HAL
open science

Microscope à force photonique : piégeage en pince optique de particules micro-usinées pour la mesure de topographies de surfaces molles.

Rudy Desgarceaux

To cite this version:

Rudy Desgarceaux. Microscope à force photonique : piégeage en pince optique de particules micro-usinées pour la mesure de topographies de surfaces molles.. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTS079 . tel-02485855

HAL Id: tel-02485855

https://theses.hal.science/tel-02485855

Submitted on 20 Feb 2020

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Microelectronique

École doctorale I2S

Unités de recherche IES et CBS

Microscope à force photonique : piégeage en pince optique de particules micro-usinées pour la mesure de topographies de surfaces molles.

Présentée par Rudy Desgarceaux
Le 3 décembre 2019

Sous la direction de Benoît Charlot
et de Francesco Pedaci

Devant le jury composé de

Jochen Fick, Chargé de recherches CNRS, Institut Neel, Grenoble	Rapporteur
Henri Camon, Directeur de recherches CNRS, LAAS, Toulouse	Rapporteur
Pascale Gall-Borrut, Professeure Université de Montpellier, IES, Montpellier	Présidente du jury
Giovanni Capello, Directeur de recherches CNRS, Liphy, Grenoble	Examinateur
Benoît Charlot, Chargé de recherches CNRS, IES, Montpellier	Directeur de thèse
Francesco Pedaci, Chargé de recherches CNRS, CBS, Montpellier	Co-encadrant

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Table des matières

1. Introduction : 7
1.1. Contexte du projet 7
1.2. Les pinces optiques 10
1.3. État de l'art des applications 15
1.4. Le dispositif des pinces optiques 18
1.5. Étalonnage du piège 22
1.6. Conclusion 27
2. Les pinces optiques rotatives 29
2.1. Description et principe physique 29
2.2. Fabrication des cylindres 32
2.3. Les experiences de rotation 44
2.4. Conclusion 52
3. Microscope à force photonique 55
3.1. État de l'art sur le PhFM/AFM 55
3.2. Micro fabrication des pointes 61
3.3. Les particules dans le piège et les premiers tests de scan 75
3.4. Structure dédiée au scan pour la comparaison PhFM/AFM 82
3.5. Les expériences sur les objets biologiques 89
3.6. Conclusion et analyse 107
4. La lithographie Talbot 111
4.1. État de l'art : l'effet Talbot et son utilisation 111
4.2. La lithographie Talbot via un masque de PDMS 115
4.3. Les premiers tests de fabrication de structures complètes et perspectives 121
4.4. Conclusion 124
5. Conclusion générale 127
5.1. Résumé 127
5.2. Perspectives 130
6. ANNEXES 133
6.1. Recettes de gravure RIE et de dépôt PE-CVD 133
6.2. Images de scans 136
6.3. Listes des abréviations 138

Remerciements

Cette thèse a été co-financée par l'école doctorale I2S d'une part et un financement européen (ERC Biotorque) d'autre part. C'est pourquoi je voudrais remercier ces deux entités pour m'avoir permis de réaliser mes recherches dans les meilleures dispositions.

Je tiens à remercier mes deux laboratoires d'accueil : l'IES (l'Institut d'Electronique et des Systèmes) et le CBS (Centre de Biochimie Structurale) qui m'ont offert de bonnes conditions de travail. J'exprime ma gratitude à tout le personnel CTM (Centrale de Technologie en Micro et nanoélectronique) : Fréderic Pichot, Jean Lyonnet, Jean-Marie Peyris, François Mirabel et Alain Giani pour leurs précieux conseils en matière de micro-fabrication. Je remercie aussi Roland Tessier qui m'a formé sur le dispositif de lithographie interférentielle et Michel Ramonda pour avoir fait les images AFM.

J'adresse tous mes remerciements à M. Henri Camon, directeur de recherche CNRS au LAAS, ainsi qu'à M. Jochen Fick, chargé de recherche CNRS à l'institut Néel, qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je voudrais aussi remercier Mme Pascale Gall-Borrut et M. Giovanni Capello d'avoir accepté d'être examinateurs pour ma soutenance de thèse.

Je remercie tout particulièrement Messieurs Benoît Charlot, mon directeur de thèse, et Francesco Pedaci, mon co-encadrant, de m'avoir offert la possibilité d'entrer dans le monde de la recherche. Cette thèse a pu être menée à bien grâce à leurs conseils avisés et la confiance qu'ils m'ont accordé.

Je suis reconnaissant envers Zhanna Santybayeva, post-doc au CBS pour m'avoir formé sur l'utilisation du dispositif optique ainsi que Eliana Battistella, stagiaire au CBS, avec qui nous avons débuté les expériences de balayage de surface.

Je remercie également Manouk Apkarian, directeur de recherche CNRS, et Viviana Claveria, post-doc au CBS, pour m'avoir fourni des échantillons de sang pour mener mes expériences. Sans oublier Catherine Breton-Braun, professeure à l'université de Montpellier, pour m'avoir préparé des échantillons sanguins infectés au paludisme. Et enfin, Didier Portran, chargé de recherche CNRS, pour m'avoir donné les microtubules ainsi que Ashley Nord, post-doc au CBS, qui m'a aidé pour les expériences sur ces échantillons.

Je me dois aussi de remercier spécialement ma compagne, Iris Bec qui a corrigé entièrement mon manuscrit de thèse et qui me supporte depuis plus de 11 ans.

Mes derniers remerciements iront à tous les doctorants, stagiaires et ingénieurs du laboratoire avec qui j'ai passé 3 années formidables autant sur le plan professionnel que festifs.

1. Introduction :

1.1. Contexte du projet

- **Objectif principal**

La compréhension de propriétés physiques des biomolécules est importante pour lier ces propriétés aux fonctions biologiques de ces macromolécules. Par exemple, la faculté de l'ADN à s'enrouler pour former les fibres de chromatines et les chromosomes est liée à ses propriétés physico-chimiques mais également à la mécanique des filaments. La biophysique expérimentale a donc pour but d'étudier et de mesurer les forces, les raideurs, les mouvements et la dynamique de ces macromolécules. Un outil a été développé il y a quelques temps pour permettre d'adresser ces mesures mécaniques sur des molécules uniques, ce sont les pinces optiques. Ce système permet de piéger des particules microniques ou sub-microniques dans le cône d'un faisceau laser focalisé et, via un système d'asservissement du faisceau, de déplacer et mesurer la position des particules avec une résolution nanométrique.

Un tel dispositif a été développé dans le laboratoire du CBS (Centre de Biochimie Structurale) par Francesco Pedaci et Zhanna Santybayeva pour l'étude de moteur moléculaire. Mes recherches se basent sur ces outils pour faire de l'imagerie de surfaces biologiques à l'échelle nanométrique. En effet, les pinces optiques offrent la possibilité de piéger d'autres types de micro-particules avec des géométries particulières comme des cylindres ou des cônes. L'idée générale du projet est de développer un microscope à force photonique [1]–[3]. C'est une technique d'imagerie en champs proche basée sur la possibilité de mesurer avec précision (nm) la position d'une particule piégée optiquement pendant un balayage d'une surface. Par rapport au microscope à force atomique (AFM), elle a l'avantage d'appliquer une force plus faible sur l'échantillon ce qui permet d'éviter la déformation qui accompagne souvent les images de surfaces molles. L'objectif de mes recherches est donc la mise au point d'un nouveau procédé de fabrication de micro-cylindres en quartz disposant d'une pointe sur une extrémité, qui reproduit une pointe AFM, et qui est utilisée comme une sonde pour des expériences de balayage de surfaces avec des pinces optiques. (Voir le schéma de la **Figure 1-1**)

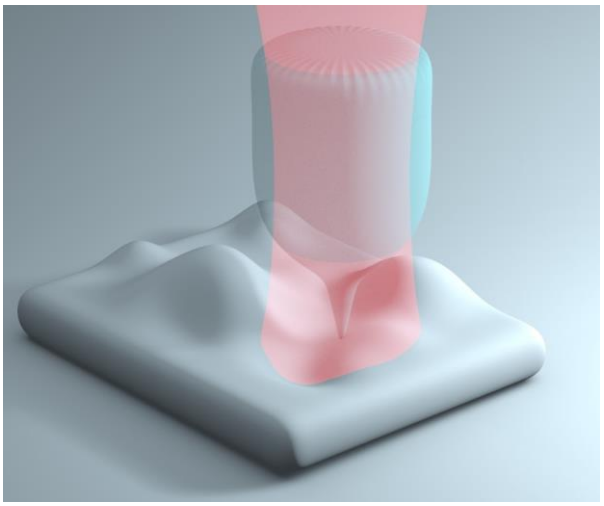


Figure 1-1 : illustration du concept de microscope à force photonique. Un cylindre taillé en pointe est piégé dans un faisceau laser et balaye une surface. L'objectif est de reconstruire la topographie en analysant le déplacement de l'objet dans le piège pendant que la surface sur laquelle il s'appuie se déplace.

- **De la force optique à la lévitation optique**

C'est au cours de l'année 2018 que A. Ashkin s'est vu décerner le prix Nobel de physique pour ses travaux sur les pinces optiques. Il est un des premiers chercheurs à avoir démontré la possibilité de manipuler des particules diélectriques par le biais de la pression de radiation [4]–[6]. La pression de radiation représente le « poids » des photons d'un faisceau de lumière, elle est analogue à la pression gazeuse. Elle applique donc une force qui tend à pousser les particules dans la direction de propagation de la lumière.

Dans son premier papier sur le sujet [4], A. Ashkin montre, pour la première fois, qu'il est possible d'accélérer des particules en suspension grâce à la pression de radiation du faisceau d'un laser. Des particules sphériques sont en suspension (mouvement Brownien) dans un milieu liquide, un faisceau laser traverse ce milieu comme on peut le voir du schéma extrait de l'article (**Figure 1-2 (a)**). Les billes qui passent au travers du faisceau sont poussées dans la direction de propagation du laser. Ce mouvement est dû à la pression de radiation. Elles sont aussi attirées vers la zone d'intensité maximale : l'axe central du faisceau, cette migration est dû au gradient d'intensité.

