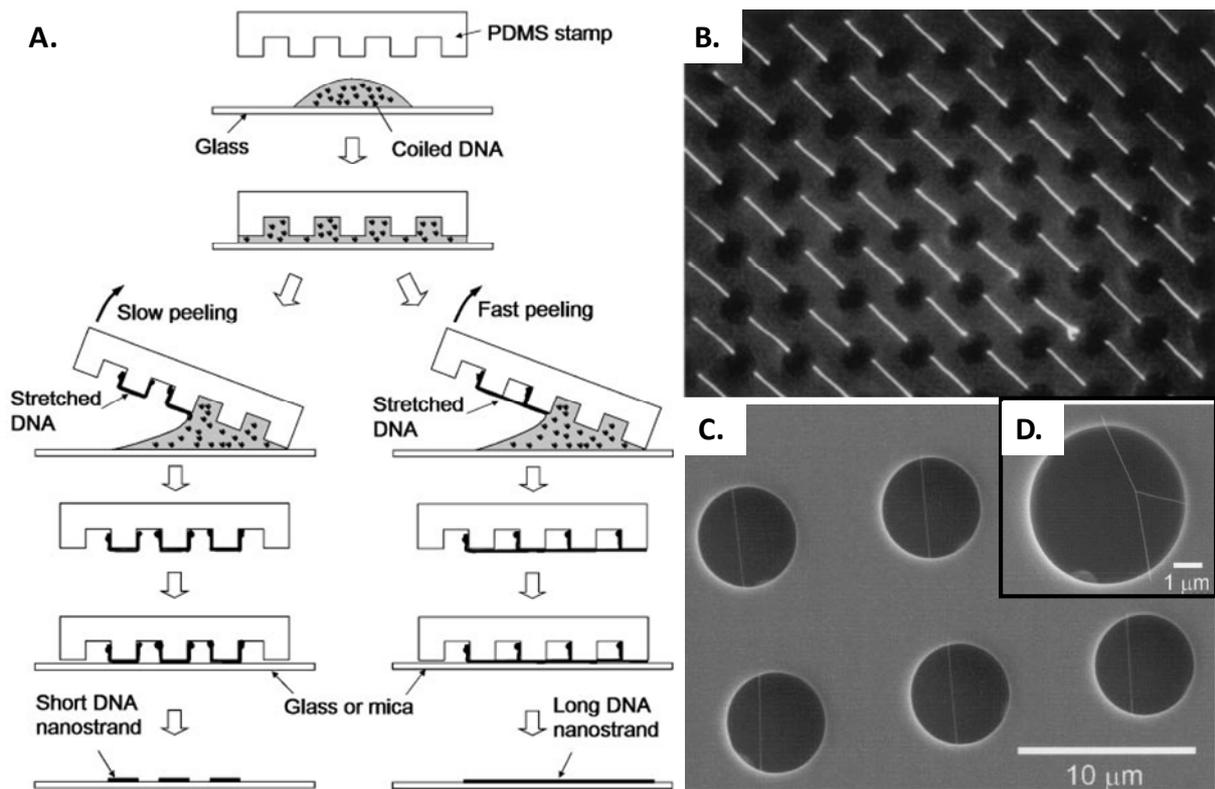


Figure 3. A. Schéma explicatif du peignage de l'ADN selon le protocole de Guan et Lee [32]. B. Image de fluorescence d'un réseau de brins d'ADN. C et D. Images MEB de molécules d'ADN suspendues au dessus des structures du timbre de PDMS.

L'assemblage capillaire constitue ici une alternative attrayante à ces études car elle permet de contrôler les paramètres expérimentaux avec une grande finesse et précision. Dans le cas des applications génomiques par exemple, où des molécules uniques sont requises, le contrôle des paramètres expérimentaux permettant des événements d'adsorption de molécules uniques, est crucial. Nous avons donc adopté la stratégie présentée dans le chapitre 2 section II, combinant la lithographie douce et l'assemblage capillaire.

Deux facteurs importants sont indispensables pour fabriquer et caractériser des réseaux ordonnés d'ADN : le substrat d'accueil doit être atomiquement plan de façon à pouvoir distinguer les motifs d'ADN et les nanostructures d'ADN doivent être positionnées de façon précise sur une large étendue tout en assurant leur immobilisation. Pour le substrat, notre choix s'est porté sur la silice avec une fonctionnalité amine et chargée positivement (couche moléculaire d'APTES) de manière à ce que l'accroche des molécules s'établisse de façon électrostatique en raison de la forte densité de charges négatives portées par l'ADN. Les substrats que nous avons utilisés sont soit du silicium oxydé, ou des lamelles de verre recouvertes par une monocouche moléculaire d'APTES, soit du mica, substrat bien adapté à l'imagerie par AFM.

III. Assemblage induit par des structures topographiques.

Les molécules d'ADN double brin utilisées durant cette étude sont issues de l'entérobactérie de phage lambda. Le **phage lambda** (*Enterobacteria phage λ*) est un virus bactériophage qui infecte la bactérie *Escherichia coli*. Cet ADN double brin linéaire de 48,5kb est entièrement séquencé.

III. A. Protocole expérimental.

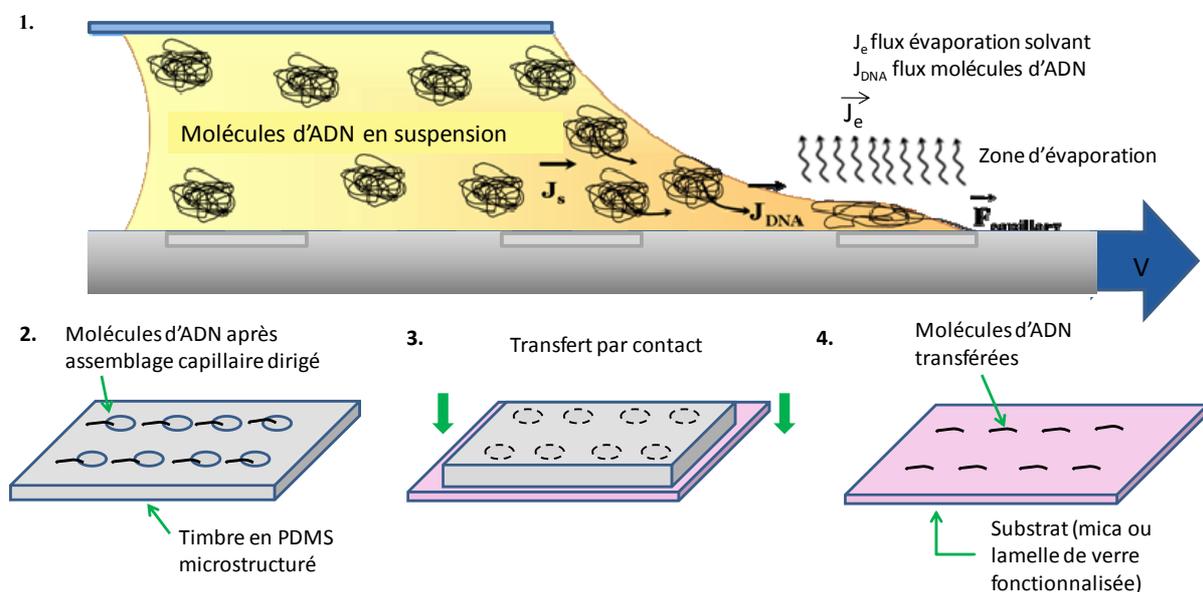


Schéma 2. Schéma représentant la procédure utilisée pour générer et transférer des réseaux de molécules d'ADN. 1. Assemblage capillaire des molécules d'ADN en suspension sur un timbre en PDMS microstructuré. Les molécules d'ADN ainsi assemblées après le procédé d'assemblage capillaire (2) sont ensuite transférées sur une surface d'accueil (lamelle de verre traitée avec une couche d'APTES ou mica) par simple contact entre le timbre et la surface (3). 4. On obtient des molécules organisées en réseaux sur la surface après transfert.

Dans le cas de l'assemblage de molécules d'ADN par assemblage capillaire, un timbre microstructuré est placé sur la platine en translation régulée en température (Cf. Chapitre 2). Une goutte de 30 μ l d'ADN de phage lambda à 10 μ g/ml dans de l'EDTA Tris pH.8 (Triton X-100 à 1%) est placée entre le timbre et la spatule de verre fixe. Le timbre est ensuite déplacé à une vitesse constante de 1mm/sec. La température du timbre est fixée à 25°C \pm 0.1°C pour préserver la structure de l'ADN. L'assemblage est réalisé sur toute l'étendue du timbre (environ 1 cm²).

Une fois l'assemblage terminé, les molécules d'ADN sont transférées du timbre vers une lamelle de verre fonctionnalisée avec de l'APTES ou vers une surface de mica fraîchement clivée par un simple contact d'une durée de 30 secondes.

III. B. Résultats

Nous ne consignerons pas dans ce manuscrit les expériences préliminaires qui nous ont permis d'établir les conditions optimales permettant d'obtenir un assemblage contrôlé jusqu'à la molécule individuelle. Ces conditions sont les suivantes : température du substrat à 25°C, vitesse de déplacement de 1 mm/sec, concentration des molécules d'ADN de 10 µg/ml, concentration de Triton X-100 de 1% v/v. Elles ne seront pas rappelées par la suite sauf si l'un de ces paramètres a été intentionnellement manipulé lors d'une expérience spécifique.

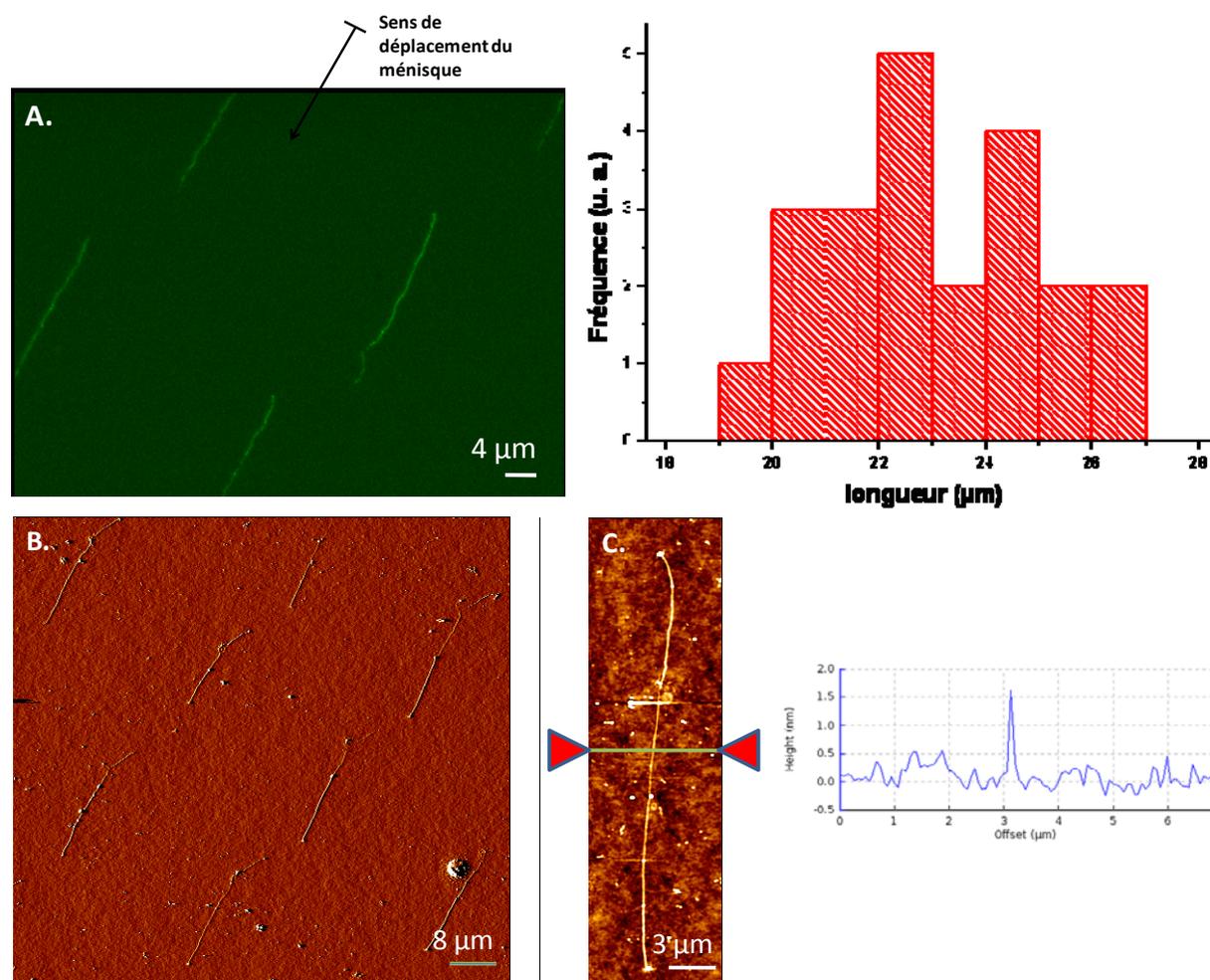


Figure 4. Réseau ordonné de molécules d'ADN phage lambda transférées sur une lamelle fonctionnalisée APTES après assemblage capillaire dirigé sur timbre microstructuré sous des conditions expérimentales optimales ($v=1\text{mm/sec}$, $T_{\text{substrat}}=25^{\circ}\text{C}$, $[C]_{\text{ADN}}=10\mu\text{g/ml}$, $[C]_{\text{TritonX-100}}=1\%v/v$). (A) Image en fluorescence et histogramme des longueurs des molécules mesurées sur un même réseau. (B) Image AFM à l'air d'un réseau et image AFM à plus fort grossissement d'une molécule d'ADN unique avec le profil topographique correspondant.

La figure 4 montre les résultats que nous avons obtenus après assemblage capillaire dirigé de molécules d'ADN phage lambda sur un timbre microstructuré puis transfert sur une lamelle de verre fonctionnalisée avec une couche moléculaire d'APTES. Comme nous pouvons le voir sur l'image en fluorescence et les images AFM, nous obtenons des réseaux réguliers de molécules d'ADN peignées perpendiculairement au front d'avancée du ménisque de la solution lors de l'assemblage. Après impression, on conserve la morphologie des molécules

correspondant à celle après assemblage. Les molécules d'ADN ont la même longueur et la même orientation, et sont positionnées de façon précise sur chaque motif. Ces réseaux peuvent être obtenus avec une bonne reproductibilité sur une étendue de plusieurs millimètres et avec un taux d'occupation des sites proche de 100%. Les images AFM de la figure 4 ont été prises à l'air, mais l'imagerie en liquide de ces échantillons est tout à fait réalisable. En effet, les molécules supportent des rinçages ultérieurs et ne sont pas déplacées, elles semblent donc être accrochées de façon robuste à la surface, probablement au travers de points d'accroche multiples le long de chaque molécule avec la surface d'APTES. Dans la figure 4c, la section mesurée montre que la hauteur des molécules est uniforme le long de chaque molécule peignée et sur différentes molécules. Les mesures effectuées sur 30 molécules nous donnent une hauteur moyenne de 1,71 nm ($\pm 0,35$ nm) allant de 1,42 à 2,08 nm. Les images AFM démontrent que la hauteur mesurée est proche de la hauteur théorique d'une molécule d'ADN double-brin unique (2 nm). Nous pouvons donc dire que la technique d'assemblage capillaire nous permet d'avoir un contrôle sur les paramètres expérimentaux et par extension, un contrôle sur le nombre de molécules à assembler par rapport à la technique de Guan et Lee [32]. Cette technique nous permet de générer des réseaux de molécules d'ADN uniques de façon contrôlée et sur une large étendue.

Si nous analysons maintenant plus en détail les images en fluorescence et AFM de la figure 4, et notamment l'histogramme des longueurs des molécules mesurées sur un même réseau, nous pouvons remarquer que les molécules d'ADN sont sur-étirées par rapport à la longueur nominale. Nous mesurons sur une même zone des valeurs situées autour de $22,9 \mu\text{m} \pm 1,9 \mu\text{m}$ mesuré sur 22 molécules différentes, avec des valeurs comprises entre $19,6 \mu\text{m}$ et $26,1 \mu\text{m}$ ce qui est bien plus important que la longueur nominale de l'ADN phage lambda ($16,3 \mu\text{m}$) [33]. L'étirement des molécules constaté au cours de ces expériences semble être assez uniforme.

Dans la suite de ce paragraphe, nous proposons une interprétation qualitative de ces résultats sur la base des mécanismes de l'assemblage capillaire précédemment décrits au chapitre 2.

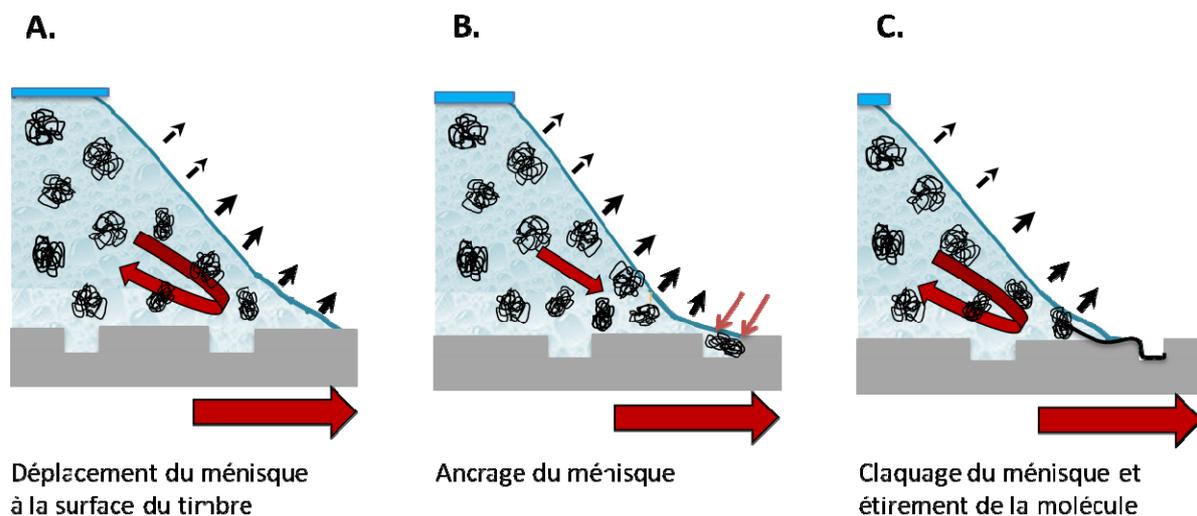


Schéma 3. Schéma du processus hypothétique d'assemblage des molécules d'ADN. La ligne de contact de la solution d'ADN de recul parcourt la surface du timbre. Lorsque la ligne de contact rencontre les cavités topographiques, elle reste ancrée pendant un temps caractéristique durant lequel les pelotes d'ADN sont piégées dans les cavités puis la ligne de contact quitte le piège topographique et étire simultanément les molécules à son passage.

Rappelons que dans notre système nous utilisons une spatule de verre montée sur un bras long flexible de façon à confiner un film mince de liquide sur le substrat. La spatule de verre est fixe et le timbre microstructuré peut être déplacé à vitesse contrôlée en utilisant la platine de translation. La combinaison des forces capillaires et des flux convectifs ayant lieu dans la solution, au voisinage de la ligne triple, sont utilisés pour confiner les molécules d'ADN diluées en solution à la surface du timbre. Les principaux paramètres de notre système qui contrôlent le processus d'assemblage sont la surface du timbre (taille et forme des motifs), la concentration macroscopique nominale des molécules d'ADN dans la solution, la vitesse de déplacement du timbre, l'angle de contact à l'interface liquide/substrat/vapeur, la température. L'assemblage se déroule donc ici directement sur la surface du timbre en PDMS microstructuré qui est hydrophobe. Sur une surface hydrophobe, l'assemblage peut être dirigé si des motifs topographiques sont prédéfinis sur la surface du substrat. La variation abrupte de la topographie au niveau des motifs occasionne un piégeage de la ligne triple. En subissant le déplacement de la platine de translation, et avec un système surfactant modulant correctement la mouillabilité de la surface, l'angle de contact est alors localement réduit pendant toute la durée du piégeage et la ligne triple présente une déformation dont l'allure dépend de la géométrie des motifs et de leur répartition sur la surface. Pendant ce temps d'ancrage caractéristique, un flux convectif de molécules d'ADN nourrit l'interface avec les molécules présentes en solution (le réservoir) et l'assemblage s'opère sélectivement dans les motifs. Ce flux lié à l'évaporation localement accrue par l'abaissement de l'angle de contact peut être modulé par la température. Le nombre de molécules assemblées dans une région spécifique dépend essentiellement du temps d'ancrage, de la concentration des molécules en solution et du taux d'évaporation. Durant le piégeage, les molécules d'ADN sont encore en solution et gardent leur forme en pelote. Pendant que le ménisque s'étire, du au mouvement de la platine, une certaine proportion d'énergie élastique est emmagasinée. Lorsque cette énergie devient supérieure à l'énergie d'ancrage, la ligne triple ou ligne de front claque de manière abrupte et retrouve sa forme initiale. L'étirement des molécules d'ADN a lieu pendant cette phase (schéma 3). Dans notre cas, une vitesse importante et une concentration adaptée ont été nécessaires pour induire le piégeage d'une molécule unique à l'intérieur de chaque cavité topographique suivi de leur étirement quasi-simultané. Nous avons testé plusieurs vitesses et plusieurs concentrations au-dessus et en-dessous des paramètres optimaux (1 mm/sec et 10 µg/ml respectivement). Nous avons observé que réduire la vitesse de la platine ou augmenter la concentration de la solution engendre la formation de cordes d'ADN composées de plusieurs molécules d'ADN peignées. Inversement, augmenter la vitesse de la platine ou réduire la concentration produit des réseaux de molécules d'ADN éparses. En effet, à 1 µg/ml et en dessous de cette concentration, le taux de remplissage du réseau commence à chuter linéairement. Il est à noter également que l'orientation des molécules d'ADN sera toujours perpendiculaire au sens de déplacement donc perpendiculaire à la ligne triple. Par conséquent, en adaptant la concentration des molécules d'ADN, la vitesse de translation de la platine, l'orientation du déplacement et la géométrie des motifs ou cavités topographiques (taille, période et répartition), il nous est possible de créer des réseaux de molécules d'ADN uniques ou des réseaux moléculaires beaucoup plus complexes.

A titre d'exemple, si nous réduisons la périodicité des motifs, nous sommes capables d'obtenir des lignes continues d'ADN sur une large étendue (1cm²) comme nous pouvons le voir sur la figure 5 ci-dessous.

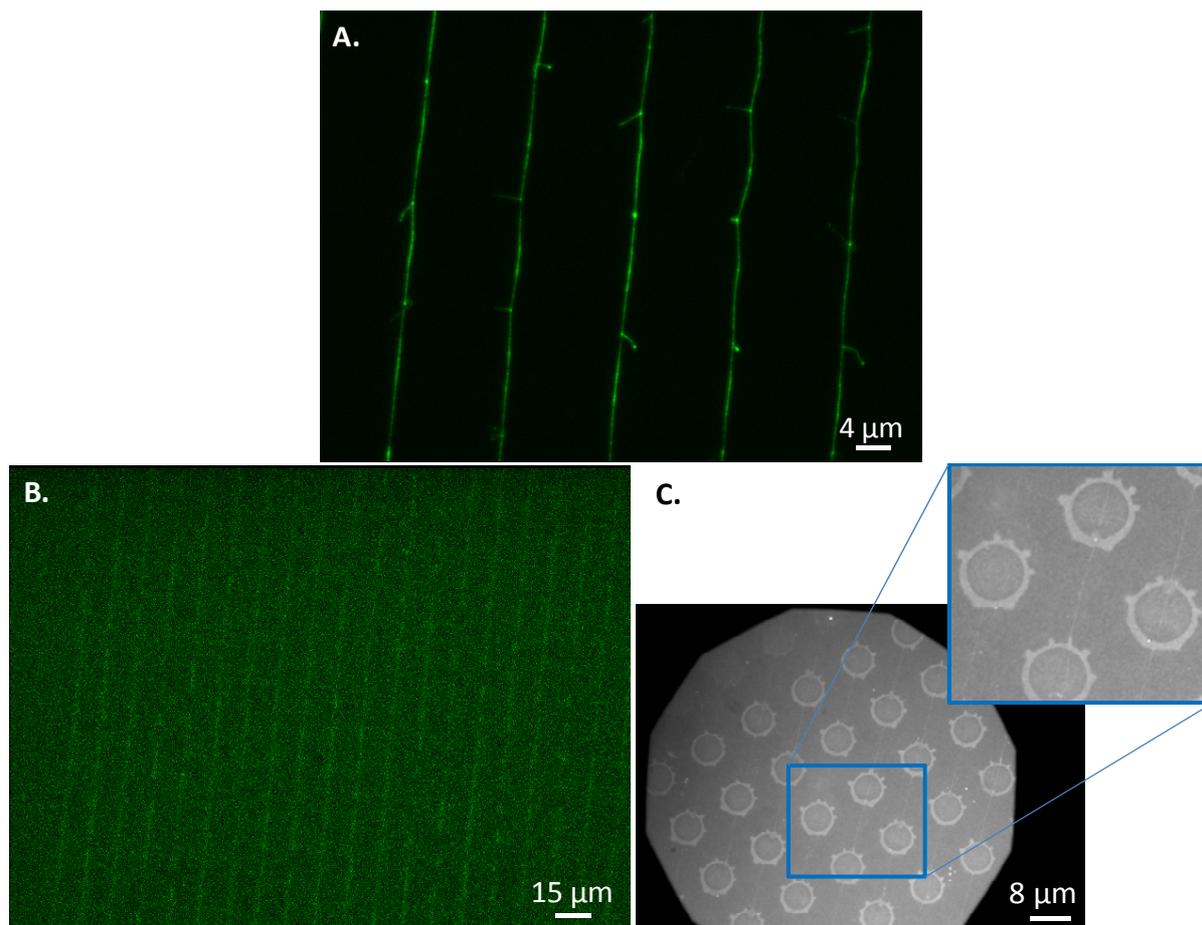


Figure 5. A. et B. images en fluorescence et C. image optique par contraste interférentiel en milieu liquide, de réseaux de lignes continues d'ADN obtenus sous conditions expérimentales optimales ($v=1$ mm/sec, $[C]_{ADN}=10$ $\mu\text{g/ml}$, $T_{\text{substrat}}=25^\circ\text{C}$, $[C]_{\text{TritonX-100}}=1\%$ v/v) en utilisant des timbres ayant des motifs topographiques de courte période (12 μm de période).

Dans la suite nous nous intéresserons au rôle du surfactant puis, de manière plus conséquente, au rôle de la température qui, en plus de contrôler les flux de convection au sein du liquide, peut être manipulée afin de dénaturer intentionnellement les molécules d'ADN.

III. B. 1. Influence du surfactant

Dans le mécanisme d'assemblage, le rôle du surfactant est essentiel pour obtenir l'angle de recul adéquat pour déclencher l'assemblage des molécules d'ADN. Nous avons testé principalement deux types de surfactants : le glycérol et le Triton X-100. Le Triton X-100 est un surfactant non-ionique appartenant à la famille des détergents de synthèse, de formule brute $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{C}_6\text{H}_4(\text{OC}_2\text{H}_4)_{9-10}\text{OH}$. Le Triton X-100 possède un groupe hydrophile (oxyde de polyéthylène) et un groupe hydrocarboné lipophile ou hydrophobe.

Il s'agit de l'un des surfactants les plus utilisés dans la littérature pour abaisser l'angle de contact d'une solution. Pour déterminer la concentration optimale de Triton X-100 à utiliser, nous avons conduit les expériences en faisant varier la concentration de Triton X-100 dans la

solution d'ADN tout en maintenant les autres paramètres expérimentaux constants. Nous avons caractérisé les échantillons après assemblage, pour chaque valeur de concentration de Triton X-100 testée. Après analyse des résultats, nous avons constaté que pour des solutions ne contenant pas de Triton X-100 ainsi que pour des concentrations inférieures à 1%, l'assemblage n'a pas lieu. Aucune molécule ne se dépose dans les cavités du timbre, l'angle de contact n'est pas optimal. Par contre, à partir de 1% en Triton X-100, le mécanisme d'assemblage se déclenche. Pour cette valeur de concentration, l'angle de recul du ménisque est estimé à $23 \pm 3^\circ$ (tableau récapitulatif 1). Nous avons également testé un autre type de surfactant : le glycérol. Dans ce cas, l'angle de contact sur un timbre en PDMS plat est proche de 100° . En utilisant du glycérol à 1%, donc à concentration équivalente par rapport à la concentration optimale dans le cas du Triton X-100, aucun mécanisme d'assemblage n'est observé. Nous avons donc orienté notre choix vers le Triton X-100 à une concentration de travail de 1%. Il est à noter que l'effet macroscopique du Triton X-100 est de régulariser l'allure de la ligne triple et d'homogénéiser son comportement au balayage des motifs. Cependant, l'interaction exacte existant entre la molécule de Triton X-100 et les molécules d'ADN est encore mal connue. Nous avons donc tenu à nous limiter à cette concentration de Triton X-100 minimale.

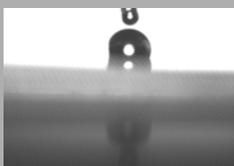
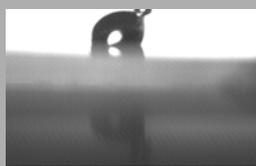
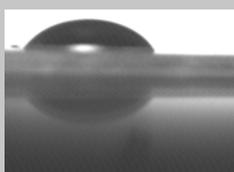
Concentrations dans l'eau DI	Angle de contact sur timbre plat vierge en PDMS	Angle de reculée sur timbre plat vierge en PDMS
Glycérol à 1%	 103°	 74°
Triton X-100 à 1%	 46°	 23°

Tableau 1. Tableau récapitulatif et comparatif des angles de contact et de recul mesurés sur un timbre en PDMS plat pour des solutions d'eau DI contenant du glycérol à 1% et du Triton X-100 à 1%.

III. B. 2. Influence de la température : vers un assemblage de molécules d'ADN simple brin

Pour des applications biologiques, il est important d'apporter des éléments de réponse quant à la fonctionnalité des entités biologiques. Ainsi, il nous a paru important d'approfondir cette partie de l'étude de façon à apporter des données quant à la biophysique des molécules

d'ADN assemblées par assemblage capillaire puis transférées sur des surfaces d'APTES. De plus, le fait de pouvoir entrevoir l'assemblage de molécules d'ADN simple brin à partir d'une solution de molécules double brin est une potentialité non négligeable.

La température de fusion (ou dénaturation) des acides nucléiques comme l'ADN est la température pour laquelle 50 % des molécules d'ADN sont désappariées ou dénaturées (*i.e.* sous forme simple brin). Cette propriété est visible par lecture de l'absorption optique de la solution contenant l'ADN à 260 nm : la densité optique augmente au cours du désappariement. Lors du processus de fusion, l'énergie thermique apportée devient suffisante pour rompre les liaisons H entre les brins. Cette température dépend donc de la quantité de liaisons hydrogènes présentes. Un lien hydrogène est une mise en commun d'un proton entre un accepteur et un donneur. Plus il y a de liaisons hydrogènes dans une molécule d'ADN, plus l'énergie de liaison est élevée et plus sa température de fusion sera grande.

Ainsi, une molécule d'ADN double brin composée uniquement d'appariements de C (de G) avec des G (des C) nécessitera plus d'énergie pour être dénaturée sous la forme de molécules simple-brins, qu'un ADN de même taille composé d'appariements de A (de T) avec des T (des A). En effet, ce sont d'abord les appariements A-T qui se séparent les premiers au fur et à mesure que la température augmente car ils ne possèdent que deux liaisons hydrogènes contrairement aux appariements G-C qui en possèdent trois. Ceci explique pourquoi la température de fusion de l'ADN varie en fonction de deux facteurs principaux :

- sa taille (exprimée en nombre de bases)
- son rapport $(A+T)/(C+G)$, appelé relation de Chargaff, donnant un indice des proportions de paires A-T versus C-G.

Plusieurs formules empiriques permettent de calculer la valeur de la température de fusion. Elles tiennent compte du pourcentage de bases (G+C), de la salinité du milieu ainsi que d'autres facteurs correctifs. La connaissance de la température de fusion est un élément important au laboratoire pour des manipulations de type PCR (Réaction en chaîne par polymérase), par exemple.

Pour étudier l'effet de ce paramètre, nous avons mené plusieurs expériences en faisant varier la température du substrat (ici, la température du timbre en PDMS microstructuré) en gardant constants les autres paramètres expérimentaux (concentration des molécules d'ADN, vitesse de déplacement de la platine en translation).

