Dépôt de matière et formation de motifs sur une surface solide : Méthodes microfluidiques, Contrôle par forces capillaires et Génération de vésicules géantes.

Maël Le Berre

▶ **To cite this version:**

Maël Le Berre. Dépôt de matière et formation de motifs sur une surface solide : Méthodes microfluidiques, Contrôle par forces capillaires et Génération de vésicules géantes.. Autre. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT : . tel-00388698v2

HAL Id: tel-00388698

https://theses.hal.science/tel-00388698v2

Submitted on 27 May 2009

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité :
Chimie physique

Présentée par :
Maël LE BERRE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Dépôt de matière et formation de motifs sur une surface solide : Méthodes microfluidiques, Contrôle par forces capillaires et Génération de vésicules géantes

Soutenue le 9 Janvier 2009 devant le jury composé de :

Anne-Marie CAZABAT	Présidente
Jean-Pierre PEYRADE	Rapporteur
Valérie MARCHI-ARTZNER	Rapporteur
Miglena ANGELOVA	Examinatrice
Moussa HOUMMADY	Examinateur
Damien BAIGL	Co-Encadrant
Yong CHEN	Directeur de thèse

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données
Esc G, 2ème étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 42 34 69 54
Tél. pour les étudiants de EM à ME : 01 42 34 68 41
Tél. pour les étudiants de MF à Z : 01 42 34 68 51
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

à Béatrice,

à Noëmie...

Remerciements

C'est en 2004, deux ans avant le début de mon travail de thèse que j'ai eut la chance de rencontrer le Professeur **Yong Chen** pour un premier stage qui a été le révélateur de mon engouement pour la recherche. Il m'a alors soutenu et encouragé pour poursuivre un master de recherche à l'université Paris XI, puis une thèse au sein de son nouveau laboratoire. Depuis le premier jour de notre rencontre, il m'a aidé et conseillé, tout en me laissant la liberté d'orienter moi-même mes travaux de recherche. Je lui dois ma formation de chercheur, ma situation de scientifique, et mon avenir professionnel. Pour ces raisons et bien d'autres encore, Je lui en serai reconnaissant tout au long de ma carrière. J'espère aujourd'hui que mon devenir scientifique sera à la hauteur de la confiance qu'il a pu m'accorder.

J'ai eut la chance tout au long de ce travail de thèse au parcourt sinueux, de profiter d'un environnement d'exception. Tout d'abord un environnement géographique au sein de l'**École Normale Supérieure**, lieu d'excellence de la recherche française dont j'ai pu bénéficier du dynamisme scientifique. Dans ce cadre, je remercie plus particulièrement **Christian Amatore** qui dirige l'**UMR 8640** du **CNRS** et à qui revient le choix d'accueillir le groupe « **Microfluidique, Auto-Organisation et Nanotechnologie** », dit **Nanoflux**, dirigé par Yong Chen. Par sa situation géographique au cœur de la montagne sainte Geneviève, ce groupe au croisement des différentes disciplines que sont la technologie, la physique, la chimie et la biologie est le lieu idéal pour développer une approche interdisciplinaire réactive, qui j'en suis convaincu, sera de plus en plus nécessaire au développement d'une recherche originale. Je remercie également l'**École Doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre** (ED388) de l'**Université Pierre et Marie Curie** (UPMC, Paris VI) qui m'a accueilli en tant qu'étudiant et m'a permis de soutenir cette thèse.

Au-delà de mon laboratoire d'accueil, Je tiens également à remercier les autres laboratoires qui m'ont à diverses reprises ouvert leurs portes. Je pense principalement au **Laboratoire de Photonique et Nanostructure**(CNRS-LPN), grande centrale technologique d'Ile de France, mais également au département de biologie de l'ENS, à l'ESPCI, au Collège de France et à l'Université Paris VII. J'ai pu également bénéficier d'un environnement économique favorable grâce à divers financements publiques et privés. Les projets européens **NABIS** et **NAPA** dans un premier temps, puis la **fondation EADS** avec l'indispensable participation de l'**institut ENS**, m'on permit d'une part d'être rémunéré pendant ces trois ans et demi de thèse et d'autre part de financer une grande partie du matériel nécessaire à mes travaux de recherche. L'**ANR** et le projet franco-japonais **ICORP** ont également permis au laboratoire d'acheter des équipements indispensables dont j'ai pu bénéficier.

Au sein de cet environnement, ma connaissance et ma production scientifique se sont développées grâce à de nombreuses personnes aux compétences variées et complémentaires.

Les personnes qui ont été les plus proches et les plus influentes auront également été les plus proches de mon cœur. **Guilhem Velve Casquillas**, ami depuis toujours et ami pour toujours, qui a partagé ma thèse, dont j'ai partagé la sienne, pour le meilleur et pour le pire et avec qui j'étais sure d'aller jusqu'au bout. **Cécile Crozatier** avec qui j'ai formé une équipe de choc pour monter les premières pierres d'un laboratoire naissant, avec qui j'ai découvert les joies et les déboires de la vie de laboratoire et avec qui j'ai construit le concept de micro-aspiration qui nous a valu de grands moments d'euphories. **Adrien Plecis** le grand capitaine qui a bien mené sa barque et a toujours eut une opinion bien sentie à partager. Et enfin **YanJun Liu**, qui nous a tant aidé lorsque nous étions perdu en Chine et pour qui je garderais une profonde amitié.

Je tiens également à remercier tous les autres membres de l'équipe Nanoflux que j'ai côtoyé plus ou moins longtemps et avec qui j'ai pu accumuler au cours de ces dernières années des centaines de manip et des milliers de conversations. Parmi eux, il y a bien évidement des compagnons thésards **Antoine Diguet** l'orchestrateur de gouttes en tout genre, **Marie Geofroy** l'organicienne spécialiste des surfactants photosensibles et des odeurs de poisson pourri, **Jian Shi** l'imprimeur avec qui j'ai fais la manip la plus rapide de l'histoire du labo, **Malika Lounaci** le cristal berbère qui a aspiré bien plus longtemps ses solutions de protéine et qui apporte un rayon de soleil dans le laboratoire, **Lei Lei** le LASER du Hubei qui a pris ma succession dans le laborieux travail de veilleur de salle blanche, **Lucia Cinque** la peigneuse italienne avec qui je rêve encore de tirer des gouttes dans le noir et **Wang Lee** la fonceuse qui n'abandonnera jamais. Il y a aussi les gens de passages : **Alice démarrez** qui aurait bien voulu que l'on arrive à coincer ses bactéries, **Claire Ribault** qui m'a appris l'indispensable art de découper les embryons de rat. Et bien d'autres encore : **Xiaofeng Ni** , **Issa Topsoba**, **Lu Ping Xu**, **Dr. Joe**, **Christophe**, **Lydia**, **WeiHua Huang**, **Shshang Guo** et les autres.

Je remercie également le **Pr. Yoshikawa** de l'université de Kyoto au Japon et le **Pr. Pang** de l'université de Wuhan en Chine qui on eut la gentillesse de m'inviter pour séjourner dans leur laboratoire respectif. Ces deux expériences dans des pays de culture radicalement différente resteront inoubliables.

Je remercie ensuite les personnes d'autres laboratoire qui m'on formé à des techniques spécifiques ou rendu de précieux services. Parmi eux je remercierais plus particulièrement **Marie-Alice Guedeau-Boudeville** qui m'a appris l'électroformation, **Anne-Marie Haghiri-Gosnet** qui m'a accepter avec mes fioles dans son laboratoire **Laurent Malaquin** qui m'a former sur son setup de retrait de ménisque, **Yvette Tran** qui m'a gentiment formé à l'ellipsométrie et à utiliser la cuve de Langmuir de l'ESPCI, **Thomas Le saux** avec qui j'ai pu tester quelques manips d'optique sur le bord de sa paillasse, manips qui n'ont malheureusement pas eut le temps de voir le jour.

Je n'oublierai pas de remercier toutes les personnes que j'ai côtoyé, dont le travail moins scientifique est plus qu'indispensable au fonctionnement du laboratoire et dont la compagnie a été un réel plaisir pendant ces trois ans : **Anne Halloppe**, **Cendrine Faure**, **Denise de peindraie**, **Jef**, les membres du club d'œnologie du COS et tout les autres.

Je remercierais également les membres de mon Jury qui ont accepté de juger

mon travail de thèse dans des conditions plutôt périlleuses. **Miglena Angelova**, mère de l'électroformation qui a accepté de rapporter ma thèse et s'est investi dans son travail avant que son statut de professeur Paris 6 ne l'en empêche, **Valérie Marchi-Artzner**, spécialiste de l'auto-assemblage, qui a accepté de remplacer Miglena et d'écrire un rapport en un temps record et **Jean Pierre Peyrade** également rapporteur dont on ne peut remettre en cause son expertise sur les technologies de pointe. **Moussa Hoummady** dont la culture du transfert donne d'autres ouvertures à nos travaux de recherche et **Anne-Marie Cazabat**, référence dans le domaine du mouillage, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence.

Enfin, je remercie toute ma famille, mes sœurs **Anaïs** et **Maëva**, mes parents **Youenn** et **Magali** qui m'ont supporté moralement et que j'aime pardessus tout, **Gwen**, **Maëlle** et **les andouilles** qui sont venus de loin pour me voir le jour fatidique et n'ont pas raté leur effet, **Mammig** et **Tanis**, mes derniers grands parents, témoins de mon histoire et bien avant.

Enfin, je remercie mes amis, plus particulièrement **Jerem** qui a su supporter mes nuits sulfureuses de fin de thèse lorsque je me couchais à son réveil et su absorber mes conversations fiévreuses le soir quand je me levais alors qu'il se couchait. **Béatrice** pour sa disponibilité infaillible lorsqu'elle est nécessaire. Et aussi **Joey**, **Alex**, **Zhara**, **Catherine**, **Gros**, **Raf** et tous les autres pour leur présence au jour le jour.

Je finirais par remercier profondément celui qui m'a certainement le plus apporté dans cette aventure, celui qui a été mon modèle, celui qui à su communiquer un second souffle à ma thèse celui avec qui j'ai travaillé activement pendant les 18 dernier mois de ma thèse. **Damien Baigl**. Il m'a appris le travail, la rigueur, l'écriture, la passion du fondamental et bien d'autre choses. Mais surtout j'ai rencontré chez lui une amitié qui va bien au-delà de la science.

Table des matières

Avant-propos **1**

I Microfluidique et dépôt de matière **3**

1 Introduction **5**
1.1 Fonctionnalisation locale de surface 7
1.2 Méthodes de moulage micro et nano 9
1.3 Organisation spontanée contrôlée 9

2 Assemblage réversible **11**
2.1 Principe 12
2.2 Modèle 12
2.3 Simulation 16
2.4 Caractérisation 20
2.5 Conclusion 25

3 Fabrication de motifs de protéines **27**
3.1 Traitements de surface par assemblage réversible 27
3.2 Microcontact printing 30
3.3 Microcontact printing multicouleur 32
3.4 Application à la culture cellulaire 35
3.5 Conclusion 38

4 Fabrication de motifs d'autres types de matière **39**
4.1 Contrôle indirect des liquides 39
4.1.1 Principe 40
4.1.2 Exemples de réalisations 41
4.1.3 Analyse théorique 45
4.1.4 Caractérisation 49
4.2 Moulage par microaspiration 55
4.2.1 Exemples de moulage 57
4.2.2 Discussions 60
4.3 Transfert de matière monolithique 62
4.4 Conclusion 65

II Microfluidique et fabrication de vésicules géantes 67

1 Les vésicules unilamellaires géantes 69
1.1 Les vésicules . . . 70
1.1.1 Les phospholipides . . . 70
1.1.2 Des phospholipides à la vésicule . . . 71
1.2 Applications des vésicules . . . 73
1.2.1 Applications thérapeutiques . . . 73
1.2.2 Cellules artificielles . . . 74
1.2.3 Réacteur chimique . . . 75
1.3 Les méthodes de fabrication . . . 77
1.3.1 La fabrication de vésicules . . . 77
1.3.2 Méthodes de fabrication des SUV et LUV . . . 79
1.3.3 Méthodes de fabrication des GUV . . . 79
1.3.4 L'électroformation . . . 80
1.3.5 La Microfluidique pour la fabrication des GUV . . . 84
1.4 Conclusion . . . 87

2 Electroformation de vésicules de taille contrôlée 89
2.1 Méthode de caractérisation de la taille des vésicules . . . 90
2.1.1 Analyse des images par seuillage . . . 90
2.1.2 Analyse des images par analyse des contours . . . 91
2.1.3 Analyse des images par transformée . . . 96
2.2 Influence des paramètres de gonflement . . . 101
2.2.1 Influence de la température . . . 101
2.2.2 Influence du temps de gonflement . . . 101
2.2.3 Influence de la nature de la surface . . . 103
2.3 Contrôle de la taille par masquage de l'électrode . . . 115
2.4 Contrôle de la taille par patterning du phospholipide . . . 115
2.4.1 Patterning par micro-contact printing . . . 115
2.4.2 Patterning par moulage . . . 122
2.4.3 Patterning par instabilités de mouillage . . . 124
2.5 Discussion . . . 126
2.6 Conclusion . . . 127

3 Le dépôt de films de phospholipide multilamellaires 129
3.1 Les méthodes de fabrication des films . . . 131
3.1.1 Les méthodes couche par couche . . . 131
3.1.2 Les méthodes en une étape . . . 133
3.2 Les méthodes de caractérisation . . . 134
3.2.1 Ellipsométrie . . . 135
3.2.2 Microscopie à force atomique . . . 138
3.2.3 Microscopie en réflexion . . . 139
3.2.4 Microscopie en épifluorescence . . . 140
3.3 Le retrait de ménisque . . . 143
3.3.1 Principe . . . 143
3.3.2 Mise en œuvre . . . 144
3.3.3 Dépôt uniforme . . . 145
3.3.4 Dépôt de motifs par instabilité de mouillage . . . 161
3.3.5 Dépôt de motifs par guidage capillaire . . . 168

3.4 Conclusion 173

4 De la vésicule à la cellule artificielle 175
4.1 Insertion d'ADN génomique 177
4.2 Suivi de l'expression de GFP dans des GUV 179
4.2.1 Encapsulation et suivi du système d'expression 181
4.2.2 Suivi des vésicules par analyse d'image 183
4.2.3 Expression de GFP et variabilité dans les liposomes . . . 185
4.2.4 Conclusion 189
4.3 Conclusion 192

Conclusion générale 193

Annexes 196

A Autres applications de la microaspiration 199
A.1 Gravure locale par assemblage réversible 199
A.2 Cristallisation de protéines sur puce. 201

B Procédés technologiques de microfabrication 203
B.1 Photolithographie 203
B.2 Lithographie molle 205
B.3 Traitements de surface 207

C Méthodes pour l'expression de protéines 209

Bibliographie 213

Publications 225

Nomenclature 229

Index 232

Avant-propos

Depuis homo faber, l'homme transforme la matière pour en fabriquer des outils. Pour en augmenter la complexité, il a réduit leur taille jusqu'à l'extrême et est capable aujourd'hui de loger plusieurs milliards de composants dans des puces de quelques millimètres carrés. Pourtant, les fonctions de ces objets restent limitées face à celles des êtres vivants, car derrière la complexité des objets fabriqués se cache une matière figée. D'un autre côté, la vie a développé une myriade de fonctions élémentaires interagissant dans un système hiérarchisé. La matière dont elle est composée fluctue, évolue et s'adapte à son environnement. Le scientifique d'aujourd'hui tente ainsi de reproduire, comprendre et contrôler les propriétés uniques de la matière vivante.

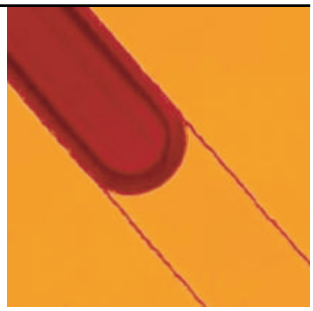
Avec le développement récent de la microfluidique, une des approches les plus fructueuses est la miniaturisation et l'intégration des outils d'analyse à l'échelle de l'objet biologique. Actuellement, un grand intérêt est ainsi porté à la fabrication de substrats et dispositifs permettant de contrôler l'environnement des cellules à leur échelle. Le contrôle statique de cet environnement passe par la fonctionnalisation de surfaces. Associé à la microfluidique, un contrôle dynamique du microenvironnement cellulaire est possible et permet d'étudier le comportement des cellules au cours de leur développement. De plus, l'ingénierie de surfaces bioactives est cruciale pour le développement des techniques bioanalytiques. Par exemple, la capacité des puces à ADN reste limitée par la densité d'intégration des oligo-nucléotides sur leur surface. Au-delà de la réalisation de substrats, le contrôle de l'organisation de molécules biologiques sur des surfaces pourrait permettre de contrôler la reconstitution biomimétique de structures cellulaires. L'objet de cette thèse est donc le développement de méthodes de dépôt et d'organisation de matière sur une surface solide pour la biologie.

Dans une première partie, nous présenterons des méthodes microfluidiques originales de dépôt de matière adaptées à la fragilité des objets biologiques mis en jeu. Nous aborderons la fabrication de motifs de protéines sur une surface, en utilisant des assemblages microfluidiques réversibles permettant d'obtenir une grande variété dans la composition des motifs déposés. Enfin, nous montrerons, par une méthode similaire, la possibilité de mouler des matériaux d'intérêt biologique tels que des gels et des nanoparticules.

Dans la seconde partie, nous étudierons spécifiquement l'organisation de molécules de phospholipide sur des substrats solides et son application à la formation contrôlée de vésicules géantes. Tout d'abord nous établirons le rôle de l'organisation des films sur la taille des vésicules obtenues par électroformation. Nous mettrons en évidence les modes d'organisation de phospholipides déposés à partir d'un ménisque en déplacement sous évaporation. La dernière partie sera consacrée à l'application des vésicules comme mimes de cellules.

Première partie

Microfluidique et dépôt de matière



Chapitre 1

Introduction

A partir des années 60, le développement de la microélectronique a fait naître de nombreuses technologies permettant de fabriquer des structures solides de taille micrométrique et faites de matériaux inorganiques [1]. La fabrication de ces structures débute à partir d'un substrat plan, généralement une galette monocristalline de semi-conducteur. On y dépose des matériaux par différentes méthodes dont les plus courantes sont l'évaporation thermique, la pulvérisation cathodique, le dépôt chimique en phase vapeur (CVD), l'épitaxie à jet moléculaire (MBE), l'électrodéposition ou encore le spin-coating.

Cette dernière technique est plus particulièrement utilisée comme support de nombreux procédés lithographiques qui permettent de définir des motifs sur le substrat. Le spin-coating consiste à faire tourner à haute vitesse le substrat, sur lequel est déposée au préalable une certaine quantité de résine liquide. La conjonction des forces visqueuses et centrifuges permet d'obtenir une couche d'épaisseur homogène dont l'épaisseur dépend entre autres de la viscosité de la résine et de la vitesse de rotation.

La couche de résine obtenue peut être lithographiée de différentes manières en fonction de la résolution voulue et de la résine utilisée (par exemple lithographie X, à faisceau d'électrons ou d'ions, ou encore lithographie par nanoimpression.). La plus courante de ces techniques est la photolithographie qui consiste à reproduire dans une couche de résine photosensible les motifs définis sur un masque optique par un procédé photographique. Dans cette technique, la couche de résine est insolée par des UV à travers un masque optique. Après développement, seules les zones insolées (ou non insolées pour les résines négatives) sont éliminées. Les motifs formés peuvent ensuite être transférés dans la couche inférieure par un procédé de gravure qui peut être humide par exemple avec un acide ou sec en utilisant un plasma.

L'ensemble de ces technologies permet de réaliser des structures complexes aux propriétés électroniques variées qui sont utilisées dans les puces électroniques comme les microprocesseurs. Dans les années 80, ces technologies ont commencé à être appliquées à d'autres domaines que celui de l'électronique, et plus particulièrement pour l'intégration d'éléments électromécaniques. Ces composants regroupés sous l'acronyme MEMS (Micro Electro Mechanical System) ont donné lieu à de nombreuses applications industrielles pour la fabrication de micro-capteurs de pression, d'accéléromètres, de têtes d'impression d'imprimantes à jet d'encre, de filtres radiofréquences ou encore des rétroprojecteurs

DLP.

Depuis les années 90, ces technologies ont été adaptées pour répondre à des problèmes dans le domaine des sciences du vivant avec l'apparition des bio-MEMS et de la microfluidique qui trouve de nombreuses applications dans des domaines comme la chimie analytique [2] ou la biologie cellulaire [3]. Ceci a permis le développement de nouveaux outils d'analyse et de séparation ayant une plus grande capacité d'intégration, et a permis de profiter de systèmes de taille micrométrique pour manipuler les cellules vivantes. Ce domaine de recherche a alors fait naître le concept de laboratoire sur puce qui vise à intégrer de nombreux éléments d'analyse et de manipulation des objets biologiques sur une même puce, pour accélérer, paralléliser et faire baisser les coûts des expériences des sciences du vivant.

Pour fabriquer certains éléments de ces laboratoires intégrés, les technologies issues de la microélectronique ne sont pas toujours adaptées. En effet, ces technologies traditionnelles sont souvent incompatibles avec la fabrication de structures impliquant des matériaux mous organiques, ou d'intérêt biologique. Ces derniers sont généralement composés de macromolécules organiques dont la structure chimique est relativement fragile. Cette nature rend leur dépôt généralement incompatible avec la plupart des procédés microtechnologiques. Par exemple, l'évaporation thermique implique des températures trop élevées pour conserver l'intégrité de ces molécules ; de plus, les solutions utilisées pour le développement des résines lors des photolithographies sont généralement composées de bases fortes qui peuvent facilement hydrolyser certaines biomolécules. D'autre part, les propriétés de certaines de ces molécules, par exemple les propriétés des protéines, sont souvent liées à une conformation moléculaire particulière qui repose sur des liaisons faibles, hydrogène, hydrophobe, dipole-dipole ou ionique. L'énergie de cohésion de ces liaisons est faible ce qui interdit l'utilisation de procédés impliquant des températures dépassant les 50-100°C. De plus, leur force dépend de l'environnement de solvatation, ce qui interdit leur déshydratation, donc l'utilisation de procédés impliquant des solvants organiques ou une étape sous vide. Finalement, ces matériaux sont facilement pollués et difficiles à nettoyer pour les raisons de fragilité déjà citées. L'impact du contact des résines et autres matériaux est peu connu sur les propriétés des biomolécules, mais on peut s'attendre à des effets néfastes. Enfin, la fabrication de puces dédiées à manipuler des cellules vivantes nécessite l'utilisation de matériaux biocompatible, c.-à-d. ne provoquant pas de rejets immunitaires, et dans certains cas l'utilisation de matériaux perméables aux gaz pour permettre aux cellules de respirer.

Vers la fin des années 90, l'ensemble de ces contraintes a fait apparaître dans le panel des outils microtechnologiques de nouveaux matériaux plus adaptés, comme le polydiméthylsiloxane (PDMS). Ces matériaux sont arrivés associés à de nouvelles technologies de fabrication non conventionnelles, souvent basées sur des principes de moulage ou de transfert, comme la lithographie molle et le micro-contact printing, plus adaptées à la structuration de matériaux mous, fragiles, plus respectueuses des propriétés de surfaces et plus adaptées à la manipulation de molécules biologiques. La microfluidique, en tant que science qui s'intéresse aux mouvements des fluides à l'échelle micrométrique, est *a priori* un bon candidat pour organiser la matière sur des surfaces solides. Elle offre la possibilité de confiner et de guider la matière en solution à l'échelle micrométrique. Ce guidage ne nécessite pas un environnement agressif et n'implique

pas l'utilisation d'étapes multiples mettant en contact la structure réalisée avec d'autres fluides qui pourraient être contaminants. Nous avons exploré lors de cette thèse certaines possibilités qu'offre cet outil pour réaliser des motifs de matière sur une surface solide.

Il n'existe pas de domaine identifié de la microfluidique qui traite du dépôt de matière sur les surfaces, mais en consultant la littérature, on retrouve cette science dans plusieurs circonstances faisant appel à des principes de dépôts différents. On peut regrouper ces technologies en au moins trois grands thèmes : i) Le contrôle local de la chimie de surface et plus particulièrement la fonctionnalisation des surfaces par des biomolécules ; ii) Le moulage iii) L'autoorganisation de matériaux à l'aide de phénomènes capillaires.

Ces trois thèmes seront abordés dans les différents chapitres de ce manuscrit pour répondre à des problèmes particuliers. Les paragraphes suivants introduisent brièvement leurs problématiques ainsi que l'état de l'art dans ces domaines.

1.1 Fonctionnalisation locale de surface

De nombreuses technologies ont déjà été proposées pour fonctionnaliser localement des surfaces avec des biomolécules. D'un côté, on a cherché à adapter les technologies de lithographie conventionnelle, en développant des procédés de chimie de surface permettant de greffer des molécules sur des motifs préétablis [4]. L'inconvénient de ces méthodes est leur manque de souplesse. Pour chaque nouvelle molécule, le procédé doit être adapté. D'un autre coté, on est revenu à des technologies plus triviales pour faire face à la demande de ce type de substrat. Par exemple, la méthode la plus utilisée est sûrement l'impression par « spotter » . Dans ce cas, des microgouttes de solutions contenant les molécules d'intérêt sont déposées sur la surface à l'aide d'un robot. Cette technique, qui permet d'imprimer un grand nombre de molécules différentes sur une surface, est largement utilisée pour déposer les milliers d'oligonucléotides nécessaires à la fabrication des puces à ADN [5]. En revanche, sa résolution est limitée à quelques dizaines de micromètres et la forme des motifs réalisés est généralement limitée à un disque. Pour augmenter la résolution, les procédés d'impression ont été miniaturisés en utilisant des systèmes à jet d'encre comme on en trouve dans les imprimantes [6] ou à grâce à la lithographie « dip pen » qui permet de fabriquer des motifs de taille nanométrique en utilisant une micro-pointe qui, balayant le substrat, dépose la molécule dans son solvant par capillarité [7]. Ces procédés séquentiels sont souples et permettent d'atteindre dans certains cas les résolutions nanométriques, mais sont limités par leur vitesse de production, ce qui n'en fait pas de bons candidats pour l'intégration à très grande échelle et à bas coût.

On a cherché alors à développer des méthodes de lithographie non-conventionnelles comme le « microcontact printing » (μCP). Cette technique simple et souple a permis d'envisager la fabrication de substrats contenant des motifs de biomolécules à bas coût. Les molécules sont dans ce cas déposées sur un tampon pouvant contenir n'importe quel motif, puis transférées sur le substrat lorsque ce dernier est mis en contact avec le tampon (figure 1.1B). Malheureusement, cette technique ne permet d'obtenir des motifs que d'un seul type de molécule sur le substrat en une étape et le matériau du tampon est susceptible de contaminer

le motif déposé. Pour pallier ces inconvénients tout en conservant une méthode parallèle, l'introduction de la microfluidique est pertinente car elle peut confiner les liquides à des échelles sub-micrométriques. La mise en contact du liquide directement avec le substrat doit alors se faire dans des canaux temporaires pour pouvoir recouvrer le substrat après la mise en contact du liquide. En utilisant la seule interaction de Van der Walls entre le substrat et un dispositif en PDMS contenant des canaux microfluidiques, Delamarche *et al.* ont proposé de faire circuler le liquide contenant la molécule à déposer par capillarité [8] et l'équipe de Whitesides utilise des pressions négatives pour l'injection des liquides pour éviter le décollage du dispositif [9, 10]. Mais les premières souffrent de limitations liées aux phénomènes capillaires (résolution, contrôle des débits dans les canaux) et les autres sont trop compliquées à mettre en œuvre pour une utilisation routinière.

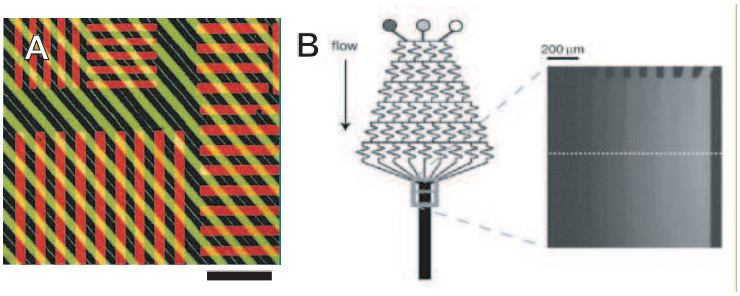


FIGURE 1.1 – Dépôt de protéines. A) Impression de protéines par applications successives de deux tampons de microcontact printing ; le rouge et le vert indiquent la fluorescence de deux protéines différentes. Extrait de [11]. La barre représente 50 µm. B) En utilisant un dispositif microfluodique, il est possible de fabriquer des gradients de concentration de protéines. Extrait de [12]

De plus, la microfluidique permet d'avoir un contrôle spatial de la composition des liquides. En effet, deux liquides mis en contact dans un canal microfluidique se mélangent peu. Les petites dimensions mises en jeu dans les dispositifs microfluidiques impliquent un faible nombre de Reynolds, donc des écoulements en flux laminaires dont les lignes de flux restent ordonnées. Le mélange entre les différentes zones de la section d'un canal ne se fait que par diffusion, ce qui permet de contrôler la composition spatiale d'un écoulement le long de sa section. Cette propriété permet, par exemple, de construire des gradients de concentration de molécules dans la direction transverse à la direction du flux (figure 1.1B). Il est alors possible de reporter ces gradients sur la concentration surfacique des molécules adsorbées pour former des motifs de composition complexe ayant une évolution spatiale progressive de leurs propriétés [9].

Pour étendre les possibilités de ces fonctionnalisations de surface, une nouvelle méthode d'assemblage réversible, basée sur la micro-aspiration, sera présentée dans le deuxième chapitre. Cette méthode sera appliquée au cours du troisième chapitre au dépôt de protéines sur des substrats de verre, sous forme de motifs et de gradients.

1.2 Méthodes de moulage micro et nano

Les technologies de moulage ont connu un développement important pour les micro-technologies à partir de 1995 avec l'apparition de la lithographie par nanoimpression [13, 14]. Face à la course à la miniaturisation, cette technologie qui permet de reproduire rapidement des structures sub-micrométriques était, et reste, une bonne candidate pour remplacer les méthodes de photolithographie dont la résolution est limitée par la diffraction de la lumière, tout en conservant une cadence de production élevée. Le regain d'intérêt des technologies de moulage s'est ensuite confirmé avec l'apparition de la lithographie molle [15]. Les techniques de moulage sont particulièrement intéressantes pour la fabrication de structures impliquant des matériaux exotiques car elles sont peu limitées par le matériau à structurer.

Néanmoins, les techniques de moulage souffrent encore de certains défauts. L'obtention de réplicats homogènes sur de grandes surfaces et sans défauts reste délicate. Un des problèmes rencontrés est notamment l'évacuation des bulles qui peuvent rester enfermées entre le moule et le substrat [16].

D'autre part, la fabrication de motifs sur des surfaces peut difficilement être obtenue avec une seule étape de moulage par pression du moule sur le matériau à mouler. En effet, l'évacuation de la matière à partir des zones compressées est d'autant plus lente que la quantité de matière restante est faible et il est quasiment impossible d'éviter la présence d'une couche résiduelle après pression du moule. L'élimination de cette couche résiduelle peut alors être problématique pour certains matériaux.

Pour éviter ce problème de couches résiduelles, un moule en élastomère, ayant la capacité de créer un contact conforme avec le substrat peut être placé avant d'injecter le matériau. Il peut alors être rempli par capillarité, c'est la technique MIMIC (MIcroMolding In Capilaries) [17]. Cette méthode de moulage peut poser des problèmes d'évacuation de l'air enfermé dans le moule. Folch et al. ont alors proposé d'aspirer l'air contenu dans le moule en utilisant une seringue [18]. Si cette technique fonctionne dans de nombreux cas, elle ne garantit pas que toutes les cavités du moule soient remplies.

Dans le chapitre 4.2 nous proposerons, pour pallier ces difficultés, une nouvelle méthode utilisant la micro-aspiration pour évacuer l'air à travers les parois d'un moule en PDMS. Nous montrerons que cette méthode permet de compléter les techniques déjà existantes de moulage comme la nanoimpression UV molle et le micro-moulage capillaire pour obtenir une bonne homogénéité et une vitesse de moulage accrue.

1.3 Organisation spontanée contrôlée

L'approche microfluidique classique reste néanmoins trop invasive pour certaines applications qui nécessitent la fabrication de motifs sur une surface solide. Nous verrons dans la seconde partie, à travers la fabrication de motifs de phospholipide pour la formation de vésicules, que le respect d'une auto organisation fine dans un niveau hiérarchique inférieur n'est pas compatible avec les contraintes mécaniques imposées par l'assemblage et le désassemblage d'un dispositif. Dans cette situation, une approche possible est d'utiliser les phénomènes microfluidiques spontanés pour guider la matière vers une certaine organisation

microscopique sans utiliser la contrainte mécanique d'un dispositif.

Cette approche peut être obtenue avec la méthode de dépôt du retrait de ménisque, qui consiste à déplacer sur un substrat le ménisque d'une goutte de solution en situation d'évaporation. Cette méthode de dépôt a été largement utilisée auparavant pour assembler des micro et nano particules [19]. Elle permet, d'assembler des réseaux réguliers de particules sur une surface ou de les organiser dans des structures préétablies sur le substrat (figure 1.2B). Plus récemment, la formation d'instabilités lors de l'évaporation de solutions de polymères a été observée, formant des motifs très réguliers de polymère sur le substrat [20, 21, 22] (figure 1.2A). Ce phénomène est encore mal expliqué, mais la littérature donne quelques pistes pour sa compréhension théorique [21, 22, 23]. Plusieurs interprétations ont été proposées, mais à notre connaissance aucune d'entre elles ne semble encore donner une explication satisfaisante pour maîtriser le phénomène.

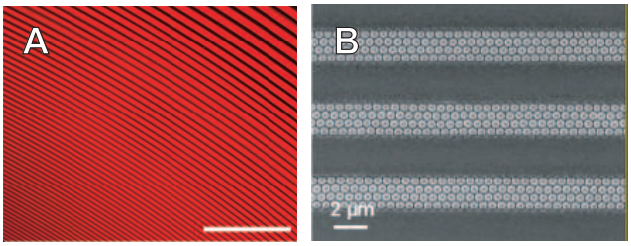
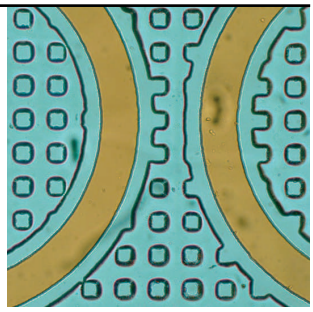


FIGURE 1.2 – Dépôt par la méthode du retrait de ménisque. A) mono-couche de nanobilles assemblées par assemblage capillaire dans des microstructures. Extrait de [19] B) Anneaux concentriques de polymère fluorescent issus de l'instabilité d'un ménisque sous évaporation. Extrait de [21]. La barre représente 200 µm.

Nous étudierons pour la première fois dans le chapitre 3 de la deuxième partie, la possibilité d'utiliser cette méthode pour déposer des molécules biologiques. Dans cette deuxième partie, qui traite principalement du contrôle de la taille de vésicules unilamellaires géantes lors de leur fabrication par électroformation, le dépôt de phospholipide par retrait de ménisque sera mis en œuvre pour réaliser des films multilamellaires uniformes dans un premier temps, et suivants des motifs dans un deuxième temps. Ces motifs seront réalisés : soit en guidant la matière par des microstructures, soit en profitant de phénomènes d'instabilités aboutissant à la formation spontanée d'une grande variété de motifs.



Chapitre 2

Assemblage réversible

L'aspiration est utilisée quotidiennement dans les activités industrielles et de recherche. Par exemple, elle permet de manipuler très simplement les grandes surfaces vitrées dans les travaux de construction. La force de préhension de ces manipulateurs est proportionnelle à l'intensité du vide et à la surface totale d'aspiration. Aux échelles microscopiques, cette force reste substantielle et peut mener à des applications intéressantes. Dans cette section, nous avons utilisé une technique de micro-aspiration pour l'assemblage de dispositifs microfluidiques. Contrairement aux techniques de soudure chimique ou thermique, qui sont généralement utilisées pour sceller les dispositifs [24, 25], l'assemblage basé sur la micro-aspiration est réversible, tout en conservant la possibilité d'injecter des pressions relativement grandes dans les canaux sans provoquer de fuites. L'utilisation de cette technique est particulièrement efficace en conjonction avec des matériaux mous comme le PDMS, grâce à la capacité de ces derniers à créer un contact conforme avec le substrat, donc une bonne étanchéité.

Un nombre important de dispositifs microfluidiques est réalisé à partir de puces en PDMS assemblées sur des substrats de verre [26]. Pour sceller le dispositif, la surface du PDMS et celle du verre sont soumises à un traitement plasma avant de les mettre en contact. Ensuite, par activation thermique, le PDMS est collé de manière irréversible donc le dispositif ne peut être désassemblé par la suite. Pourtant, dans certains cas, il peut être intéressant d'accéder à la partie intérieure du dispositif après son utilisation. Pour outrepasser l'irréversibilité de ce type d'assemblage, la micro-aspiration peut être utilisée pour maintenir temporairement la puce en PDMS en contact conforme sur le substrat par effet ventouse. Pour cela, une cavité de vide, composée d'un réseau de canaux croisés (RCC), est insérée autour des canaux microfluidiques. Après avoir placé un tel dispositif en PDMS sur le substrat, une force d'adhésion est générée par la chute de pression dans la cavité mentionnée ci-dessus : le dispositif est étanchéifié. Dès que le vide est cassé, le dispositif peut être désassemblé en décollant simplement la couche de PDMS de son substrat.

Ce type de dispositif à assemblage réversible permet d'accéder à des applications utiles, notamment la fonctionnalisation de surfaces sur des zones sélectionnées du substrat. Cette approche permet la fabrication de substrats complexes adaptés à l'étude de la croissance des cellules, de leur motilité et de leur différentiation. Par exemple, l'utilisation de motifs sur la surface de culture contenant des gradients de protéines peut permettre de déterminer le rôle de

ces protéines dans la signalisation chimique spatiale [27]. Plus précisément, les propriétés de chemo-attraction de différentes protéines dans le développement neuronal peuvent être étudiées à travers la croissance des axones sur ces motifs. De tels motifs ont déjà été réalisés en utilisant d'autres techniques d'assemblage réversible [28], mais la difficulté de mise en place et le manque de fiabilité des technologies existantes empêchent leur utilisation routinière dans des expériences biologiques. Dans ce cas, l'utilisation d'un assemblage basé sur la micro-aspiration est particulièrement pertinente : cette technologie peut être appliquée sur n'importe quel substrat en n'utilisant, en plus du matériel usuel de microfluidique, qu'une pompe à dépression et un tube supplémentaire. Un tel dispositif peut être observé sur n'importe quel microscope sans adaptation particulière. De plus, cette technique résout des problèmes technologiques engendrés par les autres méthodes, comme l'assemblage par serrage ou les dispositifs partiellement réversibles combinés avec une injection à faible pression ou à pression négative [29]. Dans ce dernier cas, la force d'adhésion native du PDMS sur le substrat limite la pression d'injection, ce qui peut parfois poser des problèmes de fuites si les précautions nécessaires ne sont pas prises [30] et l'utilisation de dépression pour la circulation des liquides a tendance à favoriser l'apparition de bulles.

Après une brève introduction du principe, nous décrirons un modèle physique simple permettant de mieux comprendre la mécanique du phénomène d'adhésion par micro-aspiration et décrivant les potentialités de la méthode. Ce modèle sera complété par des simulations en éléments finis (FEM) qui donneront une description plus précise du comportement du système. Ces résultats seront ensuite comparés avec des données expérimentales de caractérisation de nos dispositifs pour confirmer l'analyse et aboutir à la définition de certaines règles de conception.

2.1 Principe

La figure 2.1 illustre le principe de la méthode de micro-aspiration appliquée à un dispositif microfluidique. Dans un tel dispositif, la couche de PDMS contient, pour l'aspiration, un réseau de canaux croisés (RCC) qui forme une cavité soutenue par une matrice de micro-piliers. Cette cavité entoure la structure de travail qui sert à l'opération microfluidique. Le substrat peut être une simple lame de microscope faite de n'importe quel matériau, avec ou sans traitement de surface. Après avoir placé le bloc de PDMS sur le substrat, une force d'adhésion est générée entre les deux parties en créant un vide modéré dans le RCC (figure 2.1B). Le dispositif est ensuite prêt pour l'opération microfluidique. La figure 2.1A montre un canal microfluidique en PDMS scellé de manière réversible sur une lame de verre. Après utilisation, le dispositif désassemblé peut être nettoyé et réutilisé de nombreuses fois.

2.2 Modèle

Les dispositifs assemblés par micro-aspiration peuvent fonctionner sans fuite avec une pression d'injection de plusieurs centaines de milibars. Pour expliquer ce phénomène, considérons un modèle simple basé sur la déformation des struc-

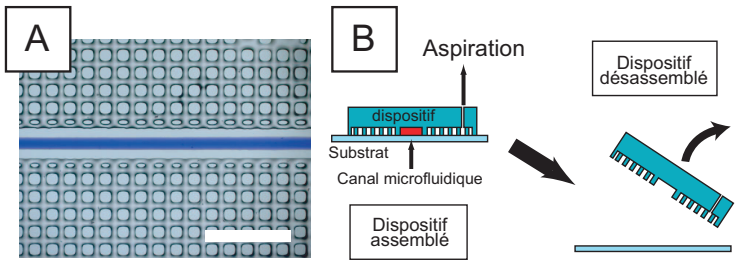


Figure 2.1 – Principe de la micro-aspiration. A) Image d'un colorant bleu circulant dans un canal scellé par micro-aspiration. La barre représente 500 µm. B) Schéma de principe de l'assemblage réversible d'un dispositif microfluidique. Sur la couche supérieure, les structures microfluidiques en PDMS sont entourées par un réseau de canaux croisés (RCC) pour l'aspiration. Lorsque cette couche supérieure est placée sur le substrat, la différence de pression générée par l'aspiration permet l'injection de fluides à une pression relativement élevée. Après utilisation, le dispositif peut être facilement désassemblé.

tures et donnant une explication phénoménologique de la mécanique mise en jeu à travers un calcul de la pression limite admissible dans les canaux microfluidiques scellés par micro-aspiration. L'analyse complète des déformations du milieu continu est un problème trop complexe pour être résolu analytiquement. Nous avons donc choisi de traiter uniquement certains phénomènes sur des éléments remarquables de la structure, choisis *a priori* comme étant les principaux responsables du comportement du dispositif. La figure 2.2, schématise les déformations prises en compte dans notre modèle.

Dans le RCC, la faible pression du vide sur les parois de la cavité ne peut contrebalancer la pression atmosphérique appliquée sur la surface du dispositif. Ce sont les piliers du RCC qui doivent compenser le déséquilibre, ce qui provoque leur déformation.

La déformation des solides élastiques est définie, entre autres, par la loi de Hooke qui décrit la déformation d'un élément parallélépipédique soumis à une pression verticale :

$$\frac{\Delta h}{h} = \frac{\Delta P}{E} \tag{2.1}$$

Où h est la hauteur du parallélépipède, ΔP la différence de pression entre la face supérieure et la face inférieure, Δh la variation de hauteur résultante et E le module de Young du matériau élastique. En considérant les piliers de la cavité comme de simples parallélépipèdes libres, cette équation nous donnera leur déformation à partir de la pression P_p appliquée par le dispositif sur les piliers.

Pour un facteur de remplissage α du réseau d'aspiration (correspondant au rapport de la surface du RCC sur la surface total du RCC et des piliers), trois forces sont appliquées suivant l'axe vertical dans la zone du RCC :

1. la pression atmosphérique appliquée sur une surface S à l'extérieur du dispositif ;
2. la pression du vide dans le RCC sur une surface αS ;

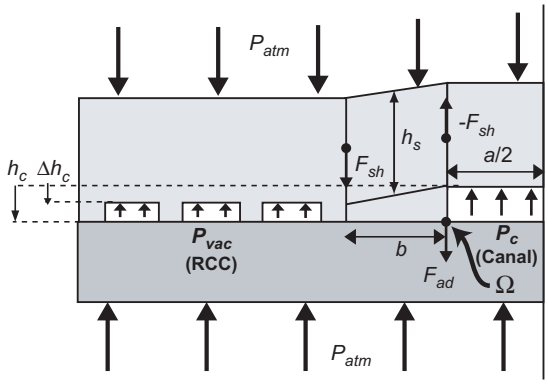


FIGURE 2.2 – Schéma de principe des phénomènes pris en compte dans le modèle (seule la moitié du dispositif est représentée, l'autre moitié se comportant à l'identique par symétrie). La différence de pression dans le RCC provoque une baisse de la hauteur des piliers du RCC. Cette déformation est responsable d'une force sur le bord du canal en réaction à une force de cisaillement F_{sh}. Ajoutée à la force d'adhésion du PDMS F_{ad}, cette force compense la force provenant de la pression P_c appliquée sur face supérieure du canal, qui tend à désolidariser le dispositif.

3. la pression supportée par les piliers sur une surface. $(1-\alpha)S$.

A l'équilibre, la somme de ces forces s'annule sur toute la surface du dispositif ce qui aboutit à la relation :

$$\alpha(P_{atm} - P_{vac}) + (1-\alpha)P_p - P_{atm} = 0 \tag{2.2}$$

Où P_{vac} représente la valeur absolue de la pression relative du vide par rapport à la pression atmosphérique. Ainsi P_p vaut :

$$P_p = P_{atm} + \frac{\alpha}{1-\alpha}P_{vac} \tag{2.3}$$

Et la variation de pression subie par les piliers en réponse à une variation de la pression P_{vac} dans le RCC s'exprime :

$$\Delta P_p = \frac{\alpha}{1-\alpha}P_{vac} \tag{2.4}$$

Cette variation de pression sur les piliers est responsable d'une déformation des piliers, ou variation de leur hauteur, que l'on calcule en utilisant l'équation 2.1 :

$$\Delta h = \frac{\alpha.h_p}{(1-\alpha)E}P_{vac} \tag{2.5}$$

Toute la partie supérieure du dispositif se déplace alors sur une distance Δh, à cause de l'écrasement des piliers. En revanche, ce déplacement n'a pas lieu dans la zone du canal microfluidique qui n'est pas en dépression par rapport à la pression atmosphérique. La zone intermédiaire séparant le canal du RCC subit alors une contrainte de cisaillement σ_{xy} qui peut s'exprimer en fonction de l'angle de cisaillement θ et du module de cisaillement G :

$$\frac{\sigma_{xy}}{G} = \theta \tag{2.6}$$

Comme le PDMS est un matériau incompressible et isotrope, le module de cisaillement peut s'exprimer en fonction du module de Young comme $G = E/3$.

En prenant en compte la géométrie décrite en figure 2.2, l'angle θ dépend des autres paramètres géométriques tel que $\tan(\theta) = \Delta h/b$. Ce qui donne au premier ordre : $\theta \simeq \Delta h/b$. En introduisant l'équation 2.5 dans cette expression, on obtient :

$$\sigma_{yx} = \frac{\alpha.h_p}{3b(1-\alpha)} P_{vac} \tag{2.7}$$

C'est cette contrainte qui est, *a priori*, responsable de la pression qui retient le canal sur le substrat. Pour en évaluer quantitativement l'influence, nous considèrerons que l'ensemble des contraintes appliquées sur le canal se concentre sur un point Ω au bord du canal (voir figure 2.2). Sur ce point, viennent s'additionner : i) La force de réaction F_{cis} provoquée par la contrainte σ_{xy} ; ii) La force d'adhésion F_{ad} du PDMS sur le substrat due aux forces de Van der Walls ; iii) Une force F_c intégrant la pression dans le canal microfluidique sur ses flancs. Si la somme de ces forces est dirigée vers le substrat, la partie supérieure du dispositif reste collée sur le substrat et l'étanchéité est respectée. Si, au contraire, la somme de ces forces est dirigée vers le corps du dispositif, le canal se décolle du substrat et une fuite peut apparaître. Lorsque la composante verticale de cette somme de force est nulle, nous sommes dans la situation où une pression limite P_{lim} est appliquée dans le canal, au-delà de laquelle l'assemblage peut perdre son étanchéité. Dans ce cas, nous avons sur l'axe vertical :

$$F_{cis} = F_c - F_{ad} \tag{2.8}$$

1. F_{cis} peut s'exprimer à partir de l'équation 2.7 en considérant que les contraintes s'appliquent sur une hauteur caractéristique h_{cis} :

$$F_{cis} = \frac{\alpha.h_p.h_{cis}}{3b(1-\alpha)} P_{vac} \tag{2.9}$$

   Comme les déformations mécaniques relatives sont invariantes par rapport à l'échelle pour une contrainte donnée, la hauteur h_{cis} peut s'exprimer comme une fonction linéaire des autres paramètres géométriques. Nous ferons l'hypothèse que les coefficients adimensionnels de cette fonction ne dépendent pas des rapports d'aspect de la géométrie, ce qui se vérifie dans les simulations FEM (cf. section simulation). F_{cis} s'exprime alors en fonction de la géométrie :

$$F_{cis} = \frac{\alpha.h_p(\beta_a.a + \beta_b.b)}{3b(1-\alpha)} P_{vac} \tag{2.10}$$

   Où β_a et β_b sont des facteurs géométriques déterminés *a posteriori*.

2. F_c est l'intégrale de la composante verticale de la pression limite dans le canal sur la moitié de la largeur a de sa face supérieure :

$$F_c = \frac{a.P_{lim}}{2} \tag{2.11}$$

3. La force F_{ad} est la force nécessaire pour induire une fracture dans le contact entre le PDMS et le substrat. Cette force, homogène à une tension de surface dans le problème à 3 dimensions, dépend *a priori* de la nature microscopique de l'angle de contact entre le PDMS et le substrat, mais également des énergies de surface des interfaces PDMS/substrat, canal/substrat et canal/PDMS.

En remplaçant l'expression de ces trois forces dans l'équation 2.8, on obtient une expression de la pression limite admissible dans le canal, avant décollement du dispositif :

$$P_{lim} = \frac{2}{a} F_{ad} + \frac{\alpha.h_p}{3(1-\alpha)} \frac{\beta_a.a + \beta_b.b}{a.b} P_{vac} \tag{2.12}$$

Ce modèle simple laisse envisager que la pression limite acceptable dans un canal est inversement proportionnelle aux dimensions a et b à une constante près.

2.3 Simulation

Pour confirmer l'explication phénoménologique de l'équation 2.12 et analyser plus précisément le comportement des dispositifs, nous avons réalisé des simulations FEM à 2 dimensions du système en variant les pressions et les dimensions caractéristiques du système. Le simulateur utilisé est le logiciel Comsol Femlab 3.0, couplé avec Matlab, pour la programmation des géométries. La simulation utilise un modèle de solide élastique en déformation plane.

Comme pour le modèle, nous avons cherché à mesurer dans ces simulations la pression limite acceptable dans le canal microfluidique à partir de la force appliquée par le PDMS sur le substrat, au bord du canal. Mais en milieu continu, la notion de force n'est pas applicable car elle se traduit par une divergence de la contrainte sur le matériau au point où elle est appliquée. En réalisant la simulation sans prendre de précautions particulières, on obtient en effet une contrainte qui tend vers l'infini au point de contact entre le canal, le PDMS et le substrat. Ce constat confirme l'hypothèse du modèle qui suppose qu'une force ponctuelle est appliquée sur ce point. Pour lever correctement cette singularité, il serait nécessaire d'introduire un modèle microscopique plus complet du comportement de ce point. Pour éviter d'avoir à traiter ce problème, nous l'avons contourné en arrondissant le bord du canal de manière à répartir cette force sur une surface non-nulle (figure 2.3B). C'est alors la contrainte suivant l'axe vertical σ_{yy} dans cette zone (au point Ω sur la figure 2.3) qui est mesurée et considérée comme proportionnelle à la force, telle qu'elle est définie dans le modèle. La pression limite applicable dans le canal est alors définie comme la pression appliquée dans la situation où σ_{yy} atteint une valeur limite σ_{yymax} représentative de la force d'adhésion F_{ad} du PDMS sur le substrat. La valeur de σ_{yymax} a été ajustée sur les mesures expérimentales de la pression limite.

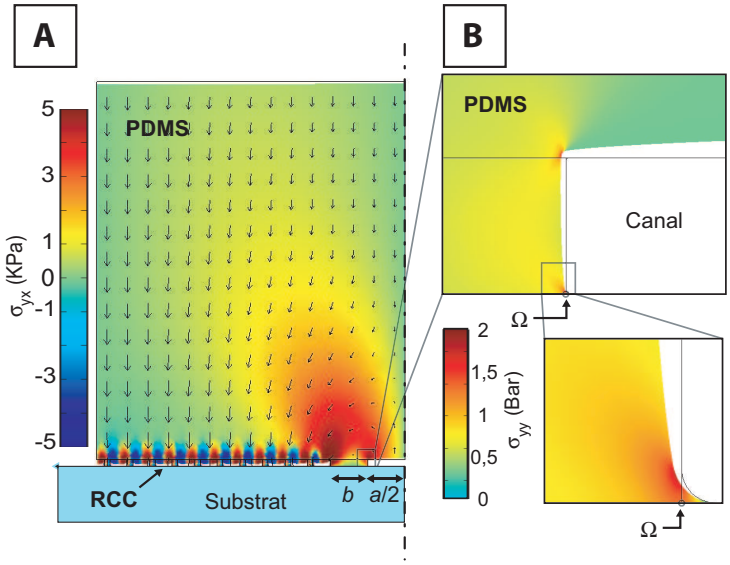


Figure 2.3 – Simulation mécanique typique d'un dispositif à la pression limite : la simulation est réalisée sur la moitié du dispositif autour de son axe de symétrie (pointillé) A) Les flèches représentent le champ de déplacement et les couleurs la contrainte de cisaillement σ_{yx}. On peut remarquer que la contrainte est accumulée sur une zone au dessus de la séparation entre le canal et le RCC. B) Détail du bord du canal. La contrainte σ_{yy} suivant l'axe y , qui est représenté par les couleurs, s'accumule au point de contact entre le canal, le PDMS et le substrat. Pour pouvoir mesurer cette contrainte sur le point Ω, le point de contact est arrondi par un arc de cercle de 500 nm de rayon. Conditions : a = 200 µm, b = 100 µm, h = 20 µm, P_{vac} = -870 mBar, P_{canal} = +300 mBar.

Méthode

Géométrie. Une description précise de la mécanique de ce système aurait certainement été obtenue avec une simulation à 3 dimensions, mais au prix de temps de calcul déraisonnables. Dans cette configuration à 2 dimensions, le RCC est remplacé par un réseau de canaux parallèles dont le taux de remplissage α est équivalent pour la comparaison avec les expériences (figure 2.3A). La géométrie simulée contient de nombreux angles qui provoquent des singularités sur le calcul de la contrainte. Pour éviter d'avoir à les traiter, les coins du canal principal ont été arrondis avec un rayon de courbure de 500 nm comme on peut le voir sur la figure 2.3B (les autres angles ne sont pas arrondis pour alléger la simulation et parce qu'ils se sont avérés avoir une influence négligeable sur les résultats).

Détermination du module de Young. Le module de Young du PDMS a été déterminé sur une simulation du RCC seul par comparaison avec l'expérience. Pour cela, nous avons réalisé une simulation paramétrée sur le module de Young (figure 2.4A) dans les conditions de l'expérience décrite dans la section 2.4. Pour obtenir un déplacement de 7,9 µm pour un vide relatif de -892 mBar, la simulation nous donne un module de Young de 7,4 Bar, ce qui correspond bien au module de Young de 7,5 Bar que l'on peut trouver dans la littérature pour le PDMS 10:1 [31].

Détermination de σ_{yymax}. Cette constante est identifiée sur le comportement expérimental du dispositif avec le réseau d'aspiration à pression atmosphérique. Expérimentalement, la pression limite dans ces conditions est en moyenne de 264mBar. La simulation d'un tel dispositif nous permet de retrouver le stress appliqué sur le bord du canal dans les mêmes conditions. Le résultat de la simulation nous donne un stress de décollement de 109 KPa (figure 2.4B).

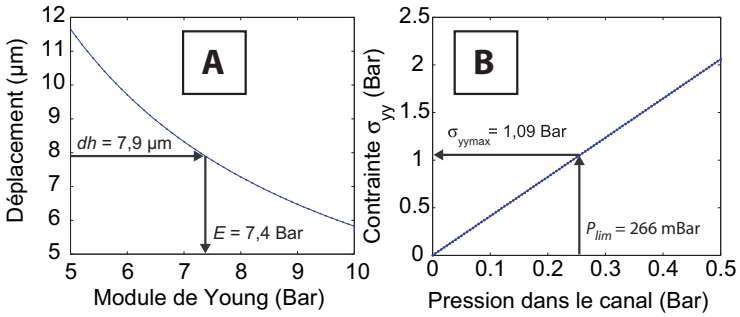


FIGURE 2.4 – Ajustement des paramètres de la simulation. A) Le module de Young est ajusté sur la valeur expérimentale du déplacement de la surface du dispositif sous l'effet de la déformation du RCC. B) La contrainte limite σ_{yymax} au delà de laquelle le canal se décolle est ajustée sur les mesures de pression limite en l'absence de vide dans le RCC.

Après identification des paramètres inconnus sur les données expérimentales (voir encadré méthode), nous avons pu étudier l'influence des différents paramètres géométriques sur l'efficacité de l'assemblage par micro-aspiration en calculant la pression limite acceptable dans le canal. Tout d'abord, nous avons remarqué que l'influence de la hauteur du dispositif sur la valeur de cette pression limite était négligeable au-delà de 10 fois la taille caractéristique de la zone d'intérêt (figure 2.5A). Ce rapport a donc été respecté pour toutes les autres simulations présentées ici. D'autre part, l'influence du facteur de remplissage α

du RCC s'est avérée être très similaire à celle exprimée dans le modèle (proportionnel à $\alpha/(1-\alpha)$) (figure 2.5B) pour les petits facteurs de remplissage (inférieur à 50%). Pour les facteurs de remplissage plus élevés, la simulation prédit un comportement moins efficace.

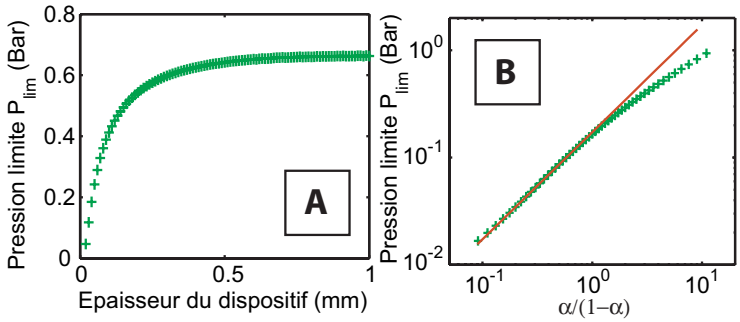


Figure 2.5 – Influence des paramètres n'ayant pas fait l'objet de caractérisations expérimentales. A) Influence de la hauteur du dispositif : Au delà de 10 fois la largeur du canal, l'influence de l'épaisseur du dispositif est négligeable. (dans cette simulation, $a = 100$ µm, $b = 100$ µm et $h = 20$ µm) B) Influence du taux de remplissage α du RCC : Pour les taux de remplissage inférieurs à 50%, la pression limite est bien proportionnelle à $\alpha/(1-\alpha)$ (la ligne rouge est une régression linéaire sur les premières mesures). pour ces simulations : $a = 100$ µm, $b = 100$ µm et $h = 20$ µm.

En vertu de l'invariance d'échelle des déformations mécaniques pour une même contrainte, le maximum de pression admissible dans le canal peut s'exprimer comme une fonction des rapports d'aspect adimensionnels du dispositif. La figure 2.6 montre la pression maximum P_{lim} en fonction des rapports d'aspect h/a et h/p [1]

Cela nous a amené à identifier un rapport d'aspect optimal h/b pour lequel la pression acceptable est maximale. En d'autre termes, la pression maximum admissible dans un canal utilisant l'aspiration dépend uniquement du rapport h/a. Cet optimum est atteint pour un rapport d'aspect du mur séparant le canal du RCC $h/b = 0{,}75$. Au-delà de ce rapport, l'effet du RCC sur la pression limite est moins efficace. L'observation des champs de contrainte des simulations indique que ce comportement, qui n'était pas prévu par le modèle, pourrait trouver son origine principale dans les contraintes horizontales dans la zone de cisaillement.

Ces résultats seront comparés dans le paragraphe suivant avec les mesures expérimentales.

1. h réfère la hauteur du canal **et** du RCC pour simplifier la représentation. Néanmoins, nous avons noté que la hauteur du canal avait peu d'influence sur le résultat et que h pouvait référer uniquement la hauteur du canal comme c'est le cas dans le modèle analytique, moyennant une légère erreur sur les résultats de la simulation.

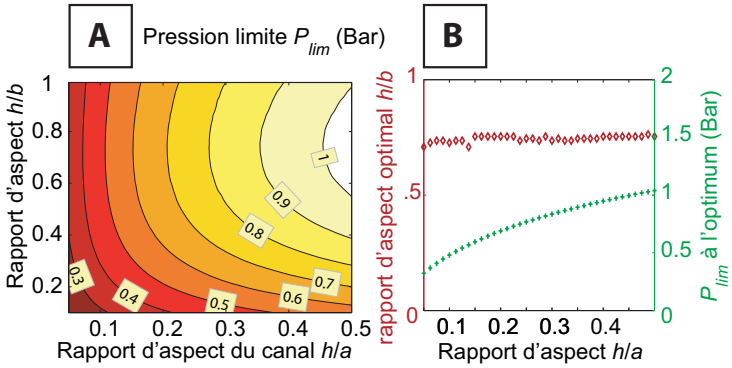


FIGURE 2.6 – Pression limite simulée. A) en fonction des rapports d'aspect de la géométrie. B) Rapport d'aspect optimal h/b avec la pression limite optimale correspondante en fonction du rapport d'aspect h/a.

2.4 Caractérisation

Pour valider les comportements théoriques prédits dans les sections précédentes, deux expériences ont été réalisées. Tout d'abord, pour valider les hypothèses de l'équation 2.5, nous avons étudié la dépendance qu'il y avait entre la déformation des piliers et la pression effective d'aspiration. Ensuite, pour évaluer quantitativement les performances de l'assemblage réversible par micro-aspiration, nous avons mesuré pour différentes géométries la pression maximale applicable dans le canal de travail, avant l'apparition d'une fuite.

Méthode

La lithographie molle multicouche (cf. annexe B.2) a été utilisée pour la fabrication des dispositifs microfluidiques avec les RCC. Les moules sont réalisés par speen-coating sur une galette de silicium, puis photolithographie d'une couche de 20 µm de résine AZ9260 pour la couche du bas et 40 µm d'épaisseur pour la couche du haut, qui contient les cavités d'isolation (cf. annexe B.1). Le dispositif final a été moulé avec un mélange de PDMS:réticulant (10:1) sur 100 µm pour la première couche. Pour cela, deux étapes successives de speen-coating de 50 µm de PDMS on dû être réalisées (30 s à 600 rpm avec recuit de 5 min. à 80°C sur plaque chauffante). La seconde couche est moulée sur une épaisseur de 10 mm. Les deux couches sont ensuite assemblées à l'aide d'une activation au plasma air et les connexions réalisées par un trou d'aiguille de 700 µm de diamètre. Une fois les dispositifs réalisés, ils sont placés sur le substrat et l'aspiration est appliquée pour obtenir une bonne étanchéité.

Nous avons, tout d'abord, remarqué que les fuites provenaient systématiquement de la zone proche des connecteurs d'injection des liquides. En effet, cette zone est démunie de RCC à proximité (b très grand) et les contraintes appliquées sur le dispositif par le connecteur sont favorables au descellement du dispositif dans cette zone. Ces contraintes sont dues à la déformation du PDMS autour du tube lorsqu'il est inséré dans le trou de connexion (figure 2.7A). Pour éliminer cette composante indésirable et isoler mécaniquement les contraintes de la connexion de la mécanique d'adhésion, nous avons conçu une géométrie de connexion qui comporte une grande cavité entre l'entrée du canal et le tube de connexion. Cette cavité, présente sur une deuxième couche du dispositif coupe

le trou de connexion en deux parties isolées. Pour réaliser des dispositifs avec cette cavité, nous avons fabriqué des dispositifs à deux couches où la couche supérieure contient de larges cavités circulaires de 1,5 mm de diamètre et 40 µm de hauteur placées au dessus des entrées et sorties des canaux microfluidiques. Dans ce cas, la contrainte appliquée par les connecteurs est reportée sur un coin de la cavité (figure 2.7B).

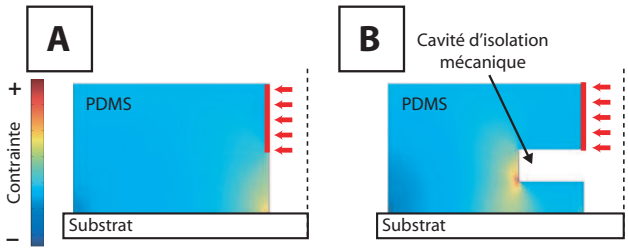


FIGURE 2.7 – Simulation des contraintes induites par l'insertion d'un connecteur dans le dispositif. A) Une pression latérale appliquée sur le trou du connecteur induit une contrainte à la base du trou qui est favorable au décollement du dispositif. B) En ajoutant une cavité d'isolation mécanique, cette contrainte est déplacée hors de la zone de contact avec le substrat. De même, la pression appliquée par le liquide injecté n'induit pas de contraintes favorables au décollement dans cette configuration.

Tout d'abord, pour confirmer la dépendance linéaire entre la pression du vide et la déformation des piliers, nous avons mesuré le déplacement du dispositif contenant un RCC lorsque l'aspiration est mise en route. Le montage expérimental est illustré en figure 2.8. Dans ce montage, la surface du dispositif est couverte d'une couche d'or de 30 nm, formant un miroir semi-transparent au dessus duquel un autre miroir semi-transparent est positionné au plus proche de la surface et à une distance fixe du substrat. Ces deux miroirs forment ainsi une cavité Fabry-Pérot dont la transmitance va dépendre de la longueur d'onde de la lumière et de la distance entre les deux miroirs. La valeur de la transmitance T vaut pour une incidence normale à la surface :

$$T = \frac{1}{1 + \frac{4R}{(1+R)^2} \sin^2\left(\frac{2\pi l}{\lambda}\right)} \tag{2.13}$$

Où R est le coefficient de réflexion des miroirs, l est la distance entre les miroirs et λ et la longueur d'onde de la lumière incidente. On peut remarquer que cette transmitance oscille en fonction de la distance entre les miroirs à raison de 2 oscillations par longueur d'onde parcourue. Le déplacement de la surface du dispositif par rapport au miroir semi-transparent (fixé au substrat) peut donc être mesuré en comptant les oscillations du coefficient de transmission de la cavité lorsque l'on baisse progressivement la pression dans le RCC. La figure 2.8 montre le déplacement de la structure suspendue par les piliers en fonction de la pression relative du vide appliquée dans un RCC. Les mesures s'ajustent bien avec l'équation 2.5 en utilisant un module de Yong $E = 6{,}7$ Bar, ce qui est proche de la valeur admise de 7,5 Bar [31].

Une seconde série d'expériences a été réalisée pour caractériser l'efficacité de l'assemblage. La pression maximum admissible dans les canaux a été testée pour

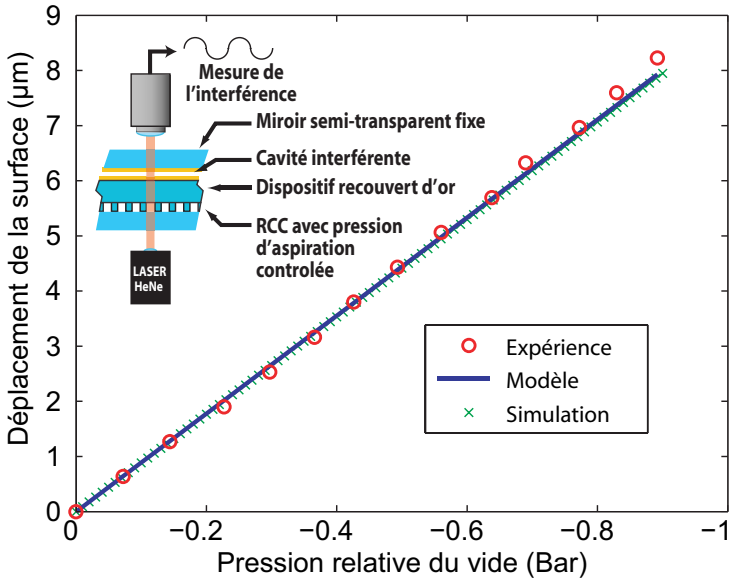


FIGURE 2.8 – Mesure de la déformation du RCC en fonction de la pression du vide. L'expérience utilise la mesure de la transmission de la lumière d'un Laser HeNe à travers la cavité formée par un miroir semi-transparent fixe et la surface supérieure du dispositif. Le déplacement de la surface du dispositif fait osciller le coefficient de transmission lorsque la pression dans le RCC est baissée progressivement. La valeur du déplacement est calculée en intégrant ces oscillations. La ligne bleue continue est un ajustement linéaire et les croix vertes sont le résultat du même système simulé par éléments finis. Le RCC contenant des piliers de 20 µm de haut avec $\alpha = 3/4$

différentes géométries et différentes conditions de travail. Avant chaque mesure, les dispositifs sont nettoyés de la même manière, c.-à-d. rincés avec de l'eau, de l'isopropanol, puis parfaitement séchés.

Lors des expériences, la pression d'entrée est graduellement augmentée, alors que la sortie du canal est laissée à pression atmosphérique. Comme un gradient de pression apparaît le long du canal, la fuite attendue apparaît généralement à proximité de l'entrée où la pression est plus élevée. Dans cette configuration, la fuite peut être est détectée en observant le début du canal au microscope à contraste de phase. En effet, la présence d'une couche d'eau entre le substrat et le PDMS, même très mince, est facilement repérable en contraste de phase grâce au saut de l'indice de réfraction engendré. Les fuites forment ainsi des zones plus claires bien délimitées comme on peut le voir sur la figure 2.9. Lorsqu'une fuite est repérée, la pression correspondante dans le canal est notée comme pression limite.

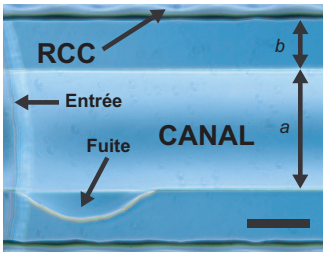


FIGURE 2.9 – Image en contraste de phase (Leica DMIL) typique de l'apparition d'une fuite à l'entrée d'un canal scellé par micro-aspiration. La zone où de l'eau est présente entre le substrat et le PDMS est clairement visible en contraste de phase. La barre représente 200 µm.

La figure 2.10 montre les mesures de pression maximale admissible en fonction de la pression de vide dans le RCC et des paramètres géométriques, ainsi que les valeurs données par la simulation et le modèle dans les mêmes conditions.

La force d'adhésion du PDMS F_{ad} est calculée à partir des mesures de pression limite sans aspiration ($P_{vac} = 0$ sur un canal de 100 µm), qui donnent $P_{lim} = 264 \pm 84$ mBar, correspondant à $F_{ad} = 1{,}39$ N/m. Les autres paramètres du modèle ont été ajustés sur l'ensemble des données visibles en figure 2.10 simultanément par une régression linéaire sur l'équation 2.12. L'ajustement donne $\beta_a = 1{,}04$ et $\beta_b = -0{,}08$.

Les données expérimentales sont en bon accord avec le modèle analytique et les simulations sur l'influence des paramètres P_{vac} et a. Elles le sont moins pour le paramètre b. L'écart obtenu doit être principalement lié au fait que, lors de la mesure de P_{lim}, l'indicateur utilisé était la présence d'une fuite et non le décollement du bord du canal. Or, pour les dispositifs où b est important, nous avons pu remarquer que le bord du canal peut se décoller sans qu'aucune fuite n'apparaisse : la réduction du paramètre b après un décollement partiel de la zone de garde permettant une pression admissible plus élevée. Le modèle et les simulations ne prenant pas en compte ce phénomène, ils sous-estiment la pression limite admissible pour les valeurs de b élevées.

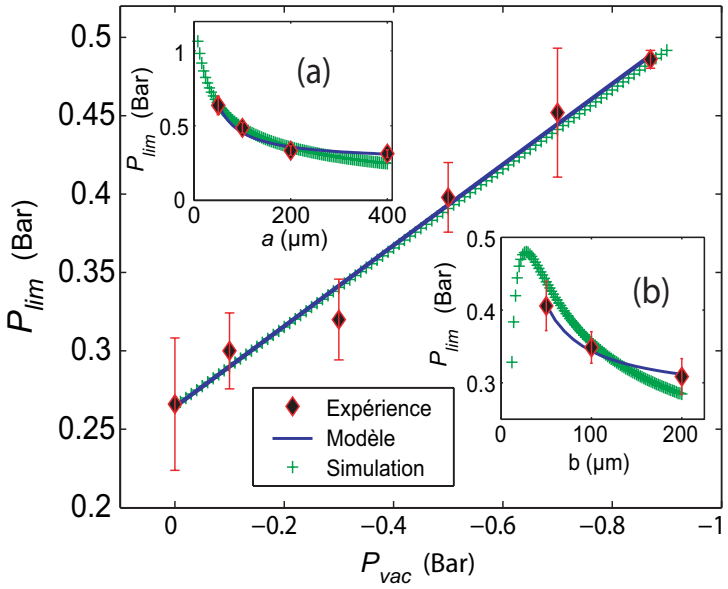
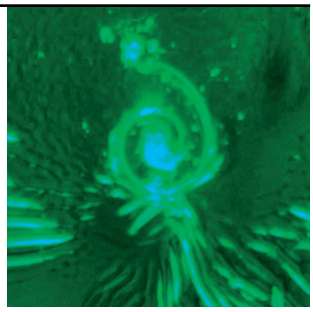


FIGURE 2.10 – Pression maximum admissible mesurée en fonction de la pression du vide pour un canal de 20 µm de haut, 100 µm de large et séparé de 100 µm du RCC. L'influence de la géométrie du canal est indiquée en insert : a) Pression limite en variant la largeur du canal pour une séparation avec le RCC de 100 µm ; b) Pression limite en variant la distance entre le RCC et un canal de 200 µm de large. Les lignes bleues continues représentent un ajustement du modèle sur l'ensemble des données ; les croix vertes indiquent les valeurs données par la simulation dans les mêmes conditions. Toutes les mesures ont été réalisées avec une pression relative de vide dans le RCC de -870 mBar.