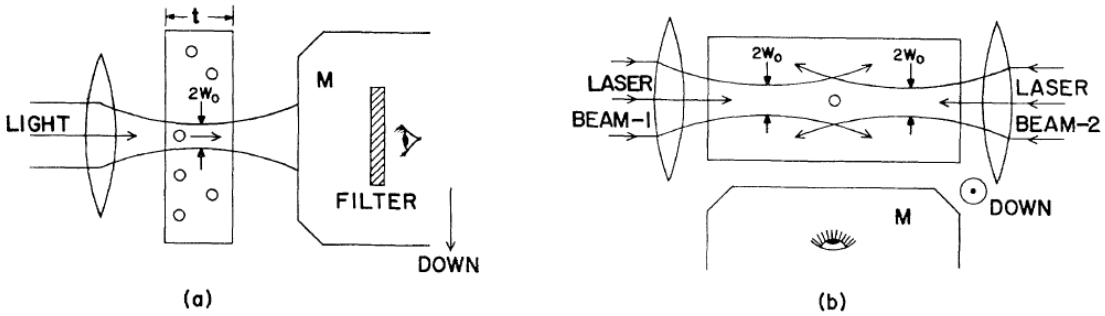


***Figure 1-2** : (a) schéma de l'expérience d'observations du mouvement des particules en suspension avec mise en évidence de la pression de radiation. (b) Piège d'une particule avec un fort indice de réfraction à l'aide de deux faisceau laser. [4]*

Dans une nouvelle configuration (**Figure 1-2 (b)**), avec deux lasers, il est possible de piéger une particule avec un fort indice de réfraction dans un puits optique. Les forces, issus de la pression de radiation, qui agissent sur la bille se compensent, créant un puits de potentiel au centre du croisement des deux faisceaux. Le point d'équilibre de la bille sera donc cet emplacement. Si un des deux lasers est éteint la bille se déplacera le long de l'axe du faisceau, lorsqu'il est rallumé la bille retourne vers son point d'équilibre. C'est donc un piège régit entièrement par des forces optiques.

Ces propriétés de la pression de radiation ouvrent la porte à la possibilité de créer un puits de potentiel optique à un seul faisceau. Appelée la lévitation optique, cette technique se base sur la capacité de la pression de radiation à compenser la gravitation. Le dispositif de la publication de 1971 [7] est schématisé sur la **Figure 1-3**. L'expérience consiste à faire léviter une bille, de quelques micromètres de diamètre, grâce aux forces que créent la pression de radiation. Les microsphères sont déposées sur une plaque de verre, à cause des interactions de Van der Waals celles-ci sont fortement adhérées sur la surface. Un dispositif acoustique permet de casser cette liaison et permettre le piègeage de la bille. En effet, le laser allumé en direction verticale sur une bille peut la soulever. La position d'équilibre est située au point B (sur la **Figure 1-3**). Il y a donc une compensation de la force de gravitation.

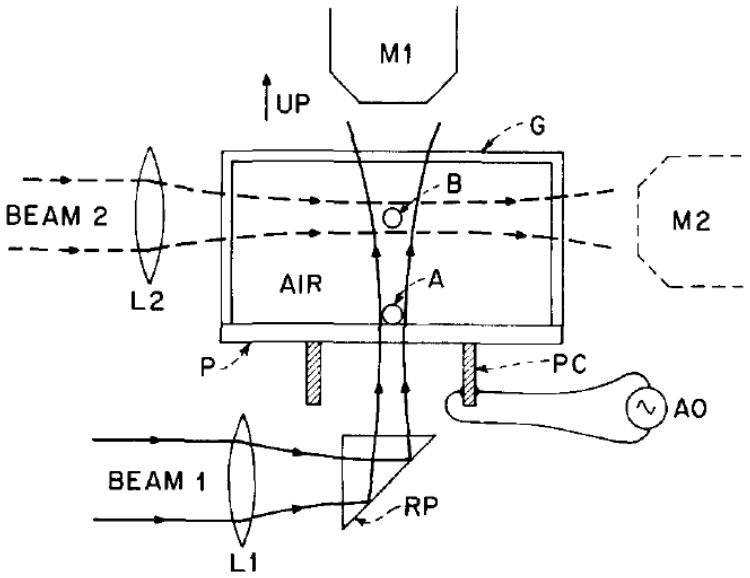


Figure 1-3 : *schéma du dispositif expérimental mis en place pour mettre en évidence la lévitation optique et calibrer les forces mises en jeu. L'enceinte est constituée d'air, un premier laser passe au travers par le bas en direction verticale. Les billes sont remuées par ondes sonores et sont « piégées » au point B. Le deuxième laser est utilisé comme sonde pour étudier la force du piège. [7]*

A l'époque de cette découverte plusieurs applications sont envisagées dans divers champs de recherche, comme l'étude de la diffraction de la lumière par des petites particules ou encore les dispositifs inertiels notamment les gyroscopes et accéléromètres.

- **De la lévitation optique aux pinces optiques**

C'est en 1978 que les travaux d'Ashkin prennent une nouvelle dimension avec la description d'une méthode pour piéger et manipuler des atomes en utilisant la résonance des forces de pression de radiation [5]. Dans ce papier, une analyse précise des propriétés de saturation de la pression de radiation est donnée. Cette théorie explique qu'il serait possible de confiner des atomes dans un puits de potentiel optique par le biais de laser fortement focalisé.

C'est finalement en 1986 que cette théorie est démontrée sur des particules diélectriques allant de 10 µm à 25 nm [8]. C'est aussi la première fois que la force de rappel optique est mise en évidence. Cette force est opposée à la direction de propagation du faisceau laser, elle est essentielle pour un piège optique car elle ramène l'objet vers le centre du faisceau de plus grande intensité. La **Figure 1-4** montre un schéma du dispositif de piège optique. Un laser d'une longueur d'onde de 514.5 nm passe au travers d'un objectif de microscope à immersion avec une grande ouverture numérique (N.A. 1.25) qui focalise un faisceau fortement convergent dans la chambre remplie d'eau. Les billes sont introduites dans l'enceinte et elles diffusent dans l'eau (mouvement Brownien). Un deuxième faisceau permet de soulever une bille et de l'amener vers le focus du premier par lévitation optique [7]. Un microscope est placé sur le côté pour pouvoir observer les particules dans le piège. La photo de la figure montre une sphère de verre de 10 µm piégée, elle permet d'observer les trajectoires du faisceau incident et diffracté.

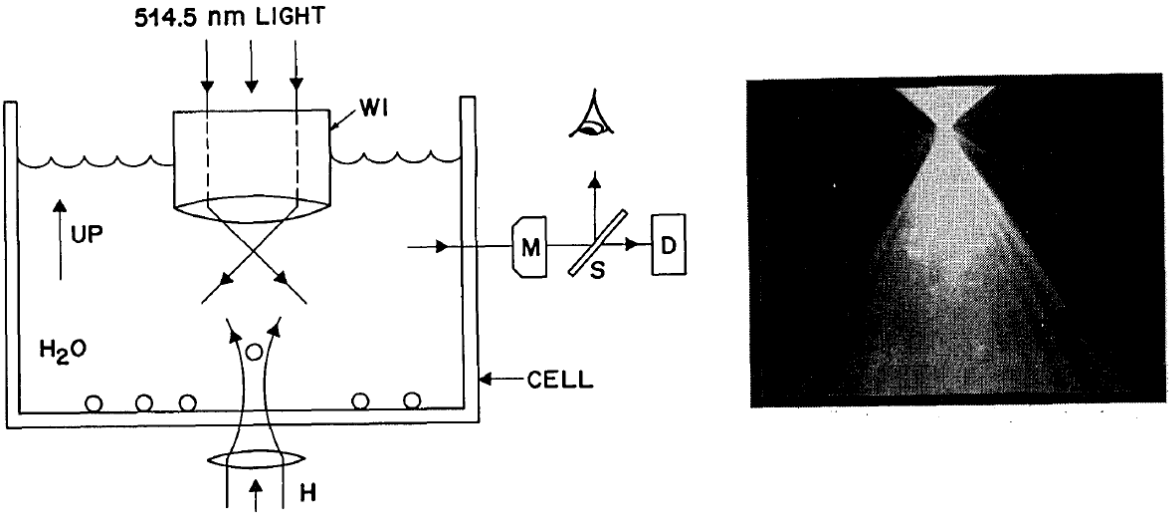


Figure 1-4 : *schéma du dispositif utilisé par Ashkin et Dziedzic [8] pour piéger des billes de diverses tailles dans le faisceau d'un laser fortement focalisé d'une longueur d'onde de 514.5 nm. A droite une photo, issu du même article, d'une bille de 10 µm piégée dans le faisceau.*

La calibration de la force du piège est complexe et les propriétés dépendent de la taille des particules à piéger. Il existe plusieurs régimes différents selon la taille : le régime de Mie pour une particule plus grande que la longueur d'onde du laser et le régime de Rayleigh pour une particule bien plus petite que la longueur d'onde. Ces propriétés seront plus amplement décrites dans la suite du chapitre.

L'ensemble de ses recherches a donc conduit à la création d'un nouvel outil appelé pince optique. La micromanipulation d'objets uniques permet d'étudier les comportements singuliers de certaines particules, aussi bien biologiques comme des virus en passant par les polymères ou autre système colloïdal.

1.2. Les pinces optiques

Dans cette seconde partie de l'introduction, je vais faire une description plus détaillée du fonctionnement des pinces optiques. Comment une bille de quelques micromètres de diamètre peut-elle être manipulée par la lumière ? quels sont les principes physiques qui permettent de piéger ?

- **Les principes d'un piège optique**

Le phénomène de piège optique est généré par un faisceau laser fortement focalisé à l'aide d'un objectif de microscope d'une grande ouverture numérique. Une particule diélectrique proche du point focal va subir une force optique due au réarrangement du front d'onde après l'interaction faisceau/particule. Cette force optique se divise en deux composantes : d'une part la force de radiation dirigée dans la direction de propagation du laser et d'autre part une force de gradient dirigée dans la direction de la zone de plus forte intensité lumineuse [9].

La lumière est une onde électromagnétique qui transporte de l'énergie, mais aussi une quantité de mouvement ou impulsion, grâce à laquelle la lumière exerce une action mécanique et nous pousse un tout petit peu. C'est ce qui produit la queue des comètes notamment.

Les rayons réfléchis contribuent à la force de diffusion qui pousse l'objet dans la direction du faisceau laser. Le piège est stable dès lors que les forces de gradient surpassent les forces de diffusion.

La force de radiation qui est dirigée dans le sens de propagation du faisceau représente le transfert de quantité de mouvement des photons qui tendent à pousser la particule dans la direction de propagation. Les rayons de lumière sont diffusés par la bille dans toutes les directions et d'autres sont absorbés. Ce phénomène provoque un transfert de quantité de mouvement des photons à la bille. Pour une diffraction isotrope, les forces résultantes se compensent toutes entre elles sauf dans la direction de propagation. Dans la plupart des cas cette force est dominante, cependant pour un faisceau avec un fort gradient d'intensité (par exemple le point focal du faisceau fortement focalisé) la seconde composante de la force optique générée n'est plus négligeable comme illustré sur les **Figure 1-5 (A)** et **(B)**. Cette force de gradient est due à l'effet du laser sur la particule diélectrique, il génère des dipôles dans la particule et leurs interactions avec le champ électrique inhomogène du point focal provoquent cette force de piège optique. Elle est proportionnelle au gradient d'intensité lumineuse dans le point focal du laser.

Pour avoir un piège stable dans les trois dimensions (x, y, z), la force de gradient doit être plus importante que la force de diffraction. Pour remplir cette condition, il est nécessaire d'avoir un faisceau avec un gradient fortement marqué comme c'est le cas pour un faisceau de type gaussien fortement focalisé. L'utilisation d'un objectif avec une grande ouverture numérique permet de remplir cette condition. Le point d'équilibre de la bille où les deux forces mises en jeu se contrebalancent se situe juste après le point focal du faisceau. Pour des petits déplacements de la bille (environ 150 nm), la force de rappel du gradient est proportionnelle à la distance séparant la particule piégée du point d'équilibre. En d'autres termes, le piège optique se comporte comme un ressort de Hooke dont la rigidité est proportionnelle à l'intensité de la lumière. Un schéma du piège optique est disponible sur la **Figure 1-5 (C)**.