Dans cette étude, nous n'avons pas observé d'effet majeur sur la plage comprise entre 25°C et 28°C. Dans cette plage, la température joue un rôle mineur par rapport à la concentration ou à la vitesse de déplacement car justement cette dernière est très élevée. Par contre, pour des températures supérieures comprises entre 32°C et 75°C, nous avons obtenu des réseaux réguliers de molécules d'ADN mais présentant des molécules d'ADN constituées de structures en forme « d'épines » avec apparition de « frisures » ou doubles (figure 6A et 6B). Sur la figure 6A, nous pouvons observer que lorsqu'on effectue l'assemblage des molécules à haute température, on obtient, après transfert, des réseaux réguliers de molécules avec le même taux d'occupation des sites mais avec des molécules qui ne présentent pas la même morphologie. A température ambiante, nous avons souligné la conservation de la morphologie des molécules après impression sur la surface. Ici, les molécules sont doubles ou rassemblées en « cordes » comme on peut le voir notamment sur la figure 6A, terminées par des « frisures » ou nœuds. Sur la figure 6B d'ailleurs, on remarque que l'intensité de

fluorescence est plus importante aux extrémités des molécules, suggérant un regroupement ou une plus grande quantité de matière à cet endroit-là. Sur l'image AFM 6C et plus particulièrement sur l'image AFM 6D, on peut observer une succession de segments d'ADN doubles (la section mesure 2 nm) puis simples (la section mesure 1 nm) avec des structures en double hélice plus ou moins relâchées (nombre de tours par unité de longueur différent). Lorsque les molécules d'ADN sont présentes à une concentration plus importante en solution (25 µg/ml), on obtient de longues cordes d'ADN qui, après assemblage à haute température, présentent la formation de « bulles » (figure 7A). Cette dissociation ou séparation des brins de la corde de molécules d'ADN est observée également en imagerie AFM sous cellule fluïdique portée à haute température (figure 7B). Nous avons établi deux hypothèses possibles afin d'expliquer ces observations et concernant l'influence de la température du substrat sur le mécanisme d'assemblage. La première est liée au rôle de la température dans le mécanisme d'assemblage capillaire, la seconde est liée à son influence sur l'initiation du processus de dénaturation des molécules. Il est probable que dans nos expériences ces deux influences se combinent. D'une part, nous pensons qu'augmenter la température du substrat qui gouverne le taux d'évaporation de la solution, créer une augmentation du flux convectif qui ramène les molécules d'ADN du réservoir vers la ligne triple. Ceci conduit à une augmentation de la densité locale de molécules au niveau de la ligne triple pendant un temps d'ancrage du ménisque identique, vu que la vitesse de déplacement reste inchangée. En conséquence, au lieu d'avoir une molécule unique piégée à l'intérieur de chaque cavité, nous avons un certain nombre de molécules qui vont se trouver au voisinage du point d'ancrage subissant les forces capillaires et le claquage du ménisque toutes simultanément. D'un autre côté, la comparaison directe entre les images AFM et de fluorescence de la figure 6, montre que les extrémités qui en fluorescence prennent l'aspect de frisures, correspondent en réalité à des « pincements » ou cassures. Les molécules d'ADN semblent donc être dénaturées lorsque l'assemblage est effectué à une température T_{substrat} supérieure à 32°C et ce phénomène semble prendre origine principalement aux extrémités des molécules. En ce qui concerne le cas où la concentration de molécules est plus élevée, on observe la formation de bulles de dénaturation tout le long de la molécule. Des groupes de recherche ont déjà mis en évidence ce phénomène [34]. Cette structure de dénaturation, ou conformation de type Poland-Scheraga adoptée par la molécule (voir schéma 4), est obtenue lorsque l'ADN est attaché à la surface au travers de deux points d'accroche. Nous pouvons donc considérer, que le fait d'augmenter la température du substrat revient à établir des conditions dénaturantes. En effet, si nous prenons en considération le faible volume qui est coincé entre la spatule de verre fixe et le timbre chauffé, il est fort probable que les molécules d'ADN subissent les prémisses d'un phénomène de dénaturation en solution. Ainsi, les molécules d'ADN, à différents stades de dissociation, vont être soumises aux forces capillaires présentes et vont être étirées également lors du claquage du ménisque. Ceci pourrait expliquer les résultats observés. Il est impossible pour nous d'établir à quelle étape du procédé d'assemblage ces événements dénaturants prennent place (dans la solution, dans la cavité, au retrait du ménisque ?...). Cependant, il est clair qu'à hautes températures, le mécanisme d'assemblage devient plus complexe, mais reste tout de même bien contrôlé au sens où tous les sites de surface sont équipés par des molécules d'ADN.

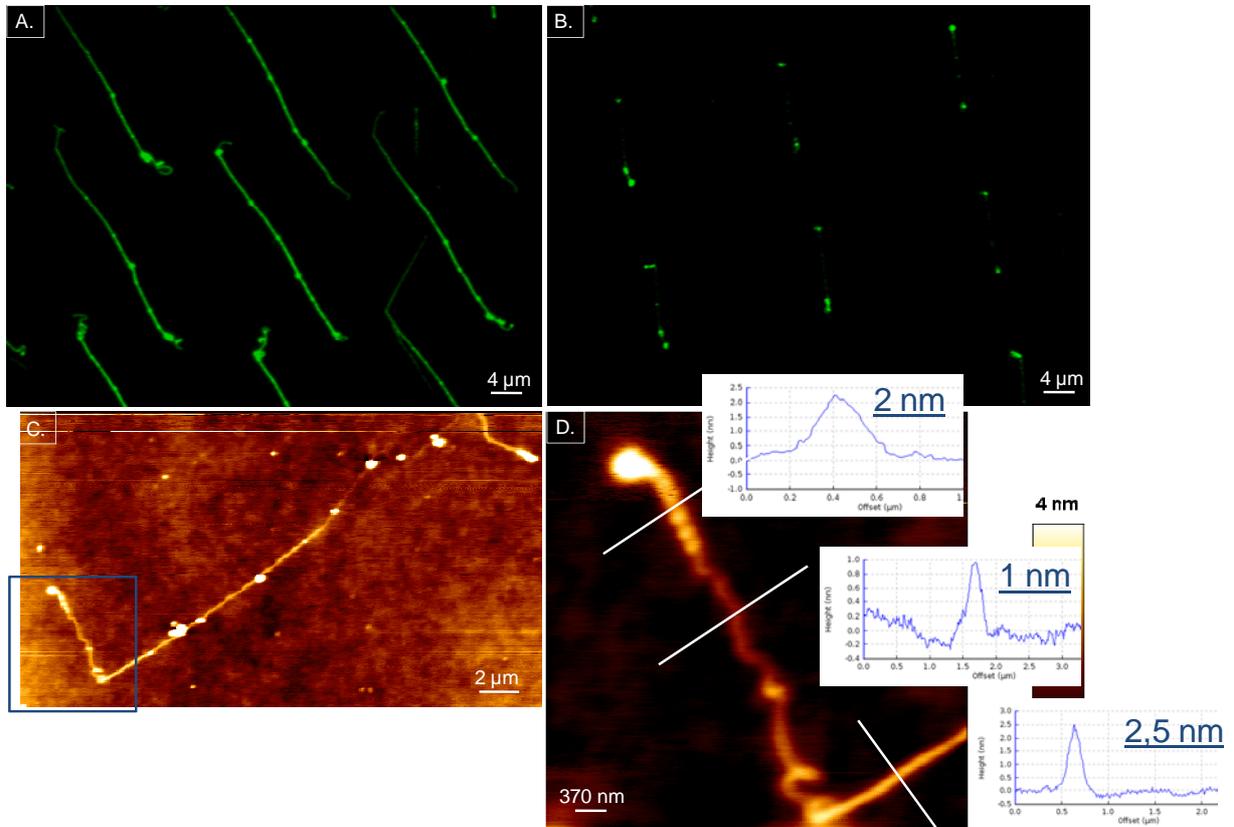


Figure 6. A et B. Images en fluorescence de réseaux d'ADN dénaturés après assemblage capillaire sur timbre chauffé ($T_{\text{substrat}} > 32^{\circ}\text{C}$, $v = 1 \text{ mm/sec}$, $[C]_{\text{ADN}} = 10 \mu\text{g/ml}$, $[C]_{\text{TritonX-100}} = 1\% \text{ v/v}$) puis transfert. C et D. Images AFM de hauteur d'une molécule d'ADN dénaturée après assemblage capillaire sur timbre chauffé ($T_{\text{substrat}} > 32^{\circ}\text{C}$) puis transfert sur lamelle de verre APTES.

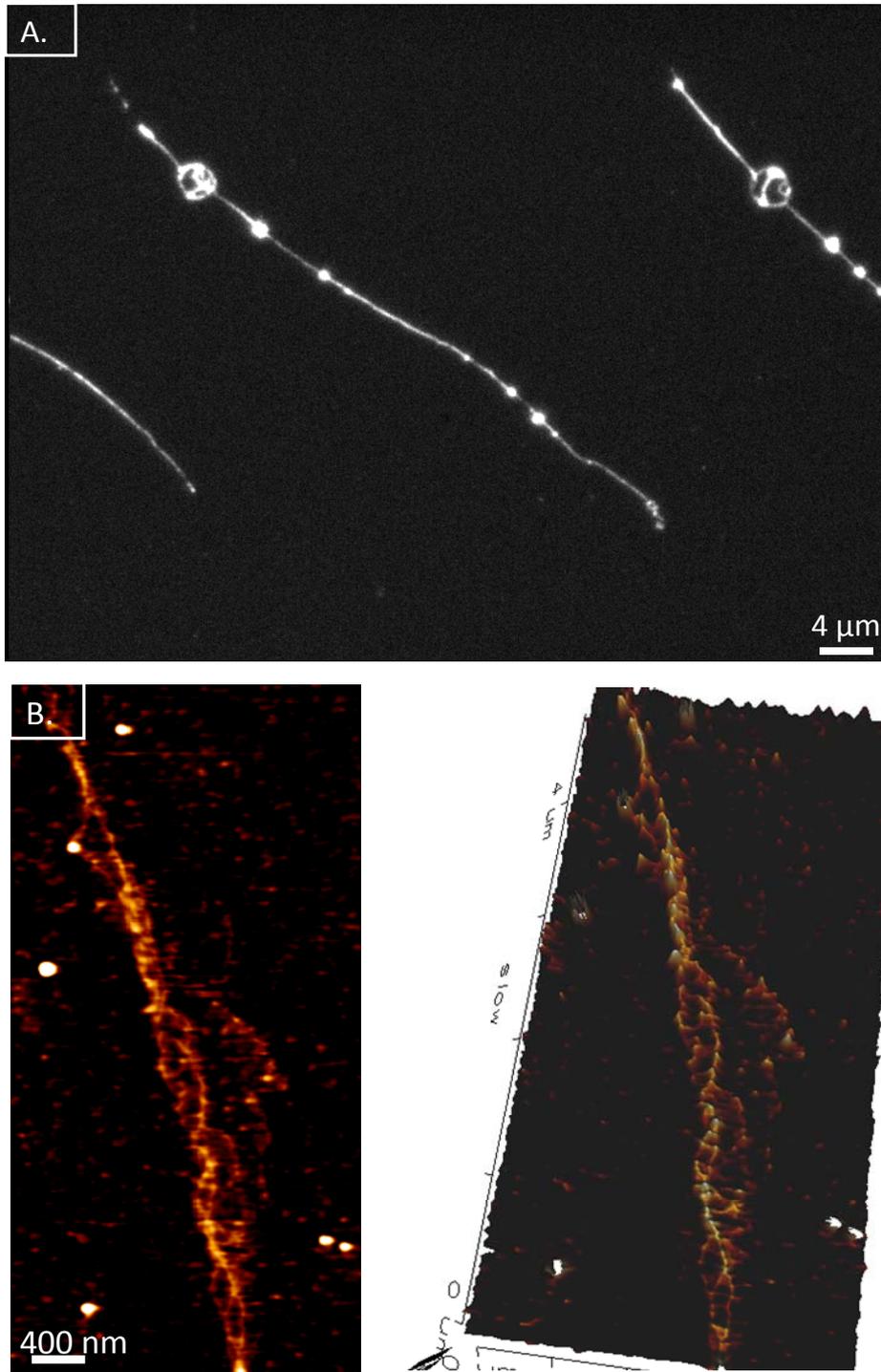


Figure 7. A. Image en fluorescence de cordes d'ADN avec bulles de dénaturation après assemblage à haute température puis transfert sur une lamelle de verre APTES. B. Images AFM de hauteur et aperçu tridimensionnel en liquide sous cellule fluidique à 70°C d'une corde d'ADN en cours de dénaturation sur une lamelle de verre APTES.

Le haut facteur d'étirement (50%) induit par notre technique mérite d'être étudié également plus en détail.

Les propriétés mécaniques de l'ADN peuvent être étudiées par des simulations numériques de dynamique moléculaire ainsi que par des expériences de manipulation de molécules uniques (par exemple, à l'aide de pinces optiques ou magnétiques). Comme tous les polymères, l'ADN est une molécule élastique. Sous des contraintes faibles, un double brin peut être décrit par des modèles standards de la physique des polymères (modèle du ver, etc). Par contre, en appliquant une force autour de 65 pN aux extrémités d'un double brin, on fait transiter celui-ci vers une nouvelle forme, environ 1,7 fois plus longue, dite ADN-S (*stretched*). Il semblerait que cette transition joue un rôle dans certains processus biologiques, tels que la réparation de l'ADN par certaines protéines.

A l'heure actuelle, deux modèles qualitativement différents ont été mis en avant par la communauté scientifique pour expliquer cette transition

structurale moléculaire. Le premier modèle explique cette transition par une rotation coopérative des paires de base : la double hélice se transforme graduellement en "échelle" ou en "fibre", et par un appariement des bases qui reste intact (figure 8, double-stranded S-DNA). Le deuxième modèle suggère une dénaturation induite par l'application d'une force provoquant la cassure progressive des liaisons hydrogènes reliant les deux brins, et l'obtention de deux simple-brins, de façon comparable à ce que l'on observe dans le cas d'une dénaturation thermique (figure 8, force-induced melting).

Dans une étude récente, van Mameren et al. [35], ont démontré grâce à un dispositif de pinces optiques couplé à une microscopie par fluorescence, que la transition comprend une conversion progressive du double brin en un simple brin, indépendamment de la géométrie de l'accroche. Ils montrent que ces conversions se déclenchent préférentiellement à partir de pincements ou extrémités libres de l'ADN. Ces discontinuités dans le squelette phosphodiester servent de points de nucléation énergétiquement favorables à la dénaturation. Lorsque les deux brins sont intacts, et il n'y a pas la présence de pincements ou d'extrémités libres, la force de sur-étirement passe de 65 à 110 pN et la dénaturation démarre tout le long de la molécule, de façon comparable à celle observée dans le cas d'une dénaturation thermique [35].

Dans notre cas, il faut considérer dans un premier temps que l'effet des intercalants utilisés pour les marquages en fluorescence est encore mal connue, mais a une influence certaine sur la biophysique des molécules. Dans la littérature, la voie étudiant l'influence des intercalants tels que le YOYO-1 sur les caractéristiques physiques des molécules d'ADN que les expérimentateurs cherchent souvent à mesurer est quelque peu tortueuse. Cependant, il est généralement admis que les intercalants TOTO et YOYO augmentent la longueur nominale de 30-35% pour un marquage selon un rapport maximal de 4 : 1 paires de bases par intercalant [4]. Dans tous les cas, nous observons ici un étirement des molécules d'environ

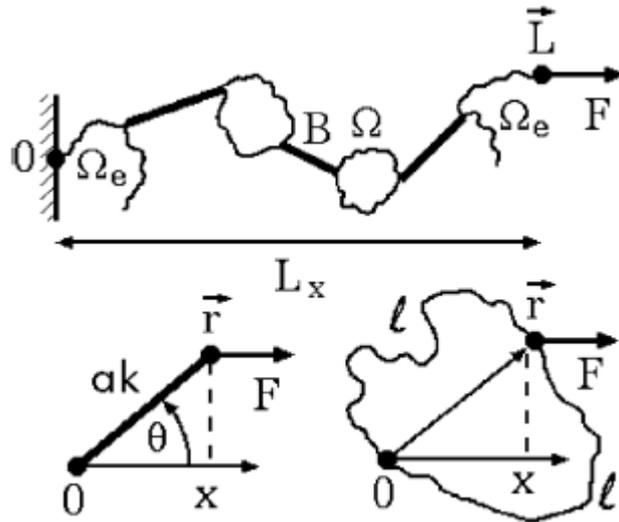


Schéma 4. ADN étiré selon le modèle Poland Scheraga avec des segments d'accroche B et des bulles de dénaturation. L'ADN est attaché entre O et L, et sujet à une force d'étirement F selon la direction x [34].

50% ce qui est plus important que l'effet que pourraient avoir les molécules intercalantes de l'ADN sur cette dimension.

Dans un second temps, un autre point à considérer est que nous sommes ici dans un cas de peignage par flux (« flow stretching »). Dans le cas d'un peignage par flux conventionnel, des forces considérables, de l'ordre de 100 pN [3], s'appliquent sur les molécules d'ADN, initialement en pelote et dans leur forme canonique, dans laquelle la double hélice d'ADN est caractérisée par une hélicité de 1 tour/10.5 pb. Sous l'effet de ces forces, les molécules d'ADN subissent un changement structural vers l'état S, dans lequel l'ADN double-brin forme encore une double-hélice, mais dont l'hélicité (1 tour/38 pb) diffère de celle de l'état canonique. A la fin du processus, les molécules sont dans une configuration linéaire et surétirée (150 % de leur longueur nominale) [36]. Ici, les molécules sont piégées à l'intérieur de la cavité du timbre par les forces capillaires exercées, mais sans qu'elles aient un point d'accroche véritablement. Une grande partie de la molécule est donc libre pendant le passage du ménisque par rapport au peignage moléculaire par exemple. La force exercée par le flux est donc maximale au point d'ancrage du ménisque, à hauteur de la cavité, mais minimale à la fin du passage du flux. La force appliquée est donc ici plutôt à caractère dégressif. Aux forces hydrodynamiques viennent s'ajouter les forces capillaires et la vitesse de déplacement élevée de notre platine de translation.

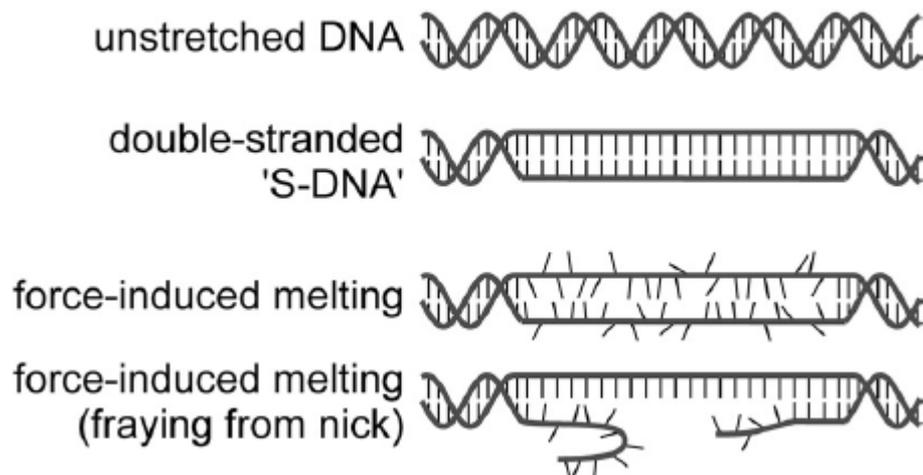


Figure 8. Représentation schématique de deux modèles expliquant la nature des transitions de sur-étirement. Dans le premier modèle, la transition est le résultat d'un déroulement coopératif progressif de la double hélice qui résulte en une structure « S-DNA » proche d'une échelle parallèle où les bases sont appariées. Dans le deuxième modèle, la dénaturation des deux brins induite par l'exercice d'une force provoque la transition [35].

De plus, Malaquin et al. ont démontré [37] que l'ampleur et la direction des forces capillaires induites par l'ancrage de la ligne triple dépendent fortement de la géométrie des motifs. En effet, la combinaison du piégeage géométrique du ménisque au niveau des structures topographiques et des forces capillaires exercées lors du claquage du ménisque joue un rôle important dans le piégeage sélectif des molécules d'ADN à l'intérieur des motifs, mais joue certainement un rôle majeur dans l'étirement final des molécules également. Mais comment mesurer quantitativement les forces réellement appliquées ?

Dans notre cas, il est difficile de savoir avec exactitude quelle est l'origine ou le facteur prédominant provoquant le sur-étirement observé. Notre étirement de 40-50% pourrait laisser penser que nous soyons en deçà des conditions conduisant à une transition de type « S-DNA » ou de type dénaturante avec rupture des liaisons hydrogène. D'autres expériences devront être toutefois menées afin de clarifier cette hypothèse. En effet, cette question reste une question essentielle à laquelle nous devons répondre afin de savoir de façon sûre si les propriétés intrinsèques des molécules d'ADN sont préservées pendant et après le processus d'assemblage capillaire. En effet, cette technique pourrait constituer un grand pas en avant dans le domaine des puces à ADN et dans le domaine médical et diagnostique mais seulement si l'on démontre que cet étirement peut être maîtrisé et que les molécules préservent leur structure intrinsèque de façon à avoir la possibilité d'hybrider des marqueurs ou séquences complémentaires non étirées ultérieurement. Il est clair que des expériences réalisées avec des brins d'ADN non marqués par des intercalants nous permettraient dans un avenir proche de mieux appréhender le rôle spécifique de l'intercalant dans le sur-étirement observé.

IV. Extensions et Applications

Dans cette section, nous avons souhaité étendre le champ applicatif de cette technique de peignage. Un point qui nous a paru essentiel est de savoir si cette technique induit une sélection en taille des objets dans le cas de solutions plus complexes ou hétérogènes, ou au contraire, si elle permet, après assemblage, de rendre compte, de façon fidèle, de l'état de la solution initiale. Un autre point important auquel nous avons souhaité répondre est de savoir si cette technique est utilisable pour des molécules d'ADN, autres que les molécules d'ADN phage lambda, et notamment plus courtes, et si les observations réalisées précédemment s'appliquent encore dans ce cas-là. Enfin, nous avons souhaité vérifier que notre technique d'assemblage est transposable à d'autres systèmes plus complexes toujours basés sur l'ADN.

IV. A. Y-a-t-il une sélection par la taille des molécules ? Cas d'un mélange complexe

Jusqu'à présent, les différentes expériences ont été réalisées systématiquement avec des molécules d'ADN très homogènes en taille. Nous souhaitons déterminer désormais quelle est l'influence de la taille des molécules sur le processus d'assemblage et par exemple savoir si la technique d'assemblage capillaire utilisée pourrait induire une sélection en taille des objets. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé exactement le même protocole expérimental (vitesse substrat de 1mm/sec), mais cette fois-ci en assemblant une goutte de molécules d'ADN en suspension ayant subi des ultrasons pendant 10 secondes. De cette façon on espère obtenir une solution de molécules d'ADN phage lambda avec des longueurs hétérogènes, composée de molécules cassées mécaniquement à des endroits aléatoires.

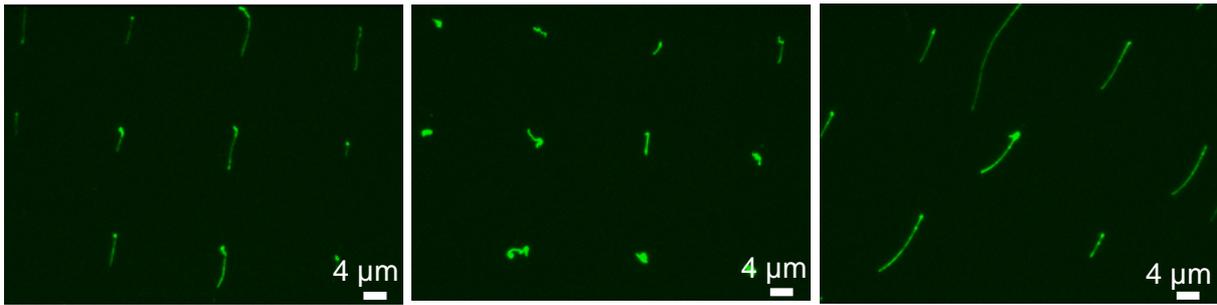


Figure 9. Images en fluorescence des résultats obtenus après assemblage d'une solution d'ADN hétérogène (solution d'ADN agitée aux ultra-sons pendant 10s) sur un timbre en PDMS et transfert de l'assemblage sur une lamelle de verre APTES ($v=1\text{mm/sec}$, $T_{\text{substrat}}^{\circ}=25^{\circ}\text{C}$, $[C]_{\text{TritonX-100}}=1\%v/v$).

Après assemblage de cette solution d'ADN hétérogène et transfert de l'assemblage sur une surface recouverte d'une couche moléculaire d'APTES, la figure 9 montre que nous obtenons un réseau avec un taux de remplissage moindre (85 sites occupés sur 100), et sur un même champ, l'assemblage de molécules d'ADN de tailles différentes. A l'échelle micrométrique, il ne semble donc pas qu'il y ait une sélection par la taille des pelotes d'ADN par assemblage capillaire. Le résultat visible à l'image rend compte de la composition de la solution initiale composée d'une multitude de tailles variables. Il est à noter qu'à partir d'une minute d'ultrasons, on n'assemble plus aucune molécule. Ces observations s'appliquent donc ici dans la limite de fragments d'ADN micrométriques assemblés sur des motifs micrométriques.

Schwartz et al. ont réalisé une puissante étude en imageant de longues (plus de 100 kbp) molécules d'ADN uniques peignées sur une surface de verre et digérées par des enzymes de restriction [38-39]. Le fait d'étirer et d'accrocher les molécules d'ADN sur une surface en verre permet une cartographie linéaire de la position spatiale vs la position génomique, et conserve l'information haplotypique. Néanmoins, la technique de Schwartz souffre d'un étirement inhomogène dû aux interactions de surface. De plus, les molécules d'ADN peignées conservent un grand nombre de points d'ancrage à la surface après leur réhydratation, et l'activité enzymatique est très perturbée au voisinage de ces points [40]. Il est clair qu'une solution pour palier à ce problème serait de réaliser ces études en solution plutôt qu'en surface. Une alternative intéressante pour la réalisation d'une cartographie génique, serait de faire circuler des molécules d'ADN fluorescentes linéaires et uniformément étirées au travers de nanocanaux. Une autre alternative serait de réaliser la réaction en solution puis d'assembler la solution résultante par assemblage capillaire. Ainsi, dans cette perspective, nous avons, pour l'heure, souhaité démontrer que la technique d'assemblage capillaire permet de rendre compte de l'état d'une solution après assemblage. En d'autres termes, prouver que si l'on part d'une solution complexe, on peut retrouver après assemblage et après transfert,

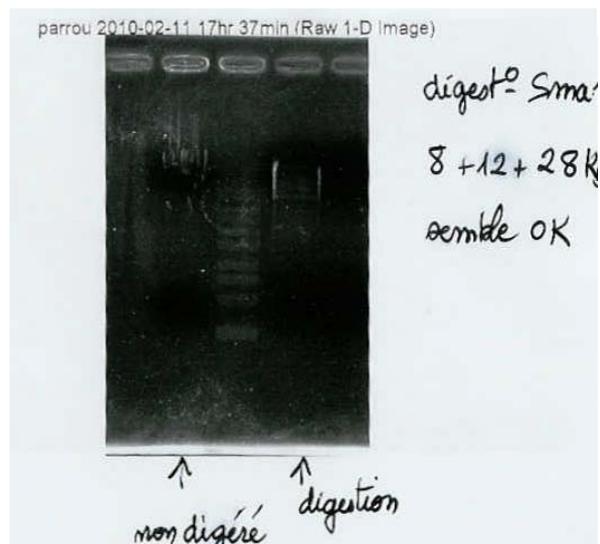


Figure 10. Gel d'électrophorèse d'ADN phage lambda après digestion par l'enzyme SmaI (à droite) et non digéré (à gauche) donné en référence.

un résultat qui rende compte de l'état de la solution initiale.

Ainsi, nous avons assemblé une solution d'ADN phage lambda digéré par action enzymatique. Nous avons choisi une enzyme (SmaI) qui clive spécifiquement l'ADN phage en deux sites bien connus et identifiés au préalable.

Le gel d'électrophorèse (figure 10) de l'ADN phage lambda digéré pendant 3 heures par l'enzyme SmaI par rapport à la migration de l'ADN non digéré de référence, témoigne d'une part de la bonne activité de l'enzyme et montre d'autre part les trois tailles que l'on s'attend à obtenir après digestion : une population de molécules de 8 kbp soit 2,4 μm , une population de molécules de 12 kbp soit 3,7 μm et une population de molécules de 28 kbp soit 8,6 μm .

La solution d'ADN se retrouve donc trois fois plus concentrée après digestion. Nous avons donc dilué cette solution de façon à respecter les conditions expérimentales d'assemblage de molécules uniques décrites dans le chapitre II (concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$) puis avons ensuite marqué l'ADN en fluorescence avec un intercalant (YOYO-1).

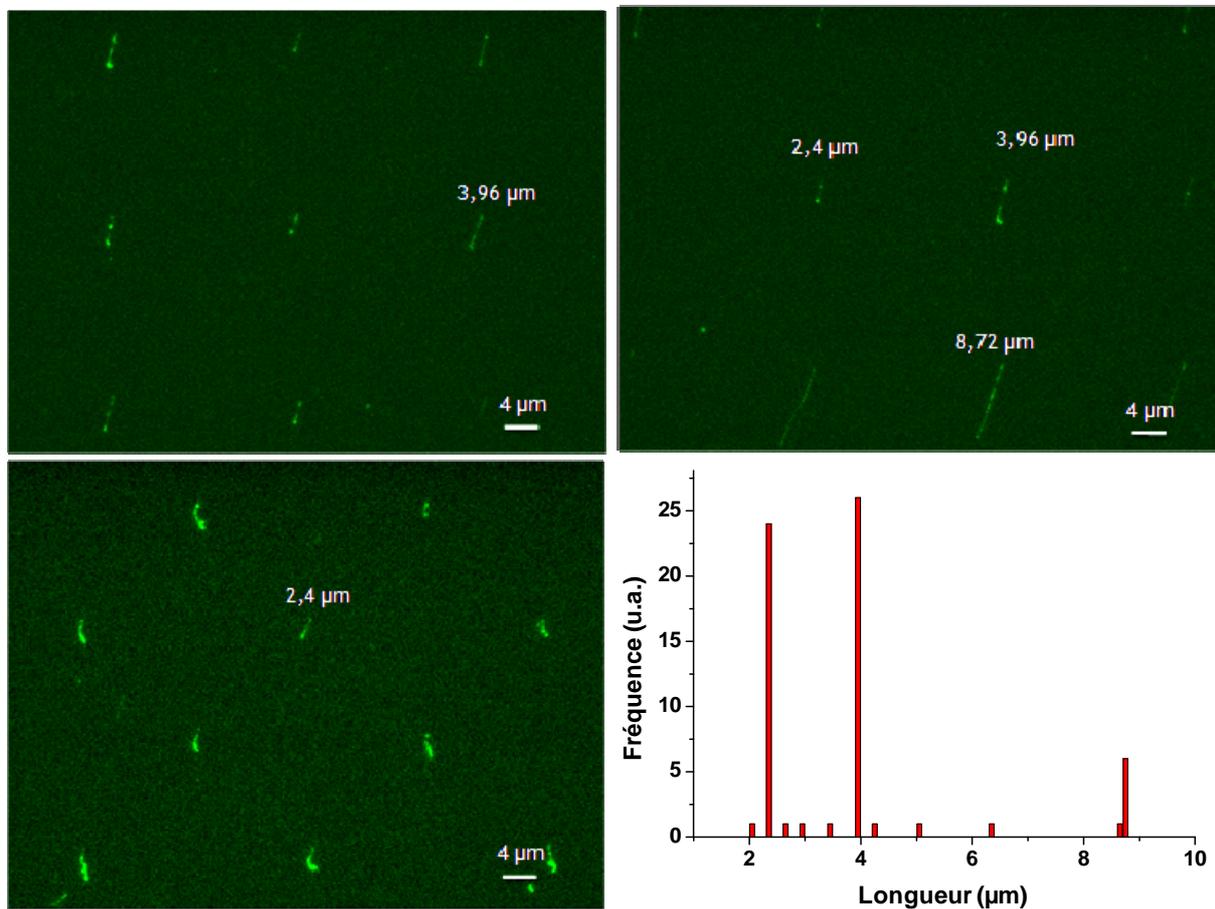


Figure 11. Images en fluorescence des résultats obtenus après assemblage d'une solution d'ADN phage lambda digérée par une enzyme de restriction (SmaI) sur un timbre microstructuré et transfert ($v=1\text{mm/sec}$, $T^{\circ}\text{substrat}=25^{\circ}\text{C}$, $[C]_{\text{ADN}}=10\mu\text{g/ml}$, $[C]_{\text{TritonX-100}}=1\%v/v$).

Les images en fluorescence de la figure 11, montrent que l'on obtient après assemblage un réseau de molécules de tailles variables. L'histogramme en bas à gauche de la figure nous apprend que ces tailles correspondent aux tailles attendues ($2,40 \mu\text{m} \pm 0,24 \mu\text{m}$, $3,96 \mu\text{m} \pm$

0,24 μm et 8,68 $\mu\text{m} \pm 0.24 \mu\text{m}$ en moyenne). Une autre question à laquelle nous avons voulu répondre par le biais de cette expérience est savoir si lorsque les molécules sont plus petites, elles subissent également le surétirement observé dans le cas de l'ADN de phage lambda. Or, ces résultats ne sont pas suffisants pour apporter des éléments de réponse concluants à cette question. En effet, les populations de 2,4 μm de long théoriques mesurent autour de 2,4 μm de long également après assemblage et les populations de 3,7 μm ou de 8,6 μm de long théoriques mesurent autour de 4,0 μm et 8,8 μm en longueur après assemblage, ce qui correspond à un surétirement de 8% et de 2,3 % respectivement. On peut peut-être se demander si l'action enzymatique a un effet sur l'étirement final des molécules dans ce cas en particulier. Cependant, il faudra réaliser un plus grand nombre d'expériences avant de pouvoir se prononcer sur ce point. Il sera notamment intéressant de vérifier si les proportions des populations sont conservées après assemblage, sur la base d'une étude plus statistique. Finalement, on peut dire que le résultat obtenu après assemblage puis transfert est représentatif de la solution initiale. Là encore, on observe que la technique d'assemblage capillaire n'induit pas de sélection par la taille et permet donc un assemblage fidèle des objets en solution. Cette donnée est importante car suivant les applications, on peut être amené à manipuler des solutions complexes et hétérogènes, avec des objets de plusieurs tailles en solution et il ne faut pas que la présence des autres objets empêche l'assemblage des objets d'intérêt. Cependant, pour cette expérience, on ne retrouve pas le surétirement notable observé dans le cas de l'ADN de phage lambda.

IV. B. Assemblage de molécules d'ADN plus courtes : les plasmides.

Pour aller plus loin, nous avons souhaité prouver dans cette partie que le protocole expérimental développé pour l'assemblage de longues molécules d'ADN (cas du phage lambda) est transposable et peut être utilisé également dans le cas de molécules plus courtes telles que les plasmides.

Nous avons utilisé une solution de plasmides linéaires à une concentration de 18 nM (buffer kit de purification, 1% de Triton X-100). Les plasmides utilisés sont constitués de 5100 bp donc mesurent 1,7 μm de long en théorie, en valeur nominale. Nous avons choisi d'utiliser le même moule micrométrique (décrit au chapitre II) de façon à pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus dans le cas de l'ADN phage lambda. Bien évidemment, en toute rigueur, la taille des motifs pourrait être ajustée plus finement *in fine*, en fonction de la taille des plasmides.

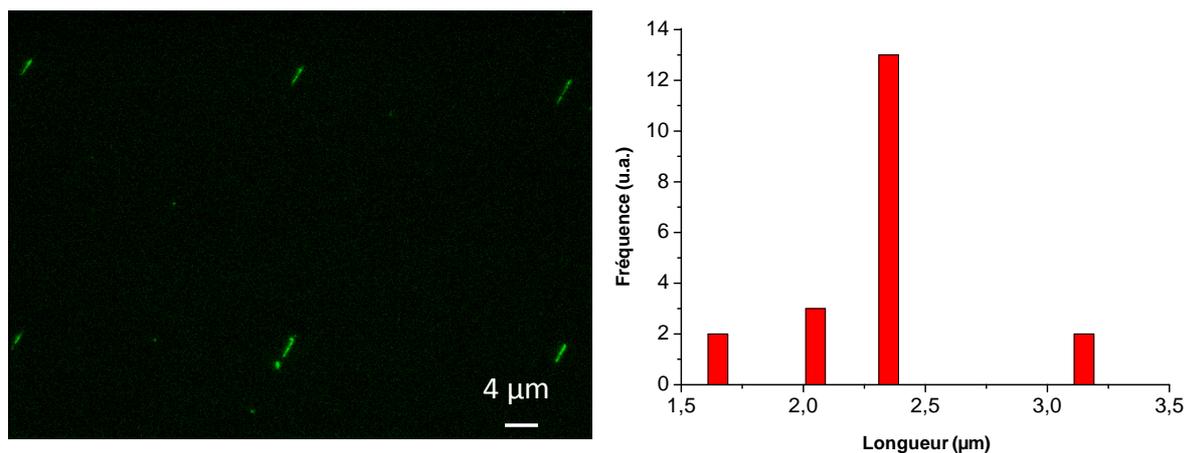


Figure 12. Image en fluorescence de plasmides linéaires 5100 bp assemblés après assemblage capillaire sur timbre en PDMS puis transfert sur une lamelle de verre fonctionnalisée APTES ($v=1\text{mm/sec}$, $T^{\circ}_{\text{substrat}}=25^{\circ}\text{C}$, $[C]_{\text{ADN}}=18\text{nM}$, $[C]_{\text{TritonX-100}}=1\%v/v$).