2.5 Conclusion

Nous avons proposé dans ce chapitre une méthode pratique et robuste pour réaliser un assemblage réversible de dispositifs microfluidiques, basé sur la micro-aspiration. Un modèle analytique simple a été présenté en considérant la géométrie du système, fournissant une explication de la nature des phénomènes mécaniques mis en jeu à travers l'expression de la pression limite applicable dans un canal scellé par micro-aspiration avant qu'une fuite ne puisse apparaître. Des simulations FEM ont permis de confirmer la phénoménologie du modèle analytique et d'avoir des données plus fines sur le comportement des dispositifs. Elles ont notamment abouti à l'identification d'un rapport d'aspect optimal de 0,75 pour le mur séparant le canal de travail du réseau d'aspiration. Les premières données expérimentales récoltées en mesurant le déplacement de la surface du dispositif ont permis de valider l'hypothèse de la déformation du réseau d'aspiration. Et finalement, la pression maximale applicable dans les canaux microfluidiques a été mesurée dans différentes conditions et s'accorde avec le modèle et les simulations.

La méthode proposée pourrait être utile à certaines applications, aussi bien pour des traitements microfluidiques que pour des fonctionnalisations de surface. Le chapitre en présentera certains exemples choisis pour la fabrication de motifs sur des surfaces solides.



Chapitre 3

Fabrication de motifs de protéines

La fabrication de motifs de biomolécules est particulièrement délicate en comparaison des autres matériaux. Leur fonction, ou activité biologique, est généralement liée à leur conformation. Cette organisation interne est basée sur des liaisons faibles et se dénature facilement lorsque l'environnement de la molécule s'éloigne trop des conditions physiologiques. Les méthodes conventionnelles de fabrication de motifs et plus particulièrement les méthodes lithographiques sont très performantes en termes de résolution, de coûts et de cadence de production. Néanmoins, comme nous l'avons souligné dans l'introduction, elles nécessitent généralement l'utilisation de solvants non-aqueux et/ou de conditions extrêmes en termes de pression, température ou pH. Ces méthodes ne satisfont donc généralement pas aux conditions nécessaires pour conserver intactes les fonctions des molécules biologiques. Des méthodes plus douces doivent êtreutilisées.

Dans ce chapitre, nous présenterons des méthodes originales utilisant la microfluidique pour déposer des motifs de protéines en utilisant les dispositifs à assemblage réversible assistés par micro-aspiration présentés au chapitre précédent.

3.1 Traitements de surface par assemblage réversible

Les dispositifs à assemblage réversible permettent de fonctionnaliser des surfaces par application directe du dispositif sur le substrat. Dans ce cas, un dispositif est assemblé sur le substrat et des solutions de protéines sont circulées dans les micro-canaux (figure 3.1A). Les molécules présentes dans les solutions s'adsorbent alors sur le substrat. Après désassemblage du dispositif et rinçage du substrat, des protéines sont déposées uniquement sur les surfaces précédemment situées sous les canaux (figure 3.1B).

Cette technique peut être utilisée avantageusement dans différentes configurations :

1. **Fonctionnalisation simple.** La circulation de solutions dans les canaux assemblés réversiblement permet d'imprimer des motifs de plusieurs pro-

téines par adsorption sur la surface. Ce procédé a l'avantage d'être très simple mais nécessite des espaces vides entre les zones fonctionnalisées qui sont nécessaires à la définition des canaux.

2. **Fonctionnalisations séquentielles.** Plusieurs fonctionnalisations peuvent être réalisées séquentiellement à l'aide du même dispositif ou de dispositifs différents. Pour ce faire, le dispositif est assemblé puis désassemblé à plusieurs reprises. Après chaque nouvel assemblage, une nouvelle protéine en solution est utilisée. Des zones connexes fonctionnalisées avec différentes protéines peuvent alors être réalisées. Sur les zones de recouvrement des fonctionnalisations successives, l'équilibre dynamique de sorption des protéines permet un échange entre la surface et la solution qui aboutit à des zones contenant un mélange des protéines circulées successivement sur la surface. La figure 3.1C montre l'adsorption successive de BSA-FITC (vert) et de BSA-cy3 (rouge) à l'aide d'une série de canaux parallèles assemblés par micro-aspiration. On peut observer sur les zones de recouvrement des deux fonctionnalisations, la présence d'un mélange des deux types de protéines.

3. **Fonctionnalisation à étape multiple et/ou avec prétraitement.** Comme il est possible de faire circuler plusieurs liquides successivement dans les canaux, une fonctionnalisation nécessitant plusieurs étapes de chimie de surface peut être appliquée. La figure 3.1D montre le greffage local et covalent d'une protéine fluorescente BSA-cy3 en utilisant un protocole développé au laboratoire, adapté à la fonctionnalisation des canaux microfluidiques en verre et en PDMS (Les détails du protocole sont donnés en annexe **??**). Ce protocole, qui nécessite de faire circuler trois réactifs successivement avec des étapes de rinçage entre chaque réactif, permet de greffer les protéines de manière covalente sur le substrat, permettant une meilleur adhésion cellulaire sur la surface en comparaison d'un protocole n'impliquant qu'une simple adsorption de la protéine [219].

   D'autre part, comme la surface n'est pas altérée sur la zone du RCC, un prétraitement de la surface peut être conservé sur cette zone pour une utilisation ultérieure. Le protocole utilisé pour fonctionnaliser la surface présenté en figure 3.1D débute par un traitement plasma de toute la surface du substrat. Comme celle-ci n'est pas altérée dans la zone du RCC lors de la fonctionnalisation, cette activation de la surface est utilisée dans un deuxième temps pour sceller irréversiblement un canal en PDMS sur le substrat localement fonctionnalisé. Ainsi, seule une petite bande sur le verre est fonctionnalisée dans le canal final.

4. **Fonctionnalisation microfluidique complexe.** En utilisant un dispositif microfluidique réversible plus complexe mettant en contact plusieurs liquides, il est possible d'obtenir des gradients spatiaux de concentration de surface de différentes protéines. Cette approche sera abordée dans la section 3.3.

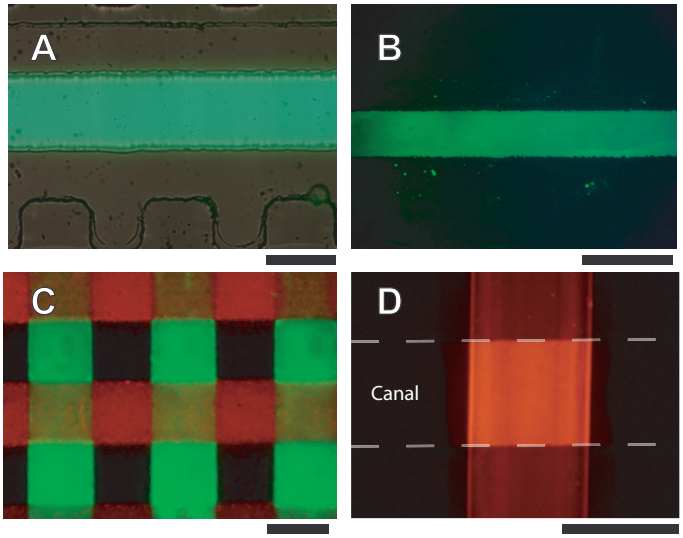


Figure 3.1 – Fonctionnalisations de surface réalisées avec des assemblages réversibles. A) La barre représente 100 µm. B) La barre représente 200 µm. C) La barre représente 100 µm. D) La barre représente 200 µm.

Méthode

Fonctionnalisation simple. (Figure 3.1B). Un canal simple de 200 µm de large et 10 µm de haut a été assemblé par micro-aspiration sur une lame de verre (Menzel) sans prétraitement particulier. Une solution de 100 µg/mL de BSA-FITC est ensuite circulée pendant 1 min. Après retrait de la couche de PDMS, la lame est rincée au PBS 1x puis à l'eau DI.

Fonctionnalisation double. (Figure 3.1C). Une série de canaux de 100 µm de large et 10 µm de haut a été assemblée par micro-aspiration sur la lame de verre (Menzel). Dans un premier temps, une solution de 100 µg/mL de BSA-FITC est circulée pendant 1 min. Après retrait de la couche de PDMS, la lame est rincée au PBS 1x et à l'eau DI et le dispositif nettoyé à l'isopropanol et à l'eau DI. Après séchage du substrat et du dispositif sous un flux d'azote, le même dispositif est assemblé une seconde fois sur le substrat de manière à ce que la nouvelle direction des canaux microfluidiques soit perpendiculaire à la direction appliquée lors de la première fonctionnalisation. Une nouvelle solution de 100 µg/mL de BSA-cy3 est circulée dans les canaux pendant 1 min. Finalement, le dispositif est à nouveau désassemblé et le substrat rincé une dernière fois.

Fonctionnalisation locale et covalente d'un canal scellé irréversiblement. (Figure 3.1D). Le substrat en verre est tout d'abord traité par plasma air (500 mTorr à puissance maximum pendant 2 min dans un Harrick plasma cleaner), puis le protocole de fonctionnalisation décrit en annexe ?? est appliqué dans un canal de 200 µm de large assemblé par micro-aspiration. Ce protocole, développé en collaboration avec le Dr. Zhiling Zhang, permet de greffer de manière covalente des protéines à la surface des canaux microfluidiques en verre et en PDMS. Une fois le protocole appliqué et la couche de PDMS décollée (on a pris soin de rincer, vider et sécher le canal auparavant), une couche de PDMS classique contenant un canal de 200 µm de large et préalablement traité au plasma (30 s à 500 mTorr et puissance maximale) est collée irréversiblement sur la surface. Pour activer la réaction, le dispositif est ensuite chauffé 1 h dans une étuve à 80°C.

En comparaison des méthodes capillaires [8], ou utilisant une faible pression [32] ou un pression négative [9, 10] qui permettent également des assemblages réversibles, l'assemblage par micro-aspiration permet une pression d'injection plus élevée. Ceci rend la méthode plus robuste et permet un contrôle plus fin des débits dans les micro-canaux. D'autre part, et comme nous le verrons plus précisément dans la section suivante, le vide présent autour des canaux microfluidiques dégaze le PDMS du dispositif, ce qui évite l'apparition de bulles qui peuvent être très problématiques lors de l'utilisation de faibles pressions d'injection. Ces avantages font de la micro-aspiration un outil pertinent pour modifier la chimie de surface d'un substrat avec une haute résolution.

Néanmoins, comme la continuité des flux doit être respectée, les motifs réalisés doivent êtres connexes. Whitesides *et al.* ont proposé, pour pallier ce problème, d'utiliser des canaux microfluidiques à 3 dimensions. Mais leur fabrication est complexe en comparaison des méthodes lithographiques classiques. Par une autre approche, le microcontact printing permet d'imprimer n'importe quel motif par simple mise en contact de la surface avec un tampon. Cette méthode ne permet pas réellement de faire de la chimie de surface et est limitée au transfert d'une seule molécule simultanément, mais nous montrerons que cette technique peut être combinée à un assemblage réversible pour profiter des avantages des deux techniques.

3.2 Microcontact printing

Le microcontact printing (μCP) est une technique simple pour imprimer des motifs sur une surface solide par auto-assemblage d'une monocouche de molécules (SAM) [33]. Cette technique de tamponnage, illustrée en figure 3.2 a été largement adoptée pour transférer des monocouches de molécules sur un substrat à partir d'une solution. La solution peut contenir divers éléments tels : des protéines, des thiols, des silanes ou encore des nanoparticules. Lorsque le tampon est trempé dans la solution, une ou un nombre limité de couches de molécules s'adsorbent à sa surface pour minimiser son énergie. Le tampon est ensuite séché et appliqué sur la surface à imprimer. Après décollement du tampon, les molécules resteront naturellement sur la surface de plus haute énergie. L'utilisation de tampon à faible énergie de surface comme c'est le cas des tampons en PDMS fonctionne pour un grand nombre de molécules, ce qui fait du μCP une méthode assez générale pour créer des motifs de SAM. Cette méthode est intéressante pour les biotechnologies car elle permet de déposer des motifs de protéines sans perdre leur activité biologique [34]. Ainsi, elle s'est avérée être particulièrement pertinente pour obtenir des surfaces biocompatibles contrôlées [35, 36].

Nous avons appliqué la méthode du microcontact printing pour réaliser des motifs de polyornitine[1] (PORN), destiné à confiner la croissance de neurones spinaux d'embryons de rat sur des substrats de silicium. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Claire Ribault, de l'équipe d'Antoine Triller du département de Biologie de l'École Normale Supérieure, dans le cadre d'un projet de photo-stimulation de réseaux de neurones de topologie contrôlée (cf. Annexe **??** pour les détails).

1. PORN : polypeptide cationique artificiel favorisant l'adhésion neuronale.

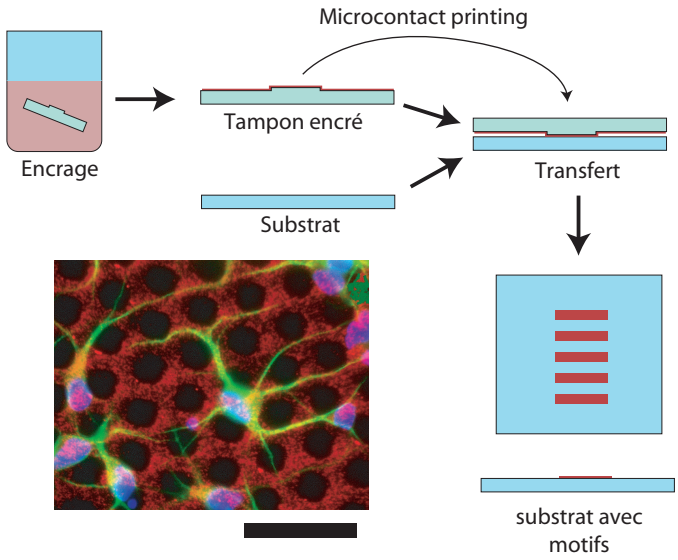


Figure 3.2 – Microcontact Printing classique : Un tampon est encré dans une solution de molécule à imprimer. Les molécules s'adsorbent sur le tampon, puis sont imprimées sur le substrat. Photo : Motifs de polyornitine-Cy3 imprimés sur un substrat de silicium par microcontact printing (rouge). Ce type de dépôt peut servir à guider la croissance des axones de neurones spinaux d'embryons de rat (axones en verte (protéine Tau), noyaux en bleu (DAPI), 10 DIV). La barre représente 50 µm.

Méthode

Pour pouvoir observer les motifs par microscopie en fluorescence, la PORN a été couplée au fluorophore cy-3 (protocole en annexe B.3). Le tampon en PDMS, qui était constitué d'un réseau de trous de 15 µm de diamètre séparés de 30 µm, a été moulé avec du PDMS (cf. annexe B.2) sur un moule contenant les motifs définis par photolithographie d'une couche de 3 µm de SU8 2002 (cf. annexe B.1). Les tampons ainsi fabriqués sont incubés pendant 2 h dans un bain d'éthanol à 70% pour les stériliser et le reste du protocole est réalisé sous hotte stérile. Avant l'impression, le tampon était incubé pendant 30 min dans une solution de 0,5 mg/mL PORN-cy3, puis rincé avec de l'eau déionisée. Après séchage sous hotte (15 min), le tampon était appliqué pendant 30 s sur le substrat de silicium. Le support de silicium était ensuite conservé dans du PBS (quelques minutes) avant d'être soumis au traitement habituel pour les cultures de neurones (cf. annexe **??**).

Après impression des motifs sur les substrats, les neurones en suspension sont ensemencés selon une concentration de 10^5 cellules/cm.^{2} Après 10 jours in vitro, un marquage immunocytochimique des axones (protéine Tau) et des noyaux (DAPI) a permis d'observer que les axones étaient bien guidés par les motifs. La photo sur la figure 3.2 montre l'observation en fluorescence d'un neurone sur un de ces substrats.

Néanmoins, le contraste d'adhésion entre la polyornitine et le silicium n'était pas suffisant pour contraindre totalement la croissance des axones, et de nombreux axones poussaient sur des zones exemptes de polyornitine. Même si les neurones ne survivaient pas sur les grandes surfaces de silicium non traitées, l'adsorption de biomolécules sur le silicium issues du medium utilisé pendant la culture permettait la croissance des axones sur les zones non-traitées au bout de quelques jours.

Pour éviter ce phénomène, il était nécessaire de développer une autre stratégie de fonctionnalisation permettant de greffer deux molécules différentes sur et en dehors des motifs imprimés. Ce procédé, utilisant une méthode photolithographique sur une structure à trois couches contenant une couche sacrificielle hydrosoluble, est décrite en annexe **??** et a permis d'obtenir un meilleur contraste en greffant une couche de TMCS entre les motifs de polyornitine.

Pour déposer plus de deux molécules, ou pour réaliser des gradients de concentration de surface de molécules, le micro-contact printing peut être amélioré comme nous l'exposerons dans la section suivante.

3.3 Microcontact printing multicouleur

La méthode du microcontact printing basée sur un encrage du tampon en solution est simple, rapide et peu coûteuse, mais ne permet de transférer qu'un seul type de molécule à la fois. La portée de cette technique serait largement étendue si une même surface pouvait être décorée avec plusieurs types de protéines simultanément. L'impression de différents types de protéines sur un même substrat peut être réalisée en utilisant différentes stratégies. Une possibilité est le transfert séquentiel de plusieurs protéines sur un même substrat en utilisant plusieurs tampons encrés avec des protéines différentes. Cette technique est simple à mettre en œuvre, mais nécessite une machine d'alignement pour contrôler la position des différents transferts. La seconde méthode consiste à encrer le tampon par capillarité en utilisant plusieurs encres simultanément [11].

Ces méthodes fonctionnent bien pour réaliser des fonctionnalisations simples, mais sont limitées dans la précision du contrôle spatial complexe des concentrations de protéines, car elles ne permettent pas un contrôle fiable des pressions d'injection des solutions.

Ici, nous présentons une méthode baptisée « microcontat printing multicouleur » (MCμCP) (par extension de l'acronyme μCP) qui a été développée en étroite collaboration avec Cécile Crozatiez. Elle permet d'imprimer des motifs de plusieurs compositions simultanément sur une surface et plus particulièrement d'imprimer des motifs de protéines dont la composition suit un gradient de concentration de surface d'une combinaison de molécules. Pour parvenir à ce résultat, le MCμCP utilise un tampon de μCP qui est encré par un réseau de canaux microfluidiques. Les structures microfluidiques de ce réseau sont conçues pour avoir des canaux indépendants qui permettent d'acheminer les liquides jusqu'aux motifs à encrer et d'adsorber le contenu de différentes solutions de molécules à différents endroits du tampon. L'assemblage réversible des canaux sur le tampon est obtenu en utilisant la technique de micro-aspiration présentée au chapitre précédent.

En outre, l'utilisation de la microfluidique pour l'encrage permet de contrôler des flux de liquides de compositions complexes contenant des gradients spatiaux de concentration [28]. En effet, comme les flux dans les micro-canaux sont laminaires, les solutions circulantes juxtaposées ne se mélangent que par diffusion. En faisant circuler parallèlement différentes solutions dont la composition suit un gradient de concentration d'une certaine molécule, on peut conserver un gradient important sur de longues distances. Ces gradients dans le volume de la solution circulée se traduisent par l'adsorption sur le tampon de gradient de concentration de surface des molécules concernées (figure 3.3).

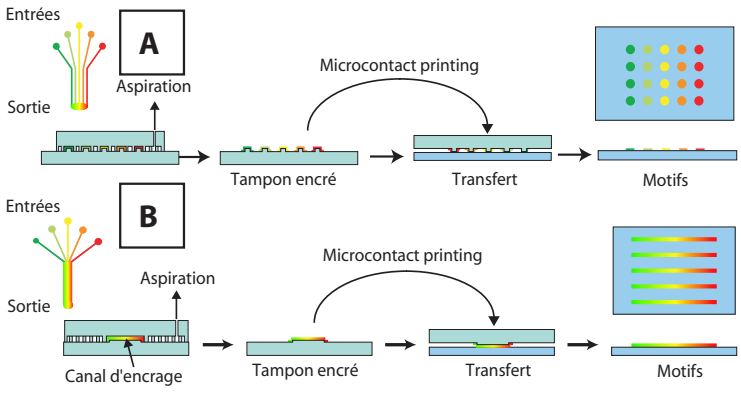


Figure 3.3 – Schema de principe du microcontact princting multicouleur. A) Plusieurs molécules peuvent être utilisées pour encrer les motifs sur le tampon. B) Grâce aux propriétés laminaires des flux dans les microcanaux, les motifs peuvent être encrés avec des gradients de concentrations.

Méthode

Solutions d'encrage : Les solutions d'encrage ont été préparées à partir de d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma), d'albumine de sérum bovin conjugué à un marqueur FITC (BSA-FITC, Sigma) et d'albumine de sérum bovin conjugué à un marqueur Cy3 (BSA-Cy3). Cette dernière protéine a été obtenue par conjugaison de BSA avec le fluorochrome Cy3 (voir annexe B.3). La concentration utilisée était 10 µg/mL dans un tampon PBS.
Fabrication et utilisation des dispositifs : Les canaux des dispositifs en PDMS de 10 µm de haut ont été réalisés par lithographie molle classique (cf. annexe B.2). Les dispositifs ont été utilisés comme décrit au paragraphe précédent et les liquides injectés à l'aide d'un pousse-seringue.
µCP : Après encrage du tampon, le dispositif était désassemblé, le tampon rincé dans du PBS, puis séché dans un flux d'azote. Le transfert de la protéine sur le substrat était réalisé en appliquant le tampon sur la lame de verre pendant 10 s. Pour finir, la lame de verre était vigoureusement rincée à l'eau déionisée pour enlever les protéines mal adsorbées et les résidus de sel.

En utilisant cette méthode, nous avons encré plusieurs types de tampons avec un double gradient de protéines fluorescentes BSA-FITC(vert)/BSA-Cy3(rouge). Comme on peut le voir sur la figure 3.4, des disques de 5 et 20 µm de diamètre (figure 3.4B et 3.4C), ainsi que des lignes de 1 µm de large (figure 3.4D) ont été transférées, créant une impression de motifs dont la composition varie progressivement d'une molécule à l'autre, sur une distance de 500 µm.

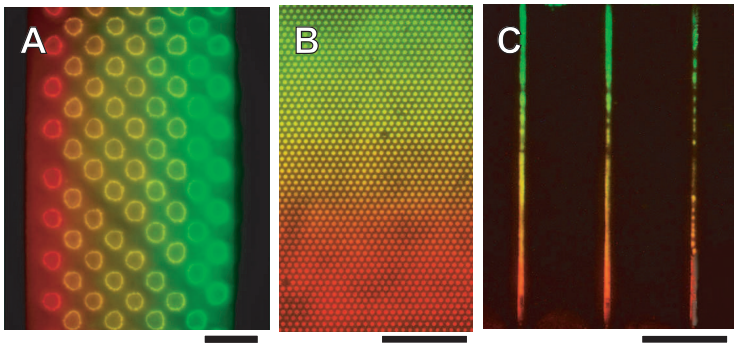


FIGURE 3.4 – Exemple de motifs réalisés par microcontact printing multicouleur. A) Tampon contenant un réseau de plot de 50 µm de diamètre. B) Réseau de plot de 5µm de diamètre. C) Lignes de 5 µm de large. Les barres représentent 100 µm.

La première application de cette technique réside dans la fabrication de différents substrats complexes pour l'étude de la croissance cellulaire, leur motilité et leur différenciation. Les motifs contenant des gradients de protéines permettent de déterminer le rôle de ces protéines dans la signalisation spatiale [37], de même l'utilisation de fonctionnalisation de surface bien définie en termes de motifs et de composition permet de générer et de contrôler des surfaces à l'échelle de la cellule. Par exemple, les propriétés de chémo-attraction de différentes protéines peuvent être étudiées sur la croissance des axones sur des lignes semblables à celles montrées sur la figure 3.4 et la construction de réseaux de neurones de topologie contrôlée est envisageable en guidant la croissance des axones d'un groupe de cellules à l'autre par des gradients de facteur de croissance axonale.

La seconde application possible de cette technique est la fabrication de motifs dans des chambres de dispositifs microfluidiques, pour réaliser notamment des micro-immunoassay, des puces à ADN intégré ou pour contraindre la croissance cellulaire de cultures sur puce. En permettant d'imprimer des motifs sur de petites surfaces, sans altérer le reste du substrat, le MCμCP permet de fonctionnaliser précisément tout type de substrat avant son assemblage irréversible avec les canaux microfluidiques.

3.4 Application à la culture cellulaire

Nous avons vu dans les sections précédentes que le concept d'un assemblage réversible offrait de nombreuses possibilités de traitements chimiques et de fabrication de motifs de protéines sur des substrats. Ces motifs offrent un moyen statique de contrôler l'environnement cellulaire. Il peut permettre de contraindre les cellules sur une surface déterminée ou de les guider suivant un gradient par chémotaxie. Mais le développement cellulaire couvre de nombreuses étapes qui demandent des traitements particuliers. Pour étudier précisément le développement cellulaire, il est nécessaire d'avoir un contrôle dynamique sur l'environnement de la cellule au cours de son développement. Par exemple, la détermination du chemin de différentiation des cellules souches passe par la variation temporelle de certains facteurs dans l'environnement de la cellule [38]. La microfluidique permet de reproduire ces conditions en milieu confiné [39] et pourrait devenir un bon outil pour le criblage automatisé de conditions de différenciation. Toutefois, pour être performant, ce contrôle dynamique devrait pouvoir bénéficier des autres possibilités de la microfluidique ainsi que des méthodes traditionnelles de biologie cellulaire qui ne sont pas toujours aisément adaptables en milieu confiné.

La possibilité de réaliser des assemblages réversibles permet alors de marier les différentes approches en offrant une plateforme versatile de confinement des cellules. La figure 3.5 montre sur un schéma synoptique les différentes possibilités que pourrait offrir l'utilisation d'un système microfluidique réversible en culture cellulaire. Tout d'abord, un assemblage réversible permet d'utiliser simplement, dans un système microfluidique, des substrats contenant des fonctionnalisations de surfaces complexes offrant un contrôle statique de l'environnement cellulaire. Les canaux microfluidiques, quant à eux, permettent un contrôle dynamique de l'environnement de la cellule à travers la variation de la composition du milieu circulant. Pour les cultures à long terme, de nombreuses phases du développement ne nécessitent pas ce contrôle dynamique et les cellules peuvent ainsi être cultivées en milieu non confiné. Ceci évite d'utiliser le matériel coûteux de contrôle microfluidique. D'autre part, certaines méthodes d'analyse comme les mesures électrochimiques ne supportent pas la présence du milieu de culture, sur de longues périodes, qui pollue les électrodes. Ici, encore, un assemblage réversible permet de se dispenser de cultiver les cellules en présence des électrodes et le dispositif de mesure peut être monté au dernier moment. De même, comme l'accès direct aux cellules est rendu possible à tout moment, les protocoles classiques de biologie cellulaire comme l'immunocytochimie peuvent être réalisés avec les protocoles classiques en éprouvette.

Le Dr. Cécile Crozatier *et al.* ont utilisé dans notre équipe, l'assemblage réversible à deux reprises : i) Pour spécialiser des cellules souches en milieu confiné

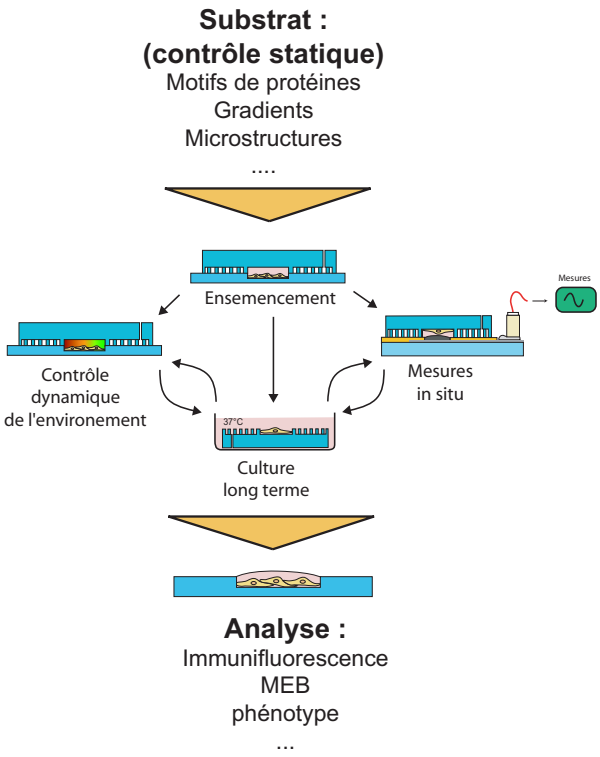


FIGURE 3.5 – Schéma synoptique des possibilités offertes par un assemblage réversible pour la culture cellulaire.

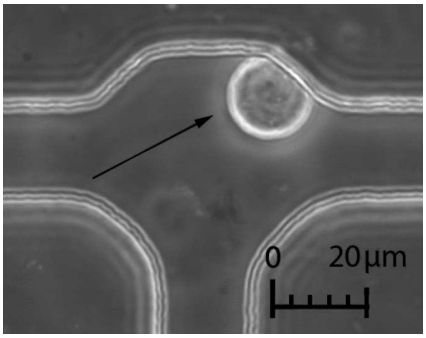


FIGURE 3.6 – Cellule macrophage RAW 264.7 cultivée sur un dispositif réversible en PDMS après désassemblage. La cellule a été ensemencée en milieu confiné en utilisant la microaspiration.

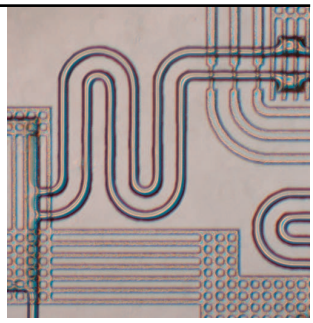
et pouvoir ensuite récupérer les cellules sur un substrat libre. La récupération des cellules a permis d'utiliser les protocoles d'immunocytochimie qui ne fonctionnaient pas en milieu confiné. ii) Pour ensemencer des cellules en des endroits précis en utilisant un réseau microfluidique dédié, les cultiver un certain temps (figure 3.6), puis réassembler le dispositif sur une matrice de microélectrodes afin de réaliser des mesures électrochimiques en milieu confiné. Pour plus de détails sur ces expériences, on pourra se reporter à son manuscrit de thèse [40].

3.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons appliqué le concept de dispositifs microfluidiques réversibles utilisant la micro-aspiration pour fabriquer différents motifs de protéines sur des substrats. L'utilisation directe de ces dispositifs a permis d'obtenir différents motifs d'une ou de plusieurs protéines simplement adsorbées sur la surface ou utilisant un protocole de fonctionnalisation plus élaboré qui permet un greffage covalent. Cette méthode a également été appliquée à d'autres traitements chimiques comme la gravure (cf. annexe A.1).

Les motifs ainsi obtenus doivent respecter une certaine connexité à cause de la continuité de flux dans les canaux microfluidiques. Pour dépasser cette limitation, nous avons utilisé le micro-contact printing, qui nous a permis de plus de guider la croissance de neurones sur des motifs de polyornitine imprimés sur des substrats de silicium. Combinée à des dispositifs à assemblage réversible pour encrer les tampons, cette dernière technique permet d'imprimer des motifs de compositions plus complexes. Cette nouvelle méthode que nous avons baptisée « microcontact printing multi-couleur » (MCμCP), nous a permis d'obtenir l'impression des motifs sur des surfaces en verre composées de gradients de concentration passant progressivement d'une protéine à l'autre, ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant.

L'ensemble de ces techniques offre des outils performants pour contrôler de manière statique l'environnement cellulaire. Nous avons ensuite discuté les possibles utilisations d'assemblages réversibles en s'appuyant sur d'autres réalisations effectuées au laboratoire et impliquant la micro-aspiration. Le contrôle dynamique de l'environnement cellulaire par microfluidique devrait pouvoir être couplé à d'autres approches, qu'elles soient microfluidiques ou traditionnelles sur une même plateforme aux possibilités variées. L'ensemble de ces travaux ouvre de nouvelles voies technologiques pour des études de biologie cellulaire, dans des domaines comme la différenciation cellulaire ou le développement neuronal.



Chapitre 4

Fabrication de motifs d'autres types de matière

Les dispositifs microfluidiques utilisent de plus en plus de matériaux exotiques qui peuvent nécessiter une organisation sous forme de motifs à trois dimensions. Mais très souvent ces matériaux ne sont pas compatibles avec les procédés lithographiques traditionnels et leur intégration requiert de trouver des méthodes non conventionnelles pour fabriquer ces motifs.

Différentes techniques ont été développées pour fabriquer ces motifs, comme le moulage capillaire [17], l'aspiration dans un moule [18], des méthodes utilisant des effets de mouillages [41] ou encore la modification de certains matériaux pour les rendre photo-réticulables ou photo-polymérisables [42]. Mais aucune de ces méthodes ne permet une approche générale qui ne dépend pas des propriétés du matériau à déposer.

Dans ce chapitre, nous présenterons deux méthodes originales pour fabriquer des motifs de matériaux monolithiques. Nous commencerons par présenter une méthode de contrôle indirecte des liquides à travers des membranes de PDMS qui utilise la micro-aspiration. Après avoir montré expérimentalement les possibilités de cette méthode et modélisé les phénomènes mis en jeu, cette méthode sera plus particulièrement appliquée à la fabrication de motifs de matériaux exotiques sur des surfaces. Dans un deuxième temps, une technique de transfert s'apparentant au micro-contact printing sera présentée pour réaliser des motifs de PDMS d'épaisseur sub-micrométrique sur une lamelle de verre.

4.1 Contrôle indirect des liquides

Les volumes typiques manipulés dans les systèmes Microfluidique vont du nanolitre au microlitre. La mise en mouvement et la manipulation de ces petits volumes demande des techniques particulières. Auparavant, de nombreuses méthodes ont été développées pour déplacer les liquides dans les microsystèmes comme les flux commandés par pression [43], les micropompes intégrées [44], les flux électroosmotiques (EOF) [45] ou les forces capillaires [46]. Plus récemment, un des défis majeurs de la Microfluidique est l'intégration à grande échelle de ces éléments [47] qui nécessite des méthodes de manipulation avec une grande capacité d'intégration et des possibilités importantes d'adressage. Des outils dédiés

ont été développés avec succès comme les fonctions à base de vannes intégrées [48], ou les fonctions pour la manipulation de gouttes [49] et ont trouvé des applications dans le criblage haut débit de conditions de cristallisation de protéines sur puce [50] ou l'étude de cellules uniques [51].

Parmi les systèmes de mise en mouvement des liquides, le contrôle par la pression est certainement la méthode qui a eu le plus de succès. De manière similaire, le vide, ou une pression négative peut aussi être utilisé pour des applications particulières [28]. Pour éviter l'utilisation d'un système de contrôle externe, Hosokawa et al. dégazaient leurs puces en PDMS dans une chambre à vide avant de les utiliser. Le PDMS appauvri en gaz autour des microcanaux induisait une chute de pression de l'air enfermé dans le dispositif qui était capable de provoquer son remplissage [52]. Parallèlement, Eddings et al. ont introduit l'utilisation du transport des gaz à travers des membranes en PDMS pour changer indirectement la pression dans des chambres et induire le mouvement de liquides [53].

Nous présentons dans ce chapitre le concept de la micro-aspiration pour créer des chutes de pression dans les microcanaux afin de déplacer des fluides. De manière similaire aux dispositifs contrôlés en pression, une grande quantité de micro-vannes, pompes et chambres de réaction peut être intégré sur un même dispositif. [47].

Dans un premier temps, la mise en œuvre de cette technique sera exposée à travers deux systèmes microfluidiques. Un premier système fera office de démonstrateur des possibilités d'intégration en montrant la possibilité de contrôler la fabrication et le déplacement de gouttes dans des micro-canaux emplis d'air. Comme cette méthode est particulièrement adaptée au contrôle précis des volumes et à la réduction des volumes morts, nous proposerons un deuxième dispositif ou la micro-aspiration sera utilisée pour distribuer les réactifs dans un dispositif basique de criblage des conditions de cristallisation d'une protéine.

Dans un deuxième temps, nous modéliserons et caractériserons un système minimaliste pour mieux comprendre les phénomènes impliqués dans ce principe d'actionneur et fournir des données quantitatives sur les performances que l'on peut attendre de cette méthode. Un modèle théorique prenant en compte les phénomènes principaux sera tout d'abord présenté. Ce modèle traitera du transport de l'air à travers la membrane de PDMS, et dans le corps du dispositif. Ensuite, nous utiliserons une série de dispositifs modèles pour donner des mesures quantitatives sur le comportement de la micro-aspiration. D'un coté, cela nous permettra de vérifier la pertinence du modèle présenté et d'un autre coté, cela nous permettra de discuter le temps impliqué dans les différentes phases du processus de remplissage et l'influence de la géométrie sur les performances de ce type de système.

4.1.1 Principe

La figure 4.1 illustre le principe de la méthode de la micro-aspiration proposé dans ce chapitre. Le dispositif est fabriqué par lithographie molle multicouche de PDMS sur un substrat de verre. La couche de PDMS inférieure contient les canaux microfluidiques de travail, des chambres et des réservoirs. Les canaux de micro-aspiration et les vannes microfluidiques sont dans la couche de PDMS supérieure. Il n'y a pas de connexion directe entre les deux couches.

Grâce à la bonne perméabilité du PDMS aux gaz, l'air est extrait du canal

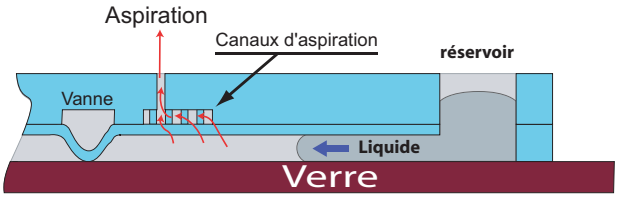


Figure 4.1 – Schéma de principe de déplacement de liquide en utilisant la micro-aspiration et des vannes en PDMS.

de travail à travers la membrane de PDMS qui sépare les deux couches. Pour cela, le vide est créé dans des canaux présents sur la couche supérieure (canaux de micro-aspiration). La présence du vide derrière la membrane provoque une chute de pression dans le canal de travail qui est responsable du déplacement du liquide. La largeur des canaux de micro-aspiration est suffisamment petite pour retenir la membrane et limiter les déformations mécaniques provoquées par la différence de pression. Associé avec des vannes microfluidiques [48], ce concept d'actionneur permet la création de gouttes, le remplissage de chambres microfluidiques sans bulles résiduelles, et la distribution de liquide à partir d'un réservoir jusqu'à n'importe quel emplacement du dispositif microfluidique sans système d'injection directe.

Méthode

Fabrication du dispositif. Les dispositifs en PDMS ont été obtenus en utilisant la technique de la lithographie molle multicouche décrite en Annexe B.2. La première couche est obtenue par spin coating d'une couche 20 µm de PDMS :crosslinker 10 :1 wt :wt sur un moule en résine AZ9260 de 15 µm d'épaisseur ayant subi une étape de fluage pour obtenir un profil de résine arrondi (cf. annexe B.1). Le dispositif en PDMS est collé sur une lame de verre après un traitement plasma (cf. annexe B.2).
Manipulation du dispositif. Avant utilisation du dispositif, les liquides sont disposés dans les réservoirs en utilisant une pipette et toutes les microvannes pneumatiques sont emplies d'eau pour éviter les échanges d'air avec les autres canaux. Un contrôleur de pression est utilisé pour régler la pression dans les vannes et une pompe à dépression (SMC ZU05S) est utilisée pour créer le vide dans les canaux de micro-aspiration. Lors de l'utilisation du dispositif, la pression dans les canaux de contrôle des vannes intégrées (P_{off} = 0 mBar, P_{on} = 600 mBar) et des canaux d'aspiration (P_{off} = 0 mBar, P_{on} = -850 mBar) sont commutés à l'aide d'électrovannes externes contrôlées par ordinateur.

4.1.2 Exemples de réalisations

Manipulation de gouttes

Nous avons tout d'abord démontré la formation de gouttes d'eau à partir d'un réservoir et leur déplacement à travers un canal de 5 cm de long (figure 4.2A). Comme le montre la figure 4.2B, une goutte est formée en remplissant un volume délimité par trois vannes et couvert par des canaux d'aspiration. La vanne 1 sépare la goutte du réservoir, la vanne 2 sépare la goutte du canal de 5 cm de long et la vanne 3 permet d'ouvrir un évent pour libérer la goutte et autoriser son déplacement. Finalement, un second réseau d'aspiration est placé

à l'extrémité opposée du long canal pour contrôler le déplacement de la goutte libérée.

La séquence suivante est utilisée pour fabriquer une goutte : Tout d'abord, les vannes 2 et 3 (figure 4.2B) sont fermées pour former une cavité étanche avec le réservoir où le vide est créé en utilisant les canaux d'aspiration. A ce stade, le liquide provenant du réservoir emplit la cavité en environ 5 s. Ensuite, la vanne 1 est fermée pour séparer la goutte du réservoir et les vannes 2 et 3 sont ouvertes pour libérer la goutte qui peut ainsi se mouvoir et être déplacée jusqu'à une cavité placée à l'autre extrémité du canal en utilisant des canaux d'aspiration.

Plusieurs gouttes successives peuvent être formées de cette manière jusqu'à ce que la cavité, où la micro-aspiration est appliquée, soit totalement remplie. Dans notre cas, la goutte mettait environ 50 s pour parcourir la longueur totale du canal. La goutte commençait sa progression à une vitesse de 1,6 mm/s au début du canal, pour finir à une vitesse de 5,6 mm/s à son extrémité. Cette augmentation de vitesse sera expliquée par la suite.

Remplissage de cavités

La technique présentée ici est particulièrement adaptée à la manipulation de petites quantités de liquide tout en ayant un contrôle précis sur leur volume. Cette particularité la rend pertinente pour la manipulation d'échantillons chers comme c'est le cas dans la recherche de conditions de cristallisation de protéines. Dans cette seconde expérience, nous avons appliqué cette méthode à la cristallisation de protéines sur puce. En effet, l'utilisation d'une méthode flexible de distribution des liquides et la réduction des volumes morts sont des points essentiels à l'efficacité de tels systèmes [54]. Notre technique de manipulation de liquides permet de répondre à ces attentes. Comme le montre la figure 4.3A, le dispositif simule deux types de méthode de cristallisation de protéines simultanément : la méthode par diffusion et la méthode par échange en phase vapeur [50]. Chaque cellule est composée de deux chambres isolées par au moins une vanne de séparation. Une chambre contient la solution de protéine et l'autre chambre contient un agent précipitant. Une fois les chambres remplies de réactifs en utilisant la micro-aspiration, elles sont séparées des réservoirs d'origine par des vannes intégrées.

L'étape suivante consiste à autoriser les échanges entre les deux réservoirs. Pour la cellule de diffusion, l'ouverture de la vanne de séparation permet la diffusion des protéines dans l'agent précipitant (Figure 4.3B). Pour la cellule d'échange en phase vapeur, l'ouverture de deux vannes permet aux liquides contenus dans les chambres d'échanger de l'eau par évaporation à travers la même cavité d'air. (Figure 4.3C à droite). Dans ces expériences, les réactifs ont été introduits dans le système en utilisant une simple pipette et automatiquement délivrés par aspiration. Le volume mort était inférieur à 10% avec un volume réactif distribué bien contrôlé.

La séquence suivante a été utilisée pour remplir les cavités. Tout d'abord, les vannes de séparation sont fermées et le vide est créé dans les canaux d'aspiration. Après un remplissage complet des cavités, le vide est relaxé pour éviter les déformations mécaniques du dispositif dues à la différence de pression et ainsi garder un bon contrôle sur le volume. Ceci est possible car le PDMS environnant la chambre est appauvri en gaz et les bulles ne réapparaissent pas, contrairement aux chambres closes emplies par injection où la pression doit être maintenue pour éviter la réapparition de bulles. Finalement, les entrées des chambres sont

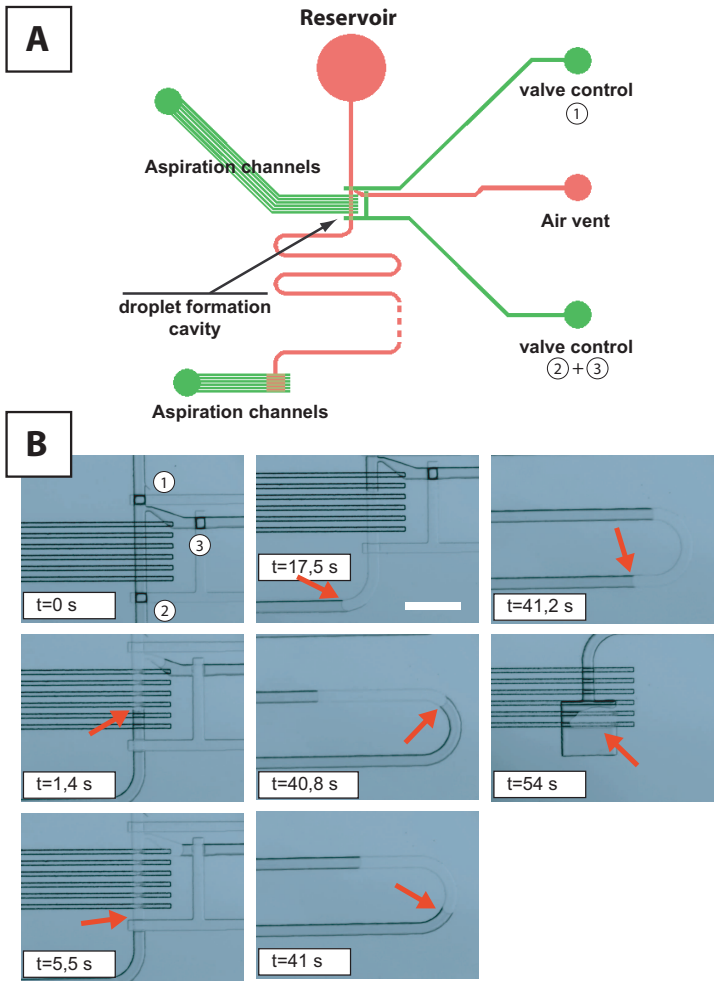


Figure 4.2 – Fabrication et déplacement de la goutte : A) Schéma du système : le rouge indique la couche contenant les canaux de contrôle (couche inférieure) et le vert représente la couche contenant les canaux de contrôle (couche supérieure). B) Séquence d'images de microscopie en transmission illustrant la fabrication d'une goutte. Sur la gauche : Fabrication de la goutte. Sur la droite, déplacement de la goutte le long du canal. La numérotation de 1 à 3 donne le numéro des vannes comme utilisé dans le texte et les flèches rouges indiquent le front de la goutte. La barre d'échelle représente 500 µm.

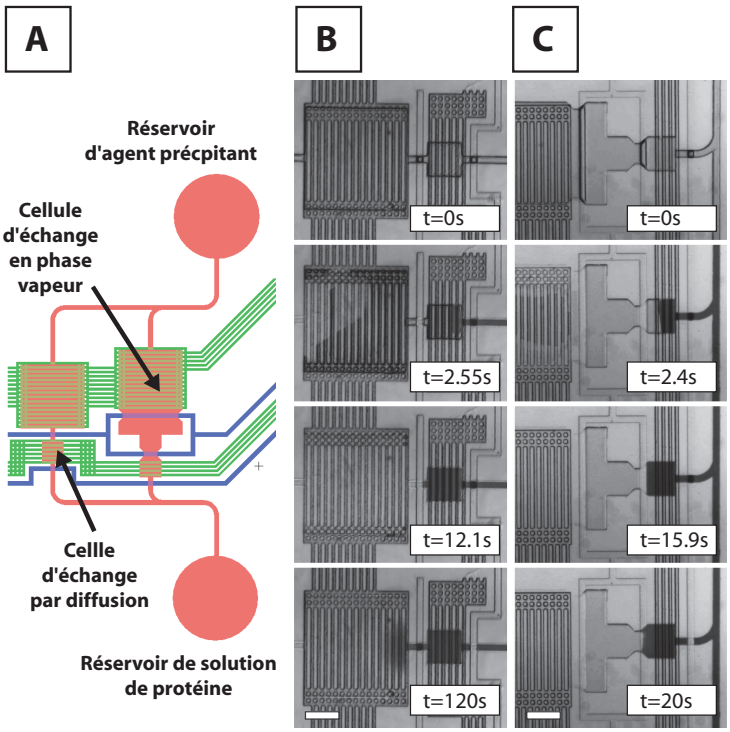


FIGURE 4.3 – Système de cristallisation de protéines. A) Schéma du système : le rouge indique la couche contenant les canaux de contrôle (couche inférieure) et le vert représente la couche contenant les canaux de contrôle (couche supérieure). B-C) Séquence d'images en transmission de la cellule de diffusion (B) et de phase vapeur (C) La protéine est remplacée par un colorant pour l'illustration. Dans les images du bas, on peut remarquer la diffusion du colorant dans la cellule de diffusion et l'interface liquide/air bien contrôlé dans la cellule de phase vapeur. La barre d'échelle représente 500 µm.

fermées et les vannes de séparation ouvertes pour laisser agir la diffusion des espèces.

Lors de l'étape de remplissage, la vitesse de remplissage diminue progressivement : 90% du volume de la chambre était empli dans les 4 s. alors que les 10 derniers % ont pris 6,2 s à se remplir, donnant un débit moyen de 9 nL/s. La vitesse de remplissage est plus rapide en moyenne pour les cavités plus grandes mais un temps minimum de remplissage est nécessaire pour évacuer les derniers volumes d'air encore présents dans les dernières bulles accrochées sur la membrane de PDMS (voir chapitre 4.1.3).

Ce type de puce, utilisant la micro-aspiration pour réduire les volumes morts et simplifier le remplissage des chambres, a été testé avec succès pour réaliser un criblage basique des conditions de cristallisation du lysozyme (voir annexe A.2).

4.1.3 Analyse théorique

Pour mieux comprendre le phénomène de la micro-aspiration et ses champs d'application, nous le décrivons à travers un modèle théorique simplifié. Dans ce modèle, nous décrivons le débit d'un liquide à partir d'un réservoir à pression atmosphérique qui est aspiré dans un simple canal de longueur L en utilisant une zone d'aspiration de surface A (voir 4.4).

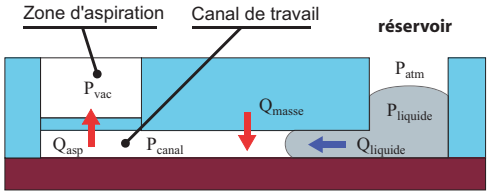


FIGURE 4.4 – Schéma de principe du modèle. P_{asp} est la pression à l'intérieur des canaux d'aspiration qui est appliquée par la pompe à vide, P_{canal} est la pression de l'air encore enfermé dans le canal de travail, P_{atm} est la pression atmosphérique, $P_{liquide}$ est la pression du liquide dans le réservoir, Q_{asp}, $Q_{liquide}$ et Q_{masse} sont respectivement le débit d'air à travers la membrane, le débit de liquide dans le canal et le débit d'air provenant du matériau du dispositif à travers les flancs du canal.

Avant d'appliquer le vide, la pression dans le réseau d'aspiration P_{asp} et la pression dans le canal sont égales à la pression atmosphérique. Une fois le vide allumé, P_{asp} devient plus petit que la pression atmosphérique, ce qui induit un transfert d'air à travers la membrane Q_{asp}. Ce flux fait baisser P_canal ce qui provoque le transfert de liquide $Q_{liquide}$. Pour un liquide de faible viscosité, la pression nécessaire pour créer un déplacement du liquide dans le canal microfluidique est très faible en comparaison de la pression nécessaire pour provoquer le même débit volumique de gaz à travers la membrane. Ainsi, le débit de liquide est déterminé par le débit de gaz à travers la membrane et P_canal reste proche de la pression atmosphérique. Pour calculer le débit de liquide, nous pouvons négliger la viscosité du fluide et la compressibilité du gaz et juste supposer que les débits volumiques Q_{asp} et $Q_{liquide}$ sont égaux. En se basant sur la théorie classique du transport des gaz à travers les polymères [55], le débit volumique par unité de surface à travers la membrane peut s'exprimer par :

$$Q_{asp} = \frac{A.P}{l}(P_{atm} - P_{asp}) \tag{4.1}$$

Où P est la perméabilité du PDMS à l'air, l est l'épaisseur de la membrane, A est la surface de la membrane et P_{atm} est la pression atmosphérique.

Dans le cas idéal, cette équation prédit un débit de liquide constant dans le canal, avant que le liquide n'atteigne la zone d'aspiration. Ensuite, le débit diminue avec la réduction de la surface de la membrane qui est recouverte progressivement par le liquide. En pratique, un autre effet peut devoir être pris en compte. Comme nous le verrons par la suite expérimentalement, un flux de gaz provenant de la masse de polymère du dispositif par dégazage peut perturber de manière significative le déplacement du liquide par aspiration.

La solubilité des gaz dans les polymères peut être importante en comparaison des autres matériaux solides [56] et la réduction des dimensions d'un système augmente rapidement la vitesse d'échange des gaz entre les matériaux. Nous utilisons ce phénomène avantageusement dans nos dispositifs, mais il peut également être à l'origine de limitations. En effet, avant l'utilisation du dispositif, l'air solubilisé dans le PDMS est à l'équilibre avec la pression atmosphérique et bien que la chute de pression dans le canal soit faible en comparaison de la chute de pression à travers la membrane, elle est suffisante pour produire un transfert de gaz du PDMS entourant le canal vers le canal. Ce phénomène peut être modélisé par un flux supplémentaire Q_{masse} entrant dans le canal. Sous les conditions de variation de pression minimale pour obtenir le déplacement du liquide, la chute de pression dans le canal de travail ΔP_{canal} doit être plus grande que la force capillaire et pour des débits plus important, cette chute de pression augmente à cause des forces visqueuses et de la dynamique de mouillage [57]. Même avec une telle pression minimum, l'effet du dégazage de la masse de polymère peut ne pas être négligeable. Pour les canaux très longs, exposés à une masse importante de polymère, ce dégazage provoque un flux de matière entrant qui peut être aussi important que le flux de matière sortant par aspiration.

Comme ce flux dépend de la concentration locale de gaz solubilisé dans le polymère environnant, il est difficile de prédire exactement ce flux. Il varie avec le temps et peut dépendre de la manière dont a été utilisé le dispositif longtemps avant. Néanmoins, il est possible de donner une estimation grossière de l'importance de ce flux en comparaison du débit aspiré.

Le transport de gaz dans le PDMS peut être décrit par la théorie classique du transport des gaz dans les polymères [55]. Les calculs se basent sur l'équation de la conservation de la masse :

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D\Delta p \tag{4.2}$$

Et l'équation de Fick de la diffusion :

$$J = -D\nabla C \tag{4.3}$$

Où C est la concentration de gaz, D est le coefficient de diffusion et J est la vitesse de transfert du gaz, qui peut être également vu comme le débit volumique de gaz par unité de surface. Cette relation peut se réécrire en fonction de la pression pour s'affranchir de la concentration :

$$J = -SD\nabla p \tag{4.4}$$

Où S est le coefficient de solubilité qui représente le volume relatif de gaz solubilisé dans le polymère par unité de pression. En coordonnées cylindriques, l'équation 4.2 donne :

$$\frac{1}{D}\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{r}\frac{\partial r\frac{\partial p}{\partial r}}{\partial r} + \underbrace{\frac{1}{r}\frac{\partial \frac{1}{r}\frac{\partial p}{\partial \theta}}{\partial \theta}}_{=0} + \underbrace{\frac{\partial \frac{\partial p}{\partial z}}{\partial z^2}}_{=0} \tag{4.5}$$

Les variations en θ et en z sont nulles par symétrie et cette équation se simplifie :

$$\frac{1}{D}\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{r}\frac{\partial p}{\partial r} + \frac{\partial^2 p}{\partial r^2} \tag{4.6}$$

On peut montrer qu'en régime stationnaire ($\partial p/\partial t = 0$), cette équation n'admet pas de solution pouvant satisfaire des conditions aux limites du type $p = p_a$ si $r = a$ et $p \to p_\infty$ si $r \to \infty$. Il n'existe pas de régime stationnaire et le système évolue perpétuellement.

Le calcul du régime transitoire n'est pas trivial, mais Crank propose une solution analytique au problème similaire de la diffusion de molécules à l'infini à partir d'un cylindre de concentration fixé [58]. En adaptant son résultat à notre système, on trouve en utilisant l'équation 4.4 :

$$J(t) = -SD\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{4SD(P_a - P_\infty)}{\pi^2 a}\int_0^\infty \exp^{-Du^2 t}\frac{du}{u(J_0^2(au) + Y_0^2(au))} \tag{4.7}$$

Où J_0 et Y_0 sont les fonctions de Bessel du premier ordre.

Pour le cas plus particulier de notre problème, on s'intéresse uniquement au débit de gaz à travers la surface du canal. Dans ce cas, on peut exprimer plus simplement le débit volumique de gaz traversant une unité de longueur du canal :

$$Q_{vl} = \pi a J = \frac{4SD(P_a - P_\infty)}{\pi}\int_0^\infty \exp^{-Du^2 t}\frac{du}{u(J_0^2(au) + Y_0^2(au))} \tag{4.8}$$

En faisant un changement de variable, cette équation peut être rendue adimensionnelle :

$$Q_{vl}^* = \frac{Q_{vl}}{Q_{vl0}} = \int_0^\infty e^{-Fo.u^2}\frac{du}{u(J_0^2(u) + Y_0^2(u))} \tag{4.9}$$

avec Fo le nombre de Fourrier :

$$Fo = \frac{Dt}{a^2} \tag{4.10}$$

et :

$$Q_{vl0} = \frac{4SD(P_a - P_\infty)}{\pi} \tag{4.11}$$

En intégrant l'équation 4.8, supposant la pression comme une fonction échelon allant de 0 à $\Delta P_{channel}$ à $t = 0$, on obtient une expression du volume de gaz provenant de la masse de polymère pendant le processus de remplissage :

$$V_l^* = \int_0^t Q_{vl}^* dt = \Xi(Fo) \tag{4.12}$$

avec :

$$\Xi(x) = \int_0^\infty e^{-x.u^2} \frac{du}{u^3(J_0^2(u) + Y_0^2(u))} \tag{4.13}$$

et :

$$V_{l0} = \frac{4Sa^2(P_a - P_\infty)}{\pi} \tag{4.14}$$

Les expressions de Q_{vl0} et de V_{l0} donnent une forme générale du transport par diffusion à travers les parois d'un canal hémicylindrique. Le calcul numérique de ces fonctions adimensionnelles est donné en figure 4.5 [1].

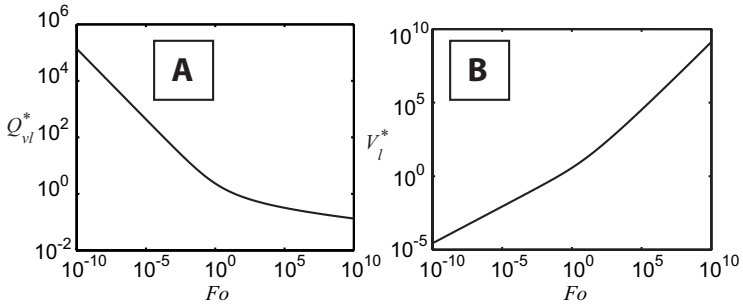


FIGURE 4.5 – Calcul numérique du débit théorique Q_{vl}^* (équation 4.9)(A) et du volume théorique V_l^* (équation 4.12)(B) passant à travers les flancs d'un canal en fonction du nombre de Fourrier Fo.

Maintenant, si l'on fait l'approximation que la longueur dans le canal où le transfert de gaz a lieu reste la longueur totale L du canal (on néglige le recouvrement de la surface du canal par le liquide). On obtient une borne supérieure du volume qui peut être transféré. Le temps de remplissage du canal t_{fill} peut alors s'exprimer :

$$t_{fill} = \frac{V_{tot}}{Q_{asp}} \tag{4.15}$$

Où Q_{asp} peut être calculé par l'équation 4.1. L'équation 4.12 devient alors :

$$V_{PDMS} = \frac{8LSa^2(P_a - P_\infty)}{\pi} \Xi\left(\frac{DV_{tot}}{a^2 Q_{asp}}\right) \tag{4.16}$$

V_{tot} peut être calculé en utilisant l'équation 4.16 itérativement en commençant au volume du canal V_{canal} et en utilisant le fait que $V_{tot} = V_{canal} + V_{PDMS}$

Ainsi, il est possible de prédire en utilisant l'équation 4.16 une limite supérieure du volume additionnel qui doit être extrait par aspiration à cause du dégazage du PDMS environnant. Cela donne les limites géométriques où le débit

1. Ce calcul numérique, programmé avec Matlab, est utilisé pour calculer la fontion Ξ de l'équation 4.16 a été utilisé pour tracer la courbe théorique visible sur la figure 4.10

de dégazage n'est plus négligeable par rapport au débit d'aspiration. Dans ces conditions, le remplissage ne sera pas aussi efficace que le prédit l'équation 4.1. Dans le paragraphe suivant, nous vérifierons la pertinence de ce modèle en le comparant avec des expériences faisant varier le rapport entre Q_{asp} et L. Cela nous permettra de balayer une grande gamme de rapports V_{PDMS}/V_{tot} pour mettre en valeur les situations géométriques où le comportement de la micro-aspiration est anticipé par l'équation 4.1, c.-à-d. quelle est la taille minimum de la surface d'aspiration nécessaire pour obtenir un comportement prévisible.

De plus, l'équation 4.16 permet d'anticiper que la micro-aspiration doit être moins efficace si le rayon a du canal est petit en comparaison des autres dimensions du système et que le comportement du système doit être invariant par rapport à l'échelle en termes d'influence relative de l'air provenant de la masse du dispositif.

4.1.4 Caractérisation

Pour étudier l'effet de la géométrie sur l'efficacité de la micro-aspiration, nous avons conçu un circuit microfluidique composé d'un simple canal partant d'un réservoir et finissant sous un réseau d'aspiration. Lors de la procédure de caractérisation, le canal est rempli en mettant en route l'aspiration tout en mesurant le débit dans le canal. Dans tous les dispositifs, la longueur totale du canal principal est conservée alors que la surface couverte par le réseau d'aspiration est modifiée (figure 4.6). Ces dispositifs nous ont permis, à travers une série d'expériences de tester la pertinence des équations 4.1 et 4.16 du modèle présenté dans la section précédente. Les paragraphes suivants donnent une analyse détaillée des phénomènes observés pendant le processus de caractérisation.

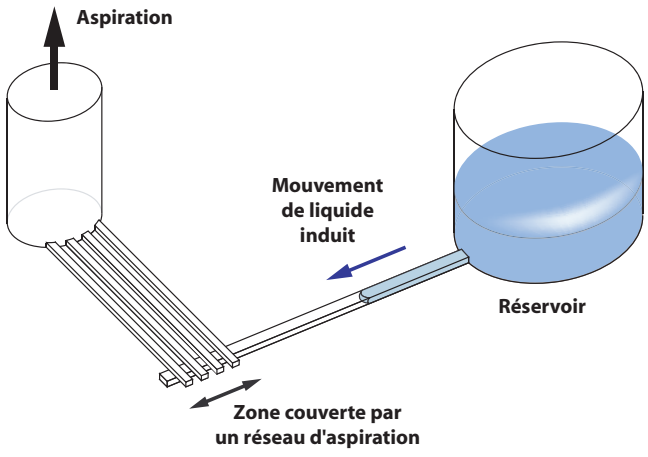


Figure 4.6 – Schéma des dispositifs de caractérisation. Pour toutes les expériences, le canal de travail est constitué d'un canal en cul de sac de 15 mm de long connecté à un réservoir. La zone couverte par le réseau d'aspiration est modifiée d'une expérience à l'autre pour changer la surface d'aspiration.

Méthode

Les quatre dispositifs avec diverses surfaces d'aspiration sont composés d'un simple canal en cul de sac de 2 cm de long, 100 µm de large et 20 µm de haut connectés d'un coté à un réservoir de 2 mm de diamètre et recouverts de l'autre par les canaux d'aspiration. Les réseaux d'aspiration sont formés de 2, 14, 30 et 55 canaux parallèles respectivement de 50 µm de large, 20 µm de haut et espacés de 50 µm. Le dispositif en PDMS a été fabriqué en utilisant la lithographie molle multicouche comme décrit en annexe B.2 à la différence que la partie du dispositif en PDMS n'est pas collée, mais juste posée sur une nouvelle lame de verre propre à chaque expérience, pour permettre de nettoyer le dispositif et laisser la possibilité de pouvoir le réutiliser. En plus, les lames de verre sont traitées chimiquement avec du triméthylchlorosilane (TMCS) par dépôt en phase vapeur après un passage au plasma oxygène pour activer la surface. Ce traitement qui fixe le verre dans un état hydrophobe bien défini, permet d'obtenir une pression capillaire plus reproductible dans le canal et prévient ainsi tout remplissage natures du liquide par capillarité. Comme le PDMS n'est pas réellement collé au verre, la pression utilisée pour l'aspiration est limitée à -300 mBar. Ceci évite le décollage du PDMS du verre à cause des déformations mécaniques induites par la chute de pression dans les canaux.
Avant l'opération de caractérisation, le réservoir est rempli avec une solution de colorant (bleu de méthylène 1 %). Ensuite, une dépression est créée dans les canaux d'aspiration. Alors que le liquide remplit le canal de travail, le déplacement du ménisque est observé au microscope (microscope inversé, Zeiss Axiovert 200, objectif 2,5x). ce déplacement est enregistré simultanément avec une caméra CCD (pixelinnk PL-A741) (figure 4.7) à une cadence adaptée pour obtenir environ 500 images par fichier vidéo. La vitesse de déplacement du ménisque dont un exemple est visible en figure figure 4.7C est ensuite déduite de la vidéo en utilisant un programme d'analyse d'image. Chaque expérience est répétée 10 fois [2] pour évaluer la répétabilité de la mesure. La pression capillaire nécessaire pour remplir le canal a été mesurée en utilisant un canal identique, ouvert d'un coté et connecté à un tube de l'autre. Le même colorant est injecté dans le tube à pression contrôlée et la pression nécessaire pour obtenir une vitesse de ménisque de 100 µm/s est mesurée 10 fois. Cette dernière mesure a donné 25±5 mBar, représentative de la pression capillaire d'avancée du ménisque.

Nous pouvons distinguer sur la figure 4.8 trois phases différentes sur l'évolution du débit. Dans la première phase (phase 1), le débit augmente jusqu'à atteindre un maximum. Cette phase correspond à la période pendant laquelle le flux d'air provenant du dégazage PDMS n'est pas encore négligeable. Ensuite, le débit reste constant à sa vitesse maximum (phase 2). Dans cette phase, l'air provenant du PDMS est négligeable. Finalement, le débit décroît dans une troisième phase qui correspond à la configuration où le liquide passe sous la zone d'aspiration, réduisant sa surface effective.

Comportement idéal

Pour vérifier la pertinence de l'équation 4.1, nous avons mesuré le débit de liquide lorsqu'il atteint le réseau d'aspiration. Dans cette situation, aucun débit d'air ne peut provenir du PDMS car le canal est déjà rempli sur sa zone non recouverte par l'aspiration et le débit est représentatif du flux d'air à travers la membrane. La figure 4.9A confirme que le débit est toujours maximum à ce point et la figure 4.10 montre que ce débit est bien proportionnel à la surface d'aspiration, comme on l'attendait théoriquement. Néanmoins, on peut noter

2. A l'exception du dispositif contenant 2 canaux d'aspiration qui n'a été réalisé qu'une fois pour des raisons pratiques

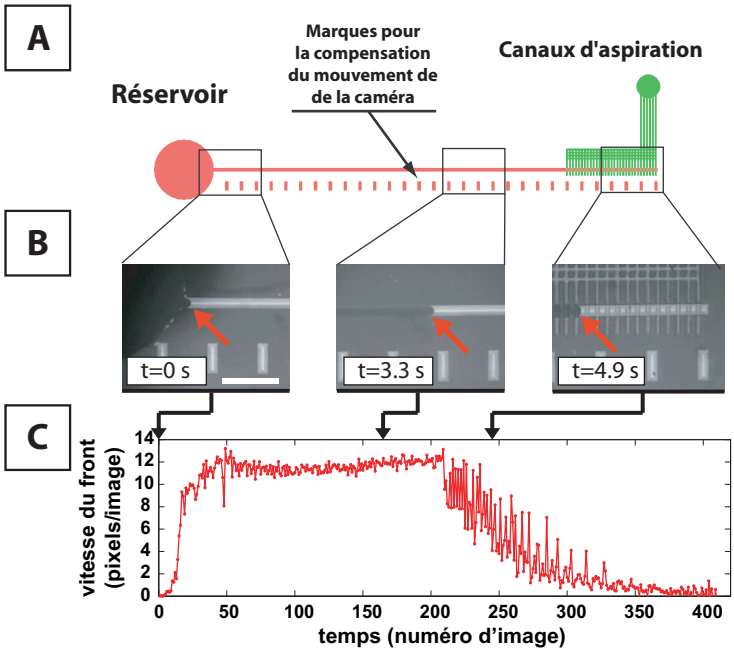


FIGURE 4.7 – Méthode de caractérisation. A) Schéma de conception du dispositif : la couche rouge représente les canaux de travail et la couche verte représente le réseau de vide. B) Image typique extraite à partir d'une vidéo du remplissage. Les flèches rouges indiquent la position du ménisque. La barre représente 100 µm. C) Profil de vitesse typique extrait par analyse de la vidéo.

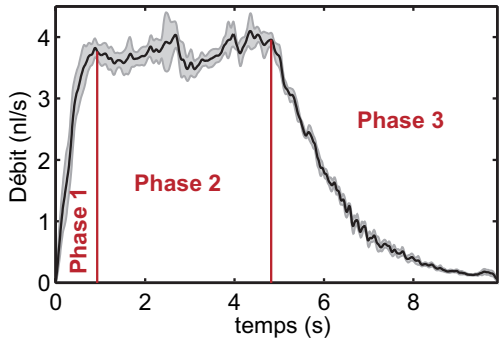


FIGURE 4.8 – Profil typique du débit. Trois phases successives peuvent être distinguées : i) Une phase transitoire d'accélération ii) une phase de débit constant iii) une phase de décélération lorsque le liquide recouvre progressivement la membrane d'aspiration.

que ce débit dévie significativement du comportement linéaire pour le réseau d'aspiration le plus grand. Nous pensons que la déviation observée est due à la viscosité de l'air qui limite sa vitesse d'extraction à travers les canaux d'aspiration et mène à une augmentation sub-linéaire du flux d'air avec l'augmentation de la surface de la membrane au dessus de 3 mm de longueur. En utilisant l'équation 4.16, un ajustement linéaire donne une perméabilité du PDMS à l'air de 930 Barrers, qui est du même ordre que la valeur de 480 Barrers mesurée par Wu et al. [59]. Les raisons possibles de la déviation sont : d'une part les déformations mécaniques de la membrane qui tendent à augmenter sa surface réelle comme l'ont analysé Eddings et al. et d'autre part les effets de bord de chacun des canaux d'aspiration qui doivent ajouter un débit supplémentaire par canal en sus de celui passant à travers la membrane.

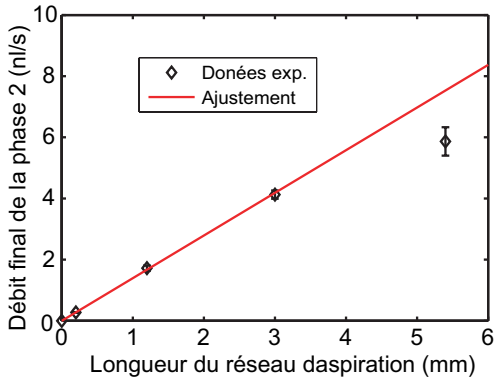


FIGURE 4.9 – Débit mesuré à la fin de la phase 2, juste avant que le liquide passe sous la membrane d'aspiration. L'ajustement donne $Q_{asp} = 14$ µm/s.

Influence des échanges de gaz avec le corps du dispositif

La figure 4.10A compare les débits le long du canal, relativement au débit maximal atteint dans les quatre dispositifs. Comme on l'attendait théoriquement, des débits plus faibles sont observés dans les premier temps du remplissage en comparaison du débit final et le débit dans la première phase augmente avec le rapport entre la zone d'aspiration et la longueur du canal. En supposant un débit constant d'extraction de l'air par aspiration, nous avons calculé le volume d'air supposé provenir du corps en PDMS du dispositif en comparaison du volume total d'air aspiré dans le canal de travail comme défini dans le §2. Les mesures expérimentales sont en bon accord avec l'estimation théorique du modèle donné par l'équation 4.16. La courbe théorique est calculée en utilisant la valeur de Q_m donnée dans la figure 4.10, les propriétés du PDMS données par Merkel et al. [59, 60] ($D = 3{,}99$ cm^2/s et $S = 0{,}11$ cm^3(STP)/cm^3.atm) et supposant une différence de pression dans le canal égale à la pression capillaire aux faibles vitesses du ménisque (25±5 mBar mesuré). Ces résultats impliquent que la réduction du débit observé pour les petites surfaces d'aspiration provient bien des échanges de gaz avec la matière du dispositif. Ainsi, la conception de tels dispositifs doit suivre des contraintes géométriques dérivées de l'équation 4.16 pour rendre ces échanges négligeables en comparaison du débit d'aspiration et pour éviter un comportement non voulu.