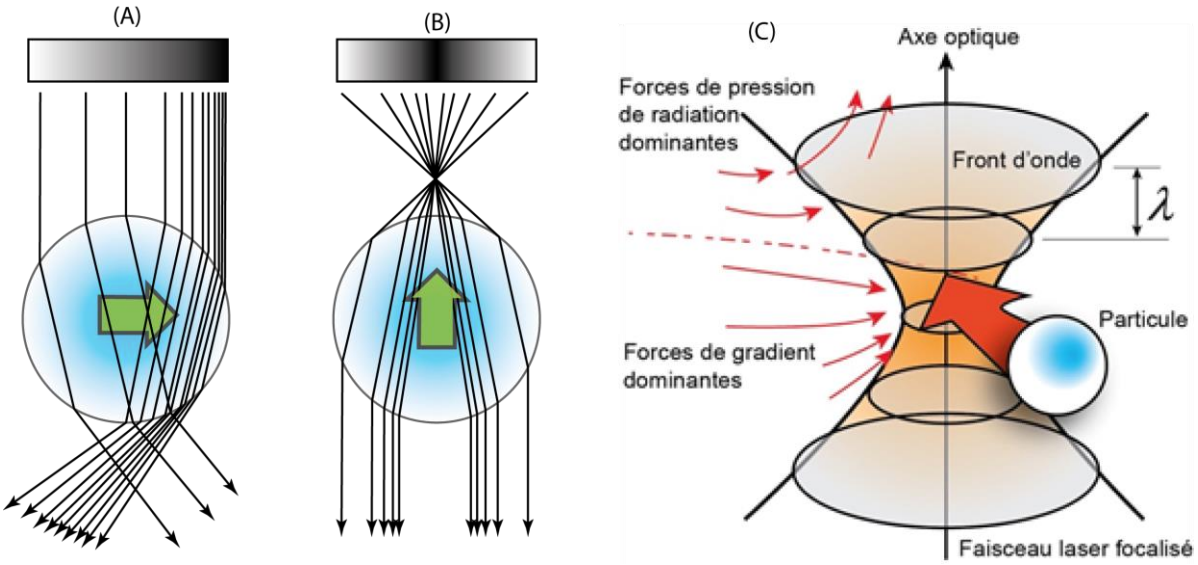


Figure 1-5 : *Schéma des rayons traversant une bille et générant la force de gradient. La figure de gauche (A) montre le passage des rayons incidents lorsque le profil d'intensité du laser est un gradient croissant (schématisé par le rectangle dégradé au-dessus des rayons). Le profil d'intensité est croissant de la gauche vers la droite. La réfraction des rayons par la bille transparente change la quantité de mouvement des photons. La loi de conservation des moments implique un changement de la quantité de mouvements de la bille égal et opposé à la propagation des rayons. De cette conservation résulte la force illustrée par la flèche verte. La force totale que subit la bille est donc dans la direction de propagation de la lumière et est aussi dirigée vers la zone de plus forte intensité. Le schéma (B) montre un profil d'intensité de type gaussien et le faisceau est fortement focalisé. Cette forte focalisation induit un gradient en trois dimensions. Comme pour le premier profil la flèche verte montre la force que subit la bille, la force résultante sera dirigée vers le haut (opposée à la direction de propagation) donnant un*

point d'équilibre juste après le point focal. (C) Schéma du piège optique avec les forces générées par le faisceau en fonction de la position de la bille.

- **Les régimes limites selon la taille de la particule**

Pour bien connaître les caractéristiques d'un piège optique il est nécessaire de calculer les forces en présence. Il existe deux cas limites où la force optique exercée sur une sphère peut être facilement calculée. Ces deux cas limites se distingue par la taille de la sphère. Pour une sphère dont le diamètre est plus grand que la longueur d'onde λ du laser de piège (d >> λ), les conditions de diffusion de Mie sont satisfaites et pour d << λ on se trouve dans le régime de diffusion de Rayleigh [9]–[12].

Dans le cas de la diffusion de Mie (d >> λ) le faisceau laser peut être vu comme une somme de rayons optiques traversant une bille comme illustré sur les **Figure 1-5** et **Figure 1-6**. Dans ce cas les lois physiques de réflexion, réfraction et diffraction de la lumière peuvent s'appliquer et les composantes de la force optique peuvent être calculées. Lors d'une réfraction de la lumière incidente sur la surface d'une sphère, un changement de quantité de mouvements des photons s'opère et par la 3ème loi de Newton un changement de quantité de mouvement égal et opposé au sens de propagation de la lumière s'applique à la sphère. La force que subit la sphère est proportionnelle à l'intensité et, selon l'indice de réfraction de la bille, celle-ci sera soit attirée vers le centre du gradient d'intensité soit poussée vers la zone de moins forte intensité.

La **Figure 1-6** montre la propagation d'un rayon incident unique arrivant sur une sphère. Cette propagation est régie par les lois de diffraction et il est possible de remonter à la force qu'exerce ce rayon sur la bille. Pour retrouver la force totale qu'exerce le faisceau entier il est nécessaire d'additionner tous les rayons. C'est ce que présente A. Ashkin dans ses travaux et il arrive à exprimer la force totale exercée sur une bille par un piège optique. En considérant la force d'un rayon avec une puissance P et un angle d'incidence θ et une quantité de mouvement d'incidence par secondes de $\frac{n_1 P}{c}$, la force totale générée sera la somme de toutes les contributions dues à la réflexion et aux diverses réfractions. Cette force se décompose en deux parties.

D'une part, on a la force selon l'axe y (perpendiculaire à l'axe du faisceau) qui s'écrit de la forme :

$$\boldsymbol{F_y = F_s = \frac{n_1 P}{c}\left\{1 + R\cos 2\theta - \frac{T^2[\cos(2\theta - 2r) + R\cos 2\theta]}{1 + R^2 + 2R\cos 2r}\right\}} \qquad (1.1)$$

Et d'autre part, la force selon l'axe z (dans l'axe du faisceau) :

$$\boldsymbol{F_z = F_g = \frac{n_1 P}{c}\left\{R\sin 2\theta - \frac{T^2[\sin(2\theta - 2r) + R\sin 2\theta]}{1 + R^2 + 2R\cos 2r}\right\}} \qquad (1.2)$$

avec θ et r les angles d'incidences et de réfraction et R et T les coefficients de Fresnel de réflexion et réfraction. Les deux composantes de la force totale représentent la force de diffraction pour l'axe z et la force de gradient de la lumière pour l'axe y (ou x).

Pour rappel ce modèle n'est valable que pour une sphère de grande taille par rapport à la longueur d'onde. Pour des particules de tailles plus petites par rapport à λ, on rentre dans le cas de la diffusion de Rayleigh. Dans ce cas la particule se comporte comme un dipôle ponctuel baigné dans un champs électrique inhomogène. Dans cette approximation la force de diffraction de la lumière vient de l'absorption et de l'énergie reçue par le dipôle. Pour une bille la force s'écrit :

$$F_{scatt} = \frac{I_0 \sigma n_m}{c} \tag{1.3}$$

avec I_0 l'intensité de la lumière incidente, σ la section de diffusion de la sphère, n_m l'indice de réfraction de la bille et enfin c la vitesse de la lumière dans le vide. Cette force est dirigée vers le sens de la propagation du faisceau et est proportionnelle à l'intensité du laser.

La force de gradient vient de l'interaction entre le dipôle ponctuel et le champ inhomogène dans lequel elle est baignée. Cette force s'écrit :

$$F_{grad} = \frac{2\pi\alpha}{c n_m^2} \nabla I_0 \tag{1.4}$$

avec α, la polarisabilité de la sphère. La force de gradient est proportionnelle au gradient d'intensité du faisceau. Ces deux déterminations de la force optique d'un piège ne sont valables que pour deux cas précis (d >> λ et d << λ). Seulement, la plupart des objets biologiques ou autres particules piègeables et intéressantes à étudier ont une taille comparable à la longueur d'onde du laser. La détermination de la force du piège s'avère beaucoup plus complexe et la théorie physique qu'il y a derrière l'est tout autant. Un mélange des deux théories précédentes doit être opéré pour répondre au mieux au problème. La théorie généralisée de Lorenz-Mie [13] permet de modéliser au mieux le cas général mais ne sera pas abordée au vue de sa complexité qui sort du domaine de mes recherches.

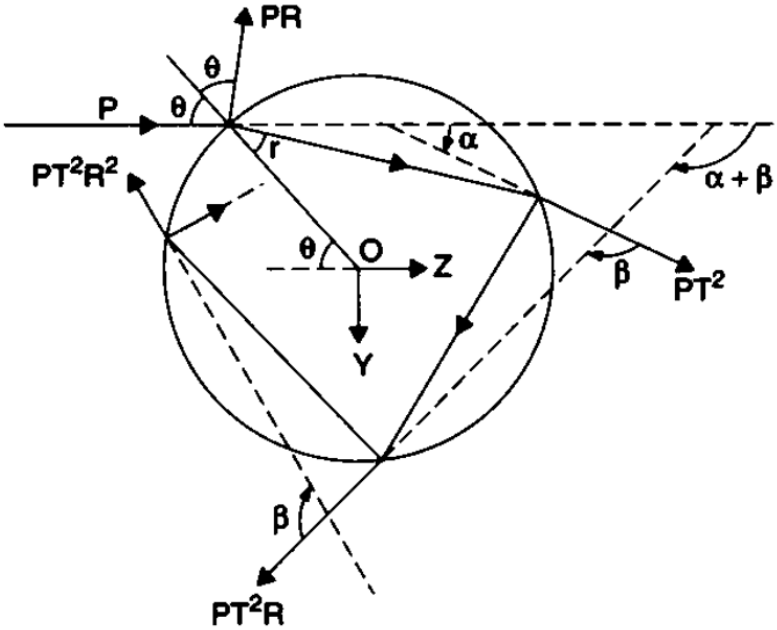


Figure 1-6 : *schéma illustrant la propagation d'un rayon de lumière du faisceau laser à travers une bille. Le rayon incident est à une puissance P et arrive avec un angle d'incidence ϑ par rapport à la normale. Cette géométrie permet de calculer la force de diffraction d'un seul faisceau incident. Image issue de l'article de A. Ashkin [11]*

La **Figure 1-7** représente la force subie par la bille selon sa position à proximité d'un piège optique. Lorsqu'elle est positionnée en amont du piège, elle est poussée vers le centre (le point focal) du piège, de même lorsqu'elle est sur un coté du piège. Sa position d'équilibre est à l'endroit où il y a un contrebalancement de la force de gradient du piège et de la force de radiation des photons. La bille se placera donc juste après le point focal du laser. Il est important de noter que lorsque la bille est située en aval du piège, il est impossible de la piéger. En effet la force de pression de radiation est plus importante que la force de gradient, la bille sera poussée vers l'extérieur du piège.