La figure 12 montre les résultats obtenus après assemblage capillaire sur timbre en PDMS et transfert sur une lamelle de verre fonctionnalisée APTES. Nous pouvons observer que le résultat en termes de taux de remplissage et de qualité d'organisation est le même que dans le cas de l'ADN de phage. La seule différence réside ici en la longueur des molécules qui cette fois-ci mesure 2,3 μm en moyenne, comme le montre l'histogramme de la figure 12, et qui correspond à la longueur nominale des plasmides linéaires escomptée. Ici, les molécules mesurent donc 2,3 μm par rapport à une longueur nominale de 1,7 μm, ce qui correspond à un surétirement de 35-40% et qui se rapproche du haut facteur d'étirement observé dans le cas des molécules d'ADN de phage lambda.

Il est donc possible par cette méthode d'assembler des plasmides linéaires uniques et par extension il est possible d'assembler des molécules d'ADN dix fois plus petites en taille. Le peignage est donc un processus utilisable pour une très grande gamme de tailles de molécules d'ADN. Nous pourrions imaginer passer à une échelle inférieure et assembler des oligonucléotides de quelques centaines de paires de bases en utilisant un moule comportant des motifs nanométriques. Nous avons d'ailleurs entamé une collaboration en ce sens afin d'assembler non pas des oligonucléotides mais des origamis ou ADN de synthèse de quelques $80 \times 60 \times 2 \text{ nm}^3$.

IV. C. Assemblage d'un système plus complexe basé sur l'ADN : le système ADN-bille

En suivant cette même ligne directrice, nous avons également voulu démontrer que la technique d'assemblage capillaire et le système expérimental tel qu'il a été conçu, permettent d'assembler des objets plus complexes. De nos jours, il existe différentes techniques pour la manipulation des brins d'ADN. Les premières études sur ce sujet portent sur l'utilisation de techniques de micro/nano-manipulation de molécule unique grâce aux champs de forces

électriques, magnétiques [41] ou optiques [42]. Les avancées dans l'instrumentation ont rendu possible ces manipulations ainsi que la mesure de très petites forces [43-46]. Ces outils puissants ont été rapidement appliqués en biophysique pour étudier l'action des moteurs moléculaires, tels que l'actine ou la kinesine par exemple [47, 48], mais aussi pour étudier les forces et les mouvements associés aux molécules biologiques et à une activité enzymatique donnée [49]. En effet, l'étude des réactions chimiques à l'échelle de la molécule unique permet de faire des mesures directes des propriétés en supprimant totalement les effets de moyenne observés lorsqu'un très grand nombre de molécules sont sondées en même temps. Les techniques de micromanipulation de molécules uniques, utilisent usuellement des molécules d'ADN accrochées à une bille (superparamagnétique, diélectrique suivant les cas). L'inconvénient majeur est que les systèmes ADN-bille sont généralement construits par incubations successives des solutions. Les sites d'intérêt où l'on obtient une molécule fonctionnelle correctement accrochée à la surface avec une bille à son extrémité sont donc des événements aléatoires et rares. Idéalement, les mesures doivent être faites de façon multiplexée, et de façon statistique, c'est-à-dire à partir de systèmes ADN-bille disposés de façon contrôlée et localisée sur la surface.

La technique d'assemblage capillaire peut répondre à ce besoin. La figure 13 montre les résultats qui ont été obtenus avec des systèmes ADN phage lambda avec une extrémité digoxigénine accrochée à une bille fonctionnalisée par un anticorps antidigoxigénine de 300 nm de diamètre. Ces échafaudages ADN/bille nous ont été fournis grâce à une collaboration avec L. Salomé et C. Tardin de l'IPBS à Toulouse. Le protocole expérimental est le même, la seule variante est que cette fois-ci on privilégie la cinétique des billes de 300 nm plutôt que la cinétique de l'ADN. En d'autres termes, l'assemblage s'effectue à une vitesse de 15 $\mu\text{m}/\text{sec}$ plutôt qu'à une vitesse de 1 mm/sec.

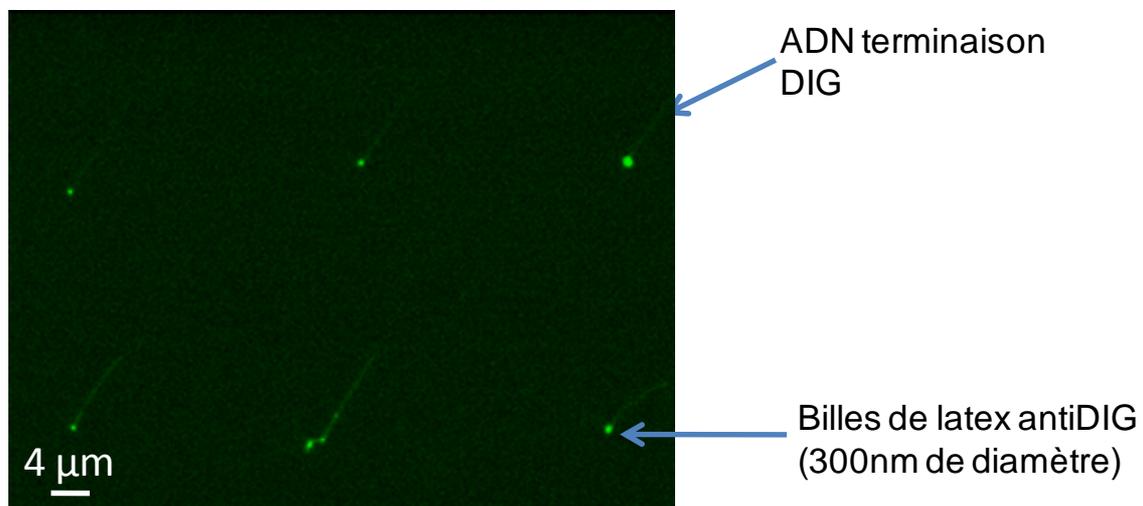


Figure 13. Image en fluorescence d'un réseau de systèmes ADN-bille assemblés par assemblage capillaire puis transférés sur une lamelle de verre fonctionnalisée APTES.

La figure 13 montre que l'on obtient des réseaux ADN-bille avec les mêmes caractéristiques que dans le cas de molécules d'ADN simples en termes de répartition, taux d'occupation et orientation. La technique d'assemblage permet ainsi de générer des réseaux réguliers de systèmes ADN-billes qui peuvent ensuite être relevés par un dispositif de type pinces magnétiques. Il est à noter que la longueur finale des molécules semble être plus proche de la longueur nominale de l'ADN de phage lambda théorique. L'accroche d'une bille à l'extrémité

de la molécule modifie donc le mécanisme de peignage de la molécule notamment en termes de forces hydrodynamiques et capillaires exercées, ce qui, par extension, agit sur le facteur d'étirement.

IV. D. Lignes d'ADN comme réseau de diffraction.

La biologie et la médecine sont en permanence à la recherche de techniques simples, à faible coût, fiables, sensibles, utilisant le minimum de matière et permettant d'identifier dans une solution au minimum une cible présente (protéines, ADN, virus, bactéries,...). Ces disciplines exploitent pour cela l'interaction entre une biomolécule sonde connue fixée sur un support (de type ADN, anticorps, protéine, antigène...) et cette (ou ces) cible(s). Il existe un grand nombre de techniques de biodétection. L'une d'entre elles est basée sur la détection des modifications du spectre de diffraction d'un réseau de biomolécules sondes lors de l'accroche de biomolécules cibles [50-52].

Le principe de la diffraction de la lumière par une structure périodique est bien connu. En effet, un réseau à une dimension transforme une onde plane monochromatique incidente en un faisceau réfléchi et en des faisceaux diffractés suivant des ordres caractérisés par des angles d'émergence différents. Comme l'amplitude de ces ordres dépend des dimensions du réseau (période p , largeur l et hauteur h des lignes), toute modification de ces paramètres par piégeage de cibles à sa surface, modifiera sa réponse lumineuse. Les réseaux de diffraction sont donc des outils adaptés à la biodétection sans marquage.

Dans le groupe NanoBioSystèmes, Jean-Christophe Cau a consacré sa thèse au développement de cette technique au format biopuce. Pour cela, il a réalisé un ensemble de micro réseaux de diffraction de périodicité submicronique disposés sur un substrat par lithographie douce. Chacun de ces micro réseaux est composé de biomolécules sondes différentes (schéma 5) destinées à la détection d'une interaction spécifique A, B, C,... La détection du type d'interaction s'effectue par la mesure des modifications du spectre de diffraction en réflexion d'un faisceau laser incident sur chaque réseau [53].

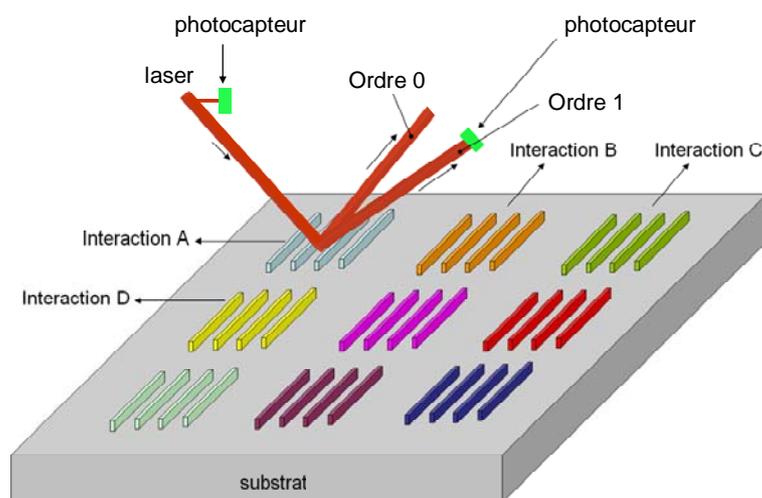


Schéma 5. Schéma de principe d'une biopuce diffractante selon [53].

L'idée que l'on a décidé d'exploiter réside ici sur le fait d'utiliser les lignes continues d'ADN décrites dans le sous-chapitre précédent (III. B.) de façon à s'en servir comme réseau de diffraction. En effet, ces lignes d'ADN sont obtenues de façon régulière, périodique et constituent des supports biologiques à 1D avec de grandes potentialités. Les lignes d'ADN mesurent quelques nanomètres de haut (2 nm de haut dans le cas de molécules uniques) et plusieurs millimètres de long. On peut dès lors imaginer utiliser ce support, hautement sensible d'un point de vue diffractif de part ses dimensions, comme intermédiaire réactionnel ou comme objet d'étude. En effet, ces lignes d'ADN peuvent être fonctionnalisées pour permettre l'accroche d'une certaine sonde, afin de permettre la reconnaissance d'une cible en solution (interaction ADN/protéine) mais peuvent également permettre de détecter une reconnaissance spécifique d'une séquence (hybridation). Les résultats préliminaires sont présentés ici comme preuve de concept (figure 14). Ils ont été réalisés en collaboration avec Amandine Egéa dans le cadre de sa thèse portant sur les biocapteurs diffractifs au sein du groupe. Ils seront approfondis dans le courant de sa thèse.

En guise d'expérience préliminaire, nous avons souhaité simplement démontrer que des réseaux périodiques de molécules d'ADN pouvaient être générés. Afin de caractériser ces réseaux nous avons utilisé comme méthode d'imagerie la fluorescence en utilisant un scanner à fluorescence commercial tel que celui utilisé pour les microarrays à ADN.

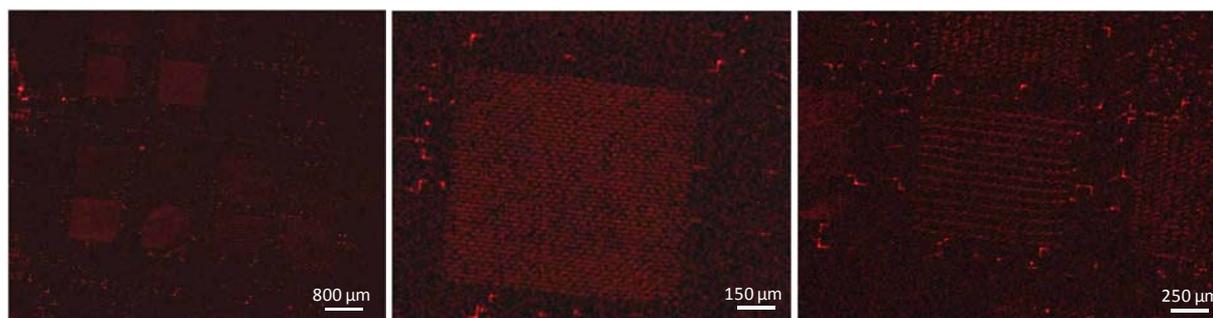


Figure 14. Images prises avec un scanner en fluorescence de la société Innopsys de réseaux d'ADN et de réseaux de lignes d'ADN qui seront utilisés comme réseaux de diffraction.

La figure 14 montre que l'on est capable de résoudre des molécules uniques avec un scanner commercial de fluorescence, ce qui ouvre les portes d'un grand nombre d'applications. En effet, ceci permettrait d'entrevoir la détection d'interactions de type ADN/ADN ou ADN/protéine à la surface de cette lame. En outre, le scanner pourrait servir de moyen de caractérisation complémentaire pour corrélérer cette détection à la détection sans marquage proposée par la diffraction.

V. Conclusion

Cette étude démontre que les forces capillaires et les flux convectifs peuvent être mis à profit sur des surfaces structurées pour produire des réseaux ordonnés de molécules d'ADN uniques avec un taux de remplissage proche de 100%, de façon automatisée et reproductible. Les molécules d'ADN sont homogènes en longueur et en orientation, et sont positionnées de façon précise sur une étendue dépassant le mm² en juste quelques secondes. L'assemblage capillaire semble avoir une influence réelle sur l'étirement des molécules. Le contrôle de quatre paramètres expérimentaux clé, à savoir la température, l'angle de contact grâce à l'ajout contrôlé de surfactant au sein de la solution d'assemblage, la vitesse de déplacement du substrat et la concentration des molécules, apporte un contrôle total du mécanisme d'assemblage ayant lieu et permet d'entrevoir une augmentation de la complexité structurale des micro- ou des nanosystèmes étudiés. La technique d'assemblage capillaire peut également être utilisée pour assembler des molécules fonctionnalisées directement en suspension ou pouvant être fonctionnalisées à posteriori. Les assemblages obtenus, notamment les lignes d'ADN, pourraient être utilisés comme supports 1D pour échafauder ou guider l'assemblage d'objets plus complexes. L'influence de divers paramètres tels que la taille des motifs, la dimension des molécules, leur fonctionnalisation (par une nanoparticule par exemple), sur l'étirement après assemblage et transfert mériterait d'être étudiée de manière systématique. Nos résultats semblent montrer que ces paramètres ont une influence, ce qui laisse entrevoir la possibilité de les manipuler afin de contrôler finement le degré d'étirement final.

VI. Références

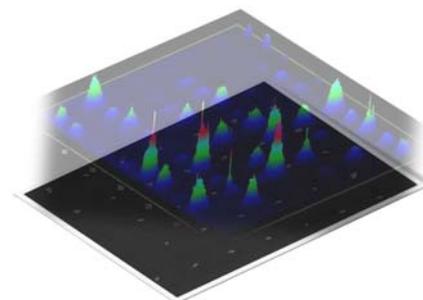
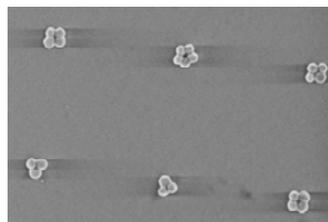
- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* (1953), **171**, 737-738.
- [2] www.futura-sciences.com
- [3] A. Crut, Diffusion de l'enzyme de restriction EcoRV sur des molécules d'ADN étirées, Université Pierre et Marie Curie, **2005**.
- [4] T. Perkins, D. Smith, R. Larson, S. Chu, *Science* (1995), **268**, 83-87 ; J. O. Tegenfeldt, C. Prinz, H. Cao, S. Chou, W. W. Reisner, R. Riehn, Y. M. Wang, E. C. Cox, J. C. Sturm, P. Silberzan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2004), **101**, 10979-10983.
- [5] L. J. Kricka, *Clinica Chimica Acta* (2001), **307**, 219-223.
- [6] N. C. Seeman, *Nature* (2003), **421**, 427-31.
- [7] C. M. Niemeyer, *Applied Physics A: Materials Science & Processing* (1999), **68**, 119-124.
- [8] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nature Letters* (2010), **465**, 202-204.

- [9] K. Lund, A. J. Manzo, N. Dabby, N. Michelotti, A. Johnson-Buck, J. Nangreave, S. Taylor, R. Pei, M. N. Stojanovic, N. G. Walter, E. Winfree, H. Yan, *Nature Letters* (2010), 465, 206-210.
- [10] L. M. Smith, *Nature* (2010), 465, 167-168.
- [11] D. Gerhold, T. Rushmore, C. T. Caskey, *Trends Biochem. Sci.* (1999), 24, 168-173.
- [12] M. Cuzin, *Transfus. Clin. Biol.* (2001), 8, 291-296.
- [13] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* (1998), 391, 775.
- [14] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* (2002), 297, 72.
- [15] Z. X. Deng, C. D. Mao, *Nano Lett.* (2003), 3, 1545.
- [16] C. F. Monson, A. T. Woolley, *Nano Lett.* (2003), 3, 359.
- [17] K. Nguyen, M. Monteverde, A. Filoramo, L. Goux-Capes, S. Lyonnais, P. Jegou, P. Viel, M. Goffman, J.-P. Bourgoïn, *Adv. Mat.* (2008), 20, 1099-1104.
- [18] J. M. Köhler, A. Csáki, J. Reichert, R. Möller, W. Straube, W. Fritzsche, *Sens. & Actuat. B.* (2001), 76, 166-172.
- [19] D. Bensimon, A. Bensimon, F. Heslot, *US Patent 5840862* (1998)
- [20] D. Bensimon, A. J. Simon, V. Croquette, A. Bensimon, *Phys. Rev. Lett.* (1995), 74, 4754
- [21] A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, D. Bensimon, *Science* (1994), 265, 2096.
- [22] Y. L. Lyubchenko, A. A. Gall, L. S. Shlyakhtenko, R. E. Harrington, B. L. Jacobs, S. M. Oden, P. I. Lindsay, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (1992), 10(3), 589-606.
- [23] J. Vesenka, M. Guthold, C. L. Tang, D. Keller, E. Delaine, C. Bustamante, *Ultramicroscopy* (1992), 42-44(2), 1243-1249.
- [24] C. Bustamante, J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Gothold, R. Keller, *Biochemistry* (1992), 31(1), 22-26.
- [25] T. Thundat, D. P. Allison, R. J. Warmack, G. M. Brown, K. B. Jacobson, J. J. Schrick, T. L. Ferrell, *Scanning Microscopy* (1992), 6(4), 911-918.
- [26] N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, Y. Baba, *Analytical Chemistry* (2004), 76(1), 15-22.
- [27] C. A. P. Petit, J. D. Carbeck, *Nano Lett.* (2003), 3, 1141-1146.
- [28] J. Opitz, F. Braun, R. Seidel, W. Pompe, B. Voit, M. Mertig, *Nanotechnology* (2004), 15, 717-723.
- [29] M. Gad, S. Sugiyama, T. Ohtani, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2003), 21, 387-393.

- [30] P. Björk, S. Holmström, O. Inganäs, *Small* (2006), 8-9, 1068-1074.
- [31] H. Nakao, H. Shiigi, Y. Yamamoto, S. Tokonami, T. Nagaoka, S. Sugiyama, T. Ohtani, *Nano Lett.* (2003), 3, 1391 ; H. Nakao, M. Gad, S. Sugiyama, K. Otobe, T. Ohtani, *JACS* (2003), 125, 7162-7163.
- [32] J. Guan, L. J. Lee, *PNAS* (2005), 102, 18321-18325.
- [33] D. E. Smith, T. T. Perkins, S. Chu, *Macromolecules* (1996), 29, 1372-1373.
- [34] A. Hanke, M. G. Ochoa, R. Metzler, *Physical Review Letters* (2008), 100(1), 018106.
- [35] J. van Mameren, P. Gross, G. Farge, P. Hooijman, M. Modesti, M. Falkenberg, G. J. L. Wuite, E. J. G. Peterman, *PNAS* (2009), 106(43), 18231-18236.
- [36] C. Bustamante, S. B. Smith, Y. Cui, *Science* (1996), 271, 795-799.
- [37] L. Malaquin, T. Kraus, H. Schmid, E. Delamarque, H. Wolf, *Langmuir* (2007), 23, 11513-11521.
- [38] E. V. Armbrust, J. A. Berges, C. Bowler, B. R. Green, D. Martinez, N. H. Putnam, S. Zhou, A. E. Allen, K. E. Apt, M. Bechner, M. A. Brzezinski, B. K. Chaal, A. Chiovitti, A. K. Davis, M. S. Demarest, J. C. Detter, T. Glavina, G. Goodstein, M. Z. Hadi, U. Hellsten, M. Hildebrand, B. D. Jenkins, J. Jurka, V. V. Kapitonov, N. Kroger, W. W. Y. Lau, T. W. Lane, F. W. Larimer, J. C. Lippmeier, S. Lucas, M. Medina, A. Montsant, M. Obornik, M. S. Parker, B. Palenik, G. J. Pazour, P. M. Richardson, T. A. Rynearson, M. A. Saito, D. C. Schwartz, K. Thamtrakoln, K. Valentin, A. Vardi, F. P. Wilkerson, D. S. Rokhsar, *Science* (2004), 306, 79-86.
- [39] E. T. Dimalanta, A. Lim, R. Runnheim, C. Lamers, C. Churas, D. K. Forrest, J. J. de Pablo, M. D. Graham, S. N. Coppersmith, S. Goldstein, D. C. Schwartz, *Anal. Chem.* (2004), 76, 5293-5301.
- [40] Z. Gueroui, Thèse de doctorat de l'ENS Lyon, 2002.
- [41] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, S. M. Block, *Biophys. J.* (1997), 72(3), 1335-1346.
- [42] A. Crut, D. Lasna, J. F. Allemand, M. Dahan, P. Desbiolles, *Phys. Rev. E* (2003), 67(5), 051910.
- [43] A. Ashkin, *Science* (1980), 210, 1081-1088.
- [44] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, T. Yamane, *Nature* (1987), 330(6150), 769-771.
- [45] S. Chu, *Science* (1991), 253, 861-866.
- [46] A. Engel, H. E. Gaub, D. J. Maler, *Current Biology* (1999), 9(4), R133-R136.
- [47] S. M. Block, *Cell* (1998), 93(1), 5-8.

- [48] T. Yanagida, K. Kitamura, H. Tanaka, A. Hikikoshi Iwane, S. Esaki, *Current Opinion in Cell Biology* (**2000**), 12(1), 20-25.
- [49] J. B. Heng, A. Aksimentiev, C. Ho, P. Marks, Y. V. Grinkova, S. Sligar, K. Schulten, G. Timp, *Nano Lett.* (**2005**), 5(10), 1883-1888.
- [50] J. B. Goh, P. L. Tam, R. W. Loo, M. C. Goh, *Analytical Biochemistry* (2003), 313(2), 262-266.
- [51] J. B. Goh, R. W. Loo, M. C. Goh, *Sensors and Actuators B: Chemical* (**2005**), 106(1), 243-248.
- [52] Y. G. Tsay, C. I. Lin, J. Lee, E. K. Gustafson, R. Appelqvist, P. Maggini, R. Norton, N. Teng, D. Charlton, *Clin. Chem* (**1991**), 37(9), 1502-1505.
- [53] J.-C. Cau, Biodétection optique sans marquage basée sur la diffraction de motifs moléculaires submicroniques, Université de Toulouse, (**2008**).

Chapitre 5



Assemblage contrôlé de nanoparticules métalliques pour la production de substrats SERS: Vers une ingénierie des points chauds.

Les phénomènes de résonance plasmonique qui se manifestent notamment dans l'effet SERS pourraient être exploités dans le domaine de la biodétection sans marquage et à haute sensibilité. Une des conditions préalables à cette application est la mise en place d'une technologie fiable et reproductible permettant la production de substrats actifs capables d'exalter localement le champ électromagnétique, substrats que nous baptiserons par la suite : substrats SERS. Dans ce chapitre, nous présentons des nanostructures ordonnées fabriquées par assemblage capillaire et lithographie douce qui constituent des substrats SERS efficaces. Pour cette étude en particulier, les substrats optiquement actifs se composent d'un réseau périodique à 2D de nanoparticules d'or avec différents arrangements. Par le biais de la spectroscopie Raman, nous avons mis en évidence que l'exaltation du champ électromagnétique local est plus importante dans le cas d'agrégats (trois à six nanoparticules) que dans le cas de particules uniques. Les dimères provoquent également une forte exaltation du signal mais leur efficacité SERS est dépendante de leur orientation. Pour aller plus loin, nous démontrons que ce type de substrats peut être utilisé également pour exalter un signal de fluorescence conventionnel. Ce type de substrat optiquement actif peut être fabriqué très facilement sans avoir recours à des technologies lourdes ou onéreuses. Il peut être fabriqué avec tout type de particules métalliques (pré-fonctionnalisées) et pourrait être couplé à des techniques de dépôt automatisé de biomolécules sondes.

Controlled assembly of metallic nanoparticles for the generation of SERS substrates: Towards the engineering of hot spots

Plasmonic resonance phenomena involved for example in the so-called SERS effect could be exploited for sensitive label-free biodetection purposes. One pre-requisite for this type of application is the implementation of a reliable and reproducible technology allowing the production of active substrates capable of local enhancement of the electromagnetic field, substrates hereafter referred as: SERS substrates. In this chapter we present the properties of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) active substrates elaborated by a low-cost approach. Our methodology relying on capillary assembly and soft-lithography allows us to generate periodic bidimensional (2D) matrixes of 100 nm gold nanoparticles patterns in a very precise, cost-efficient and large-scaled manner. For this study, we assembled nanoparticle aggregates of different sizes (1-6 particles) in order to determine the influence of the arrangement on the local electromagnetic field enhancement. We further demonstrate that this substrate is greatly efficient as a SERS, but also as a Metal-Enhanced Fluorescence (MEF) substrate for local enhancement of conventional fluorescence. This kind of substrates can be fabricated with any type of nanoparticles bulk-functionalized or not, of any size, and can be coupled to automatized deposition techniques for the deposition of probe biomolecules.

I. Sujet d'étude : Généralités

La miniaturisation et la manipulation d'objets sont les tendances actuelles pour un grand nombre d'applications. Dans ce contexte, des méthodes pour localiser et étudier ces systèmes, quelques fois réduits jusqu'à l'échelle de la molécule unique, sont nécessaires. Les interactions entre lumière et matière sont à la base d'un grand nombre de méthodes d'analyse, en physique fondamentale comme en chimie ou pour les sciences de la vie : elles permettent généralement de sonder un échantillon sans contact et de manière non-destructive ou non-invasive. Cependant la plupart de ces techniques ne sont généralement pas suffisamment sensibles pour détecter un nano-objet unique ou une molécule isolée. Les techniques dites spectroscopiques occupent une place importante. Ces techniques ont suivi les développements récents issus des nanotechnologies et l'emploi de configurations adaptées permet désormais l'étude d'objets individuels de taille nanométrique. Une configuration possible consiste à positionner les objets d'intérêt au voisinage de nanocristaux de métaux nobles (or, argent) afin d'exalter localement au voisinage de l'objet nanométrique d'intérêt le champ électromagnétique.

De par leur petite taille et leur grand rapport surface sur volume, les particules métalliques présentent des propriétés optiques différentes de celles des matériaux massifs. Les couleurs vives des suspensions colloïdales métalliques témoignent de cette particularité. Ces propriétés optiques sont une conséquence de la forte interaction entre la lumière (rayonnement électromagnétique) et les électrons de conduction dans les nanostructures métalliques connue sous le nom de « couplage plasmonique ». Les nanoparticules métalliques constituent des matériaux de choix pour localiser ou guider des ondes lumineuses dans des espaces de taille inférieure à la longueur d'onde. De ce fait, le champ de la plasmonique trouve des applications nombreuses dans des domaines tels que la photonique (guides d'onde), l'optoélectronique (phototransistors), la nanospectroscopie (effet SERS) ou la nanobiotechnologie (biocapteurs, marquage moléculaire).

II. Principe de l'effet Raman

L'effet Raman résulte de l'interaction des photons d'une source de lumière monochromatique avec les molécules de l'échantillon. Approximativement 1 sur 10 000 photons seront diffusés élastiquement par les molécules (sans perte ou gain d'énergie); on appelle cette diffusion: la diffusion Rayleigh. Occasionnellement 1 photon sera diffusé inélastiquement (1 sur 100 000 000) avec une légère perte en énergie (diffusion Raman) correspondant à une transition vibrationnelle (Schéma 1). Comme il s'agit d'un processus intrinsèquement très faible, des sources de lumière intense telles que les lasers sont nécessaires pour son observation.

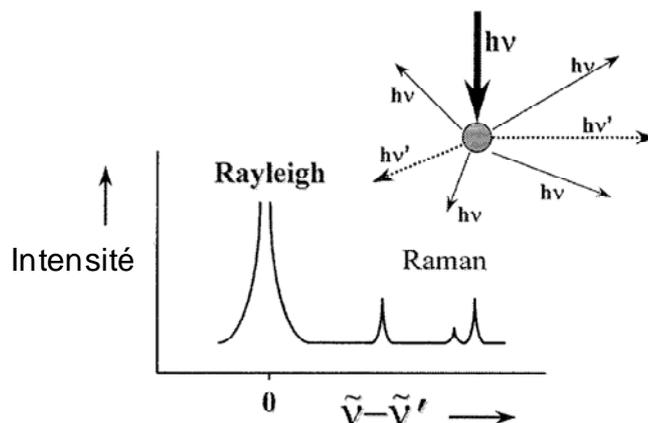


Schéma 1. Représentation schématique de la diffusion Raman Rayleigh et Stokes [1].

Ainsi, l'effet Raman est un phénomène physique de diffusion moléculaire de la lumière mis en évidence expérimentalement en 1928 par le physicien indien Chandrasekhara Venkata Raman, lauréat du prix Nobel en 1930. Dès les premiers travaux se sont dégagés les caractères essentiels de ce phénomène : la diffusion d'une radiation monochromatique par des molécules polyatomiques entraîne l'apparition de radiations de très faible intensité dont les fréquences sont différentes de celle de la radiation incidente. Cet effet consiste en l'existence d'un spectre décalé en fréquence dans la lumière diffusée par un échantillon soumis à une illumination monochromatique. Ce spectre de très faible intensité est difficile à observer à côté de la lumière diffusée sans changement de fréquence. Il est caractéristique de l'échantillon étudié. On sonde donc ici, comme avec la spectroscopie infrarouge, la structure vibrationnelle de la molécule ce qui permet d'obtenir une signature chimique très fine de la matière puisque les niveaux d'énergie vibrationnels dépendent directement de la structure de la molécule (liaisons et types d'atomes). Le spectre caractéristique de l'échantillon peut être obtenu à partir de n'importe quel état de l'échantillon : gazeux, liquide ou solide. A partir du spectre on peut remonter à des informations qualitatives (mise en évidence de la présence d'une espèce chimique) et quantitatives (par comparaison des intensités relatives des raies des différentes espèces) sur l'échantillon. En outre, cette technique se satisfait d'échantillons de très petite taille (de l'ordre du micromètre cube).

Détecter des molécules uniques tout en identifiant simultanément leur structure chimique représente un aboutissement dans l'analyse chimique et présente un intérêt tant d'un point de vue pratique que fondamental. L'avantage principal de la spectroscopie Raman est sa capacité à fournir des informations très riches sur la structure moléculaire, et ce même à température ambiante ou dans des conditions hostiles (contrairement à la fluorescence), et sans préparation particulière de l'échantillon avant analyse. Les domaines de la biophysique ou de la médecine sont les premiers intéressés par la possibilité de suivre les molécules et les interactions moléculaires à petite échelle dans des conditions assimilables aux conditions physiologiques, ouvrant la voie à des caractérisations *in vivo* des cellules ou des membranes biologiques. En effet, l'analyse est non destructive et l'étude de solutions aqueuses possible. De plus, toutes les molécules, et en particulier certaines de grand intérêt biologique ne sont pas fluorescentes. En utilisant le signal de diffusion Raman, pour lequel il n'existe aucune restriction sur la nature de l'espèce étudiée, des molécules non fluorescentes telles que les acides aminés peuvent être détectées et identifiées individuellement sans le greffage préalable d'un marqueur fluorescent. En effet, outre le fait que cette étape de marquage peut être très complexe et délicate à mettre en œuvre, on ne peut pas exclure la possibilité que la présence

du marqueur dénature la molécule et perturbe son fonctionnement. Dans le cas de la spectroscopie Raman, tous les diagnostics peuvent être effectués avec une réelle précision sur la nature exacte des espèces chimiques car le spectre Raman d'une espèce constitue une véritable empreinte. Les différentes bandes du spectre Raman peuvent être considérées comme autant de signatures puisque les vibrations ne mettent pas toutes en jeu les mêmes atomes ou liaisons, ni avec les mêmes poids. Aussi, s'il paraît évident que de telles techniques spectroscopiques sont bien souvent employées pour la détection d'espèces de spectre connu, un réel effort est porté sur la caractérisation d'espèces nouvelles en raison notamment de l'évolution technique qui conduit au contrôle d'objets de plus en plus petits. Enfin, dans le domaine de l'imagerie, la résolution spatiale de l'ordre du μm permet des analyses topologiques ou cartographiques d'excellente qualité (1 à 5 μm suivant la longueur d'onde du laser utilisé).