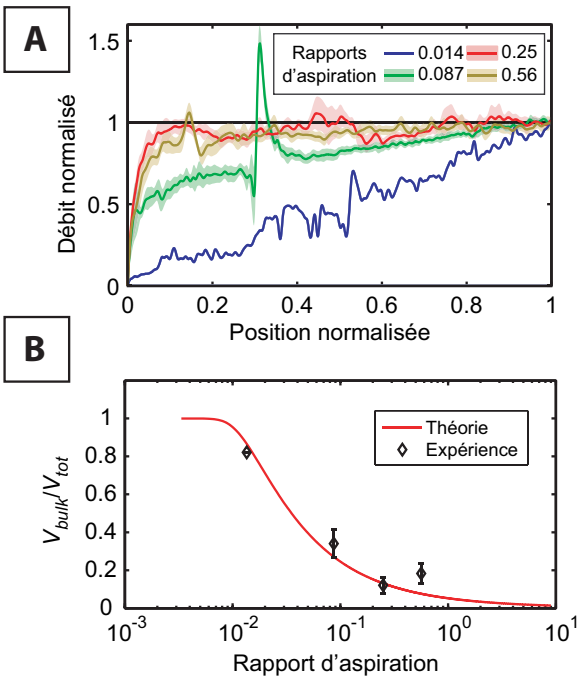


Figure 4.10 – Effet de l'air solubilisé dans le corps du dispositif : (Le rapport d'aspiration est défini comme le rapport entre la longueur du canal recouverte par le réseau d'aspiration et la longueur du canal libre). A) Comparaison du débit normalisé en fonction de la position normalisée pour les quatre longueurs du réseau d'aspiration. On peut voir que l'accélération du débit est plus lente lorsque le débit d'aspiration et réduit et la longueur du canal libre augmenté. B) Quantité relative d'air extrait provenant du corps du dispositif sur la quantité total d'air extrait par aspiration. Les données expérimentales sont calculées à partir des temps de remplissage et la courbe à partir de l'équation 4.1 (voir le texte).

Durée de la dernière phase.

Le temps nécessaire pour remplir entièrement la zone d'aspiration peut représenter une grande partie du temps total du processus de remplissage. Nous allons montrer dans ce paragraphe comment il peut être anticipé.

Dans la dernière phase, le débit décroît linéairement avec la réduction de la surface encore non-mouillée de la membrane (équation 4.1). Ceci peut s'exprimer par la relation différentielle :

$$\frac{dv}{dt} = Q_{asp}s \tag{4.17}$$

Où Q_{asp} est le débit d'aspiration par unité de surface donné par l'équation 4.1 et v et s sont respectivement le volume et la surface du canal qui n'a pas encore été rempli.

En intégrant cette équation avec les conditions aux limites appropriées, on peut en déduire le temps de remplissage de la phase 3 :

$$t_{phase3} = \frac{h}{Q_{asp}} \log\left(\frac{Q_{asp}}{Q_0}S + 1\right) + t_{bulle} \tag{4.18}$$

Ou Q_0 est le débit d'aspiration juste avant que la dernière bulle soit aspirée, S est la surface totale de la membrane déduction faite de la surface de la dernière bulle, h est la hauteur du canal et t_{bulle} est le temps nécessaire pour éliminer la dernière bulle. La relation 4.18 est bien vérifiée comme on peut le voir sur la figure 4.11.

La dernière bulle sous le dernier canal d'aspiration prend un temps constant t_{bulle} pour disparaître. Ce temps minimum d'absorption de la dernière bulle peut être estimé en utilisant un modèle simple de l'aspiration d'une bulle hémisphérique. Dans ce cas, l'équation 4.17 devient :

$$\frac{2}{3}\frac{dr^3}{dt} = Q_{asp}r^2 \tag{4.19}$$

Où r est le rayon de la bulle. En prenant le rayon initial de la bulle égal à la hauteur du canal, l'intégration de l'équation 4.19 donne :

$$t_{bulle} = \frac{2h}{Q_{asp}} \tag{4.20}$$

Cette expression donne un temps d'absorption t_{bulle} =1.1 s en utilisant Q_{asp} mesuré sur la figure 4.9. Ce temps théorique est du même ordre que le temps mesuré expérimentalement sur les vidéos qui vont de 0,8 à 1,5 s en fonction de la position de la dernière bulle sous le dernier canal d'aspiration.

On peut remarquer que, dans de telles conditions, le temps nécessaire pour remplir une cavité en utilisant l'aspiration est proportionnelle à sa hauteur et au logarithme de sa surface. Cela signifie que cette méthode est particulièrement bien adaptée pour remplir des chambres de faible hauteur et de grande surface.

En résumé, le débit induit par un système de micro-aspiration est proportionnel à la surface de la membrane et diminue lorsque le liquide recouvre la membrane. Ce comportement idéal n'est pas respecté si un flux non-négligeable d'air passe à travers des flancs du canal de travail à cause du dégazage du PDMS. Cette situation apparaît lorsque la longueur du canal est trop importante en comparaison du débit d'aspiration et ce phénomène peut ralentir de manière dramatique le processus de remplissage.

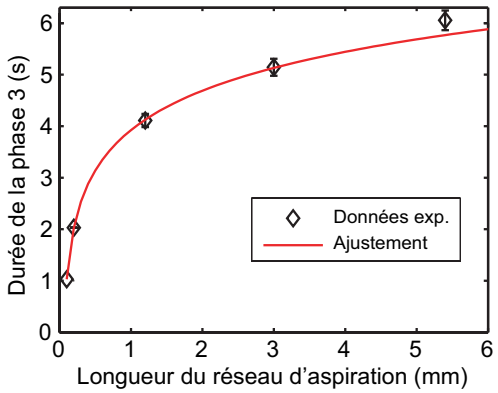


FIGURE 4.11 – de la phase 3 : L'ajustement donne $Q_0 = 0{,}091$ nL/s en utilisant $Q_{asp} = 14$ µm/s (cf. figure 4.9).

4.2 Moulage par microaspiration

La lithographie par nano-impression permet une cadence de production élevée à faible coût pour la fabrication de structures à très haute résolution. Dans cette méthode, des motifs de taille nanométrique sont répliqués à partir d'un patron sur couche mince de polymère étalé par spin-coating sur un substrat. La réplication des motifs se fait par moulage thermique ou par moulage avec traitement UV, généralement suivi d'une gravure sèche réactive (RIE) de la couche résiduelle. Un des défis restant pour obtenir une intégration à grande échelle est de répliquer de manière homogène des motifs de différentes tailles et densités sur de grandes surfaces. Bien que de nombreuses démonstrations réussies aient été réalisées, le transport de la matière sur de longues distances reste délicat [61]. De même, les pressions importantes appliquées dans la nano-impression thermique sont souvent responsables de dommages sur le moule [62]. En plus, la formation de bulles d'air peut souvent être problématique, ce qui a attiré un certain nombre d'attentions particulières sur la composition de la résine et la conception des outils d'impression [16]. Il est également connu que les matériaux mous comme le PDMS peuvent être utilisés pour la fabrication de moules pour la nano-impression UV [63]. Ces patrons en PDMS sont particulièrement intéressants pour obtenir une impression homogène sur de larges surfaces grâce à leur grande élasticité. Cette flexibilité permet également de développer de nouvelles applications, dont l'une d'entre elles est décrite ici : la lithographie assistée par micro-aspiration (MAAL). La MAAL peut être considérée comme une approche opposée à la lithographie par nano-impression. Au lieu d'utiliser une pression pour déformer la couche de résine comme dans la nano-impression classique, la MAAL utilise la force du vide généré par la micro-aspiration pour former les motifs désirés à travers un moule perméable aux gaz. La figure 4.12 montre un schéma de la technique MAAL. Le moule en PDMS est fabriqué en utilisant la lithographie molle multicouche (voir annèxe B.2). La couche superficielle du moule, de quelques dizaines de micromètres d'épaisseur contient les structures à répliquer. Une seconde couche, de quelques millimètres d'épaisseur, qui contient un réseau dense de canaux microfluidiques pour l'aspiration, est collée sur la première couche. En utilisant un tel moule, l'air présent dans la

partie vide du moule peut être aspiré à travers la membrane de PDMS et remplacé par la matière à mouler. Une fois remplie, le matériau moulé est solidifié, soit par un traitement thermique, UV, ou juste par l'évaporation d'un solvant à travers le PDMS. Ce principe peut être étendu à d'autres techniques comme le micro-moulage capillaire (MIMIC) [17], pour en améliorer les performances. Dans cette section, nous montrerons les possibilités de moulage avec différents matériaux puis nous discuterons les contraintes liées à cette technique.

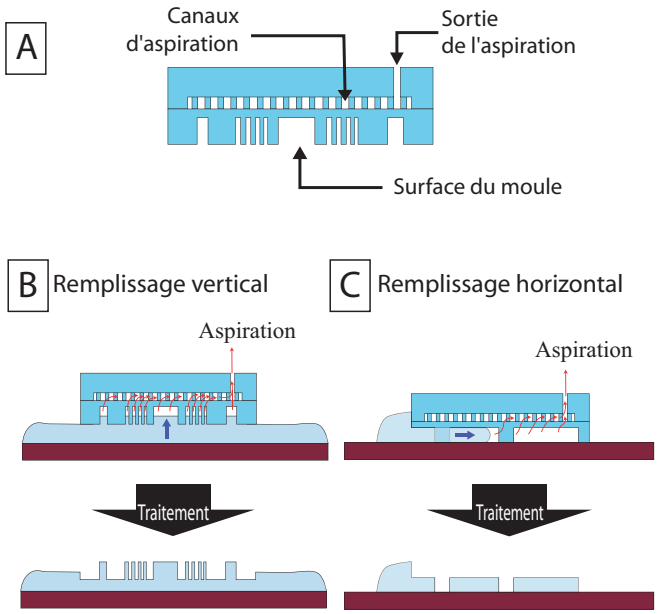


FIGURE 4.12 – principe du moulage assisté par micro-aspiration. A) Les moules assistés par micro-aspiration sont constitués d'une couche mince répliquante en PDMS sous laquelle est collé un large réseau de canaux microfluidiques pour fournir l'aspiration à travers la membrane de PDMS. B) Pour le moulage par remplissage vertical (comme pour l'UV-NIL ou la lithographie molle), le moule peut être placé sur une couche de matériau à mouler, étalé par spin-coat. Après mise en route de l'aspiration, le moulage se fait sans pression supplémentaire. C) Comme dans le MIMIC, une goutte de matériau est déposé contre le moule. La matière est aspirée dans le moule quand l'aspiration est mise en route.

4.2.1 Exemples de moulage

Méthode

Fabrication des moules. Les moules de MAAL ont été fabriqués en utilisant la lithographie molle multicouche [15]. La couche inférieure, utilisée pour le réseau d'aspiration est moulée à partir d'une galette de silicium contenant des structures en résine SU8 2010 (cf. annexe B.1) de 10 µm d'épaisseur. Dans toutes les expériences présentées ici, ces structures en PDMS moulées consistaient en des canaux de 100 µm de large séparés par 100 µm, couvrant toute la surface du dispositif. Après un traitement au TMCS comme agent antiadhésif, le moule est utilisé pour mouler une couche de 5 mm d'épaisseur de PDMS. La couche supérieure de PDMS est une membrane de 20 µm d'épaisseur, obtenue par spin-coating du PDMS sur les structures à répliquer. Après réticulation, les deux couches sont collées après une activation de leurs surfaces au plasma.
Les expériences ont été réalisées aussi bien par impression directe que par remplissage du matériau à mouler par capillarité. L'opération de moulage proprement dite est suivie par un traitement UV, thermique ou l'évaporation du solvant. Pour les impressions hautes résolutions, la matrice de départ a été fabriquée par lithographie à faisceau d'électrons sur une couche de PMMA déposé par spin-coating. Après développement du PMMA, les structures ont été transférées dans le silicium par gravure ionique réactive avec un plasma de SF_6. Les motifs contenus sur le moule étaient des séries de matrices de piliers de 150 nm de diamètre, 150 nm de profondeur gravée et 300 nm de période sur une surface de 2 mm^2. Pour les expériences de moulage capillaire, les moules d'origine ont été fabriqués par photolithographie de couches de 10 et 20 µm de résine AZ9260.

Méthode

Impression directe. Une couche de PMMA de 300 nm d'épaisseur a été étalée par spin-coating sur une galette de silicium. Après un recuit à 180°C pendant 1 min. sur une plaque chauffante, une résine réticulable par UV (LR8765, BASF) a été déposée par spin-coating sur une épaisseur de 200 nm. Le moule en PDMS est ensuite placé sur la couche de résine et l'aspiration est appliquée à l'aide d'une ligne de vide. Une minute après la résine est exposée aux UV à 450 mJ/cm^2. Le moule est ensuite décollé, laissant apparaître des structures bien définies sur l'échantillon de silicium.

Micro moulage capillaire assisté par micro-aspiration. Trois types de moulage assisté par aspiration ont été testés :

1. Moulage de microstructure de PDMS : Pendant l'expérience, le moule assisté par micro-aspiration est placé sur une lame de verre standard, qui a été auparavant activée par un plasma oxygène pour que le PDMS se lie de manière covalente sur le verre. Ensuite, la pompe à vide est allumée et un mélange de PDMS :réticulant 10:1 est étalé à l'entrée du moule (sur sa bordure). Quand la cavité du moule est remplie, après 2 minutes, le montage est placé sur une plaque chauffante à 90°C pendant 2 min. pour réticuler le PDMS des structures. Après avoir refroidi jusqu'à température ambiante, le moule est enlevé, laissant la réplique de PDMS sur le verre.
2. Dépôt de quantum dot (QD) : Une solution aqueuse de QD CdSe/ZnS a été utilisée pour la démonstration du dépôt guidé par aspiration. La solution de quantum dot a été introduite dans les cavités du moule en utilisant la même procédure que pour le moulage du PDMS. A la place du traitement thermique, le solvant contenu dans la solution de quantum dot a juste été laissée évaporer à travers la membrane de PDMS. Après 10 min. d'aspiration, le moule est séparé du substrat, laissant apparaître des dépôts de QDs bien délimités.
3. Moulage de gel d'agar : La même technique a été utilisée pour mouler des structures en gel d'agar. Une fois le gel préparé (1,5%wt dans de l'eau DI à 80°C), il a été aspiré dans le moule au dessus de sa température de fusion (70°C). Après 5 min, le temps du remplissage, le moule a été refroidi jusqu'à la température ambiante puis séparé du substrat. Nous avons obtenu de cette manière des structures de gel d'agarose solidifié sur le substrat.

La figure 4.13 montre les résultats obtenus par MAAL en utilisant les différentes stratégies de moulage. Plus particulièrement, la figure 2A montre les motifs nanométriques obtenus par MAAL. La planéité des motifs sur de longues distances n'est pas très homogène, ce qui peut rendre difficile le transfert sur une couche inférieure. Ce défaut pourrait être évité en réduisant la taille du réseau de micro-aspiration et en augmentant l'épaisseur de la membrane de PDMS.

Le remplissage capillaire des moules de MAAL permet la formation de structures avec des matériaux plus exotiques. La figure 4.13B montre des microstructures fabriquées par remplissage capillaire MAAL après un traitement de 2 min. à 90°C. Bien que le remplissage capillaire puisse être réalisé sans aspiration, 3 min. seulement sont nécessaires pour remplir complètement la surface du moule (4 cm^2), alors que plus de 20 min. seraient nécessaires sans aspiration. Evidemment, la MAAL permet de largement accélérer les procédés de moulage et permet de remplir plus facilement les structures d'où l'air ne peut s'échapper. De plus, les matériaux non-mouillants peuvent également être moulés de cette manière, ce qui n'est pas le cas du MIMIC classique. Bien que cette technique se

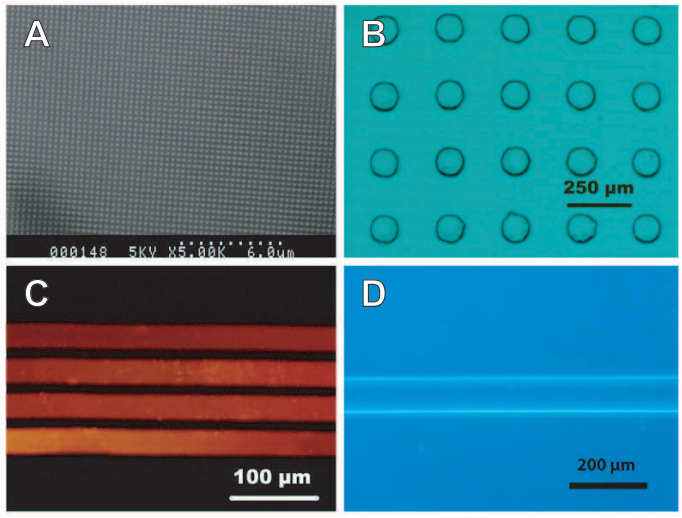


Figure 4.13 – Exemple de réalisation par lithographie assistée par microaspiration. A) Image SEM de piliers de 150 nm de diamètre, 150 nm de hauteur, réalisé par UV-NIL assisté par micro-aspiration. B) Image optique en transmission de trous de 100 µm de diamètre dans une membrane de PDMS de 20 µm d'épaisseur réalisée par lithographie capillaire assistée par micro-aspiration. C) Image de microscopie en fluorescence de bandes de QD de 40 µm de large réalisées par lithographie capillaire assistée par micro-aspiration. D) Image de microscopie en transmission d'un mur d'agarose de 20 µm de haut et 40 µm de large réalisé par lithographie capillaire assistée par micro-aspiration.

limite à la fabrication de structures connexes, nous pensons qu'elle pourra être utile pour de nombreuses applications. Par exemple, elle permet de fabriquer des membranes de PDMS trouées, structures difficiles à obtenir étant donné que le PDMS se grave difficilement. Pour montrer la large applicabilité de cette technique, le remplissage capillaire a été utilisé pour produire des motifs de quantum dot (figure 4.13C) ou des structures en gel d'agar (figure 4.13D) pour des applications particulières, par exemple dans le domaine de la nano-photonique et l'électrophorèse microfluidique.

Cette méthode pourrait également être utilisée pour fabriquer des matrices pour la croissance de tissus artificiels complexes [64] qui nécessitent la fabrication de structures tridimensionnelles de matériaux biocompatibles et/ou biodégradables, souvent des gels naturels ou artificiel [65, 66] qui ne sont pas compatibles avec les procédés de photolithographie classique.

4.2.2 Discussions

Pour mieux comprendre les limitations inhérentes à l'aspiration, considérons une structure en forme de cavité rectangulaire de longueur L et de largeur h, se remplissant par aspiration (figure 4.14).

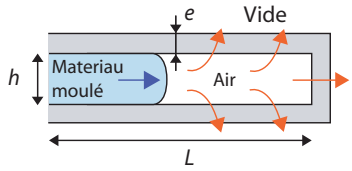


FIGURE 4.14 – Modèle d'une structure à mouler de longueur L et de hauteur h. L'air est évacué à travers une barrière de PDMS d'épaisseur e, à cause de la différence de pression entre les réseaux d'aspiration et l'air contenu dans la structure. Cette dépression dans les structures est responsable d'un flux de matière dans le moule.

Trois phénomènes doivent être pris en compte. Tout d'abord, la vitesse de remplissage de la cavité est limitée par la viscosité du matériau à mouler. Et la géométrie du capillaire. Dans l'approximation de lubrification, le débit de matière peut s'exprimer par :

$$Q = \frac{\Delta P}{L}\frac{h^3}{12\eta} \tag{4.21}$$

Où ΔP est la dépression dans la cavité et η est la viscosité du matériau de remplissage. Ainsi, le temps requis pour remplir la cavité est défini par :

$$t_{remp} = \frac{\Delta P h^2}{12\eta L^2} \tag{4.22}$$

Ensuite, la dépression du vide généré pendant le remplissage de la cavité est le résultat de l'aspiration réalisée par les canaux de micro-aspiration du moule. Cette dépression dépend du débit d'air à travers la membrane de PDMS. Comme nous l'avons déjà vu dans la section précédente, le débit d'air volumique est donné par la loi de Darcy :

$$Q_{asp} = \frac{A.P}{e}\Delta P \tag{4.23}$$

Où P est la perméabilité du PDMS à l'air, e et A sont respectivement l'épaisseur et la surface effective de la membrane de PDMS et ΔP est la différence de pression entre la cavité se remplissant et le réseau d'aspiration. En utilisant un développement similaire de celui réalisé au chapitre 4.1.3 (equation 4.18), on trouve un temps de remplissage :

$$t_{remp} = \frac{e}{P\Delta P}\left(2h + h\log\left(\frac{L}{h}+1\right)\right) \tag{4.24}$$

A partir des équations 4.22 et 4.24, on peut en déduire des contraintes sur la longueur L et la largeur h des structures pour un temps de réplication raisonnable. Pour finir, l'effet principal sur le remplissage capillaire est la force capillaire. Dans certains cas, le matériau de remplissage ne mouille pas bien le PDMS ou le substrat. Comme la force capillaire est fonction de la taille de la cavité et de la tension de surface du matériau, on peut anticiper à partir de la loi de Laplace les conditions dans lesquelles l'aspiration générera une différence de pression supérieure à la pression capillaire. En première approximation, cela impose la condition :

$$h > \frac{2\gamma}{\Delta P} \tag{4.25}$$

Ces contraintes géométriques peuvent être résumées comme sur le diagramme de la figure 4.14, qui aide à visualiser les zones intéressantes de la technique MAAL. La zone grisée sombre correspond aux géométries les plus appropriées pour le moulage assisté par micro-aspiration qui couvre partiellement les zones d'intérêt de la lithographie molle conventionnelle et de la lithographie capillaire. Dans les zones grisées claires, les forces capillaires seront généralement dominantes mais l'assistance de la micro-aspiration reste intéressante pour évacuer l'air enfermé dans les cavités du moule.

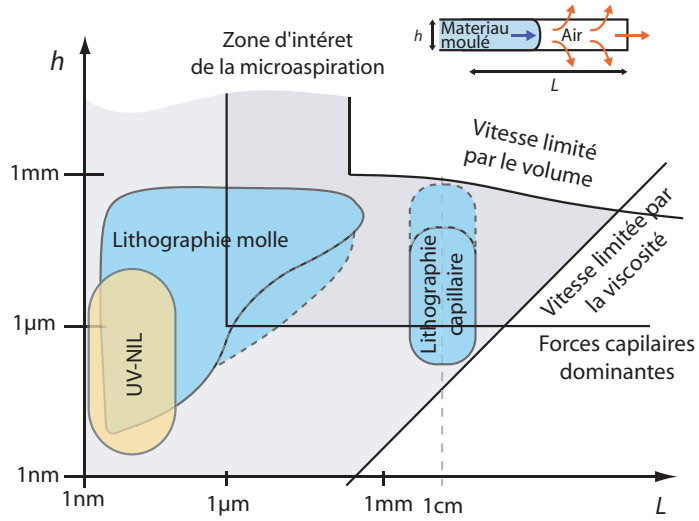


FIGURE 4.15 – Zone d'application des technologies de moulage en fonction de la longueur L et de la hauteur h des tructures à répliquer. La zone de travail habituelle des technologies les plus courantes est indiquée. Les zones en pointillé donnent les zones d'extension probable de la micro-aspiration. Ce graphe suppose une viscosité faible ($\eta = 1$ cps), un bon vide ($\Delta P = 1$ atm) et un temps maximum admissible pour le moulage de 100 s.

4.3 Transfert de matière monolithique

La fabrication de motifs de matière en volume peut également se faire par des méthodes de transfert comme pour le microcontact printing. Ce type de dépôt ne permet pas de définir des motifs à très haute résolution car si le matériau à transférer est monolithique, la création des motifs doit passer par la création de fractures dont la géométrie reste incertaine. D'autre part, une attention particulière doit être portée sur les différences d'affinité de la matière à déposer entre le substrat et le tampon, car la force nécessaire pour créer ces fractures peut être importante.

Nous avons réalisé, en utilisant cette méthode, des motifs de PDMS de 800 nm d'épaisseur sur des lamelles de verre.

En effet, la fabrication de ces motifs n'est pas aisée. Il est possible de graver le PDMS par voie chimique ou par gravure sèche RIE, mais la première ne permet pas de définir de motif, la solution de gravure n'étant pas compatible avec les résines habituelles et la seconde ne permet pas d'obtenir des états de surface de qualité optique sur les zones gravées. Pour pallier ces inconvénients, les motifs de PDMS peuvent être réalisés par moulage suivi d'une gravure de la couche résiduelle [67], mais ce procédé n'est pas compatible avec les couches très minces. Enfin, il existe également du PDMS photosensible [42] permettant de simplifier la procédure technologique, mais sa biocompatibilité n'est pas avérée.

La figure 4.16 illustre le principe du procédé. Tout d'abord, la couche mince de PDMS à transférer est déposée par spin-coating sur une galette de silicium ayant subi un traitement antiadhésif. Le tampon en PDMS utilisé pour le trans-

fert est appliqué sur la couche mince puis recuit pendant 15 min pour augmenter son adhésion. Lorsque le tampon est décollé à chaud, c'est toute la membrane qui se décolle avec lui. En refroidissant, le PDMS se regorge de gaz si bien que la membrane est plaquée le long du moule. Un traitement plasma est ensuite appliqué sur l'autre face de la membrane et sur la lamelle de verre de manière à les coller irréversiblement. Après assemblage, la structure lamelle/couche mince de PDMS/tampon est recuite pour activer la réaction. Lorsque le tampon est décollé de la structure, les zones de la couche mince qui ne sont pas en contact avec le verre restent collées sur le tampon et la membrane n'est transférée sur la lamelle que suivant les motifs présents sur le tampon.

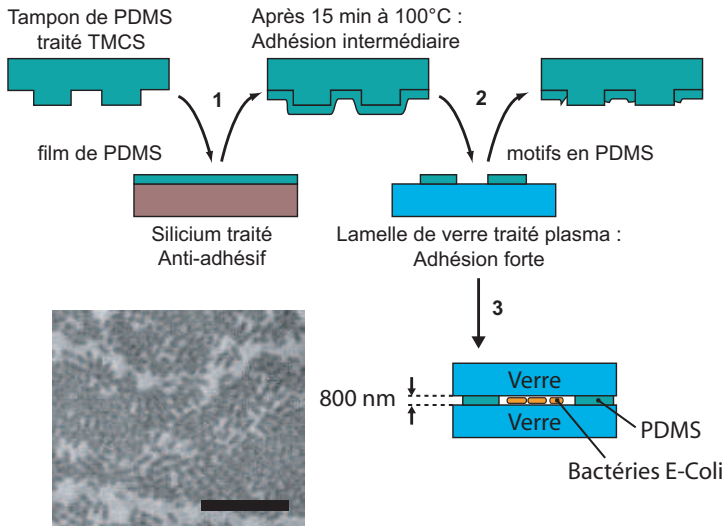


Figure 4.16 – Transfert de couche mince de PDMS. 1) Une couche mince de PDMS est transférée sur un tampon en PDMS. 2) Lors de l'application de ce tampon sur une lamelle de verre, seuls les motifs sont transférés. 3) Ces motifs permettent de réaliser des canaux de faibles épaisseurs dans une structure Verre-PDMS-Verre. Photo : monocouche de bactérie E-coli cultivée dans un canal de 800 nm d'épaisseur. La barre représente 25 µm.

Méthode

Tampon en PDMS. Le tampon en PDMS est moulé sur une galette de silicium contenant des motifs photolithographié de 10 µm d'épaisseur en AZ 9260 (cf. annexe B.1). Le tampon ne doit pas avoir une épaisseur supérieure à 5 mm. Dans le cas contraire, les contraintes dues aux gradients thermiques dans le tampon provoque sa distorsion et son décollement subséquent. La veille de son utilisation, il est exposé à des vapeurs de TMCS pendant 30 min, puis chauffé en étuve à 80°C pendant 1 h.
La galette de silicium supportant le film précurseur est préparée par un traitement au plasma air (Harrick plasma cleaner, 2 min, 500 mTorr, puissance max) suivi de 5 min d'exposition à des vapeurs de TMCS avant un recuit de 10 min à 95°C sur plaque chauffante.
PDMS. Pour réaliser une couche mince de PDMS, des mélanges de PDMS:toluène (1:7) et réticulant:toluène (7:1) sont préparés la veille et agités à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 24 h. Quelques millilitres de ces solutions sont mélangés juste avant le dépôt à raison d'un rapport 30:1 (solution de PDMS:solution de réticulant).
Transfert. Le mélange de PDMS est déposé par spin-coating (30 s à 5000 rpm avec une accélération de 2000 rpm/s) sur la galette de silicium qui est ensuite recuite à 95°C sur plaque chauffante pendant 15 min. Le moule est appliqué sur le film de PDMS, puis recuit pendant 10 min à 95°C sur plaque chauffante. Enfin, le tampon est décollé de la galette de silicium, emportant avec lui une partie du film, passé au plasma air avec la lamelle de verre pour activation (Harrick plasma cleaner, 30 s, 500mTorr, puissance max), puis appliqué sur la lamelle de verre activé pour le collage. La structure Verre/PDMS/Tampon est recuite 5 min à 95°C sur plaque chauffante avant de décoller le tampon du film de PDMS. Le film de PDMS reste alors collé sur la lamelle suivant les motifs du tampon.
Scellement du dispositif. Pour réaliser le dispositif verre/PDMS/verre, la lamelle contenant les motifs en PDMS et une autre lamelle de verre contenant des trous réalisés par sablage sont activés par une étape plasma (mêmes conditions 30 s) puis assemblés sous presse à une pression de 2 Bar pendant 30 min à 60°C. Les dispositifs étant très fragiles, il est conseillé d'enfermer l'assemblage entre deux galettes de silicium couvertes d'une fine couche de PDMS pour limiter les risques de fracture lors de l'opération de pressage.

Ces motifs nous ont permis de fabriquer des structures verre-PDMS-verre formant des canaux de 800 nm d'épaisseur qui conservaient la qualité optique du verre en s'affranchissant de la couche de PDMS inévitable dans les procédés de moulage. Ces dispositifs ont été fabriqués en étroite collaboration avec Alice Demarez de l'équipe de François Taddei (INSERM) dans le cadre d'une collaboration pour développer des systèmes de culture de bactéries à 2 dimensions destinés à étudier leur vieillissement [68]. Pouvoir cultiver de nombreuses bactéries sur deux dimensions est nécessaire pour suivre leur évolution sur de nombreuses générations. Il est nécessaire pour cela de les contraindre mécaniquement. La culture peut être réalisée dans un simple dispositif en PDMS, mais celui-ci produit beaucoup de bruit sur les images en contraste de phase ce qui n'était pas compatible avec les traitements d'images utilisés. Nous avons donc développé ces structures verre-PDMS-verre pour obtenir des canaux qui ont permis de réaliser des cultures de la bactérie Escherichia coli à deux dimensions sur de grandes surfaces, comme on peut le voir sur la figure 4.16.

4.4 Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre une nouvelle méthode utilisant le vide dans des microsystèmes en PDMS pour appliquer indirectement des dépressions dans des canaux. Nous avons montré que cette approche pouvait être utilisée dans différentes circonstances pour induire le déplacement de liquides.

Tout d'abord, nous avons montré le potentiel de manipulation de liquides dans ce type de puce en PDMS en couplant la micro-aspiration avec des micro-vannes intégrées. La possibilité de distribuer des liquides à partir d'un réservoir a été démontrée ainsi que la possibilité de déplacer des gouttes d'eau dans des canaux emplis d'air. A l'interface entre la microfluidique digitale et la microfluidique de flux, nous avons montré que des gouttes pouvaient facilement être générées à partir de solutions d'intérêt biologique et déplacées indépendamment à travers des réseaux microfluidiques complexes. Nous avons également montré qu'un contrôle précis du volume pouvait être obtenu, que les volumes morts pouvaient être optimisés et que le problème des bulles était évité. Cette étude montre que cette technologie pourrait être d'un intérêt majeur pour une large gamme d'applications comme pour la cristallisation de protéines, la distribution de réactifs dans les systèmes microfluidiques, la manipulation de cellules ou encore les tests immunologiques.

Pour décrire quantitativement le comportement des dispositifs utilisant la micro-aspiration, nous avons ensuite proposé un modèle théorique simple. Des dispositifs basiques ont été utilisés pour caractériser quantitativement les performances de nos dispositifs et pour vérifier la pertinence de nos modèles. Les données expérimentales sont en bon accord avec les prédictions théoriques et à partir de ces résultats, nous avons discuté les limites de la méthode. Aussi bien la théorie que l'expérience indique que : i) des débits proportionnels à la surface d'aspiration peuvent être obtenus pour certaines géométries ; ii) La micro-aspiration peut difficilement induire un mouvement de liquide au-delà d'une certaine distance à cause d'un flux d'air supplémentaire dû au dégazage du PDMS ; iii) le remplissage de cavités fermées requiert un temps minimum qui augmente logarithmiquement avec la surface de la cavité. Cette étude devrait aider à la conception de dispositifs basés sur la micro-aspiration et, de manière plus générale, permettre de mieux comprendre le comportement des systèmes microfluidiques fabriqués dans des matériaux très perméables comme le PDMS.

Cette méthode de micro-aspiration a plus particulièrement été appliquée au moulage de matériaux monolithiques sur des surfaces solides. Nous avons présenté deux approches possibles pour cette technique. La première est basée sur l'impression directe d'une résine réticulable par UV et la seconde permet le remplissage capillaire de différents matériaux liquides. Nous avons également donné une analyse semi-quantitative pour comprendre les limitations de ces approches. Plus d'investigations serait néanmoins nécessaires pour explorer le potentiel de la méthode.

Pour finir, nous avons présenté une autre méthode similaire au microcontact printing, mais permettant un transfert partiel de couches minces de PDMS suivant des motifs prédéfinis. Cette technologie nous a permis d'obtenir des canaux réalisés dans un sandwich verre/PDMS/verre de 800 nm d'épaisseur qui a été appliqué à la culture bidimensionnelle de la bactérie E-coli.

Deuxième partie

Microfluidique et fabrication de vésicules géantes

Chapitre 1

Les vésicules unilamellaires géantes

Les vésicules lipidiques, ou liposomes, sont de petites poches d'eau à la peau grasse, ayant des propriétés remarquables : dans les cellules vivantes, elles servent à compartimenter les différentes fonctions cellulaires et sont le constituant de base de chaque organelle. Fabriquées artificiellement, on en retrouve dans des produits cosmétiques et certains médicaments. Mais leur heure de gloire est peut-être encore à venir...

Dans ce premier chapitre, après une brève explication de la nature des vésicules, nous résumerons les principaux domaines d'application de ces petits objets et les espoirs qu'ils suscitent. Que ce soit pour la recherche fondamentale en biophysique et en biologie cellulaire ou pour la fabrication de nouveaux vecteurs thérapeutiques et microréacteurs chimiques ; les vésicules continuent à susciter un intérêt grandissant pour de nombreuses applications. Nous nous pencherons ensuite sur les vésicules unilamellaires géantes (GUV) qui attirent particulièrement l'attention par leur statut de briques de base des cellules artificielles. Nous verrons que ces nouveaux êtres brouillent la frontière entre le monde du vivant et le monde des objets artificiels, ouvrant de nouvelles perspectives de développement inespérées auparavant. Dans une dernière partie, les différentes méthodes de fabrication des vésicules et plus particulièrement des GUV seront revues pour mieux comprendre le contexte des chapitres suivants, notamment les récentes avancées concernant le contrôle de la taille des GUV qui ont largement bénéficié des micro-technologies.

1.1 Les vésicules

Les vésicules sont des compartiments étanches et souples séparant deux milieux. L'étiologue entendra par vésicule un organe enfermant un liquide, le physico-chimiste un assemblage supramoléculaire formant une poche sphérique et le biophysicien un compartiment sphérique dont la membrane est constituée de bicouches lipidiques qu'il appellera également liposome.

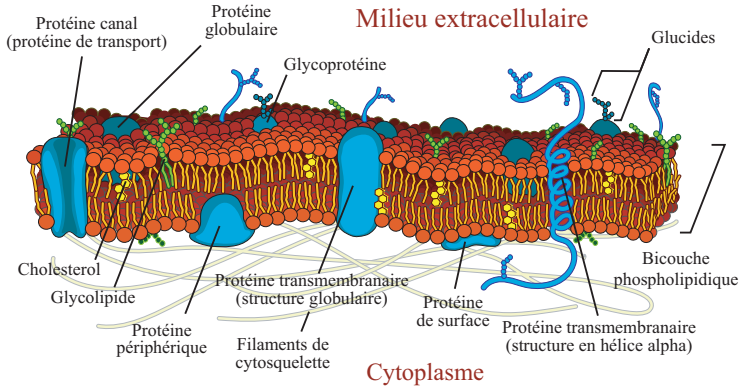


FIGURE 1.1 – La membrane cellulaire est une structure complexe composée d'une matrice de phospholipide dans laquelle diffusent de nombreuses protéines. Adapté de [69]

Les vésicules ont attiré l'attention des scientifiques par leur ressemblance avec la cellule vivante. D'un coté, les cellules sont des objets vivants délimités par une paroi, la membrane cellulaire, qui contrôle les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. La membrane cellulaire est une structure complexe, de seulement quelques nanomètres d'épaisseur, dont la composition peut varier de manière importante d'une cellule à l'autre. Elle contient principalement des phospholipides, qui forment une matrice souple et latéralement liquide dans laquelle diffusent de nombreuses protéines qui réalisent des fonctions variées : de structure, de transport, de signalisation ou encore de catalyse (figure 1.1). De l'autre coté, les vésicules sont des objets artificiels, plus ou moins sphériques, de composition très simple mais possédant également une membrane séparant un volume de liquide du monde extérieur. Le point commun de ces deux objets est la molécule de phospholipide.

1.1.1 Les phospholipides

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles composées d'une tête hydrophile, qui aime l'eau, et d'une queue hydrophobe, qui ne l'aime pas. Ils sont phospho à cause du groupe phosphate qu'ils ont dans la tête et lipide par leur longue queue aliphatique qui est généralement double mais parfois simple voire triple (voir figure 1.2A).

Les différents types de phospholipides peuvent se caractériser en premier lieu par la longueur de leur chaîne hydrocarbonée qui peut aller de 12 à 24 carbones ainsi que par leur degré d'insaturation. La longueur de la chaîne a évidemment une influence sur la longueur de la molécule, mais surtout sur la

température de transition T_m entre la phase gel et la phase cristal liquide. Dans la phase gel les molécules sont cristallisées et ont peu de degrés de liberté, alors que dans la phase cristal liquide les chaînes sont désordonnées et les molécules peuvent facilement se déplacer les unes par rapport aux autres, comme dans un liquide. Plus la queue est longue, plus T_m est élevé. La présence d'insaturations introduit des coudes dans la chaîne ce qui rend la cristallisation plus difficile et fait baisser T_m. La queue des phospholipides la plus courante que l'on trouve dans les membranes cellulaires est composée de deux chaînes de 18 carbones insaturés que l'on appelle dioleyl (DO).

Une autre caractéristique d'un phospholipide est la nature de sa tête. Elle peut être zwinterionique, par exemple phosphatidylcholine (PC) et phosphatidylglycerol (PG), ou chargée négativement, par exemple phosphatidylsérine (PS) et phosphatidyléthanolamine (PE). La figure 1.2C donne à titre indicatif la composition typique d'une membrane cellulaire par tête de phospholipide. Il n'existe pas de phospholipides naturels chargés positivement dans les conditions de pH physiologique, mais on peut avantageusement utiliser comme modèle expérimental des molécules similaires de synthèse comme le DOTAP.

Pour simplifier la lecture des noms des phospholipides, on utilise des acronymes qui donnent une information sur la nature de la chaîne et de la tête de la molécule. On comprendra par exemple par DPPC, l'abréviation pour DiPalmitic (2 fois 16 carbones) -PhosphotidylCholine (tête zwinterionique contenant le phosphate négatif et la choline positive).

Pour de plus amples informations sur les phospholipides, on trouvera dans [70] les propriétés thermodynamiques de ces molécules et dans [71] une petite rétrospective de leurs propriétés dynamiques dans les membranes.

1.1.2 Des phospholipides à la vésicule

C'est le caractère amphiphile des phospholipides qui est responsable de leur agrégation en structures ordonnées, aussi bien dans leur état cristallin qu'en présence d'un solvant polaire comme l'eau. L'analyse thermodynamique du comportement de ces molécules, très bien décrit par Israelachvili [72], permet de dégager la notion de géométrie de la molécule. La taille de la tête par rapport à la taille de la queue, la température et la présence de solvants détermine l'organisation nanoscopique de la phase, qui peut prendre différentes géométries (micelles, cylindres, lamelles...) formant parfois des diagrammes de phases très complexes. Les phospholipides qui forment des vésicules sont tous à peu près cylindriques et forment généralement des phases lamellaires en l'absence de solvant : les queues hydrophobes s'alignent les unes contre les autres, formant ainsi des membranes composées de deux couches de molécules (voir figure 1.2A). Cette organisation est suffisamment stable pour être conservée au-delà de la température de fusion et montre typiquement dans ce cas une structure cristal liquide lyotropique.

Lorsque la quantité de solvant est importante en comparaison de la quantité de phospholipide, ces lamelles peuvent se refermer sur elles-mêmes et former des vésicules. Comme l'illustre la zoologie présentée en figure 1.2B, les formes prises par les vésicules peuvent être variées. Elles peuvent être multilamellaires (MLV) si la membrane est composée de plusieurs bicouches de phospholipides ou unilamellaires si une seule bicouche est présente. Dans ce cas, on parlera alors, en fonction de leur taille, de petite vésicule unilamélaire (SUV) jusqu'à 100 nm, de grande vésicule unilamellaire (LUV) jusqu'à 1 µm et de vésicules

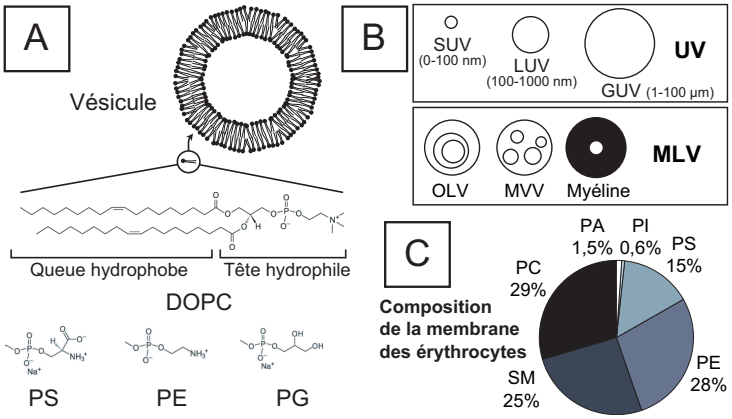


FIGURE 1.2 – Les liposomes : des vésicules composées de phospholipides. A) Les phospholipides sont des molécules amphiphiles composées d'une queue aliphatique hydrophobe et d'une tête amphiphile contenant un groupe phosphate lié à une autre fonction. Quatre exemples : choline (PC), Sérine (PS), Éthanolamine (PE) ou Glycérine (PG). B) Les vésicules unilamellaires (Unilamellar Vesicle, UV) peuvent être petites (Small Unilamellar Vesicle, SUV) grandes (Large Unilamellar Vesicle, LUV) ou géantes (Giant Unilamellar Vesicle, GUV). Les vésicules mulitlamellaires (MultiLamellar Vesicle, MLV) peuvent être oligolamellaires (OligoLamellar Vesicle, OLV), multivésiculaires (MultiVesicular Vesicle, MVV) ou en myéline. C) Composition lipidique de la membrane des érythrocytes (globules rouges) d'après [73]. On y trouve des phosphatidylcholines (PC), des phosphatidylethanolamines (PE), des sphingomyelines (SM) et des phosphatidylserines (PS), mais aussi des acides phosphatidiques (PA) et des phosphatidylinositols (PI).

unilamellaire géante (GUV) au-delà. On trouvera également dans la littérature les termes de vésicules oligolamellaires (OLV) lorsque le nombre de couches est faible mais supérieur à un (SOV,LOV,GOV pour les petites, grandes vésicules et vésicules oligolamellaires géantes respectivement), de vésicules multivésiculaires pour les vésicules contenant d'autres vésicules (MVV) et de structure en myéline lorsque le nombre de lamelles très élevé forme une structure apparemment dense. Ces structures particulières sont généralement indésirables, mais peuvent parfois être utilisées à des fins spécifiques.

1.2 Applications des vésicules

Débutées en 1965, les premières études sur les vésicules ont eu pour objet de comprendre leurs propriétés fondamentales. L'idée de les utiliser comme vecteur thérapeutique est née dans les années 70 et a évolué ensuite. Les petites vésicules de 100 nm, faciles à produire en grand volume et qui peuvent être très stables, ont largement été utilisées en cosmétique pour contrôler la rhéologie du produit. Plus récemment, Les GUV, plus fragiles et plus difficiles à élaborer ont été plus étudiées comme modèle cellulaire artificielle. Parallèlement, l'avancée des technologies et plus particulièrement l'apparition de la microfluidique laisse également envisager de les utiliser comme réacteur chimique. Nous allons développer ici les trois principales applications.

1.2.1 Applications thérapeutiques

Dés 1972, des équipes de recherche ont cherché à utiliser les liposomes comme vecteurs thérapeutiques. Cet outil a évolué et a abouti à quelques réalisations commerciales. Les liposomes ont un intérêt en pharmaceutique car ils peuvent être utilisés comme des containers mésoscopiques ayant une très bonne biocompatibilité. Quatre applications sont principalement visées [74] :

1. **Comme régulateur.** Les liposomes peuvent être utilisés comme des containers laissant diffuser un médicament lentement.
2. **Comme transporteur.** Ils peuvent optimiser l'efficacité de certaines thérapies et en diminuer les effets secondaires en ciblant l'organe malade et en y délivrant leur contenu. Naturellement, les liposomes ont tendance à se concentrer dans le foie et les organes hypervascularisés (par exemple certains cancers) : ce sont des cibles qui seront naturellement privilégiées par le traitement. De plus, il est envisageable de cibler un type cellulaire particulier en ajoutant des anticorps à la surface des liposomes (immunoliposomes).
3. **Comme vecteur de thérapie génique.** Les liposomes pouvant dans certain cas fusionner avec les cellules et déverser leur contenu dans le cytoplasme, cela en fait de bons candidats pour construire des vecteurs non viraux de matériel génétique.
4. **Comme vaccin.** En exprimant des antigènes à leur surface, les liposomes peuvent être utilisés pour activer le système immunitaire sans embarquer de matériel génétique à risque, comme c'est le cas pour les souches infectieuses désactivées utilisées habituellement.

L'efficacité de ces applications dépend de 4 critères :

1. Encapsuler efficacement les molécules d'intérêts dans les vésicules.
2. Augmenter le temps de circulation des vésicules dans le sang.
3. Reconnaître efficacement une cible.
4. Contrôler les mécanismes de délivrance du contenu du liposome.

Des réponses ont été trouvées dont certaines ont donné lieu à des tests cliniques et à la fabrication de nouveaux médicaments actuellement commercialisés. Mais la portée de ces technologies reste limitée à quelques pathologies. Des progrès importants sont attendus pour en faire un vecteur générique et efficace. On trouvera dans [75] le détail des principales techniques utilisées en vectorisation avec des liposomes.

Les GUV en thérapeutique

Jusqu'à présent, les vésicules les plus utilisées en thérapeutique sont des SUV d'environ 100 nm de diamètre, car elles ont le temps de circulation le plus long et se concentrent naturellement dans les zones fortement vascularisées comme les tumeurs cancéreuses. Sans protection, les GUV sont rapidement détruites dans la circulation sanguine et peuvent difficilement atteindre une cible donnée à cause de leur grande taille [76, 75]. Néanmoins, suffisamment bien protégées, elles pourraient avantageusement être utilisées comme container géant pour une diffusion progressive et contrôlée de médicaments sur de longues périodes et elles pourraient également intéresser les applications non circulantes, par exemple en ophtalmologie ou en dermatologie [76]. Actuellement, aucun traitement thérapeutique commercial n'utilise des GUV et leur utilisation en pharmaceutique restera peut être cantonnée dans les laboratoires où elles peuvent servir de modèles géants des plus petits liposomes, pour mieux en comprendre les propriétés.

En revanche, les GUV pourraient avoir un rôle fonctionnel en supportant le métabolisme déficient d'un malade. On trouve par exemple des tentatives de fabrication de globules rouges artificiels en encapsulant de l'hémoglobine dans des vésicules géantes [77] (figure 1.3E). Plus évolués, ces bioréacteurs pourraient devenir de véritables cellules artificielles.

1.2.2 Cellules artificielles

Au-delà de la volonté de fabriquer des réacteurs biochimiques biomimétiques, les cellules artificielles, dont la figure 1.3A donne une illustration, offrent un outil expérimental intéressant pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires. Les méthodes traditionnelles de la biologie cellulaire contiennent des outils très performants pour découvrir les éléments nécessaires à une fonction biologique donnée, mais rares sont les fonctions dont le mécanisme peut être décrit définitivement par ces méthodes sans reproduire la fonction *in vitro*. Un des grands intérêts des technologies visant le biomimétisme est de pouvoir reproduire des systèmes biomimétiques toujours plus complexes et ainsi reproduire les systèmes minimaux qui permettent de prouver les éléments suffisants à une fonction biologique donnée [78]. Ce type d'approche intéresse également l'industrie pharmaceutique car elle permet d'avoir des données quantitatives sur les réactions biochimiques visées et sont de bons outils pour tester l'influence de drogues sur un système.

A l'avenir, les cellules artificielles pourraient poser les bases de vecteurs thérapeutiques intelligents en mimant le comportement de cellules vivantes comme

celui des bactéries infectieuses ou encore pallier certaines déficiences cellulaires du corps en utilisant des êtres artificiels réalisant la fonction déficiente. Une nouvelle approche visant à fabriquer des systèmes presque vivants pourrait donner naissance à de nouvelles thérapies ayant les avantages de l'utilisation de vecteurs réellement vivants, sans certains inconvénients (contamination par des pathogènes ou compatibilité immunologique). D'un point de vue plus fondamental, la connaissance de ces systèmes pourrait permettre de créer de nouveaux modèles de systèmes auto-répliquants dans des conditions prébiotiques plausibles pour éclaircir la genèse des premières réplications cellulaires, étape-clé de l'origine de la vie [79].

Historiquement, le biomimétisme des vésicules a tout d'abord intéressé les biophysiciens pour l'étude des propriétés physiques des membranes. Leur observation en microscopie optique a permis d'identifier la séparation de phase de certains mélanges de phospholipide [80] et en présence de protéines [81]. Ce type d'étude permet d'étudier quantitativement le comportement des « rafts » des membranes biologiques, îlots de composition spécifique responsable de l'organisation spatiale des protéines membranaires [82]. D'autre part, les propriétés mécaniques des membranes peuvent être analysées en fonction des différents paramètres environnementaux, de composition de la membrane [83], de la présence d'un proto-cytosquelette [84, 85, 86] et ainsi offrir des modèles mécaniques quantitatifs des membranes permettant de mieux comprendre comment est définie la forme des cellules vivantes [86], leur rigidité [84], leur déformation lors de la division cellulaire [85], le repliement de leurs organelles [87] ou encore les mécanismes de l'exocytose [88]. De manière analogue, l'étude des interactions de surface entre les GUV et des interactions entre les GUV et un substrat permet d'établir des modèles sur les mécanismes d'adhésion et de dé-adhésion des cellules vivantes [89].

Par une autre approche biomimétique, les GUV ont également été utilisées comme cellules modèles pour caractériser un phénomène exterieur. Par exemple, Römer *et al.* ont montré en utilisant des GUV comme cellule modèle que la bactérie Shiga toxin n'utilisait pas le système d'endocytose de la cellule hôte pour l'envahir [90].

Une seconde génération de cellule artificielle vise l'inclusion de systèmes d'expression génétique reconstitués artificiellement dans des vésicules géantes. Celles-ci permettent d'étudier l'effet du confinement et de la raréfaction des molécules sur les réactions biochimiques en œuvre lors de la translation et de l'expression de protéines comme nous le verrons plus en détail dans le chapitre 4.2.3 [92, 91]. Ces recherches visent à terme la synthèse d'un système cellulaire minimal permettant d'identifier précisément le rôle de chacun de ses composants [89]. Mais pour atteindre cet objectif, un travail de recherche important reste à faire, notamment dans les méthodes de fabrication des vésicules.

1.2.3 Réacteur chimique

Comme il est possible d'enfermer des molécules dans les vésicules, celles-ci peuvent servir de réacteurs chimiques. Yamashita *et al.* ont par exemple montré qu'il était possible de cristalliser des protéines dans des vésicules géantes [93] et Orwar *et al.* ont montré la possibilité de connecter les vésicules les unes avec les autres pour former des réseaux, laissant leur contenu circuler à travers des tubules de phospholipide [94] (figure 1.4A).

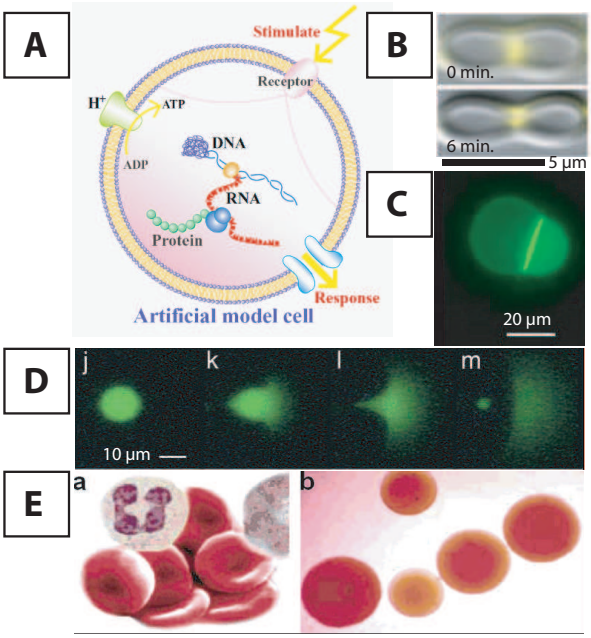


FIGURE 1.3 – Cellules artificielles. A) Schéma de principe d'une cellule artificielle. Elle est composée d'une membrane de phospholipide pouvant contenir des protéines membranaires pour communiquer ou acquérir de l'énergie et contient le matériel nécessaire à l'expression de protéines. B) Déformation d'une vésicule par un anneau de FtsZ (jaune), protéine d'importance pour la division des bactéries. Extrait de [85]. C) Expression de protéines membranaires fluorescentes α-Hemolysin-eGFP dans la membrane d'une GUV contenant un extrait de bactérie *E. coli*. Extrait de [91]. D) Séquence d'image illustrant l'exocytose d'un colorant fluorescent dans une vésicule. Extrait de [88]. E) A gauche : globule rouge naturelle. A droite : globule rouge artificiel formé de vésicules contenant de l'hémoglobine et des enzymes. Extrait de [77].

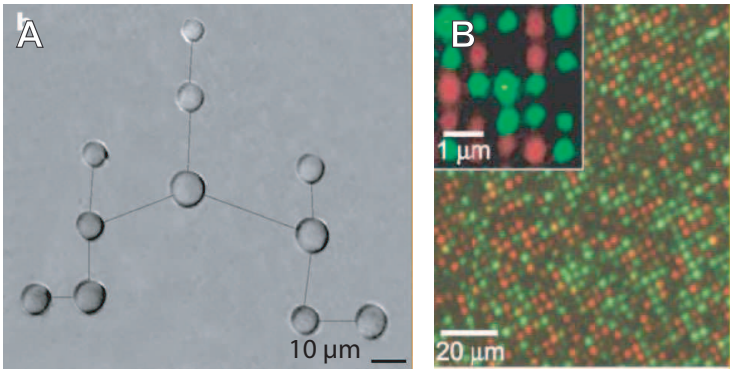


FIGURE 1.4 – Les vésicules comme réacteurs chimiques. A) Réseau de vésicules connectées par des tubes nanométriques de phospholipide. extrait de [94]. B) Matrice de vésicules fixées sur une surface par des couples biotine-streptavidine. Extrait de [95].

D'un point de vue plus industriel, les vésicules géantes sont également de bons candidats pour servir de micro-compartiments pour réaliser du criblage à haut débit de réactions chimiques [96]. Ce type de réacteur a l'avantage d'avoir des propriétés de surface ajustables et peut être adressé par un marquage chimique à l'extérieur de la membrane, lui permettant de retrouver une cible sur une surface. Les réactions pourraient alors être réalisées en solution sur un grand nombre de petites vésicules contenant chacune une condition particulière à laquelle correspond un code exprimé à sa surface. A l'instar des puces à ADN, les résultats des réactions peuvent alors être analysés sur une matrice de points adressant individuellement une condition particulière identifiée par son code [95] (figure 1.4B). D'autre part, la porosité de la membrane des vésicules peut être contrôlée de l'extérieur par changement de température [97] ou à l'aide de facteurs chimiques comme la gramicidine A [95], permettant de déclencher des réactions en modifiant l'environnement chimique de macromolécules enfermées dans les vésicules. De tels réacteurs chimiques pourraient être utiles pour réaliser certaines fonctions biologiques par biomimétisme. Duan *et al.* ont par exemple montré la possibilité de produire de l'énergie en utilisant la protéine membranaire ATPsynthase qui fabrique de l'ATP à partir de gradient de pH [98].

A l'extrême, ce biomimétisme peut également mener au développement de cellules artificielles programmées pour réaliser des réactions chimiques complexes. De nombreuses recherches sont actuellement en cours pour mettre en place des systèmes d'évolution dirigée *in vitro* par un jeu de mutations et de sélections dans un système artificiel programmé pour exprimer une certaine protéine. Ce type de système a pour but d'optimiser la fonction d'une protéine suivant certains critères. La nécessité de ces systèmes de compartimenter la sélection de gènes et d'approcher de plus en plus les performances des cellules vivantes pour pouvoir produire des protéines plus complexes, rend l'utilisation de vésicules inéluctable [99].

1.3 Les méthodes de fabrication

1.3.1 La fabrication de vésicules

De nombreuses méthodes ont été développées pour fabriquer des vésicules et chacune d'entre elles répond à un besoin spécifique. Cette section décrira brièvement les principales techniques existantes pour replacer la méthode de l'électroformation dans son contexte. On trouvera dans [75] des protocoles détaillés de ces méthodes. Mais pour mieux comprendre le paradigme de la fabrication des vésicules, commençons par quelques considérations énergétiques.

La plupart des phospholipides non chargés dans l'eau pure forment des lamelles entre lesquelles il existe une interaction attractive (forces de Van der Walls). A l'équilibre thermodynamique on obtient donc une phase lamellaire hydratée et agrégée, les phases vésiculaires ayant une énergie plus élevée. Dans une phase vésiculaire, plus les vésicules sont unilamellaires, plus leur énergie est élevée à cause des interactions entre les couches et plus les vésicules sont petites, plus leur énergie est élevée à cause du module élastique de courbure et de l'entropie des membranes (figure 1.5A). Cela entraîne deux conséquences pour la fabrication de vésicules : d'une part, il faut ajouter de l'énergie au système

ou modifier l'interaction entre les lamelles pour obtenir des vésicules et d'autre part, certaines précautions doivent être prises pour les stabiliser [100]. Dans l'eau pure, les SUV fusionnent spontanément en LUV qui fusionnent spontanément en MLV. Ce phénomène peut être limité en modifiant les interactions entre les membranes, soit par ajout de sucre dans la solution, soit par ajout de charges dans les membranes induisant une répulsion électrostatique. On peut également envisager une répulsion stérique en ajoutant dans les membranes des phospholipides fonctionnalisés avec un polymère hydrophile.

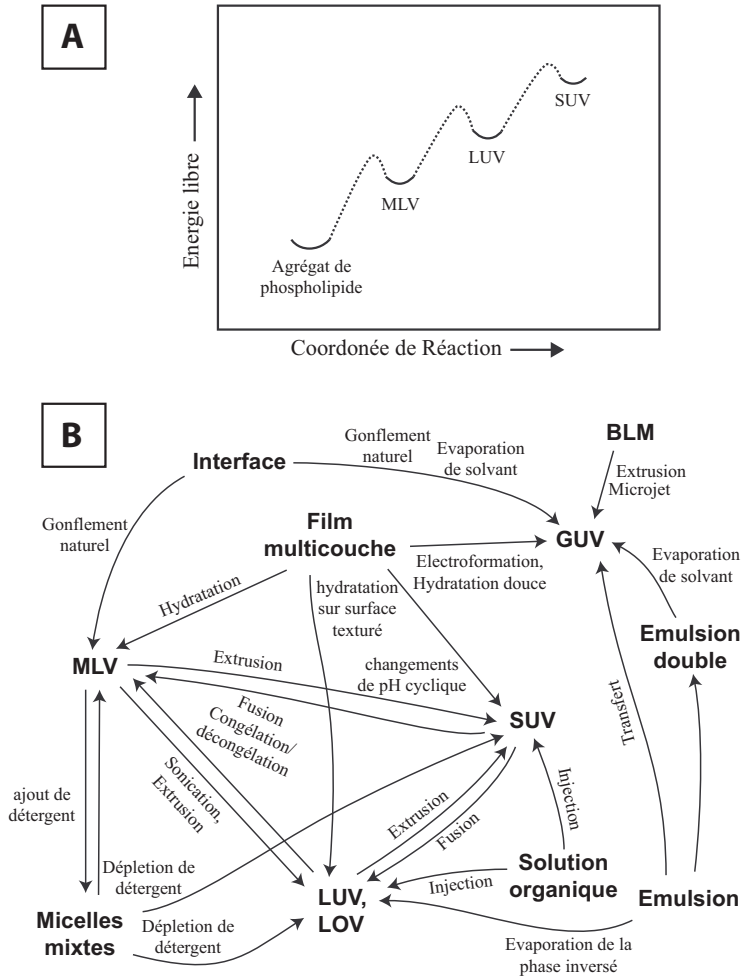


FIGURE 1.5 – Fabrication des vésicules. A) A l'équilibre dans l'eau pure, les phospholipides non chargés forment une phase lamellaire hydratée agrégée. Les phases vésiculaires ont une énergie d'autant plus importante que les vésicules sont petites. B) Schéma représentant les principales méthodes de fabrication des vésicules.

La figure 1.5B donne un aperçu des principales méthodes existantes pour fabriquer des vésicules. Les vésicules les plus simples à fabriquer sont les MLV. Elles peuvent êtres fabriquées par simple hydratation d'un film de phospholipide

séché au fond d'un ballon en agitant vigoureusement. C'est généralement à partir de cette suspension que l'on fabrique les liposomes de plus petite taille.

1.3.2 Méthodes de fabrication des SUV et LUV

En plongeant la pointe d'un générateur d'ultrasons suffisamment puissant dans une solution de MLV, on obtient une solution de LUV et/ou de SUV dont la taille dépend de la puissance et du temps de passage à l'ultrason [101]. Cette méthode, la plus ancienne et certainement la plus simple, donne des vésicules plutôt polydisperses contenant généralement des LOV. Pour un résultat plus homogène et unilamellaire, on utilise généralement une méthode d'extrusion qui consiste à faire passer plusieurs fois une dispersion de MLV, LUV ou LOV à travers une membrane nano-poreuse, dont la taille des pores détermine la taille des vésicules.

Pour enlever les petites molécules solubles pouvant contaminer le contenu des vésicules et pour préserver les protéines membranaires souvent sensibles, on préfèrera la méthode de la déplétion de solvant. Pour cela, un détergent est ajouté à la dispersion de vésicule pour former des micelles. Le solvant est ensuite dialysé pour reformer les vésicules. Cette méthode, un peu délicate à mettre en œuvre peut donner des SUV ou des LUV très homogènes en fonction des conditions [75].

En revanche, si l'on cherche à enfermer dans les liposomes des molécules avec un rendement d'encapsulation élevé, on utilisera la méthode de l'évaporation de la phase inverse qui consiste à faire évaporer la phase organique d'une émulsion de solution aqueuse dans de l'huile contenant des phospholipides. On obtient alors une concentration très élevée de LUV et de LOV (> 50 wt%) qui peut être ensuite diluée dans un tampon adéquat [75].

D'autres méthodes plus simples existent également pour produire des LUV telle l'injection d'une solution de phospholipide en solvant organique dans une solution aqueuse ou encore l'application d'un changement de pH cyclique à une dispersion de MLV [100].

1.3.3 Méthodes de fabrication des GUV

Les GUV sont plus délicates à produire que les petites vésicules unilamellaires car bien qu'elles soient plus stables d'un point de vue thermodynamique, elles sont mécaniquement plus fragiles. La première méthode qui a permis de les obtenir est la méthode de l'hydratation douce [102]. Dans cette méthode, un film de phospholipide est séché sur un substrat lisse comme le fond d'un ballon sur lequel est ajoutée une solution aqueuse. Dans les bonnes conditions (présence de sucres dans une solution à faible concentration ionique ou membrane chargée), les lamelles se repoussent les une les autres et, après quelques heures ou quelques jours d'incubation en fonction de la température, des GUV se forment spontanément à la surface du film. Aucune agitation ne doit être appliquée sous peine de voir apparaître des MLV. Cette méthode est longue et produit généralement une proportion importante de GOV et de MVV [103, 104]. Inspirée de cette méthode, l'électroformation qui sera détaillée dans la section suivante utilise un champ électrique pour accélérer la formation des vésicules et obtenir un gonflement plus robuste.

Depuis, d'autres méthodes de fabrication spontanée de GUV ont vu le jour à partir d'interface solution aqueuse/solvant organique comme la technique de l'évaporation de solvant rapide ou un solvant organique contenant les phospholipides est porté à ébullition sous vide en présence d'une solution aqueuse pour y former des GUV [105] ou encore le gonflement spontané sur une interface solution aqueuse/huile [218]. Cette dernière méthode, développée par A. Yamada en collaboration avec notre laboratoire est décrite plus précisément en annexe **??**.

L'inconvénient majeur des méthodes impliquant la formation spontanée des vésicules est la difficulté d'encapsuler de grosses molécules comme l'ADN à l'intérieur des GUV. Pour pallier cette difficulté, d'autres méthodes ont vu le jour, faisant généralement appel au transfert de gouttes à travers une interface. Dés l'année 1971, Trauble *et al.* a introduit la fabrication de vésicules à partir d'une émulsion d'eau dans l'huile contenant des phospholipides transférée par centrifugation à travers une interface huile/eau [106]. Cette méthode permet d'encapsuler une solution de composition libre et de réaliser des vésicules dont la membrane est asymétrique, i. e. dont la composition des parties intérieures et extérieures de la membrane diffère [106, 107]. Sous certaines conditions, le transfert peut se faire spontanément sans centrifugation ce qui permet d'obtenir des vésicules avec moins de défauts [108]. En contrepartie, ces méthodes permettent difficilement d'intégrer des protéines membranaires sans les détériorer (à cause de l'utilisation de solvants organiques), ; les vésicules sont principalement multilamellaires, ; contiennent de l'huile dans la membrane et ne sont généralement pas stables dans le temps. Pour obtenir une meilleure composition, on utilise généralement l'électroformation.

1.3.4 L'électroformation

Principe

L'électroformation dont le principe est schématisé sur la figure 1.6 est une version améliorée de la méthode d'hydratation douce. Elle a été présentée pour la première fois par Angelova et Dimitrov en 1986 [109].

Dans la méthode d'hydratation douce, un film de phospholipide est déposé sur un substrat puis plongé dans une solution aqueuse. Petit à petit, les lamelles du film se décollent les une des autres et forment après quelques heures des vésicules qui se détachent du substrat [100]. Dans la méthode de l'électroformation, le film de phospholipide est déposé sur une électrode et le gonflement naturel des vésicules est amplifié par la présence d'un champ électrique qui peut être continu ou alternatif. Cette méthode est appréciée car elle permet d'obtenir des vésicules unilamellaires de grandes tailles (typ. 1–100 µm), de l'ordre de la taille des cellules vivantes. De plus, les vésicules obtenues sont stables, unilaméllaires à plus de 95% et leur membrane présente des caractéristiques proches des membranes biologiques. Elle présente également l'avantage de ne pas nécessiter obligatoirement l'utilisation de solvants organiques dans le processus de fabrication des vésicules, ce qui permet d'introduire facilement des protéines membranaires sans les dénaturer. Ses principaux inconvénients sont : i) sa faculté limitée d'encapsulation des solutions salines (par ex. les tampons biologiques), des solutions visqueuses (par ex. un gel d'actine), des grands objets (ADN) et ii) aucun réel contrôle de la taille n'a pu être obtenu jusqu'a présent.

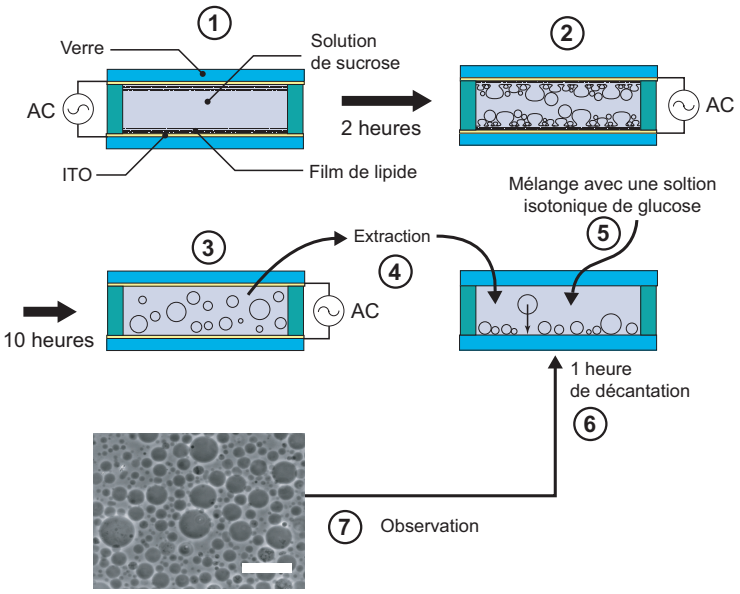


Figure 1.6 – Schéma de principe de l'électroformation et de l'observation des vésicules obtenues. 1) Une cellule de gonflement est préparée à partir de deux électrodes de verre couvertes d'oxyde d'indium étain (ITO) et empli d'une solution de sucrose. 2) Après application d'un champ électrique pendant deux heures, un grand nombre de vésicules ont gonflé sur l'électrode. 3) Après 10 heures de gonflement, la plupart des vésicules sont libres ou faiblement attachées à la surface. 4) Les vésicules sont extraites de la cellule de gonflement avec une seringue munie d'une aiguille de large diamètre (typ. 1 mm). 5) Une partie de la solution contenant les vésicules est déposée au fond d'un puits d'observation, puis mélangée avec une solution isotonique de glucose de plus faible densité. 6) Après une heure de décantation, toutes les vésicules contenues dans la solution sont tombées au fond de la cellule d'observation. 7) On peut alors observer un échantillon représentatif des vésicules formées sur un même plan focal par microscopie à contraste de phase. La barre d'échelle représente 100 µm.

Description

Electroformation en champ continu. En présence d'un champ électrique continu, la formation des vésicules à partir d'un film chargé négativement est accélérée sur la cathode et ralentie sur l'anode (le comportement opposé est observé pour les films chargés positivement) [110]. Sur la cathode, la formation de vésicules à partir de films fins (moins de 90 lamelles) chargés négativement donne de très bons rendements alors qu'aucune vésicule n'apparaît sans champ électrique. Dans ces conditions, la majorité des vésicules ont une membrane très fine, le plus souvent unilamellaire [109].

Electroformation en champ alternatif. En appliquant un champ alternatif, la formation des vésicules conserve un bon rendement pour les films fins. De plus, cette condition a l'avantage de permettre l'utilisation des deux électrodes et de favoriser le détachement des vésicules des électrodes [110]. Le ralentissement de la fréquence est connu pour favoriser le décrochage des vésicules en fin de gonflement [111].

On peut obtenir de cette manière des GUV à partir de nombreux phospholipides, chargés ou non, comme le DMPC [109], DOPC, DOPE, DOPS, DGDG [112], POPC, POPG [113], SOPC [111], DPPC, DLPC [104], DMPG [114], de leur mélange ou d'extrait naturel de phospholipide comme l'EPC [109], Egg lysoPE [112], asolectin [113], soyPC [111], mais aussi à partir de membranes cellulaires complètes [115] ou encore d'autres molécules amphiphiles comme des cyclodextrines duplex [116].

Unilamellarité. L'électroformation utilisant un champ électrique alternatif permet d'obtenir une grande proportion de vésicules unilamellaires sans défauts (80% contre 40% pour la méthode d'hydratation douce) et plus de 95% des vésicules sont unilamellaires [104, 103]. Si aucune précaution particulière n'est prise, l'augmentation de la concentration ionique de la solution a tendance à favoriser la formation de vésicules oligolamellaires [117].

Conditions de gonflement

De nombreux paramètres influent sur le résultat de l'électroformation, à savoir : la nature de l'électrode, la composition et la structure du film de phospholipide, la température, la fréquence et l'intensité du champ électrique, la composition de la solution de gonflement et le temps de gonflement. Inspectons brièvement l'influence de chaque paramètre.

Nature de l'électrode. L'électrode sur laquelle est déposé le film est historiquement un fil de platine pour sa résistance chimique ou une lame de verre recouverte d'ITO dont on bénéficie de la transparence. Pourtant, Ayuyan et Cohen ont montré que les phospholipides insaturés se peroxydaient lors de l'électroformation sur une électrode d'ITO et préconisent d'utiliser des électrode de titane pour éviter cette réaction [118]. Malgré cela, rien ne semble empêcher l'utilisation d'autres substrats s'ils ne provoquent pas de réactions électrochimiques pour les potentiels appliqués. Nous montrerons par la suite que des électrodes en silicium peuvent être avantageusement utilisées.

Nature du film. Le film est généralement déposé en faisant sécher une goutte de solution de phospholipide dans un solvant organique sur l'électrode

de manière à obtenir une épaisseur homogène. Si le solvant organique est indésirable, par exemple si l'on veut incorporer dans la membrane des molécules insolubles dans le solvant ou des protéines qui ne peuvent être déshydratées sans être dénaturées, il est également possible de réaliser le dépôt à partir d'une dispersion de vésicules préparées par une autre méthode [111, 115]. D'autres méthodes ont également été proposées pour déposer le film et seront revues plus en détail au chapitre 3, mais brièvement, l'organisation du film peut avoir des conséquences importantes sur le rendement de l'électroformation et la taille des vésicules obtenues.

Température. Pour que l'électroformation fonctionne correctement, le phospholipide doit être dans sa phase cristal liquide. Pour les phospholipides ayant des températures de transition, gel/liquide cristallin au-dessus de la température ambiante, la cellule de gonflement peut être chauffée [114]. Nous verrons dans le chapitre suivant que la température n'a pas une influence majeure au-delà de cette température.