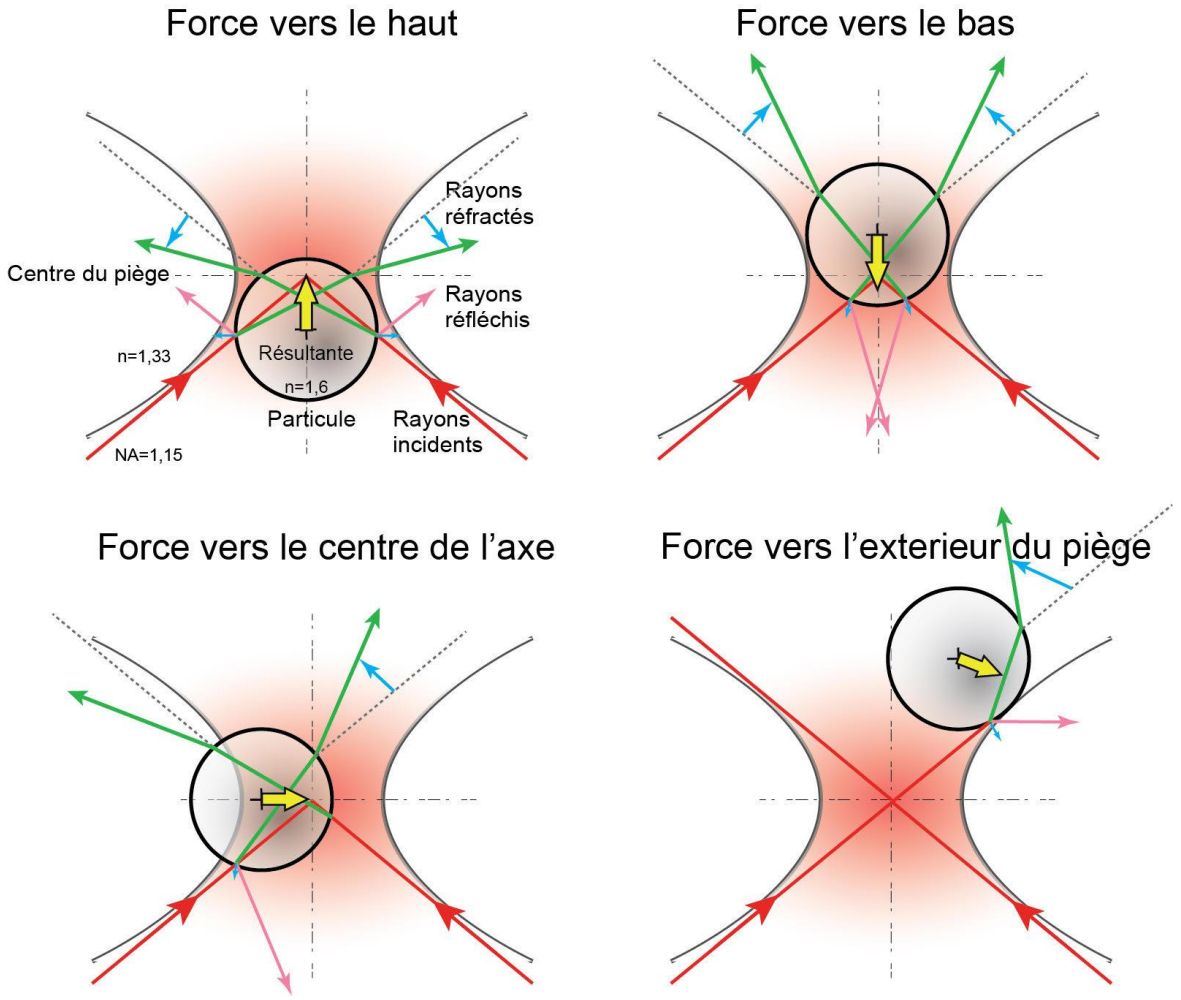


Figure 1-7 : *Schéma explicatif représentant la force subie par la bille lors des expériences de piégeage optique. Selon la position de la bille, la force peut ramener la bille vers le centre du piège ou alors la faire sortir (la pousser en dehors du piège).*

La plupart des théories et recherches abordées jusqu'à présent se basent sur la manipulation de sphères ou billes par la lumière. Cependant, les pinces optiques offrent la possibilité de piéger d'autre types de particules comme des cylindres. Comment ces objets à la géométrie particulière se comportent dans un piège optique ?

- **La manipulation de particules cylindriques**

Toutes les particules qui peuvent être manipulées par des pinces optiques ne sont pas forcément des sphères, il est possible de piéger des cellules, des bactéries ou encore des particules spécifiques dédiées à une certaine application. La caractérisation des forces du piège s'avère plus complexe et nécessite des méthodes de calculs numériques avancées pour obtenir les modèles de diffraction de telles particules. Un autre problème est l'orientation de la particule dans le piège, par exemple un cylindre pourra avoir plusieurs positions stables : horizontale, verticale, en biais...

Dans son article Y. Cao et al propose une technique basée sur la simulation dynamique. Il s'agit d'une technique de simulation en trois dimensions basée sur le mouvement libre de particules en suspension décrite par les lois de la dynamique newtonienne, pour prédire l'orientation et les positions d'équilibre de particules non sphériques dans un piège optique [14]. Ils appliquent cette méthode sur des micro-cylindres de dimensions différentes. La **Figure 1-8** (issue de l'article) montre les résultats obtenus.

Nous pouvons distinguer plusieurs régimes selon les dimensions (diamètre et hauteur) de la particule cylindrique. Pour des cylindres avec une hauteur inférieure à 1 µm environ (en dessous de la ligne rouge), ceux-ci seront orientés horizontalement dans le piège. Pour des dimensions comprises entre la courbe bleu et la rouge le cylindre s'oriente en biais dans le piège. Au-dessus de la courbe bleu l'orientation sera verticale. Enfin, il existe une zone où il est impossible de piéger la particule (zone hachurée).

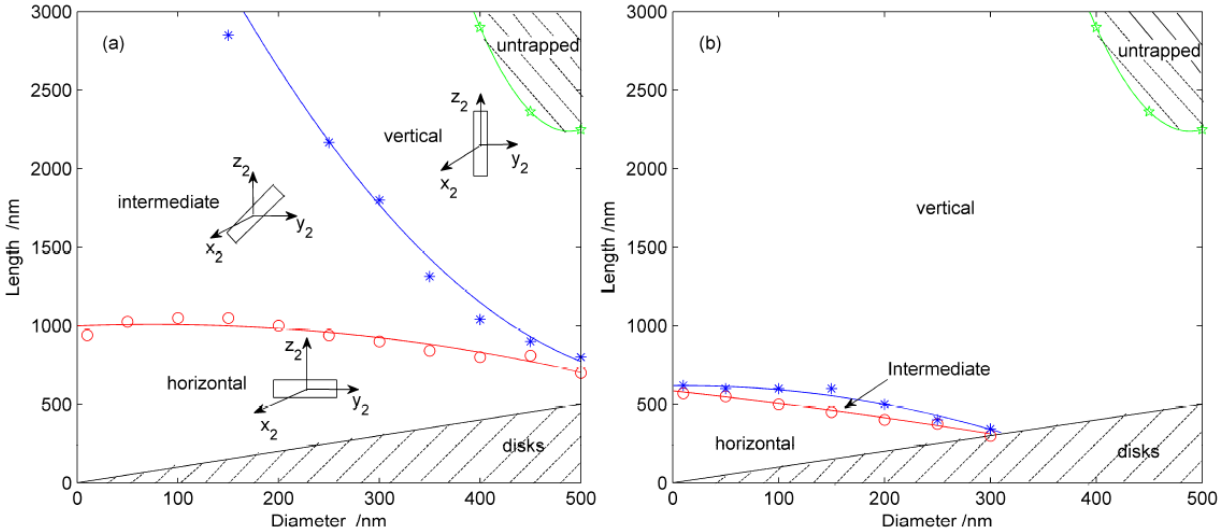


Figure 1-8 : *zone d'orientation de micro-cylindre dans un piège optique selon (a) une polarisation linéaire et (b) une polarisation circulaire. Il y a 4 régimes : la zone de non-piégeabilité, le piégeage vertical, horizontal et intermédiaire. Nous pouvons remarquer que selon la polarisation du laser ces zones sont différentes, sauf la zone de non-piégeabilité [14].*

La position d'équilibre dans le piège de la particule à la géométrie particulière est conditionnée par les dimensions des objets à piéger et la polarisation du laser. Au vue de ces résultats il est primordial de bien connaître les dimensions de la particule à piéger selon l'application envisagée.

1.3. État de l'art des applications

La manipulation d'objets uniques par les pinces optiques offre une nouvelle approche pour leur étude ainsi que pour des objets biologiques grâce au caractères non invasif de l'outil. Dans cette partie je vais présenter quelques applications des pinces optiques en commençant par les premiers travaux d'Ashkin et Dziedzic sur des objets biologiques puis sur des travaux plus récents.

Les premiers lasers qui servaient au piégeage optique disposaient, généralement, d'une longueur d'onde dans la gamme du visible. Dans cette zone du spectre de la lumière, la manipulation d'objets biologiques était très difficile en raison des dommages causés aux échantillons. L'utilisation d'un laser infrarouge a permis de minimiser ces dommages [15]. Sur la **Figure 1-9 (A)** on peut voir le dispositif utilisé par A. Ashkin pour manipuler des bactéries ou autres échantillons biologiques. Le piège par laser infrarouge ne provoque aucun dommage sur les cellules, il est possible de garder une cellule dans le focus du laser pendant un long moment (environ 3 heures) et ainsi de pouvoir observer la division cellulaire comme on peut le voir sur la photo de la **Figure 1-9 (B)**. Cette capacité des cellules de levures à se diviser en étant piégées montre que le laser infrarouge n'a aucun effet néfaste sur celles-ci.