La différence la plus importante concernant la problématique de la détection du signal Raman de molécules uniques par rapport à celle du signal de fluorescence par exemple, repose sur l'énorme écart d'efficacité des deux processus. En effet, la section efficace du processus Raman est beaucoup plus faible que celle de la fluorescence. A titre de comparaison, pour un colorant, la section efficace de diffusion Raman est typiquement 15 ordres de grandeur plus faible que celle de fluorescence. Ainsi, l'acquisition de spectres avec une bonne résolution demande des durées d'exposition ou d'acquisition très importantes. Une augmentation drastique de la puissance d'excitation ne constitue pas non plus une solution puisque, même si, contrairement à la fluorescence, la diffusion Raman ne conduit pas à un phénomène rapide de photoblanchiment, l'emploi d'une puissance élevée peut tout de même activer des processus de photodégradation, voire même à très haute puissance à une dégradation thermique. Ainsi, dans le cas de la diffusion Raman, la faiblesse du signal rend la diminution du bruit nécessaire mais insuffisante pour parvenir à un rapport signal/bruit satisfaisant. Il est donc nécessaire de trouver des moyens d'exaltation du signal lui-même.

Une solution pour augmenter le signal Raman met en œuvre une exaltation dite « de surface ». Celle-ci tire son nom du fait qu'elle a été observée pour la première fois au milieu des années 1970' par M. Fleischmann au cours d'une expérience portant sur des molécules de pyridine adsorbées sur une électrode d'argent [2]. Si l'exaltation fut au début attribuée à une augmentation du nombre de molécules participant au signal, les nombreuses expériences qui s'en suivirent validèrent la thèse d'un processus physique ou physico-chimique de surface. Cette technique porte depuis le nom de SERS, acronyme anglais de « Surface Enhanced Raman Scattering » et met en jeu l'utilisation de substrats de métaux nobles (Au ou Ag). C'est cette voie d'exaltation qui a été privilégiée dans le cadre de cette thèse.

Lorsqu'une molécule interagit avec un champ électrique ou un faisceau laser, elle devient polarisée : son nuage électronique est déformé et la séparation des charges provoque l'apparition d'un moment dipolaire induit tel que

$$\vec{\mu}_{\text{induit}} = \alpha \vec{E} \quad (1)$$

Où α est la polarisabilité, et \vec{E} le champ électrique qui dans le cas d'un laser de fréquence ω_L peut se mettre sous la forme $\vec{E} = \vec{E}_0 \cos \omega_L t$.

III. Propriétés optiques des colloïdes métalliques

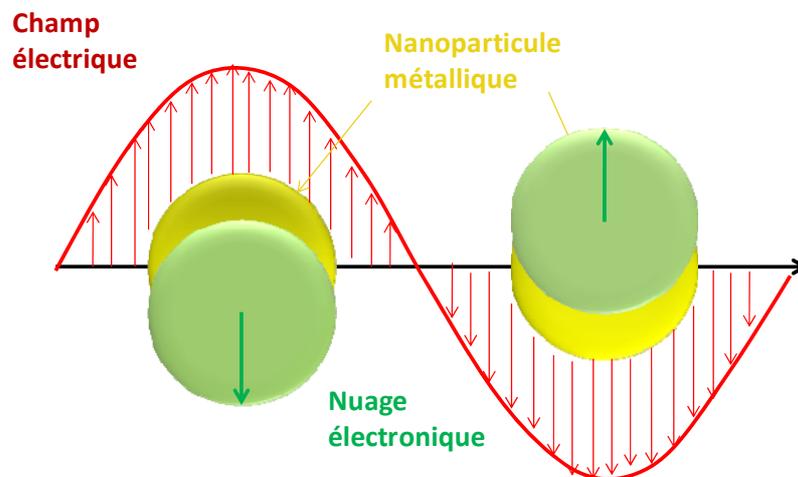


Schéma 2. Schéma illustrant l'action d'un champ électromagnétique sur le plasmon d'une nanoparticule métallique, montrant le déplacement du nuage électronique par rapport au centre la nanoparticule [3].

Les électrons libres d'un métal peuvent être décrits comme un liquide d'électrons de haute densité : un *plasma*. Cette approche prévoit l'existence de modes d'oscillation collective des électrons, appelés *plasmons* [4]. Dans les nanostructures telles que les nanoparticules métalliques, ces modes sont fortement résonants et interagissent avec la lumière. Les électrons portant une charge électrique, leurs oscillations sont associées à des champs électromagnétiques. Les conditions aux limites des champs électromagnétiques imposent des conditions à l'existence des plasmons, qui diffèrent suivant la géométrie du système.

On distingue quatre familles de plasmons, en fonction de la dimension du confinement spatial des électrons de conduction dans le métal [5] : (i) les plasmons de volume, dans un matériau massif (pas de confinement spatial) ; (ii) les plasmons de surface, à l'interface entre un métal et un matériau non-conducteur (confinement 2D) ; (iii) les plasmons guidés, le long d'un fil métallique de section nanométrique (confinement 1D) ; et (iv) les plasmons localisés, dans une particule métallique de taille nanométrique (confinement 0D). Dans les nanomatériaux, les effets de surface dominent les effets de volume. La réponse optique est donc principalement gouvernée par les plasmons de surface contrairement aux matériaux massifs qui sont régis par les plasmons de volume.

Les plasmons jouent un rôle majeur dans les propriétés optiques des métaux. Une onde électromagnétique de fréquence inférieure à la fréquence plasmon est réfléchiée car les électrons du métal écrantent le champ incident. Une onde électromagnétique de fréquence supérieure à la fréquence plasmon est transmise car les électrons ne répondent pas suffisamment rapidement pour l'écranter. Lorsque leur taille est petite devant la longueur d'onde, les propriétés optiques des nanoparticules métalliques sont dominées par l'oscillation collective des électrons de conduction (*plasmon de surface localisé*) induite par interaction avec un rayonnement électromagnétique. Le champ électrique du rayonnement incident induit la formation d'un dipôle dans la nanoparticule. Une force de rappel s'oppose alors aux déplacements des électrons par rapport au centre de la particule (confinement spatial). Comme pour un oscillateur harmonique mécanique, l'oscillation des charges dans la nanoparticule est résonante pour une certaine fréquence d'excitation (*résonance plasmon*). Seuls les métaux possédant des électrons libres (essentiellement l'or, l'argent, le cuivre, et les métaux alcalins) possèdent des résonances plasmons dans le spectre visible, et présentent pour cette raison de telles couleurs intenses. La fréquence de résonance plasmon est déterminée par la force de

rappel des électrons de conduction, laquelle dépend d'un grand nombre de paramètres tels que la composition, la taille et la forme des particules [6-7]. Quatre principaux paramètres influencent de manière considérable la réponse optique d'une particule : sa nature, sa taille, sa forme et l'indice de réfraction du milieu environnant [8-12]. La manipulation de ces paramètres peut avoir pour conséquence le décalage de la fréquence de résonance mais également l'élargissement du pic de résonance ou l'apparition de plusieurs pics.

En effet, particules d'or et d'argent de même taille auront des fréquences de résonance plasmon de surface très différentes. Cet écart est lié à la différence de fonction diélectrique des matériaux et à son effet sur la polarisabilité des particules.

L'augmentation en taille des particules va provoquer un décalage de la résonance plasmon de surface vers le rouge et va induire un élargissement du spectre de diffusion. Pour des tailles de colloïdes supérieures à 170 nm environ, l'augmentation du diamètre des particules met en évidence des contributions multipolaires qui se manifestent par l'apparition progressive de plusieurs maximums d'intensité. De même, lorsque la particule présente des facettes, les spectres d'extinction présentent un fort élargissement et on observe l'apparition de contributions multipolaires également. L'augmentation de l'indice de réfraction du milieu décale la résonance plasmon vers le rouge. Enfin, lorsque deux ou plusieurs particules sont à proximité leurs nuages électroniques interagissent. Cette interaction électromagnétique, connue sous le nom de couplage plasmonique, induit des décalages de la position spectrale de la résonance plasmon de surface par rapport à la réponse optique d'une particule unique. Ce couplage plasmonique suscite un intérêt accru dans des applications de spectroscopie Raman ou de fluorescence car il offre une forte exaltation locale du champ électromagnétique.

IV. La Spectroscopie Raman Exaltée de Surface (SERS)

Nous avons donc vu que les nanocristaux possèdent des propriétés remarquables en raison des résonances plasmon de surface (SPR) localisés qui induisent, sous l'effet d'une excitation optique de fréquence proche de la SPR, une exaltation très intense du champ électromagnétique local près de la surface. Ce phénomène a déjà été exploité pour diverses applications allant de la détection optique de molécules à des applications dans les domaines de la spintronique et de la détection chimique. L'intérêt de l'effet SERS est que le signal Raman peut être exalté de plusieurs ordres de grandeur (10^{14}), suffisamment pour détecter la molécule unique [13]. Cette technique est largement répandue de nos jours en chimie, mais son utilisation demeure plus ou moins empirique et son interprétation est sujette à controverse. La contribution électromagnétique à l'exaltation globale (car une contribution chimique n'est pas exclue) est directement liée à l'existence de points « chauds » où le champ électromagnétique est localement concentré.

Le facteur d'exaltation (ou EF, acronyme anglais pour « Enhancement Factor ») est une valeur permettant de comparer les efficacités des différentes surfaces SERS. Le EF quantifie la capacité du substrat à exalter le signal Raman des analytes à sa surface et est déterminé en comparant le signal Raman par molécule (c'est-à-dire l'intensité du signal Raman, I_{SERS} , normalisée par rapport au nombre de molécules contribuant au signal, N_{SERS}) au signal Raman par molécule (I_{neat} / N_{neat}) d'une référence non SERS-active. L'EF est défini par l'expression [14]:

$$EF = \left(\frac{I_{SERS}}{N_{SERS}} \right) \left(\frac{N_{neat}}{I_{neat}} \right) \quad (2)$$

IV. A. Mécanismes de l'effet SERS

Le mécanisme exact de l'effet SERS est encore un sujet de controverse dans la littérature. S'il reste de nombreuses zones d'ombre, il est admis qu'il existe deux contributions. La première contribution est liée à la géométrie de la surface. Elle nécessite la présence sur le substrat de points singuliers (protubérances, arêtes ou interstices) [15]. L'effet de ces points singuliers est décrit par la théorie électromagnétique qui repose sur l'excitation de plasmons de surface localisés. La deuxième contribution, dite « chimique », explique l'effet par la formation de complexes de transfert de charge. La théorie chimique s'applique uniquement à des espèces ayant formé une liaison avec la surface, alors que la théorie électromagnétique peut s'appliquer même dans les cas où le specimen est uniquement physisorbé sur la surface.

Etant donné que la diffusion Raman est gouvernée par la relation (1) précédemment énoncée, l'effet SERS doit forcément impliquer une augmentation d'un ou des deux termes E (amplitude du champ électrique) et α (polarisabilité moléculaire). La théorie électromagnétique repose essentiellement sur l'exaltation de E , et la théorie chimique est reliée à l'exaltation de α . Le point commun entre ces deux théories est que les deux requièrent une surface rugueuse pour que l'exaltation spectrale ait lieu.

IV. A. 1. La contribution électromagnétique

Le modèle électromagnétique est relié à E , l'amplitude du champ électrique de la lumière (facteur indépendant de la molécule) et propose que l'exaltation soit due à la structure de la surface.

Lorsque la lumière incidente frappe la surface, les plasmons de surface localisés sont excités. L'exaltation du champ est maximale lorsque la fréquence plasmon, ω_p , est en résonance avec la radiation. De plus, pour que la diffusion ait lieu, les oscillations plasmon doivent être perpendiculaires à la surface ; si elles sont dans le plan de la surface, il n'y a pas de diffusion. C'est pour cette même raison que des surfaces rugueuses ou des arrangements de nanoparticules sont communément utilisés dans les expériences SERS car ces surfaces offrent une zone sur laquelle ces oscillations collectives localisées ont lieu. La lumière incidente sur la surface peut exciter une variété de phénomènes surfaciques. Mais la complexité de la situation peut être minimisée avec des surfaces ayant des structures bien plus petites que la longueur d'onde de la lumière, car seules les contributions dipolaires seront prédominantes. La raison pour laquelle l'effet SERS est si prononcé, est que le phénomène d'exaltation se produit deux fois. Initialement, l'exaltation du champ amplifie l'intensité de la lumière qui excite les modes Raman de la molécule étudiée, augmentant par la même occasion le signal de la diffusion Raman. Le signal Raman est ensuite de nouveau amplifié par la surface par le

même mécanisme que celui subi par la lumière incidente. Ceci résulte en une augmentation d'autant plus significative du signal global de sortie de l'expérience. A chaque étape, le champ électrique est exalté en E^2 , pour une exaltation totale en E^4 [16]. L'exaltation n'est pas égale dans tous les cas. Lorsque le signal Raman est très faiblement décalé par rapport à la lumière incidente, la lumière laser incidente ainsi que le signal Raman peuvent être proches de la résonance avec la fréquence plasmon, ce qui conduit à une exaltation en E^4 . En revanche, lorsque le décalage en fréquence est important, la lumière incidente et le signal Raman ne peuvent pas être tous les deux en résonance avec ω_p , donc l'exaltation n'est plus maximale [17].

Le choix du métal de surface est également dicté par la fréquence de la résonance plasmon. Les radiations dans le visible et dans le proche infra-rouge sont utilisées pour exciter les modes Raman. L'argent et l'or sont les métaux usuels pour les expériences SERS car leurs fréquences de résonance plasmon tombent dans cet intervalle de longueurs d'onde, ce qui procure une exaltation maximale. Le cuivre est un autre métal pour lequel le spectre d'absorption rentre dans cette plage acceptable pour les expériences SERS [18]. De nombreux auteurs ont réalisé des études de simulation des résonances plasmons de nanoparticules, pour prévoir les facteurs d'exaltation du champ électromagnétique local.

Dans ce cas, les valeurs du facteur d'exaltation lié à des phénomènes électromagnétiques, et prévues par les modèles, peuvent être très importantes, et parfois très proches de celles observées expérimentalement. On pourrait donc admettre que dans certains cas, l'effet électromagnétique suffise à lui seul à expliquer l'augmentation du signal de diffusion Raman. Cependant, l'ensemble des valeurs présentées est constitué de valeurs théoriques, calculées dans le cadre de modèles, avec l'hypothèse de couplages de type dipolaire, et pour des morphologies particulières, voire idéales. Les morphologies considérées dans ces calculs ne décrivent donc qu'un ensemble très restreint de substrats expérimentaux réels.

De plus, un certain nombre d'observations expérimentales montrent l'existence d'une sélectivité chimique de l'exaltation. Cette sélectivité ne peut être expliquée dans le cadre des modèles électromagnétiques présentés. En effet, toutes les molécules, c'est-à-dire toutes les espèces chimiques, ne présentent pas de spectres Raman exaltés. En particulier, si on observe bien un fort signal des molécules cibles, le signal du solvant est toujours absent alors que les molécules constitutives sont a priori elles-aussi soumises au fort champ électromagnétique. En outre, une adjonction de certains ions peut aussi modifier l'exaltation effective. Ces observations de nature expérimentale amènent les auteurs à postuler et à mettre en évidence l'existence de deux effets coopératifs participant au processus d'exaltation.

IV. A. 2. La contribution chimique

Alors que la théorie électromagnétique peut être appliquée quelle que soit la molécule, elle n'explique pas entièrement l'ampleur de l'exaltation observée dans plusieurs systèmes. Le qualificatif "chimique", que l'on a attribué à cet effet, ne présume pas en réalité de la nature des processus impliqués puisque ceux-ci sont encore très mal connus. En fait, dans la littérature, l'effet chimique est aussi nommé "first layer effect", en rapport avec la première couche d'adsorption au sein de laquelle se trouvent les molécules qui présentent des spectres exaltés. Pour un grand nombre de molécules, le plus souvent celles possédant des paires d'électrons libres et pouvant s'accrocher à la surface, un mécanisme d'exaltation

complètement distinct a été décrit ne mettant pas en jeu les plasmons de surface. Ce mécanisme chimique implique un transfert de charge entre les espèces chimisorbées et la surface métallique. En effet, pour de nombreuses molécules, les transitions HOMO/LUMO nécessitent bien plus d'énergie que la lumière visible ou infra-rouge typiquement mise en jeu dans les expériences Raman. En revanche, pour un adsorbant sur une surface métallique, le niveau de Fermi du métal peut servir d'intermédiaire dans le transfert de charge [19]. L'existence d'un tel état de transfert de charge dépend de la nature et de la qualité des interactions existant entre la molécule et le substrat ; il faut en effet que le couplage soit important, et donc que les molécules soient au moins directement adsorbées sur la surface, sans espèce ou couche intermédiaire. Cet effet, qui dépend des interactions spécifiques entre la molécule adsorbée et le substrat, apporte une contribution a priori moins importante que celle de l'effet électromagnétique à l'exaltation globale du signal Raman. Il semble ainsi que l'effet chimique interviendrait au plus pour un facteur de l'ordre de 10^2 - 10^3 .

La compréhension très lacunaire de l'effet "chimique" est surtout liée à la difficulté d'effectuer des expériences probantes dans cette direction. Les études SERS de molécules individuelles ont par contre un fort potentiel dans ce cas. Dans une étude plus récente Nie et Emaury, qui furent parmi les pionniers des expériences SERS de molécules uniques, ont mis en évidence de manière directe l'importance des interactions physicochimiques molécules-métal dans l'effet chimique d'exaltation [20]. Le système étudié dans cette expérience se compose d'agrégats d'argent, préalablement incubés dans une solution diluée à $2 \cdot 10^{-9}$ M de rhodamine 6G (Rh6G), et immobilisés sur une surface de verre. Cet échantillon est ensuite introduit dans le dispositif expérimental qui comporte notamment un dispositif microfluidique. Cette installation permet de faire passer sur le substrat un flux constant d'une solution dont la composition peut être modifiée à souhait. Les auteurs ont donc observé l'influence de l'introduction de différentes espèces sur l'exaltation du signal Raman de la Rh6G notamment dans le cas d'ions halogénures et soufrés. Les comportements constatés sont très différents: une activation, c'est-à-dire une augmentation du nombre de particules actives et du facteur d'exaltation, particulièrement importante est observée en présence des halogénures Br^- , Cl^- et I^- ; une faible incidence des ions citrates, sulfates et fluorures ainsi qu'une désactivation lorsque le milieu contient des ions thiosulfates. Ces effets ont été attribués à une modification de l'adsorption de la molécule sur les sites actifs, l'adsorption sur ces sites étant ainsi favorisée lorsque des ions, par exemple chlorures, se trouvent à proximité. Cette augmentation particulière de l'exaltation du signal Raman en présence d'ions Cl^- est observée depuis les premières expériences macroscopiques [21] mais demeure incomprise.

IV. A. 3. Bilan sur les mécanismes d'exaltation

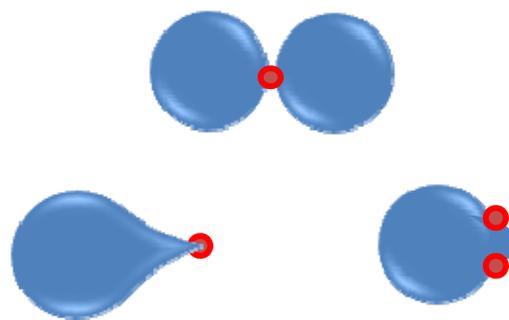
L'activité préférentielle des particules de taille suffisante (50 nm) [22], la nécessité de la présence de plusieurs particules dans la structure exaltante ainsi qu'une exaltation particulière au niveau de la jonction entre particules, caractéristiques prévues dans le cadre des théories de l'effet électromagnétique, semblent plus que probables au regard d'études expérimentales récentes effectuées en mode molécules uniques [23]. Les facteurs d'exaltation mesurés sont le plus souvent en accord avec les valeurs calculées en utilisant le modèle électromagnétique. Cependant dans certains cas, il est clair qu'il existe un deuxième mécanisme qui contribue à l'exaltation. Un certain nombre d'observations expérimentales montrent l'existence d'une

sélectivité chimique de l'exaltation. Cette sélectivité ne peut être expliquée dans le cadre des modèles électromagnétiques présentés et proviendrait d'un transfert de charge entre les espèces chimisorbées et la surface métallique. La théorie chimique s'applique donc uniquement à des espèces ayant formé une liaison avec la surface, alors que la théorie électromagnétique peut s'appliquer même dans les cas où le spécimen est uniquement physisorbé sur la surface. Quoiqu'il en soit, l'effet SERS doit forcément impliquer une augmentation d'un ou des deux termes E (pour la théorie électromagnétique) et α (pour la théorie chimique). Ainsi, même si la plupart des théories s'accordent à considérer que l'effet chimique intervient pour un facteur bien moindre que l'effet électromagnétique, il est clair aussi que ses mécanismes sont indispensables au signal SERS, et à l'exaltation spectaculaire des points chauds.

Enfin, il est important de noter qu'un phénomène important accompagne l'émission SERS. En effet, la fluorescence est annihilée : sur les spectres SERS, on remarque en effet l'absence de tout signal de fluorescence, même pour des molécules de colorants très efficaces telles que la Rh6G. En fait, la fluorescence a un temps caractéristique qui est long (ns) comparé à ceux des processus de transfert d'énergie pour lesquels les temps caractéristiques sont plutôt de l'ordre de la ps voire de la fs. Ici le couplage dipolaire fort entre la molécule et la particule sur laquelle elle est adsorbée, ouvre une nouvelle voie de relaxation de l'énergie qui l'emporte sur le processus intramoléculaire de fluorescence.

IV. A. 4. Vers un design des sites d'exaltation.

Grâce au développement d'outils de simulation du champ électromagnétique local, de nombreuses études ont tenté de déterminer quel arrangement de nanoparticules ou quelles formes de nanoparticules métalliques pouvaient optimiser le facteur d'exaltation. Sans être exhaustif sur la question nous présenterons quelques tendances qui ressortent de ces travaux.



● Localisation de point « chaud »

Schéma 3. Quelques exemples de structures métalliques exaltantes, avec la localisation possible d'un ou plusieurs points singuliers de l'exaltation électromagnétique dit point "chaud".

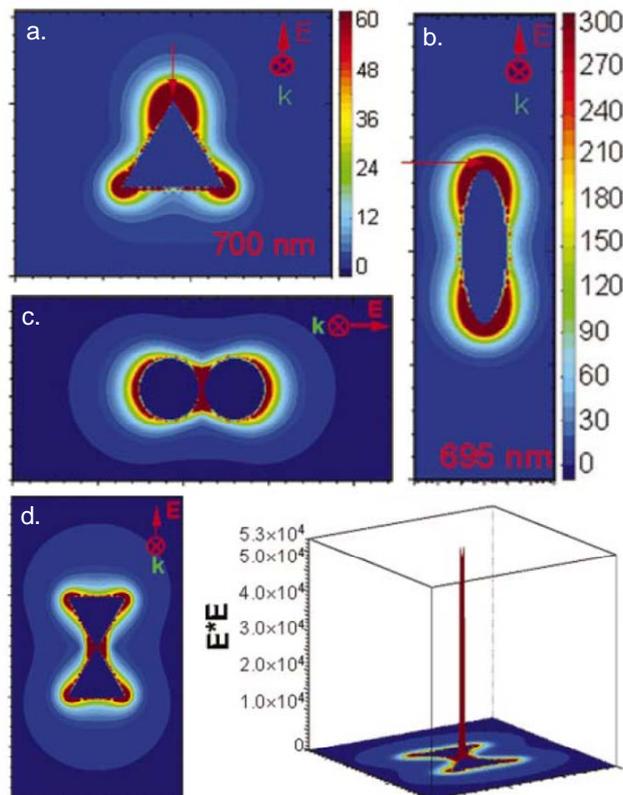


Figure 1. Des champs électromagnétiques très intenses se forment localement autour des particules métalliques lorsqu'elles sont excitées à la résonance plasmon. Simulations théoriques de l'exaltation du champ électromagnétique autour de nanoparticules d'argent: a) autour d'une nanoparticule triangulaire ($\lambda=700$ nm), c) d'un dimère de nanoparticules sphériques ($\lambda=520$ nm), b) d'une nanoparticule ellipsoïdale ($\lambda=695$ nm) et d) d'un papillon présentant un gap. L'échelle d'intensité pour a) s'applique également pour c) [24, 25].

Si on considère deux particules métalliques (or, argent) à une distance de quelques nanomètres l'une de l'autre [26] (Figure 1), l'exaltation du champ électromagnétique entre ces deux particules très proches est largement supérieure à celle obtenue dans le cas d'une particule unique, quel que soit le diamètre des objets. Comme l'ont montré récemment Xu et ses co-auteurs [26], plus les particules sont proches, meilleur est le couplage entre les modes plasmons de chaque particule ; on se place alors dans le cadre de jonctions entre particules et la présence des deux interfaces métal-air circonscrit le champ dans un espace très confiné. Le facteur d'exaltation du champ électromagnétique calculé dans cette même référence peut alors atteindre 10^{10} à 10^{12} dans le cas de particules sphériques quasi-jointives. L'influence de la morphologie des particules sur l'exaltation du champ est aussi discutée. Pour des nanoparticules nonsphériques, des amplifications particulièrement grandes sont prévues là où les rayons de courbure sont les plus courts (c'est-à-dire au niveau des pointes) [27, 28]. Les nanoparticules métalliques se comportent comme des antennes à l'échelle nanométrique [29, 30]. Par exemple, la présence d'une protubérance en pointe sur une sphère (schéma 3) augmente de 5 à 6 ordres de grandeur (pour le cas d'une pointe formant un angle de 60°) l'exaltation calculée par rapport au cas d'une bille parfaite. Le facteur lié à la géométrie "en pointe" est aussi plus important que celui obtenu pour une protubérance semi-sphérique (Figure 1).

Corni et Tomasi, en particulier, ont développé un modèle [31], dans lequel ils mettent en évidence l'importance du nombre de particules composant la structure métallique, mais aussi celle du site d'adsorption de la molécule dont on étudie la diffusion Raman. L'exaltation

électromagnétique calculée pour une chaîne de sphères d'argent augmente avec le nombre de sphères. "Topologiquement", l'exaltation la plus importante est obtenue pour une adsorption de la molécule le long de l'axe de la chaîne et plus particulièrement dans l'interstice entre deux sphères ; de plus, dans le cas de chaînes d'au moins 5 particules élémentaires, la jonction pour laquelle l'exaltation est maximale se situe a priori au centre de la chaîne, plutôt qu'au niveau des extrémités [32]. Dans le cas de la structure fractale, constituée d'un nombre beaucoup plus important de particules, une troisième échelle spatiale est considérée : la structure globale, décrite comme un ensemble de dipôles couplés [33]. Dans ce cas, les calculs de l'exaltation électromagnétique attendue, font à nouveau apparaître que la probabilité de présence de points chauds sur la structure, ainsi que l'amplitude de l'exaltation, augmentent avec le nombre de sphères considérées (de 50 à 1000), pour atteindre des facteurs d'exaltation allant de 10^{10} à 10^{13} en fonction du rayon des particules élémentaires ($r=5-20\text{nm}$). Dans ces facteurs d'exaltation électromagnétiques, les auteurs montrent que la contribution la plus importante est liée à la structure locale du point chaud, qui participe pour presque 9 ordres de grandeur à l'exaltation totale. Il faut aussi noter qu'aux longueurs d'onde d'excitation utilisées pour les calculs (607-799nm), la présence de solvant ne modifie que très peu le comportement exaltant des agrégats d'argent, contrairement aux structures d'or dont le facteur d'exaltation en présence de méthanol est 10 fois supérieur à celui obtenu dans le vide.

Quelques exemples de substrats SERS :

Des électrodes d'argent utilisées initialement, nous sommes arrivés à l'emploi d'une gamme beaucoup plus large de substrats. Sont utilisés des agrégats métalliques de formes, tailles, et degré d'agrégation différents en solution ou déposés, des nanocristaux, mais aussi des films minces obtenus par des procédés électrochimiques classiques ou par CVD (Chemical Vapor Deposition), ou des surfaces métalliques nanostructurées par lithographie colloïdale ou encore par faisceau d'électron (Figure 2).

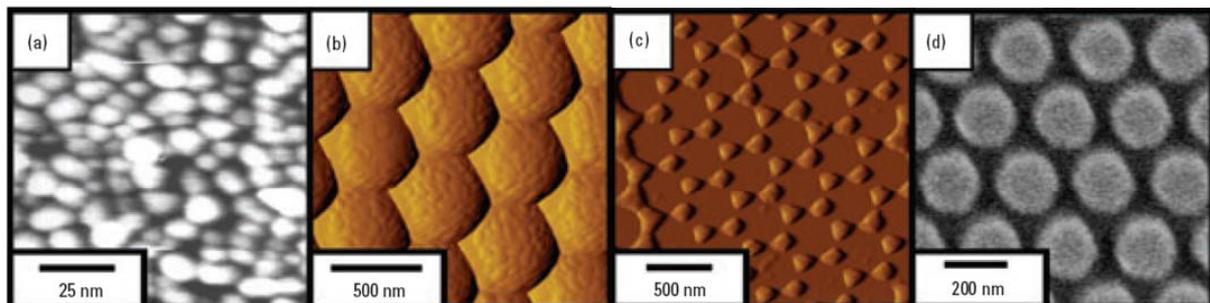


Figure 2. Quelques exemples de la littérature de substrats SERS : film d'îlots métalliques, (b) film métallique sur nanosphères, (c) réseau triangulaire de nanoparticules fabriqué par lithographie colloïdale, et (d) réseau cylindrique de nanoparticules fabriqué par lithographie par faisceau d'électrons [24, 34, 35].

La conception de structures nanométriques qui permettraient de contrôler la position de ces points « chauds » est au cœur de nombreuses recherches aussi bien théoriques qu'expérimentales [36-37]. Comme nous l'avons vu précédemment, certaines de ces propriétés n'apparaissent qu'avec des arrangements très précis tels que des dimères ayant une distance inter-particule inférieure à 2 nm par exemple [38-39]. La lithographie colloïdale [40-43] est actuellement l'une des techniques les plus fiables et reproductibles utilisée pour fabriquer des substrats avec des points « chauds » contrôlés [44]. Cependant, en pratique, pour générer ces substrats des étapes technologiques onéreuses sont nécessaires. Alternativement,

un procédé d'assemblage colloïdal guidé a été développé pour créer des motifs colloïdaux. Par exemple, Hyun et al. ont utilisé la nature réversible du flambage pour fabriquer des lignes de colloïdes sur une surface plane [45]. Cette méthode peut être utilisée avec tout type de particule colloïdale mais n'a pas démontré son efficacité pour créer des réseaux de particules uniques. Maury et al. ont structuré des monocouches auto-assemblées par nanoimprint mais les motifs ainsi obtenus sont difficiles à contrôler [46]. Xia et al. ont, quant à eux, combiné le démouillage des dispersions colloïdales sur un substrat recouvert d'une couche de résine photosensible structurée, aux forces capillaires et au confinement géométrique pour assembler des colloïdes selon des arrangements de forme, structure et taille parfaitement définies. Néanmoins, si l'on veut construire des échafaudages de complexité accrue à partir de ces substrats, la résine doit être éliminée et cette étape supplémentaire n'est pas toujours souhaitable selon l'objet ou l'application envisagée [47]. Yan et al. ont généré des réseaux de nanoparticules très bien définis mais là encore les étapes technologiques requises telles que la lithographie par faisceau électronique ou le lift-off sont lourdes et onéreuses [48].

IV. A. 5. Questions ouvertes et positionnement de notre travail

Nous avons donc vu que les nanocristaux métalliques possèdent des propriétés remarquables en raison des résonances plasmon de surface localisé qui peuvent induire une exaltation très intense du champ électromagnétique local. Cet effet d'exaltation n'apparaît qu'en présence d'arrangements et de géométries précis des structures exaltantes (agrégats de plusieurs particules, présence de protubérances, arêtes, interstices). La conception de structures nanométriques qui permettraient de contrôler la position de ces points « chauds » est au cœur de nombreuses recherches théoriques et expérimentales.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, l'assemblage par forces capillaires a déjà démontré ses potentialités pour créer des assemblages de nanoparticules d'or avec la résolution de la particule unique [49-51]. Ainsi, dans cette section, nous justifions comment la combinaison de la lithographie douce et de l'assemblage capillaire peut être utilisée pour générer des points « chauds » électromagnétiques contrôlés et disposés de façon régulière et ordonnée sur une large étendue (10^8 points « chauds » par cm^2) de façon directe et à bas-coût.

Dans un premier temps, nos objectifs seront de mettre en évidence la présence de points d'exaltation régulièrement ordonnés puis les effets de polarisation de la lumière. Nous évaluerons alors le facteur d'exaltation puis sa corrélation à l'arrangement local des nanoparticules. Dans un second temps, nous vérifierons la « canonicité » du spectre de la sonde Raman sur ces sites ainsi que sa reproductibilité et sa stabilité dans le temps.

V. Assemblage de nanoparticules induit par des structures topographiques.

V. A. Protocole expérimental

Pour cette étude nous avons utilisé des nanoparticules d'or de 100 nm de diamètre (BBI international) à une concentration de $5,6 \cdot 10^9$ particules/mL. Les nanoparticules d'or de 100 nm de diamètre sont enrobées de ligands citrate de façon à assurer leur stabilité en solution dans de l'eau DI. Les nanoparticules sont donc chargées négativement. La dispersion en taille de ces particules d'or de 100 nm de diamètre donnée par le fabricant est inférieure à 8%. Statistiquement, on peut donc avoir dans la solution commerciale des nanoparticules ayant des dimensions ou des géométries légèrement variables (cas de nanoparticules facettées).

Pour l'assemblage de nanoparticules métalliques, nous avons adopté la stratégie présentée dans le chapitre 2 combinant le microcontact printing et l'assemblage capillaire dirigé. Le moule utilisé a été spécialement conçu pour cette application. Il comporte 20 matrices (100 μm x 100 μm) de carrés de 140, 200, 250, 300 et 370 nm de côté avec des périodes de 1,5, 2, 3, et 5 μm . Pour cette étude en particulier nous avons choisi intentionnellement des cavités plus larges que le diamètre des particules de façon à prendre en compte leur dispersion en taille d'une part, mais également de façon à obtenir un échantillonnage de conformations et de tailles d'agrégats de nanoparticules pour en étudier leur propriétés optiques. Nous avons choisi une profondeur des cavités de 120 nm, comparable au diamètre des particules, de façon à obtenir des arrangements bidimensionnels et pour qu'ils puissent être facilement transférés par la suite.

La technique d'assemblage capillaire que nous utilisons offre la possibilité de diriger l'assemblage des nanoparticules. En d'autres termes, elle permet d'isoler un nombre donné de nanoparticules à partir d'une solution complexe et de les positionner de façon précise sur un substrat. Cet encrage de haute précision est effectué en utilisant le dispositif expérimental d'assemblage capillaire décrit dans le chapitre 2 basé sur le confinement des particules induit par le déplacement de la ligne de contact sur un substrat topographique.