Champ électrique. Pour obtenir la formation de vésicules à partir de films dont l'épaisseur h est inférieure à une épaisseur critique h_0 (90 lamelles pour la lécithine de jaune d'œuf), il est nécessaire d'appliquer un champ électrique. Au-dessus de cette épaisseur, des vésicules apparaissent spontanément et en dessous de cette épaisseur, les vésicules apparaissent après application d'un potentiel continu supérieur à $U \propto -\ln(h/h_0)$ [110]. Pour des courants alternatifs d'amplitude élevée, les vésicules formées sont plus petites et pour des amplitudes faibles, le film gonfle plus lentement et partiellement. Pour ces raisons, Pott *et al.* préconisent d'augmenter progressivement l'amplitude du signal électrique lors de la première demi-heure de gonflement, afin d'obtenir un rendement élevé avec des vésicules de grande taille [111]. En courant alternatif, la fréquence optimale du signal est d'environ 10 Hz dans les conditions originales (solution de sucrose à 0,1 M). Pour d'autres compositions de la solution de gonflement, il peut être nécessaire de l'adapter (voir § suivant). Il a également été remarqué qu'une baisse de la fréquence d'excitation favorisait le décrochage des vésicules formées du substrat [111].

Solution de gonflement. La solution de gonflement doit être une solution aqueuse dont la composition peut influer sur le résultat de l'électroformation. On utilise généralement une solution sucrée (Sucrose ou Glucose) à une pression osmotique d'environ 0,1 Osm, la présence de sucre étant réputée favoriser le gonflement. Après formation des vésicules, en changeant le type de sucre contenu dans la solution présente à l'extérieur des vésicules sans changer son osmolarité, on peut créer un contraste de densité et d'indice de réfraction optique entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules, ce qui permet une observation aisée. La différence de densité permet de sédimenter les vésicules et la différence d'indice permet d'obtenir un bon contraste en microscopie à contraste de phase. L'osmolarité de la solution a peu d'influence et ce paramètre peut être facilement utilisé pour étudier le comportement des vésicules face à des stresses osmotiques [119]. Néanmoins, pour des expériences à des concentrations élevées, il a été noté qu'il était nécessaire de baisser la fréquence d'excitation en cas d'augmentation de la viscosité du liquide pour avoir une électroformation efficace.

La concentration en sel, quant à elle, est d'une importance majeure. En effet, la présence de sel écrante la répulsion électrostatique entre les membranes [120],

empêchant la formation des vésicules par les méthodes d'hydratation comme par électroformation pour des concentrations au-delà de 10–50 mM [113]. Diverses solutions ont été trouvées pour contourner cet inconvénient. Tout d'abord en diminuant les interactions électrostatiques : i) par l'ajout de molécules intercalaires pour introduire une répulsion stérique, par exemple en ajoutant des phospholipides PEGylés [93] ii) en augmentant la charge des membranes (>15%mol) et/ou en présence d'ions divalents pour augmenter les répulsions électrostatiques [120]. Ces deux méthodes ont donné de bons résultats pour l'hydratation douce mais n'ont pas été testées à notre connaissance pour l'électroformation et elles ont l'inconvénient de nécessiter l'ajout de molécules étrangères dans le système. Une autre approche est de changer la solution environnant les vésicules pendant l'électroformation [113, 121]. Dans ce cas, les vésicules sont formées pendant 90 min. à basse concentration ionique puis leur contenu est remplacé en changeant délicatement la composition du liquide de gonflement. Comme la plupart des vésicules sont toujours reliées par un tubule au film originel, ce qui les rend perméables, le contenu est rapidement remplacé par le liquide de nouvelle composition. Plus récemment, Pott *et al.* ont finalement montré qu'il était possible de fabriquer des vésicules par électroformation à forte concentration ionique sans changer la composition de la solution ou des phospholipides, mais juste en augmentant la fréquence de gonflement (500 Hz pour les conditions physiologique) [111, 115].

Temps de gonflement. L'électroformation est connue comme étant un processus ayant une constante de temps de l'ordre de deux heures [111]. A ce stade, on obtient des vésicules qui ne semblent plus évoluer et restent attachées par un tubule. La modification de la fréquence ou un simple flux permet de les détacher. Néanmoins, nous montrerons que le résultat du gonflement continue à évoluer pour les temps plus long.

Conclusion

Malgré des avantages certains, l'électroformation souffre principalement de la difficulté d'encapsuler certaines molécules et de l'absence de contrôle de la taille. Par la suite, nous explorerons de nouvelles méthodes pour pallier ces inconvénients. Mais avant tout, donnons un aperçu de l'état de l'art des techniques visant la fabrication de GUV de taille contrôlée. Toutes ont un point commun : la microfluidique.

1.3.5 La Microfluidique pour la fabrication des GUV

Les méthodes de gonflement spontané de vésicules donnent généralement une importante polydispersité qui ne peut être corrigée par les techniques habituelles de reformation des SUV et des LUV (extrusion ou déplétion de solvant). Face à la nécessité d'obtenir des vésicules géantes monodisperses pour leurs perspectives d'application dans le domaine des cellules artificielles, un important effort de recherche s'est récemment concentré sur la fabrication de GUV monodisperses. Comme l'échelle de ces objets est bien loin de l'échelle mise en jeu dans les phénomènes d'auto-organisation, l'utilisation d'un patron de taille micrométrique nécessitant des technologies de microfabrication paraît la solution la plus appropriée. Les résultats des recherches récentes semblent confirmer *a posteriori* cette supposition.

Lasič *et al.* avaient déjà introduit en 1987 l'utilisation de surface texturées pour contrôler la taille de SUV et de LUV fabriqués par la méthode de l'hydratation [122, 123, 124]. D'autre part, la fabrication de vésicules par extrusion permet un bon contrôle de leur taille moyenne qui est en rapport avec la taille des pores de la membrane utilisée. Une bonne monodispersité peut même être obtenue pour les SUV de taille inférieure à 100 nm fabriquées de cette manière [125, 75]. Mais cette méthode n'est pas directement applicable à la fabrication de GUV. Néanmoins, s'inspirant de cette méthode, Dittrich *et al.* ont montré qu'il était possible de fabriquer des vésicules de 4 ± 2 µm de diamètre par extrusion d'un film de phospholipide multicouche à travers des trous de 3,5 µm micro-fabriqués dans une membrane de nitrure de silicium. Les vésicules obtenues étaient multilamellaires et relativement polydisperses [126]. Toujours par extrusion, mais cette fois-ci à l'aide d'un jet de liquide propulsé à l'aide d'une micropipette à travers une bicouche de phospholipide, Funakoshi *et al.* ont obtenu des vésicules monodisperses de 300 ± 30 µm [127], mais leur membrane contenait une quantité notable d'huile. En améliorant cette technique, Stachowiak *et al.* ont obtenu des GUV monodisperses de 200 ± 6 µm [128](figure 1.7C). Ces derniers ont montré la possibilité d'incorporer une protéine canal membranaire dans la membrane (α-hemolysine) confirmant le caractère fonctionnel et unilamellaire de la membrane. Néanmoins, cette méthode ne permet pas encore d'obtenir un grand nombre de vésicules en un temps raisonnable et la taille des vésicules obtenues reste trop grande pour servir de modèle cellulaire.

En utilisant l'électroformation, Taylor *et al.* ont obtenu des vésicules de taille contrôlée en imprimant le phospholipide sur une électrode d'ITO par microcontact printing [129, 130] (figure 1.7A), mais il n'a jamais été montré qu'il était possible d'obtenir des vésicules réellement monodisperses par cette méthode. Ceci malgré d'autres tentatives [131] et comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

Pour obtenir des vésicules parfaitement monodisperses, l'idée a également germé d'utiliser des patrons pour fabriquer les vésicules. En précurseur, Katagiri *et al.* ont utilisé des particules monodisperses comme support de fabrication, ce qui a permis de fabriquer des simili-vésicules géantes parfaitement monodisperses, mais celles-ci s'apparentent plus à des membranes supportées sur un support sphérique qu'à de vraies vésicules [132] (figure 1.7B). Dans le même esprit, Shum *et al.* ont utilisé des émulsions doubles de taille contrôlée par microfluidique (figure 1.7D). L'émulsion composée de gouttes d'eau dans un solvant organique volatile dans l'eau en présence de phospholipides, se transforme, après évaporation du solvant dans l'eau, en des vésicules parfaitement monodisperses [133]. Cette technique permet de fabriquer des vésicules plus rapidement qu'avec la technique micro-jet, mais le caractère unilaméllaire des vésicules obtenues reste à démontrer.

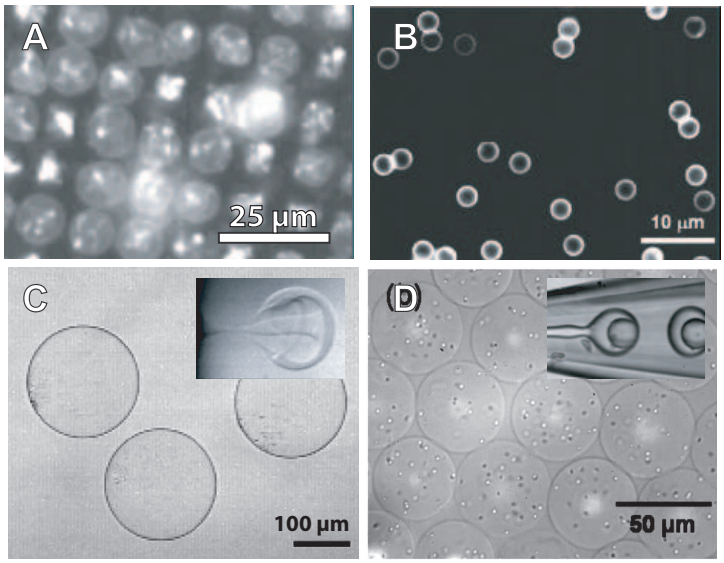
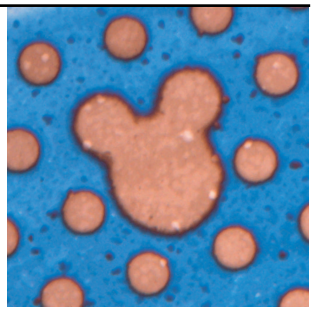


FIGURE 1.7 – Fabrication de vésicules géantes monodisperses. A) Par électroformation en imprimant des motifs de phospholipide sur l'électrode par microcontact printing. Extrait de [129]. B) En utilisant des billes de polymère comme support. Extrait de [132]. C) par extrusion microjet (En insert : formation d'une vésicule). Extrait de [128]. D) Vésicules formées a partir d'une double émulsion et contenant des particules de latex (En insert : fabrication de l'émulsion). Extrait de [133].

1.4 Conclusion

Des quatre ordres de grandeur qui séparent la taille des plus petites vésicules de la taille des plus grandes, résulte un large panel d'objets plus ou moins sphériques. Après avoir introduit les bases de leur composition, nous avons présenté les différentes configurations que pouvaient prendre les vésicules composées de phospholipides, également appelées liposomes, et leurs applications potentielles comme outils dans le domaine de la recherche et dans l'industrie. Le cas des vésicules unilamellaires géantes a attiré plus particulièrement notre attention comme brique de base des cellules artificielles qui offrent actuellement de nouvelles perspectives dans des domaines très divers, comme la compréhension des mécanismes cellulaires ou la production industrielle de protéines. La nécessité de trouver de nouvelles méthodes pour fabriquer des vésicules géantes de taille contrôlée, indispensables à l'élaboration des prochaines générations de cellules artificielles en est ressortie. Après une rétrospective des différentes méthodes de fabrication des vésicules, nous avons présenté plus précisément la méthode de l'électroformation dont il sera question dans le chapitre suivant. Pour finir, nous avons présenté les différentes techniques microfluidiques apparues récemment visant l'obtention de vésicules monodisperses. Si certaines présentent des aspects très intéressants, notamment pour l'encapsulation de solutions variées, aucune d'entre elles ne permet encore de remplacer l'électroformation qui permet d'obtenir un grand nombre de GUV parfaitement unilamellaires et qui peut s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques, condition indispensable à l'intégration de protéines sensibles dans la membrane.

Comment mieux contrôler cette technique de fabrication encore mal comprise ? C'est à cette question que tentera de répondre le chapitre suivant.



Chapitre 2

Electroformation de vésicules de taille contrôlée

Nous avons discuté dans le premier chapitre, la nécessité de trouver des méthodes permettant la fabrication de GUV de taille contrôlée pour les prochaines générations de cellules artificielles. Certaines ont déjà vu le jour parallèlement à nos travaux et permettent d'obtenir des vésicules monodisperses en utilisant des techniques microfluidiques d'extrusion ou d'émulsion double. Toutefois, ces techniques souffrent encore de faibles rendements et n'ont pas permis d'obtenir des membranes de très bonne qualité. Seule l'électroformation permet d'obtenir un grand nombre de vésicules unilamellaires avec une bicouche bien définie. Il demeure que jusqu'à présent, aucune technique de contrôle de la taille de vésicules fabriquées de cette manière n'a encore donné de résultats satisfaisants. Pourtant, pour certaines applications, l'utilisation de l'électroformation offrirait une plus grande liberté quant à la composition et la qualité de la membrane des GUV formées. Dans ce chapitre, nous apporterons certaines réponses à ce problème.

Nous commencerons par décrire les outils informatiques que nous avons développés pour caractériser la taille des vésicules par analyse d'image. Ensuite, des paramètres de l'électroformation : tels que la température, le temps de gonflement et la nature de la surface dont l'influence est peu connue seront étudiés en terme d'influence sur la distribution des tailles des vésicules électroformées. Pour finir, deux techniques basées sur le masquage de l'électrode et l'impression de motifs de phospholipide sur l'électrode permettant un certain contrôle de la taille des vésicules seront présentées.

2.1 Méthode de caractérisation de la taille des vésicules

Pour quantifier la distribution en taille des vésicules fabriquées, il est nécessaire de pouvoir mesurer leur taille une fois celles-ci extraites. L'observation des vésicules contenant du sucrose dans une solution de glucose donne un bon contraste au microscope à contraste de phase, grâce à la différence d'indice entre le contenu de la vésicule et son milieu. Les liposomes ainsi observés sont caractérisés par un disque sombre entouré par un halo blanc et le niveau de signal sur bruit est élevé. Cette forme caractéristique se prête bien à l'analyse d'image.

De nombreuses méthodes d'analyse d'image existent pour détecter ce type d'objet. Les trois suivantes ont été l'objet de nos investigations :

- **Seuillage.** Cette méthode consiste à séparer l'objet du fond en sélectionnant les zones de l'image dont la luminosité est supérieure à un certain seuil, puis de mesurer la taille des objets détectés. C'est la méthode la plus simple à mettre en œuvre. Elle a été utilisée pour analyser les premières expériences, mais elle a vite été abandonnée à cause de son manque de robustesse. Le seuillage est bien adapté pour analyser les vésicules fluorescentes car leur luminosité est homogène et les images contiennent généralement peu d'objets parasites.
- **Détection de contours.** Cette méthode consiste à sélectionner les maxima de gradients spatiaux de luminosité. C'est la méthode retenue pour faire les histogrammes des tailles des vésicules observées en contraste de phase. Elle fonctionne bien si les images sont de bonne qualité.
- **Transformée.** A l'instar de la transformée de Fourrier à 2 dimensions qui décompose l'espace de l'image en somme de sinusoïdes, cette méthode propose d'utiliser une transformée identifiant des formes de vésicule. Cette solution est plus robuste et plus souple, mais très coûteuse en termes de calcul et d'espace mémoire. Elle sera utilisée pour le cas difficile de l'analyse des images confocales d'expression de protéines dans les vésicules lorsque l'expérience ne peut produire d'images de bonne qualité.

Les programmes d'analyse ont tous été réalisés avec Matlab et sa boite à outil « Image processing toolbox » qui propose de nombreux outils facilitant la manipulation des images.

2.1.1 Analyse des images par seuillage

Pour mesurer la distribution des tailles des vésicules, il est d'abord nécessaire de séparer de leur fond les objets à détecter. Si ces objets ont une luminosité différente de celle du fond, on peut définir un seuil de luminosité au dessus ou en dessous duquel un point appartient ou non à l'objet. Ce seuil peut être défini manuellement ou automatiquement par une analyse de la distribution de la luminosité sur l'image. Ensuite, on mesure les caractéristiques géométriques de chaque ensemble de points connexes dépassant le seuil pour construire la distribution.

Nous avons utilisé cette méthode lors de nos premières expériences. Elle s'est avérée efficace pour analyser des photos de vésicules prises en microscopie à fluorescence classique, mais elle ne fonctionne correctement que si les images sont de bonne qualité, avec un seuil bien identifiable et peu d'objets parasites, ce qui

n'était pas toujours le cas lors de nos expériences. Par exemple, en microscopie à contraste de phase, les vésicules sont plus sombres que le fond, mais un halo blanc se forme autour des vésicules les plus grandes. La présence de ce halo rend cette méthode inadaptée dans ce cas de figure. Nous avons donc cherché à développer d'autres méthodes plus adaptées.

2.1.2 Analyse des images par analyse des contours

Principe

Détection des contours

La détection des contours des vésicules est réalisée en utilisant la fonction "edge" de la toolbox Matlab. Cette fonction permet d'identifier le contour d'objets à partir des gradients de luminosité de leur contour. Plusieurs algorithmes de détection sont disponibles. La méthode retenue est la méthode de Canny. Cet algorithme sélectionne les maxima locaux de gradients sur l'image filtrée par un filtre Gaussien. Il permet d'ajuster deux seuils de détection : un pour les faibles variations (contours faibles) et un autre pour les fortes variations (contours forts). Les contours sélectionnés sont les contours faibles contenant des zones à contour fort. Cette méthode permet d'obtenir des contours continus en limitant les contours parasites. Elle est moins sensible au bruit et donne une meilleure continuité des contours qu'un simple seuillage sur le gradient.

Trois paramètres peuvent être ajustés :

- σ : Écart-type du filtre Gaussien. L'augmenter supprime les petits objets et rend l'analyse moins précise (analyse plus floue)
- Les seuils de détection. Diminuer les seuils augmente le nombre d'objets. Augmenter le seuil haut supprime les objets peu contrastés et diminuer le seuil bas fait apparaître plusieurs contours par objet.

Ces paramètres ont été ajustés pour détecter correctement les vésicules dans nos conditions en microscopie en contraste de phase. Ils doivent être modifiés en fonction de la résolution des images ou si le type de microscopie est changé.

Pour rendre les contours plus connexes, la fonction "imclose" est utilisée. Cette fonction dilate les contours puis les re-contracte sans détruire la connexité des objets. Ceci a pour effet de coller les objets les plus proches, assurant une bonne continuité des contours. En revanche, cette fonction a l'inconvénient de coller les vésicules trop proches et ne permet donc de corriger des défauts de contour que sur quelques pixels.

Après extraction des contours (figure 2.1), les contours de moins de 10 points sont éliminés. Il ne reste plus qu'à vérifier si ces contours sont bien des cercles et de calculer leur diamètre.

Prétraitement

L'image obtenue par la caméra possède généralement un faible contraste, une luminosité variable d'une image à l'autre et un bruit non négligeable pouvant perturber la détections des contours (augmentation des contours parasites et discontinuité dans les contours).

Pour augmenter la robustesse du programme, les images sont d'abord formatées : la luminosité et le contraste de l'image sont améliorés et égalisés en

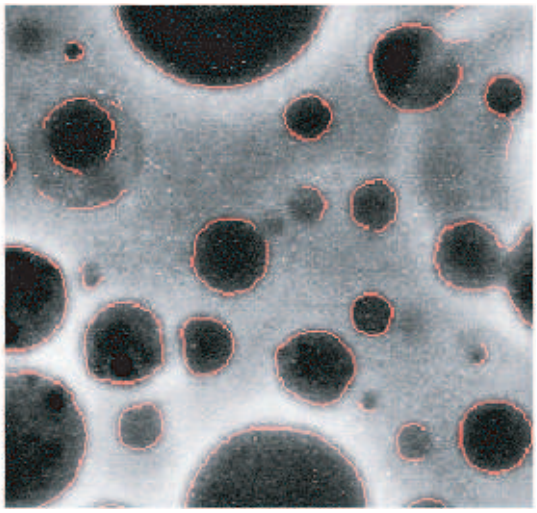


FIGURE 2.1 – Détection des contours. Les traits rouges représentent les contours détectés superposés sur l'image originale.

utilisant une fonction d'égalisation de l'histogramme et le bruit est réduit par un filtre adapté.

Deux types distincts de bruits sont présents dans les images acquises avec la caméra utilisée (pixeLink PL A741) :

- Un bruit provenant des défauts du capteur (défauts ponctuels).
- Un bruit Gaussien d'origine thermique.

L'image est filtrée en utilisant les outils de filtrage de la toolbox. Deux filtres successifs sont appliqués pour supprimer le bruit :

- Un filtre médian à 2 dimensions sur une matrice carrée de 3 pixels (fonction "medfilt2"). Ce filtre choisit pour chaque pixel la valeur médiane de la matrice de pixel environnant. Il est très efficace pour supprimer les défauts ponctuels de pixel unique, mais peu efficace pour supprimer le bruit thermique.
- Un filtre de Wiener à 2 dimensions sur une matrice carrée de 5 pixels. Ce filtre est un filtre statistique efficace pour éliminer le bruit additif gaussien. Ce filtre est bien adapté au bruit thermique, mais ne supprime pas les défauts du capteur qui sont ponctuels.

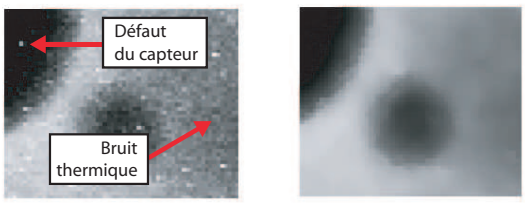


FIGURE 2.2 – Retrait du bruit dans les images. A gauche : Image bruitée. A droite : Image filtrée.

Analyse des contours

Chaque contour extrait doit représenter le contour d'un cercle. Cette situation idéale n'est généralement pas respectée et des objets parasites viennent s'ajouter aux contours corrects. Leur élimination se fait à la fin. Tout d'abord, nous cherchons à mesurer le centre et le rayon de chaque contour à partir des coordonnées de ses points. Cette mesure se fait en optimisant au moindre carré un cercle libre sur l'ensemble des coordonnées de chaque objet.

Le problème se pose de la manière suivante :
Considérons un cercle à approximer d'équation :

$$(x - x_c)^2 + (y - y_c)^2 = r^2 \tag{2.1}$$

où x_c et y_c sont respectivement l'abscisse et l'ordonnée du centre et r le rayon. Cette équation peut être développée sous la forme canonique :

$$ax + bx + c = -x^2 - y^2 \tag{2.2}$$

avec $a = -2x_c$, $b = -2y_c$ et $c = x_c^2 + y_c^2 - r^2$

Si l'on a n couples $\{x; y\}$ pour un même cercle, correspondant aux n point d'un contour détecté, on obtient un ensemble d'équations qui peut s'écrire sous forme matricielle :

$$\underbrace{\begin{bmatrix} x_1 & y_1 & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ x_n & y_n & 1 \end{bmatrix}}_{A} \underbrace{\begin{bmatrix} a \\ b \\ c \end{bmatrix}}_{X} = \underbrace{\begin{bmatrix} -x_1^2 - y_1^2 \\ \vdots \\ -x_n^2 - y_n^2 c \end{bmatrix}}_{B} + \underbrace{\begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{bmatrix}}_{E} \tag{2.3}$$

Où X correspond aux paramètres à approximer et l'erreur de l'approximation est donnée sur chaque point par :

$$E = AX - B = \begin{bmatrix} (x_1 - x_c)^2 + (y_1 - y_c)^2 - r^2 \\ \vdots \\ (x_n - x_c)^2 + (y_n - y_c)^2 - r^2 \end{bmatrix} \tag{2.4}$$

L'erreur ε_i, ainsi définie pour chaque point i, correspond à la différence entre le rayon approximé et la distance du point considéré avec le centre. Le carré de E est minimal lorsque $\text{grad}(E^2) = 0$. On peut montrer que dans ce cas :

$$X = (A^t A)^{-1} A^t B \tag{2.5}$$

Différentes interprétations de l'erreur sont alors possibles en fonction du paramètre que l'on considère erroné. Si l'on interprète l'erreur comme une erreur de rayon, on remplace r par $r_r + e$ où r_r est le rayon réel du point, c'est-à- dire la distance entre le point et le centre, et e est l'erreur sur le rayon, c'est-à-dire la distance entre r et r_r. L'équation 2.4 devient alors :

$$\varepsilon_i = (x_i - x_c)^2 + (y_i - y_c)^2 - (r_{ri} + e_i)^2 = -2re_i - e_i^2 \tag{2.6}$$

Où e_i est l'erreur ajoutée au rayon calculé pour chaque point i, c.-à-d. la distance de chaque point i du contour au cercle approximé suivant l'axe (ci).

L'erreur sur le rayon s'exprime donc :

$$e_i = r_{ri} - \sqrt{r_{ri}^2 - \varepsilon_i} \tag{2.7}$$

Le calcul de cette erreur va servir comme critère pour éliminer les contours parasites. Lorsque le contour est bien défini, les vésicules sont détectées avec une bonne précision (figure 2.3A)

Supression des contours parasites

Les images contiennent généralement un certain nombre de défauts (poussières, vésicules collées, contours parasites, *etc.*) qu'il faut écarter pour qu'ils ne soient pas pris en compte dans le dénombrement des vésicules. Deux paramètres ont été retenus pour évaluer la conformité d'un objet comme vésicule :

– Avoir un écart-type de l'erreur sur le rayon inférieur à 25 % de son rayon.

L'erreur d'approximation de chaque point est calculée comme indiqué au paragraphe précédent, puis normalisée par le rayon. La vésicule est rejetée si l'écart type de cette collection est supérieur à 25% (figure 2.3B).

– Posséder un contour recouvrant au moins 180° d'angle autour du centre.

Pour mesurer l'angle de recouvrement du contour, on utilise trois vecteurs partant du centre du cercle et pointant sur le contour : à ses extrémités et sur son milieu. La différence entre ces angles est utilisée pour extraire l'angle de recouvrement. Les contours possédant un angle de recouvrement inférieur à 180° sont écartés (figure 2.3C).

Conclusion

En pratique, la détection fonctionne bien pour les images en contraste de phase et pour les images en épifluorescence avec suffisamment peu de bruit. Ce programme nous a permis de réaliser rapidement des histogrammes sur plusieurs milliers de vésicules donnant des informations fines concernant leur morphologie. Dans certains cas, l'analyse des contours par cette méthode ne donne pas de bons résultats. Les conditions qui ne permettent pas ou alors difficilement le traitement des images par cette méthode d'analyse du contour sont les suivantes :

- Si plusieurs vésicules sont collées, le groupe de vésicule n'est pas détecté ou n'est détecté qu'une seule fois de manière erronée. C'est la principale limitation.
- Si le contraste des vésicules varie beaucoup d'une vésicule à l'autre, il est difficile de détecter les vésicules faiblement contrastées sans produire de détection de contours parasites difficiles à écarter.
- Si le bruit de l'image est trop important, les vésicules ne sont pas détectées sur l'image originale et il est difficile de trouver un filtre qui conserve le contraste de la vésicule en supprimant suffisamment le bruit.

Par exemple, les images prises au microscope confocal de protéines fluorescentes encapsulées dans les vésicules (cf. chapitre 4.2) vérifient ces trois conditions. Elles ont donc nécessité une autre méthode d'analyse qui est abordée au chapitre suivant.

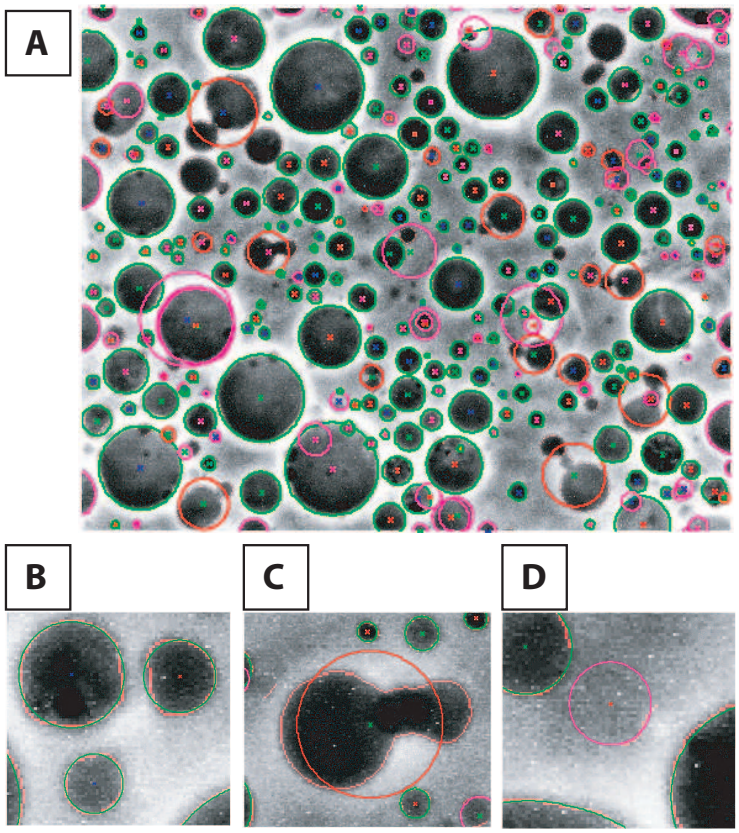


Figure 2.3 – Optimisation de cercles sur les contours de l'image. A) Résultat de la détection sur une image typique. B) Les cercles verts représentent les détections validées. B) les cercles rouges représentent les objets invalidés car leur forme n'est pas suffisamment circulaire. C) Les cercles violets représentent les objets invalidés car l'arc formé par le contour ne parcourt pas un angle suffisant sur le cercle.

2.1.3 Analyse des images par transformée

Principe

L'idée maîtresse de l'analyse d'image par transformée est de trouver une transformée de l'image dans un autre espace qui présente un maximum local identifiable en présence de l'objet à identifier. Ce type d'approche est courante et se décline dans plusieurs méthodes de reconnaissance de forme [134].

Plus particulièrement, la transformée de Hough permet de détecter des objets paramétrés dans une image à partir de leurs contours. Elle a l'avantage d'avoir une bonne tolérance au bruit et permet d'identifier des objets partiellement recouverts. Son principe est le suivant (voir la figure 2.4) :

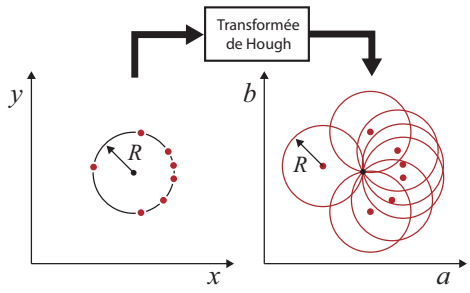


FIGURE 2.4 – Transformée de Hough pour R fixé : L'image d'un point est un cercle de rayon R. Les images des points d'un cercle de rayon R se coupent toutes au centre (A,B) du cercle.

On cherche à trouver un objet paramétré dont on connaît la fonction analytique. Par exemple un cercle d'équation :

$$(x-a)^2 + (y-b)^2 - r^2 = 0 \tag{2.8}$$

Pour chaque point de coordonnées (x, y) du contour de cet objet, on accumule son image dans l'espace de ses paramètres (a, b, r). Dans notre cas, cette image est un cercle de centre (x, y) et de rayon r (Donc un cône dans l'espace à trois dimensions). A la fin du calcul de la transformée, l'espace (a, b, r) est rempli d'unités en cercle qui parfois s'accumulent lorsque ces cercles s'entrecoupent, donnant localement des valeurs plus élevées. Les points du contour d'un cercle de coordonnées (A, B) et de rayon R vont former dans le nouvel espace une série de cercles qui s'entrecoupent tous au point de coordonnée (A, B, R), car ils vérifient l'équation 2.8 pour tous ces cercles. C'est ainsi que la transformée du contour dans l'espace de ses paramètres présente un maximum pour la valeur de ses paramètres.

Cette transformée présente des maxima très bien définis si les cercles sont parfaits mais se dégrade rapidement si le contour ne suit pas une forme idéale. Pour notre problème, cet algorithme sous sa forme originale n'est pas suffisamment robuste mais peut être amélioré.

Dans l'algorithme que nous proposons ici, on cherche à construire une carte dans l'espace des paramètres de la proposition P : "Il existe une vésicule sur l'image ayant ces paramètres". L'évaluation de cette proposition est alors faite sur un ensemble de critères géométriques mesurables et liés par des relations

logiques. Par exemple "A un contour en forme de cercle ET est homogène à l'intérieur". Cette carte doit alors valoir '1' aux coordonnées des vésicules présentes sur l'image et '0' ailleurs. Comme il est impossible de trouver un nombre raisonnable de critères qui définissent précisément toutes les vésicules sans en exclure aucune, ces critères sont flous pour que la carte présente des maxima bien définis inférieurs ou égaux à 1 aux emplacement des vésicules. Les critères géométriques sont évalués en suivant des fonctions d'appartenance qui utilisent des transformées comme indicateur et le calcul de la proposition se fait en utilisant la définition des opérateurs logiques flous. Le problème se réduit finalement à trouver les maxima de cette carte sur l'espace des paramètres d'un cercle.

Critères de sélection

Les critères de sélection dépendent du type d'image à analyser. Pour les images de microscopie confocale, les vésicules forment des disques de luminosité homogène sur leur surface comme on peut le voir sur la figure 2.6. Les critères retenus, qui ont été validés *a posteriori* comme donnant de bons résultats sont les suivants :

1. **Critère G :** Les vésicules ont une intensité lumineuse qui baisse fortement sur une portion suffisamment grande du cercle de rayon R. Autrement dit, l'image doit comporter un gradient radial fortement négatif à une distance r du centre et pour un ensemble suffisant d'angle θ (voir figure 2.5).

L'évaluation de ce critère utilise une transformée semblable à la transformée de Hough : elle intègre les contours dans l'espace des paramètres. Mais dans notre implémentation, les contours sont plus larges et flous pour s'affranchir de leurs irrégularités et seuls les contours ayant un gradient dont l'angle pointe vers le centre sont pris en compte pour augmenter le contraste de la transformée.

La valeur de la transformée est définie pour l'image $I(x, y)$ comme :

$$I^{(G)}(a,b,r) = \frac{1}{\pi r}\int_\theta C\begin{pmatrix} a + r\cos\theta \\ b + r\sin\theta \end{pmatrix}\left(\left|\Theta_{\triangledown I}\begin{pmatrix} a + r\cos\theta \\ b + r\sin\theta \end{pmatrix} - \theta\right| < \alpha\right) d\theta$$

où $C(x, y)$ est l'image des contours dilatés et flous de I, $\Theta_{\triangledown I}(x, y)$ est l'image des angles des gradients de I et α est la tolérance sur l'angle du gradient. $I^{(G)}(a, b, r)$ vaut 0 lorsqu'aucun contour avec le bon angle n'est présent sur le cercle de rayon r et de centre (a, b) et 1 lorsque le cercle se superpose parfaitement avec un contour. Entre ces deux valeurs, $I^{(G)}(a, b, r)$ donne la portion d'angle sur laquelle le cercle correspond à un contour.

Le critère G est défini comme :

$$G(a,b,r) = f_G(I^{(G)}(a,b,r))$$

Où f_G est la fonction d'appartenance à l'ensemble de vérité de G. Cette fonction définit à partir de quelle portion d'angle du cercle un contour doit être présent sur le cercle pour qu'une vésicule puisse être détectée. Elle vaut 0 en dessous de la portion d'angle minimale en dessous de laquelle G n'est pas vérifié et 1 au dessus de la portion d'angle nominale au dessus de laquelle G peut être considéré comme totalement vérifié. Elle progresse linéairement entre ces deux valeurs.

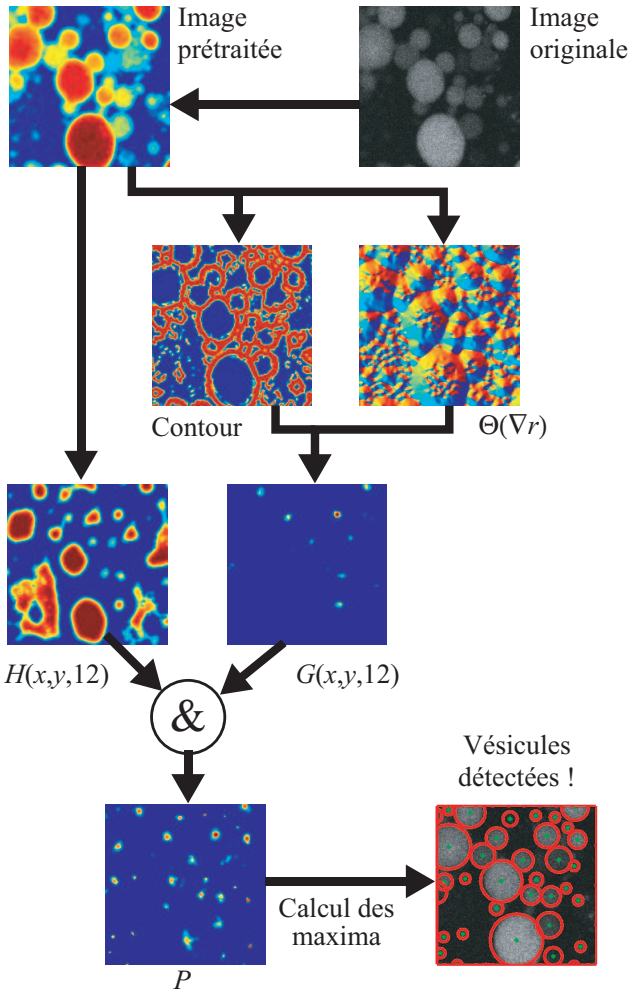


FIGURE 2.5 – Schéma de principe de l'algorithme de détection des vésicules par analyse d'image.

1. **Critère H :** Les vésicules sont homogènes à l'intérieur d'un cercle de rayon $R - \varepsilon$. Ce critère est nécessaire pour écarter la détection des paquets de vésicules dont le contour est circulaire ou partiellement circulaire.

Ce critère est défini sur la différence normalisée entre le minimum et le maximum de l'intensité dans un cercle de rayon $r - \varepsilon$:

$$H(a,b,r) = f_H\left(\frac{2(\max I_C(x,y) - \min I_C(x,y))}{\max I_C(x,y) + \min I_C(x,y)}\right)$$

avec : $C = ((a-x)^2 + (b-y)^2 < r - \varepsilon)$

Où f_H est la fonction d'appartenance à l'ensemble de vérité de H qui donne la tolérance de la variation de luminosité à l'intérieur d'un cercle pour qu'il puisse être retenu comme vésicule.

Finalement, P est défini comme :

$$P = G \otimes H \tag{2.9}$$

où l'opérateur 'et' logique $\otimes$ est défini par :

$$A \otimes B = \min(A, B) \tag{2.10}$$

Détection

La détection se fait en calculant les maxima de P sur l'espace des paramètres. Le calcul est simplifié en considérant qu'un point ne peut être le centre que d'une seule vésicule. $P(a,b,r)$ est donc projeté sur le plan (a,b) en calculant le maximum de P sur r tout en conservant en mémoire la valeur de r correspondante.

La figure 2.5 montre $P(a,b)$ pour une image typique. Les maxima de cette nouvelle image sont calculés et donnent l'ensemble des vésicules détectées.

En pratique

En pratique, l'algorithme présenté ci-dessus nécessite quelques aménagements :

Prétraitement

L'image doit subir un prétraitement pour que la détection de contour se déroule bien. L'image est d'abord convertie sur une échelle logarithmique. En effet, le bruit généré par un microscope confocal est un bruit gaussien multiplicatif. Pour pouvoir connaître l'amplitude de ce bruit indépendamment de la luminosité — ce qui est nécessaire pour définir un seuil de détection des contours — il faut le rendre additif en passant à une échelle logarithmique. Le bruit est ensuite réduit à l'aide d'un filtre passe-bas pour qu'il ne perturbe pas trop le calcul des gradients qui amplifient les hautes fréquences.

Post-traitement

Il arrive que des vésicules plus petites soient détectées à l'intérieur de vésicules plus grandes si une partie de celles-ci est plus lumineuse. Un petit programme vérifie donc qu'aucune vésicule n'est incluse dans une autre. Le cas échéant, il ne conserve que les plus grosses vésicules.

Résultats

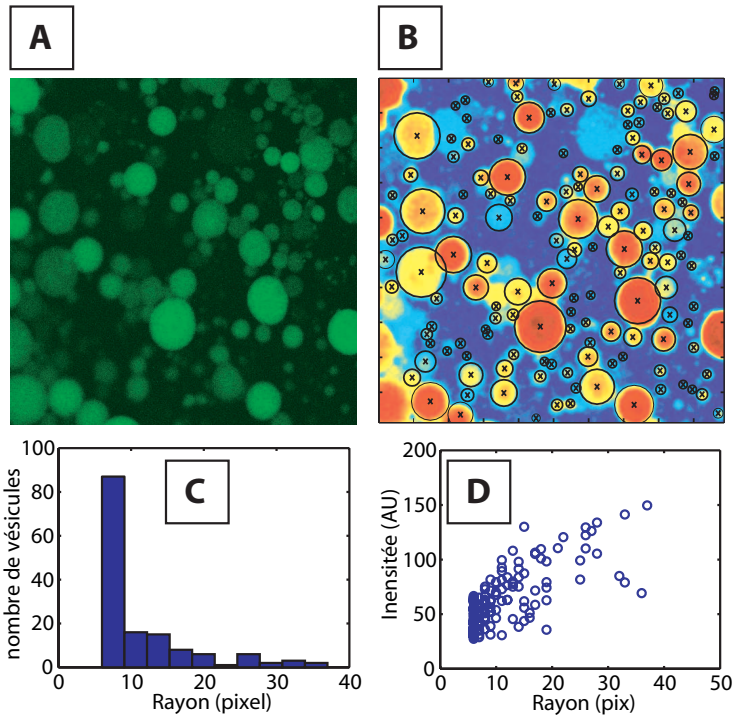


FIGURE 2.6 – La détection de vésicules par analyse d'image permet une mesure de fluorescence sur un grand nombre de vésicules simultanément. A) Image d'origine. B) Résultat de la détection sur l'image prétraitée. Les cercles noirs représentent les vésicules détectées par le programme et les croix leurs centres. C) Histogramme de la distribution des tailles des vésicules détectées. D) Intensité de fluorescence en fonction de la taille des vésicules.

Lorsque les vésicules ont des formes bien circulaires, l'analyse des images confocales à l'aide de cet algorithme a donné des résultats satisfaisants. Le niveau de détection n'égale pas celui de l'œil si les vésicules sont entassées les unes sur les autres, mais les vésicules collées sont bien reconnues. En revanche, le programme reste incapable de détecter une vésicule dont la forme générale est déformée. De même la détection des vésicules dont l'intensité lumineuse est de l'ordre du bruit se fait difficilement. Néanmoins, nous avons pu détecter dans nos conditions expérimentales des vésicules ayant des intensités de fluorescence étalées sur un ordre de grandeur, ce qui nous a permis de mesurer automatiquement et quantitativement la fluorescence des vésicules (voir chapitre 4.2). La figure 2.6 montre le résultat d'une analyse sur une photo difficile.

L'ensemble des techniques présentées ci-dessus va nous permettre d'établir précisément la distribution des tailles des vésicules sur de grandes populations. Nous tirerons profit de ces outils dans le chapitre suivant pour faire une analyse fine du comportement de l'électroformation.

2.2 Influence des paramètres de gonflement

La littérature donne peu d'informations sur l'influence des paramètres expérimentaux sur le résultat de l'électroformation, mis à part le rôle de la tension. La longueur des expériences, les nombreuses précautions à prendre pour obtenir des résultats reproductibles et la difficulté d'établir des distributions si la procédure n'est pas automatisée en sont sûrement les raisons principales. Nous avons tiré pari de notre outil logiciel de caractérisation des vésicules pour en apprendre un peu plus sur l'influence de la température et du temps de gonflement sur la taille des vésicules obtenues. Ensuite, la nature de la surface de l'électrode, et à travers celle-ci l'organisation du film, seront étudiées plus en détail.

2.2.1 Influence de la température

Plusieurs gonflements de film de phospholipide ont été réalisés sur des électrodes d'ITO à des températures allant de 10 à 30°C. La figure 2.7 donne le rayon moyen des vésicules obtenues après 3 heures de gonflement d'un film d'EPC.

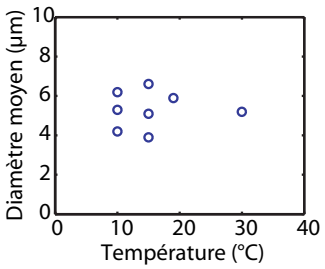


Figure 2.7 – Influence de la température sur le diamètre moyen : aucune tendance n'est observable. EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1, 2 V, 10 Hz, 3 h.

Aucune tendance n'a pu être observée sur les caractéristiques des distributions, aussi bien sur la taille des vésicules que sur le rendement de l'électroformation. On peut noter la dispersion importante de la taille des vésicules obtenues qui montre que les expériences sont peu reproductibles. Dans ces expériences, le film de phospholipide était déposé manuellement à l'aide d'une pipette. L'épaisseur était vérifiée *a posteriori* par comparaison de la couleur du film avec un film de référence dont la mesure par ellipsométrie a donné une épaisseur de 96 ±9 nm. L'inhomogénéité du film est certainement à l'origine de la dispersion importante des données.

2.2.2 Influence du temps de gonflement

Dans une autre série d'expériences, nous avons étudié l'influence du temps de gonflement sur la distribution des vésicules. Cette fois, les films de DOPC ont été déposés sur des substrats de silicium neuf par la méthode du retrait de ménisque en régime de Landau-Levich (cf. chapitre 3.3) qui permet d'obtenir des films d'épaisseur homogène avec une dispersion spatiale de l'ordre de 3%. Pour obtenir un film d'une épaisseur de 100 nm (50 bicouches de phospholipide), nous avons utilisé les conditions suivantes : 12 mg/mL de DOPC dans l'octane à une

vitesse de 30 mm/s, la hauteur du ménisque était de 500 µm et la température de 25°C.

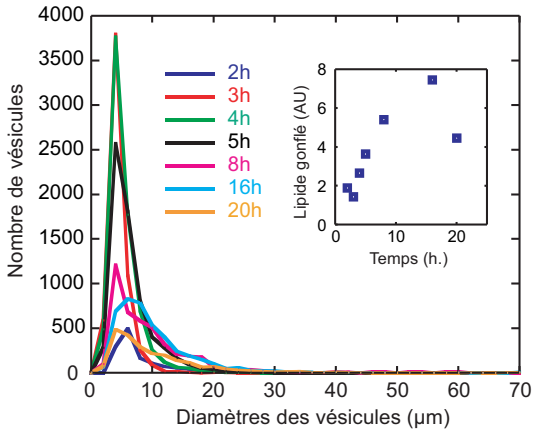


FIGURE 2.8 – Influence du temps de gonflement sur la distribution en taille des vésicules. Chaque courbe correspond à la distribution en taille des vésicules obtenues après extraction pour un temps de gonflement donné; toutes autres conditions étant fixées par ailleurs. En insert, la quantité relative de lipide consommée dans les vésicules est donnée en fonction du temps. La quantité totale de lipide est calculée pour chaque expérience à partir de la surface des vésicules observées. DOPC 20 mg/mL, in C_8H_{18} (100 nm), 2 V, 10 Hz

La figure 2.8 montre les distributions obtenues. Les distributions présentent un maximum pour 5 µm. Le nombre de ces petites vésicules augmente rapidement durant un maximum de 3 heures de gonflement. Ensuite, on observe clairement avec l'augmentation du temps de gonflement, une diminution du nombre de ces petites vésicules et une augmentation du nombre de vésicule de diamètre plus important. Cependant, le rendement continue à augmenter alors que le nombre de vésicules baisse au-delà de 4 heures de gonflement. Ces données peuvent donner des indices sur certains processus mis en œuvre lors du gonflement.

L'électroformation est généralement décrite comme un processus ayant une constante de temps de l'ordre de deux heures [111]. Le nombre maximal de vésicules est atteint dans nos conditions aux environs de 4 heures mais les vésicules continuent à grossir sur une période bien plus longue. Cette augmentation du diamètre pourrait trouver son origine dans plusieurs phénomènes : i) Il est probable qu'il puisse y avoir fusion de vésicules étant donné leurs proximités lors du gonflement. Ce phénomène spontané a déjà été observé sur des GUV par Heuvingh *et al.* [135]. ii) Mayer *et al.* ont montré qu'une majorité des vésicules est toujours attachée au film originel par un tubule. Il est donc envisageable que les vésicules continuent à gonfler après un temps important, en s'alimentant en phospholipide dans film par le biais du tubule. iii) Le transfert de phospholipides de vésicules plus petites à des plus grosses vésicules est aussi envisageable, sachant qu'il y a un échange des phospholipides entre les différentes vésicules lors de l'électroformation [136]. Le processus le plus probable est celui du gonflement progressif des vésicules à partir du film, ce qui expliquerait bien l'augmentation

conjointe de la taille et du rendement. Néanmoins, la diminution du nombre de vésicules pour les temps longs doit impliquer un transfert des phospholipides vers les vésicules de plus grande taille ce qui joue en faveur de l'existence d'au moins un des deux autres phénomènes.

Quoi qu'il en soit, il est impossible de contrôler précisément la taille des vésicules en jouant sur ces paramètres de gonflement. Comme les données de nombreuses publications le confirment, les vésicules apparaissent aléatoirement sur le film et le contrôle de ce phénomène doit passer *a fortiori* par le contrôle de l'organisation du film à partir duquel les vésicules naissent. Interrogeons-nous sur le rôle que la nature de la surface peut jouer sur cette organisation.

2.2.3 Influence de la nature de la surface

La nature de la surface sur laquelle est réalisée l'électroformation est *a priori* un paramètre majeur pouvant influer sur le phénomène d'électroformation. Comme nous le verrons par la suite, de cette nature va dépendre l'organisation du film de phospholipide à l'échelle microscopique et très certainement la force des interactions dues aux champs électriques.

Traditionnellement, la fabrication de GUV par électroformation est réalisée sur des électrodes d'ITO car elles permettent l'observation simultanée des vésicules lors du gonflement. Néanmoins, elle peut être réalisée sans problème sur d'autres types d'électrodes. On trouve dans la littérature des protocoles utilisant des électrodes de platine [109] ou de titane pour éviter la peroxydation des lipides insaturés lors du gonflement [118]. Okumura *et al.* ont également montré que le phénomène d'électroformation pouvait apparaître sur des substrats non conducteurs comme le verre ou le poly(éthylène téréphtalate) (PET). Le caractère conducteur du substrat ne semble donc pas indispensable ce qui impliquerait qu'il n'est pas nécessaire que le champ électrique soit concentré à l'interface.

L'effet de la nature de la surface a été étudié sur le gonflement naturel par Lasič *et al.* [122]. L'étude montre qu'il est possible de contrôler la taille des vésicules en variant la topologie du substrat. On obtient de cette manière des SUV sur des substrats en zéolites [123] ou des LUV sur du silicium gravé [124] en ayant une bonne homogénéité des vésicules formées. Ces études montrent que la taille caractéristique de la rugosité de la surface détermine la taille caractéristique des vésicules. Pour les vésicules géantes, le gonflement naturel donne une importante proportion de vésicules présentant des défauts [103]. A notre connaissance, aucune étude n'a été menée auparavant pour tenter de mesurer l'influence de la topologie de surface sur le résultat de l'électroformation. C'est l'objet des paragraphes qui vont suivre.

Le silicium comme substrat de gonflement

Grâce au développement considérable de l'industrie microélectronique, le silicium (Si) est devenu un matériau aux propriétés très bien contrôlées [1]. On le trouve commercialement sous forme de galettes monocristallines, à un prix très faible en comparaison des autres types de monocristaux. Le silicium est un semi-conducteur qui, en fonction de son dopage, peut être plus ou moins conducteur d'électricité. Il s'oxyde en surface au contact de l'air pour former

une couche de silice d'environ 2 nm d'épaisseur. Son état de surface est bien reproductible et la rugosité est de l'ordre de quelques angströms. Pour ces raisons, les biophysiciens utilisent couramment des galettes de silicium pour l'étude des membranes de phospholipides supportées [137, 138]. Nous avons étudié pour la première fois l'électroformation des vésicules en utilisant une galette de silicium comme électrode. L'utilisation de ce substrat versatile permettra ensuite d'étudier l'influence de l'état de surface sur l'électroformation.

Méthode

Toutes les galettes de silicium utilisées (Siltronix) dans ce chapitre ont une orientation cristalline [100] et une épaisseur de 500 µm ce qui permet de les cliver facilement pour obtenir des échantillons carrés de quelques centimètres carrés. Elles sont dopées P (Bore) avec une résistivité intermédiaire de 1-10 Ω.cm qui est suffisamment faible pour ne pas influer sur les courants impliqués lors de l'électroformation. La procédure de préparation du gonflement est la même que celle décrite au chapitre 1.3.4 à la différence qu'une des deux électrodes en ITO est remplacée par une électrode de Silicium et que le film de phospholipide n'est déposé que sur cette électrode. Avant utilisation, l'électrode de silicium est nettoyée par rinçages successifs dans un bain d'isopropanol et d'acétone puis traitée aux ultrasons pendant 10 min dans un bain d'isopropanol pour éliminer les particules qui auraient pu s'adsorber sur la surface lors du clivage. Le contact électrique est réalisé en soudant un fil électrique à l'aide d'un vernis contenant des particules d'argent sur un bord de l'échantillon. Pour comparaison, les électrodes d'ITO subissent le même traitement.

Comparaison avec l'ITO

La figure 2.9 montre la comparaison entre les vésicules obtenues à partir d'un film déposé sur une électrode de silicium et celles obtenues à partir d'un film déposé sur une électrode en ITO. Les images de microscopie confocales montrent que les membranes sont similaires en épaisseur et en luminosité, quel que soit le substrat de support du film (figure 2.9A, 2.9B) et la proportion de vésicules défectueuses est comparable. Comme il a été établi qu'environ 95% des vésicules gonflées sur l'ITO étaient unilamellaires [112, 103], on peut conclure que la plupart des vésicules produites sur le silicium le sont aussi. Il est également intéressant de comparer les substrats en ITO et en silicium en regardant la distribution de taille des vésicules produites. La figure 2.9C montre que sous les mêmes conditions de gonflement, la distribution des tailles présente une taille moyenne et une taille maximum plus grande dans le cas du substrat de silicium. Une interprétation possible de cette différence pourrait être une densité de défauts moindre sur la surface de silicium ce qui s'inscrirait dans la continuité des travaux de Lasič *et al.* [124].

Fonctionnalisation du silicium

Comme la surface du silicium peut être facilement modifiée par chimie de surface, nous avons étudié le rôle des propriétés de la surface sur l'électroformation des vésicules. Quatre types de traitement de surface ont été appliqués aux substrats de silicium : l'hydrophilisation (Si OH), aucun traitement (Si natif), le greffage de groupes phényle (Si PTS) et l'hydrophobisation (Si HF). Les surfaces de silicium rendues hydrophiles ont été préparées en traitant les galettes

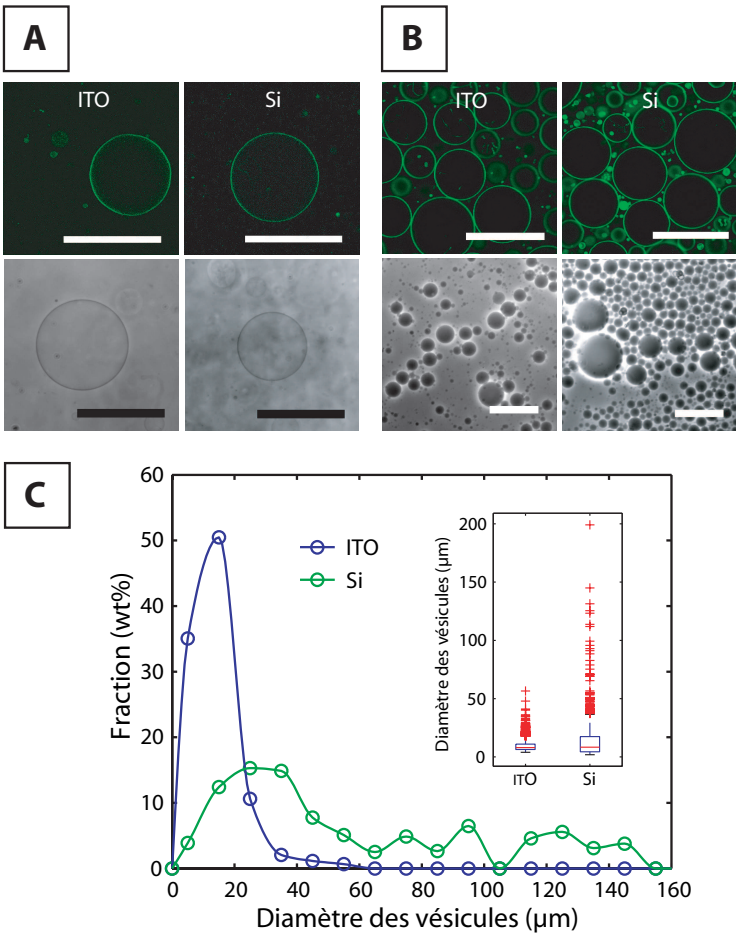


Figure 2.9 – Comparaison entre les substrats d'ITO et de Si. A) Images typiques en fluorescence confocale (en haut) et en contraste de phase (en bas) de vésicules en solution obtenues après électroformation sur un substrat d'ITO (gauche) et de Si (droite). B) Comme sur A) après décantation des vésicules dans une solution de glucose. C) Distribution de la taille des vésicules en fraction (wt%) de la quantité totale de phospholipide. L'insert montre les caractéristiques de la distribution des vésicules sous forme de boite à moustache (la ligne rouge horizontale, la boite et les moustaches représentent respectivement les médianes, les premiers et les troisièmes quartiles et les queues des distributions). Les barres d'échelle font 100 µm. EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1, 2 V, 10 Hz, 4 h.

de silicium avec un plasma d'air qui est connu pour enrichir la surface de silicium en groupes silanols [139]. Les surfaces de silicium natif correspondent aux galettes de silicium utilisées telles quelles. les surfaces modifiées par des groupements phényle ont été préparées en greffant une couche auto-assemblée de phényltriméthoxysilane (PTS) sur le substrat de silicium. Enfin, les surfaces de silicium rendues hydrophobes ont été préparées en enlevant la couche d'oxyde natif avec de l'acide fluoridrique.

Méthode

Le silicium a été rendu hydrophile par un traitement par plasma d'air pendant 2 min à 500 mTorr (Harrick plasma cleaner). Les surfaces modifiées par des groupes phényles ont été obtenues en utilisant le protocole de silanisation décrit en annexe B.3. Le silicium hydrophobe est trempé dans une solution d'acide fluoridrique (HF) tamponnée (BOE7 :1, Technic France) pendant 30 s puis rincé dans de l'eau ultra-pure pour éliminer la couche d'oxyde hydrophile présente à sa surface [140].

Propriétés

La figure 2.10 montre les angles de contact d'avancée et de reculée de gouttes d'eau sur ces substrats. Le Si HF s'est avéré le plus hydrophobe avec une hystérésis de mouillage important, ce qui est caractéristique de propriétés de mouillage inhomogènes ou de la présence de défauts sur la surface. Le Si PTS s'est montré moins hydrophobe que le Si HF, mais plus que le Si natif à cause de la présence des groupes phényle sur la surface. Le Si OH a été la surface la plus hydrophile avec un angle de contact inférieur à 20°. Il est intéressant de noter que la surface Si PTS a eu l'hystérésis la plus faible, ce qui indique une bonne homogénéité de surface après le greffage de la monocouche. Comme les phospholipides sont dissous dans un mélange de chloroforme/méthanol (9/1 vol/vol) pour la préparation des films, nous avons mesuré l'angle de contact pour ce solvant sur les quatre surfaces pour connaître la solvophilicité de la surface vis-à-vis de ce solvant particulier (figure 2.10B). Pour cela, nous avons utilisé une méthode basée sur l'interférométrie permettant de mesurer de faibles angles de contact [57, 141]. La figure figure 2.10B montre que l'angle de contact du mélange chloroforme/méthanol vaut approximativement 3-5° pour les quatre surfaces.

Méthode

Les angles de contact des gouttes d'eau (figure 2.10) ont été mesurés par la méthode de la tangente [57] à partir de photos des gouttes vues de profil. Les photos ont été prises avec une caméra CCD (PL-A741, Pixellink) montée sur un système optique spécialement dédié, puis traitées avec le logiciel imageJ. Pour chaque substrat, les mesures ont été réalisées à 10 emplacements différents. Les angles de contact des gouttes de chloroforme/méthanol ont été mesurés à partir des figures d'interférence observées le long de la ligne de contact [57, 141] en utilisant un logiciel d'analyse d'image programmé pour l'occasion (voir annexe B.1). Les images ont été prises avec un microscope droit (Nikon Optiphot) en mode réflexion en utilisant un module de diode laser Acculase 1420-00 (Global Laser Technology) comme source lumineuse et une caméra CCD (PL-A741, Pixellink) pour l'acquisition des images. 30 mesures ont été réalisées sur chaque substrat.

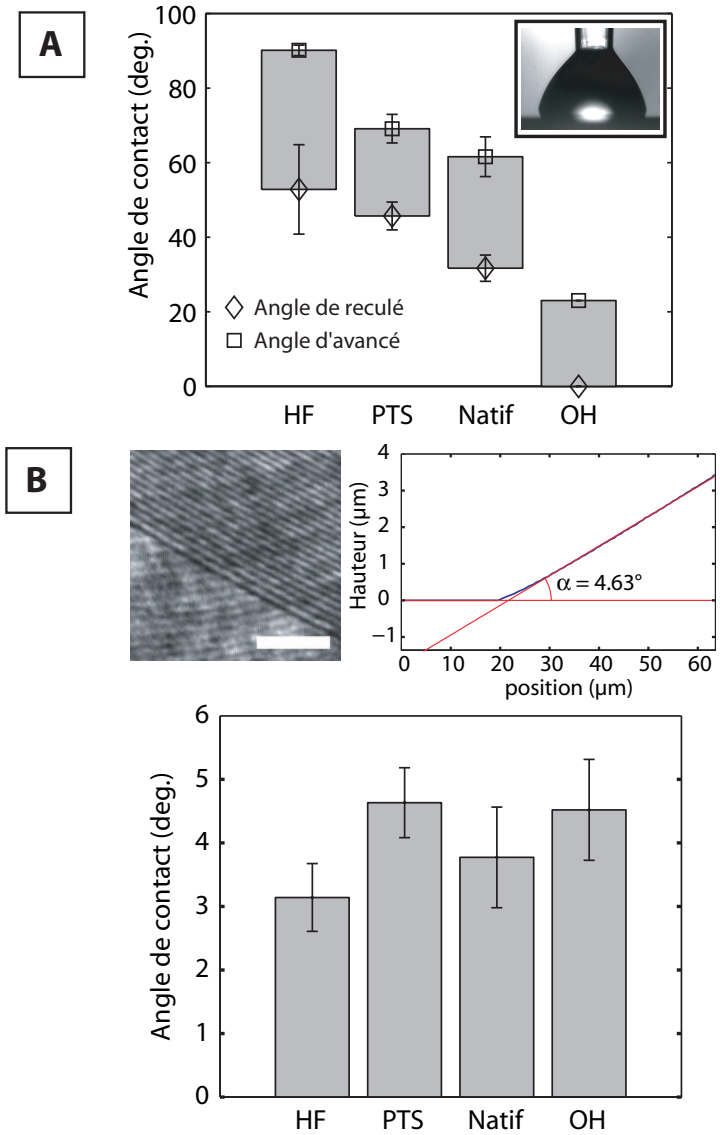


Figure 2.10 – Angles de contact d'avancée et de reculée sur les substrats de silicium après différents traitements. A) Mouillage de l'eau. Les angles de contact sont mesurés directement à partir de photos du profil de la goutte (insert). B) Mouillage du solvant (Choloroforme:Méthanol 9:1). Les angles de contacts sont calculés à partir du profil de la goutte mesuré par interférométrie.

Le film de phospholipide a été étalé dans les mêmes conditions pour les quatre surfaces et observé par microscopie en réflexion [1] (figure 2.12). Sur le silicium rendu hydrophile (Si OH), de larges portions du film ont démouillé du substrat. Il en a résulté la coexistence de portions de film fin stratifié avec des zones épaisses, apparemment amorphes (figures 2.11A). Des doigts de très faible épaisseur, probablement composés d'une unique bicouche, croissent à partir de ces zones sur le silicium (figures 2.11B). Ce phénomène, observé sur toutes les surfaces avec différentes morphologies, est attribué aux forces de van der Waals entre le substrat et le film qui induisent une pression de disjonction sur les premières couches de phospholipide responsable de leur étalement [142]. Au contraire, sur les substrats de silicium natif, le film de phospholipide était bien organisé (figure 2.12B) et réparti de manière homogène sur toute sa surface à l'exception de petits défauts (trous dans le film), nucléant probablement sur les défauts du silicium. Sur la surface Si PTS, le film était organisé avec une épaisseur homogène sur des surfaces très larges, presque sans défauts (figure 2.12C). Sur les surfaces rendues hydrophobes (Si HF), le film de phospholipide était très fin et très hétérogène à l'échelle microscopique, présentant de nombreux défauts (figure 2.12D). Ces différences dans la morphologie du film ne montrent aucune corrélation ni avec l'hydrophobicité, ni avec la solvophilicité des différentes surfaces (figure 2.10A, 2.10B). Nous en avons donc conclu que l'interaction entre les molécules de phospholipides et la surface est le paramètre principal qui contrôle l'organisation et non l'hydrophilicité ou la solvophilicité du substrat. De plus, nous avons noté que les surfaces avec une large hystérésis (Si natif et Si HF) induisent de nombreux défauts dans le film, qui gênent la formation d'une organisation lisse des molécules de phospholipide à l'échelle micrométrique. Il semble donc avantageux au vu de ces résultats de greffer une monocouche dense de molécule sur le silicium pour améliorer l'étape de dépôt du film.

Influence sur le gonflement

La figure 2.12 montre l'effet des traitements de surface sur les vésicules obtenues après électroformation. Dans tous les cas, des vésicules ont été formées mais la distribution de leur taille dépendait fortement de la nature chimique de la surface (figure 2.12E). Les vésicules étaient très petites dans le cas de la surface hydrophile (figure 2.12A), ce qui est probablement dû au nombre limité de bicouches dans la partie organisée du film. De plus, la partie amorphe du film mène à la formation d'une quantité importante de petites vésicules non sphériques et multilamellaires. Les tailles des vésicules obtenues sur le silicium natif étaient typiquement distribuées entre 5 et 200 µm (figure 2.12B) et les vésicules gonflées sur la surface Si PTS étaient significativement plus grandes en moyenne que celles gonflées sur le silicium natif (figure 2.12C). Ceci peut s'expliquer par une meilleure homogénéité du film étalé sur la surface modifiée en comparaison du silicium natif, sur lequel la présence de défauts affecte l'organisation du film de phospholipide. Au contraire, le gonflement sur le Si HF (film fin avec de nombreux défauts) a donné de petites vésicules avec un rendement plus faible (figure 2.12D).

Tous ces résultats montrent que la nature chimique de la surface est essentielle pour la conduite de la formation des vésicules. Les vésicules sont grandes sur des surfaces homogènes (peu de défauts) et quand la nature de la surface

1. voir le paragraphe 3.2.3 pour plus d'information sur l'observation de films en réflexion.

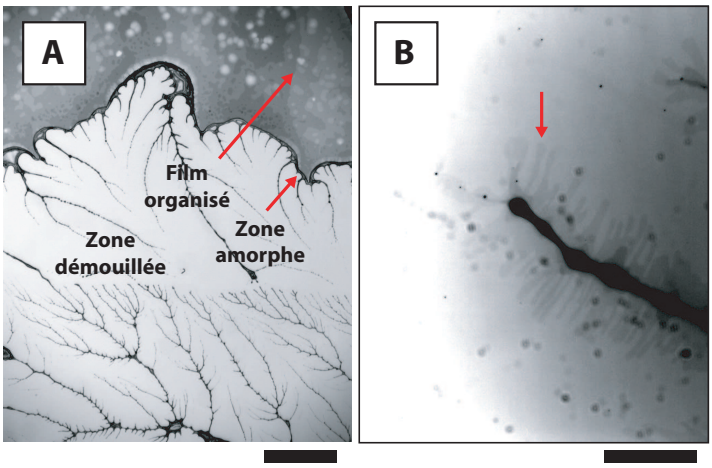


Figure 2.11 – Sur un substrat de silicium hydrophile, le film démouille partiellement (EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1). A) Le démouillage laisse des figures dendritiques sur la zone démouillée. L'intérieur de la zone déposée est bien organisé et entouré d'une bordure plus épaisse. Echelle : 500 µm B) des doigts de très faible épaisseur, probablement composés d'une unique bicouche, croissent à partir des dendrites (flèche). Ce phénomène, observé sur toutes les surfaces est attribué aux forces à longues portées du substrat [142]. Echelle : 50 µm.

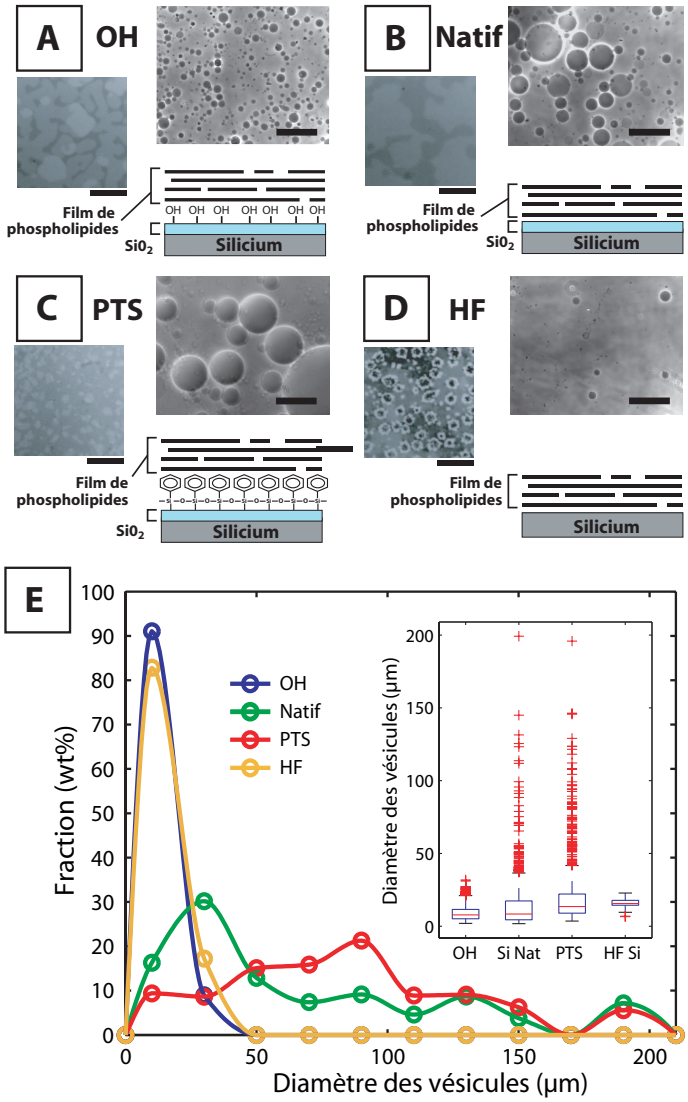


FIGURE 2.12 – Effet de la chimie de surface sur la formation des vésicules. A-D) Représentation schématique (en bas à droite) et images typiques des films après le dépôt (à gauche, image en réflexion, barre d'échelle 20 µm) et des vésicules après électroformation sur le silicium (en haut à droite, image en contraste de phase, barre d'échelle 100 µm) avec divers traitements de surfaces : traité au plasma (A), sans traitement (B), avec greffage de groupes phényle (C) et rendu hydrophobe par un traitement au HF (D). E) Distribution de la taille des vésicules en fraction (wt%) de la quantité totale de phospholipide. L'insert montre les caractéristiques de la distribution des diamètres sous forme de boite à moustaches (la ligne rouge horizontale et les moustaches représentent respectivement les médianes, les premiers et les troisièmes quartiles et les queues des distributions). EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1, 2 V, 10 Hz, 4 h.

est adaptée à une bonne organisation du film.

Structuration du silicium

Pour clarifier la corrélation entre l'organisation du film de phospholipide et la formation des vésicules, nous avons utilisé le fait que le silicium pouvait aisément être microstructuré pour étudier l'effet de la structure de la surface sur l'organisation du film et la formation des vésicules. Dans ce but et en utilisant la gravure sèche ionique réactive, nous avons préparé des substrats de silicium composés d'un réseau de micro-piliers de 170 nm de hauteur [2] (c.-à-d., plus haut que l'épaisseur du film de phospholipide déposé) et de période variées (respectivement 7, 15 et 60 µm)(figure 2.13).

Méthode

Les microstructures de silicium ont été obtenues par photolithographie en utilisant la résine AZ5214 (voir annexe B.1) suivie par une étape de gravure sèche du silicium (gravure ionique réactive (RIE) 40 sccm de SF_6, 30 mT, 10 W, 60 s sur une machine Nextral NE100). La résine restante est ensuite dissoute dans l'acétone et les substrats sont nettoyés dans un bain d'acétone puis d'isopropanol sous ultrasons pendant 10 min.

La figure 2.13B montre des images typiques de microscopie en réflexion de films de phospholipide étalés sur les différentes surfaces. Comme c'était le cas sur les surfaces de silicium natif, le film de phospholipide est organisé de manière stratifiée. Pourtant, la présence de micro-piliers affecte clairement l'organisation du film. Alors que de très larges zones d'épaisseur uniforme étaient observées sur le silicium natif, le film de phospholipide est fragmenté à cause de la présence des micro-piliers. La taille typique des fragments diminue de manière marquée avec la diminution de la période du réseau. La microstructuration de la surface peut ainsi être utilisée pour contrôler l'organisation microscopique d'un film de phospholipide arrangé en bicouches stratifiées.