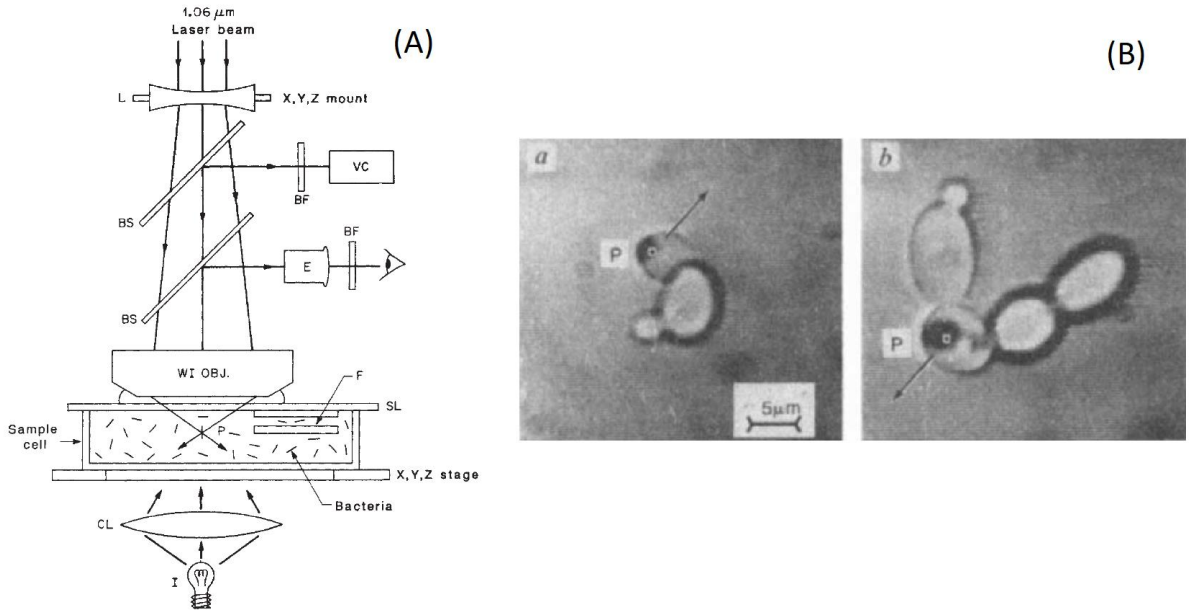


Figure 1-9 : *(A) Schéma du set up utilisé par A. Ashkin pour piéger des objets biologiques. (B) Photos de cellules de levure piégées dans le laser infrarouge, la photo a présente une cellule et la photo b présente cette même cellule mais après la division cellulaire. Ces images sont issues de l'article de A. Askin [15].*

Dans une autre étude et avec l'utilisation d'une laser infrarouge, A. Ashkin et ses partenaires ont réussi à déterminer la force générée par un organite [16]. Brièvement, un organite est un composant de la cellule (noyau, ribosome, vésicule…etc.). Ici la force motrice d'une mitochondrie se déplaçant le long d'un microtubule a pu être déterminée grâce aux pinces optiques. L'expérience consiste à piéger une mitochondrie unique à l'aide du laser à une certaine puissance puis en réduisant la puissance jusqu'à ce que l'objet puisse sortir du piège ils peuvent remonter à la force motrice de l'organelle. Ainsi ils trouvent une force de $2{,}7.10^{-7}$ dynes (soit 2,7 pN) pour un seul moteur moléculaire **Figure 1-10 (b)**.

De plus en plus en vue, les pièges optiques s'affirment comme la référence pour l'étude d'objet unique. Le chercheur Steven Block est un des pionniers de l'utilisation des pinces optiques pour ces applications. Une de ces contributions dans le domaine est l'observation directe des pas de l'ARN polymérase lors de la transcription [17]. La transcription est un mécanisme qui permet de recopier les données des gènes. Pendant cette opération, l'ARN polymérase (ARNP) se déplace de façon progressive le long d'un brin d'ADN, créant ainsi une protéine complémentaire de l'ARN. La **Figure 1-10 (A)** est un schéma de l'expérience faisant intervenir un dispositif à deux pièges et dans lequel tous les éléments optiques, externes au microscope, sont scellés dans une boîte remplie d'hélium à la pression atmosphérique. Cela limite les perturbations du faisceau laser par l'air et améliore ainsi la résolution.

Deux pièges sont nécessaires à l'évaluation de la force de l'ARNP, un complexe bille – ADN – ARNP – bille est formé et chaque bille est piégée dans un faisceau différent. Le mouvement d'une bille (celle de droite sur la **Figure 1-10 (a)**) est enregistré, lors de la transcription l'ARNP va se déplacer le long du brin d'ADN et par conséquent la bille va aussi se faire tirer. Ce déplacement est visible sur les signaux enregistrés et permet de remonter au pas de l'ARNP qui sont en moyenne de 3,4 Å. Avec ces quelques innovations sur un dispositif de pinces optiques, il est possible de mesurer des déplacements de l'ordre de l'ångström.

En enregistrant le mouvement d'une bille dans un piège il est possible de mesurer des forces mises en jeu lors de phénomènes connus mais jamais quantifiés comme le déplacement de la kinésine (Voir le schéma de **Figure 1-10 (B)**) le long d'un microtubule par pas de 8 nm [18] ou encore la force générée par la myosine lors de l'hydrolyse de l'ATP [19]. (Schéma de la **Figure 1-10 (C)**)

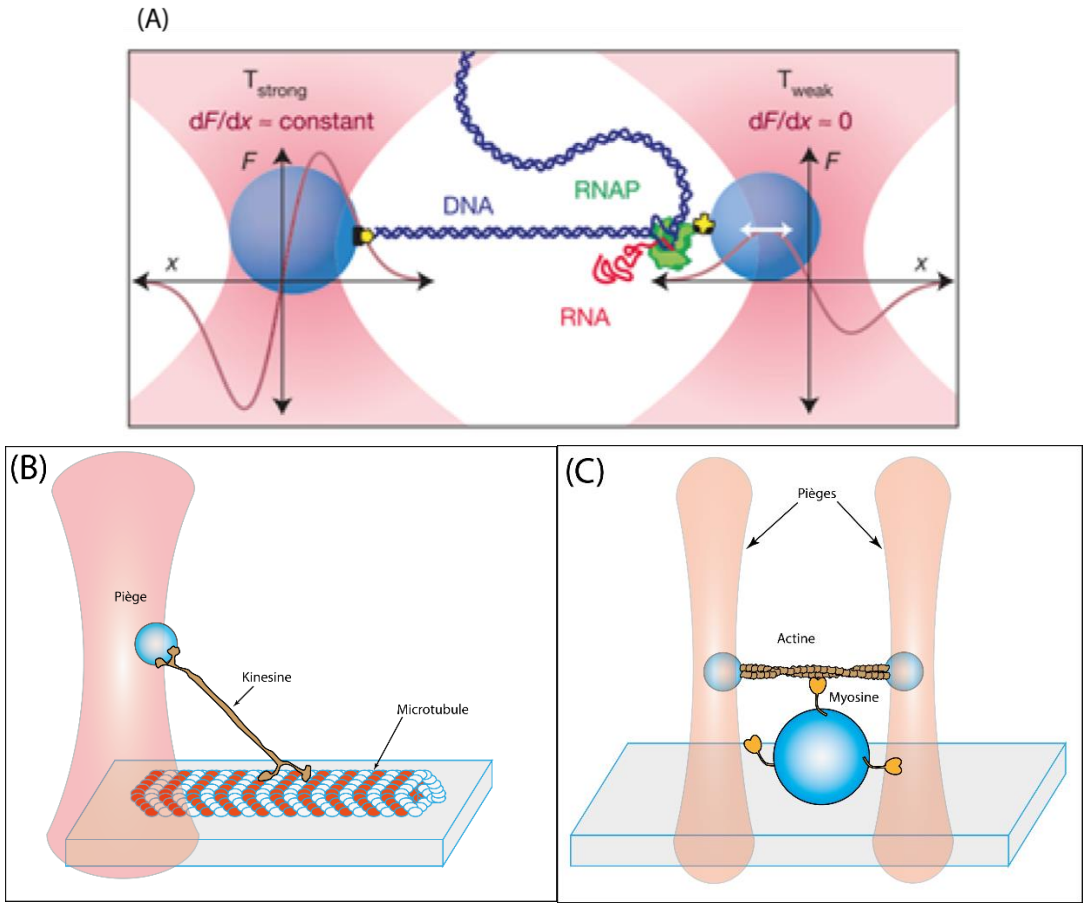


Figure 1-10 : *(A) schéma du dispositif mis en place par S. Block pour mettre en évidence le mouvement lors de la transcription par des molécules unique d'ARNP d'Escherichia coli. Il y a deux pièges différents : un piège faible (à droite) dans lequel une bille est piégée et un piège fort (à gauche) dans lequel est piégée une bille plus grande que la première. Les deux courbes représentent la force de chaque piège en fonction de la position. Une molécule d'ARNP est attachée à la bille de droite qui est reliée par un brin d'ADN à la sphère de gauche. Schéma extrait de l'article de S. Block [17]. (B) Le mouvement d'une bille piégée est enregistré alors qu'elle est tirée par un moteur de kinésine unique se déplaçant le long d'un microtubule, cette étude menée par Svoboda et al. [18] révèle que le moteur se déplace avec des pas de 8 nm. (C) Utilisation d'un piège optique à double faisceau ayant pour but l'étude de la force mécanique générée par une seule myosine lors de l'hydrolyse de l'ATP [19].*

Ces premières recherches ne font généralement intervenir qu'un voire deux pièges optiques. Pour étendre ces études à des systèmes plus complexes et plus grands comme un assemblage de colloïdes il est nécessaire d'étendre les dispositifs de pinces optiques simples à des systèmes à multiples pièges. Appelées pinces optiques holographiques, ces dispositifs permettent d'avoir plusieurs pièges avec un seul faisceau laser [20]. D. G. Grier et ses partenaires font partie des premiers à avoir travailler sur ce type de dispositifs. Pour obtenir un ensemble de pièges à partir d'un seul faisceau laser ils ont utilisé un générateur de modèles de diffraction (disponible à l'achat), c'est-à-dire un objet qui va diffracter le faisceau et créer une nouvelle configuration qui aboutit à un ensemble de pièges. Sur le schéma de la **Figure 1-11**, on peut voir que cet objet est placé juste après la sortie du laser. Il permet de créer un modèle carré de 4X4 pièges (**Figure 1-11 (a)**). Pour l'expérience des billes ont été piégées puis relâchées (**Figure 1-11 (c)**). Cette expérience montre la possibilité d'arranger un système colloïdal grâce à un ensemble de pièges. Les applications envisagées peuvent aller de l'étude de ces systèmes à l'élaboration de surfaces structurées par pinces optiques, ou encore à la fabrication de circuits optiques particuliers.