Ici, le timbre nanostructuré sur lequel on souhaite assembler les nanoparticules d'or est placé sur une platine en translation sous une spatule de verre fixe. Entre les deux on place une goutte de 30 μl de solution de nanoparticules d'or en suspension. La ligne de contact du liquide est ensuite déplacée à une vitesse constante de 1 $\mu\text{m}/\text{sec}$. En effet, dans le cas de colloïdes de taille nanométrique, la clé de l'assemblage est de minimiser la déformation de la ligne de contact et de réduire sa vitesse de déplacement. La température du timbre nanostructuré a été fixée à 27°C. Dans de nombreux travaux, les particules nanométriques sont transférées sur une surface d'accueil préalablement recouverte d'une couche de résine par impression [51]. Cette résine sert en quelque sorte de « colle » pour que le transfert des particules ait lieu du timbre vers la surface d'accueil. Cependant, cette résine doit ensuite être retirée par plasma ou par dissolution dans un solvant, et cette étape peut être critique suivant la nature des particules et le type d'application. Ici, pour transférer les réseaux de nanoparticules ainsi assemblées sur une surface solide d'accueil, nous avons mis en place un protocole alternatif. Une goutte d'éthanol ou d'eau déionisée est placée sur cette surface (silicium ou lamelle de verre) préalablement fonctionnalisée avec une couche moléculaire

d'APTES. Le timbre avec les nanoparticules assemblées est ensuite mis en contact avec cette surface et l'ensemble est placé dans une étuve à 110°C pendant 20 minutes minimum jusqu'à évaporation du solvant (éthanol ou eau DI). Le timbre est finalement retiré (schéma 4). Nous avons baptisé cette méthode le « nanocontact printing » assisté par un solvant [52].

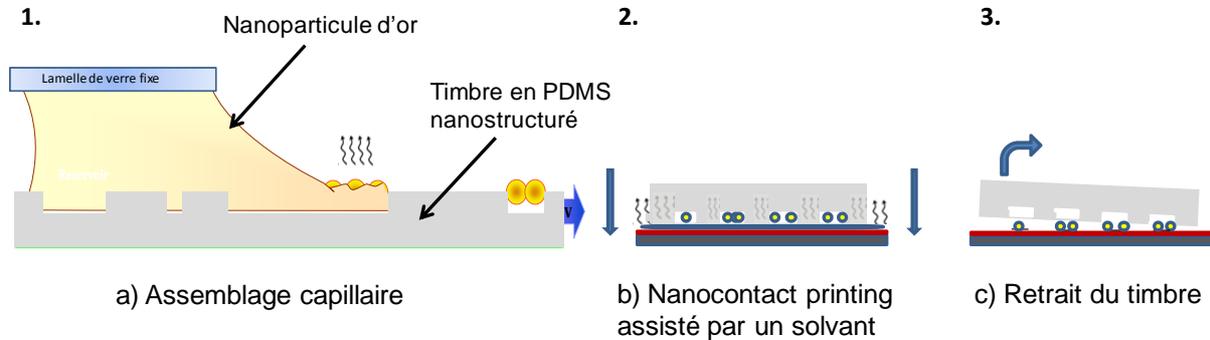


Schéma 4. Représentation schématique du nanocontact printing assisté par un solvant après assemblage dirigé. a) Les nanoparticules en solution sont assemblées par assemblage capillaire sur un timbre nanostructuré. b) Après assemblage, le timbre avec les nanoparticules assemblées est mis en contact via un film mince de solvant (éthanol ou eau) avec la surface d'accueil préalablement fonctionnalisée avec de l'APTES. c) L'ensemble est placé dans une étuve à 110°C puis après évaporation du solvant, le timbre est finalement retiré.

Nous avons observé que tous les solvants ne sont pas adaptés au transfert. Des solvants tels que le toluène, l'hexane, ou le trichloroéthylène induisent une déformation beaucoup trop conséquente et irréversible du timbre. L'éthanol est un solvant qui, comparé à l'éthyl acétate par exemple, ne provoque une déformation du timbre que de 6,3% en volume. Pourtant, même si l'isopropanol fait partie de la même catégorie de solvants que l'éthanol, le transfert en présence d'isopropanol s'effectue pas ou beaucoup moins bien. Ainsi nous pensons que plusieurs mécanismes sont impliqués dans ce processus de transfert dynamique. D'une part un solvant est rarement un milieu inerte par rapport à une réaction se produisant en son sein. En effet, il participe souvent activement et peut avoir une influence sur la vitesse ou le mécanisme-même d'une réaction donnée. Un solvant crée un milieu homogène où les réactifs peuvent être en contact. La présence d'un solvant peut faciliter la création d'ions intermédiaires et réactifs en exerçant un pouvoir ionisant ou dispersif. L'éthanol et l'eau sont tous deux des solvants protiques qui solvatent les anions : il est possible qu'ils jouent un rôle et favorisent l'accroche électrostatique se produisant entre les molécules d'APTES et les ligands citrate des nanoparticules. D'un autre côté, nous avons observé que plus le solvant est évaporé (temps plus longs et températures plus élevées dans l'étuve), plus le transfert est efficace. Ainsi, pendant le contact du timbre avec la surface, *via* le liquide, le processus d'évaporation conduit certainement à la création de forces capillaires qui dirigent les nanoparticules piégées dans les cavités vers la surface mouillée. Ainsi, le processus de chauffage facilite peut-être la libération des nanoparticules. Cependant, il est difficile de discriminer laquelle de ces hypothèses est prépondérante (le mouillage ou le séchage) pendant le transfert.

Ce qui est sûr est que cette technique est efficace et peut être utilisée avec des nanoparticules de toutes tailles, formes, ou un mélange des deux, de façon parallèle et sans nécessité d'étapes lourdes supplémentaires.

V. B. Résultats du nanocontact printing assisté par solvant après assemblage capillaire

Les figures 3 et 4 montrent les résultats obtenus après assemblage dirigé de la solution colloïdale de nanoparticules d'or sur un timbre nanostructuré puis transfert de l'assemblage sur une surface de silicium traitée APTES après évaporation du solvant. Les images champ sombre (figure 3) montrent que l'assemblage effectué sur toute l'étendue du timbre (1cm²) est transféré dans sa totalité sur la surface avec une très bonne fidélité (97 %). Aucune nanoparticule ne reste sur le timbre après transfert : toutes les cavités du timbre sont vides et ce, quelle que soit la taille des cavités. On peut donc dire que le taux de transfert est indépendant de la taille des motifs.

L'image MEB A de la figure 4 correspond au témoin de l'expérience. Dans ce cas, le transfert a été effectué sans l'intermédiaire d'un solvant, en d'autres termes, uniquement en réalisant un contact « à sec » entre le timbre avec nanoparticules assemblées et la surface. Nous pouvons remarquer qu'aucune nanoparticule n'est transférée dans ce cas. On observe uniquement la présence d'empreintes noires aux endroits des motifs. Compte tenu du fait que le timbre utilisé est négatif, ce contraste met en évidence que lors du contact, des résidus ou des huiles de silicone du timbre en PDMS sont transférées sur la surface. Ce phénomène a déjà été démontré dans les travaux de Thèse de Christophe Thibault au sein du groupe [53]. Les images MEB B à D de la figure 4, correspondent au substrat silicium après transfert des nanoparticules, cette fois-ci avec l'intermédiaire d'un solvant. Par comparaison directe entre les images A et B par exemple, il apparaît clairement que les particules sont présentes sur la surface uniquement dans le cas où le transfert est assisté par un solvant. Les images MEB, B à D, figure 4, montrent également que nous sommes capables de transférer des nanoparticules de plusieurs tailles (voir section extensions et applications du présent chapitre) avec des géométries irrégulières (figure 4D par exemple).

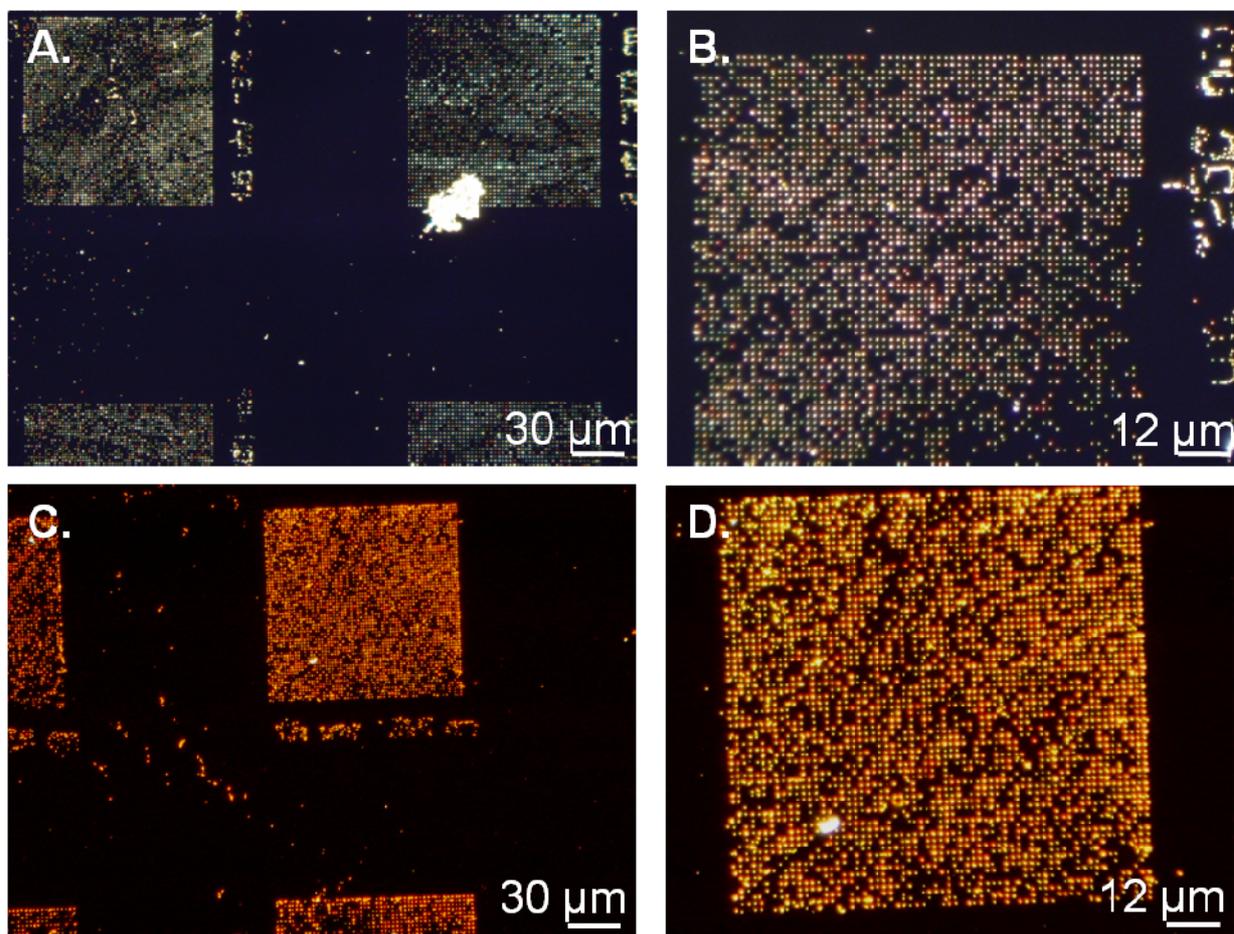


Figure 3. Images champ sombre de nanoparticules d'or de 100 nm de diamètre transférées par l'intermédiaire d'un film d'éthanol sur une lamelle de verre fonctionnalisée APTES (A-B) et par l'intermédiaire d'un film d'eau DI sur un substrat de silicium fonctionnalisé APTES (C-D).

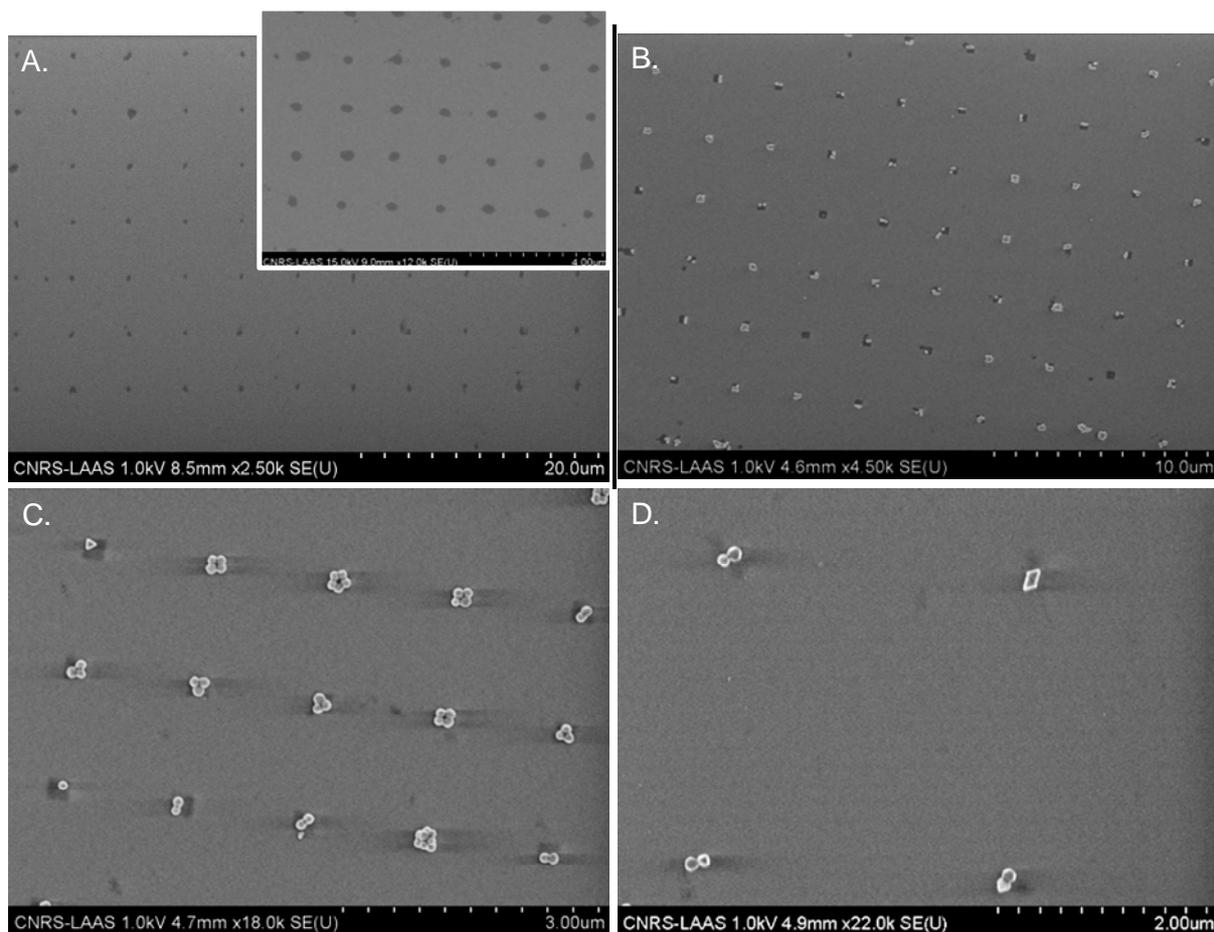


Figure 4. Images MEB d'un substrat silicium après transfert de l'assemblage de nanoparticules (B-D). (A) est le témoin de l'expérience : sans l'intermédiaire d'un film mince de solvant, les particules ne sont pas transférées. Les carrés noirs visibles sur l'image correspondent à l'empreinte du timbre après contact uniquement (zoom en haut à droite de l'image A).

Si l'on regarde plus en détail l'image en champ sombre (figure 3), nous pouvons observer que les nanoparticules assemblées semblent conserver leurs propriétés optiques. En effet, les agrégats de petite taille semblent diffuser la lumière visible de façon plus efficace dans la gamme spectrale bleue tandis que les agrégats de taille plus importante tendent à diffuser plus de lumière dans le rouge. En fait cette différence de diffusion dépend non seulement du nombre de particules mais également de leur forme et de leur arrangement spatial. Pour étudier de façon plus approfondie les propriétés optiques des particules d'or en fonction de leur nombre et de leur conformation, nous avons utilisé l'analyse spectrale de la lumière diffusée (spectre d'extinction) ainsi que la spectroscopie Raman. Pour l'étude du comportement optique des agrégats de nanoparticules, nous nous sommes concentrés sur les motifs de 200 nm et de 250 nm de côté uniquement car dans ces deux zones nous disposons d'un échantillonnage intéressant de configurations à une, deux, trois, voire 6 nanoparticules par site.

V. C. Préparation des substrats pour les mesures Raman

Pour préparer les substrats SERS, la concentration de l'espèce à caractériser doit être suffisamment faible. Dans la littérature, on utilise fréquemment des concentrations micromolaires ou nanomolaires qui permettent d'augmenter la probabilité de détection des molécules tout en restant dans un mode où les molécules sont suffisamment dispersées pour permettre d'avoir au un petit nombre de molécules sur chacun des agrégats. Au cours de cette étude, nous avons préparé les échantillons en incubant les substrats précédemment présentés composés de réseaux de nanoparticules avec une solution de rhodamine 6G (10^{-6} mol/l dans l'éthanol), sonde Raman de référence utilisée fréquemment dans la littérature (figure 5). L'échantillon a été ensuite laissé sécher à l'atmosphère ambiante.

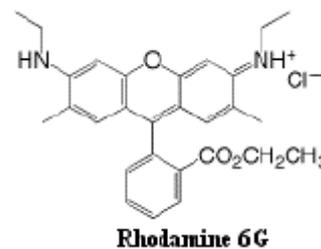


Figure 5. Structure chimique de la Rhodamine 6G.

V. D. Dispositif expérimental

Ces expériences ont été réalisées au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) à Toulouse en collaboration avec le Dr. Gábor Molnár.

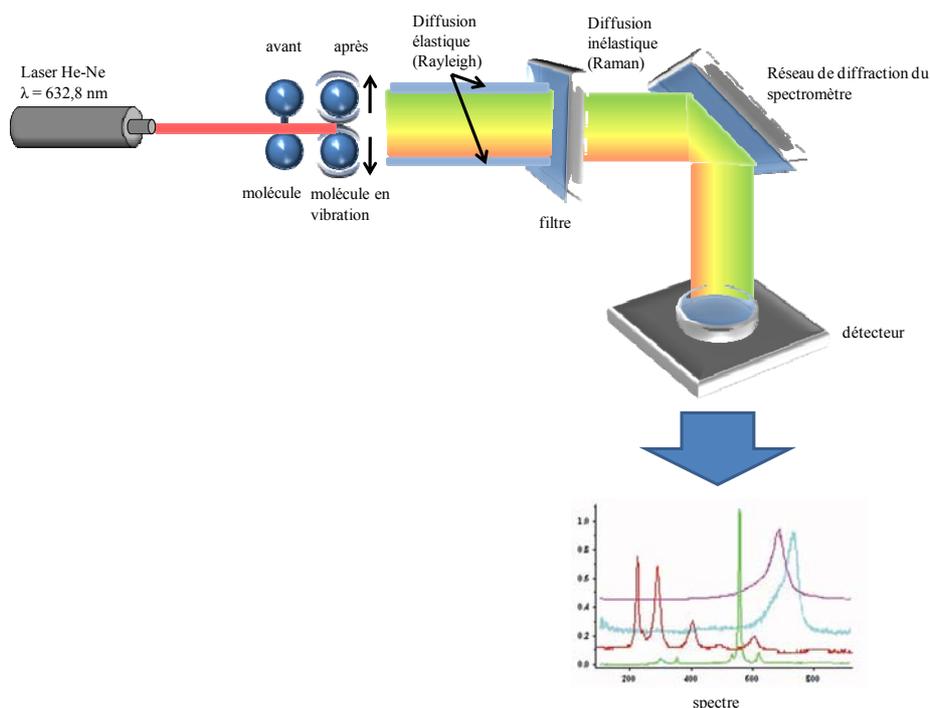


Schéma 5. Représentation schématique d'un montage de spectrométrie Raman.

Les spectres Raman ont été enregistrés sur une fenêtre spectrale allant de 600 à 1700 cm^{-1} grâce à un spectromètre Jobin Yvon Labram HR800 équipé d'un microscope optique Olympus BXFM. L'excitation est obtenue à partir d'un laser Hélium-Néon (He-Ne) 3 mW utilisé au cours de cette étude en mode monoraie dans le rouge à 632,8 nm. Avant d'atteindre la partie microscope, le faisceau laser est filtré grâce à un filtre d'excitation à bande étroite de type interférentiel. Le faisceau laser est polarisé rectilignement. Le faisceau est focalisé sur l'échantillon *via* un objectif x100 (ouverture numérique NA=0.9). La puissance laser qui frappe l'échantillon est atténuée par des filtres neutres appropriés et fixée à 30 μW pour une taille de spot mesurée de 0,5 μm de diamètre.

Comme on utilise un faisceau focalisé, le montage comporte aussi un système de balayage qui permet d'effectuer une image point par point et de reconstituer une véritable cartographie de l'échantillon. Le signal issu de l'échantillon est collecté en configuration de rétrodiffusion, c'est-à-dire que le signal diffusé par l'échantillon est collecté par le même objectif que celui utilisé pour l'excitation. Le signal suit ensuite le même parcours qu'à l'aller, traverse la lame séparatrice avant d'arriver au filtre de détection qui est utilisé pour couper le signal de diffusion élastique (Rayleigh). Il s'agit ici d'un filtre notch (filtre holographique) qui réfléchit uniquement les longueurs d'onde situées dans une fenêtre étroite autour d'une longueur d'onde donnée.

Le signal est ensuite aiguillé vers un spectromètre (focale 800 mm) dans lequel le signal est envoyé, après dispersion sur un réseau, vers une caméra CCD 1024*256 pixels refroidie à -70°C thermoélectriquement. Sur ce spectromètre est monté un réseau à 600 fentes par mm conduisant à une résolution spectrale de 4 cm^{-1} (schéma 5). Tous les spectres ont été calibrés par rapport à la raie Raman du silicium pur à 520,7 cm^{-1} . Chaque mesure a été effectuée à l'ambiante, et a été accumulée deux fois avec un temps d'acquisition d'une seconde.

En choisissant comme détecteur le spectromètre on enregistre un spectre complet en chaque pixel de l'image. On effectue alors une image hyperspectrale qui contient une grande richesse d'informations et permet d'effectuer une véritable cartographie chimique de l'échantillon.

On peut aussi réaliser des traitements sur cette image, en extrayant uniquement par exemple l'intensité relative à une gamme restreinte de fréquences, correspondant à la bande de vibration caractéristique d'une espèce chimique donnée. L'image fille obtenue fait alors ressortir la localisation de cette espèce sur l'échantillon. Ce type d'analyse se révèle très utile, en particulier dans le cas de l'étude d'échantillons hétérogènes.

De plus en maintenant la position d'excitation fixe, il est possible d'enregistrer l'évolution du spectre Raman au cours du temps. On parle alors de chronospectres. Cette option expérimentale est **vitale** pour discerner parmi toutes les raies spectrales celles qui évoluent dans le temps de celles qui demeurent constantes.

Pour obtenir la signature spectrale des résonances plasmon des zones assemblées, nous avons utilisé un tout autre montage. Le montage optique est couplé à un microscope optique droit avec un objectif x100. L'excitation a été obtenue à partir d'une source Halogène. Pour faire ressortir le signal plasmonique par rapport au bruit de fond, nous avons réalisé les mesures spectrales en mode rétrodiffusion et champ sombre. En mode champ sombre, les zones non structurées apparaissent noires, et les zones structurées avec des nanoparticules apparaissent brillantes. Le spectre de diffusion a été obtenu sur une fenêtre spectrale allant de 400 à 700 nm. Pour minimiser les effets de la source Halogène et du détecteur, nous avons corrigé les spectres avec le spectre du bruit de fond obtenu en mode champ clair à partir d'une lame recouverte de Téflon.

VI. Comportement optique.

VI. A. La résonance plasmon en solution

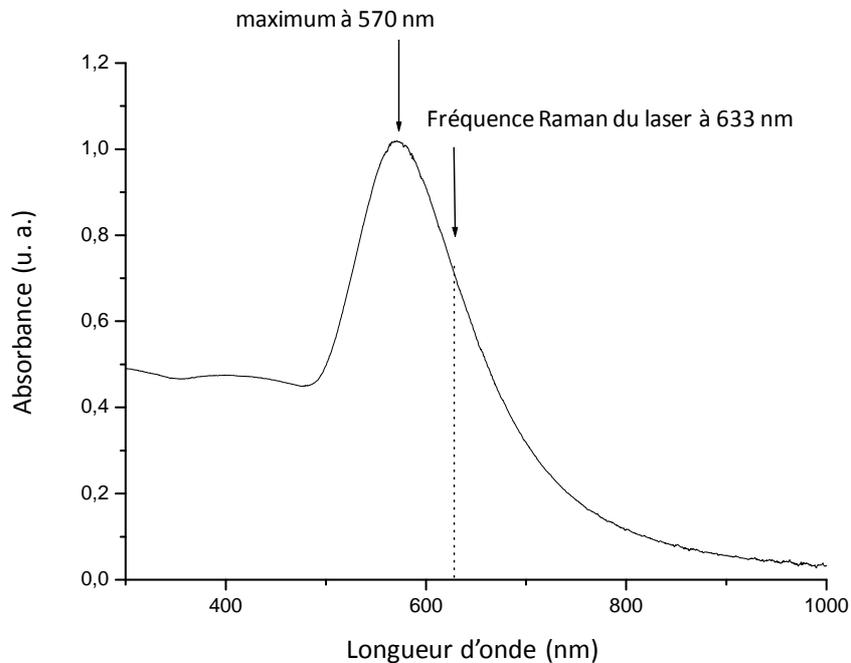


Figure 6. Mesure d'absorbance de la solution commerciale de nanoparticules d'or de 100 nm de diamètre (expérience réalisée en solution).

Nous avons tout d'abord réalisé une mesure d'absorbance de la suspension de nanoparticules d'or commerciale utilisée à l'aide d'un spectrophotomètre Cary50 (figure 6). Comme le montre cette figure, nous avons trouvé une large bande d'absorption centrée autour de 570 nm. Nous attribuons cette bande à l'excitation des résonances plasmoniques des nanoparticules. Nous avons reporté sur l'image la longueur d'onde d'excitation utilisée pour les expériences de Raman : elle est comprise dans la bande SPR donc même si nous ne pouvons pas parler de spectroscopie Raman résonante, la longueur d'onde utilisée permet l'excitation efficace des modes plasmons des nanoparticules utilisées.

VI. B. La résonance plasmon sur les sites

Caractéristiques optiques de la résonance plasmonique

Pour caractériser ensuite la résonance des agrégats de nanoparticules de nos substrats, nous avons réalisé des mesures de rétrodiffusion en mode champ sombre du même échantillon actif optiquement.

Dans le cas des particules de très petite taille ($D \leq \lambda/10$ ie $D \leq 50\text{nm}$), l'extinction de l'onde lumineuse incidente est dominée par l'absorption [54]. En revanche, pour des particules plus grandes, la diffusion est plus importante et domine l'extinction [10] ; c'est ce dernier cas de figure qui s'applique ici dans le cas de particules de 100 nm de diamètre. Dans notre cas, les sites, composés d'arrangements de nanoparticules de 100 nm, sont donc hautement diffusifs.

La figure 7 montre les images optiques champ sombre prises sur la zone d'étude du substrat. Nous avons caractérisé cette même zone au microscope électronique à balayage pour collecter des informations quant à la morphologie de chacun des motifs de nanoparticules. La légende à droite de l'image renseigne sur la morphologie et le nombre de nanoparticules à chaque motif. Cette légende se reporte à l'image et identifie chaque motif au travers d'un cercle d'une couleur donnée.

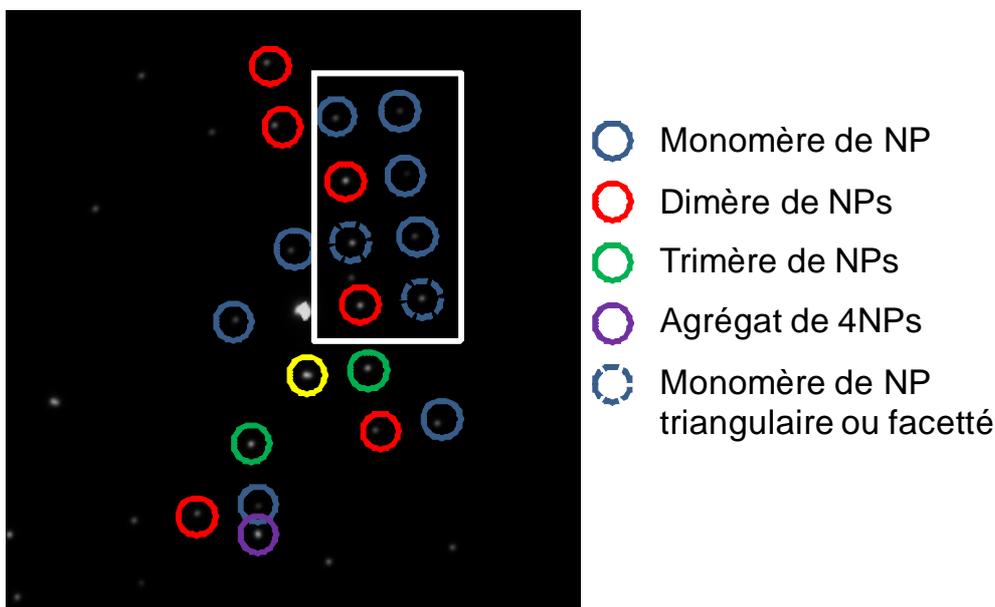


Figure 7. Image champ sombre du substrat de nanoparticules assemblées. L'encart correspond à la zone d'étude (réseau motifs 200 nm, période 5 μm).

Le premier point que l'on observe à partir de ces images champ sombre est que les dimères et agrégats de plus de deux nanoparticules diffusent plus efficacement la lumière. Le deuxième point que cette image met en évidence est que lorsque la nanoparticule est facettée, la diffusion est plus importante également.

On peut ajouter que les intensités sont comparables en optique lorsque les agrégats ont la même taille (d'un monomère à un autre monomère par exemple).

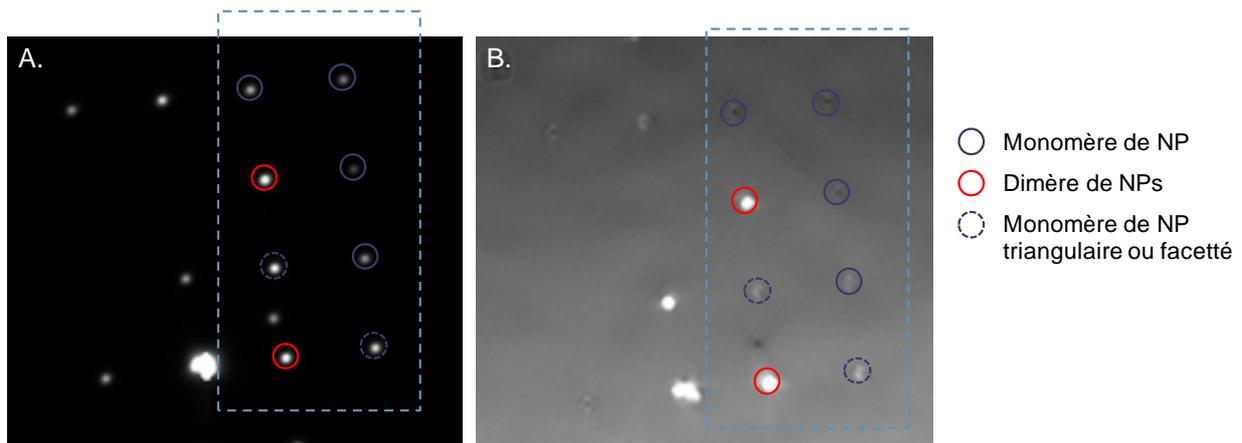


Figure 8. Comparaison de deux images optiques champ sombre de la même zone d'étude : l'une prise avec polariseur parallèle (A), l'autre avec polariseur croisé (B).

Enfin, lorsqu'on réalise l'observation en polariseur croisé, il apparaît que seuls les dimères et les monomères facettés restent brillants alors que les monomères s'éteignent (figure 8). La lumière diffusée est polarisée le long de l'axe des dimères.

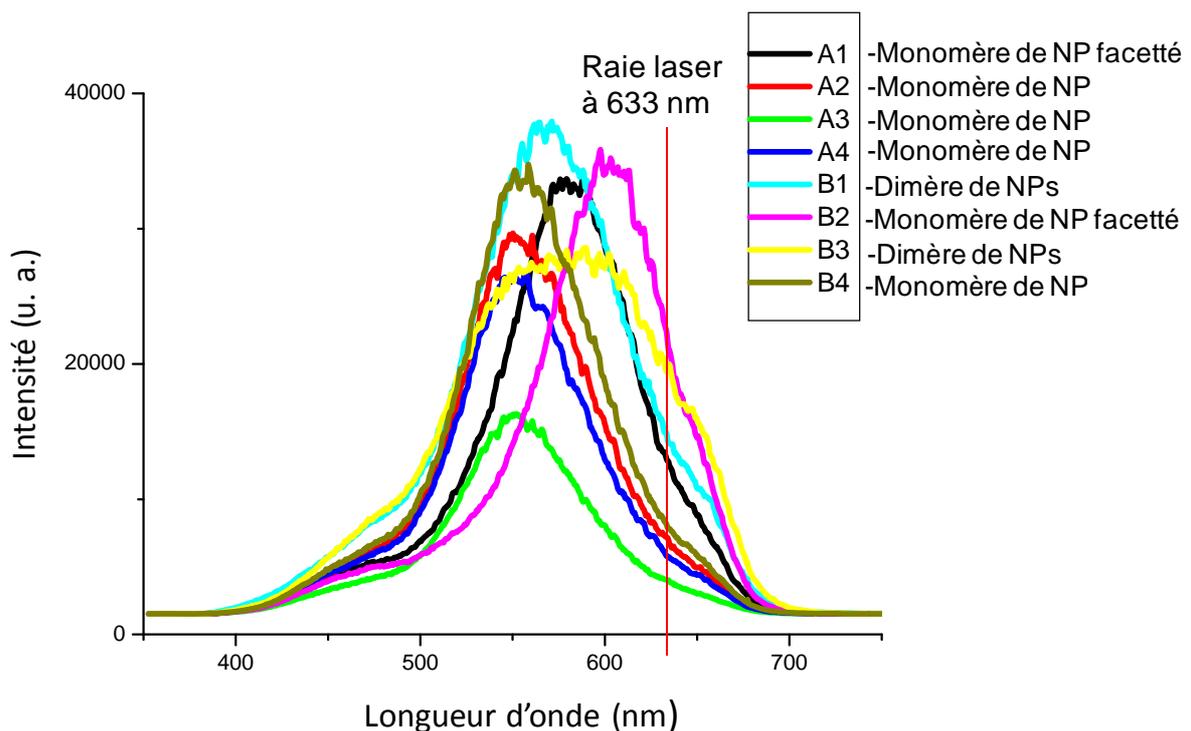


Figure 9. Spectres de diffusion des différents agrégats de la zone d'étude.