Influence sur le gonflement

Les figures 2.13C et 2.13D montrent les images en contraste de phase caractéristiques et les distributions de tailles des vésicules obtenues par électroformation de ces films. Il y a une corrélation claire entre la taille caractéristique des microstructures, l'organisation du film (figures 2.13B) et la médiane de la distribution des tailles (figures 2.13D). La taille des vésicules décroît en moyenne avec la diminution de la période des structures, ce qui est interprété comme la conséquence de la fragmentation du film de phospholipide organisé. Cette interprétation est corroborée par l'étude de Lasič sur le gonflement spontané de SUV et de LUV sur des surfaces de topologie variées [122, 123, 124]. En revanche, la moyenne de la taille des vésicules n'est pas corrélée (figures 2.13D en haut à droite) à la période du réseau, ce qui est dû à la présence d'une petite quantité de grandes vésicules pour les trois surfaces. Leur formation implique le gonflement de plusieurs couches de phospholipide pour former une unique vésicule ou la fusion de plusieurs vésicules de plus petite taille. Il est donc impossible de contrôler précisément la distribution en utilisant seulement une électrode microstructurée. Ces résultats montrent qu'il est possible de fragmenter le film de phospholipide de manière contrôlée en utilisant des microstructures. La fragmentation du film est directement corrélée à la taille des vésicules électroformées mais comme tout le film participe au gonflement des vésicules ; que ce soit sur

2. Mesuré au profilomètre.

les piliers ou entre les piliers, la taille caractéristique des fragments de film est mal définie et les vésicules peuvent fusionner. Ainsi, la présence de vésicules de plus grande taille ne peut être évitée.

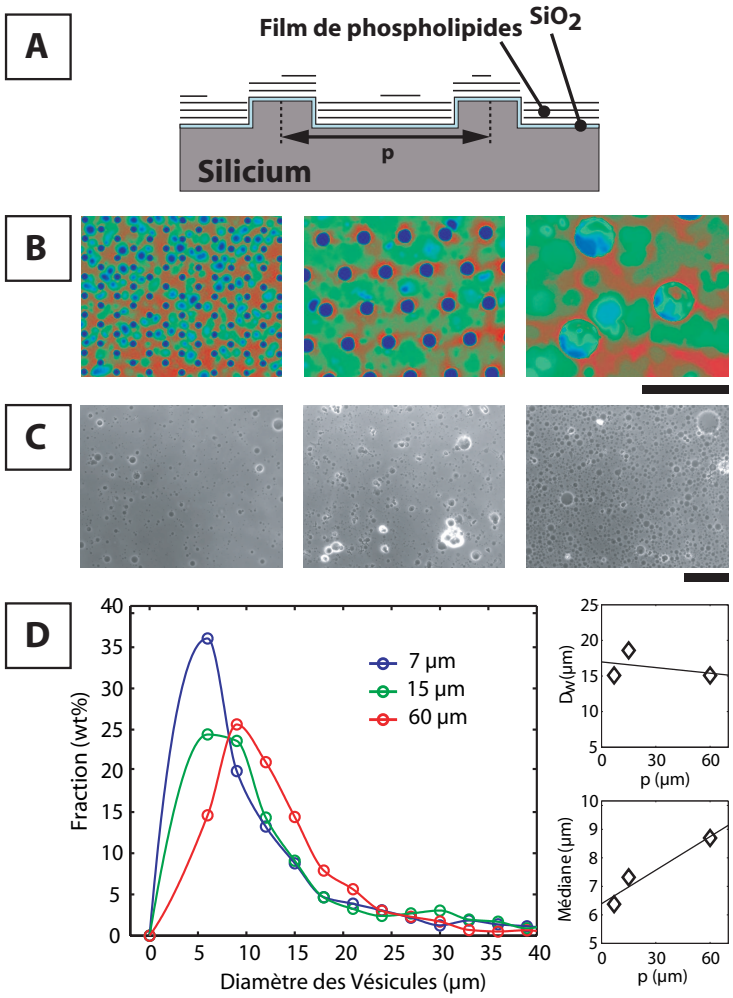


FIGURE 2.13 – Effet de la structuration de surface sur l'électroformation. A) Schéma de principe : des piliers de 170 nm de profondeur suivant un réseau hexagonal de période p sont gravés dans l'électrode silicium. Le film de phospholipide est déposé sur les substrats ainsi préparés. B) Photos en réflexion des films obtenu (fausses couleurs : cf. chapitre 3.2.3) C) Photos en contraste de phase des vésicules obtenues. D) A gauche : histogrammes comparés de la distribution des tailles des vésicules pour les différentes structures. A droite : Diamètre moyen en masse (haut) et diamètre médian (bas) des vésicules obtenues. EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1, 2 V, 10 Hz, 12 h.

2.3 Contrôle de la taille par masquage de l'électrode

Nous avons essayé une autre stratégie pour avoir un meilleur contrôle sur la distribution des diamètres des vésicules. La méthode consiste à isoler partiellement l'électrode de silicium en utilisant une couche de SiO_2 de 200 nm d'épaisseur. Des trous circulaires de différents diamètres (respectivement 7, 12 et 24 µm) sont gravés dans la couche isolante pour exposer localement le silicium au film de phospholipide. Le champ électrique est ainsi concentré dans les trous ou l'impédance de surface est approximativement 60 fois moindre. La figure 2.14 montre l'organisation du film et le résultat sur l'électroformation pour différentes tailles de trous. Comme dans les expériences précédentes, le film est organisé de manière stratifiée. En revanche, on trouve une corrélation plus forte entre la distribution des tailles des vésicules et la taille caractéristique des microstructures : aussi bien la moyenne des diamètres que le diamètre moyen de la distribution augmentent avec le diamètre des trous. Il ressort que le diamètre moyen est de l'ordre de la taille des trous. Bien que cette méthode ne permette pas d'obtenir des vésicules strictement monodisperses, c'est la première fois à notre connaissance qu'un contrôle clair de la distribution est obtenu après collection de vésicules fabriquées par électroformation.

Méthode

Pour fabriquer les masques de SiO_2, un couche de 200 nm de SiO_2 a été formée sur la galette de silicium par croissance thermique (25 min a 1000°C en atmosphère d'oxygène humide) suivi par une étape de photolithographie en utilisant la résine AZ5214 (voir annexe B.1) pour définir les motifs. La couche d'oxyde thermique a été gravée par immersion dans une solution d'acide fluorhydrique (HF) tamponnée (BOE7:1, Technic France) pendant 4 min puis rincée dans de l'eau ultra-pure. La résine restante est finalement dissoute dans l'acétone et les substrats sont nettoyés dans un bain d'acétone puis d'isopropanol sous ultrasons pendant 10 min.

2.4 Contrôle de la taille par patterning du phospholipide

A l'instar de la technique du masquage de l'électrode présentée dans la partie précédente, on peut envisager de contrôler la taille des vésicules en déposant les molécules de phospholipide sur l'électrode sous forme de motifs de taille contrôlée. Les sections suivantes présenteront plusieurs approches permettant de réaliser de tels motifs, chacune d'elles donnant des résultats différents.

2.4.1 Patterning par micro-contact printing

La méthode du microcontact printing pour imprimer des motifs de phospholipide a déjà été étudiée pour la fabrication de vésicules monodisperses [129, 130]. Ces travaux ont montré qu'il était possible par cette méthode d'obtenir des réseaux de GUV relativement monodisperses sur une électrode. La difficulté principale de cette méthode est l'étape d'encrage du tampon qui doit être bien homogène. En effet, comme les vésicules obtenues par cette méthode sont le

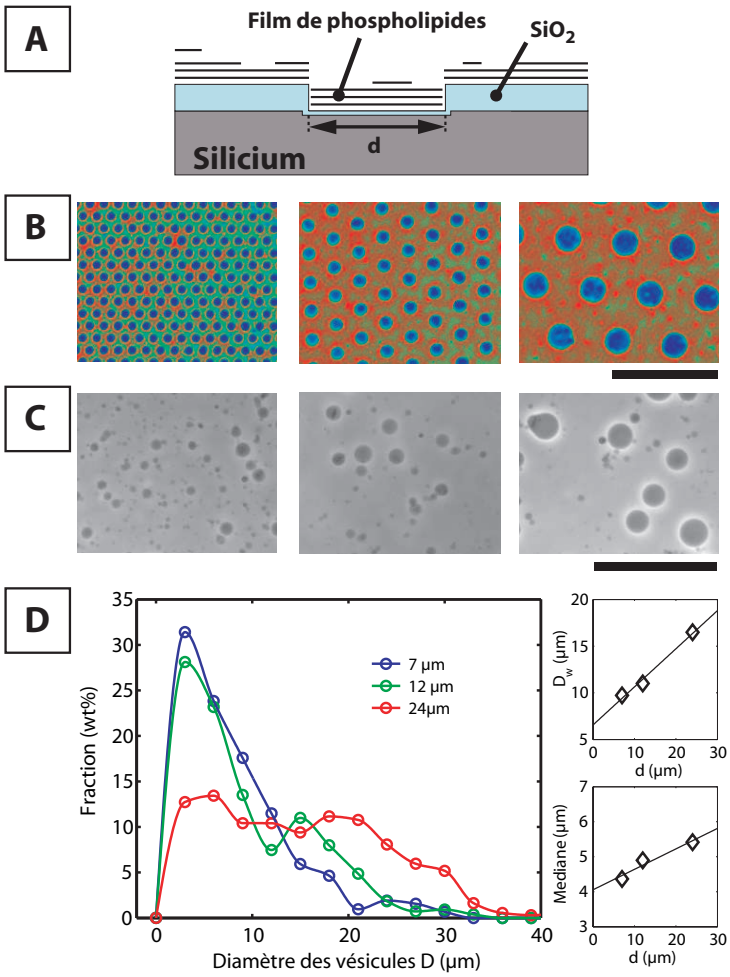


FIGURE 2.14 – Effet du masquage de l'électrode sur l'électroformation. A) Schéma de principe : Un masque en silice de 200 nm d'épaisseur isole l'électrode de la solution. Des trous de diamètre d suivant un réseau hexagonal sont gravés dans le masque, découvrant localement l'électrode de silicium. Le film de phospholipide est déposé sur ces substrats. B) Photos en réflexion des films obtenus (fausses couleurs : cf. chapitre 3.2.3) C) Photos en contraste de phase des vésicules obtenues. D) A gauche : distributions des tailles des vésicules pour les différentes structures. A droite : Diamètre médian et diamètre moyen en masse des vésicules obtenues. EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1, 2 V, 10 Hz, 12 h.

résultat de la coalescence de plusieurs petites vésicules (figure 2.20A) [130], la taille des vésicules obtenues dépend plus de la quantité de phospholipides présente sur chaque motif que de la taille du motif en lui même. L'homogénéité de l'impression du lipide est donc primordiale pour obtenir la monodispersité. Pour obtenir une bonne homogénéité, Taylor *et al.* ont fonctionnalisé leur tampon en PDMS pour le rendre hydrophile et ont déposé les phospholipides à partir d'une solution d'éthanol qui est un mauvais solvant pour les phospholipides. Nous avons pu remarquer lors de nos investigations que la raison de l'utilisation de l'éthanol comme solvant est que le PDMS n'est pas compatible avec les solvants habituellement utilisés pour dissoudre les phospholipides [143] : le PDMS se déforme en se gorgeant de solvant et devient inutilisable comme tampon. Pour simplifier cette procédure tout en évitant l'utilisation de solvants organiques, nous avons essayé une autre méthode originale pour encrer le tampon, présentée schématiquement sur la figure 2.15.

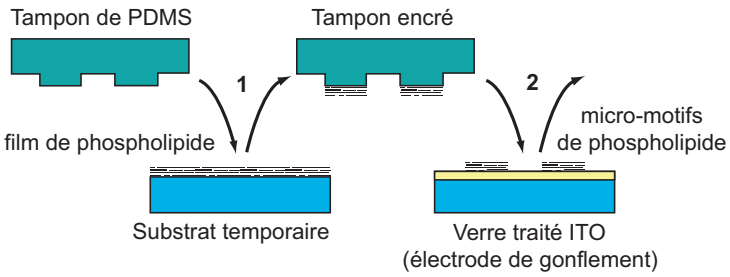


Figure 2.15 – Impression de motifs de lipide par micro-contact printing. 1) Le tampon est appliqué quelques secondes avec une faible pression sur un film de phospholipide déposé auparavant sur un substrat. 2) Le tampon est posé quelques secondes sur l'électrode en appliquant une pression de 35 g/cm^2.

Plutôt que de tremper directement le tampon dans une solution, il est apparu plus judicieux de déposer avant l'encrage un film de phospholipide homogène sur une surface temporaire (comme on le fait habituellement sur les électrodes destinées à l'électroformation), puis d'encrer le tampon en l'appliquant sur cette surface comme on le fait lors de l'utilisation d'un tampon traditionnel. Le tampon ainsi encré est ensuite appliqué sur la surface utilisée comme électrode de gonflement sous une pression contrôlée. L'observation des dépôts en microscopie à fluorescence montre des motifs bien définis de phospholipide sur la surface d'ITO (figure 2.16).

L'homogénéité des motifs imprimés dépend beaucoup de l'homogénéité du dépôt initial sur le substrat temporaire (figure 2.16A). Pour pallier ce problème et montrer que l'inhomogénéité provenait bien du dépôt initial, nous avons utilisé comme dépôt temporaire un film déposé par la méthode du spin-coating qui permet d'obtenir un film homogène [113]. Nous avons alors obtenu une impression beaucoup plus homogène des motifs (figure 2.16B) sur toute la surface imprimée. Le dépôt par spin-coating a néanmoins l'inconvénient de consommer beaucoup de phospholipides et pourrait être avantageusement remplacé par un dépôt par retrait de ménisque que l'on étudiera dans le chapitre suivant.

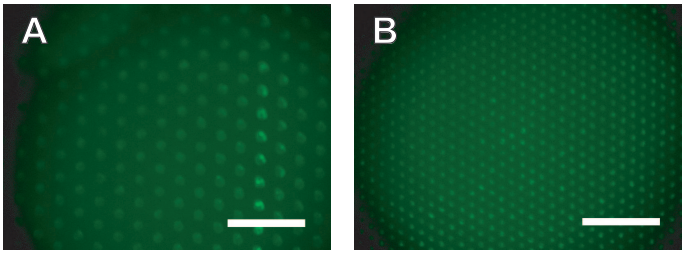


FIGURE 2.16 – Images en fluorescence des motifs de phospholipides obtenus après tranfert d'un film avec un tampon. A) Disques de 30 µm transférés à partir d'un film déposé à la main. B) Disque de 15 µm déposé à partir d'un film déposé par spin-coating.

Méthode

Les tampons sont réalisés par moulage de PDMS (RTV615 PDMS:crosslinker 10:1) sur un moule réalisé par photolithographie d'une couche de 6 µm de SU8 2005 (cf. Annexe B.1) sur une galette de silicium. Les motifs se présentaient sous forme d'un réseau hexagonal de disques de 15 et 30 µm de diamètre espacés respectivement de 30 et 60 µm. La solution de lipide L-α-phosphatidylcholine fluorescente (EPC, 10 mg/ml +2% Rhodamine-PE ou FITC-PE dans du chloroforme:méthanol 9:1 vol:vol) est tout d'abord déposée sur le substrat temporaire (une lame d'ITO dans notre cas) et séchée sous vide pendant une heure, afin d'obtenir un film fin de lipide sec et bien organisé. Ensuite, le tampon de PDMS est appliqué sur la surface temporaire (35 g/cm^2, 10 s.) puis sur la lame de verre recouverte d'une couche d'ITO (35 g/cm^2, 10 s.) pour transférer le film de lipide avec les motifs désirés (figure 2.16). Les vésicules ont été obtenues par électroformation pendant 2 heures des lipides déposés sur cette électrode en utilisant la même procédure que celle décrite au chapitre 1.3.4.

En accord avec [129, 130], nous avons observé que la taille des vésicules pendant le gonflement est directement contrôlée par la taille des motifs du tampon de PDMS. La figure 2.17 montre deux réseaux de vésicules obtenues après 30 minutes de gonflement de films de lipides micro-imprimés suivant des motifs de 30 µm (gauche) et 15 µm (droite) de diamètre respectivement. Il y a une augmentation claire de la taille des vésicules obtenues avec l'augmentation de la taille des motifs telle que la moyenne des diamètres des vésicules et la tailles des motifs sont égales (figure 2.19A). Malheureusement, après extraction des vésicules de la cellule de gonflement, cette monodispersité est perdue (figure 2.19B) et la distribution des tailles des vésicules obtenues ne diffère pas notablement entre le gonflement des motifs imprimés et le gonflement d'un film déposé par impression avec un tampon sans motif (figure 2.18B). Ce phénomène est attribué au fait que le gonflement produit de petites vésicules qui fusionnent ensuite [130] (figure 2.20A). Une grosse vésicule est ainsi formée sur chaque motif comme on l'observe sur la figure 2.17, mais de petites vésicules continuent d'apparaître à la base de celle-ci (figure 2.20B). Ces vésicules de pieds sont beaucoup plus nombreuses que les grosses vésicules et masquent la monodispersité des vésicules gonflées comme l'avaient déjà remarqué Kuribayashi *et al.* [131]. Il est intéressant de noter que ces petites vésicules se forment préférentiellement sur les bords des motifs. Cette observation indique qu'elles doivent se former à partir de défauts du film.

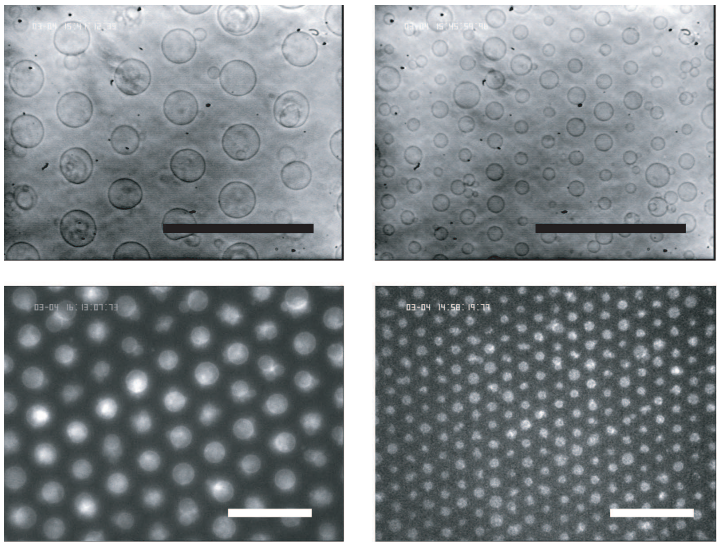


Figure 2.17 – Vésicules pendant le gonflement des motifs de phospholipides imprimés. En haut : Photos en contraste de phase. En bas : photos en fluorescence. A gauche : motifs de 30 µm de diamètre. A droite : motifs de 30 µm de diamètre. EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1, 2 V, 10 Hz, 30 min. Les barres font 100 µm.

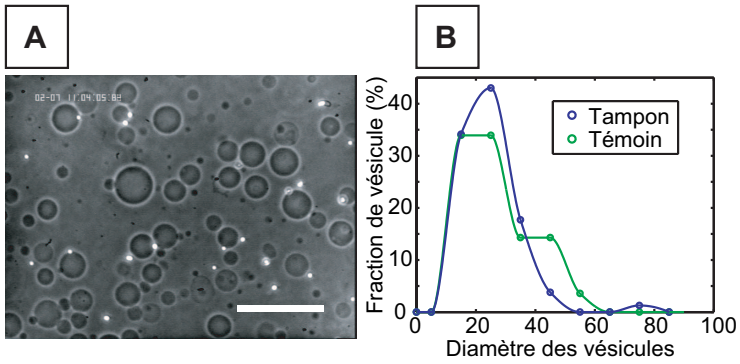


Figure 2.18 – Vésicules après extraction de la cellule et plombage en cellule d'observation. A) Photos en contraste de phase des vésicules issues d'une impression de lipide avec un tampon de motifs de 30 µm de diamètre. La barre d'échelle représente 100 µm B) Histogrammes comparés de la taille des vésicules gonflées à partir d'un film déposé par un tampon avec et sans micro-structures (témoin). EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1, 2 V, 10 Hz, 4 h.

Même si le contrôle de la taille des vésicules après extraction ne peut être obtenu par cette méthode, elle peut être très intéressante pour réaliser des réseaux de vésicules monodisperses fixées sur une surface. Ce type de réseaux pourrait être utilisé par exemple pour exprimer des protéines de manière dynamique suivant des motifs préétablis ou encore pour étudier des systèmes de communication cellulaire *in vitro*.

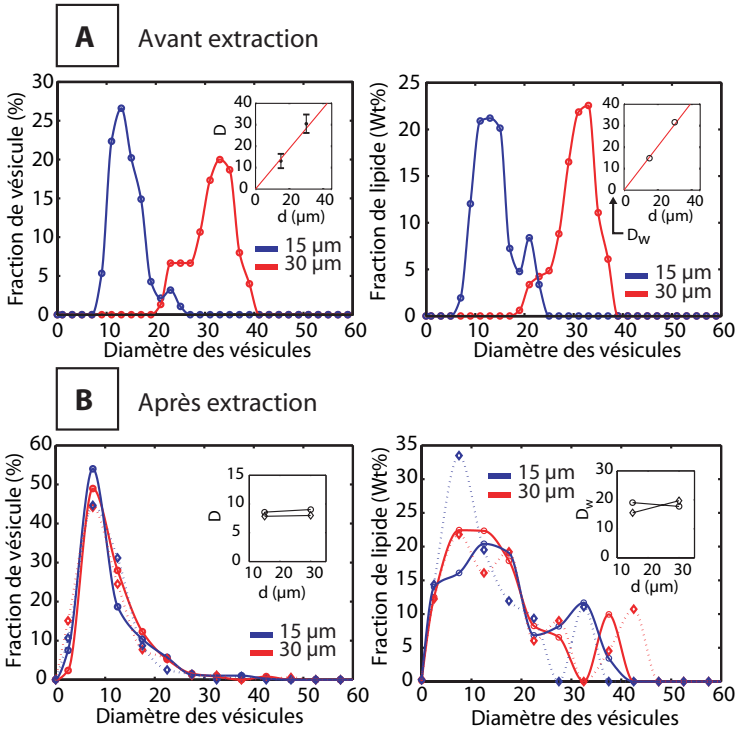


FIGURE 2.19 – Influence de la taille du motif sur la taille des vésicules avant extraction (A) et après extraction (B). Les graphes représentent la distribution des tailles (à gauche) et la répartition de la masse de phospholipide en fonction de la taille des vésicules (à droite) obtenu après le gonflement de motifs de 15 et 30 µm de diamètres. Les moyennes sont données en insert. A) Les droites rouges dans les inserts représentent les ajustements linéaires sur les moyennes. Les ajustements donnent : 0,94 µm/µm pour la moyenne des diamètres (gauche) et 1,02 µm/µm pour la moyenne pondérée par la masse (droite). B) Les motifs ∘ avec interpolation en trait plein représentent les données issues des mesures sur les images en contraste de phase et les motifs ◇ avec interpolation en trait pointillé représentent les données issues des mesures sur les images en fluorescence. EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1, 2 V, 10 Hz, 30 min.

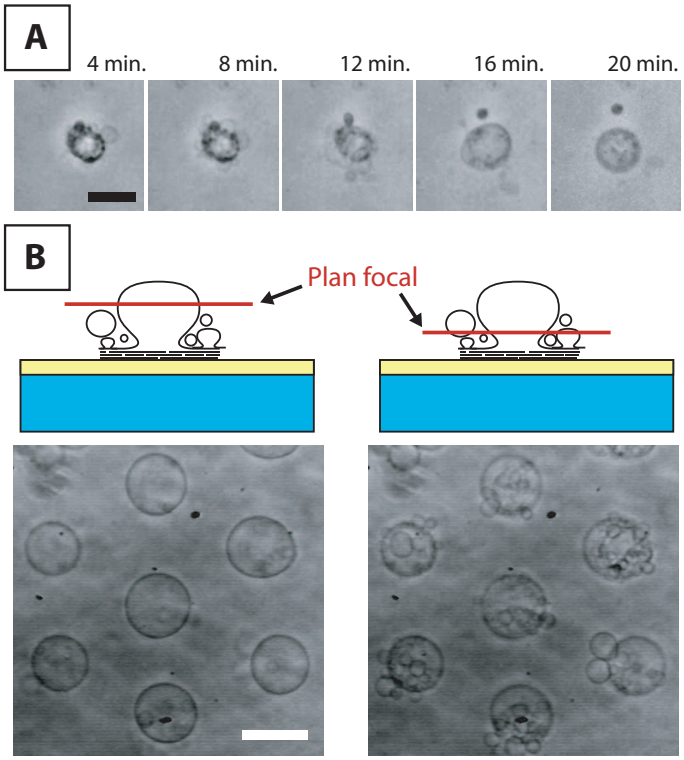


Figure 2.20 – Les vésicules lors du gonflement de motifs micro-imprimés. A) De petites vésicules apparaissent tout d'abord, puis fusionnent pour former une grosse vésicule. B) Un nombre important de vésicules de plus petite taille apparaissent au pied de la vésicule principale présente sur chaque motif. Les barres d'échelle représentent 30 µm. EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1, 2 V, 10 Hz, 20 min.

2.4.2 Patterning par moulage

Le micro-contact printing ne donnant pas de bons résultats, nous avons tenté d'utiliser d'autres méthodes pour déposer les phospholipides sous forme de motifs. Kuribayashi *et al.* avaient déjà essayé de déposer le phospholipide par la technique du « dry lift-off » pour avoir une meilleur homogénéité du dépôt [131]. Mais les résultats qu'ils ont obtenus étaient similaires à ceux du micro-contact printing. Nous avons essayé dans un premier temps de déposer le phospholipide en le moulant sur la surface comme illustré sur la figure 2.21. Pour cela, une goutte de phospholipide dans un mélange de chlorophorme:méthanol 10:1 est déposée sur l'électrode et un moule en PDMS est appliqué sur la goutte avant qu'elle sèche. Après 2 minutes, le solvant s'est évaporé à travers le PDMS et une fois le moule désolidarisé du substrat, des motifs bien définis apparaissent sur l'électrode.

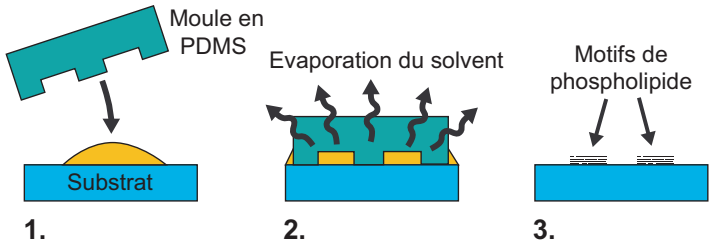


FIGURE 2.21 – Fabrication de motifs de phospholipide par moulage : 1. une goutte de solution de phospholipide dans un solvant organique est déposée sur le substrat. 2. Après application du moule en PDMS sur la goutte, le solvant organique s'évapore à travers celui-ci. 3. Une fois le moule décollé, des motifs de phospholipide restent sur le substrat.

Nous avons utilisé pour nos tests un moule en PDMS contenant des trous de 30 µm de diamètre et 6 µm de profondeur. Les motifs obtenus par cette technique étaient notablement plus épais que pour le micro-contact printing. Leur aspect semblait amorphe, ne présentant pas de structures stratifiées visibles.

La figure 2.22A montre des dépôts pour différentes concentrations C de phospholipides dans le solvant. A faible concentration ($C < 5$ mg/mL), le dépôt se présente sous forme d'anneaux. Pour des concentrations plus élevées ($C \geq 5$ mg/mL), un dépôt relativement uniforme sur chaque motif et homogène sur toute la surface est obtenu.

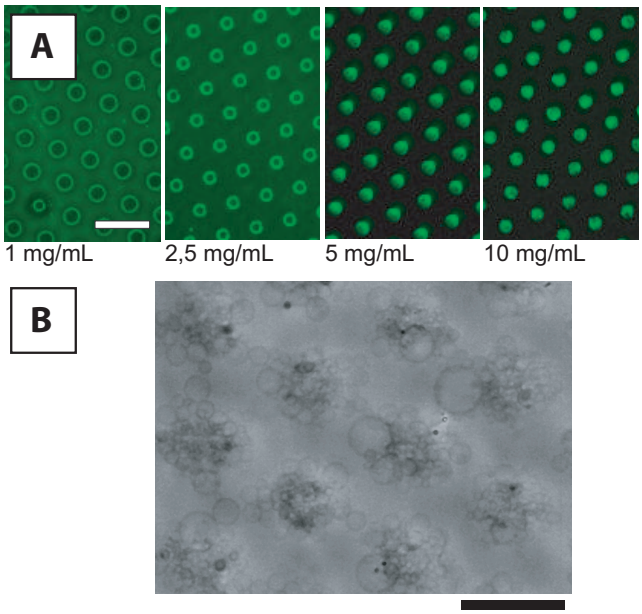


Figure 2.22 – Impression de motifs de phospholipide par la méthode de moulage. A) Image en fluorescence de motifs imprimés avec différentes concentrations de phospholipide dans la solution (l'échelle de fluorescence est différente pour chaque image). La barre représente 100 µm. B) Image en contraste de phase après 18 min. de gonflement de motifs de 30 µm. La barre représente 50 µm. EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1, 2 V, 10 Hz

Méthode

Le moule en PDMS a été réalisé par moulage d'une couche de 5 mm de PDMS (RTV615 PDMS:crosslinker 10:1) sur un moule réalisé par photolithographie d'une couche de 6 µm de SU8 2005 (cf. Annexe B.1) sur une galette de silicium. Les motifs se présentaient sous forme d'un réseau hexagonal de disques de 30 µm de diamètre espacés respectivement de 60 µm. Une goutte de 5 µL de solution de phospholipide fluorescent (EPC+2% FITC-PE dans du chloroforme:méthanol 9:1 vol:vol) était déposée sur le substrat d'ITO, puis immédiatement recouvert par le moule en appliquant une légère pression avec le doigt pendant quelques secondes. Après 2 min. de séchage, le moule est délicatement décollé du substrat en prenant soin de ne pas lui appliquer de forces latérales. Les vésicules ont été obtenues par électroformation, pendant 2 heures, des lipides déposés sur cette électrode en utilisant la même procédure que celle décrite au chapitre 1.3.4.

Lors du gonflement de ces motifs de phospholipides, nous avons pu observer que de nombreuses petites vésicules se formaient très rapidement (figure 2.22B), puis diffusaient sur la surface avant de se détacher. Contrairement à ce que l'on a pu observer pour les films déposés par micro-contact printing, une faible proportion de ces petites vésicules a fusionné pour en former de plus grandes. Comme on peut le voir sur la figure 2.22A, un dépôt de phospholipide est également présent entre les motifs. Il est fort probable que ce dépot formant un support liquide soit responsable de la diffusion rapide des vésicules hors des motifs, empêchant leur fusion subséquente.

Après extraction, la distribution de la taille des vésicules obtenues présente un net maximum à 5 µm, issu de la formation des nombreuses petites vésicules sur les motifs. Peu de vésicules plus grandes sont présentes, comme on peut le voir sur la figure 2.24. En comparaison du dépôt par micro-contact printing, le résultat obtenu est encore plus éloigné du résultat escompté.

Cette nouvelle expérience confirme *a fortiori* qu'une mauvaise organisation du film — d'apparence amorphe et ne présentant pas de structure stratifiée — mène à la formation de petites vésicules d'environ 5 µm. Ces petites vésicules peuvent fusionner en partie mais viennent irrémédiablement polluer la solution finale. Un bon contrôle de l'organisation microscopique du film est donc indispensable pour obtenir le gonflement de grandes vésicules n'impliquant pas de phénomènes de fusion et ce contrôle peut difficilement passer par une méthode mécanique de dépôt comme le moulage ou le micro-contact printing où les forces mises en jeu viennent perturber de manière incontrôlable l'organisation de l'objet fragile qu'est le film en structure lamellaire. Le paragraphe suivant présente une autre méthode ne faisant pas intervenir ces contraintes mécaniques.

2.4.3 Patterning par instabilités de mouillage

Nous anticipons dans ce paragraphe les résultats du chapitre suivant en introduisant un dépôt de phospholipide réalisé par la méthode du retrait de ménisque. Sous certaines conditions, lorsque le ménisque est instable, il est possible de déposer de cette manière des îlots de phospholipide de 5,1±0,8 µm sur une galette de silicium comme on peut le voir sur la figure 2.23. Les observations par microscopie en réflexion indiquent par comparaison avec les films qui seront étudiés au chapitre suivant que l'épaisseur de ces galettes de phospholipides fait environ 100 nm et contient très probablement le même nombre de couches de

phospholipide sur toute la surface (très faible dispersion d'épaisseur et pas de marches visibles).

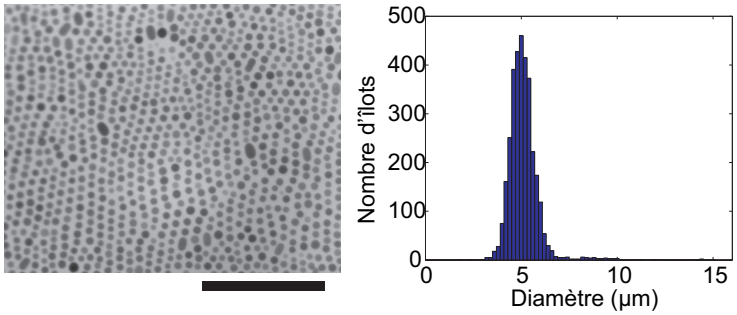


Figure 2.23 – Îlots de phospholipides fabriqués par instabilités de mouillage. A gauche : Image en réflexion du dépôt. La barre représente 100 µm. A droite : distribution des diamètres des îlots. Dépot : EPC 12 mg/m in $C_{10}H_{22}$, 48°C, 35 µm/s

Le gonflement de ces îlots a donné une distribution relativement ramassée en comparaison des autres méthodes de dépôt, avec des tailles de vésicule plus grandes que la taille des îlots et peu de petites vésicules (voir figure 2.24). Ce résultat est difficile à interpréter et il serait nécessaire de réaliser d'autres experiences pour mieux comprendre le phénomène. L'aspect ramassé de la distribution laisse pourtant espérer la possibilité d'un meilleur contrôle en optimisant l'organisation du film.

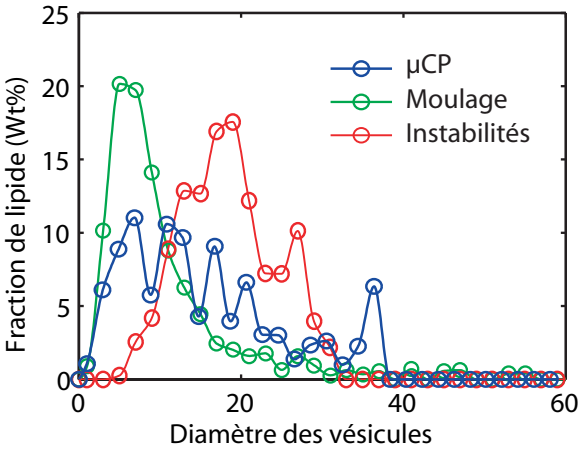


Figure 2.24 – Distributions comparées de la taille des vésicules obtenues i) par micro-contact printing (µCP) avec un tampon de 15 µm (vert) ii) par moulage avec un moule contenant des motifs de 30 µm (bleu) iii) avec des instabilités de mouillage donnant des motifs de 5 µm (rouge).

2.5 Discussion

Les résultats présentés dans ce chapitre ont mis en évidence l'influence des défauts dans le film sur la taille des vésicules obtenues par électroformation. Tout d'abord, nous avons montré en modifiant la chimie de surface de l'électrode que la formation de vésicules de grande taille (50-200 µm) était favorisée par une organisation stratifiée du film, homogène sur de grandes surfaces, avec très peu de défauts. L'augmentation naturelle (mesurée par l'hystérésis de mouillage) et artificielle (microstructures) de la densité de défaut réduit la taille des vésicules formées. A l'extrême, les films amorphes observés sur le silicium hydrophile et issus des motifs fabriqués par moulage (ne présentant aucune structure stratifiée visible en microscopie optique et donc contenant a priori une très forte densité de défauts) mènent à la formation d'un grand nombre de petites vésicules ($\sim$ 5 µm) mal formées et probablement multilamellaires, alors que les motifs sans défauts obtenus par les instabilités de mouillage n'ont formé que des vésicules de taille intermédiaire. D'autre part, les observations réalisées lors du gonflement de motifs réalisé par microcontact printing ont montré que des petites vésicules gonflaient préférentiellement en périphérie des motifs, indiquant que les vésicules naissaient à partir de défauts du film. La présence de défauts favorise donc certainement le gonflement des vésicules en favorisant le passage de la solution entre les couches. Mais pour obtenir des vésicules monodisperses, la meilleure stratégie est *a fortiori* de chercher à obtenir des motifs de phospholipide ayant une organisation stratifiée sans défauts. Ces considérations ont motivé le travail du chapitre suivant qui présente une nouvelle méthode de dépôt permettant de mieux contrôler l'organisation du film.

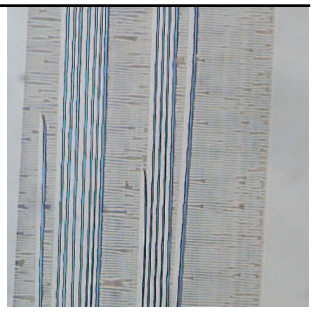
2.6 Conclusion

Pour pouvoir caractériser précisément la taille des vésicules que nous fabriquons, nous avons tout d'abord mis au point un outil informatique d'analyse d'image permettant de mesurer la distribution de taille d'une grande population de vésicules. Deux méthodes d'analyse d'image ont été présentées : une première basée sur l'analyse de contours est simple et rapide, mais ne permet pas de détecter les vésicules dans des conditions d'observation difficiles ; la seconde méthode, basée sur une technique de transformée, est plus complexe mais permet une analyse plus robuste, efficace dans des conditions difficiles.

Cet outil d'analyse a permis de mesurer l'influence de différents paramètres expérimentaux sur la distribution en taille des vésicules fabriquées par électroformation. La température lors du gonflement a eu peu d'effet sur la distribution. En revanche, l'augmentation du temps de gonflement a eu tendance à produire des vésicules plus grosses. Nous avons également pu établir une corrélation entre la taille des vésicules et la densité de défauts dans le film en utilisant des électrodes en silicium ayant subi différents traitements de surface, caractérisés par leurs propriétés de mouillage. Comme la présence de défauts diminuait en moyenne la taille des vésicules produites, nous avons cherché à produire ces défauts artificiellement. La génération artificielle de défauts dans le film par micro-structuration de ces électrodes n'a pas permis d'avoir qu'un contrôle partiel sur la distribution. En revanche, couplée à l'utilisation d'un masque isolant en silice, cette méthode a permis un bon contrôle de la taille des vésicules, même si les populations obtenues ne sont pas strictement monodisperses.

Parallèlement, nous avons tenté d'imprimer le film de phospholipide par différentes méthodes. Le microcontact printing, qui avait déjà été introduit par Taylor *et al.* nous a permis d'obtenir des résultats similaires. En utilisant une méthode originale de transfert du film à l'aide du tampon nous avons obtenu des impressions plus homogènes. Nous avons alors obtenu des réseaux de vésicules monodisperses sur l'électrode mais l'extraction s'est traduite par un élargissement notable de la distribution des tailles. D'autre part, des motifs de phospholipides réalisés par une technique de moulage, plus simple à mettre en œuvre, a donné par électroformation des vésicules de très petite taille (~ 5 µm). Nous avons attribué ce résultat inattendu au caractère amorphe du dépôt.

L'ensemble de ces observations nous a amené à conclure qu'il ne serait pas possible de bien contrôler le phénomène de l'électroformation sans une meilleure maîtrise de l'organisation du film déposé. Une nouvelle méthode de dépôt de film doit s'imposer et ce sera l'objet du chapitre suivant.



Chapitre 3

Le dépôt de films de phospholipide multilamellaires

La fabrication de couches minces est d'un intérêt fondamental pour de nombreux domaines comme la microélectronique [1], l'optique [144] et les traitements de surfaces [145]. Beaucoup de méthodes existent déjà pour fabriquer des films fins de compositions variées comme le dépôt chimique en phase vapeur (CVD), l'épitaxie à jet moléculaire (MBE), le spin-coating, le dip-coating ou encore l'électrodéposition. Pourtant, certaines molécules qui ont des propriétés d'auto-organisation comme les phospholipides restent difficiles à déposer avec un bon contrôle de l'organisation du film aux différentes échelles nano-, micro- et macroscopique simultanément.

Lors du processus d'électroformation des vésicules, les molécules de phospholipide passent de la phase lamellaire à la phase vésiculaire. Les phénomènes mis en jeu dans ce processus sont mal compris, mais l'organisation initiale de la phase lamellaire semble avoir une importance primordiale comme nous avons pu l'observer au chapitre précédent. Il est donc apparu évident que les études sur l'électroformation ne subiraient pas d'avancées majeures sans un contrôle précis de la morphologie du film initial. Nous avons donc cherché une méthode qui nous permettrait de préparer des films de phospholipide multicouches modèles se rapprochant d'une structure lamellaire idéale. Par idéal, comprenons un film de phospholipide dont nous connaissons le nombre de couches à la couche près et dont les couches sont des plans infinis, sans défauts. Si nous maîtrisons la fabrication de tels films, il sera alors possible de faire une étude quantitative de l'influence des défauts sur le phénomène de gonflement et plus généralement de mieux comprendre la mécanique des membranes biologiques en conformation repliée.

Traditionnellement, le dépôt des phospholipides se fait par l'étalement d'une goutte de phospholipide dans un solvant organique sur le substrat. Elle peut être déposée simplement sur la surface, dans ce cas, le solvant est choisi de manière à ce que le substrat soit très solvophile (généralement le méthanol sur l'ITO). La goutte s'étale alors sur la surface par mouillage et laisse un dépôt de phospholipide après avoir séché. La goutte peut également être littéralement

étalée avec une pipette sur la surface de manière à forcer le mouillage de la goutte. La première méthode a l'avantage d'être reproductible, mais est limitée au dépôt sur de petites surfaces et le dépôt résultant est généralement peu homogène [146] (à cause de l'effet « tache de café » [147]). La seconde méthode permet un étalement sur une plus grande surface et de manière plus homogène. Toutefois, le résultat, qui dépend de l'opérateur humain, est peu reproductible. Dans les deux cas, le contrôle de l'épaisseur reste aléatoire, loin d'être à la couche près.

Dans de précédents travaux, diverses méthodes ont été explorées pour améliorer le dépôt des films de phospholipide comme l'étalement de goutte [146, 148], le spin-coating [113], le dépôt par Langmuir-Blodgett [149], Langmuir-sheafer [150] ou "layer-by-layer" (LBL) [132]. Diverses organisations ont été obtenues en fonction de la méthode utilisée [113] mais aucune d'entre elles n'a permis d'obtenir simultanément un bon contrôle de l'épaisseur du film, de l'organisation nano- et microscopique et de l'homogénéité macroscopique du film.

Dans ce chapitre, nous commencerons par faire une rétrospective des différentes méthodes utilisables pour fabriquer des dépôts de phospholipide multicouches et en détaillerons les avantages et les inconvénients. Par la suite, nous discuterons les méthodes de caractérisation des films et celles que nous avons utilisées et développées seront spécifiquement détaillées. Une étude sur la méthode de dépôt par retrait de ménisque sera ensuite présentée comme moyen de réaliser des films d'épaisseur contrôlée et donnant également des perspectives sur le contrôle de l'organisation intime des films. Pour finir, nous présenterons et discuterons deux approches possibles pour réaliser des motifs de phospholipide en utilisant cette même méthode.

3.1 Les méthodes de fabrication des films

De nombreuses méthodes de dépôt existent pour obtenir des multicouches de molécules de phospholipide. Nous séparerons ces méthodes en deux catégories :

1. les méthodes couche par couche, qui sont propres au caractère auto-organisationnel des phospholipides. Elles consistent à déposer les couches de phospholipide séquentiellement les unes après les autres. ;
2. Les méthodes en une étape, plus traditionnelles qui permettent d'obtenir dans les bonnes conditions des films lamellaires bien organisés.

3.1.1 Les méthodes couche par couche

Langmuir Blodgett

Le dépôt de couches par la méthode de Langmuir-Blodgett est une méthode de fabrication de monocouches ou de multicouches de tensioactif par transfert sur un substrat d'une couche pré-organisée sur une interface liquide/air. La découverte des propriétés d'auto-organisation des tensioactifs en couches s'est accompagnée de méthodes de caractérisation de leurs propriétés thermodynamiques. La méthode la plus répandue pour caractériser le diagramme de phase de ces molécules est l'expérience inventée par Langmuir et Blodgett. Dans cette expérience, une cuve est remplie d'un liquide ne dissolvant pas le tensioactif à étudier, par exemple de l'eau pour les phospholipides. La bonne quantité de tensioactif est déposée à la surface du liquide de manière à obtenir légèrement moins d'une couche de tensioactif à la surface du liquide. Naturellement, les molécules de tensioactif amphiphile vont s'orienter de manière à apposer leur côté ayant le plus d'affinité avec le liquide du côté du liquide. Un système de glissière permet ensuite de compresser cette couche tout en mesurant la tension de surface du liquide. La pression appliquée sur la couche fait baisser d'autant la tension de la surface du liquide. Ceci permet de connaître simultanément la pression et la surface de la couche et ainsi de tracer ses isothermes de compression. Il est ensuite possible de transférer la couche sur un substrat en le faisant passer à travers l'interface à pression constante. En le passant successivement dans une direction puis dans l'autre, on peut déposer idéalement plusieurs couches de tensioactif les unes sur les autres. On trouvera une description complète de cette méthode et de ses applications dans [151].

Il a été montré qu'il était possible de déposer de cette manière un nombre illimité de couches successives avec certains tensio-actifs [151]. Pour le cas des phospholipides, de nombreux exemples de la littérature montrent des dépôts d'une bicouche de phospholipide obtenues par cette méthode pour fabriquer des membranes supportées (principalement de DDPC [150]). Le dépôt d'un plus grand nombre de couches est délicat à cause de la faible interaction entre les couches. Les couches déjà déposées ont tendance à se redéposer sur l'interface eau/air plutôt que de former une nouvelle couche. On trouve néanmoins certains travaux relatant ce type de dépôt en utilisant des ions divalents : Zn^{2+} ou Co^{2+} pour augmenter l'interaction entre des couches chargées négativement (DMPA). Caseli *et al.* ont ainsi montré qu'il était possible de déposer plus de 13 couches de DMPA sur des microbalances à quartz [149]. Toutefois ces résultats ne sont peut-être pas adaptables à tous les types de phospholipides. A notre connaissance,

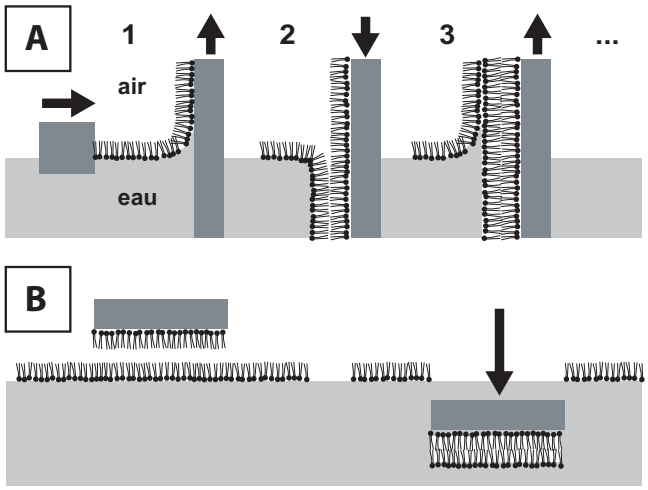


FIGURE 3.1 – Schéma de principe du dépôt de multicouches de phospholipide par la méthode de Langmuir-Blodgett. A) Le trempage et retrait successif d'un substrat à travers une interface eau/air recouverte d'une monocouche de phospholipide dont la pression est contrôlée permet d'ajouter une à une des couches de phospholipide. B) La méthode de Langmuir-Sheaffer permet d'ajouter une couche de molécule supplémentaire en faisant passer le substrat à travers l'interface parallèlement à celle-ci.

aucun dépôt de plus de deux couches de DPPC et de plus d'une couche de DOPC n'a été obtenu par cette méthode.

Certaines équipes ont pallié cette difficulté en utilisant la méthode de Langmuir-Sheaffer. Cette méthode consiste à transférer une couche supplémentaire en faisant traverser le substrat à travers l'interface eau/air parallèlement à celle-ci [150, 152]. A notre connaissance, il n'a jamais été montré qu'il était possible de déposer plus d'une couche de phospholipide supplémentaire par cette méthode.

Nous avons essayé de déposer des multicouches de DOPC par la méthode de Langmuir-Blodgett sur des galettes de silicium hydrophiles. Lors de nos tentatives de dépôt de la seconde couche, la première couche réintégrait systématiquement l'interface eau/air quelle que soit la pression appliquée sur le film.

La méthode de Lagmuir-Blodgett paraît séduisante, au premier abord, pour déposer les multicouches car elle est basée sur le transfert de couches de molécules parfaitement continues et laisse espérer l'obtention de films sans défauts. Malheureusement, elle présente des inconvénients difficiles à surmonter. Tout d'abord, c'est une méthode lourde à mettre en œuvre : la préparation et la manipulation de la cuve prennent beaucoup de temps et les dépôts se font à des vitesses de l'ordre de la dizaine de micromètres par seconde : il faudrait environ 20h pour déposer une vingtaine de couches sur un substrat d'un centimètre carré. Cette méthode est donc inenvisageable pour des expériences routinières. D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, la surface spécifique des molécules de phospholipide dépend de l'hygrométrie. Il est donc peu probable que le film conserve la continuité de ses membranes lors des immersions et retraits successifs si le film se dilate et se rétracte alternativement, créant ainsi des réorganisations permanentes au sein du film. L'obtention de membranes sans

défauts dans ces conditions semble pour l'instant peu probable.

Layer-by-Layer

La méthode du Layer-by-layer (LBL) est une autre méthode permettant de réaliser des multicouches en empilant sur un substrat des couches de charge opposées les unes sur les autres. Pour obtenir de telles structures, on trempe successivement le substrat dans la solution contenant les molécules chargées positivement, puis dans la solution contenant les molécules chargées négativement. A chaque étape, une couche de charge opposée se forme sur la surface à cause de l'interaction électrostatique entre la surface chargée et les nouvelles molécules en solution de charge opposée. Découverte initialement avec des molécules chargées amphiphiles, cette méthode a ensuite été principalement appliquée à des polyélectrolytes [153], et beaucoup plus rarement à des phospholipides [132]. Cette méthode a été utilisée pour réaliser des membranes supportées (par adsorption d'une seule bicouche de phospholipide) dont on trouvera une revue dans [154], mais beaucoup moins pour un nombre plus élevé de couches [132]. Le principal inconvénient de cette méthode est la nécessité d'utiliser des couples de phospholipide chargées et généralement une couche intermédiaire de polyélectrolyte si l'on veut réaliser plus d'une bicouche. Ceci limite de ce fait cette méthode à la fabrication de films de composition très spécifique. D'autre part, les études réalisées sur ce type de structure ont montré qu'elles étaient moins ordonnées que les structures réalisées par la méthode de Langmuir-Blodgett [149], ce qui reste à vérifier pour le cas des phospholipides.

3.1.2 Les méthodes en une étape

Beaucoup de méthodes en une étape sont envisageables pour le dépôt de phospholipide. Nous ne parlerons dans cette partie que des méthodes qui ont été employées pour ce type de molécule. On trouvera des caractérisations comparées de ces méthodes par SAXS et EPR dans [155] et par microscopie optique et AFM dans [113].

Evaporation de gouttes

L'étalement de gouttes est la méthode la plus simple. Une simple goutte de phospholipide dissout dans un solvant organique est déposée sur le substrat. Si la goutte mouille bien le substrat, elle s'étale pour former un disque bien défini. Après séchage, un disque de phospholipide d'épaisseur plus ou moins homogène reste sur la surface. Cette méthode a l'avantage d'être très simple mais offre peu de contrôle sur l'homogénéité du film et la reproductibilité de son épaisseur [155].

Spin-coating

La technique du spin-coating consiste à étaler un film mince de liquide sur un disque en la faisant tourner à une vitesse élevée. La force centrifuge est responsable d'un écoulement du liquide vers l'extérieur du disque qui amincit le film. Le spin-coating de solutions de phospholipide a été étudié par Estes et Mayer pour l'appliquer à l'électroformation [113]. Ils ont obtenu des films d'épaisseur bien contrôlée qui donnent de bons résultats lors de l'électroformation. Néanmoins,

leurs observations au microscope à force atomique montrent que l'organisation du film est très fragmentée à l'échelle sub-micrométrique, ce qui n'en fait pas un bon candidat pour servir de système modèle.

Dip-coating

La méthode du dip-coating consiste à tirer le substrat d'une solution de phospholipide à une vitesse contrôlée. Un film de solution d'épaisseur uniforme se dépose sur le substrat et laisse après séchage du solvant, un film d'épaisseur homogène [155]. Cette méthode a l'avantage de permettre le dépôt d'une large gamme d'épaisseurs en variant les conditions expérimentales. Elle a été peu utilisée pour déposer des films de phospholipide et ne donne pas toujours des résultats homogènes [113] ni reproductibles [155]. Cette méthode sera décrite plus en détail dans la suite de ce chapitre.

3.2 Les méthodes de caractérisation

Un film de phospholipide est une structure qui peut prendre des organisations spécifiques à différentes échelles en fonction des conditions météorologiques et de la manière dont il a été fabriqué. Aucun outil ne permet de résoudre tous les détails de cette structure simultanément. Pour chaque nature d'organisation que l'expérimentateur cherche à décrire, il est donc nécessaire d'utiliser une méthode adaptée.

A l'échelle nanoscopique, les molécules de phospholipide s'organisent les unes par rapport aux autres suivant une phase qui dépend de l'équilibre thermodynamique, mais qui est toujours lamellaire pour les phospholipides pouvant mener à la formation de vésicules. Cette structure supramoléculaire peut être déterminée par des moyens d'analyse structurale classiques. On trouve dans la littérature des caractérisations de films de phospholipide mono- ou multicouches utilisant des méthodes de diffraction comme la diffraction de rayons X aux petits angles (SAXS) [146, 155] ou la diffraction de neutron aux petits angles (SANS) [152]. Ces méthodes permettent de faire une mesure globale de l'organisation des molécules les unes par rapport aux autres et d'obtenir des informations comme l'épaisseur des couches de molécules, leurs distances, la présence d'eau ou de solvant entre les couches, les fluctuations des molécules ou des membranes, etc. Les méthodes spectroscopiques comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) [156] ou la résonance paramagnétique électronique (EPR) [155] permettent d'obtenir des informations sur l'orientation des molécules qui informent sur la morphologie des défauts, la présence de molécules étrangères ou la dynamique de ces molécules. Ces méthodes permettent généralement de sonder la structure moyenne des films en réalisant une mesure globale sur une grande surface. Généralement moins précises, des méthodes directes d'observation peuvent donner des informations supplémentaires sur la nature des réorganisations autour des défauts ou des frontières. Notamment en utilisant la microscopie électronique à transmission (TEM) ou à balayage (SEM) [157] qui permettent d'observer les ondulations des couches à plus grande échelle ou la structure de la réorganisation des couches aux frontières des défauts.

A une échelle plus grande, mais toujours sub-micrométrique, l'épaisseur et les propriétés optiques du film peuvent être mesurées par la technique de l'el-

lipsométrie qui mesure la dépolarisation de la lumière réfléchie sur le film [158] et les variations d'épaisseur par des méthodes de microscopie en champ proche comme la microscopie à force atomique (AFM) qui sonde la surface avec une pointe nanométrique [159, 160].

A l'échelle microscopique, l'organisation lamellaire des molécules de phospholipide peut être plus ou moins homogène, cette structure peut être stratifiée et présenter des marches espacées par des distances micrométriques ou amorphe si elle ne présente pas d'organisation claire à ces échelles. Cette organisation est observable à travers la variation d'épaisseur du film avec des techniques de microscopie optique comme la microscopie en réflexion [161], la microscopie en fluorescence [161, 142], la microscopie à angle de Brewster [162], la microscopie ellipsométrique [158]. Les défauts n'aboutissant pas à une variation d'épaisseur peuvent être localisés avec d'autres méthodes optiques comme la microscopie en champ noir qui peut permettre de localiser des inhomogénéités d'indice dans le film ou la microscopie en biréfringence qui est sensible aux variations des propriétés optiques anisotropes du film. En ajoutant des sondes comme des Quantum Dots (QD) dans le film qui vont se concentrer dans certains défauts en fonction de leur affinité, il est également possible de localiser ces défauts.

A l'échelle macroscopique, l'épaisseur, ou l'organisation du film, peut ne pas être uniforme en fonction des conditions de dépôts du film. Ces variations pourront être quantifiées et cartographiées par des mesures locales multiples en utilisant la méthode adaptée à la grandeur à mesurer ou simplement par des mesures optiques globales comme l'imagerie en lumière réfléchie, en champ noir ou de fluorescence.

Les propriétés des films supportés peuvent faire également l'objet d'analyses comme la mesure du coefficient de diffusion des phospholipides dans les membranes par la méthode de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP). Dans cette méthode, la fluorescence est détruite localement par une excitation en lumière intense et la diffusion des molécules ayant conservé leurs propriétés de fluorescences est observée dans la zone éteinte par microscopie [163, 164]. Les propriétés électriques du film peuvent être mesurées par la spectroscopie d'impédance [165, 138], ce qui donne des informations sur la conductivité et la capacité du film [165, 138] et les propriétés mécaniques à l'aide d'une machine de force [150] qui permet de sonder la force des interactions entre les couches et leur cohésion.

L'ensemble de ces techniques de mesure permet de caractériser quasiment toutes les caractéristiques d'un film. Toutefois, la plupart sont longues à mettre en œuvre et nécessitent un matériel coûteux. Dans les paragraphes suivants, nous détaillerons les méthodes utilisées pour nos expériences. Elles font partie des plus simples et permettent une utilisation routinière. Les deux dernières méthodes, basées sur la microscopie optique, ont fait l'objet de développements spécifiques pour nos expériences.

3.2.1 Ellipsométrie

L'ellipsométrie est une méthode de caractérisation de couches minces diélectriques. Une source de lumière plane monochromatique de polarisation contrôlée (généralement un faisceau laser polarisé) est dirigée sur la surface à caractériser avec un angle θ et la polarisation de la lumière réfléchie est mesurée (figure 3.2).

Principe

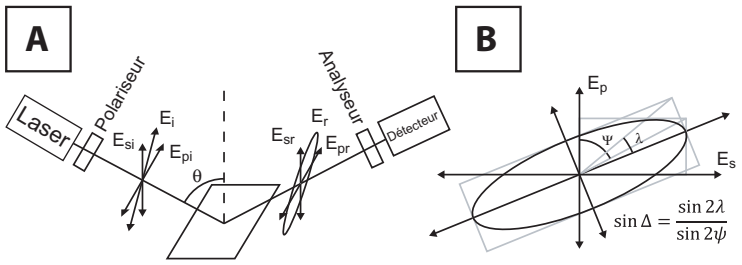


FIGURE 3.2 – Principe de l'ellipsométrie. A) Schéma d'un ellipsomètre sous sa forme la plus simple. La lumière d'un laser polarisé est réfléchie sur la surface, puis analysée pour en mesurer l'ellipsité. B) La polarisation de la lumière, comme la variation de la polarisation de la lumière peut être décrite par les paramètres $\tan(\psi)$ et Δ qui représentent respectivement le rapport d'amplitude et le déphasage des composantes parallèle (E_p) et perpendiculaire (E_s) du champ électrique. On retrouve ces paramètres à partir de la forme de l'ellipse.

Une lumière polarisée est composée d'un champ électrique transverse à la direction de propagation de la lumière qui peut s'exprimer en fonction de ses composantes parallèle (p) et perpendiculaire (s) (vecteur de Jones) [144] :

$$E = \begin{bmatrix} E_0 \sin\Psi e^{i\omega t+\phi+\Delta} \\ E_0 \cos\Psi e^{i\omega t+\phi} \end{bmatrix} \tag{3.1}$$

Lorsque cette lumière est réfléchie sur un matériau plan et optiquement isotrope, les composantes p et s du champ électrique sont réfléchies indépendamment, le champ électrique réfléchi devient :

$$E_r = \begin{bmatrix} r_p & 0 \\ 0 & r_s \end{bmatrix} E_i \tag{3.2}$$

Où $r_p = \frac{|E_{pr}|}{|E_{pi}|}\exp(\arg(E_{pr})-\arg(E_{pi}))$ et $r_s = \frac{|E_{sr}|}{|E_{si}|}\exp(\arg(E_{sr})-\arg(E_{si}))$ sont les coefficients complexes de réflexion sur la surface des composantes parallèle et perpendiculaire du champ électrique. La variation de la polarisation de la lumière peut alors être caractérisée par :

$$\frac{r_p}{r_s} = \tan\psi e^{i\Delta} \tag{3.3}$$

Où ψ et Δ représentent respectivement le rapport des atténuations et la différence de déphasage entre les composantes parallèle et perpendiculaire de l'onde. Ce sont ces deux paramètres qui sont généralement mesurés en ellipsométrie de couches minces. On peut les mesurer directement sur la polarisation de la lumière réfléchie avec l'équation 3.1 (figure 3.2B) en utilisant une lumière polarisée linéairement à 45° comme lumière incidente (figure 3.2A). En pratique, les appareils utilisent des méthodes de mesures plus complexes qui utilisent des polariseurs et des analyseurs tournant pour atteindre une plus grande précision de mesure [166].

Ces paramètres peuvent être calculés en suivant un modèle à partir des relations de Fresnel et des distances de propagation de la lumière dans la couche

mince à mesurer en prenant en compte les réflexions multiples. Cela permet d'identifier des paramètres de la couche comme son épaisseur et son indice de réfraction. Le modèle peut également contenir plusieurs couches et peut éventuellement tenir compte de caractéristiques optiques plus fines des matériaux (anisotropie, conductivité, etc). Mais seulement deux paramètres peuvent être déterminés de cette manière. Pour obtenir plus d'informations, il existe des ellipsomètres qui font varier d'autres paramètres de mesures comme l'angle d'incidence (ellipsométrie multi-angle) ou la longueur d'onde de la lumière (ellipsométrie spectroscopique) pour pouvoir augmenter le nombre degré de liberté du modèle.

En pratique, la mesure de couches très minces (c.-à-d., de l'ordre de quelques nanomètres) ne permet de déterminer que l'épaisseur de la couche car l'angle ψ varie très peu avec les paramètres et la mesure de l'indice n'est pas fiable. Il faut utiliser alors l'ellipsométrie en concomitance avec d'autres méthodes pour connaître l'indice du matériau.

Ellipsométrie de couches de phospholipide

L'ellipsométrie de films de phospholipides est devenue assez courante dans la littérature. Elle se rencontre dans différentes configurations comme silicium/phospholipide/air [Seul90], silicium/phospholipide/eau [158] ou encore eau/phospholipide/air [159]. L'indice des couches de phospholipides n'est pas isotrope et peut varier en fonction des conditions de dépôt et de l'environnement des couches (hydratation par exemple). Néanmoins, on obtient une bonne approximation de l'épaisseur en utilisant un indice isotrope moyen de 1,44 pour le DMPC [158]. Pour les mesures ellipsométrique sur silicium, nous avons utilisé un modèle à deux couches prenant en compte l'épaisseur de la couche d'oxyde sur le silicium.

Méthode

Les mesures ellipsométriques de multicouches de phospholipides ont été réalisées sur un ellipsomètre Sentech SE 400 apparatus avec une source laser hélium-néon (λ = 632,8 nm) ayant un angle d'incidence de 72°C. Pour les mesures sur substrat de silicium, le substrat vierge est d'abord caractérisé pour connaître sa conductivité et son indice de réfraction (typiquement n_{si} = 3,87) et l'épaisseur de la couche d'oxyde (typiquement 2,2 nm en prenant n = 1,46) en utilisant un modèle à une seule couche. On utilise ensuite un modèle à deux couches pour mesurer l'épaisseur du film de phospholipide. Pour les mesures effectuées sur des substrats de verre recouvert d'une couche d'ITO, une première mesure est effectuée pour connaître l'épaisseur et l'indice de la couche d'ITO (typiquement 67 nm et $n = 1{,}75$) avec un modèle à une couche en prenant $n = 1{,}5$ pour le verre. Un modèle à deux couches est ensuite utilisé pour mesurer l'épaisseur du film. Dans les deux cas, l'indice du film de phospholipide est fixé à la valeur de 1,44.

Nous avons utilisé l'ellipsométrie pour mesurer l'épaisseur des couches de phospholipides déposées sur des substrats de silicium et d'ITO. Lors de nos expériences, nous avons pu remarquer que la qualité de l'ajustement des paramètres diminuait pour les fortes épaisseurs. Pour les films épais, il serait propablement nécessaire d'utiliser un modèle plus fin des propriétés optiques du phospholipide afin d'obtenir une mesure précise de l'épaisseur.

3.2.2 Microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique est un microscope à sonde balayée qui permet de mesurer la topographie d'une surface à l'échelle nanométrique.

Principe

La pointe du microscope (sonde), qui va balayer la surface, est positionnée au bout d'un levier flexible de taille microscopique (figure 3.3A). L'interaction mécanique entre la pointe et la surface est mesurée par la déflexion du levier à l'aide d'un laser se réfléchissant à son extrémité. La moindre variation d'angle du levier se traduit par une déflexion du faisceau laser réfléchi, qui est mesurée par un détecteur optique à quatre quadrants. L'échantillon est positionné avec une précision sub-nanométrique sous la pointe à l'aide d'un actionneur piézo-électrique ce qui permet de balayer la surface de l'échantillon sous la pointe et d'asservir la force entre l'échantillon et la pointe à une valeur bien précise.

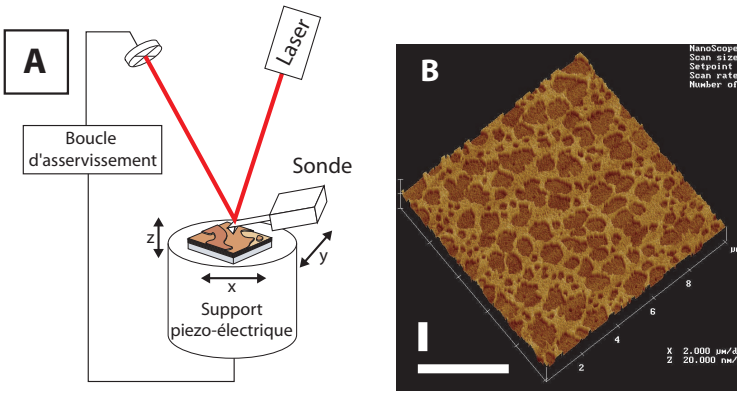


FIGURE 3.3 – Observation de couches de phospholipide par AFM. A) Principe de fonctionnement d'un AFM. B) image caractéristique en 3 dimensions de couches stratifiées de phospholipide sur une galette de silicium. Les barres d'échelle horizontale (x, y) et verticale (z) représentent 4 µm et 40 nm respectivement. Conditions : DOPS 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH 9:1 sur une galette de silicium.

AFM et phospholipides

L'AFM est une bonne technique de contrôle pour visualiser les films de phospholipide déposés sur un substrat de silicium. Comme les méthodes optiques, il offre la possibilité de voir l'organisation des films de phospholipide à l'échelle du nanomètre sur l'axe vertical, de plus il permet d'obtenir une résolution nanométrique sur les axes latéraux, offrant une plus grande finesse d'analyse. En revanche, il permet difficilement de mesurer l'épaisseur des films. La figure 3.3B montre un dépôt de DOPS sur un substrat de silicium. Contrairement au DOPC, Le DOPS s'organise mal sur la surface et montre des strates formant des structures sub-micrométriques qui ne sont pas visibles avec les méthodes de microscopie optique.

3.2.3 Microscopie en réflexion

Sur les surfaces réfléchissantes comme le silicium, il est possible d'observer l'organisation des films de phospholipide en utilisant un microscope standard en réflexion. En effet, à l'instar de l'ellipsométrie mais sans polarisation particulière de la lumière, les interférences constructives et destructives à travers le film de phospholipide offrent un contraste autorisant à observer les variations d'épaisseur du film. La figure 3.4B montre une image typique de film de phospholipide sur une galette de silicium propre sans traitement de surface. On observe clairement l'organisation stratifiée du film de phospholipide (figure 3.4).

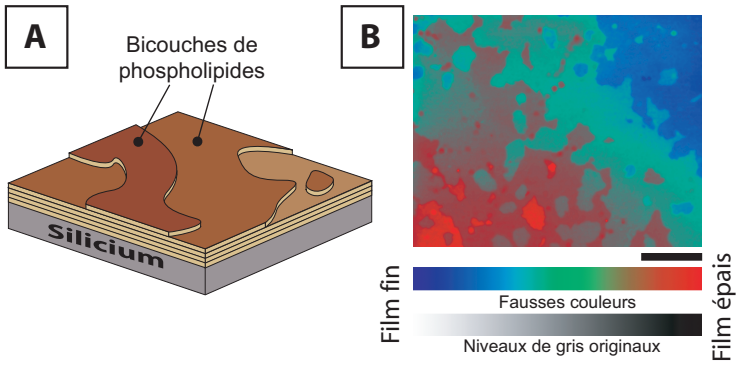


Figure 3.4 – Observation de films de phospholipides par microscopie en réflexion. A) Représentation schématique d'un film de phospholipide organisé en multicouches sur un substrat de silicium. B) Image typique de microscopie en réflexion d'un film de phospholipide sur silicium. Pour une meilleure visibilité, l'image originale en niveau de gris a été convertie en fausses couleurs. Les zones plus claires correspondent à des zones plus fines (bleu en fausses couleurs) et les zones plus sombres correspondent à des zones plus épaisses (rouge en fausses couleurs). Les barres indiquent la correspondance gris/couleur qui a été appliquée lors du traitement de l'image. EPC 10 mg/mL, in $CHCl_3$:MetOH, la barre représente 50 µm.

Cette méthode permet d'observer l'organisation de la stratification des couches sur une large surface sans faire appel à un appareillage compliqué. Elle a beaucoup été utilisée pour mesurer de faibles angles de contact de mouillage [57, 141] ou l'épaisseur de films fins de lubrifiant [167]. Elle peut permettre des mesures quantitatives si la source de lumière et la chaîne d'acquisition sont correctement calibrées. Le contraste est assez faible pour les films ultra-minces et permet difficilement de distinguer les couches de phospholipides en dessous d'une trentaine de nanomètres d'épaisseur. En revanche, il est très élevé pour les épaisseurs comprises entre 50 et plusieurs centaines de nanomètres et permet de distinguer des variations d'épaisseur inférieures au nm. Pour augmenter le contraste pour les faibles épaisseurs, on peut ajouter une couche diélectrique entre la couche à mesurer et la surface réfléchissante [167].

3.2.4 Microscopie en épifluorescence

Comme la microscopie en réflexion, la microscopie en épifluorescence permet d'observer l'organisation microscopique des films de phospholipide. Une sonde fluorescente est mélangée au phospholipide, ce qui permet de visualiser la quantité de phospholipide déposée en regardant l'intensité de fluorescence de la surface. L'avantage de cette méthode est qu'elle peut donner plus facilement une information quantitative sur l'épaisseur du film de phospholipide présent sur la surface et produire ainsi une "carte" de l'épaisseur du film. Néanmoins, l'ajout d'une sonde fluorescente dans le phospholipide peut perturber l'expérience et la photoextinction de cette sonde limite le temps des observations.

Pour obtenir des images indiquant directement l'information de l'épaisseur du film, une calibration est nécessaire car l'intensité de fluorescence n'est pas linéaire avec l'épaisseur du film. En effet, la lumière excitatrice de la fluorescence comme la lumière émise interfère dans le film si bien que l'intensité de fluorescence résultante n'est pas une fonction monotone de l'épaisseur. Néanmoins, pour les épaisseurs inférieures à la centaine de nanomètre, cette fonction peut être approximée par une fonction monotone.

Nous avons calibré le système d'acquisition en comparant les mesures obtenues par épifluorescence et par ellipsométrie sur une série de films d'épaisseurs variées (figure 3.5). Les films ont été produits par la méthode du retrait de ménisque décrite dans chapitre 3.3, donnant un film d'épaisseur suffisamment homogène à l'échelle microscopique et macroscopique. Pour chaque film d'épaisseur fixée, l'épaisseur moyenne du film est mesurée par ellipsométrie. L'intensité moyenne de fluorescence quant à elle est mesurée en prenant une photo en microscopie d'épifluorescence dans des conditions identiques d'exposition et de réglage du microscope (Objectif 10x, filtre de densité n°5, jeu de filtres FITC, exposition 300 ms sur une camera EMCCD Photonmax 512B (Roper) monté sur un microscope Zeiss Axioobserver). Une fonction puissance de la forme $e = A(E.f + B)^D$ est ensuite ajustée sur les valeurs moyennes mesurées (e est l'épaisseur, f est l'intensité de fluorescence, B est l'intensité du bruit de fond de la caméra, A, D et E sont ajustés)(figure 3.5). Cette fonction permet de calculer l'épaisseur du film à partir de l'intensité de la fluorescence en chaque point des images prises dans les mêmes conditions. Une correction spatiale de l'intensité de fluorescence (ajustement bicubique) a été appliquée sur les images en fluorescence pour compenser l'inhomogénéité du champ d'excitation (figure 3.6).

Les images de films prises sur les substrats de silicium font apparaître les mêmes marches de phospholipides d'une hauteur de 5 ± 1nm que l'on observe avec les autres méthodes. La principale source d'erreurs dans ces mesures d'épaisseur est imputée à la photoextinction du fluorophore avant la prise de vue.

Cette technique d'observation permet d'établir des cartes en épaisseur sur des surfaces de quelques centaines de μm^2 plusieurs mm^2. Sa résolution latérale n'est pas aussi élevée que celle de l'AFM, mais elle est moins invasive puisqu'elle ne met pas en jeu d'interaction mécanique avec le film. Elle est donc plus intéressante que l'AFM pour observer l'organisation microscopique des films sur de grandes surfaces.

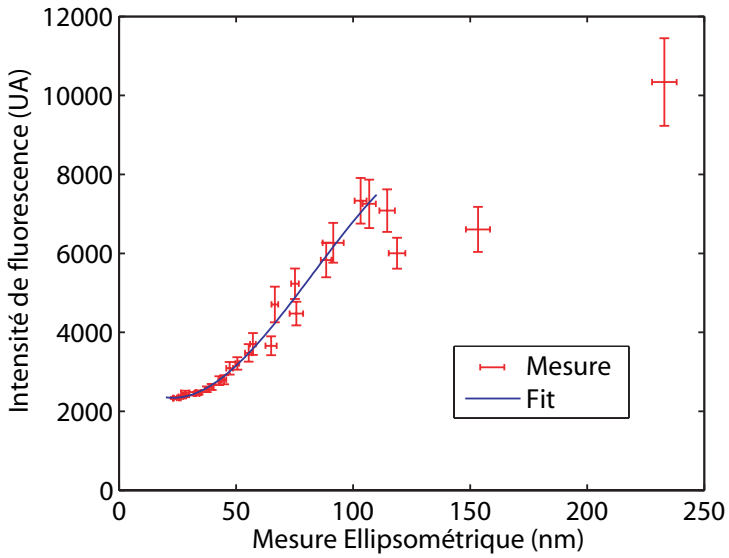


Figure 3.5 – Fonction de calibration de l'épaisseur sur l'intensité de fluorescence. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de l'intensité des pixels de l'image ($N = 10^6$) sur l'axe des abscisses des mesures ellipsométriques ($N = 10$) sur l'axe des ordonnées.