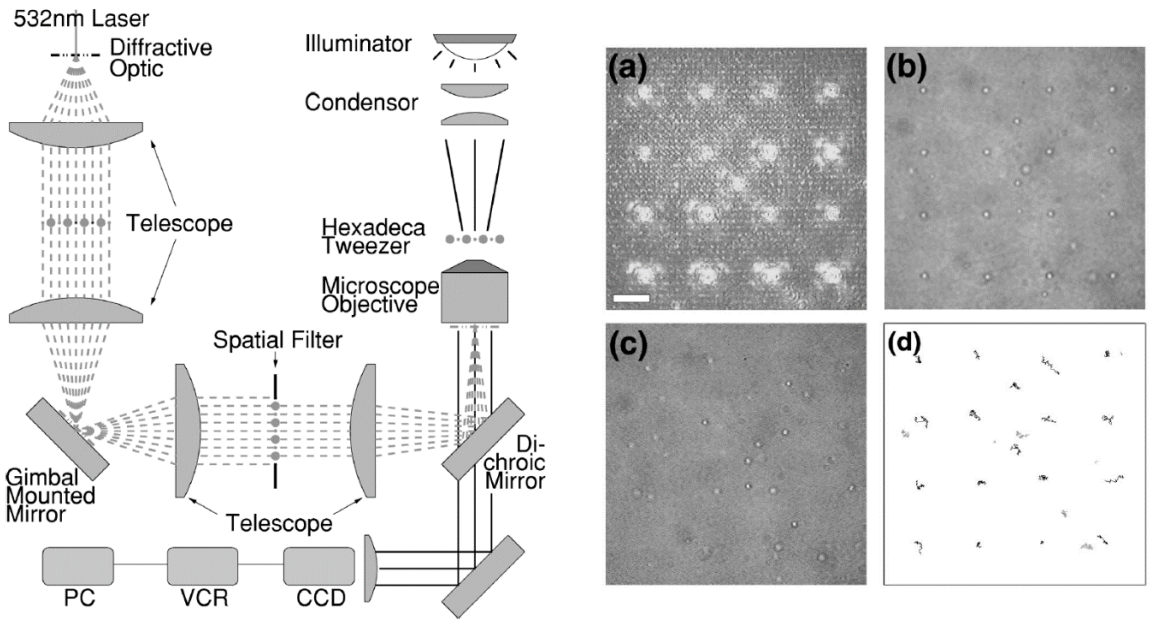


Figure 1-11 : *Sur la gauche est présenté le dispositif utilisé par E.R. Dufresne et D. G. Grier pour avoir un ensemble de pièges optiques issus d'un seul et même faisceau laser. Sur la droite des photos de la disposition de ces pièges une fois allumés [20]. Sur la photo (a) on voit les points de lumière diffractés par des micro-billes piégées, la barre d'échelle est de 10 µm. La photos (b) montre les billes dans le milieu juste après avoir éteint le laser (les pièges) puis 3.1 secondes après (c). Et enfin l'image (d) est la reconstruction des trajectoires des billes une fois les pièges éteints. Images issues de l'article [20].*

1.4. Le dispositif des pinces optiques

Dans cette partie, je vais décrire le dispositif optique mis en place au CBS (Centre de Biochimie Structurale) pour la manipulation de microparticules et plus précisément le microscope à force photonique. J'expliquerai aussi comment on peut détecter la position d'une particule piégée dans le faisceau laser et enfin je décrirai les calibrations nécessaires pour avoir les caractéristiques du piège.

- **Le dispositif optique à notre disposition**

Nous disposons d'un laser infrarouge (Azure Light System) d'une puissance de 3 Watts et d'une longueur d'onde de 1064 nm. Il produit un faisceau stable et collimaté dans le mode TEM_{00} couplé à un microscope inversé pour générer un piège optique. On peut séparer le dispositif en deux parties distinctes : d'une part on a l'unité laser et d'autre part l'unité détection. Pour simplifier, tout ce qui est avant le piège est la partie laser et ce qui est après est la partie détection. Une partie du dispositif, celle dédiée à l'utilisateur, est exposée sur la **Figure 1-12**. Un schéma du dispositif complet est disponible sur la **Figure 1-13**.

L'unité de détection recueille la lumière après le piège, qui va vers un détecteur sensible à la position (DSP) et vers un photodétecteur séparé afin de suivre la position latérale et axiale de la particule piégée.

Une plaque demi-onde est placée juste à la sortie du laser suivie d'un séparateur de faisceau polarisant. Cette configuration permet de ne garder que la polarisation p du laser c'est-à-dire la partie qui est parallèle au plan d'incidence du faisceau. La polarisation d'une onde se décompose en deux polarisations rectilignes orthogonales entre elles nommées s et p. La polarisation s est perpendiculaire au plan d'incidence et la polarisation p est parallèle à ce plan. Ne garder que la polarisation p du

faisceau nous permet de limiter les phénomènes de réflexion sur les lentilles lors du passage de la lumière au travers de celles-ci.

La lumière du laser passe à travers un télescope 1:1 qui est construit en plaçant deux lentilles (L1, L2, longueur focale f = 250 mm) dans la configuration standard 4f. Un sténopé (*pinhole* 600 µm) est placé en position 2f de la configuration 4f afin de couper le bruit des hautes fréquences. Un modulateur acousto-optique (AOM) est utilisé pour stabiliser la puissance du laser, à l'aide d'un contrôleur PID (*Proportional Integrative Derivative*), implémenté dans un détecteur FPGA (*Field Programmable Gate Array*). Le signal utilisé par le système PID est acquis par le photo détecteur dédié. Il reçoit une partie de l'intensité du faisceau, grâce à la présence d'une fenêtre en coin placée après l'AOM. Cette composante réfléchit une partie du faisceau jusqu'au détecteur mentionné précédemment, qui est précédé d'une lentille (L5, f = 40 mm) et, si nécessaire, par un filtre de densité neutre (Optical Density OD = 1) qui permet de réduire l'intensité reçue par le détecteur. Le diaphragme placé avant la lentille L3 permet de couper la seconde réflexion générée par la fenêtre en coin.

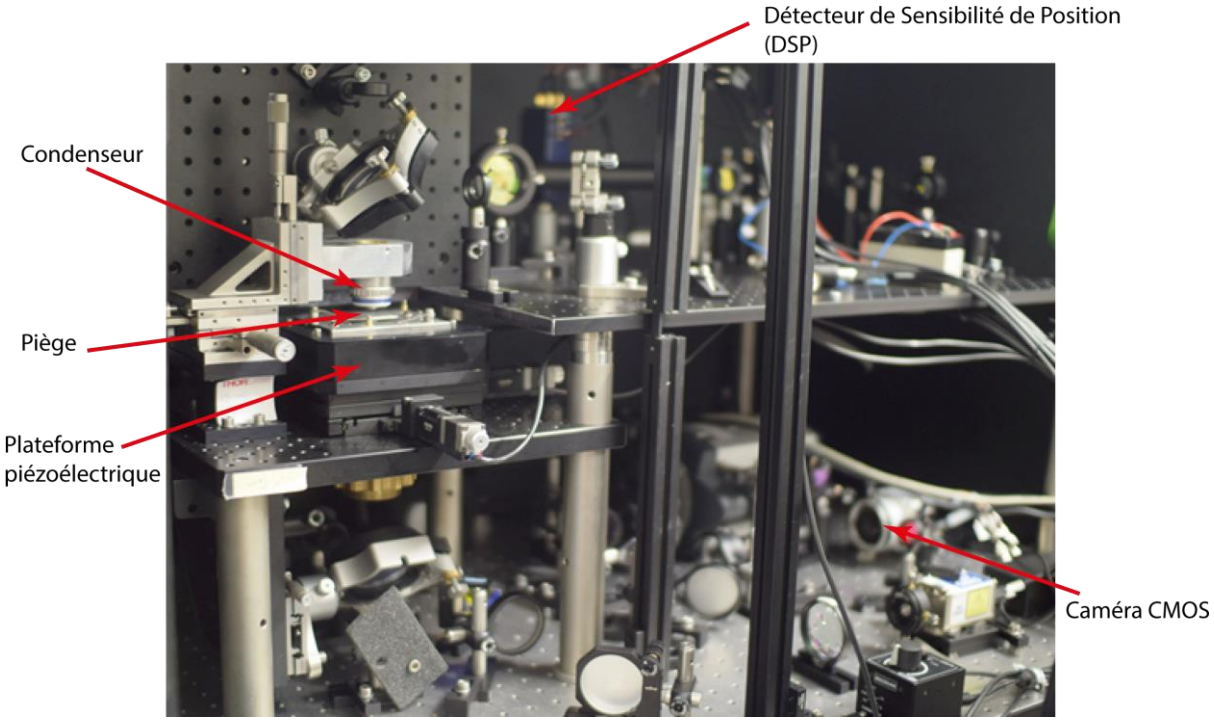


Figure 1-12 *:Photo de la partie dédiée à l'utilisateur du piège optique. L'échantillon est posé entre le condenseur et l'objectif, sur la plateforme piézoéléctrique.*

Le faisceau est élargi à l'aide d'un expanseur de faisceau (1:10). Les expanseurs de faisceaux, utilisés couramment dans l'interférométrie, la télédétection, le traitement par laser de matériaux et les applications de balayage par laser, reçoivent de la lumière collimatée dans le système et l'étendent en un faisceau collimaté plus large en sortie. Le faisceau est ensuite dirigé vers un miroir M6 puis vers M7, qui fait partie du périscope qui amène le faisceau élargi au système de détection. Le piège est formé entre deux objectifs identiques du microscope à immersion dans l'eau (ouverture numérique NA = 1,2), qu'on distingue en les appelant objectif et condenseur. Le diamètre du faisceau élargi a été choisi afin de remplir complètement l'ouverture de l'arrière de l'objectif. L'illumination de l'échantillon est assurée par une LED qui émet dans le visible (660 nm ou 470 nm) placée au-dessus du miroir M8. Sa lumière est focalisée par une lentille à travers le condenseur et l'objectif et amenée à une caméra CCD à l'aide du miroir (M7) et de la lentille L8. Après le condenseur, le miroir M8 dirige le faisceau vers la partie dédiée à la détection. Le signal résultant est détecté sur un détecteur sensible à la position (PSD)

pour la détection de la position latérale (Signaux X, Y) et un photodétecteur pour les déplacements axiaux (Signal Z). Le plan focal arrière du condenseur est enregistré sur une caméra CCD.