Sur la figure 9, nous présentons l'analyse spectrale de la lumière diffusée sur la zone d'étude (encadrée sur les images optiques) en utilisant le montage en mode champ sombre et en rétrodiffusion : les différents pics observés sont la signature de la résonance plasmonique dont la position spectrale et la largeur varient en fonction de l'arrangement des différents agrégats. Le montage expérimental utilisé nous permet d'acquérir un spectre pour chaque agrégat individuel (la période du réseau imprimé est plus grande que le diamètre du faisceau laser).

Ainsi, il est possible d'observer la réponse optique individuelle de chaque site, sans effet de moyenne. Le couplage avec l'imagerie MEB permet par la suite d'identifier la configuration exacte des nanoparticules ayant généré cette réponse optique. Sur silicium pur on mesure une intensité de 2000 a.u. attribuée au courant d'obscurité du CCD essentiellement, alors que sur des sites de nanoparticules, les intensités mesurées s'échelonnent de 30 000 a.u. à 40 000 a.u. Ces mesures confirment ce que l'on observe en optique : les nanoparticules sont bien hautement diffusives. Les mesures de résonance plasmon des agrégats d'un site à l'autre illustrent des différences inter-sites ; les signatures plasmoniques diffèrent en raison du bruit de la mesure mais surtout à cause des variations de géométrie et de morphologie des sites. Les résonances plasmoniques pour des monomères ou des dimères se situent entre 540 et 615 nm. Les résonances des monomères sont en accord avec la mesure effectuée à partir de la solution commerciale située autour de 570 nm (figure 6). Les résonances plasmoniques des dimères ou des monomères facettés sont globalement décalées vers le rouge par rapport à cette même référence (de 20 nm à 70 nm). Ce décalage est dû à la morphologie des nanoparticules (de par leur dispersion en taille lors de la fabrication) dans le cas des monomères, ajoutée à un effet de couplage dans le cas des dimères.

Lorsque les nanoparticules métalliques forment des agrégats, on observe un élargissement de leur spectre d'absorption (spectre dimère B2 figure 9 par exemple). Dans le cas simple du dimère de particules, la résonance plasmon se sépare en deux résonances d'énergies différentes, chacune correspondant à l'excitation du plasmon suivant un axe différent du dimère (parallèle ou normal à l'axe formé par la paire de particules). Le dimère de particule forme alors un système anisotrope, dont l'excitation est sensible à la polarisation du champ incident. Dans le cas le plus général, *i.e.*, pour une assemblée de dimères de particules caractérisés par une certaine distribution de distances interparticulaires, cette interaction se traduit par un élargissement de la résonance plasmon globale [55]. Par analogie avec le système simple du dimère de particules, on peut considérer cette large résonance comme la superposition d'un grand nombre de résonances locales, chacune caractérisée par une énergie et un axe préférentiel d'excitation.

De plus, nous pouvons observer que les intensités sont variables d'un monomère à l'autre ou d'un dimère à l'autre. Par contre, lorsqu'on prend une mesure sur un même site à quelques secondes ou minutes d'intervalle, on retrouve exactement le même spectre. Les spectres sont donc reproductibles : on retrouve le même profil spectral (même intensité, et surtout même décalage spectral). En outre, il est à noter que nous avons refait exactement la même étude mais en utilisant cette fois-ci une source Xénon à la place de la source Halogène initiale. Là encore les spectres enregistrés sur les mêmes agrégats correspondent à ceux mesurés avec la source Halogène. Les différences d'intensité sont donc directement liées à la morphologie des nanoparticules et à des variations propres à la surface. L'interprétation serait beaucoup moins complexe bien évidemment si les nanoparticules étaient parfaitement monodisperses et toutes sphériques.

VI. C. L'effet SERS

Une fois la signature spectrale des résonances plasmon des zones assemblées identifiée, nous avons pu procéder à la caractérisation de l'échantillon par spectroscopie Raman. L'idée ici est tout d'abord de savoir si ces sites régulièrement ordonnés constituent des points d'exaltation ou « points chauds ». Pour répondre à cette première question, nous avons déposé des molécules de Rh6G à 1 μM sur notre substrat composé de réseaux de nanoparticules. Ensuite, nous avons réalisé une cartographie Raman, en mesurant le signal Raman à des intervalles réguliers, sur une zone d'un des réseaux de nanoparticules (figure 10A). La cartographie Raman qui en résulte est présentée sur la figure 10B. Malgré un temps d'acquisition court et une faible puissance laser (durée d'acquisition de 1s et puissance laser de 30 μW), nous obtenons une augmentation significative du signal Raman aux sites correspondant aux motifs de nanoparticules uniquement.

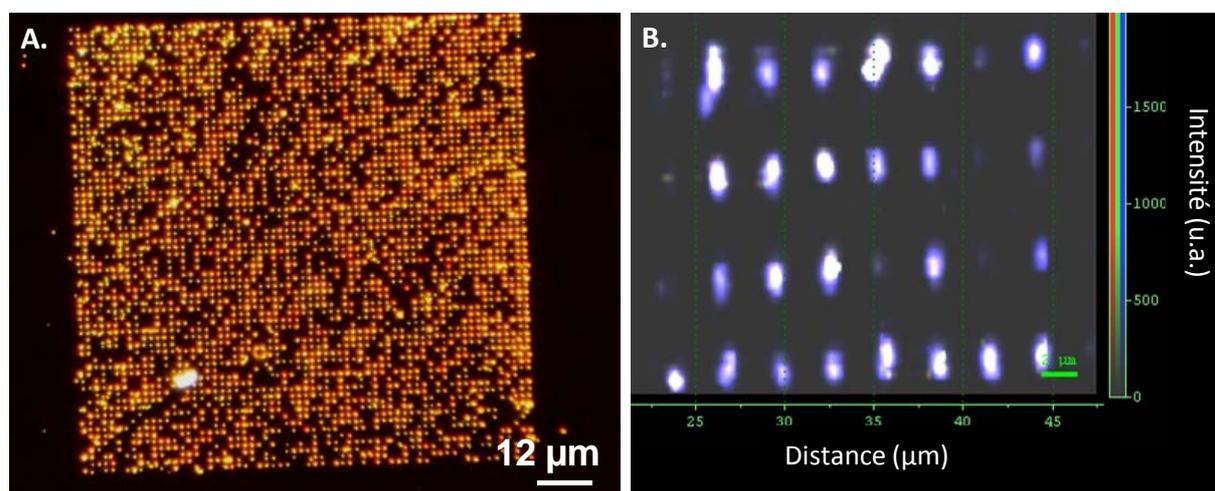


Figure 10. A. Image champ sombre du réseau de nanoparticules étudié. B. Cartographie Raman 30 μm x 30 μm effectuée sur une zone de ce réseau.

En enregistrant des spectres SERS de molécules adsorbées, nous avons détecté la présence de points chauds sur lesquels le signal de diffusion inélastique profite d'un facteur d'exaltation important. Si l'on se penche sur la cartographie Raman plus attentivement, nous pouvons remarquer que cette exaltation locale du signal Raman varie selon les motifs. Certains sites sont plus intenses que d'autres. Il est couramment admis que la morphologie du substrat exaltant est de première importance pour l'effet électromagnétique. Cette remarque est valable aussi bien pour l'effet géométrique ou effet de pointe, que pour l'effet des plasmons de surface.

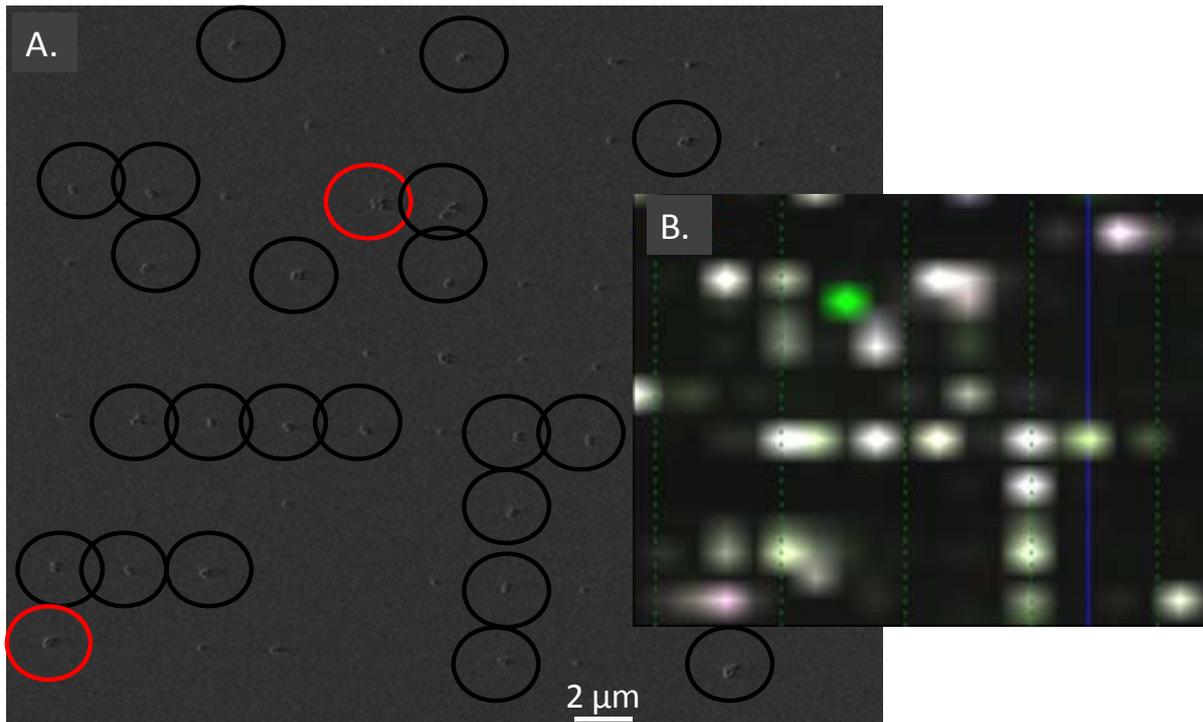


Figure 11. Confrontation entre une cartographie Raman (B) et l'image MEB de cette même zone (A).

Ainsi, la deuxième question qui s'est posée est de savoir s'il est possible de relier l'intensité des points chauds à leur morphologie et à leur taille. Pour apporter des éléments de réponse à cette question, nous avons choisi intentionnellement une concentration de nanoparticules permettant d'avoir un échantillonnage des assemblages afin de trouver quel est l'arrangement qui exalte le plus le signal Raman. La seule étude pertinente est celle qui consiste à réaliser une double caractérisation, c'est-à-dire à croiser l'information d'activité géante, obtenue par spectroscopie Raman et la morphologie de l'agrégat correspondant, comme le montre cette citation de Mikael Käll en conclusion d'un article de 2000 [26] : "High resolution imaging of "hot" single particles could resolve this issue (lien entre l'existence des points chauds et celle d'une forte rugosité de surface ou de crevasses...), and serve as critical test of electromagnetic SERS theory". Le microscope optique ne fournit pas la résolution suffisante pour détecter les détails morphologiques des particules métalliques. Ainsi, nous avons caractérisé cette même zone au microscope électronique à balayage (MEB). La confrontation directe entre les deux images, Raman et MEB, réalisée à plusieurs endroits du même échantillon et pour différents échantillons, a permis de recueillir des données importantes (figure 11).

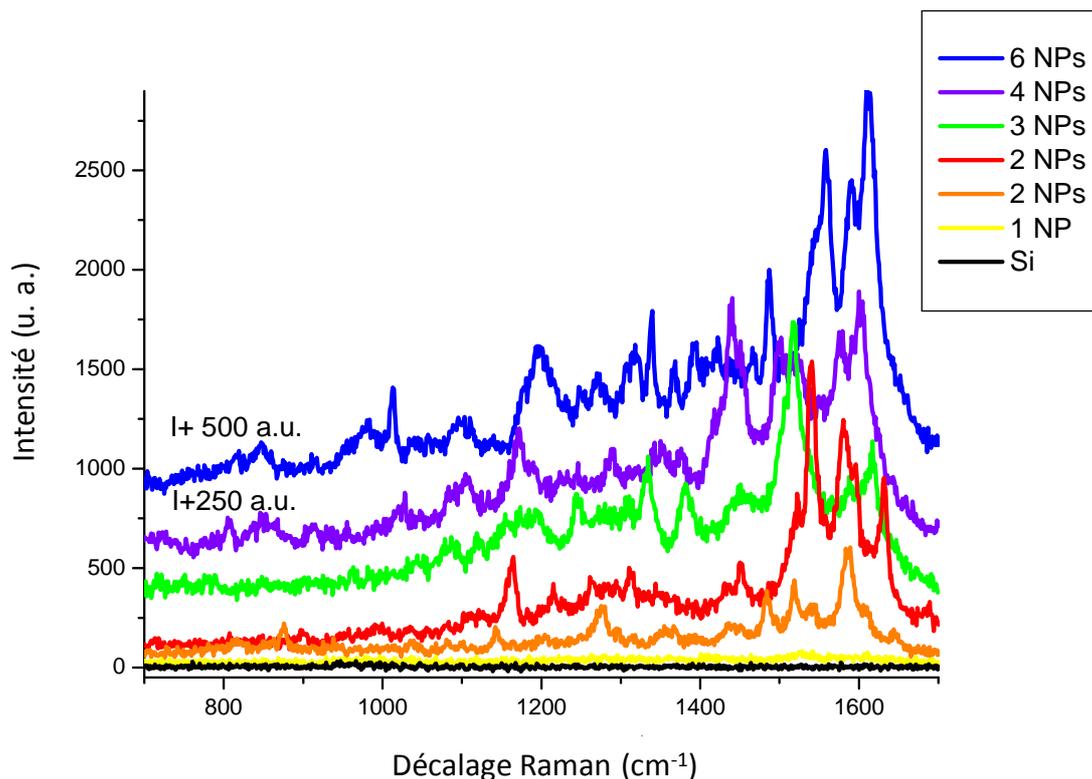


Figure 12. Spectres Raman enregistrés sur des agrégats de tailles différentes. Par souci de clarté et pour pouvoir distinguer les différentes courbes, la courbe bleue a été décalée vers le haut de 500 unités arbitraires et la courbe mauve de 250 unités arbitraires. En effet, les courbes bleue, mauve et verte sont proches l'une de l'autre.

La figure 12 montre les spectres Raman enregistrés sur des agrégats de taille et de morphologie connues par confrontation avec la caractérisation MEB. On peut observer que les exaltations les plus considérables sont provoquées par des agrégats de 3 à 6 nanoparticules. Cette exaltation est comparable à partir de 3 nanoparticules. Les dimères présentent également de fortes exaltations du signal Raman mais leur efficacité est plus variable ou en tous cas semble moins constante que pour les agrégats de plus de 3 nanoparticules. Enfin, les particules uniques provoquent des exaltations relativement faibles. Le spectre correspondant à une particule unique n'est guère plus intense que le signal mesuré sur silicium nu.

Les variations observées dans les spectres, nous conduisent à nous interroger sur l'effet de la polarisation de la lumière. En effet, en faisant varier la polarisation du faisceau excitateur dans le plan de l'échantillon, l'intensité du signal varie sachant que l'intensité maximum est obtenue pour une polarisation parallèle au dipôle de la particule.

On peut également suivre la direction du dipôle d'émission. Les composantes du signal de diffusion sont ainsi séparées dans la voie de détection par des composants optiques adaptés. On peut ainsi comparer les caractéristiques des spectres en suivant différentes orientations du champ électrique de la lumière diffusée.

Dans la présente étude, nous avons fixé la polarisation incidente du laser (maintenue verticale) et nous avons ajouté un analyseur de manière à ne laisser passer les photons diffusés que selon deux directions (soit verticale, soit horizontale). Nous avons ensuite enregistré deux cartographies, l'une avec un analyseur vertical (parallèle donc à la polarisation incidente),

l'autre avec un analyseur croisé (horizontal ou perpendiculaire à la polarisation incidente). La comparaison de ces deux cartographies démontre clairement un comportement de type interrupteur ON/OFF (figure 13). La figure 13D montre le résultat obtenu en soustrayant la cartographie obtenue avec analyseur croisé à celle obtenue avec analyseur vertical. Si nous faisons la corrélation de ce résultat avec l'image MEB correspondante de la zone considérée (figure 13A), nous pouvons voir qu'effectivement, uniquement les dimères sont sensibles à l'orientation de l'analyseur.

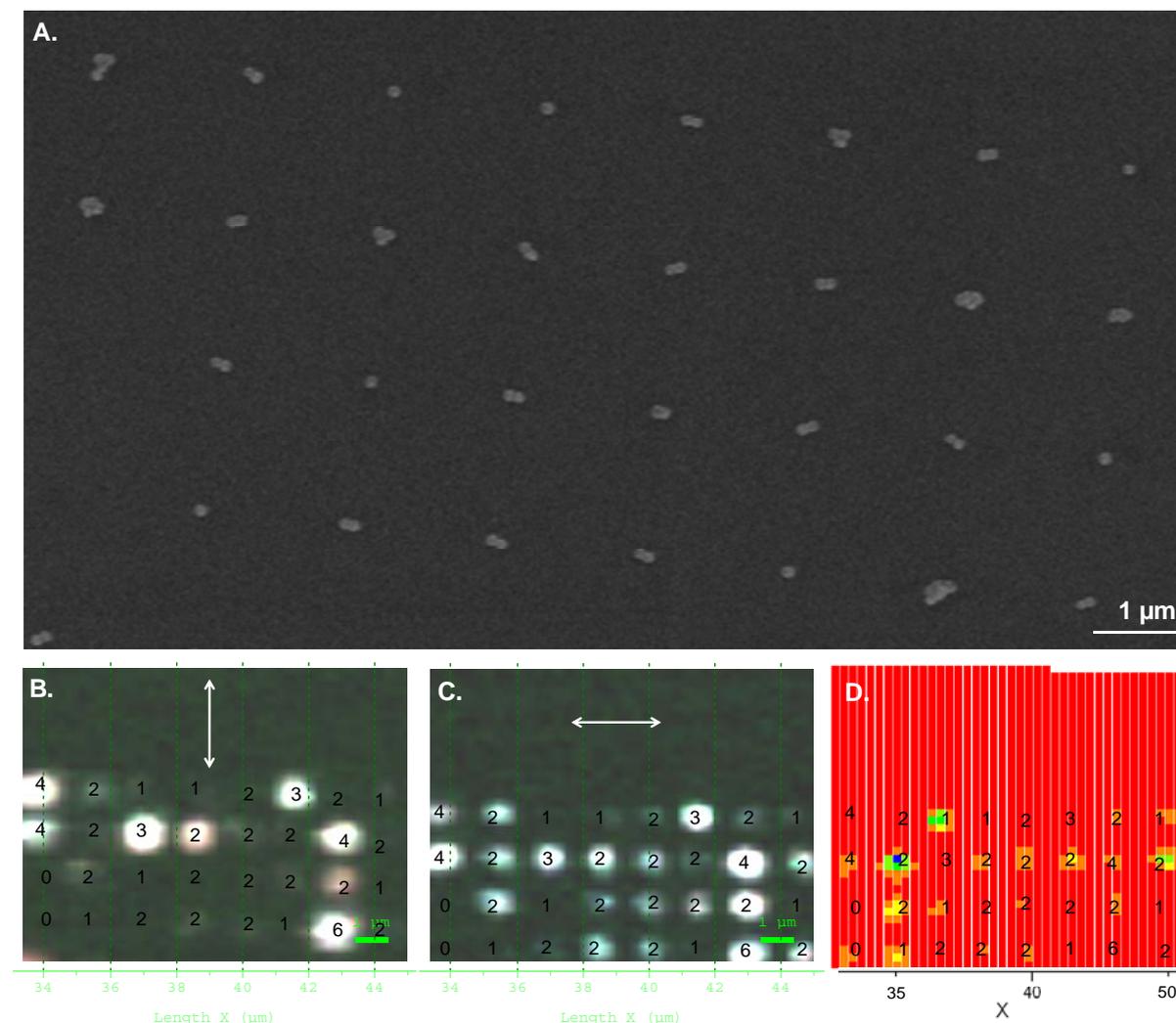


Figure 13. Etude de l'influence de la polarisation. A) Image MEB correspondant aux cartographies Raman B) et C) (motifs de 200 nm de côté et 1,5 μm de période). B) correspond à un analyseur vertical et C) correspond à un analyseur horizontal. D) Cartographie correspondant à la soustraction des cartographies B) et C) ; Les fausses couleurs représentent l'intensité du signal allant de rouge (minimum d'intensité) à vert/bleu (maximum d'intensité).

L'efficacité de notre substrat SERS est difficile à quantifier. Les calculs du facteur d'exaltation (EF) (se référer à l'équation (2)) que l'on trouve dans la littérature sont bien souvent sujets à controverse et sont irréalistes dans la plupart des cas. Dans cette étude, il est difficile d'estimer le nombre exact de molécules couvert par le spot laser. Cependant, il nous est tout de même possible d'estimer grossièrement le facteur d'exaltation pour les spectres Raman de la rhodamine 6G dans le cas optimal d'un agrégat de trois particules sans pour autant émettre des hypothèses questionnables sur la densité de surface des molécules adsorbées sur les nanoparticules.

Sur la base du facteur d'exaltation communiqué pour une nanoparticule de 100 nm unique [56] et sur le ratio des intensités Raman mesurées pour 3 nanoparticules et une nanoparticule, nous pouvons estimer que le facteur d'exaltation que nous avons dans ce cas précis est de 6×10^4 . Il est important de souligner que cette estimation s'applique au cas bien particulier de la rhodamine 6G.

Ainsi, une question importante qui se pose à présent est de savoir si quelque soit le type d'agrégat on obtient bien à chaque fois la signature spectrale caractéristique de la molécule sonde. En d'autres termes, le spectre de la molécule est-il canonique sur ces sites ? Pour répondre à cette question, nous avons collecté les spectres Raman sur plusieurs sites individuels de l'échantillon.

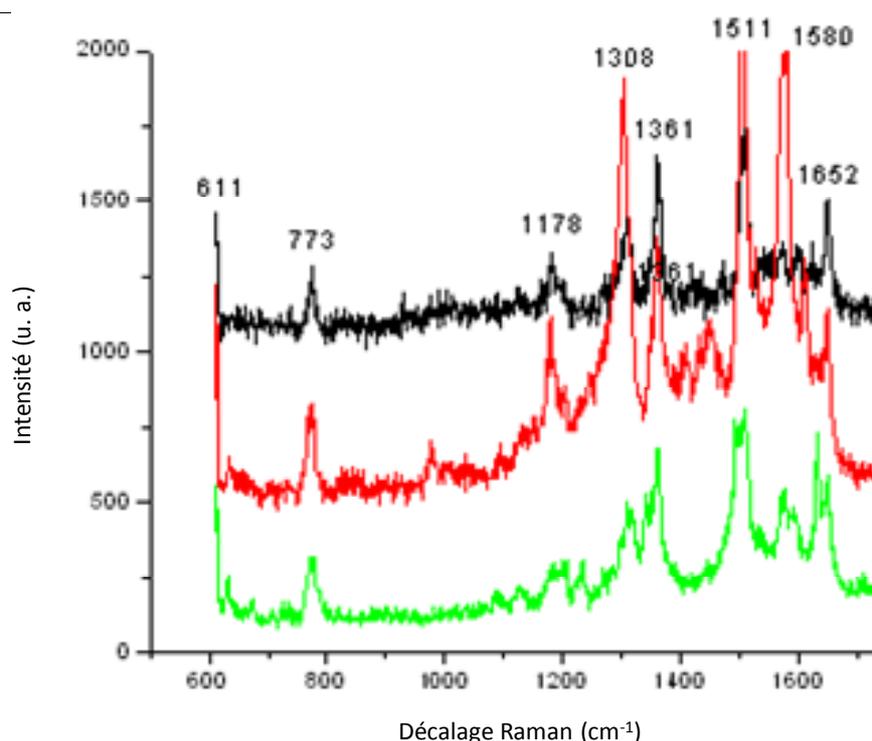


Figure 14. Spectre type obtenu de la rhodamine 6G enregistré sur un agrégat du réseau de nanoparticules. (la puissance à l'entrée de l'objectif est de $30 \mu W$).

La figure 14 montre que les spectres présentent des raies intenses bien résolues et de faible largeur à mi-hauteur. Le fond continu sur lequel émergent les bandes résolues est caractéristique des spectres Raman exaltés de surface ; il a notamment été observé dans le cas de la rhodamine 6G par de nombreux auteurs [57]. Les bandes vibrationnelles observées correspondent à la signature spectroscopique de la Rh6G.

Plus précisément, nous pouvons voir que les spectres obtenus correspondent au spectre de référence de la rhodamine 6G que l'on trouve dans la littérature avec des raies Raman intenses à 1182, 1188, 1312, 1347, 1366, 1511 et 1655 cm^{-1} en

	Références	
	Hildebrandt et al 1984	Meixner et al 2001
Elongation ν_{C-C} aromatique	1650-1652	1650
	1572-1575	1575
	1509	1509
	1363-1365	1366
Déformation dans le plan δ_{CH}	1127-1131	1137
	1181-1187	1187
Déformation hors du plan π_{CH}	773-776	776
Déformation dans le plan δ_{C-C} cycle	614	618

Tableau 1. Tableau récapitulatif des raies caractéristiques de la rhodamine 6G mesurées par Hildebrandt en 1984 et par Meixner en 2001 [58-59].

particulier [58-61].

Il est à noter que la raie à 1600 cm^{-1} correspond à la signature caractéristique de résidus organiques.

En outre, on remarque que les spectres SERS obtenus sur différents sites présentent de légers décalages spectraux les uns par rapport aux autres ($\pm 10\text{ cm}^{-1}$).

Ceci nous amène à nous pencher sur la reproductibilité et la stabilité des spectres dans le temps. Pour répondre à ce point en particulier, nous avons réalisé des chronospectres. En effet, l'enregistrement de spectres successifs permet de suivre l'évolution du spectre de la molécule au cours du temps.

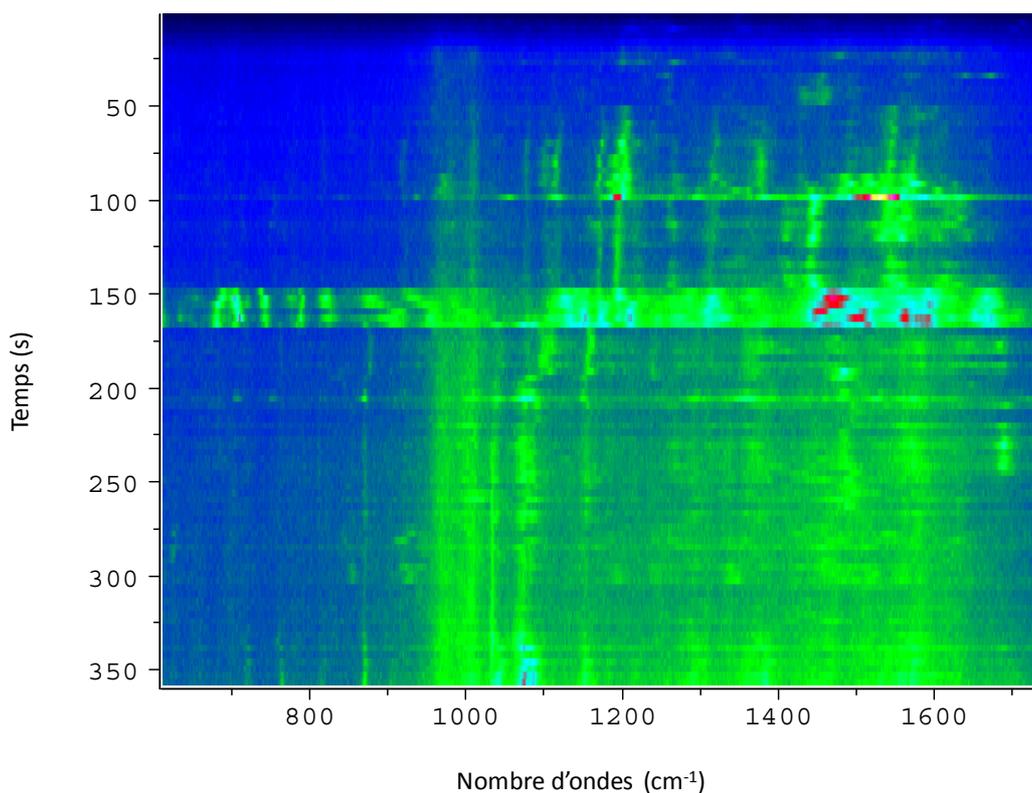


Figure 15. *Suivi temporel. Série de spectres successifs enregistrés sur un même agrégat (les fausses couleurs représentent l'intensité de signal où vert ou rouge correspondent au maximum et bleu ou noir au minimum). On observe une forte dynamique temporelle : dans les spectres successifs, les différentes bandes caractéristiques voient leurs intensités relatives, ainsi que leurs fréquences, fluctuer au cours du temps. Ceci est caractéristique d'un spectre Raman typique obtenu sur une molécule unique.*

La figure 15 montre une acquisition de spectres de rhodamine 6G pris sur le même agrégat en fonction du temps. Au début de l'acquisition, le spectre présente uniquement le profil type de la rhodamine 6G, mais au fur et à mesure que le temps progresse, le spectre change autour de $t=150\text{s}$ puis retrouve son allure initiale quelques secondes plus tard et ce jusqu'à la fin de l'acquisition (sur 360s). Les spectres préservent leurs caractéristiques de structure (nombre de bandes, intensités relatives des composantes et position) uniquement sur quelques secondes.

Nous avons donc mis en évidence que les réseaux de nanoparticules assemblées par notre méthodologie constituent des points d'exaltation ou « points chauds » du signal Raman de la

rhodamine 6G. Après une analyse statistique des données, nous avons mis en évidence que les exaltations les plus significatives sont provoquées par des agrégats de plusieurs nanoparticules (3 à 6 nanoparticules), alors que les particules uniques provoquent uniquement des exaltations relativement faibles. Au-delà de 3 nanoparticules, on atteint pour ainsi dire une sorte de saturation de l'exaltation ; cette observation rejoint celles de Yan et al. [48]. Afin d'expliquer le fait que les agrégats de 3 à 6 nanoparticules fournissent la plus grande exaltation, nous proposons l'interprétation suivante : ce phénomène pourrait être du au fait que la résonance varie en fonction de la taille de l'agrégat : plus les agrégats sont de taille importante, plus leur résonance se décale vers le rouge [62].

En effet, cette interprétation rejoint également de précédents travaux réalisés par Khan et al. [63-64]. Ainsi, étant donné que dans notre cas nous utilisons une excitation laser à 633 nm, nous sommes dans le cas de figure où l'on est plus proche de la résonance d'agrégats de taille importante donc composés de plusieurs nanoparticules ; nous favorisons donc l'exaltation de la diffusion de ce type d'agrégats plutôt que celle de particules uniques ou de petits agrégats [64]. Ceci implique que les observations auraient été différentes si l'on avait eu à disposition une autre source d'excitation. De plus, des simulations du champ électrique ont montré que les points chauds sont localisés entre les nanoparticules [65] (voir figure 16) : ceci est sans aucun doute un facteur clé pour expliquer la différence constatée entre des particules uniques et des agrégats de plusieurs nanoparticules, qui de par leur taille et conformation ont plus de chance d'être des sites « actifs ».

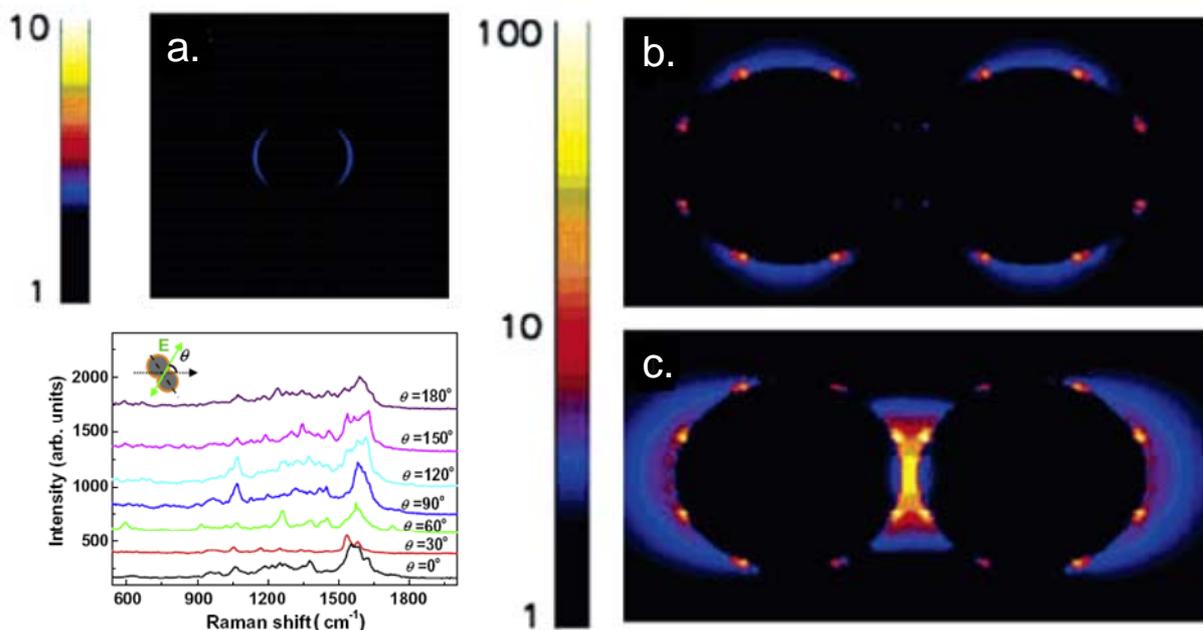


Figure 16. Exaltation du champ électromagnétique à 633 nm pour une nanosphère isolée (a), un couple de nanosphères adjacentes avec un axe perpendiculaire à la polarisation incidente (b), un couple de nanosphères adjacentes avec un axe inter-particule parallèle à la polarisation incidente (c). En bas à gauche, spectres SERS d'un dimère de particules d'Ag dépendant de la polarisation. L'angle ϑ correspond à l'angle entre la direction de polarisation du laser et la direction horizontale [66-67].