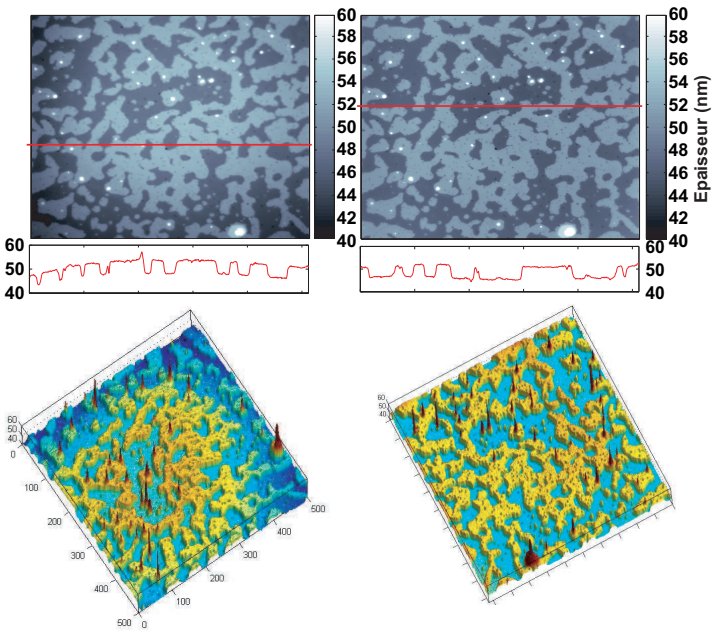


FIGURE 3.6 – Carte en épaisseur d'un film de phospholipide calculée à partir d'une image en fluorescence en utilisant la fonction de calibration. A gauche : Sans correction. A droite : Avec correction spatiale de l'intensité de fluorescence. La correction est réalisée en divisant l'épaisseur par une fonction bicubique ajustée sur l'image normalisée par l'intensité moyenne de fluorescence. Le profil est donné sur la ligne rouge. Conditions : DOPC 20 mg/mL, in C_8H_{18}.

3.3 Le retrait de ménisque

Pour trouver une alternative aux techniques généralement utilisées pour déposer des films de phospholipide, nous avons mis au point une nouvelle méthode basée sur le retrait de ménisque. Dans cette méthode, une goutte de solution de phospholipide dans un solvant organique est déplacée à vitesse constante sur un substrat. Comme nous le verrons par la suite, cette méthode permet de déposer des films d'épaisseur homogène, ce que nous cherchions initialement, mais également de réaliser des motifs de phospholipide en utilisant des instabilités de mouillage. Dans tous les cas, cette technique s'est révélée être une méthode de choix pour contrôler l'organisation microscopique du dépôt de phospholipide.

3.3.1 Principe

Le principe de la méthode est schématisé en figure 3.7 Une goutte de 40 µL de solution de phospholipide dans un solvant organique est injectée entre un substrat et une lame presque parallèle (figure 3.7). Nous appellerons par la suite cette lame « pinceau ». Le pinceau est légèrement incliné pour former un ménisque bien défini à son extrémité. Dans notre configuration, le pinceau est fixé et le substrat peut être déplacé à une vitesse contrôlée grâce à un étage de translation linéaire. Lorsque le substrat est mis en mouvement par rapport au pinceau, le ménisque se retire et laisse derrière lui un film de matière dont les caractéristiques dépendent des conditions expérimentales. Pour bien contrôler ces conditions, la température du substrat est imposée par un système de contrôle de température et la convection sur le ménisque est imposée par un flux d'air aspiré par des canaux disposés sur le pinceau. Les détails de ce système sont décrits dans l'encadré méthode.

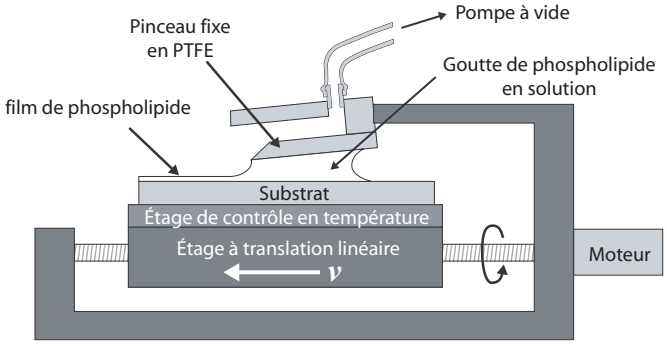


Figure 3.7 – Schéma de la machine de dépôt.

Deux phénomènes peuvent être responsables d'un dépôt de matière sur le substrat :

- A faible vitesse, le soluté est concentré en direction de la ligne de contact à cause de l'évaporation du solvant à la surface du ménisque. En fonction des conditions expérimentales, la matière déposée dans ce régime peut se présenter sous forme d'un film d'épaisseur uniforme ou sous forme de motifs de géométrie variés en présence d'instabilités de mouillage.

– A des vitesses plus élevées, l'évaporation n'est plus suffisante pour déposer un film d'épaisseur importante, mais le solvant peut être emporté par le substrat à cause de sa viscosité. Après évaporation du solvant, il reste alors sur le substrat un film d'épaisseur plus ou moins uniforme en fonction des conditions expérimentales. Ce deuxième régime s'apparente à la méthode du dip-coating dans une géométrie un peu particulière.

Ces deux régimes sont expliqués et modélisés dans la section « dépôt uniforme » et les instabilités qui apparaissent dans le régime à basse vitesse sont décrites dans la section « dépôt patterné ».

3.3.2 Mise en œuvre

Machine de dépôt

Deux machines de dépôts ont été utilisées lors des expériences présentées par la suite :

La première a été réalisée par le Dr. L. Malaquin au Laboratoire de Photonique et Nanostructures du CNRS. Je remercie au passage Anne-Marie Aguyrie, directrice de recherche au CNRS-LPN qui m'a permis d'utiliser la machine. Ce premier système est monté sur un microscope droit, permettant de faire des observations en réflexion et en fluorescence. La grande majorité des dépôts et mesures de la partie "Dépôt de motifs" (chapitre 3.3.4) ont été réalisés sur cette machine.

Nous avons construit une autre machine au laboratoire de l'ENS, dont les caractéristiques ont été optimisées pour la fabrication de dépôts uniformes (vitesses maximum plus importante, jusqu'à 5 cm/s, meilleur contrôle de la hauteur du ménisque et contrôle de la convection). Cette machine ne disposant pas de système de vision, l'observation des dépôts lors de leur fabrication n'est pas possible. Toutes les expériences de la partie « Dépôt uniforme » (chapitre 3.3.3) ont été réalisées sur cette machine.

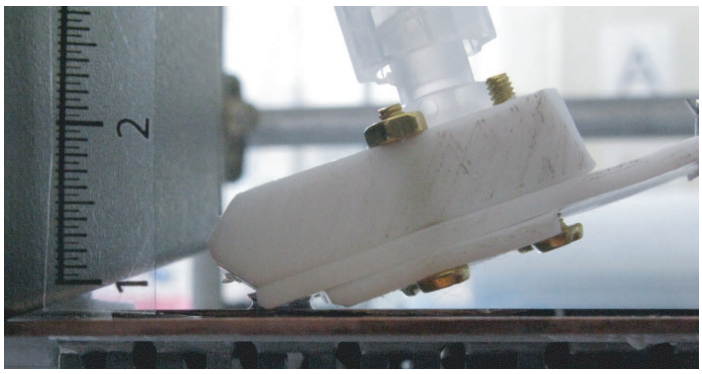


FIGURE 3.8 – Photo de profil du pinceau supportant le ménisque. On peut distinguer sous le pinceau les deux ménisques avant et arrière, ainsi que la pièce fixée sur la lame contenant les canaux servant à contrôler la convection.

Méthode

La machine de dépôt fabriquée à l'ENS est basée sur un étage de translation linéaire M-403.6PD fabriqué par la société PI (figure 3.7). Un module thermoélectrique à effet Peltier refroidi par un échangeur de température à eau d'un côté et couvert d'une plaque en cuivre de l'autre est monté sur l'étage de translation. La température est contrôlée par un contrôleur PID commercial (modèle 350B, Newport) branché sur le module Peltier et sur une sonde de température insérée dans la plaque de cuivre. Le tout est commandé par ordinateur à travers une interface Matlab ce qui permet de commander des séquences de criblage de vitesses de dépôt.
Le pinceau que l'on peut voir sur la figure 3.8 est constitué d'une lame de téflon d'environ 2 cm de large qui supporte la goutte de solution. La hauteur de la lame est réglée par un micromanipulateur qui est fixé sur le support de l'expérience.
Pour générer le flux d'air qui contrôle la convection, la lame est surmontée d'un canal de 3 mm de hauteur couvrant toute la largeur du pinceau. Ce canal est relié par un capillaire de 1 m de long et 500 µm de diamètre interne (tygon s54hl) à une pompe à vide suivie d'un pressiostat à vide. Le débit d'air est directement contrôlé par la pression du vide en suivant la courbe de calibration visible sur la figure 3.9.

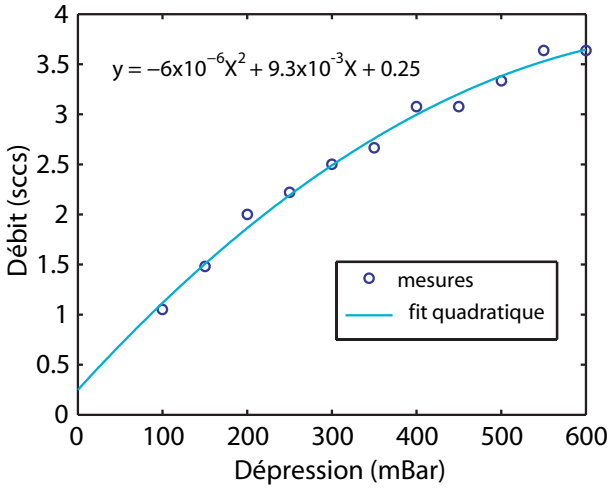


Figure 3.9 – Courbe de calibration du débit de gaz en fonction de la pression de pompage. Les mesures de débits ont été réalisées par le chronométrage du temps de pompage d'un volume d'air de 40ml.

3.3.3 Dépôt uniforme

Dans les conditions expérimentales appropriées, il est possible de déposer par la méthode du retrait de ménisque un film d'épaisseur homogène. A première vue, cette méthode s'apparente à la méthode du dip-coating qui est très largement utilisée dans l'industrie pour déposer des films minces [145]. Mais,

contrairement à la situation du dip-coating classique, notre configuration expérimentale fait entrer en jeu l'évaporation du solvant qui peut faire apparaître des effets surprenants.

Dans les paragraphes suivants, le phénomène de dépôt est étudié théoriquement et expérimentalement. Deux régimes ont été identifiés en fonction de l'importance relative de l'évaporation et des forces visqueuses. Les propriétés des films ont été étudiées aux différentes échelles en fonction de la vitesse de retrait et du régime de dépôt. Finalement, la stabilité du phénomène de dépôt est discutée, introduisant la possibilité de former des motifs en utilisant cette méthode de dépôt.

Modèle

Deux phénomènes différents peuvent être responsables du dépôt d'un film à la surface du substrat. A faible vitesse, le soluté est concentré en direction de la ligne de contact du ménisque à cause de l'évaporation du solvant. Il s'agit du régime dit « d'assemblage convectif ». A plus haute vitesse, le solvant est emporté par les forces visqueuses formant un film de solution qui, après séchage, laisse sur le substrat un film de matière sèche. Il s'agit alors d'un régime que l'on appelle « Landau-Levich ». Un modèle théorique est décrit ci-dessous pour expliquer quantitativement ces deux phénomènes.

Dépôt convectif

Aux faibles vitesses de dépôt, le ménisque garde sa forme statique et aucune raison hydrodynamique ne justifie un dépôt de matière sur le substrat. En revanche, l'évaporation du solvant à la surface du ménisque est responsable de la concentration du soluté en direction de la ligne de contact avec le substrat. Ce phénomène a été observé à l'origine sur des gouttes en train de sécher et est devenu célèbre comme étant responsable de la formation d'un anneau lorsque l'on fait sécher une goutte de café [147]. Il a ensuite été largement étudié sur des solutions de colloïdes, notamment pour le dépôt de couches minces auto-organisées [168] [19]. Le dépôt de molécules non volatiles par cette méthode a aussi été étudié : i) pour réaliser des réseaux de polymères sans étape de lithographie en utilisant des instabilités de mouillage [20] ; ii) pour fabriquer des nano-composites en utilisant des molécules ayant des propriétés d'assemblage supramoléculaire [169]. Malgré l'important effort expérimental réalisé sur ce régime de dépôt, à notre connaissance seule une publication de Berteloot *et al.* traite théoriquement du problème de l'épaisseur du film déposé [170]. Leur modèle fait une analyse microscopique des flux dans le ménisque et aboutit à une dépendance de l'épaisseur $\propto v^{-2}$, ce qui est en contradiction avec nos résultats expérimentaux.

Nous proposons ici un modèle plus simple permettant d'expliquer l'expérience est nous discuterons plus tard des raisons de sa validité en tenant compte des travaux de Berteloot *et al.*

Nous considérons dans ce modèle un bilan de matière dans une boîte entourant le ménisque (voir figure 3.10). Cette boîte doit être suffisamment grande pour inclure toutes les variations locales de concentration qui pourraient être provoquées par l'évaporation de solvant. Trois phénomènes peuvent être responsables d'un échange de matière entre l'intérieur et l'extérieur de la boîte : i) L'évaporation du solvant, puis sa diffusion dans l'atmosphère environnante est

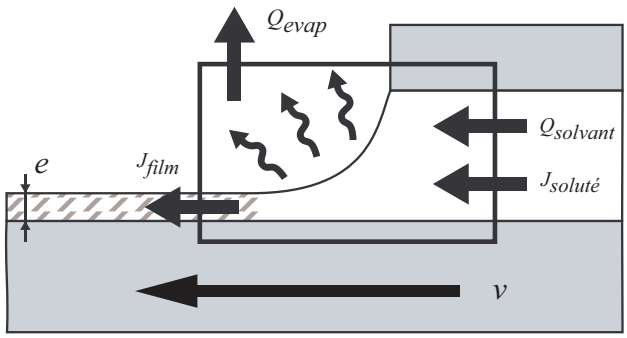


Figure 3.10 – Schéma du modèle de dépôt par évaporation.

responsable d'un flux de volumique de solvant $Q_{évap}$ sortant de la boîte. ; ii) Le dépôt de soluté sur le substrat sortant de la boîte à la vitesse de déplacement du substrat est responsable d'un flux sortant de molécule de soluté J_{film}. ; iii) Un flux volumique de solvant $Q_{solvant}$ et un flux moléculaire de soluté $J_{soluté}$ en provenance du reste de la goutte peut apparaître par convection. En régime de dépôt permanent, la conservation de la quantité de matière dans la boîte impose :

$$Q_{évap} = Q_{solvant} \tag{3.4a}$$
$$J_{film} = J_{soluté} \tag{3.4b}$$

Si la concentration C de la solution est homogène aux frontières de la boîte et suffisamment faible pour négliger le volume de soluté par rapport au volume de solvant, $J_{soluté}$ peut être lié à $Q_{solvant}$ par la relation :

$$J_{soluté} = C.Q_{solvant} \tag{3.5}$$

Et connaissant les propriétés physiques de la molécule déposée, l'épaisseur e du film peut être liée à J_{film} :

$$J_{film} = \frac{h\rho v}{M_w} \tag{3.6}$$

Où ρ est la densité du film, v la vitesse du substrat et M_w la masse molaire de la molécule en solution. En insérant (3.4) et (3.5) dans (3.6), on en déduit une expression de l'épaisseur du film en fonction des données du problème :

$$e = \frac{M_w C Q_{évap}}{\rho} v^{-1} \tag{3.7}$$

Landau-Levich

Pour des vitesses plus importantes, la forme du ménisque ne peut plus être assimilée au ménisque statique. En effet, les forces capillaires ne sont plus suffisantes pour retenir la solution dans la goutte et un film de solution est entraîné

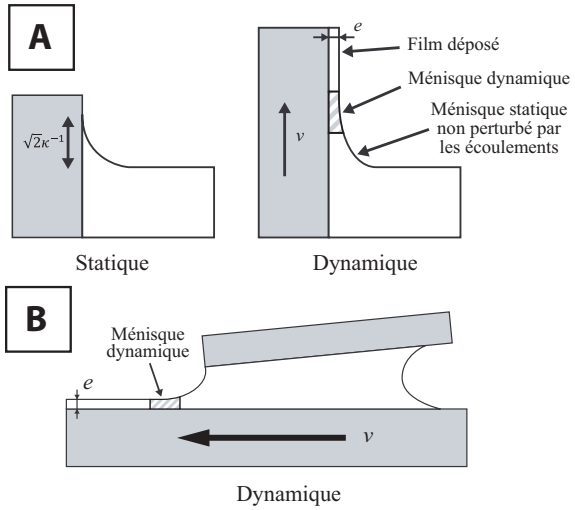


FIGURE 3.11 – Organisation du modèle de Landau-Levich. A) Dans sa configuration historique. B) Adaptée pour notre géométrie.

sur le substrat. Ce phénomène est bien connu et trouve de nombreuses applications industrielles dans l'enduction de films ou fibre [57] [145]. Le phénomène physique a été décrit pour la première fois par Landau, Levich et Derjaguin [171] [172] puis repris dans de nombreux travaux pour affiner sa description et l'étendre à différentes géométries [145] [173]. Dans le problème décrit initialement, qui correspond à la technique du dip-coating, une plaque est tirée verticalement d'un container à vitesse constante (figure 3.11). Le modèle de Landau-Levich décrit la dynamique du ménisque pour trouver une relation entre la vitesse de retrait et l'épaisseur du film déposée sur la plaque :

$$e = 0.94\kappa^{-1}Ca^{2/3} \tag{3.8}$$

Où κ^{-1} est la longueur capillaire qui représente la longueur caractéristique résultant de la compétition entre les forces capillaires et la force gravitationnelle :

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\gamma}{\rho g}} \tag{3.9}$$

Où γ est la tension de surface, ρ est la densité du liquide et g est l'accélération gravitationnelle.

Ca est le nombre capillaire qui représente l'effet relatif entre les forces visqueuses et les forces capillaires :

$$Ca = \frac{\eta v}{\gamma} \tag{3.10}$$

Où η est la viscosité du liquide et v représente ici la vitesse de la plaque.

Dans ce modèle, l'épaisseur du film est calculée à partir de l'équation différentielle décrivant l'hydrodynamique de la partie dynamique du ménisque.

Dans la situation décrite par Landau, le liquide est retenu dans le container par la gravité. Dans notre cas, le substrat est horizontal et la gravité ne peut pas retenir le liquide, mais au contraire tend à étaler la goutte sur le substrat. La

force qui retient la goutte sous le pinceau provient de la pression capillaire due au confinement des ménisques. Bien que l'origine de cette force soit différente, le problème peut être décrit de manière similaire. En effet, dans le modèle de Landau, l'hydrodynamique du ménisque est traitée en négligeant la gravité et la solution de l'équation différentielle est liée au reste du problème à travers la courbure du ménisque à la frontière entre la partie dynamique du ménisque et sa partie statique. Ce raccordement peut être résumé par la relation [145] :

$$C = 1.34\frac{Ca^{2/3}}{e} \tag{3.11}$$

Où C est la courbure locale à la frontière. En utilisant cette relation, on peut déduire l'épaisseur du film déposé dans notre géométrie si l'on connaît la courbure du ménisque à sa ligne de contact dans la situation statique. Le paragraphe suivant traite ce problème.

Ménisque statique

Avant le dépôt, une goutte de solution de phospholipide est déposée entre le pinceau et le substrat. La tension présente à la surface de la goutte tend à minimiser sa surface de contact avec l'air. Ainsi, la goutte vient s'aligner sous l'arête du pinceau la plus proche du substrat, minimisant ainsi la surface du ménisque. Pour cette raison, le pinceau doit avoir une légère inclinaison de manière à ce que l'arête du côté du dépôt soit l'arête la plus proche du substrat. Une fois la position de la goutte fixée, la forme du ménisque est alors régie par la loi de Laplace :

$$P = \frac{\gamma}{R} \tag{3.12}$$

Où γ est la tension de surface, P est la pression locale à l'intérieur de la goutte relativement à la pression atmosphérique et R est le rayon de courbure local du ménisque que l'on peut lier à la courbure par la relation $C = 1/R$.

A l'équilibre, la pression dans la goutte est uniforme, hormis sa composante hydrostatique. La pression peut donc s'exprimer à une hauteur z comme :

$$P = P_g - \rho g z \tag{3.13}$$

Où P_g est la pression à la base de la goutte relativement à la pression extérieure, ρ est la densité du liquide et g est l'accélération gravitationnelle. En remplaçant cette expression de P dans (3.12), on obtient l'équation :

$$C = \frac{P_g}{\gamma} - \frac{z}{\kappa^{-2}} \tag{3.14}$$

Où C est la courbure et κ^{-1} est la longueur capillaire définie par (3.9).

Comme le ménisque avant est accroché sur un angle, sa forme n'est pas contrainte et peut prendre différentes géométries à l'équilibre en fonction de la pression dans la goutte. Cette pression est alors définie par les contraintes imposées sur le ménisque arrière (figure 3.12). En exprimant la courbure de ce ménisque en coordonnées cartésiennes, (3.14) se réécrit :

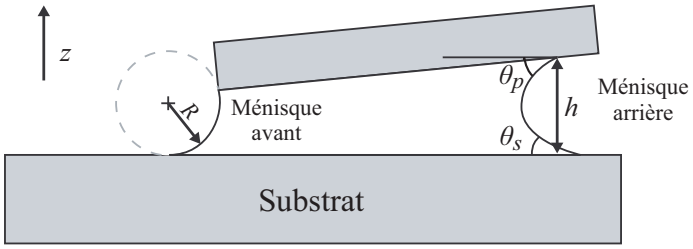


FIGURE 3.12 – Ménisque statique.

$$\frac{P_g}{\gamma} - \frac{z}{\kappa^{-2}} = -\ddot{z}(1+\dot{z}^2)^{-\frac{3}{2}} \tag{3.15a}$$

$$\frac{P_g}{\gamma} - \frac{z}{\kappa^{-2}} = \ddot{z}(1+\dot{z}^2)^{-\frac{3}{2}} \tag{3.15b}$$

Pour la partie inférieure et la partie supérieure du ménisque respectivement. La frontière entre les deux parties étant le point où la surface du ménisque est verticale. En intégrant ces deux équations, on obtient :

$$\frac{P_g}{\gamma} z - \frac{1}{2\kappa^{-2}} z^2 + Cte = (1+\dot{z}^2)^{-\frac{1}{2}} \tag{3.16a}$$

$$\frac{P_g}{\gamma} z - \frac{1}{2\kappa^{-2}} z^2 + Cte = -(1+\dot{z}^2)^{-\frac{1}{2}} \tag{3.16b}$$

Les constantes peuvent être déterminées en utilisant les conditions aux limites aux lignes de contact, c'est-à-dire l'angle de contact θ_s du liquide sur le substrat et l'angle de contact θ_p du liquide sur le pinceau ($\dot{z} = -\tan\theta_s$ pour $z = 0$ et $\dot{z} = \tan\theta_p$ pour $z = h$). (3.16) devient alors :

$$\frac{P_g}{\gamma} z - \frac{1}{2\kappa^{-2}} z^2 + \cos\theta_s = (1+\dot{z}^2)^{-\frac{1}{2}} \tag{3.17a}$$

$$\frac{P_g}{\gamma}(z-h) - \frac{1}{2\kappa^{-2}}(z^2-h^2) - \cos\theta_p = -(1+\dot{z}^2)^{-\frac{1}{2}} \tag{3.17b}$$

On détermine P_g par la différence entre (3.17a) et (3.17b) au point de raccord entre les deux équations. Ce point correspond à l'endroit où la tangente au ménisque est verticale ($\dot{z} \to \infty$) :

$$P_g = \frac{\gamma}{h}\left(\frac{h^2}{2\kappa^{-2}} - \cos\theta_p - \cos\theta_s\right) \tag{3.18}$$

Ce qui nous permet d'obtenir à partir de (3.14) et (3.18) l'expression de la courbure du ménisque en fonction de z :

$$C = \frac{h}{2\kappa^{-1}} - \frac{\cos\theta_p + \cos\theta_s}{h} - \frac{z}{\kappa^{-2}} \tag{3.19}$$

Ménisque dynamique

En utilisant l'expression de la courbure de l'équation (3.19), on obtient à partir de l'équation (3.11) une expression de l'épaisseur du film de liquide déposé :

$$e_{liq} = 1,34 \frac{h}{\cos\theta_p + \cos\theta_s - \frac{h^2}{2\kappa^{-2}}} Ca^{2/3} \tag{3.20}$$

Qui correspond au dépôt d'un film de matière sèche d'épaisseur :

$$e_{sec} = \frac{MwC}{\rho} e_{liq} \tag{3.21}$$

Où M_w est la masse molaire de la molécule en solution, C est sa concentration et ρ est la densité de la matière sèche. Ce régime de Landau-Levich domine lorsque la quantité de solvant tiré par le substrat est plus grande que la quantité de solvant qui s'évapore, c.-à-d. lorsque la relation suivante est vérifiée :

$$\frac{h}{\left(2 - \frac{h^2}{2\kappa^{-2}}\right)} \frac{\eta^{2/3} v^{5/3}}{\gamma^{2/3} Q_{évap}} > 1,34 \tag{3.22}$$

Aux vitesses intermédiaires, un film de liquide préconcentré par l'évaporation est tiré par le substrat, ce qui dépose un film sec plus épais que celui prévu par les équations (3.20) et (3.21).

Caractérisation

Une goutte de phospholipide est tirée sur le substrat de silicium à une vitesse constante v, à température contrôlée et à convection forcée contrôlée. A basse vitesse ($v < v^*$), un film de phospholipide est déposé derrière le ménisque. Pour $v > v^*$, un film liquide est tiré par le substrat, formant un film de phospholipide sec après évaporation du solvant. La figure 3.13 montre l'épaisseur du film déposé en fonction de la vitesse (l'épaisseur est mesurée pour chaque vitesse par ellipsométrie).

Méthode

Toutes les expériences présentées par la suite ont été réalisées à 27°C avec une solution de phospholipides composée à 98% de DOPC et 2% de NBD-PC (Aventi Polar Lipids) dissous dans du n-octane (Sigma) à une concentration de 20 mg/mL, à l'exception des points verts de la figure 3.13 (12 mg/mL). Tous les dépôts ont été réalisés sur des substrats de silicium [100] dopé Bore 1-10 Ω.cm (Siltronix). Les substrats sont clivés pour obtenir la taille désirée et utilisés tels quels après un simple rinçage à l'acétone et à l'isopropanol.
Après avoir placé le substrat sur l'appareil, le pinceau est positionné à la hauteur voulue et une goutte de 40 µL de solution de phospholipide est injectée entre le substrat et le pinceau à l'aide d'une pipette. Ensuite, le programme de dépôt est lancé le plus vite possible pour minimiser l'évaporation du ménisque avant le dépôt. Avant chaque dépôt, une étape de pré-dépôt est réalisée pour éviter les artefacts dus à l'évaporation du ménisque avant le lancement du programme (dépôt de 7 mm à 1 mm/s).

On peut voir sur la courbe de la figure 3.13A que l'épaisseur e présente un minimum aux environs de la vitesse v^* qui sépare les deux régimes. Un ajustement sur une loi $e = Av^\alpha$ a été réalisé sur les données expérimentales

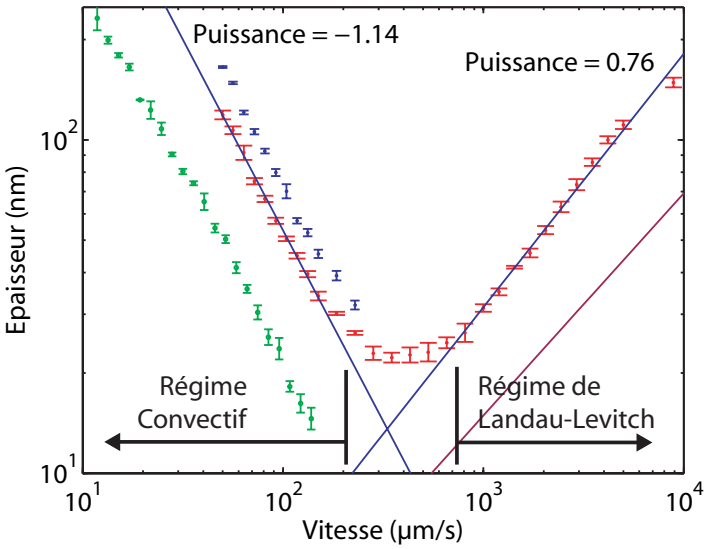


FIGURE 3.13 – Epaisseur du film déposé en fonction de la vitesse de dépôt. DOPC 20 mg/mL in C_8H_{18}. en rouge : $d = 0{,}75$ mm, $\Phi_{conv} = 0{,}5$ sccs, en vert : $d = 0{,}3$ mm, $\Phi_{conv} = 0{,}5$ sccs, en bleu : $d = 0{,}75$ mm, $\Phi_{conv} = 3{,}5$ sccs

pour les deux régimes. Cet ajustement indique que l'épaisseur e du film varie comme $e \propto v^{-1,1}$ et $e \propto hv^{0,76}$ pour $(v < v^*)$ et $(v > v^*)$ respectivement. La figure 3.13B montre que pour $v < v^*$, la même dépendance à la vitesse est observée ($e \propto v^\alpha$ avec $\alpha \approx 1,1$) quelles que soient les conditions expérimentales. En revanche, le pré-facteur augmente avec une augmentation de la convection forcée (points bleus) et diminue pour une hauteur de ménisque plus petite et une concentration plus faible (points verts). Pour toutes les conditions décrites ici, l'épaisseur du film est homogène à l'échelle macroscopique (typiquement $\pm 3\%$). Tous ces résultats montrent que l'épaisseur du film peut être contrôlée avec une bonne précision entre approximativement 20 nm et 200 nm en changeant simplement la vitesse de dépôt v. Ceci est illustré par la figure 3.13C qui montre le dépôt d'un film sur un substrat en augmentant la vitesse de dépôt par palier.

Ces résultats expérimentaux mettent en évidence les deux régimes de dépôts attendus théoriquement dans les paragraphes précédents.

A basse vitesse $(v < v^*)$, le régime d'évaporation domine. Les données expérimentales donnent un exposant de v ($\alpha \approx v^{-1.1}$) en bon accord avec le modèle présenté à la page 147 (équation 3.7) qui prédit une épaisseur déposée $e \propto v^{-1}$. De plus, l'estimation de $Q_{évap}$ à partir des ajustements sur l'équation 3.7 (figure 3.13B) montre que $Q_{évap}$ suit l'évolution attendue lorsqu'on varie la hauteur du ménisque d et le flux de convection ϕ_{conv} (Table 3.1) : lorsque d diminue, la vitesse d'évaporation du ménisque diminue ($Q_{évap}$ diminue) car sa surface diminue et lorsque l'on augmente le flux de convection ϕ_{conv}, le ménisque s'évapore plus vite ($Q_{évap}$ augmente).

A haute vitesse $v > v^*$, le régime Landau-Levich domine. Les données expérimentales donnent un exposant de v ($\alpha \propto v^{0,76}$) qui est également en bon

Table 3.1 – paramètres α (exposant de v) et Q_{evap} (flux d'évaporation 2D) déterminé par ajustement des données expérimentales (figure 3.13B) pour différentes valeurs de la hauteur du ménisque d et de flux de convection Φ_{conv}

d (mm)	Φ_{conv} (sccs)	α	$Q_{évap}$ ($\mu m^2/s$)
0,75	0,5	-1,14	273
0,75	3,5	-1,18	372
0,3	0,5	-1,14	128

accord avec le modèle de Landau-Levich présenté à la page 151 (équation 3.20 et 3.20) qui prévoit une épaisseur déposée $e \propto v^{2/3}$. la courbe en pointillés sur la figure 3.13 représente l'équation 3.20 en utilisant les paramètres physiques du n-octane pour η, γ (valeurs de Guena *et al.* [23]) et ρ (donnée Sigma). Une différence significative est observée pour le pré-facteur, qui est approximativement 2,3 fois supérieur pour l'expérience. Cette augmentation de la quantité de matière déposée pourrait être due à un effet Marangoni solutal à la surface du ménisque. En effet, comme nous l'avons fait remarquer pour le régime d'évaporation, l'évaporation du solvant est responsable de la concentration de la matière en direction de la ligne de contact. Ce gradient de concentration est responsable d'un flux de liquide par effet Marangoni en direction de la ligne de contact [174].

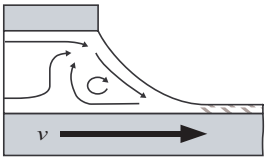


Figure 3.14 – Schéma des flux observés dans le ménisque après ajout de particules dans la solution.

En ajoutant des particules dans la solution, nous avons pu observer expérimentalement un flux qui prenait la forme d'un vortex sous le ménisque dont la vitesse pouvait atteindre plusieurs millimètres par seconde à la surface du ménisque (figure 3.14). Dans le cas de tensioactif dans l'eau, cet effet est connu comme pouvant être responsable d'un facteur d'épaississement de la loi de Landau-Levich de 1 à 2,5 [175].

Organisation microscopique du film

La figure 3.15 montre l'organisation microscopique respective des films obtenus pour le régime de Landau-Levich et le régime d'évaporation par microscopie en fluorescence (voir chapitre 3.2.4).

Pour les deux régimes, on observe une organisation stratifiée avec une hauteur de marche caractéristique de 5 ± 1 nm, qui correspond à l'épaisseur d'une bicouche de phospholipide. La hauteur de ces marches est en accord avec les observations réalisées en utilisant d'autres techniques d'observation comme l'AFM

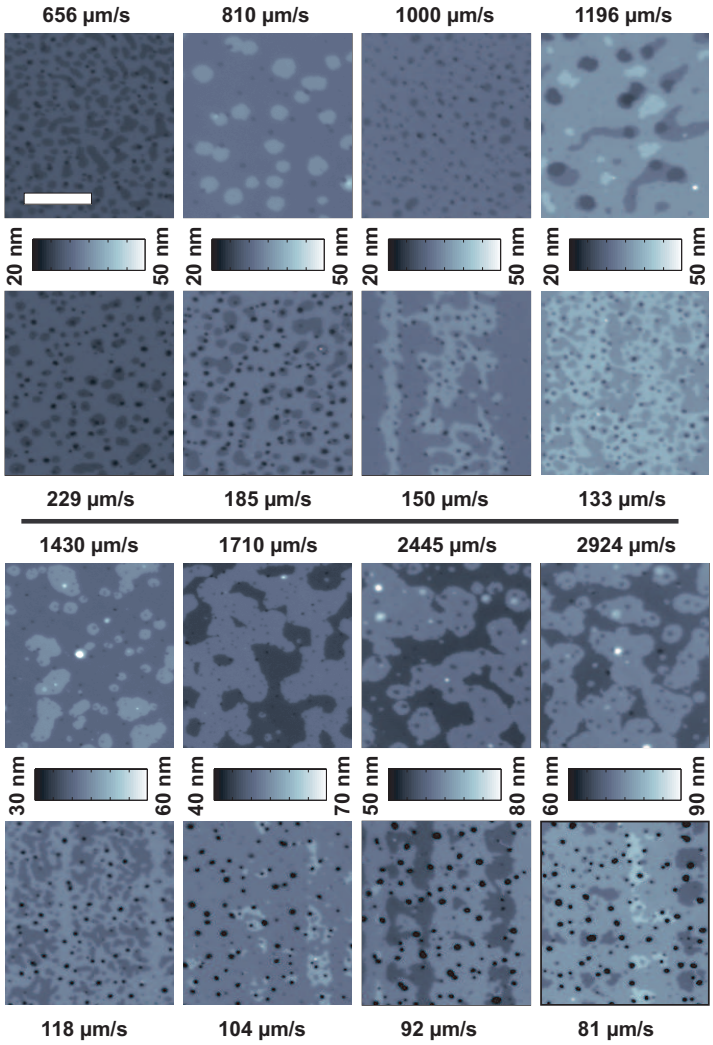


FIGURE 3.15 – Comparaison de l'organisation microscopique du film pour différentes épaisseurs. Pour chaque paire d'images : en régime Landau-Levich en bas, en régime convectif en haut. Mêmes conditions que la courbe rouge sur la fig. 3.13

[148] ou la microscopie en réflexion (voir chapitre 3.2.3) et indique que le film est organisé en une multicouche sur le substrat de silicium [146]. Dans la plupart des cas, la variation de l'épaisseur du film ne dépasse pas l'épaisseur d'une bicouche sur toute la surface d'une image (800 µm x 600 µm) ce qui montre la bonne homogénéité du film à l'échelle micrométrique (figure 3.16).

En revanche, chacun des deux régimes présente une organisation spécifique. Quelle que soit la vitesse v de dépôt, les films obtenus dans le régime de Landau-Levich présentent de larges zones d'épaisseur homogène contenant quelques défauts d'épaisseur plus importante (points blancs). Au contraire, les films obtenus dans le régime d'évaporation sont composés de petits domaines contenant de nombreux défauts de plus faible épaisseur (points noirs). Si l'on mesure le profil de ces défauts (inserts sur la figures 3.16A-B) ou que l'on analyse l'histogramme des images (figures 3.16C), on peut en conclure qu'ils représentent une variation d'épaisseur d'au moins 20 nm sur une distance caractéristique de 8 µm pour les points blancs comme pour les points noirs. Malheureusement, la résolution et la dynamique de la méthode de mesure ne sont pas suffisantes pour pouvoir décider de la morphologie exacte de ces défauts.

Par contre, nous avons remarqué que l'organisation du film est fortement altérée par l'humidité relative de l'air comme l'avaient déjà remarqué Spangenberg *et al.* [148] ou de sa concentration en solvant. Si le RH augmente (ou la concentration en solvant), le film gonfle et les trous disparaissent, ou de nouvelles couches apparaissent à la surface du film. Au contraire, si le RH ou la concentration en solvant dans l'air baisse, le film se rétracte et les trous grandissent, ou de nouveaux trous apparaissent dans le film. Dans une gamme de variations raisonnables de concentration en eau ou en solvant, les transformations subies par le film sont réversibles et les défauts apparaissent toujours aux mêmes emplacements. Ces observations tendent à montrer que la présence de ces défauts est inhérente à la fabrication du film, mais sont nucléés par un phénomène étranger à l'organisation moyenne de la membrane, peut-être par la présence de particules ou d'une organisation interne particulière de la structure lamellaire. Au-delà de l'origine de ces points de nucléation, les différences d'organisation du film entre les deux régimes pourraient trouver leur origine dans la différence de la dynamique de séchage du film. En effet, le séchage du film est plus lent dans le régime d'évaporation, à cause de la proximité du ménisque. L'observation du film lors du dépôt a montré que, dans le régime d'évaporation, le séchage complet du film était effectif à une distance d'approximativement 1 mm du ménisque. Le temps nécessaire pour atteindre cette position est généralement de plusieurs secondes ce qui doit permettre au film d'atteindre un état stable avant l'évaporation complète du solvant. Comme la surface spécifique par molécule dépend de la présence de solvants, le film se rétracte à la fin du processus de séchage. Si aucune réorganisation n'est possible entre les couches de phospholipides, cela mène à la formation de trous.

Ces variations d'organisation pourraient mener à la modification des propriétés du film. Une meilleure compréhension de l'organisation de ces films, de leur contrôle et de leurs propriétés pourrait trouver des applications intéressantes non seulement pour la fabrication des vésicules, mais aussi pour la fabrication de biocapteurs à partir de biomembranes.

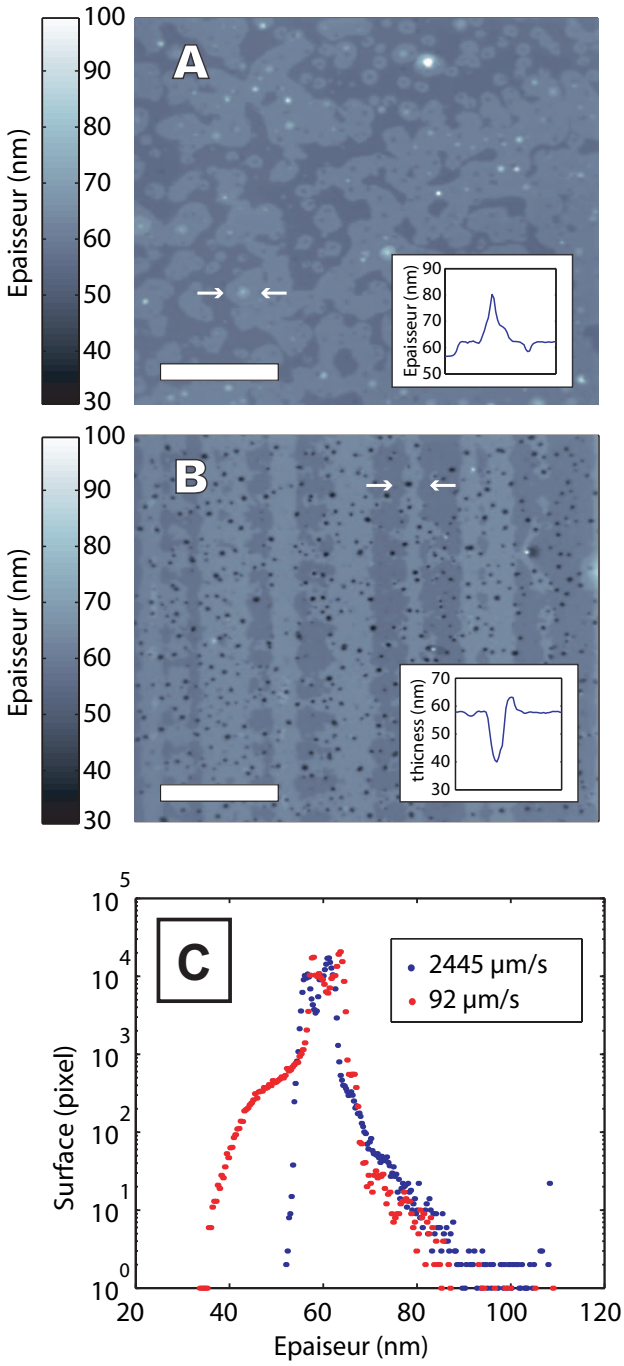


FIGURE 3.16 – Comparaison de l'organisation microscopique du film entre les deux régimes. A) En Landau-Levich (2445 µm/s). B) En convectif (92 µm/s). Les inserts indiquent le profil des défauts marqués par les flèches blanches. C) Comparaison de la distribution des épaisseurs sur les images. Mêmes conditions que la courbe rouge sur la fig. 3.13.

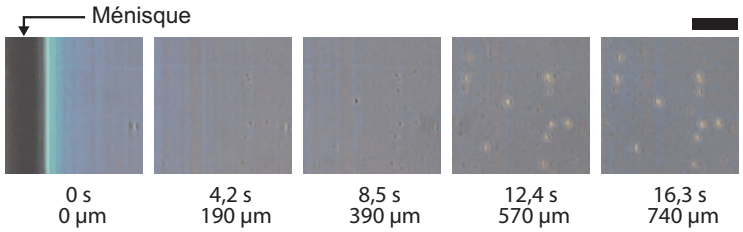


Figure 3.17 – Apparition des défauts en régime d'évaporation. Lors du dépôt, les trous dans le film n'apparaissent pas immédiatement. Cette série d'images montre l'apparition des défauts sur une zone donnée lorsqu'elle s'éloigne du ménisque. Sous les images sont indiqués le temps après passage du ménisque et la distance de l'image au ménisque. La barre représente 100 µm. EPC 12 mg/mL in C_8H_{16}, 25°C, 45 µm/s.

impédance

En complément des observations microscopiques, nous avons mesuré l'impédance de l'interface silicium/film/électrolyte pour caractériser la qualité des films déposés à l'échelle de la membrane. Ce type de mesure a déjà été utilisé pour caractériser la qualité de membranes supportées, et notamment la densité de défauts dans la membrane [165, 138]. Nous proposons ici d'étendre les modèles utilisés pour les membranes supportées à des multicouches de phospholipides pour quantifier la quantité de défauts de ces structures.

Caractérisation.

Nous avons mesuré avec le montage illustré sur la figure 3.18B les spectres en impédance d'une série de film de 10, 20, 28 et 100 couches d'épaisseur respectivement. Toutes les mesures ont été réalisées à polarisation nulle pour des fréquences allant de 1 à 10^4 Hz. Les spectres obtenus sont présentés en figure 3.18C. L'impédance du silicium natif a montré un spectre caractéristique d'une simple capacité. L'ajustement sur la l'expression $Z = 1/jC\omega$ donne une capacité de 0,29 µF/cm^2. Pour toute la série d'épaisseurs mesurées, l'impédance à haute fréquence augmentait avec l'augmentation du nombre de couches déposées. A basse fréquence, l'impédance était peu modifiée jusqu'à 20 couches d'épaisseur, mais au-delà, elle baissait rapidement jusqu'à des valeurs de plus d'un ordre de grandeur en dessous de l'impédance de l'électrode seule.

La valeur de la capacité de l'électrode seule était assez faible en comparaison de celles des électrodes en silicium généralement utilisées pour ce type de caractérisation (1,4 µF dans [165]). Ceci s'explique par le fait que l'électrode semi-conductrice utilisée était faiblement dopée. La jonction silicium/électrolyte étant en régime de déplétion à polarisation nulle [165], (dans cette situation, les porteurs majoritaires dans le silicium (trous) sont repoussés par l'interface) une zone de charge d'espace isolante vient s'ajouter à l'épaisseur de la couche d'oxyde pour former la capacité de la jonction. L'épaisseur de cette zone isolante étant d'autant plus élevée que le silicium est faiblement dopé, la capacité de l'interface en régime de déplétion peut donc être beaucoup plus faible que la capacité de la couche d'oxyde seul [176]. Cette forte impédance de l'électrode masque l'impédance du film ce qui explique les faibles variations d'impédance observées

en comparaison de l'électrode seul.

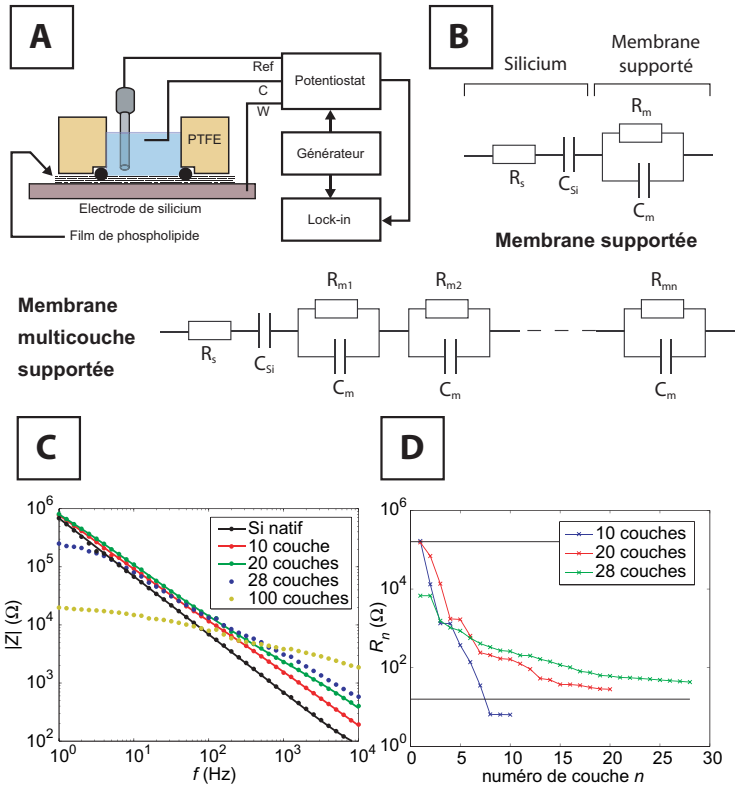


FIGURE 3.18 – Impédance mesurée des structures multicouches déposées en Landau-Levitch. A) Schéma de la mesure : Le film, déposé sur une électrode en silicium, est recouvert d'une cellule en PDMS remplie par l'électrolyte (solution de HEPES 50 mM + 100 mM NaCl). Le spectre d'impédance est mesuré à l'aide d'un amplificateur synchrone (Lock-in) détectant le courant mesuré par un potentiostat commandé par un générateur. Le tout est contrôlé par ordinateur. B) Schéma électrique équivalent d'une membrane supportée par une électrode de silicium (haut) [165] et modèle extrapolé pour une membrane comportant plusieurs couches de phospholipides (bas).

Méthode

Cellule de mesure. La cellule de mesure est réalisée avec un bloc de téflon contenant un trou de 1 cm qui définit la surface de mesure (0,79 cm)^2 et contenant un joint pour l'étanchéité. Deux petits trous on été réalisés dans le bloc pour placer l'électrode de référence (Leak-Free Reference Electrode 690053 (Ag/AgCl), Harvard Apparatus) et la contre-électrode (fil de platine) Ce bloc est fixé sur le substrat de silicium à l'aide de pinces puis rempli par l'électrolyte pour la mesure.
Mesure. La mesure est réalisée avec un potentiostat analogique « fait maison » dont le potentiel est imposé par un générateur de fonction (Agilent 33220A). Le signal du courant provenant du potentiostat est comparé au potentiel appliqué par un détecteur synchrone (Stanford Research Systems SR530) (figure3.18). Le tout est contrôlé par ordinateur à travers l'interface Matlab pour obtenir les spectres d'impédance.
Films et solution. Les films mesurés sont obtenus par la méthode du retrait de ménisque en régime de Landau-Levich (voir chapitre 3.3.3). L'électrolyte utilisé était une solution de 10 mM de HEPES contenant 50 mM de NaCl (pH 7,5).

Modélisation.

Comme l'illustre la figure 3.18B, le schéma électrique d'une membrane en solution est constitué d'une capacité C_m, qui dépend principalement de l'épaisseur de la membrane, en parallèle avec une résistance R_m, qui dépend de la conductivité naturelle de la membrane et de sa densité de défaut [165]. Lorsque cette membrane est supportée sur une électrode, l'impédance de l'interface électrode/électrolyte vient s'ajouter en série avec celle de la membrane. Cette seconde impédance est également composée d'une capacité C_i et d'une résistance R_i en parallèle, cette dernière étant généralement négligeable par rapport au reste du circuit si les conditions de polarisation de l'interface ne font pas intervenir de réactions électrochimiques. Il peut être nécessaire de prendre en compte la résistance de l'électrode et de l'électrolyte R_s, mais ces résistances étaient négligeables dans notre cas.

La mesure du spectre d'impédance de la structure complète permet de mesurer, par ajustement sur le modèle, la capacité C_m et résistance R_m de la membrane. Cette résistance décroît si le nombre de défauts augmente.

Pour un film contenant plusieurs couches de phospholipides, on peut s'attendre à obtenir une impédance totale contenant un ensemble d'impédances élémentaires de membranes en série (figure 3.18B). Les impédances élémentaires ont alors toutes la même capacité C_m et une résistance R_{mi} qui dépend de la quantité de défauts contenus dans la couche i. L'impédance totale Z de la structure peut alors s'exprimer en fonction de la fréquence telle que :

$$Z = \frac{1}{jC_{si}\omega} + \sum_{i \leqslant n} \frac{R_{mi}}{1 + R_{mi}C_m j\omega} \tag{3.23}$$

De la même manière, un ajustement sur la mesure devrait permettre de retrouver les différents paramètres de cette expression en connaissant le nombre de couches contenues dans le film. Pour les films ayant peu de couches ($n \leq 28$), nous avons réalisé un tel ajustement [1] en fixant les valeurs de C_{si} à la

1. L'ajustement a été réalisé sur le module de la fonction de transfert en utilisant l'algorithme itératif de Levenberg-Marquardt implémenté dans la toolbox « curve-fitting » de Matlab.

valeur mesurée pour le silicium seul et C_m à la valeur de 0,71 $\mu F/cm^2$, mesurée dans [165]. La figure 3.18D montre la série des résistances R_{mi} obtenues. On peut tout de suite remarquer que ces distributions ne sont pas superposables et que le nombre de défauts de chaque couche dépend de l'épaisseur totale. Si le modèle est cohérent, un film contient plus de couches de forte résistivité dans l'absolu, mais relativement plus de couches de faible résistivité. Toutefois, pour confirmer ce modèle, il faudrait d'une part faire l'expérience avec un nombre plus faible de couches pour confirmer la nature discrète de l'évolution de l'impédance avec le nombre de couches, et d'autre part faire des expériences témoins en induisant artificiellement des défauts ou en mesurant la densité de défauts par une autre méthode (par exemple EPR ou RMN) pour confirmer que la forme caractéristique des spectres obtenus provient bien de la variation de résistivité des couches individuelles de phospholipide.

Pour les spectres obtenus avec les épaisseurs importantes ($n \geq 28$), ce modèle, ainsi que n'importe quel modèle n'impliquant qu'un ensemble de résistances et de condensateurs en série avec l'électrode, n'est plus applicable. En effet, pour que l'impédance de la structure passe en dessous de l'impédance de l'électrode seule aux basses fréquences, soit l'impédance de l'électrode est perturbée par la présence du film, soit l'impédance du film est négative dans cette gamme de fréquences. Nous n'avons pu élucider l'origine de ce comportement étrange.

Les résultats de ce modèle sont à prendre avec précaution car aucune expérience témoin ne permet d'en confirmer la pertinence. Mais nous avons montré que cette méthode de caractérisation par spectroscopie d'impédance de films de phospholipide multicouches pouvait donner des informations sur la structure intime du film. Mieux comprise, elle pourrait offrir un outil intéressant de test de la qualité de ce type de film et d'un point de vue plus fondamental, pourrait permettre d'obtenir des informations sur l'évolution de l'organisation interne des structures multicouches dans des phénomènes tels que l'électroformation.

Stabilité du dépôt

Toutes les observations décrites auparavant ont été obtenues en utilisant du n-octane comme solvant qui est en situation de mouillage total avec le substrat de silicium. Nous avons remarqué qu'en utilisant un solvant en situation de mouillage partiel avec le substrat, par exemple le chloroforme, aucun dépôt n'était obtenu dans le régime d'évaporation dans la plupart des conditions (dans certains cas extrêmes néanmoins, un dépôt instable a pu être observé) Cette observation explique les démouillages que nous observions lors de nos premiers dépôts à l'aide d'une pipette sur les substrats de silicium fonctionnalisés (voir chapitre 2.2.3) et indique qu'il est préférable que le solvant soit en situation de mouillage total sur le substrat pour obtenir des dépôts de qualité, même en régime Landau-Levich, pour éviter les effets de bord ou la nucléation de trous dans le film à partir de défauts.

En situation de mouillage total, le film déposé est stable et d'épaisseur homogène uniquement dans certaines conditions. A faible concentration ($<$ 10 mg/mL), ou à haute température ($>$30°C), la ligne de contact du ménisque devient instable et des motifs en forme de bandes parallèles à la ligne de contact sont formés. Ce phénomène est similaire à celui observé avec des solutions de polymère [20] et sera étudié plus en détail par la suite. A faible température, c.-à-d. significativement plus faible que la température ambiante, l'épaisseur du

film devient très inhomogène et anormalement importante. Cela peut s'expliquer par la condensation d'eau provenant de l'humidité de l'air sur le ménisque comme l'a déjà observé Malaquin *et al.* [19]. Il est donc possible de déposer un film uniforme en utilisant le n-octane comme solvant dans les conditions assez restrictives énoncées ci-dessus. Ces conditions changent d'un solvant à l'autre et ne sont pas toujours reproductibles (il semble que le taux d'humidité dans l'air ait également son importance). Le dépôt de film uniforme en régime d'évaporation nécessite donc des précautions importantes relatives aux conditions de dépôt. Ceci explique peut être qu'aucune publication à notre connaissance ne relate cette méthode de dépôt.

3.3.4 Dépôt de motifs par instabilité de mouillage

A plus faible concentration, le dépôt de phospholipide sur les galettes de silicium n'est pas uniforme et des instabilités spatiotemporelles apparaissent sur la ligne de contact. Les instabilités observées dépendent fortement l'ensemble des conditions expérimentales, c.-à-d de la concentration, la température, la vitesse de dépôt, la hauteur du ménisque, la nature du solvant, etc.

Pour clarifier les conditions de ces instabilités, nous les avons classées les unes par rapport aux autres.

En supposant que le dépôt du film respecte toujours le bilan de matière du modèle présenté pour les films uniformes (équation 3.7 page 147), on peut représenter pour une épaisseur donnée, l'ensemble des conditions expérimentales sur un espace à deux dimensions coordonné par la concentration et le produit $v.Q_{evap}$. Nous pouvons alors placer les instabilités observées sur ce diagramme de phase. La figure 3.19 montre approximativement la position des différentes instabilités observées lors de nos expériences sur un tel diagramme de phase et la figure 3.20 montre des images typiques de microscopie en réflexion de ces instabilités. Toutes les instabilités ne peuvent être obtenues pour un solvant donné car la variation de la vitesse d'évaporation sur une large gamme implique l'utilisation de différents solvants ayant différents paramètres d'évaporation. Le diagramme de phase est donc donné à titre indicatif pour donner la position relative des instabilités les unes par rapport aux autres, mais il n'est pas représentatif du comportement du dépôt pour un solvant donné.

En observant le comportement du ménisque lors du dépôt, certains comportements caractéristiques du ménisque ressortent derrière l'apparente complexité du diagramme de phase présenté. La figure 3.21 en donne une représentation schématique. Le comportement du ménisque peut être divisé en deux régimes distincts : i) à forte concentration, le dépôt apparaît directement à partir de la ligne de contact ; ii) à faible concentration, un film ultrafin vient s'intercaler entre le film déposé et la ligne de contact du ménisque.

A forte concentration de phospholipide ($C \gtrsim 1$ mg/mL)

Nous avons déjà vu qu'à très forte concentration ($C \gtrsim 10$ mg/mL), il était possible d'obtenir des films uniformes (figure 3.21A et 3.20E). Dans certaines conditions, par exemple si la température est élevée ou pour des solvants s'évaporant facilement, le dépôt n'est pas uniforme et des bandes de plus fortes épaisseurs, orientées dans la direction de déplacement du dépôt, sont présentes sur le film (nous avons observé ces instabilités pour le chloroforme, le pentane, l'hexane

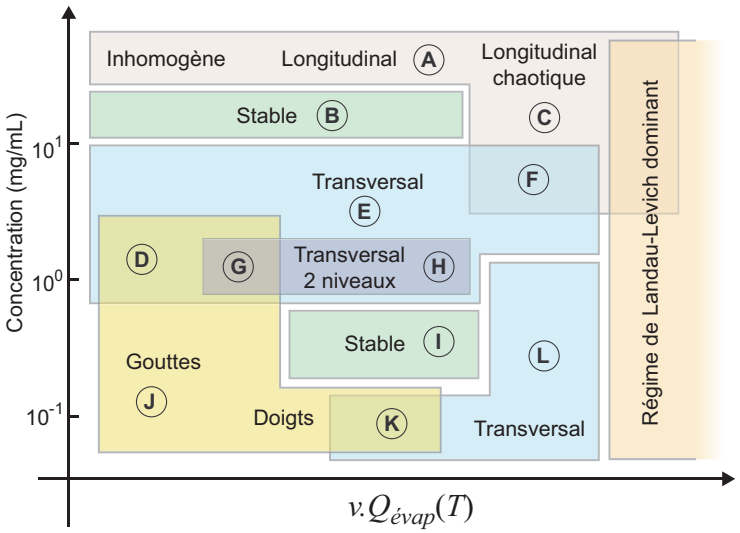


FIGURE 3.19 – Diagramme de phase des instabilités de mouillage en fonction de la concentration de phospholipide dans le solvant et du produit de la vitesse de dépôt et de la vitesse d'évaporation. Ce diagramme est donné à titre indicatif pour positionner les instabilités les unes par rapport aux autres. Il a été construit par le recollement d'expériences effectuées sur plusieurs solvants, toutes les instabilités n'apparaissant pas pour un solvant donné. La position des frontières indiquées ici est approximative et peut varier fortement d'un solvant à l'autre.

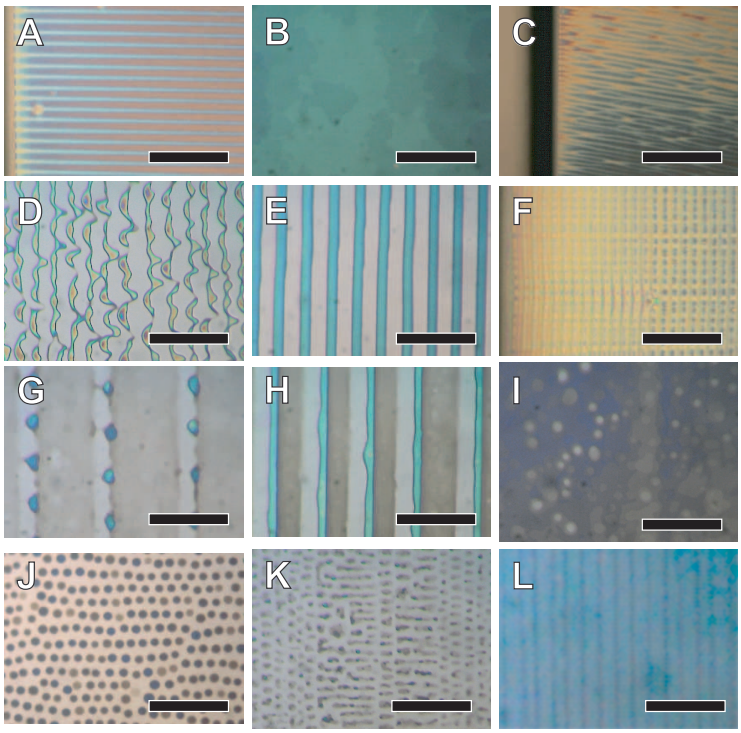


Figure 3.20 – Images typiques de microscopie en réflexion des instabilités rencontrées. Conditions de concentration, solvant, température et vitesse de dépôt : A)EPC 25 mg/mL, Chloroforme, 15°C, 540 µm/s (barre 250 µm) B) EPC 12 mg/mL, Octane, 25°C, 20 µm/s (barre 50 µm) C) EPC 25 mg/mL, Chloroforme, 25°C, 1000 µm/s (barre 250 µm) D) EPC 1 mg/mL, heptane, 40°C, 30 µm/s (barre 50 µm) E) EPC 12 mg/mL, nonane, 40°C, 20 µm/s (barre 50 µm) F) EPC 25 mg/mL, Chloroforme, 10°C, 150 µm/s (barre 250 µm) G) EPC 1 mg/mL, heptane, 40°C, 40 µm/s (barre 50 µm) H) EPC 1 mg/mL, heptane, 40°C, 50 µm/s (barre 50 µm) I) EPC 1 mg/mL, heptane, 30°C, 25 µm/s (barre 50 µm) J) EPC 12 mg/m, décane, 48°C, 35 µm/s (barre 50 µm) K) EPC 0,1 mg/mL, heptane, 20°C, 10 µm/s (barre 50 µm) L) EPC 1 mg/mL, heptane, 40°C, 200 µm/s (barre 20 µm)

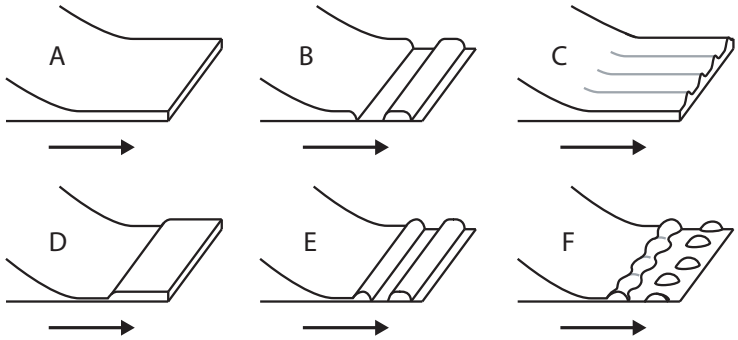


FIGURE 3.21 – Schéma illustrant les différents régimes caractéristiques de dépôt. A forte concentration, le film est formé directement à partir de la ligne de contact (A-C). Le dépôt peut être continu (A), discontinu (B) ou d'épaisseur inhomogène (C). A faible concentration, un film ultramince vient s'intercaler entre la ligne de contact et le film déposé (D-F). Le film déposé peut également être continu (D), mais aussi discontinu (E) ou instable (F).

et l'heptane). Le plus souvent, leur organisation est chaotique (figure 3.20C) ou dendritique, et dans de plus rares situations, des bandes bien parallèles peuvent être obtenues (observé uniquement pour le chloroforme), figure 3.20A).

Pour des concentrations intermédiaires ($1 \lesssim C \lesssim 10$ mg/mL), le dépôt devient discontinu (figure 3.21B), menant à la formation de motifs de phospholipide en forme de bandes transverses à la direction de dépôt (figure 3.20E). Nous avons observé cette instabilité pour tous les solvants testés. Lorsque la vitesse de dépôt est très lente, les bandes obtenues ont tendance à être latéralement inhomogènes (figure 3.20E) et peuvent former, à faible concentration, des gouttes régulières (figure 3.20G). Cette instabilité peut également se coupler avec les instabilités longitudinales pour des vitesses de dépôt élevées et à vitesse d'évaporation élevée (figure 3.20C).

En faisant varier la vitesse de dépôt dans la gamme de conditions où apparaissent ces instabilités, nous avons pu observer que l'épaisseur des bandes déposées ne variait pas (la couleur de la lumière réfléchie par les bandes observée par microcopie en réflexion ne variait pas). Nous avons alors mesuré par analyse d'image les caractéristiques géométriques de ces bandes, ce qui nous a permis de constater que la période des bandes variait peu (figure 3.22B) mais que la largeur des bandes diminuait avec la vitesse de dépôt (figure 3.22C). Pour vérifier que le comportement du dépôt respecte le modèle des films uniforme (équation 3.7 page 147), nous avons alors mesuré l'épaisseur moyenne du dépôt en en fonction de la vitesse de dépôt (nous avons déterminé l'épaisseur des bandes par comparaison de leur couleur avec celle de dépôts uniformes d'épaisseur connue : cf. chapitre 3.2.3). Le comportement mesuré était alors similaire à celui des dépôts uniformes du chapitre 3.3.3 (figure 3.22D).

Nous avons également réalisé des observations en fluorescence pour essayer de comprendre comment se formait l'instabilité. La figure 3.23 montre l'évolution du ménisque observé par microcopie d'épifluorescence. Ces mesures indiquent qu'il n'y a pas de pré-concentration du phospholipide avant la zone de l'instabilité. Il est probable que le contenu du ménisque soit circulé par effet Marangoni,

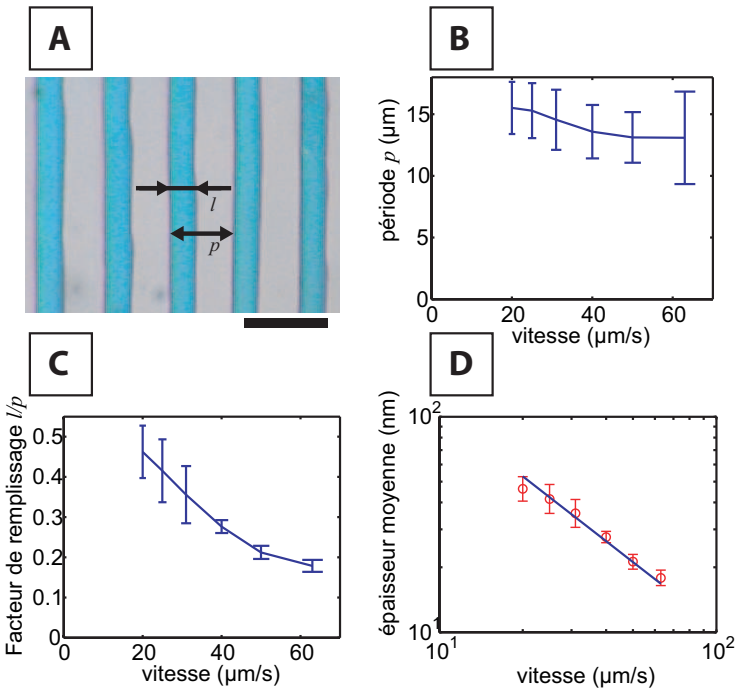


Figure 3.22 – Caractéristiques géométriques d'instabilités transversales (figure 3.21B). (Dépôt d'EPC 12 mg/mL dans du nonane à 40°C) A) photo en réflexion typique du dépôt pour une vitesse de 20 µm/s : Il apparaît des bandes de phospholipide de largeur l, de période p et ayant une épaisseur homogène d'environ 120 nm sur toute la largeur de la bande (couleur bleu turquoise) On extrait de ces images les caractéristiques géométriques des motifs déposés (l et p) en mesurant la position des extrema de la fonction d'auto-corrélation du gradient de chaque image. La barre représente 20 µm B) Période p des motifs en fonction de la vitesse de dépôt. C) facteur de remplissage du dépôt sur la surface (l/p) D) En considérant l'épaisseur du dépôt parfaitement homogène sur toute la largeur des bandes, on en déduit l'épaisseur moyenne du dépôt sur toute la surface en fonction de la vitesse de dépôt. La conservation de la matière dans la goutte est respectée comme l'indique l'ajustement sur l'équation 3.7. L'ajustement donne un paramètre d'évaporation Q_{vap} de 88 µm^2/s. Les barres d'erreur représentent la déviation standard sur l'ensemble des images mesurées (N=30).

comme nous l'avions observé pour les dépôts uniformes. Cette circulation peut empêcher la pré-concentration du phospholipide qui devrait apparaître à cause de l'évaporation du solvant dans la zone de la ligne de contact. Ce même effet Marangoni pourrait être responsable de la formation de l'instabilité à cause du fort gradient de concentration présent en limite de la zone instable. Plus d'expériences, ainsi qu'une étude théorique approfondie seraient nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

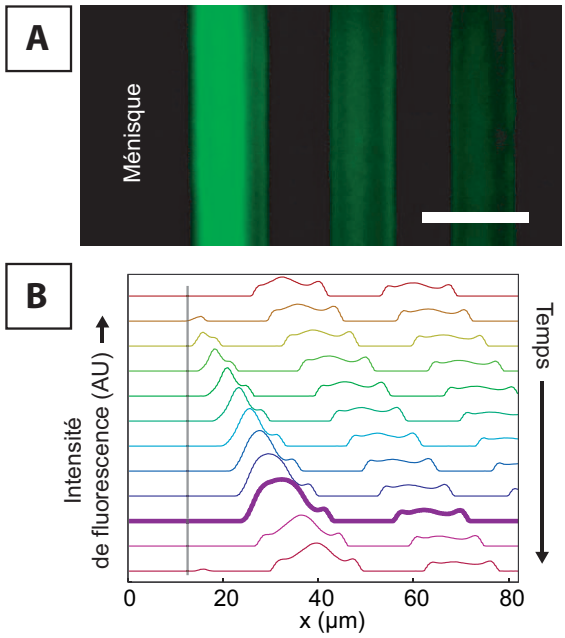


FIGURE 3.23 – Suivi par microscopie en fluorescence de la formation des instabilités transversales. A) Image typique extraite de la vidéo du ménisque suivi par son dépôt de phospholipide en forme de bandes. La fluorescence est concentrée sur la zone instable. (DOPC 3 mg/mL contenant 2% de NBD-PC avec de l'octane pour solvant, dépôt à 20°C et 5 µm/s) B) Suivi dans le temps du profil de fluorescence du ménisque sur un cycle de l'instabilité. Chaque courbe est espacée de 300 ms. La courbe en gras correspond au profil juste avant que le ménisque se brise. On peut remarquer sur la courbe suivante qu'il n'y a pas de fluorescence avant le point de brisure qui correspond au bout du ménisque (La ligne grise indique la position de la ligne de contact lorsqu'elle est en position de retrait). Le phospholipide n'est donc pas pré-concentré avant de la zone instable. La barre représente 20 µm.

A faible concentration de phospholipide ($C \lesssim 1$ mg/mL)

A faible concentration de phospholipide dans le solvant, le comportement de la ligne de contact change et devient de nouveau stable. Dans cette situation, le film déposé apparaît à une certaine distance du ménisque. Entre le film et le ménisque, un film de liquide ultrafin, quasiment invisible en réflexion donc d'épaisseur probablement inférieure à 30 nm, transporte la matière du ménisque

vers le film déposé (figure 3.21D, 3.20I et 3.24). Nous avons pu observer dans ce film, la présence d'un important flux de matière dans la direction du dépôt lorsqu'une particule le traverse. Un film uniforme peut alors de nouveau être obtenu (figure 3.20I) dans cette autre conformation du ménisque.

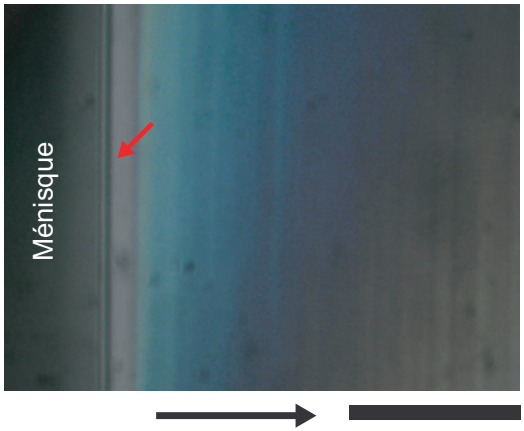


Figure 3.24 – Image de microscopie en réflexion du ménisque lors d'un dépôt stable à basse concentration. Le film déposé est séparé du ménisque par un film ultra-mince (flèche rouge) dans lequel le flux est très important. Dépôt d'EPC 1mg/mL dans l'heptane à 50°C et 80 µm/s. La barre représente 50 µm et la flèche noire représente la direction de déplacement du substrat.