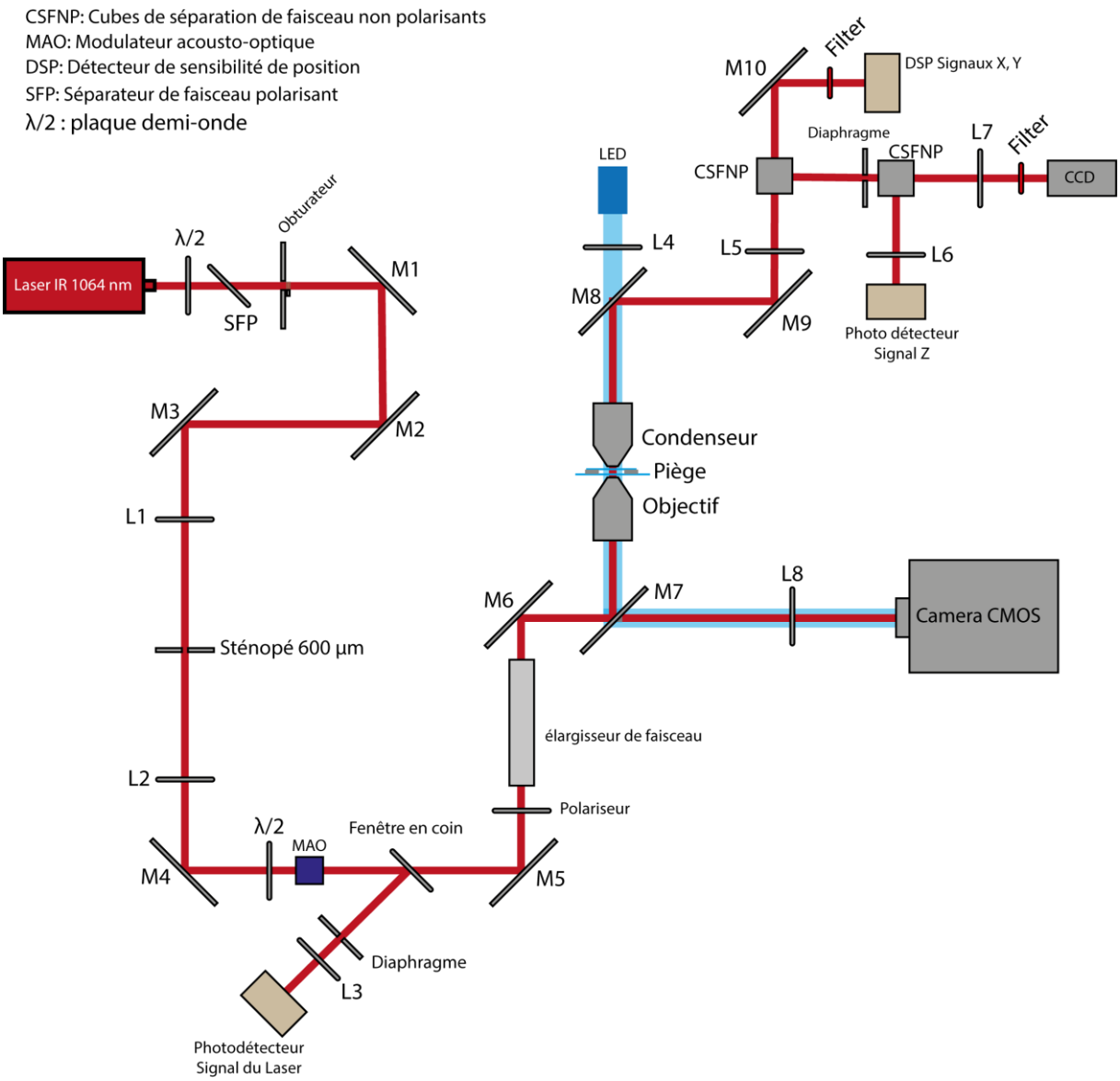


Figure 1-13 : *Schéma du dispositif optique assemblé par F.Pedaci, Z. Santybayeva et E. Battistella au CBS. C'est sur ce piège optique que se déroulent mes travaux de recherche.*

Ce système optique est un des plus complexes que j'ai rencontré, l'alignement peut prendre parfois plus d'une semaine. La méthode d'alignement repose sur l'utilisation de deux diaphragmes. Le faisceau doit être dirigé parallèlement à la table optique et le long d'une ligne droite. La longueur d'onde du laser utilisé est de 1064 nm (émission infrarouge), l'alignement doit donc être effectué à l'aide d'une carte qui dispose d'une plage de longueurs d'onde d'absorption dans le proche infrarouge et une plage de longueurs d'onde d'émission dans le visible. Il est également possible d'utiliser une caméra CCD infrarouge pour un alignement plus fin.

Un premier alignement grossier est effectué à l'aide de deux diaphragmes et de la carte de détection. Les deux diaphragmes doivent être montés à la même hauteur. L'un des deux est placé près du composant optique que l'on veut aligner et l'autre est placé très loin (à l'infini). Ensuite, la hauteur et le déplacement latéral du composant optique sont réglés jusqu'à ce que le faisceau passe à travers le premier diaphragme. Le deuxième diaphragme sert à régler l'inclinaison du composant optique. La

procédure est répétée jusqu'à ce que le rayon passe à travers les deux diaphragmes sans être coupé. La procédure est décrite dans le schéma de la **Figure 1-14**. La même procédure est appliquée pour l'ensemble du montage, en veillant à ce que le faisceau passe par le centre des composants optiques, en particulier dans le cas de composants non plats. Enfin, si nécessaire, la caméra CCD est utilisée pour un alignement plus fin.

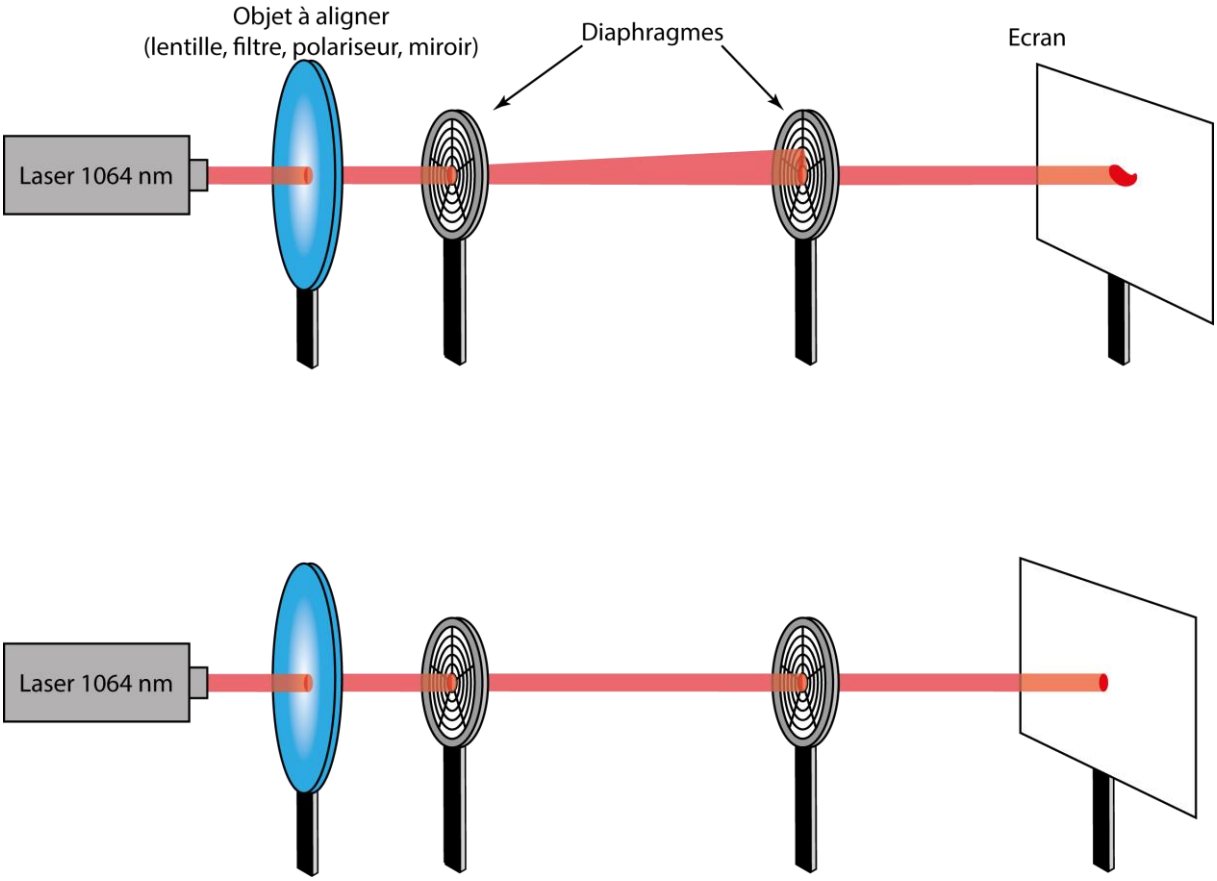


***Figure 1-14** : Schéma de la méthode d'alignement des composantes optiques à l'aide de 2 diaphragmes.*

- **Détection de la position d'une bille piégée**

Lorsqu'une bille ou un objet est piégé avec les pinces optiques, les signaux reçus par les divers détecteurs nous permettent de connaître la position de la particule dans le piège. Chaque changement de position dans le piège se traduira par un changement d'intensité sur les détecteurs. Sur le schéma du dispositif de la **Figure 1-13**, dans la partie détection (située après le piège), on dispose de deux détecteurs : le photodétecteur qui nous sert à mesurer le signal sur la position axiale (z) de la bille dans le faisceau et un détecteur de sensibilité de position quatre quadrant (PSD en anglais) qui nous donne la position dans le plan perpendiculaire au faisceau (x, y). Un schéma du mode de détection selon la position de la bille dans le piège est donné sur la **Figure 1-15**. Pour la position dans le plan on utilise le PSD, pour une bille piégée dans sa position d'équilibre l'intensité reçue par le détecteur est de type gaussienne (comme illustrée sur le schéma de la **Figure 1-15**). Si la bille est décalée de cette position, le pic d'intensité sera décalé aussi ce qui traduit un mouvement de la bille dans le piège. Pour avoir la position dans l'axe il faut regarder l'intensité reçue par le photo-détecteur. Lorsqu'un rayon traverse le piège à vide avec une phase Φ (schématisé en rouge sur la **Figure 1-15**) celle-ci est renversée de 180 ° lorsqu'elle arrive sur détecteur. Lorsqu'une bille est piégée une partie des rayons est diffusée par la bille et la phase de cette composante, n'étant plus focalisée, ne tourne pas de 180°. Sa valeur s'arrête à la valeur du point z où se trouve la bille. On a donc au niveau du détecteur de l'interférence entre la

composante diffusée (qui passe au travers de la bille au point z) et celle qui ne l'est pas et qui reste focalisée. Le niveau d'interférence (qui est visible comme une variation d'intensité sur l'axe du faisceau) dépend de la position z de la bille. Nous avons une mesure d'intensité que nous pouvons utiliser pour remonter à la position de la bille dans l'axe z.