Les dimères présentent également de fortes exaltations du signal Raman. Ceci a déjà été recensé plusieurs fois dans la littérature. Il est bien connu que les dimères sont des arrangements de choix pour obtenir des exaltations importantes du signal Raman de par leur couplage inter-particule (figure 16). Cependant, leur efficacité SERS semble être beaucoup

plus sensible à plusieurs facteurs notamment à leur orientation. Ainsi, nos résultats rejoignent ceux de la littérature : une orientation perpendiculaire des dimères par rapport à l'orientation de l'analyseur éteint l'effet SERS. Les agrégats de trois particules ou plus ne semblent pas être influencés aussi drastiquement par l'orientation de l'analyseur car ceux-ci présentent moins d'anisotropie et la polarisation de la lumière exaltée possède plusieurs composantes non nulles.

Enfin, les fluctuations spectrales importantes qui sont observées d'un spectre à l'autre, suggèrent que peu de molécules participent au signal détecté. En effet, l'une des spécificités des spectres de molécules uniques est de présenter, à l'échelle de temps d'acquisition de l'ordre de la seconde, de légères variations de ses caractéristiques. En particulier, l'intensité relative de certaines raies fines caractéristiques de la rhodamine 6G varie ; des bandes de vibrations montrent un comportement de "clignotement" ou d'apparition/disparition du spectre typique du signal SERS de molécules uniques, observé depuis les toutes premières expériences de Kneipp ou Nie, confirmé par les études suivantes [23, 59, 68], puis à nouveau par Camden et al. dans le cas du système rhodamine 6G-particule citrate [69]. Cette dynamique temporelle à l'échelle de la seconde est caractéristique du signal de molécules individuelles. L'enjeu des études actuelles est ainsi d'identifier le, ou les processus, à l'origine de cette dynamique. Il n'existe pas, dans le cas du signal Raman, de signature spectroscopique spécifique permettant de s'assurer de l'unicité de la molécule étudiée. Il est à noter que l'on peut être amené à observer des variations dans la position des maxima ou de la forme des spectres à cause de la température. En effet, l'ordre de grandeur du déplacement des maxima varie de quelques centièmes de nanomètres à basse température et quelques nanomètres à température ambiante.

VII. Effet MEF

VII. A. Généralités

Certaines molécules organiques ont la propriété d'absorber de manière très efficace une partie du spectre visible puis de retourner à l'état électronique fondamental par émission d'un rayonnement appelé rayonnement de fluorescence.

La fluorescence est couramment utilisée comme un "outil" d'analyse spectroscopique, par exemple pour étudier la structure électronique d'un composé chimique. La fluorescence fournit également un contraste spécifique pour la microscopie, qui apporte des informations complémentaires aux contrastes d'absorption, de réflexion ou de diffusion. Cette technique d'imagerie s'est imposée avec le développement de sondes fluorescentes et leur utilisation pour le marquage spécifique en biologie. Cependant, dans de nombreuses applications, les possibilités de cet "outil" sont limitées par la faiblesse du signal et la faible stabilité photochimique de ces sondes fluorescentes. Une des solutions proposées pour résoudre ce problème, outre le développement de nouvelles sondes fluorescentes plus performantes, est d'agir sur les "mécanismes" de la fluorescence, en modifiant les propriétés électromagnétiques de l'environnement local des sondes fluorescentes.

On définit le rendement quantique Q du fluorophore comme la proportion des processus électromagnétiques dans l'ensemble des processus de relaxation de la molécule excitée.

L'interaction avec un élément extérieur peut fournir de nouveaux modes électromagnétiques auxquels le fluorophore peut se coupler pour émettre. Cela se traduit par un accroissement des taux d'émission radiative et non-radiative, et une réduction de la durée de vie de l'état excité. Le rendement quantique radiatif Q_r du fluorophore est soit augmenté (exaltation) soit diminué (quenching), suivant que cette interaction est en faveur des processus radiatifs ou non-radiatifs.

La présence d'une surface ou d'une nanostructure amplifie localement le champ électromagnétique, et est susceptible d'avoir une influence sur les processus d'excitation et d'émission du fluorophore (augmentation du taux d'excitation). Ce type d'interaction met en jeu des phénomènes d'excitation résonante de charges électriques confinées dans les nanostructures métalliques (plasmons) : c'est l'effet MEF, acronyme anglais de « Metal-Enhanced Fluorescence ».

Le couplage fluorophore/métal induit également un déplacement spectral du pic d'émission et une réduction des durées de vie de fluorescence. L'amplification totale de la fluorescence dépend fortement de la distance séparant les fluorophores du métal, en raison de la compétition entre l'amplification du champ local et le transfert d'énergie non-radiatif au métal.

VII. B. Exaltation des processus optiques et photochimiques

Les propriétés optiques de fluorophores moléculaires adsorbés sur des nanoparticules métalliques sphériques ont été étudiées par Gersten & Nitzan [70-71], et Weitz *et al.* [72]. Nitzan & Brus [73] ont mis en évidence la compétition entre les processus d'exaltation à l'excitation et à l'émission, et les processus de désexcitation non-radiative à proximité de la particule métallique.

Si l'amplitude du champ d'excitation décroît avec la distance à la surface du métal (l'exaltation est confinée dans la zone des dix premiers nanomètres), le contact direct avec la particule n'est pas la configuration qui procure l'exaltation de fluorescence maximale.

D'un point de vue quantique, on peut considérer que la présence de la nanoparticule métallique accroît localement le taux d'excitation. Cette exaltation est d'autant plus efficace que la fréquence d'émission de la molécule est proche de la résonance plasmon de la particule. Toutefois, pour des distances trop courtes, le couplage entre le fluorophore et la nanoparticule est tel que des processus compétiteurs non radiatifs prennent le dessus et la fluorescence se trouve diminuée malgré l'exaltation locale du champ exciteur.

Les positions les plus favorables à l'exaltation des processus d'excitation (contact direct avec le métal) sont donc les plus défavorables à l'émission radiative. Il existe donc une distance finie qui offre un compromis entre exaltation à l'excitation et taux d'émission radiative, et qui donne une valeur maximale du rendement quantique apparent. Cette distance est de l'ordre de

10 nm [74], et dépend d'un certain nombre de paramètres parmi lesquels l'indice optique du milieu autour et entre la molécule et la particule.

Il existe également une fréquence d'excitation optimale, proche du maximum d'absorption de la molécule et de la résonance plasmon de la nanoparticule métallique, pour laquelle le rendement quantique apparent est le plus grand.

Par ailleurs, nous avons vu précédemment que la position et la largeur spectrale de la résonance plasmon dépend de la taille, de la forme et de la composition des particules. Il est donc possible d'adapter la résonance plasmon aux bandes d'absorption et/ou d'émission de la molécule, pour optimiser le couplage nanoparticule - fluorophore.

Les facteurs d'exaltation en présence de nanoparticules métalliques sont bien plus grands pour le SERS que pour la fluorescence, notamment parce que le nombre de photons émis ne dépend pas linéairement du nombre de photons absorbés, mais quadratiquement.

VII. C. Application à l'exaltation de fluorescence

Afin de vérifier si nos substrats SERS pourraient également être utilisés comme substrats d'exaltation de la fluorescence [75-76], nous avons sélectionné un fluorophore qui peut être excité à une longueur d'onde proche de la SPR de l'or. Nous avons donc déposé une solution de molécules de Cyanine 5 (CY5, figure 17) à 1.10^{-6} M sur notre substrat nanostructuré actif optiquement. Les images en fluorescence obtenues ont révélé qu'au lieu d'obtenir un voile fluorescent rouge homogène, la fluorescence est localement amplifiée aux sites correspondant aux motifs de nanoparticules uniquement (Figure 18A).

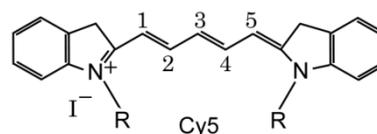


Figure 17. Structure chimique de la Cyanine 5.

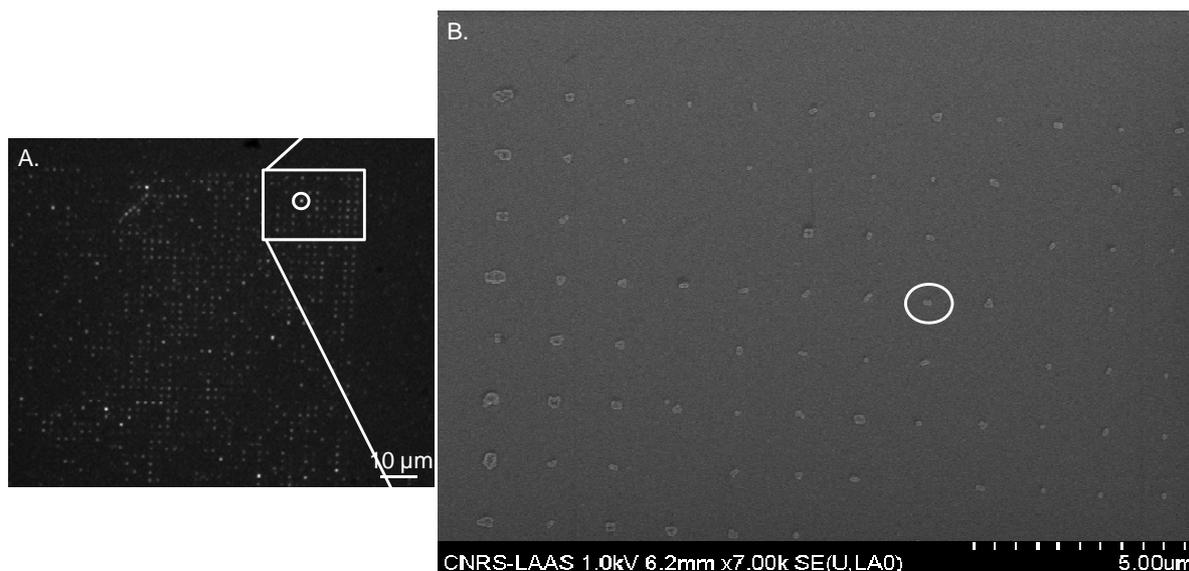


Figure 18. Effet MEF. A) Image de fluorescence par microscopie confocale de molécules CY5 déposées sur un substrat en silicium nanostructuré avec de réseaux de nanoparticules d'or. B) Image MEB qui correspond à un zoom sur une zone de A) (motifs de 250 nm de côté et de 1,5 μm de période).

La comparaison des images de fluorescence avec et sans métal met en évidence l'amplification de l'intensité du signal de fluorescence, ordinairement faible à cause du très bas rendement quantique de la molécule et de sa faible concentration.

Nous avons corrélé l'image en fluorescence à l'image MEB correspondante (figure 18B) et nous avons constaté que les particules uniques ne provoquent pas d'exaltation significative de la fluorescence comparée aux agrégats. Ce résultat suggère d'ores-et-déjà qu'il se produit une exaltation locale d'origine plasmonique. Afin de corroborer cette hypothèse avec le CY5, nous avons généré un deuxième substrat mais cette fois-ci avec une autre configuration appelée configuration de contrôle. Dans ce cas, nous avons choisi de ne pas avoir une accroche électrostatique entre les fluorophores chargés positivement et les nanoparticules chargées négativement.

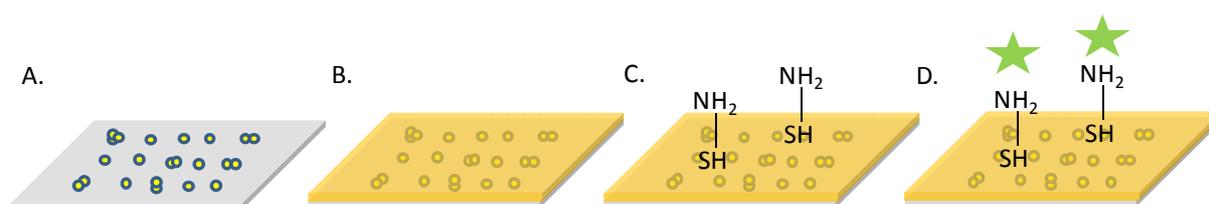


Schéma 6. Représentation schématique de la fabrication de l'échantillon de contrôle. Le substrat SERS-actif (A) est recouvert d'une couche d'or de 100 nm d'épaisseur (B). On dépose ensuite par incubation les molécules d'accroche (cystéamines) (C) puis finalement la molécule Oregon green à détecter (D).

Le but ici est de déposer une couche d'or sur toute la surface du substrat optiquement actif c'est-à-dire avec des réseaux de nanoparticules, et d'utiliser une chimie thiol intermédiaire de façon à ce que le dépôt du fluorophore se fasse de manière homogène sur le substrat (schéma 6). De cette façon nous pouvons comparer simultanément deux zones, une surface d'or non structurée et une surface nanostructurée avec des particules d'or, qui auront subi exactement la même fonctionnalisation chimique. Après dépôt d'une couche de 100 nm d'or par pulvérisation, les images champ sombre et MEB ont confirmé que la couche d'or recouvrant le substrat avec des réseaux de nanoparticules est homogène et continu : on distingue les



Figure 19. Image MEB de contrôle. Substrat SERS recouvert d'une couche d'or de 100 nm d'épaisseur : uniquement les agrégats de taille importante sont visibles.

agrégats de taille importante mais les plus petits agrégats sont entièrement recouverts (figure 19). Il est à noter que l'épaisseur de cette couche pourrait être variée afin d'étudier son influence sur l'exaltation du signal de fluorescence.

Nous avons ensuite incubé un thiolamine, (solution de molécules cystéamine à 15 mM, figure 20) pendant une heure.

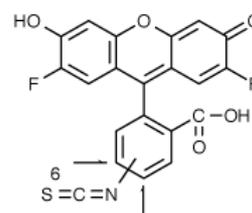


Figure 20. Structure chimique de l'Oregon Green isothiocyanate.

Ici, les molécules cystéamine ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) s'accrochent à la surface d'or au travers de leur terminaison thiol. Finalement, après rinçage et séchage du substrat, nous avons incubé une solution de molécules Oregon green isothiocyanate à 0,001% (v/v) pendant 4 heures, de façon à ce que les fluorophores s'accrochent aux terminaisons amine libres et qu'ils soient donc déposés de manière parfaitement homogène et covalente sur la surface après incubation. La longueur de la molécule cystéamine (3-4 Å environ) donne l'éloignement du fluorophore par rapport à la surface métallique.

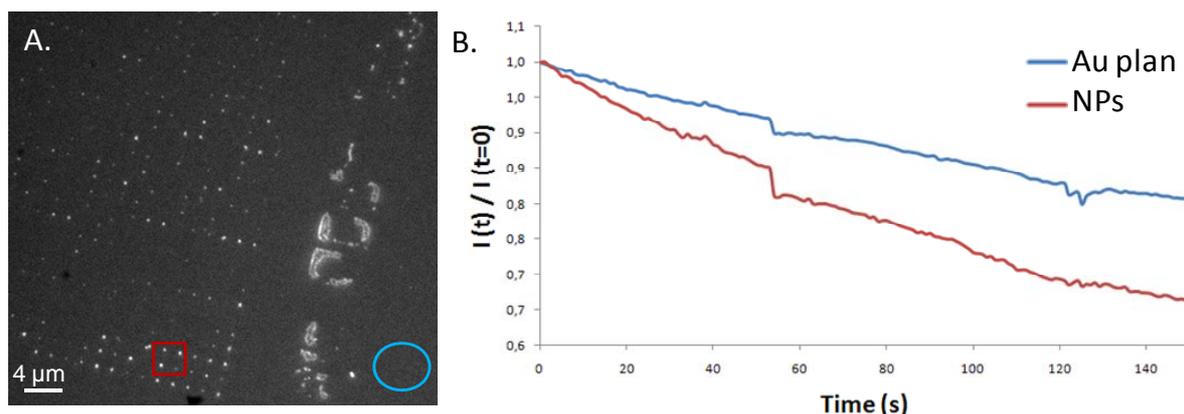


Figure 21. A) Image de fluorescence de molécules Oregon green déposées sur un substrat nanostructuré avec des réseaux de nanoparticules recouvert d'une couche d'or de 100 nm. B) Mesure de photoblanchiment effectué sur deux zones de ce substrat : la courbe bleue correspond à des fluorophores localisés sur une région non structurée d'or plane, et la courbe rouge correspond à des fluorophores localisés sur des nanostructures de particules d'or. Les courbes sont normalisées par rapport à leur maximum.

Les images en fluorescence (figure 21A) révèlent que malgré la présence de cette couche épaisse d'or au dessus du substrat nanostructuré, les motifs de nanoparticules constituent encore des points « chauds » qui amplifient localement le signal de fluorescence.

L'enregistrement du déclin de la fluorescence est une voie d'analyse de la dynamique moléculaire. La technique la plus courante pour étudier ce phénomène par le biais de l'observation du signal de fluorescence, consiste à photoblanchir une zone de l'échantillon, c'est-à-dire à irradier cette zone de façon prolongée jusqu'à disparition totale de la fluorescence ou émission. Ainsi, si on enregistre le déclin de fluorescence, on peut avoir accès indirectement à la dynamique des mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de fluorescence.

Si l'on considère la toute première partie de la pente de la courbe de photoblanchiment, la figure 21B montre que les fluorophores localisés sur les motifs de nanoparticules d'or photoblanchissent deux fois plus vite que les fluorophores localisés à l'extérieur de cette zone structurée. Cette différence de dynamique implique que le couplage de la molécule avec notre substrat métallique induit une augmentation du taux d'excitation du fluorophore caractéristique d'un mécanisme d'exaltation local. La molécule accomplit un plus grand nombre de cycles d'excitation/émission par unité de temps et se dégrade donc plus rapidement. Cependant nous ne pouvons pas écarter une augmentation locale de la température également. En effet, ce facteur thermodynamique ne peut pas être négligé dans l'interprétation globale du phénomène car cette élévation en température a déjà été mise en évidence dans le cas de points « chauds » [77] ce qui leur a d'ailleurs valu ce nom.

La détection de fluorescence est devenue une technique de référence pour l'analyse et l'imagerie en biologie.

Dans ce travail, nous avons démontré l'efficacité des substrats métalliques nanostructurés comme moyen d'amplifier le signal de fluorescence. Nous avons mis en évidence la pertinence de leur utilisation pour améliorer la sensibilité à la détection, dans un contexte biodiagnostique, comme pour des applications de type puces à ADN et d'imagerie des cellules et des tissus.

VIII. Extensions et applications

VIII. A. Exaltation du signal Raman de couches minces.

Pour la caractérisation et pour la plus grande partie des applications de ces substrats nous avons collaboré étroitement avec le Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) à Toulouse. Carlos Bartual, étudiant en thèse dans ce laboratoire, a déposé une couche de dipyridyl disulfide sur notre substrat SERS-actif. La spectroscopie Raman a démontré que nos

substrats pouvaient exalter le signal Raman de cette molécule et son spectre a pu être identifié de cette façon (figure 22). Ensuite il a déposé une succession de couches minces par une technique de « couche par couche » pour pouvoir observer la transition de spin d'un composé moléculaire. Là encore notre échantillon a permis d'avoir des résultats intéressants qui sont toujours en cours d'exploitation mais qui ouvrent d'ores-et-déjà de grandes perspectives. Ce qui est important de souligner est que des mesures avaient été faites au préalable en utilisant des substrats SERS commerciaux et les résultats obtenus n'avaient pas été satisfaisants : notre substrat SERS a donc réellement un grand potentiel par rapport aux substrats existants et promet d'être utilisé de façon plus routinière dans le groupe pour diverses applications.

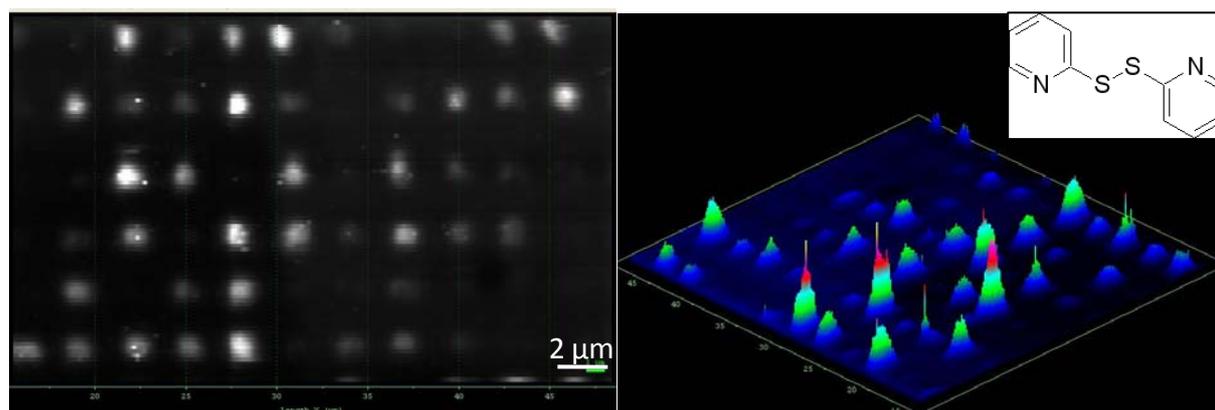


Figure 22. Cartographie Raman d'une couche de dipyrrolyl-disulfide déposée sur notre substrat SERS-actif de nanoparticules d'or (à gauche) et son équivalent en niveaux d'intensité (à droite).

VIII. B. Détection de molécules uniques

L'analyse chimique qu'il est possible d'effectuer à partir de l'étude du spectre Raman de molécules uniques se révèle tout aussi puissante et prometteuse pour l'étude de l'ADN par exemple, puisqu'effectivement la signature SERS en mode molécule unique de l'adenine, base de l'ADN, a été observée en 1997 [78], et ce sans marqueur particulier. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'on était capables de fabriquer des substrats de molécules d'ADN uniques peignées en réseaux. Ce résultat trouve une application directe ici. En effet, le couplage de cette nanostructuration à base de brins d'ADN et de l'effet SERS pourrait ouvrir la voie à une technique rapide de séquençage de brin d'ADN puisque les 4 bases constitutives présentent des signatures spectroscopiques spécifiques entre 650 et 800 cm^{-1} .

Cette analyse chimique peut de même être effectuée dans le temps, et un tel suivi peut se faire sur de longues périodes puisque la molécule ne risque pas d'être photoblanchie comme avec l'analyse par fluorescence. On pourra donc suivre une réaction (photo)chimique en détectant et en caractérisant de manière précise les produits des réactions.

VIII. C. Assemblages de mélanges

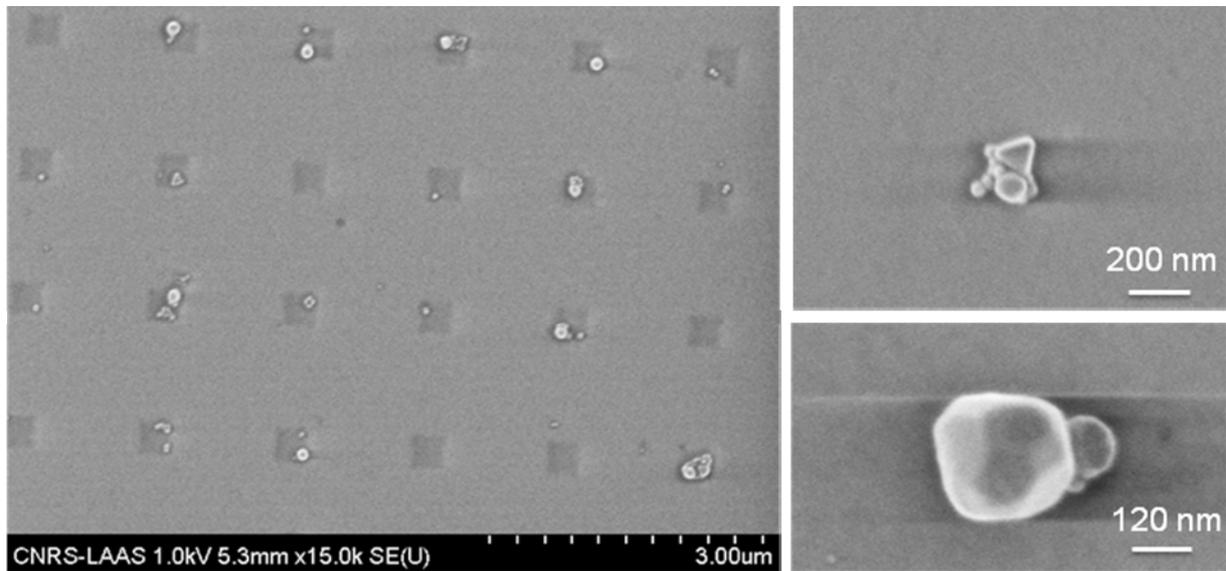


Figure 23. Images MEB montrant les résultats obtenus après assemblage d'une solution colloïdale contenant un mélange de nanoparticules d'or de plusieurs tailles (250 nm, 100 nm et 40 nm) sur un timbre nanostructuré et transfert de l'assemblage ainsi obtenu sur silicium fonctionnalisé APTES.

Des expériences d'assemblage d'une solution constituée d'un mélange de différentes tailles de nanoparticules ont été entreprises. En effet, d'un point de vue spectroscopique et optique, le fait d'avoir des motifs de nanoparticules de plusieurs tailles présente l'intérêt de pouvoir augmenter le nombre de points chauds à l'échelle d'un même agrégat et peut-être augmenter le facteur d'exaltation global. Ce sont des tests que nous aurions souhaité approfondir si le temps l'avait permis. De plus, pour les applications d'utilisation de ces structures comme masque de gravure, ces agrégats, plus complexes, pourraient offrir des propriétés de nanotexturation particulières. Quelque soit l'application visée *in fine*, il est important de remarquer là encore que la technique d'assemblage capillaire n'impose pas une sélection en taille des objets en l'occurrence des nanoparticules en solution. En effet, après assemblage on retrouve toutes les tailles de nanoparticules initialement en solution (figure 23).

Il est à noter qu'il est également possible d'obtenir des résultats semblables en assemblant une première solution de nanoparticules de grande taille, puis en assemblant immédiatement après une solution de nanoparticules de taille inférieure de façon à ce que celles-ci remplissent les interstices laissés vacants par les nanoparticules plus grandes [79]. C'est d'ailleurs l'un des avantages de la technique d'assemblage capillaire, qui permet de réaliser des assemblages successifs pour l'obtention de structures toujours plus complexes.

VIII. D. Assemblage de nanoparticules à transition de spin

Nous avons également voulu aller plus loin et transposer cette méthodologie pour assembler directement des nanoparticules à transition de spin là encore synthétisées par le LCC. La difficulté réside ici dans l'utilisation de solvants polaires qui sont agressifs pour le PDMS tels que l'hexane ou l'octane. Nous avons toutefois réussi à mettre au point un protocole expérimental de façon à palier les déformations subies par le timbre lors de l'assemblage capillaire. Ce travail a été réalisé avec Carlos Quintero, et fait l'objet d'une thèse en cotutelle avec le LAAS actuellement. Lorsqu'il est question d'assembler des objets en solution dans des solvants polaires, il est tout de même envisageable de réaliser un assemblage capillaire en utilisant des timbres épais. De cette façon, le timbre subit une déformation mais qui reste suffisamment modérée pour permettre un assemblage par voie capillaire. L'angle de contact est favorable (sans nécessité d'ajout de surfactant) et le transfert se fait avec la même technique que celle employée pour les nanoparticules d'or.

Il est à noter que le protocole de transfert que nous avons développé dans le cas des nanoparticules assemblées sur timbre est transposable à d'autres objets. Il a été ainsi utile à d'autres membres de l'équipe qui l'ont étendu au transfert de nanotubes de carbone (collaboration avec Amélie Bédier) et de nanofils en silicium (collaboration avec Sven Salomon) d'un timbre vers une surface en silicium hydrophile.

VIII. E. Nanoparticules comme masques de gravure

Les méthodes d'assemblage localisé ont permis notamment l'essor de la lithographie par nanosphère (NSL) [35, 80-85]. Il s'agit d'une technique économique pour transférer par gravure ionique réactive des réseaux de motifs à l'échelle nanométrique grâce au dépôt de nanosphères utilisées comme masque de gravure.

Pour ce travail nous avons collaboré avec le CEA à Grenoble et d'autres partenaires dans le cadre d'un projet national. L'idée est d'assembler des nanoparticules métalliques en réseau et de les utiliser comme masque de gravure de façon à être répliquées ultérieurement par moulage plastique. En effet, l'ambition de ce projet est d'intégrer des processus de nanotexturation à bas-coût dans des composants plastiques d'équipements manufacturés pour faciliter le démoulage de pièces ou pour inclure de nouvelles fonctions et/ou propriétés de surface (réflectivité, mouillage, superhydrophobie...). A terme, le projet contribuera à équiper les machines actuelles avec des outils nano-structurés.

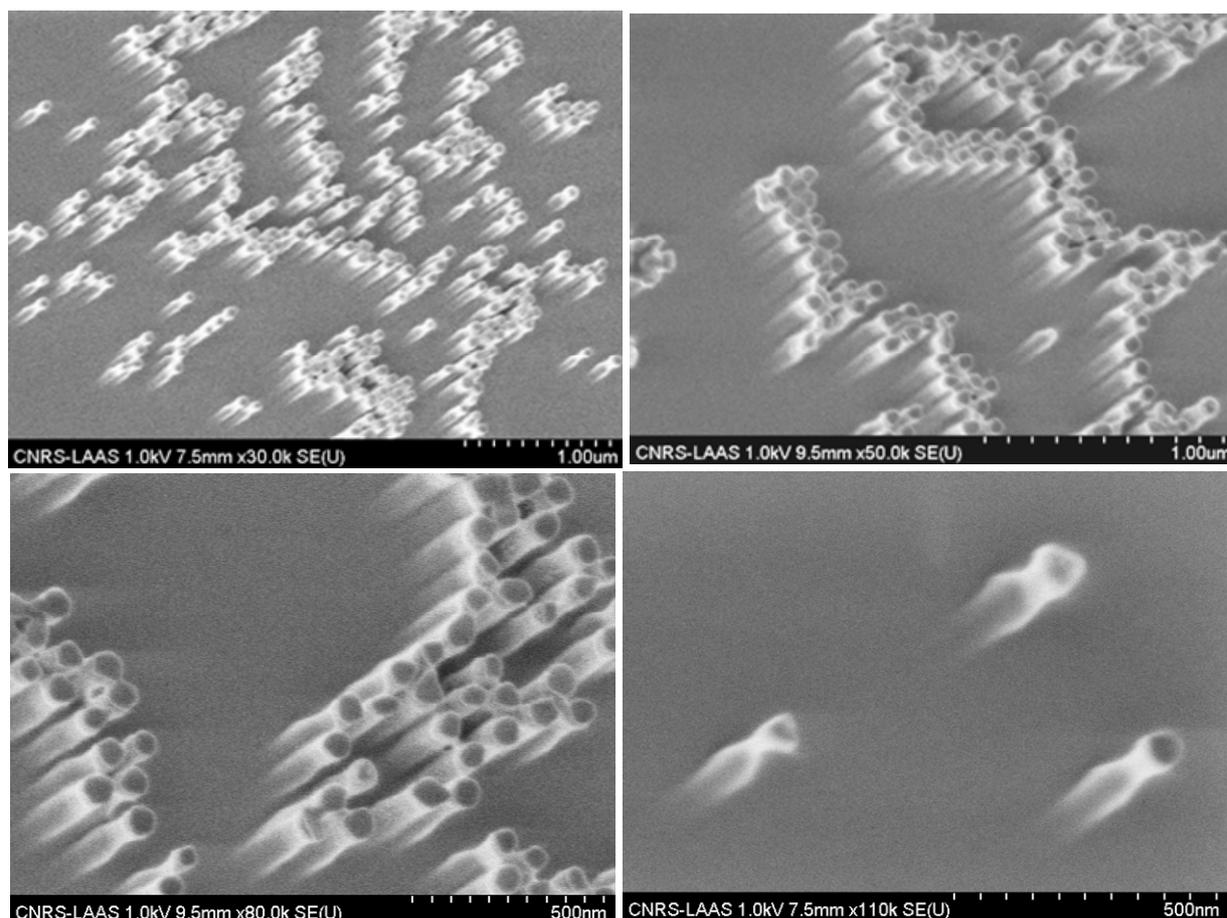


Figure 24. Substrats Si / 400 nm SiCH / 2 µm DLC / 50 nm SiCH avec des nanoparticules d'or de 100 nm assemblées et après gravure par plasma des deux premières couches superficielles.

Pour la première phase du projet nous avons travaillé avec des motifs micrométriques afin de valider dans un premier temps le type de substrat, la taille des nanoparticules à utiliser et le protocole de gravure à adopter. Nous avons fonctionnalisé les substrats fournis par le CEA avec un contraste chimique hydrophile/hydrophobe. Ensuite nous avons incubé les nanoparticules d'or en solution de façon à ce qu'elles se déposent de façon sélective dans les motifs hydrophiles. Après gravure, les premiers résultats présentés figure 24, montrent que le concept est possible : les particules de 100 nm de diamètre peuvent effectivement servir de masque de gravure ; la faisabilité du projet est donc établie.

IX. Conclusion

Les communautés de médecins, biologistes, pharmaciens, les corps de sécurité recherchent des techniques de détection et d'analyse de biomolécules qui soient non perturbantes des propriétés naturelles des biomolécules (sans marquage), très sensibles avec une faible limite de détection (ie générant une variation de signal significative), qui puissent fournir un grande quantité d'information, rapide, et à bas-coût.

L'effet SERS constitue une technique de biodétection optique qui répond à ces critères. Elle peut constituer une technique de choix pour des applications futures dans le domaine des biopuces et des biocapteurs.

Nous avons démontré que les nanostructures ordonnées de nanoparticules d'or que nous avons fabriquées par assemblage capillaire et lithographie douce constituent des substrats SERS efficaces. Au travers de la combinaison de ces deux techniques, l'avantage est que les points « chauds » peuvent être fabriqués avec un faible nombre de nanoparticules ce qui augmente la possibilité de détecter un faible nombre de molécules. Pour cette étude en particulier, les substrats optiquement actifs se composent d'un réseau périodique à 2D de nanoparticules d'or avec différents arrangements. Par le biais de la spectroscopie Raman, nous avons mis en évidence que l'exaltation du champ électrique local est plus importante dans le cas d'agrégats (trois à six nanoparticules) que dans le cas de particules uniques. Les dimères provoquent également une forte exaltation du signal mais leur efficacité SERS est dépendante de leur orientation : une orientation perpendiculaire des dimères par rapport à l'analyseur éteint l'effet SERS. Pour aller plus loin, nous avons démontré que ce type de substrats peut être utilisé également pour exalter le signal de fluorescence conventionnel. Les observations faites dans le cas de l'effet SERS s'appliquent là encore dans le cas de l'effet MEF : les particules uniques ne provoquent pas d'exaltation significative en comparaison avec l'exaltation mesurée dans le cas d'agrégats de plus de 3 particules.

Ce type de substrat optiquement actif peut être fabriqué très facilement sans avoir recours à des technologies lourdes ou onéreuses.

Il peut être fabriqué avec tout type de particules métalliques (préfonctionnalisées) et pourrait être couplé à des techniques de dépôt automatisé telles que le bioplumes développé au sein du groupe [86].