Lorsque la vitesse de dépôt est suffisamment lente, le début du film n'est pas stable (figure 3.21F) et aboutit à la formation de gouttes (figure 3.20J) ou de doigts (figure 3.20K). Nous avons utilisé les dépôt visibles sur la figure 3.21J pour faire gonfler les vésicules du chapitre 2.4.3 (p. 124).

De même, à haute vitesse, des instabilités transversales peuvent également apparaître (figure 3.20L) ; celles-ci n'ont pu être observées que pour des épaisseurs de dépôt très faibles.

Pour dans la limite supérieure en concentration de cette gamme d'instabilités, le film ultrafin devient instable et le ménisque oscille entre un comportement de film fin (figure 3.21D) et un comportement de dépôt direct de bandes transversales (figure 3.21B). Ce phénomène aboutit à la formation de bandes à deux marches visibles sur la figure 3.20G-H.

A notre connaissance, ce type d'instabilité sur un dépôt de matière par retrait de ménisque, impliquant la présence d'un film ultramince au bout du ménisque, n'a jamais été observé auparavant. La présence d'un film ultramince a déjà été observé sur le mouillage d'alcanes sur des substrats de silicium [177], mais a été peu étudié. Nous pensons qu'il est généré par la pression de disjonction provoquée par les interactions moléculaires à longues portées entre le substrat et le liquide. Cette surpression, présente sur les premiers nanomètres du liquide au contact de la surface, pourrait expulser la matière du ménisque lorsque la concentration en phospholipide à la ligne de contact est suffisamment faible pour que le liquide reste en situation de mouillage total.

3.3.5 Dépôt de motifs par guidage capillaire

Lorsque le solvant ne mouille que partiellement le substrat, aucun dépôt n'est généralement observé avec la méthode du retrait de ménisque. Néanmoins, il est possible de forcer le dépôt en jouant sur les propriétés de mouillage du substrat. En gravant le substrat de manière à obtenir des trous avec des flancs verticaux, un dépôt est possible dans ces structures. Lorsque le ménisque est balayé sur la surface, les arêtes des structures provoquent des discontinuités locales de l'angle de contact dont la conséquence est l'accroche de la ligne de contact sur les arêtes. Après le passage du ménisque, une partie de la solution est retenue dans les trous comme schématisé sur la figure 3.25. Après évaporation complète du solvant contenu dans ces gouttes microscopiques, un dépôt de phospholipide reste au fond des trous. Cette méthode s'apparente à l'encrage de tampon de la lithographie par tamponnage de canaux [178], à la différence que la matière est ici préconcentrée avant le dépôt.

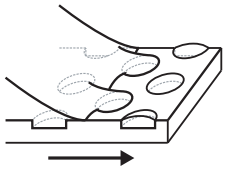


FIGURE 3.25 – Schéma de principe du dépôt local de phospholipide par capillarité : lorsque la ligne de contact est déplacée sur une surface contenant des structures, elle s'accroche sur les arêtes et forme au passage des gouttes emplissant les trous. Après séchage complet des gouttes, il reste un dépôt de phospholipide au fond des trous. La flèche indique la direction de déplacement du substrat.

Méthode

Les substrats de silicium sont clivés dans des galettes [100] dopées P (10 Ω.cm) pour obtenir des carrés d'environ 3 cm x 3 cm. Les motifs sont définis par une étape de photolithographie en utilisant la résine AZ5214E en négatif (cf. Annexe B.1) puis gravés sur 400 nm de profondeur par gravure sèche RIE (Nextral NE 100, 2 min. avec 10 sccm de SF_6 à 50 W et 30 mTorr). La résine restante est éliminée dans un bain d'acétone puis d'isopropanol sous ultrason 5 min. respectivement. Avant utilisation, les substrats sont nettoyés 20 min. dans un mélange « piranha » d'H_2SO_4 concentré/H_2O_2 50% 2/1 vol/vol pour éliminer les résidus organiques issus de l'étape de photolithographie. Après un dépôt, les substrats peuvent être réutilisés une ou deux fois après un simple rinçage au chloroforme puis à l'isopropanol. Les dépôts ont été réalisés avec la machine du LPN pour les observations *in situ* et avec la machine de l'ENS pour les autres dépôts, comme décrit dans la section 3.3.1.

Nous avons essayé, comme solvant du phospholipide, le chloroforme et le trichloréthylène. Le chloroforme s'évaporant très vite, il a tendance à créer des instabilités longitudinales comme nous l'avons noté dans la section précédente. Nous avons également observé ce phénomène lors des dépôts sur les structures : la quantité de matière déposée dans les structures présentant des inhomogénéités importantes formant des lignes parallèles à la direction de déplacement. Le trichloréthylène, qui s'évapore moins vite, s'est avéré être un meilleur choix

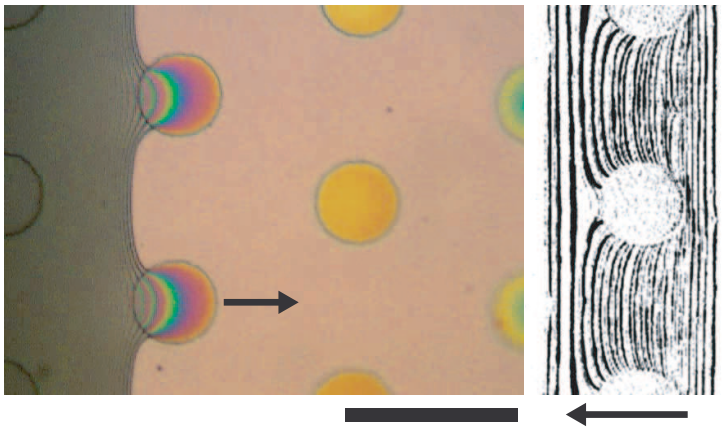


Figure 3.26 – Dépôt local de phospholipide par capillarité. A gauche : Image de microscopie en réflexion pendant le dépôt. La flèche représente la direction de déplacement du substrat. À droite : évolution de la forme de la ligne de contact au passage des structures. Les lignes représentent les positions successives de la ligne de contact autour des microstructures tous les 100 ms (la flèche indique le sens de déplacement de la ligne). Conditions de dépôt : DOPC 0,16 mg/mL dans du trichloréthylène à 15°C et 10 µm/s. La barre représente 50 µm.

pour ce type de dépôt. La figure 3.26 montre une image en réflexion de la ligne de contact lors du dépôt. On observe très clairement l'accrochage de la ligne de contact sur les arêtes des structures et les gouttes de solution restantes au fond des trous (de couleur jaune sur la figure 3.26A). En observant les positions successives de la ligne de contact, on peut voir que la ligne de contact suit progressivement le contour des microstructures jusqu'à former une constriction qui se brise, séparant le ménisque du liquide remplissant le trou.

Après le séchage complet du solvant et dans les conditions adéquates, le fond des trous est rempli d'une couche de phospholipide uniforme. Nous avons ainsi obtenu des dépôts très homogènes sur des surfaces de plusieurs centimètres carrés pour des structures de 6, 12 et 24 µm de diamètre. La figure 3.27 montre le profil d'épaisseur d'un de ces dépôts. Pour un dépôt à 15 µm/s, 25°C à une concentration de 0,5 mg/mL, L'épaisseur moyenne de phospholipide dans les trous était de 72 µm (maximum local de la distribution).

Bien que la ligne de contact ne laisse pas de matière derrière elle comme c'est le cas pour les solvants mouillant totalement le substrat, l'évaporation du solvant reste responsable d'une pré-concentration du soluté au niveau de la ligne de contact. Pour mettre en évidence ce phénomène, nous avons mesuré l'intensité de fluorescence moyenne de dépôts contenant des phospholipides fluorescents en fonction de la vitesse de déplacement du ménisque pour les structures de 12 µm. On observe alors une dépendance de la fluorescence proche de $v^{-}1$ (figure 3.28). Comme cette expérience n'a pas été calibrée en épaisseur, on ne peut rien en conclure sur la dépendance précise de l'épaisseur, mais la tendance observée pour les autres types de dépôts est respectée.

Stabilité du dépôt

A l'instar du dépôt uniforme, l'obtention de dépôts de bonne qualité sur les

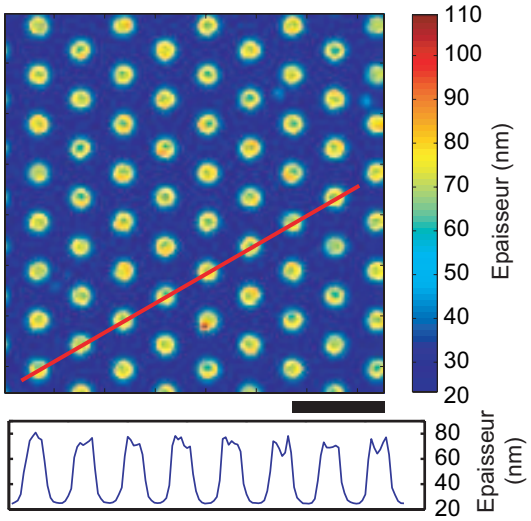


FIGURE 3.27 – Cartographie de l'épaisseur de phospholipide déposée réalisée à partir d'une image de microscopie en fluorescence. Le profil en bas est mesuré sur la ligne rouge. La barre représente 50 µm.

microstructures demande certaines précautions :

A forte concentration (> 5 mg/mL) ou si le substrat n'est pas parfaitement propre, un dépôt peut apparaître entre les structures et à haute température, des instabilités transversales peuvent également apparaître comme c'est le cas lorsque le substrat est en situation de mouillage total (cf. section précédente). Il est probable que ces phénomènes apparaissent lorsque la concentration au niveau de la ligne de contact est trop importante et change les propriétés de mouillage du solvant. Il est intéressant de noter ici que les instabilités générées sur les microstructures ont une période qui se synchronise sur la période des microstructures (figure 3.29). Si l'orientation du ménisque est alignée avec un plan cristallin du réseau de structure, les instabilités transversales suivent ces plans avec une grande robustesse. Cette propriété pourrait être utilisée pour guider les instabilités répertoriées au chapitre précédent et obtenir ainsi une plus grande régularité dans le dépôt.

A vitesse élevée, des gouttes satellites peuvent apparaître derrière chaque structure. Ces gouttes sont formées lors du décrochage entre le ménisque et la structure et attribuées à une instabilité de Rayleigh-Plateau, comme on peut l'observer lors du décrochage d'une goutte pendante [57]. Sur les structures de grandes tailles (24 µm et 12 µm dans une moindre mesure), les gouttes de solvant déposées se déforment, surtout à haute température. Ces déformations mènent à des dépôts inhomogènes, voire provoquent le démouillage de la goutte en son centre, ne laissant après séchage qu'un anneau contre le bord de la microstructure. Ce phénomène est certainement dû à un effet Marangoni solutal. Si c'est le cas, ce problème devrait pouvoir être limité en utilisant un solvant s'évaporant moins vite (au prix d'une vitesse de dépôt réduite).

De même que pour le dépôt de phospholipide uniforme, les bonnes conditions de dépôt sur des microstructures semblent aussi dépendre de manière importante

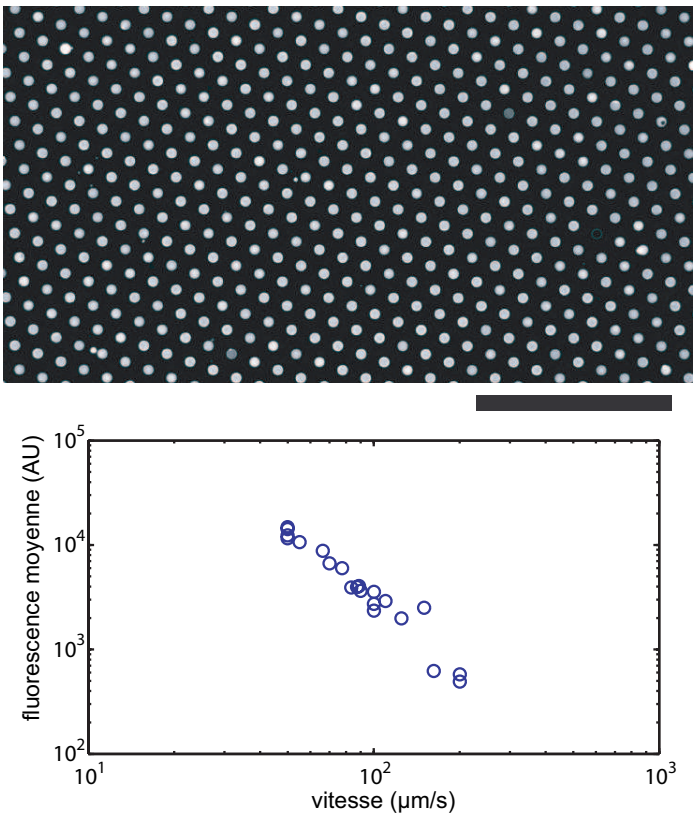


Figure 3.28 – Image en fluorescence du dépôt de phospholipide après séchage complet du dépôt. Les molécules de phospholipides sont présentes de manière homogène dans les trous et absentes sur le reste du substrat. La barre représente 200 µm, les trous font 12 µm de diamètre et 400 nm de profondeur pour un de dépôt de DOPC à 4 mg/mL + 2% NBD-PC dans du trichloréthylène à 24°C et 80 µm/s. En bas : En faisant varier la vitesse de dépôt, on remarque que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'inverse de la vitesse à une vitesse $v_0 = 200\mu$m/s près.

de la température de la pièce et/ou du taux d'humidité de l'air.

La méthode présentée dans cette dernière section a l'avantage de pouvoir combiner un contrôle de la forme du motif déposé, tout en gardant une bonne organisation microscopique (la plupart de nos dépôts étaient uniformes à la couche près et sans défauts apparents sur les images prises par microscopie en fluorescence). Néanmoins, tous les motifs ne sont pas réalisables par cette méthode et l'obtention de bandes, par exemple, reste réservée aux instabilités (qui peuvent éventuellement être contraintes par des structures). Un gonflement a été réalisé sur des motifs de 6 µm de diamètre et à donné de moins bons résultats que le gonflement réalisé à partir de motifs déposés par les instabilités. La qualité de la surface gravée et la présence des flancs du trou pourraient être mises en cause. Dans tous les cas, il serait nécessaire de faire davantage d'expériences pour confirmer les résultats de ces gonflements.

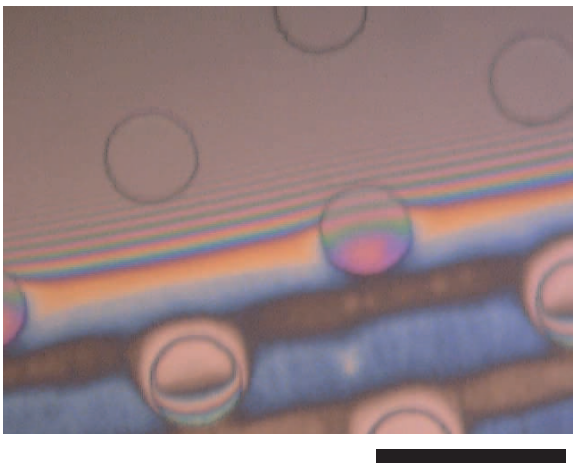


FIGURE 3.29 – Guidage des instabilités par structuration de surface : La topologie de la surface contraint les instabilités. Conditions de dépôt : DOPC 12 mg/mL dans du trichloréthylène à 20°C et 80 µm/s. La barre représente 50 µm.

3.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une nouvelle méthode pour déposer des films de phospholipide sur un substrat.

Nous avons tout d'abord introduit et développé des méthodes de caractérisation simples qui peuvent être utilisées de manière routinière pour caractériser la morphologie des films. La microscopie en réflexion a permis de visualiser, sans ajout de sonde et sur de grandes surfaces, les variations d'épaisseur de la structure stratifiée des films. La microscopie en fluorescence nécessite l'ajout d'une sonde fluorescente dans le film, mais a permis d'obtenir simplement une mesure quantitative de l'épaisseur du film à l'échelle microscopique. Les mesures obtenues par ces deux méthodes sont en accord avec les mesures par microscopie à force atomique, qui permet en sus d'avoir une résolution latérale sub-micrométrique.

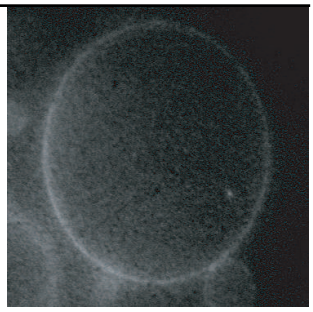
Ces méthodes de caractérisation nous ont permis de montrer pour la première fois que la méthode du retrait de ménisque permettait d'obtenir des films avec un bon contrôle de l'épaisseur à l'échelle macroscopique comme à l'échelle microscopique, ce qui était l'objectif recherché. Nous avons expliqué par des modèles théoriques simples le comportement du dépôt qui se divise en deux régimes, suivant l'importance relative de l'évaporation du solvant et des forces visqueuses. D'autre part, nous avons observé des différences d'organisation du film à l'échelle microscopique que nous avons attribué à la dynamique de séchage du film. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives pour le contrôle de l'organisation de ce type de films.

Nous avons ensuite mis en évidence que cette méthode de dépôt permettait également d'obtenir des motifs de phospholipide de tailles micrométriques en utilisant des instabilités de mouillage. Ces motifs ont présenté des formes variées avec sous certaines conditions une qualité d'organisation sans précédent. Plus particulièrement, l'électroformation de motifs de phospholipides en îlots a permis d'obtenir des vésicules avec une distribution de taille plus ramassée que les autres méthodes de dépôt.

Pour finir, l'utilisation de substrats contenant des microstructures nous a permis d'obtenir des dépôts de phospholipides suivant des motifs préétablis par photolithographie en utilisant le retrait de ménisques en condition de mouillage partiel. Cette technique offre un meilleur contrôle de la régularité du dépôt mais a donné de moins bons résultats après électroformation des vésicules. Il est à noter que de tels substrats peuvent également servir à contraindre les instabilités pour les rendre plus régulières.

L'ensemble de ces résultats devrait permettre un meilleur contrôle du phénomène d'électroformation et pourraient également trouver des applications dans d'autres domaines nécessitant le contrôle du dépôt de phospholipides comme les biocapteurs à membrane supportée ou la préparation de substrats de culture cellulaire.

En introduisant la méthode du retrait de ménisque pour le dépôt de molécules ayant des propriétés d'auto-organisation, cette étude pourrait également intéresser d'autres domaines pour fabriquer, par exemple, de nouveaux capteurs utilisant les propriétés physiques de molécules auto-organisées.



Chapitre 4

De la vésicule à la cellule artificielle

Au-delà des applications classiques des liposomes comme l'étude des propriétés des membranes [80, 84, 88, 89], leur utilisation comme compartiment pour isoler des molécules d'intérêt [77, 95] ou encore leur utilisation comme vecteur thérapeutique [74], la recherche sur les liposomes se tourne de plus en plus vers la construction de cellules artificielles. Ces objets artificiels qui reproduisent le fonctionnement des cellules vivantes pourrait, d'une part contribuer à développer de nouvelles technologies pour créer de nouveaux bioréacteurs mieux contrôlés et plus efficaces que leurs analogues vivants [99] et d'autre part devrait permettre de faciliter la compréhension des principes généraux de la matière vivante [78].

En effet, les mécanismes qui régulent l'expression des gènes et leurs maintenance au travers des divisions cellulaires sont encore mal compris et constituent un défi important de l'épigénétique qui cherche à déchiffrer les facteurs non génétiques qui régulent l'expression des gènes et permet leur héritage [179]. Un exemple manifeste de ce paradigme est la variabilité significative que l'on peut observer sur le profil d'expression de cellules génétiquement identiques [180]. Par exemple, de nombreuses espèces de bactéries commutent de manière stochastique leurs phénotypes pour s'adapter aux variations aléatoires de leur environnement [181]. Ainsi, pour décrypter les mécanismes de régulation génétique face au microenvironnement de la cellule, la possibilité de construire des systèmes d'expression bien définis dans des modèles de cellules artificielles comme les liposomes géants est donc reconnue comme un défi expérimental important.

Dans ce chapitre, nous présenterons deux méthodes visant la construction de cellules artificielles :

La première utilise la méthode de l'électroformation pour fabriquer des vésicules contenant un brin d'ADN génomique de 70 µm de long. Pour encapsuler un objet aussi grand, dont la taille peut être plus importante que la vésicule elle-même, une méthode de compaction de l'ADN a été utilisée.

La seconde méthode permet de générer un grand nombre de liposomes qui encapsulent un système de transcription et de translation composé uniquement d'un mélange de facteurs purifiés (PURESYSTEM, Post Genome Institute). Les liposomes ont été obtenus par transfert de micro-gouttes encapsulant le système

d'expression et couvertes de phospholipide à travers une interface huile/eau. L'analyse des images acquises a permis de suivre quantitativement la translation et l'expression de protéines en temps réel et à partir de matrices d'ADN et d'ARNm dans de nombreux liposomes simultanément. Cette deuxième méthode a été développée dans le cadre d'une collaboration avec l'université de Kyoto pour le projet ICORP. Nous avons analysé, interprété les données et réalisé tous les programmes d'analyse d'image et de traitement à l'ENS. La partie expérimentale a été réalisée par le Dr. Hirohide Saito à l'université de Kyoto.

4.1 Insertion d'ADN génomique

Dans la nature, jusqu'à 2 m d'ADN génomique peuvent être conditionnés pour entrer dans un espace réduit de taille micrométrique comme le noyau des cellules eucaryotes ou la capside des virus [182]. D'autre part, la préparation de cellules artificielles contenant des matériaux génétiques est d'un grand intérêt pour étudier et comprendre l'auto-organisation hiérarchique et la régulation des gènes dans les systèmes vivants complexes [78]. Pourtant, le double défi de i) préparer des vésicules monodisperses et ii) insérer de l'ADN génomique long à l'intérieur des vésicules n'a encore jamais été atteint jusqu'à présent.

On peut néanmoins citer le travail de Nomura et al. qui ont encapsulé un complexe histone/ADN de grande taille par une méthode de transfert [183]. Toutefois, les vésicules qu'ils ont obtenues étaient de mauvaise qualité : multilamellaires et non sphériques.

Comme nous l'avons vu précédemment, il est envisageable d'obtenir des vésicules monodisperses en utilisant la méthode de l'électroformation (chapitre 2). Nous proposons dans les paragraphes suivants une nouvelle méthode pour insérer des ADN longs pendant l'électroformation en utilisant une méthodologie de compaction de l'ADN schématisée sur la figure 4.1.

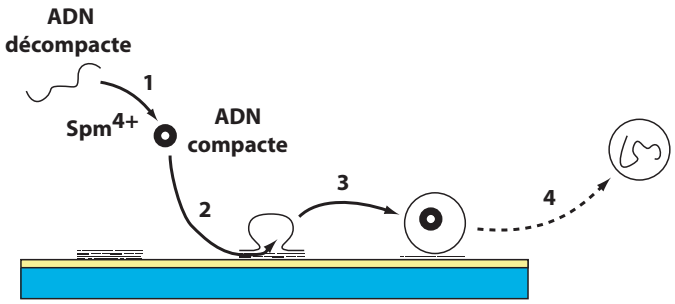


Figure 4.1 – Insertion d'ADN génomique lors de l'électroformation. 1) L'ADN est tout d'abord compacté en ajoutant dans la solution un contre-ion multivalent. 2) Lors du processus d'électroformation, la taille de l'ADN compact est suffisamment réduite pour permettre à la molécule d'entrer dans les vésicules en formation. 3) Après l'électrogonflement, des brins d'ADN compacts sont enfermés dans certaines vésicules. 4) Une méthode adéquate pourrait être utilisée pour décompacter l'ADN et l'étudier dans sa conformation étirée.

Jusqu'à présent, les techniques habituelles pour inclure l'ADN dans des vésicules produites par électroformation (Injection [184] électroporation, insertion pendant le gonflement [185]) ont été limitées à l'insertion de brins d'ADN très courts (jusqu'à quelques milliers de paires de bases maximum). Ceci est dû au fait que l'électroformation ne permet pas d'insérer des objets de taille plus importante. Pour insérer des molécules d'ADN plus longues, nous avons utilisé le fait que les molécules uniques d'ADN double-brins se replient de manière réversible en présence de contre-ions multivalents. Dans cet état ils prennent une forme compacte très dense [186] dont la taille est suffisamment petite pour entrer dans les vésicules lors de leur fabrication.

La figure 4.2 montre la compaction d'un monobrin d'ADN en présence de

spermine (Spm^{4+}). Sans spermine ou à faible concentration de spermine, l'ADN est dans son état naturel de pelote. Si l'on augmente la concentration de spermine, l'ADN subit une transition de phase du premier ordre autour de 5 µM et passe brusquement dans son état compacté. Le condensat d'ADN obtenu a une forme toroïdale de 90 nm de diamètre (figure 4.2). Aux concentrations intermédiaires, il y a coexistence entre des molécules à l'état compacté et à l'état décompacté.

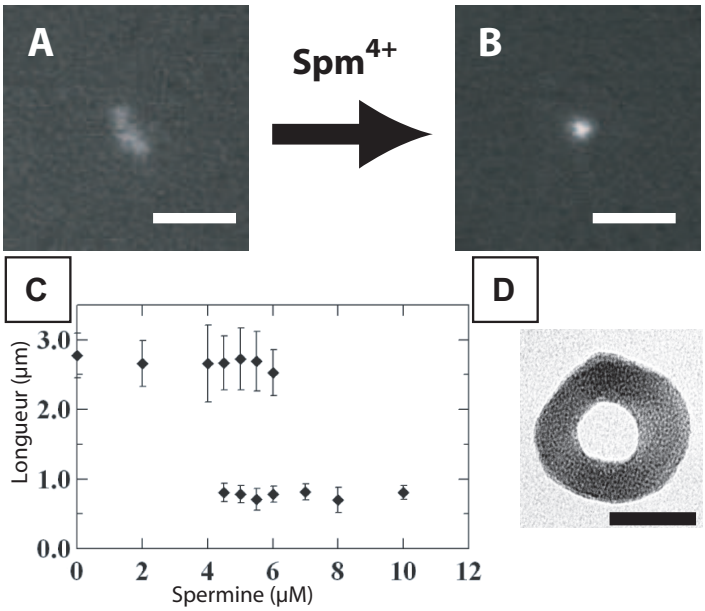


FIGURE 4.2 – Compaction d'une molécule d'ADN T4 unique (166000 paires de base, 0,1 µM dans 10 mM de tampon Tris-HCl, pH = 7,4) par la spermine (Spm^{4+}). Sans spermine, toutes les molécules sont dans un état décompacté et se présentent sous forme de pelotes allongées. Après un ajout suffisant de spermine, toutes les pelotes se replient dans un état compact dense. A) Image de microscopie en fluorescence d'une molécule d'ADN décompactée en l'absence de spermine. La barre d'échelle représente 5 µm. B) Image de microscopie en fluorescence d'une molécule d'ADN compactée après ajout de 10 µm de spermine. La barre d'échelle représente 5 µm. C) Taille du grand axe de la molécule d'ADN observée par microscopie en fluorescence en fonction de la concentration de spermine. Extrait de [187]. D) Image de microscopie électronique en transmission (TEM) la molécule d'ADN compactée. La barre d'échelle représente 50 nm.

Pour pouvoir insérer des brins d'ADN T4 lors de l'électroformation de vésicules, nous avons ajouté 10 µM de spermine de manière à compacter la totalité des brins d'ADN qui peuvent entrer dans cet état dans les vésicules lors du gonflement.

Méthode

La solution de gonflement des vésicules contenant les molécules d'ADN T4 double-brins (166 Kb) compactées a été obtenue par l'ajout successif de i) 1 mM de tampon Tris-HCl (pH = 7.4) pour maintenir le pH ii) 10 µM de spermine (spm^{4+}) pour la compaction iii) 1 µM de colorant fluorescent DAPI pour marquer l'ADN iv) 1 µM d'ADN dans une solution standard de gonflement à 0,1 M de sucrose. Cette solution a été utilisée pour faire gonfler pendant 2 heures un film de phospholipide par la méthode classique (voir chapitre 1.3.4). Le film a été réalisé à partir d'une solution d'EPC (10 mg/mL) contenant 4% de PE-FITC comme marqueur fluorescent. Pour les observations après le gonflement, la solution contenant les vésicules a été extraite de la cellule de gonflement et mélangée (1/2 vol/vol) avec une solution de glucose ajustée en osmolarité (110 mOsm). Après 2 heures de décantation, les vésicules ont été observées sur un microscope inversé à épifluorescence Axiovert 200 (Zeiss) avec un objectif 100x à huile et un jeu de filtres DAPI. De cette manière, il était possible de distinguer les vésicules (fluorescence jaune) et les ADN compactes (fluorescence bleu). Les vidéos de la figure 4.3 ont été prises à l'aide d'une caméra EMCCD (Hamamatsu) puis numérisées.

La figure 4.3 montre des images typiques de microscopie en fluorescence de vésicules contenant les molécules d'ADN compact. Dans cette figure, une molécule d'ADN compact est visible sous la forme d'un point bleu (fluorescence du marqueur DAPI) se déplaçant librement dans une vésicule fluorescente jaune (fluorescence du phospholipide marqué à la fluorescéine contenue dans la membrane de la vésicule). Pour confirmer que ce résultat n'est pas une interférence entre le DAPI et le phospholipide, nous avons réalisé la même expérience sans marqueur fluorescent dans la membrane et en replaçant le DAPI par du YOYO (1 µm). L'expérience a donné des résultats similaires. Le rendement de l'insertion d'ADN était faible (environ 1%) lors de nos expériences. Il pourrait être augmenté dans une certaine mesure en utilisant une concentration d'ADN plus élevée, mais le coût du matériel génétique rendrait ce type d'expérience très cher. D'autre part, les conditions de cette expérience sont à la limite des possibilités du protocole standard de l'électroformation qui limite à 50 mM la concentration en sel de la solution de gonflement [113].

En conclusion, nous avons montré la possibilité d'inclure des fragments d'ADN long (166 Kb) dans les vésicules lors de l'électroformation en réduisant leur taille par une technique de compaction. L'ADN double-brin contenu dans les vésicules obtenues était sous forme compacte. Mais il est envisageable de le décompacter en utilisant la même méthode avec une molécule appropriée permettant de décompacter l'ADN par un stimulus extérieur [188], en changeant la composition du contenu de la vésicule à la fin de l'électroformation [113] ou par l'adjonction après formation d'un facteur porigène comme la gramicidine A [95]. Un tel objet permettrait par exemple d'étudier l'effet du confinement sur la transcription d'ADN long à travers des expériences sur molécules uniques.

4.2 Suivi de l'expression de GFP dans des GUV

L'encapsulation de réseaux génétiques dans des vésicules artificielles est une voie prometteuse pour construire des cellules artificielles. Comme nous l'avons vu au chapitre 2.1, de nombreuses méthodes existent pour fabriquer des vésicules. Mais la possibilité d'encapsuler des systèmes d'expression génétique dans des GUV avec ces techniques reste difficile. L'équipe de Szostak a incorporé

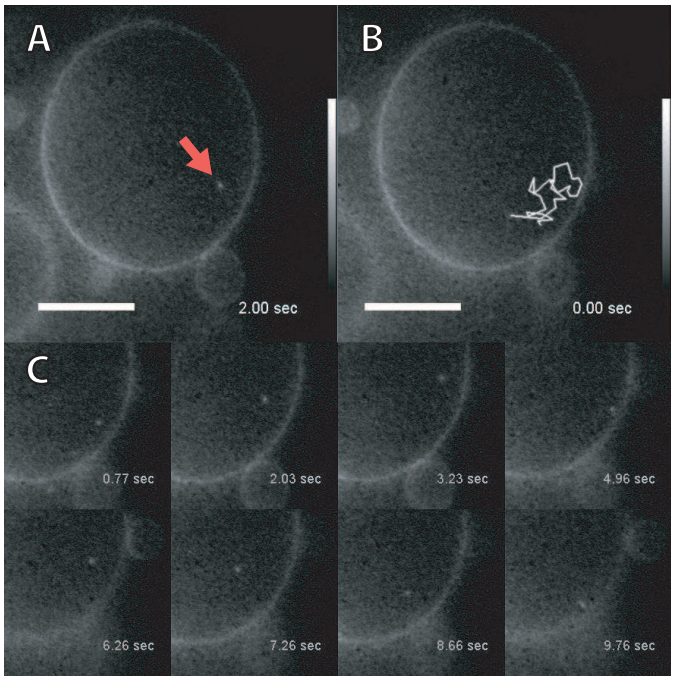


FIGURE 4.3 – Inclusion d'ADN génomique dans une vésicule géante fabriquée par électroformation. A) Photo en fluorescence d'une vésicule contenant un ADN long compact (flèche rouge). B) La ligne blanche représente la trajectoire du mouvement brownien de cette ADN sur 10 s. C) Enregistrement à intervalles réguliers de la vésicule illustrant le mouvement de l'ADN. La barre d'échelle représente 20 µm

avec succès différents réseaux génétiques dans des micro-compartiments, mais les vésicules obtenues étaient petites (environ 10 µm), sans forme bien définie et sans phospholipides dans la membrane [189, 190]. Par contre, il a été récemment montré que des micro-gouttes d'eau dans l'huile contenant des phospholipides [191] pouvaient être utilisées comme précurseur pour générer des GUV encapsulant des systèmes d'expression génétiques [91, 108, 133]. En utilisant ce principe, Libchaber *et al.* ont encapsulé des systèmes d'expression provenant d'extraits cellulaires dans des liposomes qui maintenaient une expression génétique pendant environ deux jours [91]. Ils ont utilisé pour cela une étape de centrifugation pour récolter les liposomes, qui mène à un rendement très faible de production de vésicules et une dispersion des liposomes obtenus dans le milieu.

Pour outrepasser les problèmes mentionnés ci-dessus, nous avons développé une méthode avec laquelle un grand nombre GUV encapsulant un système d'expression peut être généré. Il est basé sur le transfert spontané de gouttes d'eau dans l'huile à travers une interface eau/huile. Sous des conditions optimisées, des centaines de liposomes peuvent être générés et localisés sous l'interface. Ceci permet le suivi de l'expression de protéines en temps réel avec un microscope confocal. Nous avons appliqué cette méthode pour étudier la dynamique d'un système de translation et d'expression dans les liposomes générés. Il en est ressorti que les profils d'expression montrent une variabilité significative entre les liposomes.

4.2.1 Encapsulation et suivi du système d'expression dans les liposomes

La figure 4.4 décrit le principe de la méthode utilisée. Le système d'expression génétique est tout d'abord assemblé et émulsifié dans une solution d'huile minérale contenant des phospholipides (de l'EPC). Cette émulsion est ajoutée dans une phase huileuse qui est placée sur une phase aqueuse dans une chambre d'observation à 37°C (figure 4.4A). En quelques minutes, la plupart des gouttes coulent au fond de la phase huileuse et sont spontanément transférées à travers l'interface eau/huile pour former des liposomes juste en dessous de l'interface [108]. Comme la plupart des liposomes restent attachés à l'interface, il est possible de caractériser simultanément un nombre important de liposomes par microscopie confocale (Figure 4.4B). Comme système d'expression et de translation, nous avons choisi un système de translation et d'expression sans extrait cellulaire. Ce système artificiel a l'avantage d'être reconstitué à partir de facteurs d'expression purifiés avec des concentrations bien définies (PURE system, Post Genome Institute). Comme le système ne contient pas d'ARNase, aussi bien des fragments d'ARNm que des fragments d'ADN peuvent être utilisés comme matrice pour l'expression. Les conditions du tampon ont été optimisées pour générer un grand nombre de liposomes qui soient stables et typiquement, 400 liposomes sont formés sur une image de microscopie confocale (500x500 µm). Une fois encapsulé, le système reconstitué peut exprimer de la GFP dans les liposomes : par exemple, si des fragments codant l'EGFP sont insérés dans le système d'expression, ils seront transcrits et translatés en protéines EGFP après une heure d'incubation à 37°C alors qu'aucune fluorescence n'est observée en l'absence de fragments d'ADN (figure 4.4C).

Après la formation des liposomes sous l'interface, une série d'images est

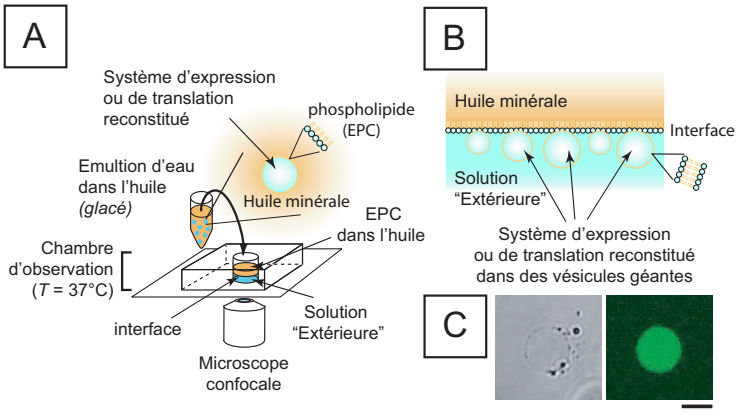


FIGURE 4.4 – Protocole expérimental. A) Schéma de principe de l'expérience. Avant l'expérience, le microscope confocal est réglé pour prendre des images juste en dessous de l'interface entre la phase aqueuse "extérieure" et la phase huileuse contenant l'émulsion et les phospholipides. Après la préparation de l'émulsion à partir du système d'expression et de l'huile minérale contenant le phospholipide (à 0°C), celle-ci est immédiatement ajoutée dans la chambre d'observation à 37°C ou la réaction s'initie. B) Schéma de principe du transfert spontané des gouttes à travers l'interface eau/huile. Après avoir coulé, les gouttes d'eau dans l'huile recouvertes d'une couche de phospholipide sont transférées spontanément à travers l'interface pour former des vésicules géantes qui restent juste en dessous de l'interface. C) A gauche : Image en contraste de phase différentiel d'un liposome géant après sa formation. A droite : Image en fluorescence d'un liposome exprimant la GFPuv à près 1 h. d'incubation. La barre d'échelle représente 50 µm.

acquise à intervalle régulier sur une même région. La figure 4.6A montre une séquence typique d'image de l'expression de l'EGFP dans les liposomes. Comme les liposomes sont générés environ une minute après l'introduction de l'émulsion dans la chambre d'observation, il y a une incertitude d'environ une minute sur la détermination du temps de réaction dans les liposomes. Une faible fluorescence est observée dans les liposomes après 20 minutes à 37°C. Celle-ci augmentant progressivement avec le temps pour atteindre un plateau après environ 75 minutes. Pour établir l'expression génétique dans chaque liposome individuellement, nous avons développé un programme d'analyse d'image qui détecte les liposomes (figure 4.6B), mesure leurs tailles et leurs intensité de fluorescence (figure 4.6C) sur l'ensemble de la succession d'image.

4.2.2 Suivi des vésicules par analyse d'image

Les images acquises par microscopie confocale sont fortement bruitées et les liposomes observés sont agrégés. Nous avons donc utilisé pour la détection des liposomes le programme d'analyse de forme utilisant la méthode de la transformée décrit au chapitre 2.1.3. En utilisant cette technique, certains liposomes peu contrastés, trop agrégés, non sphériques, ou parasités par d'autres liposomes de plus petite taille ne sont pas détectés, mais tous les liposomes détectés correspondent à de vrais liposomes et 50 à 100% des liposomes générés sont détectés en fonction de la qualité de l'image analysée.

Une fois les vésicules détectées sur toutes les images d'une séquence, un autre programme est chargé d'établir la correspondance entre les liposomes détectés sur chaque image. Malgré les précautions expérimentales, des mouvements de convection restent présents dans la cellule d'observation et déplacent la position des vésicules d'une image sur l'autre. Ces mouvements sont imprévisibles *a priori* et varient avec le temps. Néanmoins, leur répartition spatiale est relativement continue à l'échelle d'une paire d'images. Il est donc possible d'anticiper la position approximative des liposomes sur une image à partir de la position des mêmes liposomes sur l'image précédente et d'établir la correspondance entre les liposomes d'images consécutives.

Détection des mouvements

La méthode retenue a donc été de trouver l'ensemble des déplacements des vésicules entre deux images de manière à ce qu'une fonction suffisamment continue puisse approximer ces déplacements.

Détection des déplacements possibles. L'ensemble des déplacements possibles est tout d'abord collecté : le déplacement entre la vésicule i sur l'image a et la vésicule j sur l'image $a+1$ est retenu si la position des deux vésicules est suffisamment rapprochée et leurs tailles sont suffisamment proches. Si l'on doit trouver le déplacement de n vésicules, on obtient de cette manière $m > n$ déplacements possibles, mais au plus n de ces déplacements sont valables.

Calcul des déplacements probables. Ensuite, on calcule les paramètres d'une fonction suffisamment continue qui approxime le déplacement sur le meilleur ensemble de n déplacements parmi les m déplacements, en cherchant à minimiser l'erreur d'approximation. Il n'existe pas d'algorithme permettant de trouver la solution exacte de ce problème. Mais nous proposons ci-dessous une méthode heuristique qui donne de bons résultats dans notre cas.

Soit une vésicule i sur l'image a, défini par sa position (x_{ai}, y_{ai}) et sont rayon r_{ai}. Le déplacement de ce centre par rapport à l'image suivante est défini par ses composantes (dx_{ai}, dy_{ai}). On cherche donc le déplacement tel que :

$$\left| \begin{array}{l} x_{a+1,i} = x_{a,i} + dx_{a,i} \\ y_{a+1,i} = y_{a,i} + dy_{a,i} \end{array} \right. \tag{4.1}$$

Dans la suite du développement, les indices a ne sont plus notés pour alléger l'écriture.

Soit $(fx(xi, yi), fy(xi, yi))$ les fonctions approximant le couple (dxi, dyi). L'erreur de l'approximation est définie comme la différence entre le vecteur approximé et le vecteur réel :

$$\varepsilon_i = \left| \begin{array}{l} f_x(x_i, y_i) - dx_i \\ f_y(x_i, y_i) - dy_i \end{array} \right. \tag{4.2}$$

On cherche donc les fonctions f pour atteindre le minimum :

$$\min_{f_x, f_y} \sum_i ||\varepsilon_i||_2^2 = \varepsilon_{xi}^2 + \varepsilon_{yi}^2 \tag{4.3}$$

On choisit les fonctions f comme des bi-polynômes pour leur linéarité :

$$\left| \begin{array}{l} f_x = u_1 + u_{x2}x + \cdots + u_{xn}x^n + u_{y2}y + \cdots + u_{yn}y^n \\ f_y = v_1 + v_{x2}x + \cdots + v_{xn}x^n + v_{y2}y + \cdots + v_{yn}y^n \end{array} \right. \tag{4.4}$$

Alors (4.2) peut s'écrire sous forme matricielle :

$$\underbrace{\begin{bmatrix} \varepsilon_{x1} & \cdots & \varepsilon_{xm} \\ \varepsilon_{y1} & \cdots & \varepsilon_{ym} \end{bmatrix}}_{E} = \underbrace{\begin{bmatrix} u_1 & u_{x1} & \cdots & u_{xn} & u_{y1} & \cdots & u_{yn} \\ v_1 & v_{x1} & \cdots & v_{xn} & v_{y1} & \cdots & v_{yn} \end{bmatrix}}_{U} \underbrace{\begin{bmatrix} 1 & \cdots & 1 \\ x_1 & \cdots & x_m \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_1^n & \cdots & x_m^n \\ y_1 & \cdots & y_m \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ y_1^n & \cdots & y_m^n \end{bmatrix}}_{X} - \underbrace{\begin{bmatrix} dx_1 & \cdots & dx_m \\ dy_1 & \cdots & dy_m \end{bmatrix}}_{D} \tag{4.5}$$

$$\text{Donc : } E = UX - D \tag{4.6}$$

On vérifie bien que minimiser E^2 est équivalent à (4.3). On peut ajouter une matrice de pondération W à (4.6) pour pouvoir sélectionner les données à n dimensions sur les m dimensions de E :

$$\text{Donc : } E = UWX - WD \tag{4.7}$$

Cette matrice est alors une matrice diagonale telle que $W_{i,i} = 1$ si le déplacement i est sélectionné et $W_{i,i} = 0$ sinon.

Le carré de E est minimal lorsque $\text{grad}(E^2) = 0$. On peut montrer que dans ce cas :

$$U = (X^t W X)^{-1} X^t W Y \tag{4.8}$$

On obtient de cette manière la fonction $f(x, y) = UX$ approximant les couples (dx, dy) si l'ensemble des déplacements valables est connu. Pour trouver l'ensemble des déplacements valables, on part de l'hypothèse que les déplacements non valables suivent une loi d'espérance nulle et que suffisamment de déplacements sont valables pour que la fonction approximée soit en moyenne plus proche des déplacements valables que des déplacements non valables. Cette hypothèse a d'autant plus de chances d'être respectée si i) le nombre de déplacements total est grand pour une même proportion de déplacements valables ; ii) la proportion des déplacements valables est importante ; iii) la fonction peut approximer avec une bonne précision les déplacements. Dans ce cas, les déplacements ayant les résidus les plus grands sont en majorité des déplacements non valables : on refait alors l'approximation en donnant un poids nul aux n déplacements ayant les résidus les plus grands. Ce calcul est itéré jusqu'à ce que l'ensemble des déplacements valables converge. Alors, cet ensemble est l'ensemble des déplacements valables. Cet algorithme ne converge pas vers la bonne solution si les hypothèses de départ ne sont pas respectées.

En pratique, cet algorithme a bien fonctionné en utilisant une fonction d'approximation bicubique pour toutes les suites d'images que nous avons analysées, sauf lorsque la fonction bicubique ne pouvait pas approximer correctement les déplacements. La figure 4.5 montre les résidus suivant l'axe x après une approximation sur une paire d'images typique. On peut remarquer que la fonction d'approximation suit la zone de plus forte densité de points.

Sélection sur les déplacements probables. Une fois que le déplacement probable de chaque vésicule est calculé à partir de la fonction de déplacement approximée, ce déplacement est comparé avec l'ensemble des déplacements possibles de chaque vésicule. Seul le déplacement possible le plus proche du déplacement probable est alors retenu. Il arrive que sur une paire d'images, une vésicule ne soit détectée par le programme de détection de forme que sur une des deux images. Dans ce cas, le déplacement sélectionné est erroné et lie deux vésicules différentes plus éloignées. Pour éviter cette situation, un dernier test est réalisé sur l'écart entre le déplacement sélectionné et le déplacement probable de la vésicule pour éliminer les déplacements qui s'éloignent trop du déplacement approximé.

Une fois ce travail réalisé, l'ensemble des suites de déplacements est rangé dans une structure de données où sont également stockées les propriétés de la vésicule (diamètre, position et intensité de fluorescence moyenne). On peut tracer à partir de cette structure les graphes de suivi visibles sur la figure 4.6B-C.

4.2.3 Expression de GFP et variabilité dans les liposomes

A partir des courbes obtenues par analyse d'image, on observe effectivement que dans chaque liposome, l'expression d'EGFP atteint un plateau après 75 à 90 minutes de réaction en fonction des liposomes. Ce profil cinétique est très

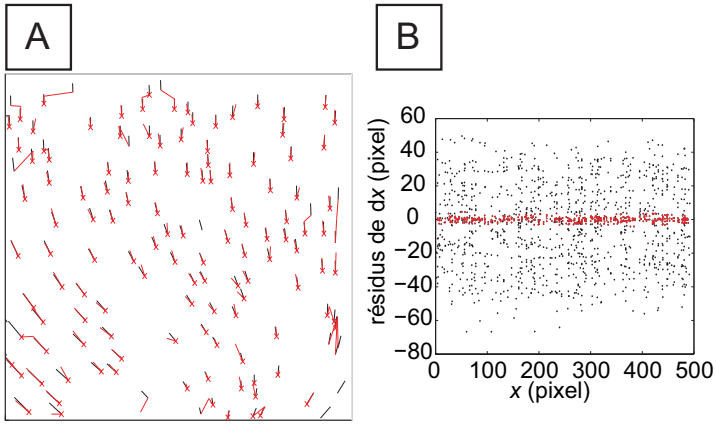


FIGURE 4.5 – Détection des déplacements sur des paires d'images. A) Le déplacement le plus probable est approximé entre chaque paire d'images à l'aide d'une fonction bicubique. Les traits noirs et rouges représentent respectivement les déplacements approximés et les déplacements sélectionnés par l'approximation. Lorsqu'une vésicule n'est pas présente sur une des deux images, ce deuxième déplacement est écarté (déplacement sélectionné qui s'éloigne trop du déplacement approximé) les croix rouges représentent les centres des vésicules dont le déplacement a été retenu. B) Résidu de l'approximation du déplacement sur l'axe x pour une paire d'images typique. Les points rouges et noirs représentent respectivement les déplacements retenus et écartés par l'algorithme d'approximation. On peut remarquer que les déplacements retenus sont répartis sur une surface de plus forte densité de l'espace analysé. C'est cette zone plus dense qui est détectée par l'algorithme.

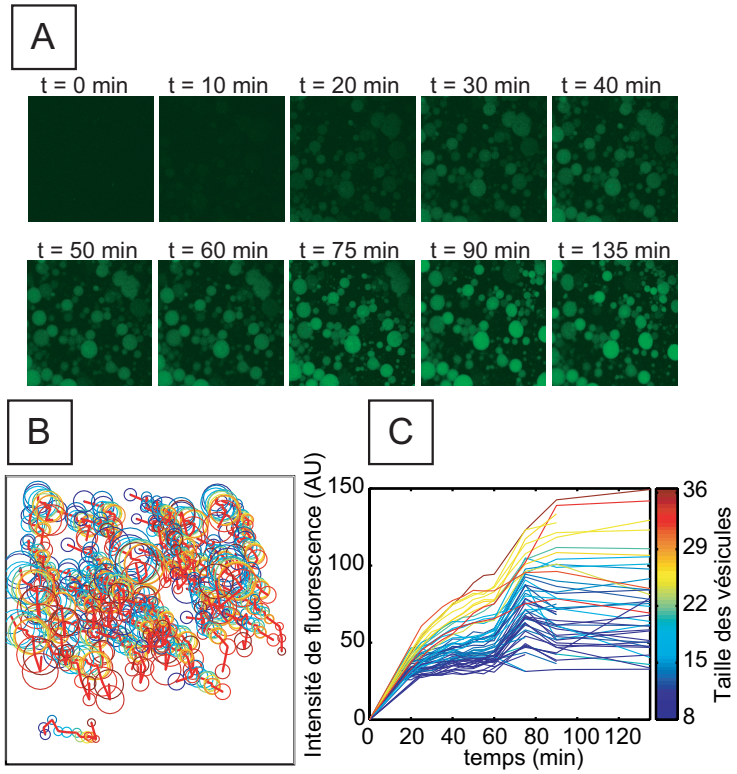


Figure 4.6 – Le suivi de vésicule permet la mesure de l'expression de gène sur un nombre important de vésicules. A) Enregistrement à intervalles réguliers d'images en microscopie confocale du système d'expression de gènes. Le plan focal est positionné juste en dessous de l'interface eau/huile. B) Suivi des vésicules par analyse d'image : chaque cercle correspond à la détection d'une vésicule (une couleur par image) et les lignes rouges suivent la trajectoire des centres. C) Fluorescence moyenne d'eGFP dans les vésicules individuelles en fonction du temps. La couleur correspond à la taille des vésicules.

similaire à ceux obtenus en éprouvette. Néanmoins, une variabilité importante est observée entre chaque liposome individuel. Cette variabilité se retrouve dans toutes les expériences similaires que nous avons observées. En regardant plus attentivement la figure 4.6B, les gros liposomes tendent à montrer une expression plus importante en moyenne. Cette corrélation est observée pour toutes les expériences, mais rarement de manière aussi prononcée et elle est partiellement due à un artefact de la mesure de fluorescence (Lors d'expériences témoins, les petites vésicules formées à partir de GFPuv commercial paraissent moins fluorescentes que les grosses). A notre connaissance, c'est la première fois que l'expression de protéines peut être suivie en parallèle sur un grand nombre de liposomes individuels et que la variabilité entre des modèles de cellules artificielles génétiquement identiques.

Variabilité de l'expression : expression vs. translation

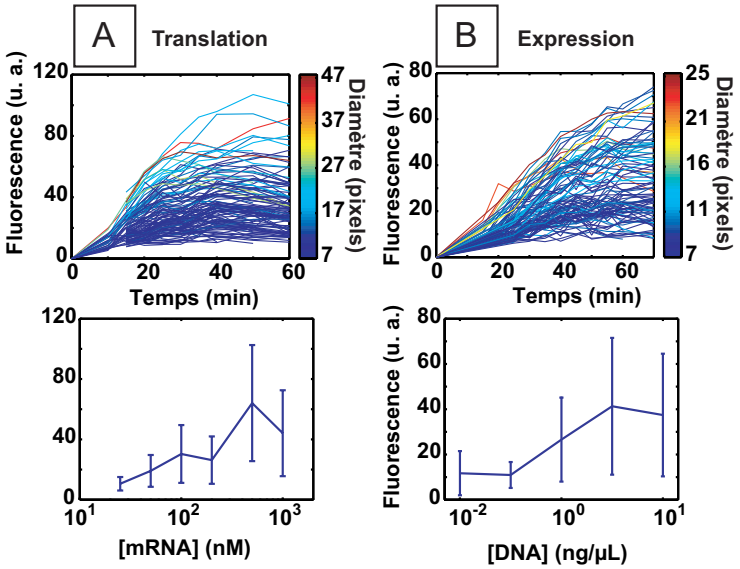


FIGURE 4.7 – Suivi comparé des systèmes de transcription et d'expression : Fluorescence moyenne dans chaque vésicule en fonction du temps (en haut) et fluorescence moyenne sur toutes les vésicules après 80 min (A) et 100 min (B) en fonction de la concentration de la matrice.

Nous avons suivi l'expression de protéines dans les liposomes en utilisant différentes matrices (ADN et ARNm) à diverses concentrations (figure 4.7). Nous avons tout d'abord préparé de l'ARNm d'EGFP in vitro et étudié si cette matrice pouvait être utilisée avec le système d'expression PURE dans les liposomes. Les liposomes contenant le système d'expression avec l'ARNm ont commencé à exprimer une fluorescence mesurable après 10 minutes d'incubation et saturaient après un temps typique de 60 minutes (figure 4.7A, en haut). Inversement, les liposomes contenant de l'ADN comme matrice commençaient à exprimer une fluorescence mesurable après 20 minutes d'incubation et la saturation n'était atteinte qu'après 70 minutes (figure 4.7B, en haut). Ceci montre que l'expression d'EGFP peut être mesurée en temps réel pour des matrices d'ADN et

d'ARNm, permettant de distinguer la contribution de la transcription et de la translation dans le processus d'expression du gène. En répétant l'expérience pour différentes concentrations d'ADN et d'ARNm, des profils similaires ont été obtenus. En mesurant l'intensité de fluorescence après 90 minutes à 37°C on observe une augmentation de la production moyenne d'EGFP avec l'augmentation de la concentration de la matrice pour l'ADN comme pour l'ARNm. Cette augmentation sature pour les concentrations importantes. Les barres d'erreur, qui indiquent la déviation standard observée sur la population de liposomes indiquent qu'il y a une variabilité significative entre les liposomes individuels. La variabilité observée est plus importante dans le cas de l'expression à partir de l'ADN que dans le cas de l'ARNm. Cela montre qu'une variabilité intrinsèque émerge dans ces modèles de cellules artificielles et provient de l'étape de transcription comme de l'étape de translation.

Calibration de la fluorescence des protéines : cinétique quantitative

Il peut être intéressant d'accéder à la quantité de protéine exprimée dans chaque liposome. Pour cela, nous avons d'abord préparé de l'ADN codant de la GFPuv et suivi sa cinétique d'expression dans les liposomes (figure 4.8A). Nous avons observé que l'intensité de fluorescence de la GFPuv est détectable à partir de 20 minutes d'incubation et augmente sans atteindre le point de saturation dans le temps de l'expérience. Pour quantifier la quantité de GFPuv exprimée dans les liposomes, nous avons encapsulé directement la protéine à différentes concentrations puis mesuré l'intensité de fluorescence de chaque liposome individuel obtenu. Pour chaque concentration, les intensités mesurées sont distribuées sur une gamme assez large, ce qui pourrait être attribué à une adsorption partielle des protéines sur la membrane. Pour obtenir la concentration correspondant à une certaine intensité, les données obtenues expérimentalement sur l'ensemble des concentrations sont ordonnées suivant leur intensité de fluorescence. Sur ce nouvel ensemble de donnée, la moyenne et l'écart-type de la concentration et de l'intensité de fluorescence est calculée pour chaque paquet de 700 données. Ce calcul nous permet d'attribuer une concentration de GFPuv avec une barre d'erreur correspondant à une déviation standard pour une intensité de fluorescence donnée (figure 4.8B). En utilisant cette courbe de calibration, nous avons calculé la concentration de GFPuv dans les liposomes en fonction du temps, en indiquant par la couleur la probabilité normalisée de trouver une vésicule pour chaque valeur de concentration (figure 4.8C). Ces résultats montrent que nous pouvons suivre quantitativement dans le temps la réaction d'expression génétique dans les liposomes.

4.2.4 Conclusion

Dans cette étude, nous avons successivement montré que i) une quantité suffisante de système d'expression génétique a été encapsulée dans des vésicules synthétiques pour exprimer les gènes étudiés ; ii) la dynamique et la cinétique d'expression d'un grand nombre de liposome a été analysée quantitativement par microscopie dans une chambre où les liposomes sont maintenus sous une interface eau/huile.

Pour préparer des vésicules synthétiques qui contiennent des macromolécules biologiques, la méthode du gonflement naturel a été largement utilisée et la reconstruction de la transcription et de la translation a déjà été rapportée.

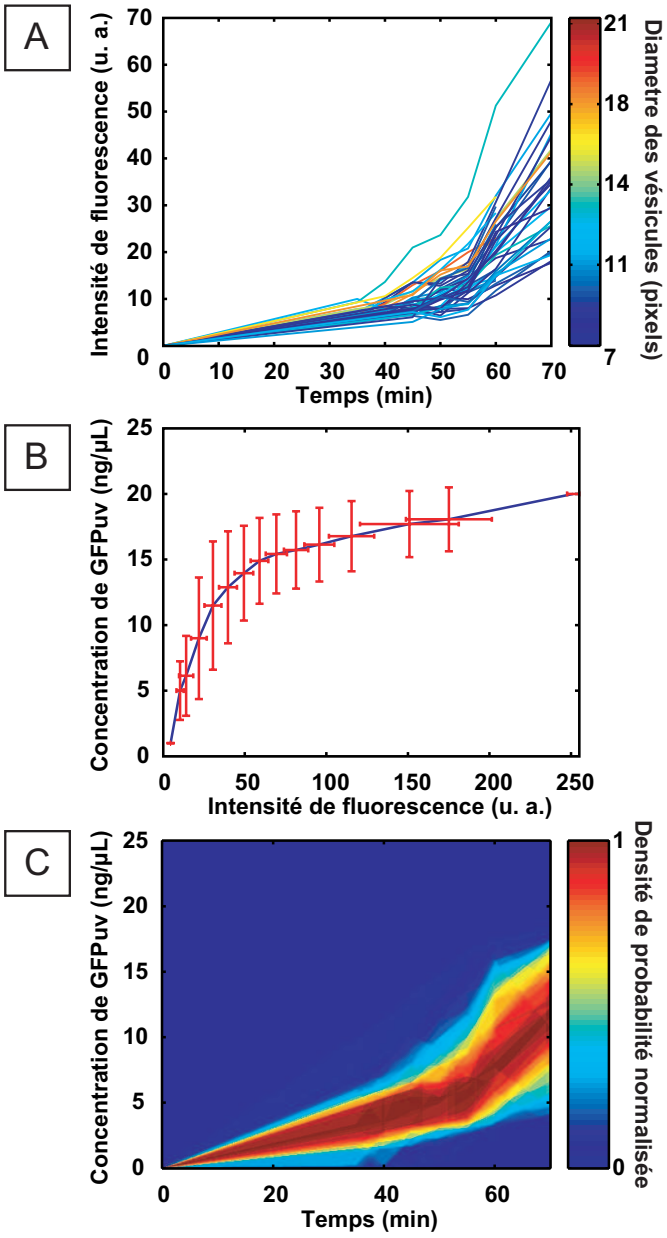


FIGURE 4.8 – Quantification de l'expression de protéines. A) Fluorescence moyenne dans chaque vésicule en fonction du temps. La couleur correspond à la taille des vésicules. B) Concentration de GFPuv dans les liposomes en fonction de l'intensité de fluorescence. Les barres d'erreurs correspondent à la déviation standard sur un jeu de 700 mesures. C) Densité de probabilité de trouver une vésicule exprimant une certaine concentration de GFPuv en fonction du temps.

Pourtant, seulement 30 à 40% des liposomes encapsulaient les macromolécules désirées et une faible population d'entre eux montrait un niveau d'expression raisonnable. Ces faibles rendements étaient un obstacle pour analyser la cinétique d'expression dans de nombreux liposomes. Nous pensons que les analyses quantitatives à haut débit deviendront essentielles pour construire et évaluer les modèles de cellules artificielles. Dans notre méthode, nous utilisons la microscopie confocale pour analyser simultanément une grande quantité de liposomes. Ainsi, cette méthode nous a permis d'étudier la dynamique de la localisation des protéines ainsi que la dynamique des vésicules elle-même en prenant des séquences d'images de plusieurs liposomes individuellement.

En utilisant la méthode présentée ci-dessus, nous avons encapsulé les trois matrices ADN EGFP, ADN GFPuv et ARNm EGFP à différentes concentrations et analysé les cinétiques d'expression des protéines correspondantes à différentes concentrations. Les matrices d'ADN comme les matrices d'ARN ont exprimé la protéine GFP. La transcription et la translation initiée par l'ADN ont montré plus de variabilité que la translation initiée par l'ARNm, indiquant que la transcription contribue à augmenter la variabilité de l'expression génétique encapsulée dans des liposomes individuels. Nous avons également pu faire une courbe de calibration pour évaluer la concentration des protéines dans les liposomes et quantifier la probabilité d'expression génétique en employant de l'ADN de GFPuv et sa protéine recombinante. Comme le système est totalement artificiel, la concentration des réactifs peut être changée à souhait et l'expérience répétée de manière reproductible. Ce système peut donc permettre de faciliter l'investigation de la relation entre le nombre de molécules et la variabilité de l'expression génétique. En plus, la corrélation entre la taille des vésicules et l'efficacité de l'expression génétique peut être analysée dans notre système, bien que nous n'ayons pas trouvé de forte corrélation dans les conditions de nos expériences.

4.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons introduit deux nouveaux outils pour la fabrication de cellules artificielles. Tout d'abord, nous avons introduit une nouvelle méthode basée sur la compaction de l'ADN permettant l'insertion de brins d'ADN génomique pendant l'électroformation des vésicules. Malgré un rendement d'encapsulation faible, nous avons obtenu des vésicules d'une qualité sans précédent contenant un unique brin d'ADN de cette longueur (166 kb). Dans un deuxième temps, nous avons développé un outil informatique d'analyse d'image permettant de suivre l'expression de protéines fluorescente dans un nombre important de vésicules uniques simultanément. Cet outil a été utilisé pour analyser des observations en microscopie confocale d'expériences de transcription et de translation dans des liposomes fabriqués par une méthode de transfert et contenant un système minimal d'expression génétique. Les résultats de l'analyse ont permis de quantifier la concentration de protéines exprimée et a permis d'identifier une variabilité du niveau d'expression des protéines entre les vésicules.

Conclusion générale

Cette thèse a permis de développer de nouvelles méthodes de dépôts et de formation de motifs d'intérêt biologique sur des substrats solides. Les phénomènes physiques mis en jeu dans ces méthodes ont été analysés pour mieux en cerner les contraintes et optimiser les paramètres de procédé. L'introduction de la micro-aspiration en microfluidique nous a conduits à assembler des dispositifs de façon simple et réversible permettant ainsi de produire des surfaces fonctionnalisées avec des motifs micrométriques en contrôlant spatialement la mise en contact des solutions sur les surfaces. De cette manière, des protéines ont pu être déposées localement avec une résolution importante. La circulation de différentes solutions et l'application successive de ces dispositifs a permis en plus de créer des motifs de compositions variées ou des gradients de concentration sur les surfaces. Ces dispositifs ont également été utilisés avec des protocoles de chimie de surface plus complexes, liant de manière covalente les protéines sur le substrat. En se basant sur cette méthode d'assemblage réversible, nous avons aussi démontré une nouvelle approche de microcontact printing, le microcontact printing multi-couleurs qui est plus souple que d'autres méthodes de dépôts, puisqu'elle permet de créer des motifs de composition hétérogène à l'aide du transfert moléculaire par un tampon.

L'utilisation de la micro-aspiration a également permis le transport de matières à travers les dispositifs, offrant un moyen simple d'évacuer l'air contenu dans des espaces confinés à travers leurs parois. La réversibilité des dispositifs associée au contrôle du transport de la matière a ainsi permis de réaliser des motifs en volume composés de matériaux exotiques.

Toutefois, les méthodes de transfert ou de moulage ne permettent pas toujours de respecter l'organisation interne de la matière déposée. Ce constat a été établi en étudiant l'électroformation de vésicules unilamellaires géantes de taille contrôlée à partir de motifs de phospholipide déposé sur une électrode. Le processus de formation de ces vésicules est très sensible à l'organisation du film précurseur et nous avons montré que le contrôle de la taille des vésicules par une approche « motif » doit passer par un contrôle fin de leur structure interne. Pour mieux contrôler l'organisation des films déposés, nous avons étudié la méthode du retrait de ménisque qui a été appliquée pour la première fois à ce type de dépôt. Cette approche a permis d'obtenir des films multilamellaires de phospholipide avec un contrôle de l'épaisseur sans précédent. De plus, nous avons montré que ce type de dépôt peut être utilisé pour créer des motifs, soit en guidant le dépôt avec un substrat pré-structuré, utilisant les propriétés capillaires du ménisque, soit par l'émergence d'instabilités de mouillage sur un substrat plan qui permettent d'obtenir une grande variété de motifs dont l'organisation à l'échelle micrométrique a une homogénéité sans précédent. L'utilisation de ces

motifs pour la fabrication de vésicules a montré certains avantages en comparaison des motifs obtenus par d'autres méthodes. Néanmoins, il serait nécessaire de faire plus d'expériences pour aboutir à la production de vésicules unilamellaires géantes monodisperses. Clairement, cet objectif ne pourra être réalisé qu'avec une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeu dans la dynamique microscopique de la ligne de contact soumise à l'évaporation.

L'utilisation de ces dépôts dans les applications biologiques, permet un contrôle statique du support de culture cellulaire. Par exemple, la croissance de neurones sur ces substrats a été guidée par la présence des motifs et la culture de cellules dans des dispositifs réversibles a également été démontrée. L'utilisation de ces systèmes devrait permettre à l'avenir de combiner un contrôle statique par des fonctionnalisations de surfaces complexes et le contrôle dynamique du microenvironnement lors des cultures cellulaires, offrant un outil souple et performant à l'étude du comportement des cellules.

Quant à elle, la fabrication de motifs en volume est particulièrement adaptée à la fabrication de dispositifs microfluidiques composites, mariant des matériaux biocompatibles dont les propriétés sont difficilement compatibles avec les technologies traditionnelles de fabrication. La fabrication de dispositifs composés d'un sandwich verre/PDMS/verre, utilisant une technique de transfert du PDMS, a permis de fabriquer des canaux de moins d'un micromètre d'épaisseur, pouvant contraindre sur deux dimensions la culture de bactéries E-Coli, permettant le suivi de cellules individuelles sur de très grandes populations de bactéries.

Cette méthode de transfert, inspirée du microcontact printing, a également permis d'obtenir des réseaux de vésicules monodisperses par électroformation de vésicules géantes à partir de motifs de phospholipide. Le caractère monodisperse de ces vésicules est perdu après extraction des vésicules de la cellule de gonflement et une autre approche est nécessaire pour obtenir des vésicules monodisperses en solution. Par exemple, l'utilisation d'un masque en silice a permis d'obtenir un contrôle sans précédent de la taille de vésicules extraites de la cellule de gonflement. Les dépôts de motifs de phospholipide utilisant des instabilités de mouillage sont prometteurs car ils ne génèrent pas de vésicules de petite taille comme le font les motifs déposés par les autres méthodes. D'autre part, nous avons montré qu'il était possible d'encapsuler de l'ADN génomique dans ces vésicules, en utilisant une méthode de compaction de l'ADN par des ions multivalents. L'ensemble de ces techniques pose les bases de la compréhension du phénomène d'électroformation, même si celui-ci n'est toujours pas totalement élucidé.

Enfin, les méthodes acquises pour l'étude des vésicules ont permis l'analyse d'expériences d'expression et de translation de protéines dans des liposomes réalisés par une méthode de transfert. L'outil développé a permis de mesurer la cinétique d'expression et d'identifier une certaine variabilité d'expression entre les liposomes. Une analyse plus approfondie des données a permis d'en discuter l'origine. Ce type d'analyse devrait permettre à terme de comprendre les mécanismes régissant la régulation de l'expression génétique.

La fabrication de motifs de matière sur une surface est un art impliquant plusieurs disciplines. La fabrication d'assemblages réversibles efficaces nécessite une bonne connaissance de leur mécanique. Le contrôle des fluides dans les systèmes micrométriques nécessite la compréhension de la mécanique des fluides et des phénomènes de capillarité. D'autre part, certains matériaux comme le PDMS laissent facilement diffuser les petites molécules dont une grande quantité peut

être solubilisée dans le matériau. Ces phénomènes posent des difficultés techniques, mais peuvent être avantageusement utilisés lorsqu'ils sont bien compris. Par exemple, la coexistence sur une surface de zones vierges et de zones comportant de la matière lors de la création de motifs peut poser des problèmes de mouillage pour les matériaux visqueux, mais ces propriétés de mouillage peuvent également être utilisées pour la formation de motifs qu'il serait impossible de réaliser par une méthode de moulage ou de transfert direct. Nous avons proposé dans ce manuscrit des modèles pour décrire certains de ces phénomènes, mais de nombreux comportements restent à comprendre. Leur compréhension sera nécessaire à l'amélioration des technologies de fabrication de motifs.

Pour finir, les perspectives des thèmes abordés dans ce travail sont multiples. Nous avons montré à travers différentes démonstrations les possibilités de la micro-aspiration. Celle-ci permet de réaliser des motifs de protéines de différents types. La croissance des cellules peut être contrainte par ces motifs et la fabrication de gradients de concentration de protéines sur une surface permettra de guider la croissance ou le déplacement des cellules par chemotaxie. Ce contrôle statique pourra être bien évidemment complété par un contrôle dynamique en utilisant des dispositifs microfluidiques. L'avantage de la méthode d'assemblage réversible repose sur sa capacité à pouvoir s'adapter à des substrats complexes et fragiles, sans les détériorer. La réversibilité des assemblages permet alors de réaliser de nombreux types d'analyse : *in situ*, sur cellule unique ou sur l'ensemble d'une culture. Il est également envisageable de réaliser des expériences de microfluidique directement sur des tissus vivants, ce qui offrirait aux biologistes un outil inédit d'étude du comportement des cellules *in vivo*. Ces nouveaux outils devraient ouvrir la porte à de nouvelles possibilités expérimentales en biologie cellulaire ou la mise à disposition d'outils pour contrôler le microenvironnement devient indispensable pour étudier le développement des cellules et pouvoir les conditionner afin d'étudier des mécanismes plus fins. Ce conditionnement de l'expérience est également nécessaire pour les expériences *in vitro* ou la compartimentation des réactions biochimiques devient mieux contrôlée dans les vésicules. Les dépôts de motifs de phospholipide multicouches pourraient offrir une alternative aux membranes supportées et la fabrication de vésicules de tailles contrôlées à partir de ces films sera utile pour étudier *in vitro* des mécanismes tels que la chemotaxie ou le rythme circadien, en étudiant le comportement de systèmes minimaux reconstitués.

Annexes

Annexe A

Autres applications de la microaspiration

A.1 Gravure locale par assemblage réversible

Les assemblages réversibles par micro-aspiration peuvent être utilisés de manière plus générale à des traitements chimiques de surface pour les localiser sur des zones de taille micrométrique. Pour illustrer ces possibilités, nous avons appliqué cette idée à la réalisation de micro-gravure chimique. Cette approche est intéressante face aux méthodes de lithographie classique, lorsque la surface à graver est incompatible avec les procédés classiques. Par exemple, si elle contient des molécules sensibles.

La figure A.1A montre la gravure de tranchés concentriques de 100 µm de large dans une couche de résine AZ9260 de 10 µm d'épaisseur avec un mélange de développeur AZ 400K:eau DI 4:1 (Clariant). Pour réaliser ces tranchés, le développeur a été simplement circulé pendant 5 min sur la couche de résine en utilisant des canaux scellés réversiblement. La résine présente sous les canaux est gravée alors que le reste de la couche est protégé par le dispositif.

Nous avons gravé de manière similaire une galette de silicium en utilisant une solution de KOH (50%wt à 70°C pendant 90 min)(figure A.1B). Nous avons pu observer dans ce cas que la solution de gravure pouvait s'infiltrer entre le PDMS et le silicium, altérant la surface aux environs de la zone gravée. Cette dernière expérience pointe les limites de la méthode dans certaines circonstances.

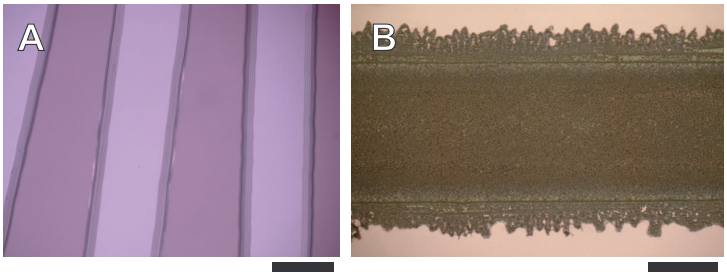


FIGURE A.1 – Gravure réalisée avec des assemblages réversibles. A) Dissolution d'une couche de 10 µm d'AZ9260. La barre représente 100 µm. B) Gravure d'une galette de silicium par écoulement d'une solution de KOH. La barre représente 200 µm.

A.2 Cristallisation de protéines sur puce.

Dans un dispositif similaire à celui présenté au second paragraphe du chapitre 4.1.2 (p. 42), l'utilisation d'une cellule de diffusion a été testée pour cristalliser la protéine lysozyme. 4 cellules contenant des chambres de différents volumes pour les protéines (4, 7, 11 et nl) et des chambres contenant un même volume d'agent précipitant ont été remplies en utilisant des canaux d'aspiration. Après ouverture des vannes séparant les chambres, les liquides ainsi mis en contact ont commencé à diffuser. Après 48 h, des cristaux de lysozyme ont été observés dans la zone de diffusion : un petit cristal pour la chambre de 11 nl, plusieurs cristaux de taille moyenne pour la chambre de 15 nl (figure A.2) et aucun cristal dans les autres chambres. Ce résultat illustre les possibilités de criblage de telles cellules. En bénéficiant de volumes morts réduits, la technique de la micro-aspiration donne une alternative simple pour la réduction des coûts des systèmes intégrés de criblage de conditions de cristallisation des protéines.

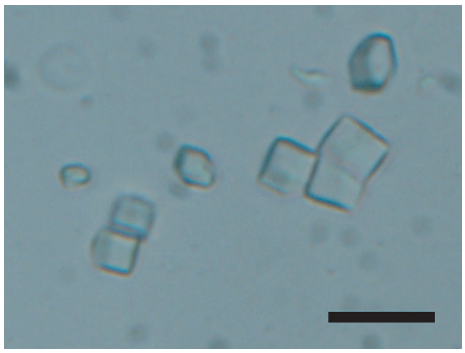


Figure A.2 – Cristal de lysozyme observé en microscopie en transmission dans la zone de diffusion de la chambre de protéine de 15 nl. La barre d'échelle représente 20 µm.

Méthode

Cristallisation de protéines. La méthode de diffusion a été utilisée lors des expériences de cristallisation de protéines. La solution de protéine lysozyme de 40 mg/mL a été solubilisée dans 0,1 M de tampon acétate (pH 4,5) et une solution de 2,5 M de NaCl en présence de 0,1 M de tampon acétate (pH 4,5) a été utilisée comme agent précipitant. Après injection, le dispositif a été placé dans une atmosphère saturée en eau pour éviter l'évaporation de l'eau à travers le PDMS.

Annexe B

Procédés technologiques de microfabrication

B.1 Photolithographie

AZ5214E

L'AZ 5214E, fabriquée par Clariant, est une résine photosensible inversible, c.-à-d. qui peut être positive ou négative en fonction de la manière dont elle est utilisée. Elle est généralement utilisée en positive avant une étape de gravure en profitant du meilleur de sa résolution et en négative pour faire du lift-off de dépôts métalliques ou autres (retrait de la matière après dépôt par dissolution de la résine) en profitant du profil particulier de ses flancs dans ce cas qui permettent un retrait aisé de la matière après dépôt. Elle permet de réaliser des motifs de 1 à 3 µm d'épaisseur. Les recettes suivantes ont été optimisées pour les conditions du laboratoire pour réaliser des structures de 1,4 µm d'épaisseur ayant une résolution inférieure à 2 µm.

Le procédé optimal est le suivant pour l'utilisation sur des substrats de verre ou de silicium :

1. Plasma air 2 min 500 mTorr (Harrick plasma cleaner).
2. Exposition au TMCS (Sigma) 5 min.
3. Recuit sur plaque chauffante 2 min à 125 °C.
4. Laisser refroidir 2 min.
5. Spin coating de la résine 30 s à 3000 rpm (accélération 2000 $rpm.s^{-1}$) après une première étape d'étalement de 5 s à 500 rpm (accélération 200 $rpm.s^{-1}$).
6. Recuit sur plaque chauffante 60 s à 125 °C pour substrat silicium et lamelle de verre fine et 90 s pour lame de verre épaisse.
7. Laisser refroidir 2 min.

Ensuite, en positif :

1. Exposition avec le masque en contact 8 s a 40 mW/cm^2

2. Tremper dans une solution de développeur AZ MIF768 (Clariant) pur environ 30 s. (attendre que la résine disparaisse à l'œil dans les motifs puis attendre 5 s supplémentaires puis tremper immédiatement dans un bain d'eau DI donne de bons résultats)

En négatif :

1. Exposition avec le masque en contact 2,5 s a 40 mW/cm^2
2. Chauffage sur plaque chauffante 45 s à 125 °C pour substrat silicium et lamelle de verre fine et 80 s pour lame de verre épaisse
3. Laisser refroidir 2 min
4. Exposition sans masque 10 s a 40 mW/cm^2
5. Tremper dans une solution de développpeur AZ MIF768 (Clariant) pur environ 30 s. (idem positif)

AZ9260

L'AZ 9260 (Clarient) est une résine épaisse positive. Elle permet de réaliser des structures entre 5 et 20 µm d'épaisseur en une seule couche et plus de 100 µm d'épaisseur en plusieurs couches. Après l'étape de photolithographie, cette résine peut être fluée, c.-à-d. après un recuit au dessus de sa température de fusion, la résine se liquéfie et les angles des structures s'arrondissent sous l'effet de la tension de surface. Cette technique peut avantageusement être utilisée pour fabriquer des canaux ayant des profils arrondis. Elle est par exemple utilisée pour réaliser les moules des vannes en lithographie molle multicouche, la forme arrondie des vannes permettant une meilleure étanchéité lorsque le canal est pincé.

Le procédé de fabrication est le suivant pour réaliser des structures de 10 µm de hauteur sur un substrat de silicium. Pour d'autres épaisseurs, on se reportera à la documentation constructeur pour adapter les temps de recuit et d'insolation :

1. Plasma air 2 min 500 mTorr (Harrick plasma cleaner).
2. Exposition au TMCS (Sigma) 5 min.
3. Chauffage sur plaque chauffante 2 min à 110 °C.
4. Laisser refroidir 2 min.
5. Spin-coating de la résine 60 s à 2000 rpm (accélération 300 rpm.s^{-1}) après une première étape d'étalement de 5 s à 500 rpm (accélération 100 rpm.s^{-1}).
6. Recuit sur plaque chauffante 3 min 30 à 110 °C s'il n'y a qu'une couche à déposer et 4 min 30 à 110 °C s'il y a plusieurs couches à déposer.
7. Laisser refroidir 5 min (Ce temps de repos est nécessaire pour laisser la résine se réhydrater. Il doit être augmenté pour des couches plus épaisses, jusqu'à 4 h. pour 100 µm d'épaisseur).
8. Exposition avec le masque en contact 35 s à 40 mW/cm^2
9. Si plus d'une couche doivent être déposées, reprendre à l'étape 5.

10. Tremper dans une solution de développeur AZ AZ400K [1]/eau DI (1/4 vol/vol) environ 2 min pour une couche. (Attendre que la résine disparaisse à l'œil dans les motifs puis attendre 30 s supplémentaires)
11. Rincer à l'eau DI.
12. Optionnellement, Recuire 6 min. à 90°C pour fluer la résine.

SU8

La SU8 est une résine époxy, épaisse et négative. Elle est déclinée en plusieurs versions en fonction de la gamme d'épaisseur désirée, le dernier chiffre donnant l'épaisseur nominale en micromètres (SU8 2002, 2005, 2010, 2050 et 2100). Après l'étape de photolithographie, cette résine ne peut pas être fluée et difficilement dissoute car le polymère dont elle est constituée est réticulé et chimiquement résistant. En revanche, elle peut être photolithographiée successivement sur plusieurs couches ce qui permet de réaliser des structures complexes en trois dimensions.

Le procédé de fabrication est le suivant pour réaliser des structures de 6 µm de hauteur sur un substrat de silicium. Pour d'autres épaisseurs, on se reportera aux documentations du constructeur pour adapter les temps de recuit et d'insolation. :

1. Plasma air 2 min 500 mTorr (Harrick plasma cleaner).
2. Spin coating de la résine 30 s à 2000 rpm (accélération 500 rpm.s^{-1})
3. Recuit sur plaque chauffante 2 min à 65 °C.
4. Recuit sur plaque chauffante 4 min à 95 °C.
5. Recuit sur plaque chauffante 2 min à 65 °C.
6. Laisser refroidir 2 min.
7. Exposition avec le masque en contact 7 s à 40 mW/cm^2
8. Recuit sur plaque chauffante 2 min à 65 °C.
9. Recuit sur plaque chauffante 3 min à 95 °C.
10. Recuit sur plaque chauffante 2 min à 65 °C.
11. Tremper dans une solution de développeur « SU8 developer » pure environ 17 s.
12. Rincer à l'isopropanol.

B.2 Lithographie molle

Le terme de lithographie molle regroupe l'ensemble des technologies de fabrication de motifs en utilisant les propriétés hyper-élastiques et conformationnelles des élastomères, que ce soit pour le moule ou pour l'objet moulé (Moulage de PDMS [15], microcontact printing (µCP) [11], lithographie molle multicouche (MLSL) [48], micro-moulage capillaire (MIMIC) [17], lithographie par nanoimpression molle (soft-NIL) [63] etc.). Les paragraphes suivants décrivent les procédés technologiques des techniques utilisées lors de cette thèse, à savoir le moulage de PDMS pour réaliser des microcanaux ou des tampons de microcontact

1. Clariant

printing, la lithographie molle multicouche qui permet de réaliser des dispositifs microfluidiques contenant des vannes et le microcontact printing pour imprimer des motifs micrométriques de molécules sur une surface.

Moulage de PDMS

Le moulage du PDMS permet de fabriquer simplement et rapidement des pièces micro-usinées. Il profite de la grande élasticité du PDMS qui permet un démoulage aisé, sans risque de détériorer les structures [15].

Pour fabriquer les pièces, un mélange de polymère PDMS - Généralement du RTV615 qui est biocompatible (General Electrics) - et d'agent réticulant est tout d'abord mélangé. Ce mélange peut être fait à la main (vigoureusement avec une touillette pendant 3 min.) ou à l'aide d'un mélangeur planétaire qui évitera la formation de bulles pendant le mélange (Par exemple Uni-cyclone UM-103S). La proportion de réticulant va définir l'élasticité de l'élastomère final (10 :1 wt :wt pour obtenir un module de Young de 0,7 MPa [31]). Le mélange est versé dans le moule et laissé reposé environ deux heures pour laisser remonter les éventuelles bulles. Pour certaines microstructures profondes, il est nécessaire de réaliser un dégazage du PDMS sous vide modéré pour éliminer les bulles restées dans les structures et éviter la croissance de nouvelles bulles lors de la cuisson (15 min à 150 mBar). Le PDMS dans son moule est ensuite cuit à 80 °C pendant 45 minutes (pour une couche de 1 cm d'épaisseur), puis laissé refroidir à l'air libre. Le démoulage se fait à la main sans précautions particulières.

Préparation du moule. Les moules sont généralement réalisés à partir de structures fabriquées par photolithographie sur une galette de silicium. Pour le moulage, la galette est fixée au fond d'une boîte de pétrie à l'aide de rubans adhésifs. Comme les structures de résine sont relativement fragiles, il est préférable de réaliser un traitement anti-adhésif avant le moulage, par exemple une exposition de 5 min à des vapeurs de TMCS suivi d'un recuit de 10 min. dans l'étuve à 80°C. Si une étape de plasma est utilisée avant le traitement au TMCS pour augmenter la densité de groupement méthyl qui se fixe sur la surface, on pensera à attendre 24 à 48 h. avant d'utiliser le moule, le temps que les groupes réactifs résiduels soient désactivés, pour éviter que le PDMS se lie chimiquement à la surface.

Fabrication de microcanaux en PDMS sur verre. Une fois le bloc de PDMS démoulé, des accès aux chambres et aux canaux sont réalisés en perçant le bloc de PDMS avec une aiguille plate de diamètre adapté

Lithographie molle multicouche

Pour réaliser des dispositifs plus complexes, plusieurs couches de PDMS moulées peuvent être superposées : c'est la lithographie molle multicouche. D'autre part, en étalant le PDMS sur le moule par spin-coating, il est possible de réaliser des couches minces de PDMS entre les canaux, qui peuvent être déformés par la pression appliquée dans un canal. On réalise ainsi des micro-vannes et pompes péristaltiques qui ont beaucoup été utilisées dans les dispositifs microfluidiques en PDMS [48]. Le procédé suivant permet de réaliser des dispositifs contenant des vannes fonctionnelles :

Moulage de la couche inférieure. Le moule utilisé est réalisé par photolithographie sur une galette de silicium. Après moulage d'une couche de 1 cm de PDMS, les dispositifs sont découpés à la taille voulue à l'aide d'un scalpel et les trous de connexion fluidique sont réalisés à l'aide d'un emporte-pièce de taille adaptée (Une aiguille de seringue à tête plate pour les connexions avec les tubes tygon).

Moulage de la couche supérieure. Un traitement antiadhésif est appliqué pour un démoulage plus aisé (par exemple une exposition de quelques minutes à des vapeurs de TMCS). La couche de 10 µm d'épaisseur de PDMS est déposé par spin-coat (60 s à 5000 rpm) d'un mélange de PDMS:réticulant (15:1), puis recuit 4 min à 95°C sur plaque chauffante.

Assemblage. Avant assemblage, la couche supérieure et la couche inférieure sont traitées par un plasma d'air pendant 30 s, puis laissées sous vide pendant 5 min pour dégazer le PDMS et éviter ainsi la présence de bulle d'air entre les deux couches après assemblage. La couche inférieure est ensuite alignée puis déposée sur la couche supérieure en appliquant une légère pression. La structure est chauffée telle quelle pendant 3 h dans une étuve à 80°C pour obtenir un bon collage des deux parties.

Les dispositifs sont ensuite découpés et les trous de connexion de la couche supérieure sont réalisés avec l'emporte-pièce. Le dispositif est finalement collé sur une lame de verre après un même traitement plasma.

B.3 Traitements de surface

Silanisation

L'opération de silanisation est l'opération de greffage d'un silane, une molécule portant une fonction -Si(EtOH)$_n$ (ethoxysilane), -Si(MetOH)$_n$ (méthoxysilane) ou -SiCl$_n$ (chloroysilane), sur une surface comportant des terminaisons -SiOH (silanol). Cette opération est très sensible à la présence d'eau qui provoque la condensation des monomères de silanes en oligomères. Pour cela, le solvant utilisé (toluène) est anhydre et sur tamis moléculaire. Lors de la manipulation des bouteilles de silane, qui sont souvent fournies par le fabricant sans septum, l'eau vient immanquablement polluer le liquide et nous avons remarqué que la qualité de la fonctionnalisation se dégradait rapidement avec l'âge des bouteilles. Pour éviter ce phénomène, il est préférable de diviser le stock de silane ou de le transférer dans une fiole munie d'un septum. L'étape d'activation de la surface a généralement été réalisée par plasma car c'est la méthode la plus simple qui donne de très bons résultats si la surface n'est pas polluée. Néanmoins, elle peut être remplacée par une étape d'oxydation au piranha qui donne de meilleurs résultats si la surface est polluée par des molécules organiques. D'autres procédés plus complexes existent, mais n'ont pas été utilisés. Le procédé que nous utilisons est le suivant :

1. Nettoyage des substrats à l'acétone puis à l'isopropanol dans un bain à ultrasons
2. Activation de la surface par plasma air (Harrick plasma cleaner) 2 min à 500 mTorr, puissance maximum.
3. Trempage de l'échantillon pendant 40 min dans une solution de 2 vol% de silane contenant 1,5 %vol de butylamine dans du toluène anhydre. Cette

étape est réalisée dans un bocal en verre de forme adaptée à l'échantillon, fermé hermétiquement pour empêcher l'eau de pénétrer et trempé dans un bain à ultrasons.

4. L'échantillon est ensuite rincé deux fois au toluène puis à l'eau ultra-pure.

Conjugaison des protéines et polypeptides par le marqueur Cy3

Ce protocole est inspiré du manuel du kit de fluorescence et du guide d'utilisation des colonnes de chromatographie. Il a bien fonctionné pour marquer la BSA et la PORN

Materiel :

- environ 250 mL de tampon bicarbonate (Na_2HCO_3) ajusté à pH 9 avec de la soude.
- kit de fluorescence orange 548 (Fluka)
- Colonnes de chromatographie jetable Sephadex G25 PD10

Protocole :

- Préparer 8 mL de solution de la protéine dans le tampon à 2mg/mL.
- Ajouter 400 µL de tampon dans le réactif fluorescent.
- Mélanger le réactif et la protéine puis attendre une heure.
- Rincer une colonne PD 10 avec 5x5 mL de tampon.
- Faire passer le produit 2,5 mL de produit fluorescent dans la colonne.
- Éluer avec 3,5 mL de tampon.
- Récupérer le produit de la colonne entre 2 et 6 mL.
- Rincer la colonne avec 25 mL de tampon.
- Recommencer la procédure pour le reste de la solution.

La solution finale contient environ 1,4 mg/mL de protéine fluorescente.

Annexe C

Méthodes pour l'expression de protéines

Préparation de l'ADN

Les ADN matrices codant l'EGFP et la GFPuv ont été préparés par PCR. Tous les primers utilisés proviennent de Hokkaido System Science. L'ADN matrice est préparé par une PCR à 2 étapes : dans la première étape, la séquence contenant la zone de fixation au ribosome (séquence SD) est ajoutée à l'extrémité 5' de l'ADN. Ensuite, les séquences de régulation contenant un promoteur T7 sont ajoutées lors de la seconde PCR. Pour préparer l'ADN codant l'EGFP, le vecteur pEGFP-N1 (Clontech) a été utilisé comme matrice mère et sa phase ouverte de lecture (ORF) avec les séquences SD est amplifiée par les primers EGFP fwd et EGFP rev. Après la première PCR, la seconde PCR a été réalisée en utilisant les primers T7 fwd et EGFP rev. L'ADN amplifié est ensuite purifié sur gel d'agarose (SEAPLAQUE GTG AGAROSE, FMC bioproducts) suivi par une précipitation dans l'éthanol. L'ADN codant la GFPuv a été préparé à partir de vecteurs GFPuv (Clontech) comme matrice d'origine et les fragments ont été amplifiés en utilisant les primers GFPuv fwd et GFP rev de la même manière que pour l'EGFP. Les primers utilisés ont les séquences suivantes :

primer EGFP fwd : 5'-AAGGAGATATACCAATGGTGAGCAAGGGCGA-G-3'

primer EGFP rev : 5'-TATTCATTACCCGGCGGCGGTCACGAA-3'

primer T7 fwd : 5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACA-ACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATA-TACCA-3'

primer GFP uv fwd : 5'-AAGGAGATATACCAATGAGTAAAGGAGAAG-AAC-3'

primer GFP uv rev : 5'-TATTCATTATTTGTAGAGCTCATCC-3'

Préparation de l'ARN

L'ARN codant l'EGFP est préparé in vitro en utilisant le kit MEGAscript (Ambion) en suivant les instructions du fabricant. Après transcription, du TURBO DNase (Ambion) est ajouté pour éliminer l'ADN pouvant contaminer l'expérience. L'ARN généré a été purifié par RNeasy MinEluteTM Cleanup

Kit (QIAGEN) en suivant les instructions du fabricant.

Préparation de la protéine recombinante GFPuv

La protéine recombinante GFPuv a été achetée chez Clontech.

Test de translation in vitro

Les réactions de translation encapsulées dans les liposomes ont été réalisées en utilisant le PURESYSTEM classic II 96 (Post Genome Institute, Co., Ltd. JAPAN). Le système est composé de 2 solutions A et B. Brièvement, la solution A contient 100 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 200 mM L-Glutamic acid Monopotassium salt, 4 mM spermidine, 26 mM Mg(OAc)2 , 2 mM DTT, 112 OD/ml tRNA mix, 20 µg/mL 10-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid, 4 mM ATP, 4 mM GTP, 2 mM CTP, 2 mM UTP, 40 mM creatine phosphate et 0.6 mM des 20 amino-acides. La solution B contient les ribosomes et différents facteurs protéiniques, comme de la polymerase d'ARN T7, IF 1-3, EF-G, EF-Tu, EF-Ts, RF 1-3 et RRF.

Préparation de l'huile minérale contenant des phospholipides

Une solution d'EPC (10 mM dans un mélange de chloroforme/méthanol 2/1 vol/vol) est versée dans une éprouvette. Le solvant est ensuite évaporé sous un flux d'azote puis séché sous vide pendant 10 min. pour laisser un fin film de lipide au fond du tube. 500 µL d'huile minérale (Nakarai Tesque, Inc., JAPAN) est ajouté sur le film avant de plonger le tube dans un bain à ultrasons pendant 60 min. à 50 °C. Ensuite, la solution est mélangée avec un vortex pendant 20 s. Pour toutes les expériences, la solution de phospholipide est utilisée dans les quelques heures qui suivent sa préparation. La concentration finale de phospholipide était de l'ordre de 0,5-0,75 mM.

Préparation et observation de l'interface eau-huile.

La chambre d'observation est constituée d'une pièce de PDMS contenant un trou cylindrique de 4mm de diamètre et 5mm de profondeur collé sur une lame de microscope propre. 10 µL de solution extérieure (Solution de PURESYSTEM 9.6/0.4 A/B) sont étalés au fond de la chambre d'observation pour former une couche mince de liquide qui est couverte par l'huile minérale contenant 0,5-0,75 mM d'EPC (10 µL). La chambre est ensuite placée sur l'étage contrôlé en température d'un microscope inversé Axiovert 100 (Zeiss) équipé d'un module de microscopie confocal LSM 510 (Zeiss) et d'une unité de contrôle de température (Tokai Hit, JAPAN). La chambre est incubée pendant 10 min. avant le début de l'expérience.

Préparation des liposomes avec les réactifs d'expression

2,5 µL de solution intérieure est émulsifiée dans 50 µL d'huile minérale en aspirant alternativement le liquide avec une pipette. L'émulsion obtenue est ajoutée dans la chambre d'observation sur les deux couches de liquide déjà présentes juste après sa préparation. Après quelques minutes, les gouttes d'eau dans l'huile sont transférées spontanément à travers l'interface pour former des liposomes. Le système d'expression est maintenu dans la glace avant l'émulsification et l'expression des gènes est initiée dans la chambre d'observation qui est maintenue à 37 °C. Pour générer des liposomes stables à l'interface eau/huile, les solutions intérieures et extérieures sont composées comme suit : i) Solution

extérieure : 5 µL de solution A, 4,6 µL d'eau déionisée, 0,4 µL de Pure mix ; ii) solution intérieure : 5 µL de solution A, 2 µL d'eau déionisée, 2 µL de solution B et 1 µL de matrice d'ADN ou d'ARN.

Suivi en temps réel de l'expression des protéines

Des centaines de liposomes géants (de taille > 1 µm) contenant la solution d'expression génétique sont générés à l'interface eau/huile. Ceci nous a permis de suivre l'expression génétique dans de nombreux liposomes simultanément. Pour visualiser l'expression d'EGFP ou de GFPuv dans les liposomes, la microscopie confocale a été utilisée pour observer la fluorescence (excitation 488 nm et observation à 505-530 nm).

Bibliographie

[1] M. J. Madou : *Fundamentals of Microfabrication.* CRC Press, Boca Raton, 1991.

[2] P. S. Dittrich et A. Manz : Lab-on-a-chip : microfluidics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5:210–218, 2006.

[3] J. El-Ali, P. K. Sorger et K. F. Jensen : Review article cells on chips. *Nature*, 442:403–411, 2006.

[4] H. Sorribas, C. Padeste et L. Tiefenauer : Photolithographic generation of protein micropatterns for neuron culture applications. *Biomaterials*, 23(3):893–900, 2002.

[5] G. Ramsay : DNA chips : State-of-the art. *Nature Biotechnology*, 16:40–44, 1998.

[6] P. Calvert : Inkjet printing for materials and devices. *Chem. Mater.*, 13:3299–3305, 2001.

[7] R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong et C. A. Mirkin : "dip-pen" nanolithography. *Science*, 283(5402):661–663, 1999.

[8] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, A. Bietsch, B. Michel et H. Biebuyck : Microfluidic networks for chemical patterning of substrates : Design and application to bioassays. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:5000–5008, 1998.

[9] X. Jiang, Q. Xu, S. K. W. Dertinger, A. D. Stroock, T. Fu et G. M. Whitesides : A general method for patterning gradients of biomolecules on surfaces using microfluidic networks. *Anal. Chem.*, 77:2338–2347, 2005.

[10] D. T. Chiu, N. L. Jeon, S. Huang, R. S. Kane, C. J. Wargo, I. S. Choi, D. E. Ingber et G. M. Whitesides : Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97(6):2408–2413, 2000.

[11] A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard et E. Delamarche : Microcontact printing of proteins. *Adv. Mater.*, 12:1067–1070, 2000.

[12] S. K. Sia et G. M. Whitesides : Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, 24:3563–3576, 2003.

[13] S. Y. Chou, P. R. Krauss et P. J. Renstrom : Nanoimprint lithography. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 14(6):4129–4133, 1996.

[14] Y. Chen et A. Pépin : Nanofabrication : Conventional and nonconventional methods. *Electrophoresis*, 22:187, 2001.

[15] Y. N. XIA et G. M. WHITESIDES : Soft lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 153:153–184, 1998.

[16] H. HIROSHIMA, M. KOMURO, N. KASAHARA, Y. KURASHIMA et J. TANIGUCHI : Elimination of pattern defects of nanoimprint under atmospheric conditions. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 42:3849–3853, 2003.

[17] E. KIM, Y. XIA et G. M. WHITESIDES : Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. *Nature*, 376:581 – 584, 1995.

[18] A. FOLCH, B.-H. JO, O. HURTADO, D. J. BEEBE et M. TONER : Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures. *Biomed. Mat. Res.*, 52:346–353, 2000.

[19] L. MALAQUIN, T. KRAUS, H. SCHMID, E. DELAMARCHE et H. WOLF : Particle placement through convective and capillary assembly. *Langmuir*, 23:11513–11521, 2007.

[20] H. YABU et M. SHIMOMURAN : Preparation of self-organized mesoscale polymer patterns on a solid substrate : Continuous pattern formation from a receding meniscus. *Adv. Funct. Mater.*, 15:4, 2005.

[21] J. XU, J. XIA, S. W. HONG, Z. LIN, F. QIU et Y. YANG : Self-assembly of gradient concentric rings via solvent evaporation from a capillary bridgea. *Phys. Rev. Lett.*, 96:066104, 2006.

[22] S. W. HONG, J. XIA et Z. LIN : Spontaneous formation of mesoscale polymer patterns in an evaporating bound solution. *Adv.Matter.*, 19:1413–1417, 2007.

[23] G. GUÉNA, C. POULARD et A. M. CAZABAT : Evaporating drops of alkane mixtures. *Colloids Surf., A*, 298:2–11, 2007.

[24] W. H. KO, J. T. SUMINTO et G. J. YEH : *Bonding Techniques for Microsensors Micromachining and Micropackaging of Transducers*. Elsevier, 1985.

[25] P. W. BARTH : Silicon fusion bonding for fabrication of sensors, actuators and microstructures. *Sensor Actuat. A-Phys.*, 23(1-3):919–926, 1990.

[26] J. C. MCDONALD et G. M. WHITESIDES : Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabrication of microfluidic devices. *Acc. Chem. Res*, 35:491–499, 2002.

[27] H. BAIER et F. BONHOEFFER : Axon guidance by gradients of a target-derived component. *Science*, 255(5043):472–475, 1992.

[28] N. L. JEON, S. K. W. DERTINGER, D. T. CHIU, I. S. CHOI, A. D. STROOCK et G. M. WHITESIDES : Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. *Langmuir*, 16(22):8311–8316, 2000.

[29] S. K. W. DERTINGER, X. JIANG, Z. LI, V. N. MURTHY et G. M. WHITESIDES : Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:12542–12547, 2002.

[30] E. DELAMARCHE, A. BERNARD, H. SCHMID, B. MICHEL et H. BIEBUYCK : Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks. *Science*, 276:779–781, 1997.

[31] D. ARMANI, C. LIU et N. ALURU : Re-configurable fluid circuits by PDMS elastomer micromachining. *In Micro Electro Mechanical Systems*, pages 222–227, 1999.

[32] A. FOLCH et M. TONER : Cellular micropatterns on biocompatible materials. *Biotechnol. Prog.*, 14:388–392, 1998.

[33] Y. XIA et G. M. WHITESIDES : Soft lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37:550–575, 1998.

[34] A. BERNARD, E. DELAMARCHE, H. SCHMID, B. MICHEL, H. R. BOSSHARD et H. BIEBUYCK : Printing patterns of proteins. *Langmuir*, 14:2225–2229, 1998.

[35] C. S. CHEN, M. MRKSICH, S. HUANG, G. M. WHITESIDES et D. E. INGBER : Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol. Progr.*, 14:356–363, 1998.

[36] M. THÉRY, V. RACINE, A. PÉPIN, M. PIEL, Y. CHEN, J.-B. SIBARITA et M. BORNENS : The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature Cell Biol.*, 7(10):947–953, 2005.

[37] N. L. JEON, H. BASKARAN, S. K. W. DERTINGER, G. M. WHITESIDES, L. Van de WATER et M. TONER : Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nature Biotechnol.*, 20:826–830, 2002.

[38] P. BOURIN, L SENSEBÉ et Charbord P. : Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) : données, controverses, perspectives. *Hématologie*, 10:434–443, 2004.

[39] A. TOUROVSKAIA, X. FIGUEROA-MASOT et A. FOLCH : Differentiation-on-a-chip : A microfluidic platform for long-term cell culture studies. *Lab Chip*, 4:14–19, 2005.

[40] C. CROZATIER : *Contrôle et analyse électrochimique de la réactivité biologique à l'échelle de la cellule unique dans un dispositif microfluidique.* Thèse de doctorat, Université Paris VII, 2007.

[41] E. JAKOBS et Y. HANEIN : Micrometer scale gel patterns. *In Proc of Transducer 05*, volume 2 (5-9), pages 1412–1415, 2005.

[42] A. A. S. BHAGAT, P. JOTHIMUTHU et I. PAPAUTSKY : Photodefinable polydimethylsiloxane (PDMS) for rapid lab-on-a-chip prototyping. *Lab Chip*, 7:1192–1197, 2007.

[43] B. KUCZENSKI, P. R. LEDUC et W. C. MESSNER : Pressure-driven spatiotemporal control of the laminar flow interface in a microfluidic network. *Lab Chip*, 7:647–649, 2007.

[44] N. T. NGUYEN, X. HUANG et T. K. CHUAN : MEMS-micropumps : a review. *J. Fluid Eng.*, 124:384–392, 2002.

[45] N. A. POLSON et M. A. HAYES : Microfluidics controlling fluids in small places. *Anal. Chem.*, 73(11):312A–319A, 2001.

[46] D. JUNCKER, H. SCHMID, U. DRECHSLER, H. WOLF, M. WOLF, B. MICHEL, N. de ROOIJ et E. DELAMARCHE : Autonomous microfluidic capillary system. *Anal. Chem.*, 74(24):6139–6144, 2002.

[47] T. THORSEN, S. J. MAERKL et S. R. QUAKE : Microfluidic large-scale integration. *Science*, 298(5593):580–584, 2002.

[48] M. A. UNGER, H.-P. CHOU, T. THORSEN, A. SCHERER et S. R. QUAKE : Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288:113–116, 2000.

[49] Y. C. TAN, J. S. FISHER, A. I. LEE, V. CRISTINI et A. P. LEE : Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting. *Lab Chip*, 4:292–298, 2004.

[50] C. SAUTER, K. DHOUIB et B. LORBER : From macrofluidics to microfluidics for the crystallization of biological macromolecules. *Cryst. Growth Des.*, 7:2247–2250, 2007.

[51] D. DI CARLO, L. Y. WU et L. P. LEE : Dynamic single cell culture array. *Lab Chip*, 6:1445–1449, 2006.

[52] K. HOSOKAWA, M. OMATA, K. SATO et M. MAEDA : Power-free sequential injection for microchip immunoassay toward point-of-care testing. *Lab Chip*, 6:236–241, 2006.

[53] M. A. EDDINGS et B. K. GALE : A PDMS-based gas permeation pump for on-chip fluid handling in microfluidic devices. *J. Micromech. Microeng.*, 16:2396–2402, 2006.

[54] C. L. HANSEN, E. SKORDALAKES, J. M. BERGER et S. R. QUAKE : A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99(26):16531–16536, 2002.

[55] J. CRANK et G. S. PARK : *Diffusion in polymers.* Academic Press Inc., New York, 1968.

[56] W. L. ROBB : Thin silicon membranes – their permeation properties and some applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 146:119–137, 1968.

[57] P. G. de GENNES, F. BROCHARD-WYART et D. QUÉRÉ : *Gouttes, bulles perles et ondes.* Echelle. Belin, 2005.

[58] J. CRANK : *The Mathematics of diffusion.* Oxford University Press, 1956.

[59] F. WU, L. LI, Z. XU, S. TAN et Z. ZHANG : Transport study of pure and mixed gases through PDMS membrane. *Chem. Eng. J.*, 117:51–59, 2006.

[60] T. C. MERKEL, V. I. BONDAR, K. NAGAI, B. D. FREEMAN et I. PINNAU : Gas sorption, diffusion, and permeation in poly(dimethylsiloxane). *J. Polym. Sci. B : Polym. Phys.*, 38:415–434, 2000.

[61] H.-C. SCHEER, H. SCHULZ, T. HOFFMANN et C. M. SOTOMAYOR TORRES : Problems of the nanoimprinting technique for nanometer scale pattern definition. *J. Vac. Sci. & Technol. B*, 16:3917–3921, 1998.

[62] Y. HIRAI, S. YOSHIDA et N. TAKAGI : Defect analysis in thermal nanoimprint lithography. *J. Vac. Sci. & Technol. B*, 21:2765–2770, 2003.

[63] E. ROY, Y. KANAMORI, M. BELOTTI et Y. CHEN : Enhanced UV imprint ability with a tri-layer stamp configuration. *Microelectron. Eng.*, 78-79: 689–694, 2005.

[64] W TAN et T. A. DESAI : Microscale multilayer cocultures for biomimetic blood vessels. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 72:146–160, 2005.

[65] T. MATSUMOTO, J.-I. SASAKI, E. ALSBERG, H. EGUSA, H. YATANI et T. SOHMURA : Three-dimensional cell and tissue patterning in a strained fibrin gel system. *Plos One*, 2(11):e1211, 2007.

[66] E. SACHLOS et J. T. CZERNUSZKA : Making tissue engineering scaffolds work. review : The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur. Cell Mater.*, 5:29–40, 2003.

[67] A. PLECIS et Y. CHEN : Fabrication of microfluidic devices based on glass-PDMS-glass technology. *Microelectron. Eng.*, 84(5-8):1265–1269, 2007.

[68] A. B. LINDNER, R. MADDEN, A. DEMAREZ, E. J. STEWART et F. TADDEI : Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(8):3076–3081, 2008.

[69] LADYOFHATS : Diagrame détaillé membrane cellulaire.svg. Domaine publique, 2007.

[70] G. CEVC et D. MARSH : *Phospholipid Bilayers. Physical Principles and Models.* Cell biology. Wiley, New York, 1987.

[71] F. M. MENGER, M. E. CHLEBOWSKI, A. L. GALLOWAY, H. LU, V. A. SEREDYUK, J. L. SORRELLS et H. ZHANG : A tribute to the phospholipid. *Langmuir*, 21:10336–10341, 2005.

[72] J. N. ISRAELACHVILI : *Intermolecular and surface forces.* Academic Press Inc., 1985.

[73] J. A. VIRTANEN, K. H. CHENG et P. SOMERHARJU : Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:4964–4969, 1998.

[74] F. SCHUBER, A. KICHLER, C. BOECKLER et B. FRISCH : Liposomes : from membrane models to gene therapy. *Pure Appl. Chem.*, 70(1):89–96, 1998.

[75] V. TORCHILIN et V. WEISSIG : *Liposomes.* Oxford University Press, New York, 2003.

[76] A. A. DATE, B. NAIK et M. S. NAGARSENKER : Novel drug delivery systems : Potential in improving topical delivery of antiacne agents. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 19:2–16, 2004.

[77] D. M. VRIEZEMA, M. C. ARAGONÈS, J. A. A. W. ELEMANS, J. J. L. M. CORNELISSEN, A. E. ROWAN et R. J. M. NOLTE : Self-assembled nanoreactors. *Chem. Rev.*, 105:1445–1489, 2005.

[78] A. C. FORSTER et G. M. CHURCH : Towards synthesis of a minimal cell. *Mol. Syst. Biol.*, 2(45):1–10, 2006.

[79] M. M. HANCZYC et J. W. SZOSTAK : Replicating vesicles as models of primitive cell growth and division. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 8:660–664, 2004.

[80] S. L. VEATCH et S. L. KELLER : Seeing spots : Complex phase behavior in simple membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1746:172–185, 2005.

[81] T. BAUMGART, A. T. HAMMOND, P. SENGUPTA, S. T. HESS, D. A. HOLOWKA, B. A. BAIRD et W. W. WEBB : Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(9):3165–3170, 2007.

[82] K. SIMONS et E. IKONEN : Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387:569–572, 1997.

[83] P. MELEARD, C. GERBEAUD, T. POTT, L. FERNANDEZ-PUENTE, I. BIVAS, M. D. MITOV, J. DUFOURCQ et P. BOTHOREL : Bending elasticities of model membranes : Influences of temperature and sterol content. *Biophys. J.*, 72:2616–2629, 1997.

[84] L. LIMOZIN, A. ROTH et E. SACKMANN : Microviscoelastic moduli of biomimetic cell envelopes. *Phys. Rev. Letters*, 95:178101, 2005.

[85] M. OSAWA, D. E. ANDERSON et H. P. ERICKSON : Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science*, 320:792–794, 2008.

[86] M. HONDA, K. TAKIGUCHI, S. ISHIKAWA et H. HOTANI : Morphogenesis of liposomes encapsulating actin depends on the type of actin-crosslinking. *J. Mol. Biol.*, 287:293–300, 1999.

[87] N. KHALIFAT, N. PUFF, S. BONNEAU, J.-B. FOURNIER et M. I. ANGELOVA : Membrane deformation under local ph gradient : Mimicking mitochondrial cristae dynamics. *Biophys. J.*, 2008. in press.

[88] A.-S. CANS, N. WITTENBERG, R. KARLSSON, L. SOMBERS, M. KARLSSON, O. ORWAR et A. EWING : Artificial cells : Unique insights into exocytosis using liposomes and lipid nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(2):400–404, 2003.

[89] A.-S. SMITH, B. G. LORZ, U SEIFERT et E. SACKMANN : Antagonist-induced deadhesion of specifically adhered vesicles. *Biophys. J.*, 90:1064–1080, 2006.

[90] W. RÖMER, L. BERLAND, V. CHAMBON, K. GAUS, B. WINDSCHIEGL, D. TENZA, M. R. E. ALY, V. FRAISIER, J.-C. FLORENT, D. PERRAIS, C. LAMAZE, G. RAPOSO, C STEINEM, P. SENS, P. BASSEREAU et L. JOHANNES : Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature*, 405:670–675, 2007.

[91] V. NOIREAUX et A. LIBCHABER : A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(51):17669–17674, 2004.

[92] A. V. PIETRINI et P. L. LUISI : Cell-free protein synthesis through solubilisate exchange in water/oil emulsion compartments. *Chem. Bio Chem.*, 5:1055–1062, 2004.

[93] Y. YAMASHITA, M. OKA, T. TANAKA et M. YAMAZAKI : A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals in them. *Biochim. Biophys. Acta*, 1561:129–134, 2002.

[94] A. KARLSSON, R. KARLSSON, M. KARLSSON, A. S. CANS, A. STROMBERG, F. RYTTSEN et O. ORWAR : Networks of nanotubes and containers. *Nature*, 409:150–152, 2001.

[95] D. STAMOU, C. DUSCHL, E. DELAMARCHE et H. VOGEL : Self-assembled microarrays of attoliter molecular vessels. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42: 5580–5583, 2003.

[96] S. M. CHRISTENSEN et D. STAMOU : Surface-based lipid vesicle reactor systems : fabrication and applications. *Soft Matter*, 3:828–836, 2007.

[97] P. BOLINGER, D. STAMOU et H. VOGEL : Integrated nanoreactor systems : Triggering the release and mixing of compounds inside single vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:8594–8595, 2004.

[98] L. DUAN, Q. HE, K. WANG, X. YAN, Y. CUI, H. MÖHWALD et J. LI : Adenosine triphosphate biosynthesis catalyzed by f_0f_1 ATP synthase assembled in polymer microcapsules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46:6996–7000, 2007.

[99] T. MATSUURA et T. YOMO : In vitro evolution of proteins. *J. Biosci. Bioeng.*, 101(6):449–456, 2006.

[100] D. D. LASIČ : The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.*, 256:1–11, 1988.

[101] J. PEREIRA-LACHATAIGNERAIS, R. PONS, P. PANIZZA, L. COURBIN, J. ROUCH et O. LÓPEZ : Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chem. Phys. Lipids*, 140:88–97, 2006.

[102] J.P. REEVES et R.M. DOWBEN : Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *J. Cell. Physiol.*, 73:49–60, 1969.

[103] N. RODRIGUEZ, F. PINCET et S. CRIBIER : Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation : A comparison by fluorescence microscopy. *Colloids Surf., B*, 42:125–130, 2005.

[104] L. A. BAGATOLLI, T. PARASASSI et E. GRATTON : Giant phospholipid vesicles : comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods a two photon fluorescence microscopy study. *Chem. phys. Lipids*, 105:135–147, 2000.

[105] A. MOSCHO, O. ORWAR, D. T. CHIU, B. P. MODI et R. N. ZARE : Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:11443–11447, 1996.

[106] H. TRÄUBLE et E. GRELL : Carriers and specificity in membranes. iv. model vesicles and membranes. the formation of asymmetrical spherical lecithin vesicles. *Neurosci. Res. Program Bull.*, 9:373–380, 1971.

[107] S. PAUTOT, B. J. FRISKEN et D. A. WEITZ : Engineering asymmetric vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(19):10718–10721, 2003.

[108] A. YAMADA, T. YAMANAKA, T. HAMADA, M. HASE, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL : Spontaneous transfer of phospholipid-coated oil-in-oil and water-in-oil micro-droplets through oil/water interface. *Langmuir*, 22:9824–9828, 2006.

[109] M. I. ANGELOVA et D. S. DIMITROV : Liposomes electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81:303–311, 1986.

[110] M. I. ANGELOVA et D. S. DIMITROV : Swelling of charged lipids and formation of liposomes on electrode surfaces. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 152:89–104, 1987.

[111] T. POTT, H. BOUVRAIS et P. MÉLÉARD : Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chem. Phys. Lipids*, 154:115–119, 2008.

[112] M. I. ANGELOVA, S. SOLEAU, P. MÉLÉARD, J.-F FAUCON et P. BOTHOREL : Preparation of giant vesicles by external ac fields. kinetics and applications. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 89:127–131, 1992.

[113] D. J. ESTES et M. MAYER : Electroformation of giant liposomes from spin-coated films of lipids. *Colloids Surf., B*, 42:115–123, 2004.

[114] K. A. RISKE, L. Q. AMARAL, H.-G. DÖBEREINER et M. T. LAMYY : Mesoscopic structure in the chain-melting regime of anionic phospholipid vesicles : DMPG. *Biophys. J.*, 86:3722–3733, 2004.

[115] L.-R MONTES, A. ALONSO, F. M. GOÑI et L. A. BAGATOLLIY : Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. *Biophys. J.*, 93:3548–3554, 2007.

[116] D. DONG, D. BAIGL, Y. CUI, P. SINAŸ, M. SOLLOGOUB et Y. ZHANG : Amphiphilic bipolar duplex α-cyclodextrin forming vesicles. *Tetrahedron*, 63(14):2973–2977, 2007.

[117] K.-I. AKASHI, H. MIYATA, H. ITOH et K. KINOSITA : Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophys. J.*, 71:3242–3250, 1996.

[118] G. A. AYUYAN et F. S. COHEN : Lipid peroxides promote large rafts : Effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation. *Biophys. J.*, 91:2172–2183, 2006.

[119] A.-L. BERNARD, M.-A. GUEDEAU-BOUDEVILLE, L. JULLIEN et J.-M. di MEGLIO : Raspberry vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1567:1–5, 2002.

[120] K. AKASHI, H. MIYATA, H. ITOH et K. KINOSITA : Formation of giant liposomes promoted by divalent cations : critical role of electrostatic repulsion. *Biophys. J.*, 74:2973–2982, 1998.

[121] P. PETERLIN et V. ARRIGLER : Electroformation in a flow chamber with solution exchange as ameans of preparation of flaccid giant vesicles. *Colloids Surf., B*, 64(1):77–87, 2008.

[122] D. D. LASIČ : The spontaneous formation of unilamellar vesicles. *J. Colloids Surf., A Interface Sci.*, 124:428–435, 1987.

[123] D. D. LASIČ, J. KIDRIČ et S. ZAGORC : A simple method for the preparation of small unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 896:117–122, 1987.

[124] D. D. LASIČ, A. BELIČ et T. VALENTINČIČ : A new method for the preparation of large unilamellar vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, 110:970–971, 1988.

[125] Avanti Polar Lipids , Inc. *Preparing Large, Unilamellar Vesicles by Extrusion (LUVET).* Mini-Extruder technical note.

[126] P. S. DITTRICH, M. HEULE, P. RENAUD et A. MANZ : On-chip extrusion of lipid vesicles and tubes through microsized apertures. *Lab Chip*, 6:488–493, 2006.

[127] K. FUNAKOSHI, H. SUZUKI et S. TAKEUCHI : Formation of giant lipid vesiclelike compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow. *J. Am. Chem. Soc.*, 129:12608–12609, 2007.

[128] J. C. STACHOWIAK, D. L. RICHMOND, T. H. LI, A. P. LIU, S. H. PAREKH et D. A. FLETCHE : Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(12):4697–4702, 2008.

[129] P. TAYLOR, C. XU, P. D. I. FLETCHER et V. N. PAUNOV : A novel technique for preparation of monodisperse giant liposomes. *Chem. Commun.*, 14:1732–1733, 2003.

[130] P. TAYLOR, C. XU, P. D. I. FLETCHER et V. N. PAUNOV : Fabrication of 2D arrays of giant liposomes on solid substrates by microcontact printing. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5:4918–4922, 2003.

[131] K. KURIBAYASHI et S. TAKEUCHI : Formation of monodisperse giant liposomes using micro-patterned lipid films. *In proceedings of μTAS 2005*, volume 2, pages 1455–1457, 2005.

[132] K. KATAGIRI et F. CARUSO : Monodisperse plolyelectrolyte-supported asymmetric lipid-bilayer vesicles. *Adv. Mater.*, 17(6):738–743, 2005.

[133] H. C. SHUM, D. LEE, I. YOON, T. KODGER et D. A. WEITZ : Double emulsion templated monodisperse phospholipid vesicles. *Langmuir*, 24: 7651–7653, 2008.

[134] M. SONKA, V. HLAVAC et R. BOYLE : *Image Processing, Analysis and Machine Vision*. PWS publishing, 1998.

[135] J. HEUVINGH, F. PINCET et S. CRIBIER : Hemifusion and fusion of giant vesicles induced by reduction of inter-membrane distance. *Eur. Phys. J. E*, 14:269–276, 2004.

[136] L. MATHIVET, S. CRIBIER et P. F. DEVAUX : Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys. J.*, 70:1112–1121, 1996.

[137] P. FROMHERZ, V. KIESSLING, K. KOTTIG et G. ZECK : Membrane transistor with giant lipid vesicle touching a silicon chip. *Appl. Phys. A*, 69(5):571–576, 1999.

[138] V. ATANASOV, N. KNORR, R. S. DURAN, S. INGEBRANDT, A. OFFENHÄUSSER, W. KNOLL et I. KÖPER : Membrane on a chip : A functional tethered lipid bilayer membrane on silicon oxide surfaces. *Biophys. J.*, 89(3):1780–1788, 2005.

[139] R. L. DEROSA, P. A. SCHADER et J. E. SHELBY : Hydrophilic nature of silicate glass surfaces as a function of exposure condition. *J. Non-Cryst. Solids*, 331(9):32–40, 2003.

[140] S. M. KANAN, W. T. Y. TZE et C. P. TRIPP : Method to double the surface concentration and control the orientation of adsorbed (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane on silica powders and glass slides. *Langmuir*, 18:6623–6627, 2002.

[141] R. FONDECAVE et F. BROCHARD-WYART : Polymers as dewetting agents. *Macromolecules*, 31:9305–9315, 1998.

[142] J. NISSEN, S. GRITSCH, G. WIEGAND et J. O. RÄDLER : Wetting of phospholipid membranes on hydrophilic surfaces - concepts towards self-healing membranes. *Eur. Phys. J. B*, 10:335–344, 1999.

[143] J. N. LEE, C. PARK et G. M. WHITESIDES : Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Anal. Chem.*, 75:6544–6554, 2003.

[144] E. HECHT : *Optics*. Addison-Wesley, second edition édition, 1987.

[145] D. QUÉRÉ et A. de RYCK : Le mouillage dynamique des fibres. *Ann. Phys Fr.*, 23(1):1, 1998.

[146] M. SEUL et J. SAMMON : Preparation of surfactant multilayer films on solid substrates by deposition from organic solution. *Thin Solid Films*, 185:287–305, 1990.

[147] R. D. DEEGAN, O. BAKAJIN, T. F. DUPONT, G. HUBER, S. R. NAGEL et T. A. WITTEN : Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 289:827–829, 1997.

[148] T. SPANGENBERG, N. F. de MELLO, T. B. CRECZYNSKI-PASA, A. A. PASA et H. NIEHUS : AFM in-situ characterization of supported phospholipid layers formed by solution spreading. *Phys. Stat. sol.*, 201(5):857–860, 2004.

[149] L. CASELI, R. P. M. FURRIEL, J. F. de ANDRADE, F. A. LEONE et M. E. D. ZANIQUELLI : Surface density as a significant parameter for the enzymatic activity of two forms of alkaline phosphatase immobilized on phospholipid langmuir-blodgett films. *J. Colloid Interface Sci.*, 275:123–130, 2004.

[150] B. CROSS : *Etude expérimentale des propriétés mécaniques de membranes supportées et en phase lamellaire.* Thèse de doctorat, Université de Lyon 1, 2004.

[151] G. ROBERTS, éditeur. *Langmuir-Blodgett Films.* Plenum, New York, 1990.

[152] A. V. HUGHES, J. R. HOWSE, A. DABKOWSKA, R. A. L. JONES, M. J. LAWRENCE et S. J. ROSER : Floating lipid bilayers deposited on chemically grafted phosphatidylcholine surfaces. *Langmuir*, 24(5):1989 –1999, 2008.

[153] G. DECHER, J. D. HONG et J. SCHMITT : Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process : Iii. consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 210-211:831–835, 1992.

[154] R. P. RICHTER, R. BÉRAT et A. R. BRISSON : Formation of solid-supported lipid bilayers : An integrated view. *Langmuir*, 22:3497–3505, 2006.

[155] M. RAPPOLT, H. AMENITSCH, J. STRANCAR, C. V. TEIXEIRA, M. KRIECHBAUM, G. PABST, M. MAJEROWICZ et P. LAGGNER : Phospholipid mesophases at solid interfaces : in-situ x-ray diffraction and spin-label studies. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 111:63–77, 2004.

[156] H. HIANIK : Structure and physical properties of biomembranes and model membranes. *Acta Phys. Slovaca*, 56(6):687–805, 2006.

[157] J. T. WOODWARD et J. A. ZASADZINSKI : High-resolution scanning tunneling microscopy of fully hydrated ripple-phase bilayers. *Biophys. J.*, 72:964–976, 1997.

[158] M. C. HOWLAND, A. W. SZMODIS, B. SANII et A. N. PARIKHYZ : Characterization of physical properties of supported phospholipid membranes using imaging ellipsometry at optical wavelengths. *Biophys. J.*, 92:1306–1317, 2007.

[159] Z. LEONENKO, M. AMREIN et E. FINOT : Determination of the molecular architecture of supported lipid-protein films using atomic force microscopy and spectroscopic ellipsometry. *Microsc. Microanal.*, 13:1588–1589, 2007.

[160] M. HISHIDA, H. SETO et K. YOSHIKAWA : Smooth/rough layering in liquid-crystalline/gel state of dry phospholipid film, in relation to its ability to generate giant vesicles. *Chem. phys. Lett.*, 411:267–272, 2005.

[161] S. LENHERT, P. SUN, Y. WANG, H. FUCHS et C. A. MIRKIN : Massively parallel dip-pen nanolithography of heterogeneous supported phospholipid multilayer patterns. *Small*, 01:71–75, 2007.

[162] S. HÉNON et J. MEUNIER : Microscope at the brewster angle : Direct observation of first-order phase transitions in monolayers. *Rev. Sci. Instrum.*, 62(4):936–939, 1990.

[163] J. TSAI, E. SUN, Y. GAO, J. C. HONE, et L. C. KAM : Non-brownian diffusion of membrane molecules in nanopatterned supported lipid bilayers. *Nano Lett.*, 8(2):425–430, 2008.

[164] M. P. JONSSON, P. JÖNSSON, A. B. DAHLIN et F. HÖÖK : Supported lipid bilayer formation and lipid-membrane-mediated biorecognition reactions studied with a new nanoplasmonic sensor template. *Nano Lett.*, 7(11): 3462–3468, 2007.

[165] O. PURRUCKER, H. HILLEBRANDT, K. ADLKOFER et M. TANAKA : Deposition of highly resistive lipid bilayer on silicon-silicon dioxide electrode and incorporation of gramicidin studied by ac impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta*, 47:791–798, 2001.

[166] F. BERNOUX, J. P. PIEL, B. CASTELLON, P. BOHER, J. L. STEHLÉ, C. DEFRANOUX et J. H. LECAT : Ellipsométrie - théorie. *In Mesures - Analyse*, volume R6, chapitre traité Mesures et Contrôle, page 490. Techniques de l'Ingénieur, 2003.

[167] M. HARTIL, I. KRUPKA, R. POLISUK, M. LISKA, J. MOLIMARD, M. QUERRY et P. VERGNE : Thin film colorimetric interferometry. *Tribol. Trans.*, 44(2):270–276, 2001.

[168] N. D. DENKOV, O. D. VELEV, P. A. KRALCHEVSKY, I. B. IVANOV, H. YOSHIMURA et K. NAGAYAMA : Two-dimensional crystallization. *Nature*, 361:26, 1993.

[169] C. J. BRINKER, Y. LU, A. SELLINGER et H. FAN : Evaporation-induced self-assembly : Nanostructures made easy. *Adv. Mater.*, 11:7, 1999.

[170] G. BERTELOOT, C.-T. PHAM, A. DAERR, F. LEQUEUX et L. LIMAT : Evaporation-induced flow near a contact line : Consequences on coating and contact angle. *Europhys. Lett.*, 83(1):14003, 2008.

[171] L. LANDAU et B. LEVICH : Dragging of a liquid by a moving plate. *Acta phys.-chim. URSS*, 7(1-2):42, 1942.

[172] B. DERJAGUIN : On the thickness of the liquid film adhering to the walls of a vessel after emptying. *Acta phys.-chim. URSS*, 20(3):6, 1945.

[173] F. P. BRETHERTON : The motion of long bubbles in tubes. *J. Fluid Mech.*, 10:166, 1961.

[174] X. FANTON et A. M. CAZABAT : Spreading and instabilities induced by a solutal marangoni effect. *Langmuir*, 14(9):2554 –2561, 1998.

[175] O. O. RAMDANE et D. QUÉRE : Thickening factor in marangoni coating. *Langmuir*, 13:2911–2916, 1997.

[176] C. KITTEL : *Physique de l'état solide*. Dunod, 1995.

[177] G. GUÉNA, C. POULARD et A.-M. CAZABAT : The leading edge of evaporating droplets. *J. Colloid Interface Sci.*, 312:164–171, 2006.

[178] P. M. MORAN et F. F. LANGE : Microscale lithography via channel stamping : Relationships between capillarity, channel filling, and debonding. *Appl. Phys. Letters*, 74(9):1332–1334, 1999.

[179] A. BIRD : Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447:396–398, 2007.

[180] M. THATTAI et A. van OUDENAARDEN : Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics*, 167:523–530, 2004.

[181] N. Q. BALABAN, J. MERRIN, R. CHAIT, L. KOWALIK et S. LEIBLER : Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305:1622–1625, 2004.

[182] P. N. CAMPBELL et A. D. SMITH : *Biochimie illustrée*. Maloine, Paris, 2002.

[183] S.-I. M. NOMURA, Y. YOSHIKAWA, K. YOSHIKAWA, O. DANNENMULLER, S. CHASSEROT-GOLAZ, G. OURISSON et Y. NAKATANI : Towards protocells : "primitive" lipid vesicles encapsulating giant DNA and its histone complex. *Chem. Bio Chem.*, 6:457–459, 2001.

[184] A. FISCHER, A. FRANCO et T. OBERHOLZER : Giant vesicles as microreactors for enzymatic mRNA synthesis. *Chem. Bio Chem.*, 3(5):409–417, 2002.

[185] G. TRESSET et S. TAKEUCHI : Utilization of cell-sized lipid containers for nanostructure and macromolecule handling in microfabricated devices. *Anal. Chem.*, 77:2795–2801, 2005.

[186] D. BAIGL et K. YOSHIKAWA : Dielectric control of counter-ion-induced single-chain folding transition of DNA. *Biophys. J.*, 88:3486–3493, 2005.

[187] W.-H. HUANG, A. A. ZINCHENKO, C. PAWLAK, Y. CHEN et D. BAIGL : Dynamic conformational behavior and molecular interaction discrimination of DNA/Binder complexes by single-chain stretching in a microdevice. *Chem. Bio Chem.*, 8:1771–1774, 2007.

[188] A.-L M LE NY et C. T. LEE : Photosensible DNA condensation using light-responsive surfactants. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:6400–6408, 2006.

[189] I. A. CHEN, K. SALEHI-ASHTIANI et J. W. SZOSTAK : Rna catalysis in model protocell vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:13213–13219, 2005.

[190] S. S. MANSY, J. P. SCHRUM, M. KRISHNAMURTHY, S. TOBÉ, D. A. TRECO et J. W. SZOSTAK : Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell. *Nature*, 454:122–125, 2008.

[191] M. HASE, A. YAMADA, T. HAMADA, D. BAIGL et K. YOSHIKAWA : Manipulation of cell-sized phospholipid-coated microdroplets and their use as biochemical microreactors. *Langmuir*, 23:348–352, 2007.

[192] X. FANTON, A. M. CAZABAT et D. QUÉRÉ : Thickness and shape of films driven by a marangoni flow. *Langmuir*, 12(24):5875 –5880, 1996.

[193] Donald T. HAYNIE : Artificial red blood cells, 2008.

[194] B. ILIC et H. G. CRAIGHEAD : Topographical patterning of chemically sensitive biological materials using a polymer-based dry lift off. *Biomed. Microdev.*, 2(4):317–322, 2000.

[195] I. JUNG, M. PELTON, R. PINER, D. A. DIKIN, S. STANKOVICH, S. WATCHAROTONE, M. HAUSNER et R. S. RUOFF : Simple approach for high-contrast optical imaging and characterization of graphene-based sheets. *Nano Lett.*, 7(12):3569–3575, 2007.

[196] M. NONOMURA, R. KOBAYASHI, Y. NISHIURA et M. SHIMOMURA : Periodic precipitation during droplet evaporation on a substrate. *J. Phys. Soc. Jpn.*, 72(10):2468–2471, 2003.

[197] Y. OKUMURA, H. ZHANG, T. SUGIYAMA et Y. IWATA : Electroformation of giant vesicles on a non-electroconductive substrate. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(6):1490–1491, 2007.

[198] D. RYAN, B. A. PARVIZ, V. LINDER, V. SEMETEY, S. K. SIA, J. SU, M. MRKSICH et G. M. WHITESIDES : Patterning multiple aligned self-assembled monolayers using light. *Langmuir*, 20:9080–9088, 2004.

[199] P. TABELING : *Introduction à la microfluidique*. Belin, 2003.

[200] Y. WANG, X. CHENG, Y. HANEIN, A. SHASTRY, D. D. DENTON, B. D. RATNER et K. F. BOHRINGER : Selective attachment of multiple cell types on thermally responsive polymer. *In Transducer*, volume 2, pages 979–982, 2003.

[201] M. N. YOUSAF, B. T. HOUSEMAN et M. MRKSICH : Using electroactive substrates to pattern the attachment of two different cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:5992–5996, 2001.

Publications parues dans le cadre de la thèse

[202] C. Crozatier, M. Le Berre et Y. Chen : Multi-colour micro-contact printing based on microfluidic network inking. *Microelectron. Eng.*, 83(4-9):910–913, 2006.

[203] C. Crozatier, I. Tapsoba, M. Le Berre, S. Arbault, C. Amatore et Y. Chen : A reversibly assembled microfluidic chip for culture and analysis of single cell array. *In Proc. of μTAS2006*, pages 981–983, 2006.

[204] A. Diguet, M. Le Berre, Y. Chen et D. Baigl : Preparation of phospholipid multilayer patterns of controlled size and thickness by capillary assembly on a microstructured substrate. *Small*, 2009. in press (DOI : 10.1002/smll.200900368).

[205] M. Le Berre, Y. Chen et D. Baigl : From convective assembly to landau-levich deposition of multilayered phospholipid films of controlled thickness. *Langmuir*, 25(5):2554–2557, 2009.

[206] M. Le Berre, Y. Chen, C. Crozatier et Z.L. Zhang : Electrocapillary force actuation of microfluidic elements. *Microelectron. Eng.*, 78-79:93–99, 2005.

[207] M. Le Berre, C. Crozatier, G. Velve Casquillas et Y. Chen : Liquid handling by micro-aspiration for microfluidic PDMS chip. *In Proc of Transducer 07*, pages 747–750, 2007.

[208] M. Le Berre, C. Crozatier, G. Velve Casquillas et Y. Chen : Reversible assembling of microfluidic devices by aspiration. *Microelectron. Eng.*, 83(4-9):1284–1287, 2006.

[209] M. Le Berre, M.-A. Guedeau-Boudeville, Y. Chen et D. Baigl : Preparation of cell-sized of controlled size containing long genomic DNA. *In Proc. of μTAS2006*, pages 1399–1401, 2006.

[210] M. Le Berre, J. Shi, C. Crozatier, G. Velve Casquillas et Y. Chen : Micro-aspiration assisted lithography. *Microelectron. Eng.*, 84(5-8):864–867, 2007.

[211] M. Le Berre, A. Yamada, Y. Chen et D. Baigl : Preparation of cell-sized liposomes on silicon : controlling liposome size by surface micro-engineering. *In Proc. of μTAS2007*, pages 1613–1615, 2007.

[212] M. Le Berre, A. Yamada, L. Reck, Y. Chen et D. Baigl : Electroformation of giant phospholipid vesicles on a silicon substrate : Advantages of controllable surface properties. *Langmuir*, 24:2643–2650, 2008.

[213] M. LOUNACI, P. RIGOLET, C. ABRAHAM, M. LE BERRE et Y. CHEN : Microfluidic device for protein crystallization under controlled humidity. *Microelectron. Eng.*, 84(5-8):1758–1761, 2007.

[214] H. SAITO, Y. KATO, M. LE BERRE, A. YAMADA, T. INOUE, K. YOSIKAWA et D. BAIGL : Time-resolved tracking of a minimum gene expression system reconstituted in giant liposomes. *Chem. Bio Chem.*, 2009. in press.

[215] G. VELVE CASQUILLAS, F. BERTHOLLE, M. LE BERRE, S. MEANCE, L. MALAQUIN, J. J. GREFFET et Y. CHEN : Thermo-resistance based micro-calorimeter for continuous chemical enthalpy measurements. *Microelectron. Eng.*, 85(5-6):1367–1369, 2008.

[216] G. VELVE CASQUILLAS, M. LE BERRE, C. PEROZ, Y. CHEN et J. J. GREFFET : Microlitre hot stripe devices for thermal characterization of nanofluids. *Microelectron. Eng.*, 84:1194–1197, 2007.

[217] G. VELVE CASQUILLAS, M. LE BERRE, C. R. TERRENA, C. FU, A. M. HAGHIRI-GOSNET, J. J. GREFFET, P. T. TRAN et Y. CHEN : Disposable microfluidic temperature control on chip cell studies. *In Proc. of μTAS2008*, pages 1834–1836, 2008.

[218] A. YAMADA, M. LE BERRE, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL : Spontaneous generation of giant liposomes from an oil/water interface. *Chem. Bio Chem.*, 8:2215–2218, 2007.

[219] Z. L. ZHANG, C. CROZATIER, M. LE BERRE et Y. CHEN : In situ biofunctionalization and cell adhesion in microfluidic devices. *Microelectron. Eng.*, 78-79:556–562, 2005.

Publications à venir

[220] M. Le Berre, Y. Chen et D. Baigl : Spontaneous formation of phospholipid multilayer patterns by wetting instabilities. *En cours de rédaction*, 2009.

[221] M. Le Berre, C. Crozatier, G. Velve Casquillas et Y. Chen : Liquid handling by micro-aspiration, Part II : characterization. *En cours de rédaction*, 2009. unpublished.

[222] M. Le Berre, C. Crozatier, G. Velve Casquillas et Y. Chen : On micro-aspiration based microfluidic device assembly. *En cours de rédaction*, 2009. unpublished.

[223] M. Le Berre, C. Crozatier, G. Velve Casquillas, M. Lounaci et Y. Chen : Liquid handling by micro-aspiration, Part I : demonstration. *En cours de rédaction*, 2009. unpublished.

[224] G. Velve Casquillas, F. Chuanhai, C. R. Terrena, M. Le berre, J. J. Greffet, Y. Chen et P. T. Tran : Microfluidic temperature control for high resolution imaging of yeast cells on chip. *En cours de rédaction*, 2009. unpublished.

Nomenclature

μCP microContat Printing

AFM microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy)

BSA albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumin)

DI déionisé

DOPC 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phophocholine

DOTAP 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane

EPR résonance paramagnétique électronique (Electron Paramagnetic Resonance)

FITC Fluoresceine Iso Thio Cyanate

FRAP récupération de fluorescence après photo-décoloration (Fluorescence Recovery After Photo-bleaching)

GFP protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein)

GOV vésicule oligolamélaire géante (Giant Oligolamelar Vesicle)

GUV vésicule unilamellaire géante (Giant Unilamelar Vesicle)

HF acide fluoridrique

ITO oxyde d'indium étain (Indium Tin Oxyde)

LBL layer-by-layer

LOV grande vésicule oligolamellaire (Large Oligolamellar Vesicle)

LPN Laboratoire de Photonique et Nanostructures

LUV grande unilamellaire vésicule (Large Unilamelar Vesicle)

MCμCP microContat Printing multi-couleur (MultiColor microContat Printing)

MEMS Micro Electro Mechanical System

MIMIC micromoulage capillaire (MIcroMolding In Capilaries)

MLV vésicule multilamellaire (MultiLamelar Vesicle)

MVV vésicule multivésiculaire (MultiVesicular Vesicle)

NBD-PC 1-oleoyl-2-12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl-sn-glycero-3-phophocholine

OVL	vésicule oligolamellaire (OligoLamellar Vesicle)
PA	Acides Phosphatidiques
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate-Buffered Saline)
PC	PhosphatidylCholines
PE	PhosphatidylEthanolamine
PET	poly(éthylène téréphtalate)
PI	PhosphatidylInositol
PORN	polyornitine
PS	PhosphatidylCholines
PTS	phényltriméthoxysilane
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAM	Monocouche auto-assemblée (Self-Assembled Monolayer)
SANS	diffraction de neutron aux petits angles (Small Angle Neutron Scattering)
SAXS	diffraction de rayon X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering)
sccs	centimètre cube standard par seconde (Standard Cubic Centimeter per Second)
SEM	microscopie électronique à balayage (Scanning Electron Microscopy)
SOV	petite vésicule oligolamellaire (Small Oligolamellar Vesicle)
SUV	petite unilamellaire vésicule (Small Unilamelar Vesicle)
TEM	microscopie électronique à transmission (Transmission Electron Microscopy)
UV	vésicules unilamellaire (Unilamellar Vesicle)

Index

électroformation, **80**
    influence de la surface, 103
    influence de la température, 101
    influence du temps de gonflement, 101
évaporation, 146
µCP, 7

acide fluoridrique, 106
ADN, 177
analyse d'image
    analyse des contours, 93
    détection de contours, **90**, 91
    par transformée, 90
    post-traitement, 94, 99
    prétraitement, 91, 99
    suivi, 183
    transformée, 96
assemblage convectif, 146
Assemblage réversible, 11
    caractérisation, 20
    Modèle, 12
    pour la culture cellulaire, 35
    Principe, 12
    simulation, 16
AZ5214, 203
AZ9260, 204

café, 146
capillaire
    longueur, 148
    nombre, 148
    pression, 149
cellule artificielle, 175
condensation, 161
contrôle
    de l'épaisseur d'un film, 151
Contrôle de la taille
    instabilités de mouilllage, 124
    masquage de l'électrode, 115
    micro-contact printing, 115
Contrôle indirect des liquides
    caractérisation, 49
    théorie, 45
contrôle indirect des liquides, 39
    moulage, 55

dépôt
    SiO_2, 115
    colloïdes, 146
dépôt de phospholipides, **129**
    évaporation de gouttes, 133
    convectif, 146
    deep coating, 134
    effet du mouillage, 160
    Landau-Levich, 147
    Langmuir Blodgett, 131
    Layer-by-layer, 133
    méthode, 131
    méthodes couche par couche, 131
    micro-contact printing, 115
    organisation, 153
    patterné, 161
    spin coating, 133
    stabilité, 160
    uniforme, 145
deep-coating, 145
diffraction de neutron, 134
diffraction de rayons X, 134

ellipsométrie, 135

facteur d'épaississement, 153
film de phospholipides
    caractérisation, 134
    Organisation microscopique, 155
fonctionnalisation, 7
    du silicium, 104

gravure
    SiO_2, 106, 115
    silicium, 112
gravure ionique réactive, 112

instabilité, 124
instabilités, 161
ITO
    électroformation sur l', **80**, 104

Landau-Levich, 147
Laplace (loi de), 149
lithographie
    dip pen, 7
    non conventionnelle, 7

ménisque
    dynamique, 151
    retrait de, 143
    statique, 149
Marangoni (effet), 153
MCμCP, 33
micro-contact printing, 30, 115
microscopie
    à force atomique, 138
    en épifluorescence, 140
    en réflexion, 139
microstructure, 112
MIMIC, 9
mooulage
    de gel d'agar, 58
motifs
    de gel d'agar, 58
    de PDMS, 58, 62
    de protéines, 27
    de Quantum Dots, 58
mouillage
    du silicium, 107, 160
moulage, 9
    de PDMS, 58
    de phospholipide, 122
    de Quantum Dots, 58
    par micro-aspiration, 55
        limitations, 60

Organisation, 9

paramètre d'évaporation, 153
perméation, 40
phényl, 106
phényltriméthoxysilane, 106
photolithographie, 203
pression capillaire, 149
puce à ADN, 7

régimes de dépôt, **146**, 152
résonance magnétique nucléaire, 134
retrait de ménisque, 143
retrait de menisque, 10

seuillage, 90
silane, 207
silanisation, 106, 207
silicium, 103, 151
    électroformation sur le, 103
        fonctionnalisé, 108
        structuré, 112
    fonctionnalisation, 104
    propriétés de mouillage du, 106
    structuration, 112
spotter, 7

transfert de matière, 62
transformée, 90
    de Hough, 96

vésicule, **70**
    électroformation, **80**
    caractérisation de la taille, 90
    contrôle de la taille, 89
    fabrication, 77, 211
    géantes unilamellaires, 69
vésicules
    application, 175

Wiener (filtre de), 92

Résumé

Ce travail de thèse a eu pour objectif de développer de nouvelles méthodes de dépôts et de formation de motifs pour mieux contrôler l'organisation de molécules d'intérêt biologique sur des substrats solides.

Dans la première partie du manuscrit, nous présentons une méthode originale, la micro-aspiration, permettant de réaliser des assemblages réversibles de canaux microfluidiques sur un substrat et servir à guider les liquides. Nous avons étudié les propriétés de ces systèmes avec des modèles physiques simples et appliqué ces phénomènes à la micromanipulation de liquides, le dépôt de protéines à diverses concentrations sur un substrat, la fabrication de motifs de polymères, nanoparticules, gels, etc.

Dans la seconde partie, nous avons exploré de nouvelles méthodes de dépôt de films de phospholipides multicouches sur des substrats solides et les avons appliquées à la fabrication de vésicules unilamellaires géantes de taille contrôlée. Tout d'abord, l'adaptation de techniques conventionnelles (micro-contact printing, moulage, etc.) a permis d'obtenir des motifs de phospholipides de taille micrométrique. Les dépôts ont ensuite été réalisés par retrait d'un ménisque en situation d'évaporation (assemblage capillaire). Nous avons identifié deux régimes de dépôt en fonction de l'importance relative des forces visqueuses et de l'évaporation, permettant un contrôle de l'épaisseur du film jusqu'à 200 nm à la bicouche près. L'émergence d'instabilités de mouillage ou le guidage sur micro-structures ont permis en outre de réaliser des motifs variés. En utilisant des substrats comme électrodes, ces différents niveaux d'organisation ont permis d'obtenir par électroformation des vésicules unilamellaires géantes de taille contrôlée. L'ensemble de ces travaux ouvre de nouvelles voies à la réalisation de surfaces et de motifs micrométriques d'intérêt biologique.

Summary

The objective of this work was to develop new methods of deposition and patterning in order to better control the organisation of molecules of biological interest on a solid substrate.

In the first part of the manuscript, we present an original method, the micro-aspiration, which allowed us to reversibly assemble microfluidic channels and to guide liquids through it. We have studied the properties of these systems with simple physical models and fabricated patterns of polymers, nanoparticles, gels, etc.

In the second part, we explored new deposition methods of multilayered phospholipid films on solid substrates and applied it to the fabrication of giant unilamellar vesicles of controlled size. First, the adaptation of conventional techniques (microcontact printing, molding, etc.) allowed us to obtain phospholipid patterns of micrometric size. The deposition has been realized afterward using a receding meniscus under evaporation (capillary assembling). Two deposition regimes have been identified depending on the relative importance of evaporation and viscous forces, allowing a control of the film thickness up to 200 nm with a bilayer resolution. The appearance of wetting instabilities or the guidance with microstructures allowed us to obtain patterns of various shapes. By using these substrates as electrodes, we obtained giant unilamellar vesicles of controlled size by electroformation. All these results open new perspectives for the fabrication of surfaces and micro-patterns of biological interest.