Nous pourrions plus tard imaginer évoluer vers une biopuce sans marquage avec lecture optique en utilisant ces substrats SERS pour détecter des molécules biologiques, des cellules ou pour détecter des interactions spécifiques avec une haute sensibilité.

X. Références

- [1] W. R. Browne, J. J. McGarvey, *Coordination Chemistry Reviews* (2007), 251, 454-473.
- [2] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* (1974), 26 (2), 163.
- [3] K. L. Kelly, E. Coronado, L. Lin Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* (2003), 107(3), 668-677.
- [4] H. Raether, *Springer tracts in modern physics* (Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1988), 111.
- [5] C. Sönnichsen, *Plasmons in metal nanostructures*. Thèse de doctorat de l'université Ludwig-Maximilians de Munich, (2001).

- [6] U. Kreibig, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*, (Springer-Verlag, Berlin, **1996**).
- [7] J. J. Mock, M. Barbic, D. R. Smith, D. A. Schultz, S. Schultz, *J. Chem. Phys.* (**2002**), 116 (15), 6755-6759.
- [8] C. Noguez, *Journal of Physical Chemistry C* (**2007**), 111 (10), 3806-3819.
- [9] O. Lecarme, *Spectroscopie d'interactions plasmoniques d'assemblages colloïdaux déterministes*. Université Joseph Fourier, Grenoble, (**2008**).
- [10] F. Vallée, in *Nanomaterials and Nanochemistry*, ed. by C. Bréchnignac, P. Houdy, M. Lahmani, (Springer, Berlin, **2008**), 197.
- [11] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz, *Journal of Physical Chemistry B* (**2003**), 107(3), 668-677.
- [12] J. Grand, P.-M. Adam, A.-S. Grimault, A. Vial, M. Lamy de la Chapelle, J.-L. Bijeon, S. Kostcheev, P. Royer, *Plasmonics* (**2006**), 1, 135-140.
- [13] S. M. Nie, S. R. Emory, *Science* (**1997**), 275, 1102–1106.
- [14] E. J. Smythe, M. D. Dickey, J. Bao, G. M. Whitesides, F. Capasso, *Nano Lett.* (**2009**), 9(3), 1132–1138.
- [15] R. M. Stockle, Y. D. Suh, V. Deckert, R. Zenobi, *Chem. Phys. Lett.* (**2000**), 318, 131.
- [16] E. Smith, G. Dent, John Wiley and Sons (**2005**).
- [17] M. Moskovits, *Physics and Applications* (Springer, Berlin, **2006**), 1-18.
- [18] A. Campion, P. Kambhampati, *Chemical Society Reviews* (**1998**), 27, 241-250.
- [19] C. Langhammer, Z. Yuan, I. Zorić, B. Kasemo, *Nano Lett.* (**2006**), 6(4), 833-838.
- [20] W.E. Doering, S. Nie, *J. Phys. Chem. B* (**2002**), 106, 311.
- [21] P. Hildebrandt, M. Stockburger, *J. Phys. Chem.* (**1984**), 88, 5935.
- [22] A.M. Michaels, J. Jiang, L. Brus, *J. Am. Chem. Soc.* (**1999**), 121, 9932.
- [23] A.M. Michaels, J. Jiang, L. Brus, *J. Phys. Chem. B* (**2000**), 104, 11965.
- [24] C. L. Haynes, A. D. McFarland, R. P. Van Duyne, *Anal. Chem.* (**2005**), 77 (17), 338A-346A.
- [25] E. Hao, G. C. Schatz, *J. Chem. Phys.* (**2004**), 120(1), 357-366.
- [26] H. Xu, J. Aizpurua, M. Kall, P. Apell, *Phys. Rev. E* (**2000**), 62(3), 4318.

- [27] M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* (1985), 57, 3, 783-826.
- [28] A. Wokaun, *Mol. Phys.* (1985), 56(1), 1-33.
- [29] A. Bouhelier, M. R. Beversluis, L. Novotny, *Appl. Phys. Lett.* (2003), 83, 24, 5041-5043.
- [30] P. Anger, P. Bharadwaj, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* (2006), 96(11), 113002-113004.
- [31] S. Corni, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* (2001), 114(8), 3739.
- [32] S. Corni, J. Tomasi, *Chem. Phys. Lett.* (2001), 342, 135.
- [33] S. Corni, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* (2002), 116, 1156.
- [34] A. J. Haes, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* (2002), 124 (35), 10596–10604.
- [35] T. R. Jensen, M. Duval Malinsky, C. L. Haynes, R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* (2000), 104, 10549-10556.
- [36] M. Käll, H. Xu, P. Johansson, *J. Raman Spectrosc.* (2005), 36, 510–514.
- [37] For a recent review see: *Chem. Soc. Rev.* (2008), 37.
- [38] C. L. Haynes, A. D. McFarland, R. P. Van Duyne, *Anal. Chem.* (2005a), 77, 338A–346A.
- [39] H. Xu, J. Aizpurua, M. Käll, P. Apell, *Phys. Rev. E* (2000), 62, 4318–4324.
- [40] J. C. Hulteen, R. P. Van Duyne, *J. Vac. Sci. Technol. A* (1995), 13, 1553.
- [41] A. Kosiorek, W. Kandulski, H. Glaczynska, M. Giersig, *Small* (2005), 1, 439.
- [42] G. Zhang, D. Wang, H. Mohwald, *Nano Lett.* (2007), 7, 127.
- [43] H. Fredriksson, Y. Alaverdyan, A. Dmitriev, C. Langhammer, D. S. Sutherland, M. Zach, B. Kasemo, *Adv. Mater.* (2007), 19, 4297–4302.
- [44] T. R. Jensen, M. Duval Malinsky, C. L. Haynes, R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* (2000), 104, 10549–10556.
- [45] D. C. Hyun, G. D. Moon, E. C. Cho, U. Y. Jeong, *Adv. Funct. Mater.* (2009), 19, 2155–2162.
- [46] P. Maury, M. Peter, V. Mahalingam, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Adv. Funct. Mater.* (2005), 15, 451–457.
- [47] Y. N. Xia, Y. D. Yin, Y. Lu, J. McLellan, *Adv. Funct. Mater.* (2003), 13, 907–918.

- [48] B. Yan, A. Thubagere, W. R. Premasiri, L. D. Ziegler, L. Dal Negro, B. M. Reinhard, *ACS Nano* (2009), 3, 1190–1202.
- [49] T. Rivera, O. Lecarme, J. Hartmann, R. L. Inglebert, D. Peyrade, *D. Microelec. Eng.* (2009), 86, 1089–1092.
- [50] T. Rivera, O. Lecarme, J. Hartmann, E. Rossitto, K. Berton, D. Peyrade, *D. J. Vac. Sci. Technol. B* (2008), 26, 2513–2519.
- [51] T. Kraus, L. Malaquin, H. Schmid, W. Riess, N. D. Spencer, H. Wolf, *Nat. Nanotechnol.* (2007), 2, 570–576.
- [52] A. Cerf, C. Vieu, *Colloids Surf. A* (2009), 342, 136–140.
- [53] C. Thibault, Impression de Biomolécules par Lithographie douce, applications pour les Biopuces, de l'échelle Micrométrique à Nanométrique, Université de Toulouse, (2007).
- [54] U. Håkanson, M. Agio, S. Kühn, L. Rogobete, T. Kalkbrenner, V. Sandoghdar, *Physical Review B* (2008), 77, 155408.
- [55] V. P. Drachev, M. D. Thoreson, V. M. Shalaev In *Optical Properties of Nanostructured Random Media* (Heidelberg, Springer Berlin, 2002), 82, 113-148.
- [56] H. Wei, U. Håkanson, Z. Yang, F. Höök, H. Xu, *Small* (2008), 4, 1296–1300.
- [57] A. Weiss, G. Haran, *J. Phys. Chem B* (2001), 105, 12348.
- [58] P. Hildebrandt, M. Stockburger, *J. Phys. Chem.* (1984), 88, 5935.
- [59] A. J. Meixner, T. Vosgrone, M. Sackrow, *J. Lumin.* (2001), 94-95, 147.
- [60] J. Chen, T. Martensson, K. A. Dick, K. Deppert, H. Q. Xu, L. Samuelson, H. Xu, *Nanotechnology* (2008), 19, 275712.
- [61] G. S. S. Saini, S. Kaur, S. K. Tripathi, C. G. Mahajan, H. H. Thanga, A. L. Verma, *Spectrochim. Acta, Part A* (2005), 61, 653–658.
- [62] G. Herzberg Molecular spectra and molecular structure. Vol. 1: spectra of diatomic Molecules (Van Nostrand, New York : 1966).
- [63] I. Khan, D. Cunningham, D. Graham, D. McComb, W. E. Smith, *J. Phys. Chem. B* (2005), 109, 3454–3459.
- [64] I. Khan, D. Cunningham, R. E. Littleford, D. Graham, W. E. Smith, D. W. McComb, *Anal. Chem.* (2006), 78, 224–230.
- [65] E. Hao, G. C. Schatz, *J. Phys. Phys.* (2004), 120, 357–366.

- [66] C. E. Talley, J. B. Jackson, C. Oubre, N. K. Grady, C. W. Hollars, S. M. Lane, T. R. Huser, P. Nordlander, N. J. Halas, *Nano Lett.* (2005), 5(8), 1569-1574.
- [67] C. L. Du, M. X. Yang, Y. M. You, T. Chen, H. Y. Chen, Z. X. Shen, *Chem. Phys. Lett.* (2009), 473(4-6), 317-320.
- [68] A. Weiss, G. Haran, *J. Phys. Chem B* (2001), 105, 12348.
- [69] J. P. Camden, J. A. Dieringer, J. Zhao, R. P. Van Duyne, *Acc. Chem. Res.* (2008), 41, 1653–1661.
- [70] J. I. Gersten, A. Nitzan, *J. Chem. Phys.* (1980), 73, 7, 3023-3037.
- [71] J. I. Gersten, A. Nitzan., *J. Chem. Phys.* (1981), 75, 3, 1139-1152.
- [72] D. A. Weitz, S. Garoff, J. I. Gertsten, A. Nitzan, *J. Chem. Phys.*(1983), 78(9), 5324-5338.
- [73] A. Nitzan, L. E. Brus. *J. Chem. Phys.* (1981), 74, 9, 5321-5322. ; A. Nitzan, L. E. Brus, *J. Chem. Phys.* (1981), 75, 5, 2205-2214.
- [74] J. Kümmerlen, A. Leitner, H. Brunner, FR Aussenegg and A. Wokaun, *Mol. Phys.* (1993), 80, 5, 1031-1046.
- [75] T. Yamaguchi, T. Kaya, H. Takei, *Anal. Biochem.* (2007), 364, 171–179.
- [76] S. S. Shankar, L. Rizzello, R. Cingolani, R. Rinaldi, P. P. Pompa, *ACS Nano* (2009), 3, 893–900.
- [77] L. Gui, C. L. Ren, *Applied Physics Letters* (2008), 92, 024102.
- [78] K. Kneipp, H. Kneipp, V. B. Kartha, R. Manoharan, G. Deinum, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. Feld, *Phys. Rev. E* (1998), 57(6), R6281.
- [79] T. Pinedo Rivera, Assemblage convectif de colloïdes par forces de capillarité en milieu confiné : applications en plasmonique. Université Joseph Fourier, Grenoble, (2009).
- [80] S.-M. Yang, S. G. Jang, D.-G. Choi, S. Kim, H. K. Yu, *Small* (2006), 2(4):458–475.
- [81] M. J. Gordon, D. Peyrade, *Appl. Phys. Lett.* (2006), 89(5), 053112–053113.
- [82] A. V. Whitney, B. D. Myers, R. P. Van Duyne, *Nano Lett.* (2004), 4(8):1507–1511.
- [83] N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, Y. Baba, *Anal. Chem.* (2004), 76(1), 15–22.
- [84] P. Jiang, M. J. McFarland, *JACS* (2005), 127(11), 3710–3711.

- [85] C. L. Cheung, R. J. Nikolic, C. E. Reinhardt, T. F. Wang, *Nanotechnology* (2006), 17(5), 1339–1343.
- [86] T. Leichle, D. Saya, J. B. Pourciel, F. Mathieu, L. Nicu, C. Bergaud, *Sens. Actuators A-Phys.* (2006), 132, 590–596.

Conclusion et Perspectives

Pour définir le nombre, la position des objets et leurs distances sur une surface, il est généralement nécessaire de diriger leur assemblage par le biais de substrats ou timbres structurés au préalable. Les surfaces nanostructurées ont déjà été fabriquées par nanoimprint, microtransfert molding, réplique de motifs induite par champ électrique, auto-assemblage... Plusieurs de ces techniques reposent sur l'utilisation d'un support souple, ou timbre, qui rend ces techniques particulièrement attractives pour leur capacité à couvrir de grandes surfaces, avec une grande efficacité et avec des potentialités de complexification de la nanofabrication accrues.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons ouvert un vaste pan applicatif. Notre intérêt s'est porté vers les cellules bactériennes, les molécules d'ADN et les nanoparticules métalliques comme objets d'étude en vue d'applications très distinctes. Pour ces trois objets d'intérêt, notre objectif premier a été de pouvoir les organiser selon des motifs précis d'une surface en utilisant des techniques fiables, bas-coût, simples à mettre en œuvre et avec une résolution atteignant celle de l'objet unique. Parmi toutes les techniques d'assemblage actuelles, nous avons choisi l'assemblage dirigé par structuration surfacique par contraste chimique dans le cas des cellules, puis l'assemblage dirigé par structuration topographique dans le cas des molécules et des particules. Ces techniques reposent toutes deux sur l'utilisation d'un timbre en PDMS. La constante qui relie ces deux techniques est donc la lithographie douce, technique phare du groupe NanoBioSystèmes.

Dans le cas des cellules, nous ne souhaitons ni les confiner mécaniquement, ni les exposer à l'air, en utilisant une technique douce nous permettant de préserver leur viabilité. Nous avons ainsi mis en place une procédure simple et fiable qui permet de générer des motifs chimiques présentant des propriétés de surface différentes afin d'induire l'adsorption sélective de cellules bactériennes traitées et non traitées à des endroits prédéfinis et en milieu liquide. L'ingénierie chimique de surface de ces substrats a été préparée en combinant deux techniques, la lithographie douce et une simple technique d'incubation. Nous avons mis en évidence une adsorption sélective des cellules sur chacun de ces sites chimiques localisés et nous avons réussi à fabriquer des réseaux ordonnés de bactéries uniques et vivantes avec un taux de réussite proche de 100%. Les substrats à contraste chimique développés par lithographie par impression sont simples à mettre en œuvre et permettent surtout de pouvoir assembler les cellules tout en les maintenant dans un milieu liquide pendant toute la durée de l'étude. Les dimensions des motifs et des molécules à déposer est modulable en fonction de l'application. Grâce à ce biopatterning de surface contrôlé, nous avons pu réaliser des études spectroscopiques sur cellules uniques et de façon statistique.

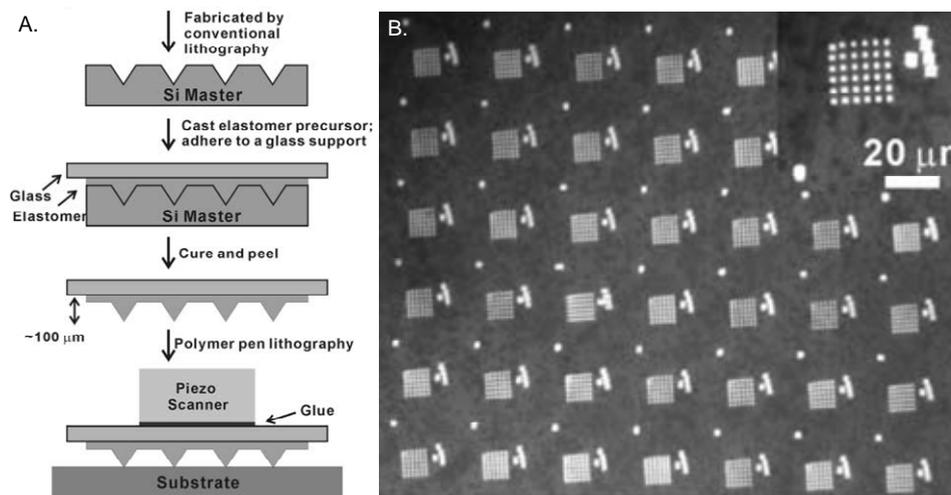
L'ADN étant une entité biologique plus robuste, nous avons employé une technique d'assemblage capillaire dirigé par structuration topographique de surface. Nous avons d'ailleurs utilisé cette même technique dans le cas des nanoparticules métalliques. Grâce à cette méthode, nous avons pu assembler des molécules d'ADN uniques peignées en réseaux ordonnés sur une surface. Les molécules d'ADN sont homogènes en longueur et en orientation, et sont positionnées de façon précise sur une étendue dépassant le mm^2 en juste quelques secondes. Mais l'assemblage capillaire semble avoir une réelle influence sur

l'étirement des molécules : ce point méritera d'être approfondi. Nous avons pu étendre et transposer cette méthode à des molécules de toutes tailles et à des systèmes plus complexes de type ADN-bille. Au travers de ces expériences, nous avons mis en évidence que cette technique n'induit pas de sélection en taille des objets et permet donc l'assemblage de solutions hétérogènes également. Les assemblages obtenus, notamment les lignes d'ADN, pourraient être utilisés comme supports 1D pour échafauder ou guider l'assemblage d'objets plus complexes et difficiles à assembler. Dans le cas des nanoparticules métalliques, nous avons démontré que les nanostructures ordonnées que nous avons fabriquées par assemblage capillaire dirigé par structuration topographique constituent des substrats SERS efficaces. Les substrats optiquement actifs se composent d'un réseau périodique à 2D de nanoparticules d'or avec différents arrangements. Par le biais de la spectroscopie Raman, nous avons mis en évidence que l'exaltation du champ électrique local est plus importante dans le cas d'agrégats que dans le cas de particules uniques. Les dimères provoquent également une forte exaltation du signal mais leur efficacité SERS est dépendante de leur orientation. Pour aller plus loin, nous avons démontré que ce type de substrats peut être utilisé également pour exalter le signal de fluorescence conventionnel. Ce type de substrat optiquement actif peut être fabriqué très facilement avec tout type de particules métalliques et pourrait être couplé à des techniques de dépôt automatisé. Il peut constituer un substrat de choix pour des applications futures dans le domaine des biopuces et des biocapteurs pour la détection intégrée d'interactions spécifiques. Une façon d'optimiser encore plus cette méthodologie d'assemblage serait de fonctionnaliser directement le timbre structuré avec un contraste de tension de surface (couplage entre la topographie et une fonctionnalisation chimique hydrophile/hydrophobe du timbre), de manière à servir de support pour diriger l'assemblage capillaire des objets, tout en s'affranchissant de l'utilisation de surfactants potentiellement nuisibles aux entités biologiques. Dans le cas de l'ADN, nous pourrions imaginer fonctionnaliser des pointes AFM avec une séquence d'ADN complémentaire d'une séquence peignée en surface. Ainsi, par spectroscopie AFM nous pourrions vérifier si la reconnaissance spécifique a lieu et par extension si la fonctionnalité de l'ADN peigné et surétiré est préservée. En effet, la question se rapportant au surétirement des molécules demeure un point crucial à élucider. A terme, il serait intéressant de coupler ce dispositif d'assemblage capillaire avec un système fluide pour permettre l'assemblage de cellules également mais aussi pour la réalisation de tests biologiques en parallèle et directement sur puce.

En conclusion, l'objectif de cette thèse a été atteint. Au travers de cette thèse, nous avons créé une boîte à outils basée sur la lithographie douce et l'assemblage dirigé pour la réalisation de puces d'objets micro- ou nanométriques uniques de façon précise, fiable et à bas-coût, pour différentes applications dans le domaine de l'analyse médicale, des capteurs, de l'optique. La technique d'assemblage par forces de capillarité est avantageuse en raison de son efficacité, sa simplicité et du faible coût de mise en œuvre des expériences. Parmi toutes les variantes de cette technique, l'assemblage par forces de capillarité dirigé par des motifs topographiques offre une grande flexibilité de fabrication d'une diversité de structures de tailles et géométries bien définies et permet d'éviter le dépôt non spécifique des objets en dehors des motifs. Cet encrage de haute précision peut être réalisé à partir de faibles volumes et sur de larges étendues (1 cm²), de façon fiable, avec une bonne reproductibilité et avec un taux de réussite élevé. Le contrôle de quatre paramètres expérimentaux clés, à savoir la température, l'angle de contact grâce à l'ajout contrôlé de surfactant au sein de la solution d'assemblage, la vitesse de déplacement du substrat et la concentration des objets, apporte un contrôle total du mécanisme d'assemblage ayant lieu et permet d'entrevoir une augmentation de la complexité structurale des micro- ou nanosystèmes étudiés. La technique d'assemblage

capillaire peut également être utilisée pour assembler des objets fonctionnalisés directement en solution. La possibilité de transférer les assemblages du timbre vers une autre surface (verre ou silicium), confère à cette technique l'avantage d'être également compatible avec toutes les techniques de la microélectronique et avec tous les moyens de caractérisation.

Dans un contexte où il est question de la recherche de techniques rapides, grande échelle et bas-coût, cette technique représente une alternative intéressante à la technologie « Dip-Pen ».



« Polymer Pen Lithography » [F. Huo, Z. Zheng, G. Zheng, L. Giam, H. Zhang, and C. A. Mirkin, *Science* (2008), 321]

D'ailleurs, depuis la création du Dip Pen en 1999, Mirkin a suivi cette tendance et a récemment fait évoluer la technologie Dip Pen vers une technique parallèle, le « Polymer Pen Lithography » reposant sur les forces capillaires et la lithographie douce tout comme nous. Ce choix technologique prouve que le couplage de la lithographie douce avec l'assemblage par forces capillaires a de l'avenir et est très prometteur pour les applications de demain.

Ce travail de thèse a fait l'objet de plusieurs publications et d'actes de diverses manifestations scientifiques. La liste de ces ouvrages est jointe en annexe. D'autres travaux qui ne sont pas décrits explicitement dans ce mémoire ont également été menés et ont fait l'objet d'un dépôt de brevet.

Conclusion and Perspectives

To define the number, position, and distances of the objects on a surface, it is often necessary to direct their assembly by means of suitable pre-patterned substrates or stamps. Nanopatterned surfaces have been fabricated by nanoimprinting, microtransfer molding, pattern replication induced by an electric field, self-assembly. Most of these techniques rely on a soft mould or stamp, which render these techniques particularly attractive for their capability to cover large areas, with great efficiency and with upscale nanofabrication capacity.

In the frame of this Ph.D., we opened a wide range of applications. We focused our efforts on bacterial cells, DNA molecules and metallic nanoparticles as objects of study for various applications. For these three objects of interest, our main goal was to organize them along precise and pre-defined areas of a surface using simple, reliable, and low-cost techniques with single-object resolution. Among the existing assembly techniques, we chose the assembly induced by surface chemical contrast in the case of cells, and the assembly induced by surface topography in the case of molecules and particles. Both techniques rely on the use of a PDMS stamp. The unifying thread between these two techniques is soft-lithography, a flagship technique of the NanoBioSystems group.

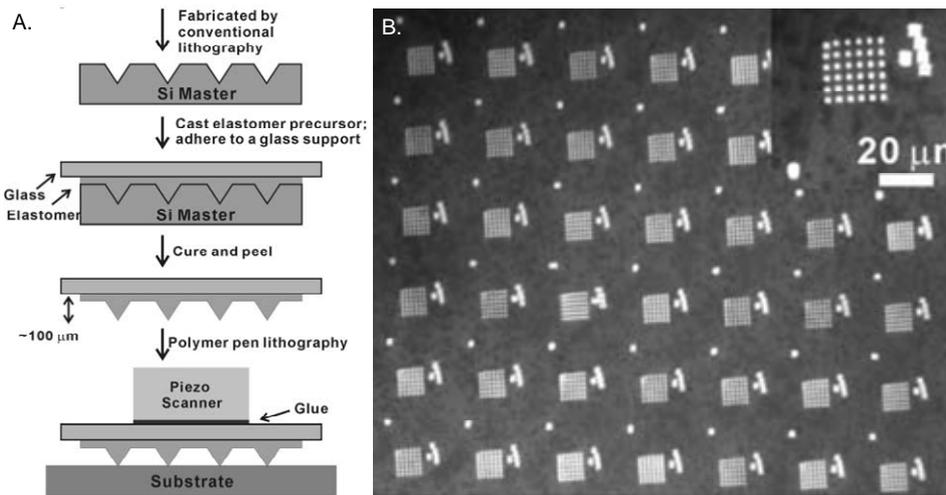
In the case of cells, we neither wanted to mechanically confine them nor expose them to air, by using a soft technique allowing us to preserve their viability. Following this route, we set a simple and reliable procedure that allows generating chemical patterns exhibiting different surface properties to induce the selective adsorption of treated and untreated bacterial cells onto pre-defined areas and in liquid media. This chemical engineering was prepared with the combination of soft lithography and a simple incubation technique. We evidenced the selective adsorption of cells on each one of these localized chemical patterns and we succeeded in generating ordered arrays of single and living cells with a success rate close to 100%. The substrates developed with chemical contrast by contact lithography are simple to fabricate and allow the assembly of cells while maintaining them in a liquid environment for the entire duration of the study. The dimensions of the patterns and the molecules used for the chemical functionalization are tunable depending on the application sought. Thanks to this controlled biopatterning, we were able to conduct different spectroscopy studies on single cells in a statistical manner.

DNA being a more robust biological entity, we employed a capillary assembly technique directed by surface topography. In fact, we performed the same technique in the case of metallic nanoparticles. Thanks to this method, we were able to assemble single stretched DNA molecules into highly ordered arrays on a surface. The DNA molecules are homogeneous in length and orientation, and are precisely positioned over an area of more than 1 mm² in just a few seconds. However, the capillary assembly seems to have a real influence on the molecules' stretching: this precise point deserves particular attention and thorough study. We extended and transposed this method to molecules with different sizes and to more complex systems such as DNA tethers. Through these experiments, we evidenced that this technique does not induce a selection in size of the objects, and allows the assembly of

heterogeneous solutions as well. The resulting assemblies, such as the continuous lines of DNA, could be used as 1D supports to build up or guide the assembly of objects more complex and difficult to assemble. Regarding metallic nanoparticles, we demonstrated that the regular nanostructures fabricated by capillary assembly induced by surface topography constitute efficient SERS substrates. The optically active substrates consist of periodic 2D matrixes of gold nanoparticle patterns with different arrangements. By means of Raman spectroscopy, we evidenced that the enhancement of the local electromagnetic field is greater in the case of aggregates than in the case of single nanoparticles. Dimers also provoke high enhancements of the signal but their SERS efficiency depends on their orientation. As a further step in this development, we demonstrated that this kind of substrate can be used to enhance conventional fluorescence as well. This optically active substrate can be generated very easily with any type of metallic particles and could be further coupled to automatized deposition techniques. It can represent a first choice substrate for future applications in the fields of biochips and biosensors for the integrated detection of specific interactions. A way to further improve this assembly methodology would be to directly functionalize the structured stamp with surface tension contrast (coupling between topography and hydrophobic/hydrophilic functionalization of the stamp), to direct the capillary assembly of objects, while avoiding the use of surfactants, potentially harmful for biological entities. In the case of DNA, we could imagine functionalizing the AFM tips with a DNA sequence that would be complementary of a sequence stretched and attached on the surface. Thus, by means of AFM spectroscopy, we could verify if the specific recognition takes place and, by extension, if the functionality of overstretched molecules is preserved. In fact, the question regarding the overstretching of the assembled molecules remains a crucial point to elucidate. Eventually, it would be interesting to couple this directed capillary assembly setup with a fluidic system to allow the assembly of cells but also to perform biological tests in parallel and directly on chip.

To conclude, the objectives of this Ph. D. thesis were reached. Through this Ph. D. thesis, we created a tool-box based on soft-lithography and directed assembly for the generation of chips with single micro- or nanometric objects in a precise, reliable and low-cost manner for various applications in the fields of medical analysis, sensors and optics. The assembly technique by capillary forces induced by topographic patterns offers great fabrication flexibility of various structures with well-defined size and geometry, and prevents non-specific deposition of objects outside the patterns. This high-precision inking can be performed with small volumes over large areas (1 cm²), in a reliable and reproducible manner and with high success rate. The control of four experimental key parameters, namely the temperature, the contact angle thanks to the controlled addition of surfactant systems inside the solution, the displacement speed of the substrate and the concentration of the objects, provides full control of the assembly mechanism taking place, and allows to foresee the increase of the overall structural complexity of micro- or nanosystems studied. The capillary assembly technique can also be used to assemble bulk-functionalized objects directly in solution. The possibility to transfer the assemblies from the stamp to any other surface (glass or silicon), invests this technique with the advantage of being compatible with all means of characterization.

In a context in which efforts are seeking to provide low-cost and high-throughput methods, this technique represents an interesting alternative to “Dip Pen” technology.



« Polymer Pen Lithography » [F. Huo, Z. Zheng, G. Zheng, L. Giam, H. Zhang, and C. A. Mirkin, *Science* (2008), 321]

In fact, since the creation of “Dip Pen” in 1999, Mirkin followed this tendency and recently made “Dip Pen” technology evolve toward a parallel technique called “Polymer Pen Lithography”, relying on capillary forces and soft-lithography such as we did in this study. This technological choice proves that the coupling between soft-lithography and assembly by capillary forces is really promising for tomorrow’s applications.

This Ph. D. thesis led to various publications and acts in different scientific manifestations listed hereafter. Other studies not reported explicitly in this thesis were also conducted and yielded the deposition of a patent.

Brevet : A. Cerf, E. Dague, C. Vieu, Procédé de prélèvement cutané à haute résolution spatiale destiné à la recherche et l'analyse biomédicale, déposé.

Publications :

- A. Cerf, X. Dollat, J. Chalmeau, A. Coutable, C. Vieu, *Journal of Materials Research Focus Issue on Self-Assembly and Directed Assembly of Advanced Materials* (2011), accepted
- A. Cerf, C. Vieu, *Biophysical Journal* (2010), 98(3), 758a
- A. Cerf, G. Molnar, C. Thibault, C. Vieu *ACS Applied Materials & Interfaces* (2009), 1(11), 2544-2550
- A. Cerf, C. Vieu *Colloids and Surfaces A.* (2009), 342(1-3), 136-140
- A. Cerf, E. Dague, J-C. Cau, C. Vieu *Langmuir* (2009), 25(8), 4607-4614 (highlighted in www.nanowerk.com)
- A. Cerf, C. Thibault, M. Geneviève, C. Vieu *Microelectronic Engineering* (2009), 86(4-6), 1419-1423 invited article (rank 3/467)
- A. Cerf, J-C. Cau, C. Vieu *Colloids and Surfaces B.* (2008), 65(2), p. 285-291
- J.C. Cau, A. Cerf, C. Thibault, C. Séverac, J. P. Peyrade, C. Vieu, *Microelectronic Engineering* (2008), 85(5-6), 1143-1146

Ouvrages :

- A. Cerf, C. Vieu, Chapitre dans ouvrage commun "Lithography" ISBN 978-953-307-064-3 (2009, IN-TECH, Editorial Colloquiums)

Communications orales (Congrès Internationaux) :

- Biophysical Society 54th Annual Meeting, 20-24 Février, 2010, San Francisco, CA.
- 3rd International Congress of NanoBiotechnology & Nanomedicine NanoBio, 22-24 Juin, 2009, San Francisco, CA.

Affiches :

- Journée « Les nanotechnologies en cancérologie : projets, applications cliniques et enjeux dans le GSO », Toulouse, France, 1^{er} Juillet 2010
- *NanoSWEC* Workshop "Bioinspired nanosystems and nanomaterials", Bordeaux, France, 2-4 Novembre, 2009
- 3rd ITAV Workshop, Toulouse, France, 25 Septembre, 2008
- 34th Micro and Nano Engineering Conference (MNE), Athènes, Grèce, 15-18 Septembre, 2008
- International Symposium on Molecular Materials Chemistry, Solid State Physics,

Theory and Nanotechnology (MOLMAT), Toulouse, France, 8-11 Juillet, 2008

- X Winter Workshop, Linz, Autriche, 15-19 Février, 2008

Critique d'articles :

- Applied Physics Letters (Août 2010)
- Journal of Physical Chemistry (Février 2010)
- Journal of Biomechanics (Octobre 2009)
- ACS Applied Materials & Interfaces (Octobre 2008)

TITRE : « Assemblage dirigé de nano-objets »

Un échange vigoureux au travers des frontières de la biologie et de la physique se développe autour de nouvelles méthodes et outils, et autour de nouveaux phénomènes. Les objets d'étude au cœur de ce recouvrement multidisciplinaire sont très divers. De manière non exhaustive, il s'agit de nanoparticules, de cellules ou encore d'objets encore plus petits et élémentaires tels que les molécules. Aussi bien pour des applications dans le domaine de la microélectronique que pour l'étude de mécanismes biologiques fondamentaux, l'intégration des objets d'intérêt à l'échelle de l'objet unique est essentielle. Dans le cadre de cette thèse, l'objectif que nous nous sommes fixés est de développer un volet technologique qui permette l'assemblage d'objets micro- ou nanométriques uniques à des endroits bien définis d'une surface solide de façon simple, fiable, bas-coût et parallèle. Pour ce développement, nous nous sommes intéressés tout particulièrement aux nanoparticules d'Or de 100 nm de diamètre, aux bactéries, puis aux molécules d'ADN. Nous décrirons les stratégies développées reposant sur la lithographie douce puis leurs potentialités pour différentes applications dans les domaines de l'analyse médicale et de la détection.

MOTS-CLE : Lithographie douce, assemblage capillaire, cellules, molécules d'ADN, nanoparticules, biopatterning, biodétection

TITLE : « Directed assembly of nano-objects »

A vigorous trade across the borders of biological and physical sciences is developing around new methods and tools, and around new phenomena. The objects at the heart of this multidisciplinary overlapping are numerous. In a non exhaustive manner, the objects of study can be nanoparticles, cells, or even smaller and more elementary objects such as molecules. For applications in the field of microelectronics as for studies of fundamental biological mechanisms, the integration of these objects of interest at the single object scale is essential. In the frame of this Ph.D. thesis, the objective we pursued is the development of a technological tool-box allowing the assembly of micro- and nano-objects at pre-determined locations of a solid surface, in a simple, reliable, low-cost and parallel manner. For this development, we focused on gold nanoparticles 100 nm in diameter, bacterial cells and DNA molecules in particular. We will describe the strategies developed relying on soft-lithography and their potentialities for different applications in the fields of medical analysis and sensing.

KEYWORDS: soft-lithography, capillary assembly, cells, DNA molecules, nanoparticles, biopatterning, biodetection