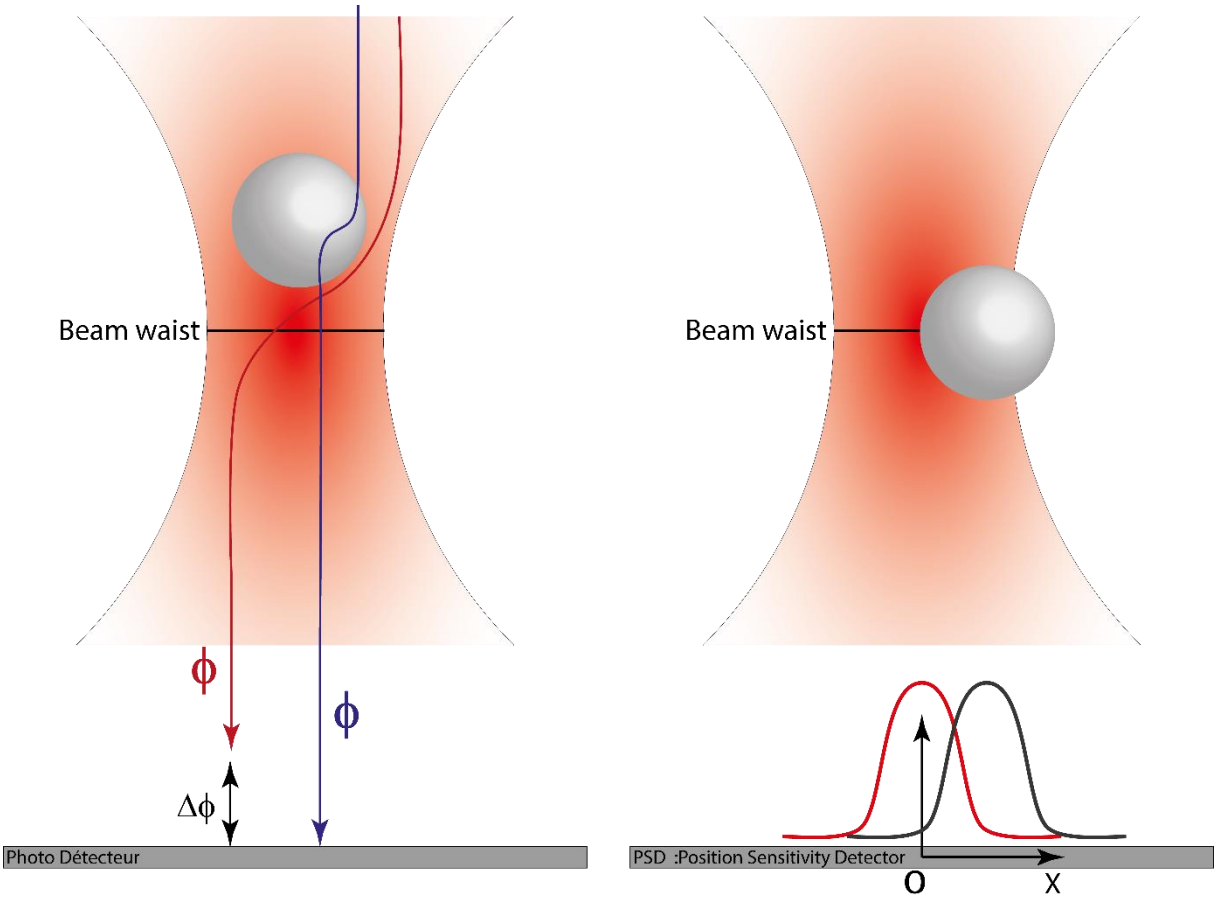


Figure 1-15 : *Schéma de la position de la bille dans le piège optique avec l'intensité reçue pour chaque détecteur.*

1.5. Étalonnage du piège

Un piège optique est caractérisé par trois grandeurs : sa raideur (en [N/m]), le coefficient de trainé de la particule piégée (drag en anglais en [N.s/m]) et la sensibilité des détecteurs (en V/m). Toutes les variations de positions sont visibles grâce aux deux détecteurs utilisés (le PSD et le photo détecteur). Les signaux sont enregistrés en volt, il est donc nécessaire d'avoir un coefficient qui nous permette de convertir ces volts en déplacement réel (en nm), c'est ce qu'on appelle la sensibilité. Pour des petits déplacements, la force développée par l'axe optique est analogue à la force de rappel d'un ressort qu'on peut noter : F = -k.x, ou k est notre coefficient de raideur et x le déplacement par rapport à la position d'équilibre. Pour des objets de la taille de ceux que l'on piège, on peut négliger les force d'inertie et de gravité. Dans cette section je vais décrire les méthodes appliquées pour déterminer les différents coefficients caractéristiques de notre piège.

- **L'équipartition**

Cette méthode permet de déterminer la raideur du piège en analysant les fluctuations de la particule dans le piège. Le coefficient de diffusion d'une particule sphérique avec un mouvement Brownien dans un fluide s'écrit, d'après la loi de Stokes-Einstein :

$$\boldsymbol{D = \frac{K_b T}{6\pi\eta R}} \tag{1.5}$$

Avec Kb la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité du milieu et R le rayon de la sphère.

Le déplacement quadratique moyen est :

$$\boldsymbol{\langle X^2(t)\rangle = 2nDt} \tag{1.6}$$

ou n est la dimension du problème.

Le mouvement de la bille dans le piège optique peut être assimilé à un mouvement Brownien dans un puits de potentiel harmonique [9], le théorème de l'équipartition peut être appliqué dans ce cas est nous donne :

$$\boldsymbol{K_b T = k < x^2 >} \tag{1.7}$$

Avec k_b la constante de Boltzmann, T la température et $<x^2>$ la variance du mouvement de la particule dans le piège. On retrouve donc la raideur du piège sans avoir plus d'informations caractéristiques sur le piège. Une autre utilisation de ces données peut être faite. En effet, le potentiel proche du centre du piège peut être approximé comme puits parabolique [21]. La densité spectrale de puissance des fluctuations d'une bille de diamètre d piégée dans les pinces optiques de raideur k dans un milieu de viscosité η peut s'exprimer comme une lorentzienne :

$$\boldsymbol{S(f) = \frac{S_0\, f_c^2}{f_c^2 + f^2}} \tag{1.8}$$

Avec la fréquence, $f_c = k/2\pi\gamma$ la fréquence de coupure où $\gamma = 3\,\pi\eta d$ le coefficient de drag d'une sphère et $S_0 = 4\,\gamma k_b T/k^2$ est la valeur à fréquence nulle de S(f). Grâce à cette lorentzienne il est possible de déduire deux paramètres : la fréquence de coupure qui nous permet d'obtenir la raideur du piège et la valeur du plateau P^V (comme on le voit sur l'exemple sur la **Figure 1-16**) qui nous permet de trouver la sensibilité, noté β, par la relation [22] :

$$\boldsymbol{P^V = \beta^2 \frac{K_b T}{3\pi^3 \eta d}} \tag{1.9}$$

D'où,

$$\boldsymbol{\beta = \sqrt{\frac{3\pi^3 \eta d P^V}{K_b T}}} \tag{1.10}$$

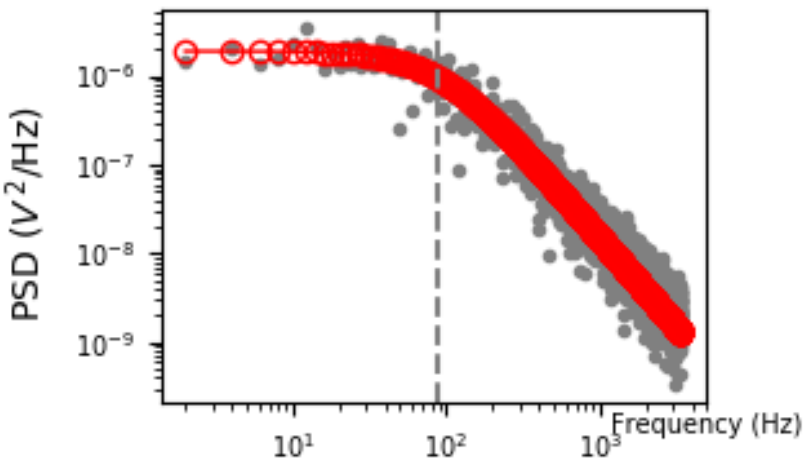


Figure 1-16 : *Lorentzienne représentant la densité spectrale de puissance d'une bille piégée. La ligne en pointillé marque la fréquence de coupure et on peut aussi voir le plateau qui se forme vers les basses fréquences.*

- **L'indentation**

La sensibilité peut aussi être déterminée par une méthode expérimentale. L'expérience consiste à réaliser une courbe d'approche-retrait sur une surface dure (comme du verre) et d'enregistrer le signal reçu par le photodétecteur. La courbe obtenue est exposée sur la **Figure 1-17**, elle présente une partie linéaire après le point de contact entre la bille et la surface. Le coefficient directeur de cette partie nous donne directement la sensibilité β du détecteur en V/m.

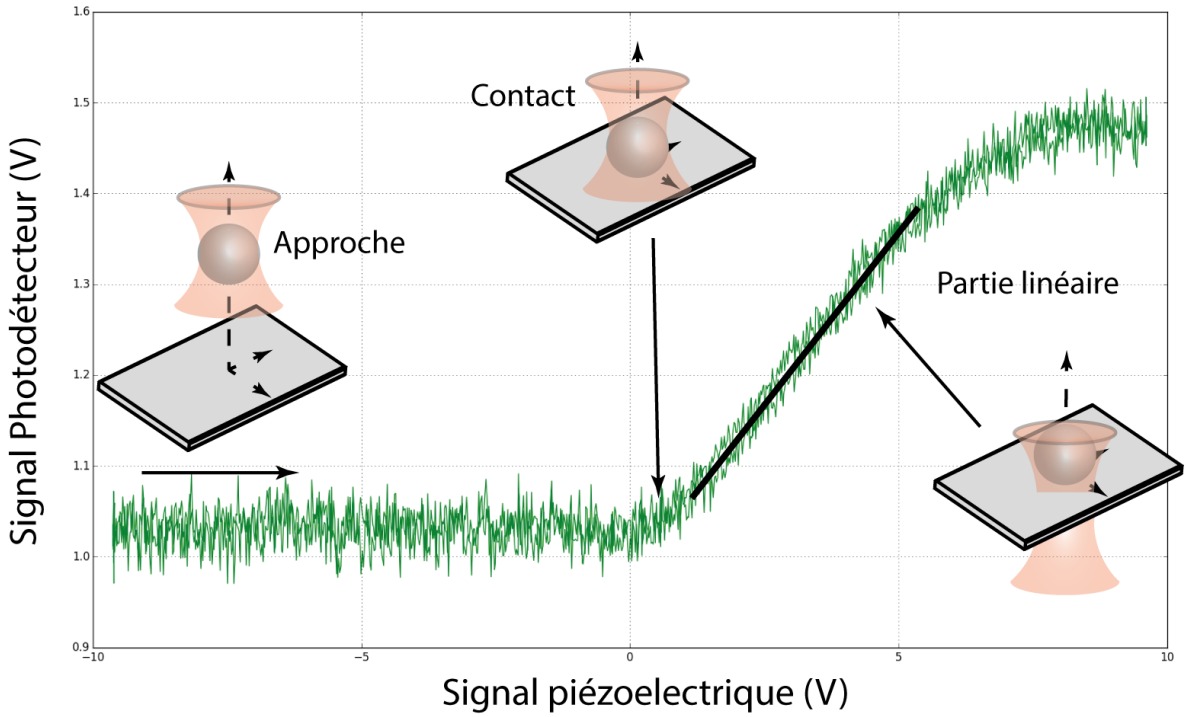


Figure 1-17 : *Courbe d'indentation sur une surface dure, le coefficient directeur de la partie linéaire permet d'avoir directement la sensibilité.*

Cette méthode simple permet d'avoir la sensibilité seulement pour une dimension, en l'occurrence z. Pour avoir la sensibilité dans les deux autres (x et y) il est nécessaire de passer par d'autres expériences.

- **Le calibrage par sinusoïde**

Dans la section précédente, la sensibilité du détecteur et la rigidité du piège sont estimées à l'aide de mesures indépendantes. Ici la méthode permet de calculer les trois grandeurs caractéristiques avec une seule manipulation. Lorsqu'une bille est piégée, on a un contrôle dans les trois dimensions de l'espace par le biais de la plateforme piézoélectrique. Dans l'article de Tolić-Nørrelykke et al. [23], ils montrent qu'en implémentant un mouvement sinusoïdal défini par l'utilisateur et en regardant la réponse du système, il est possible de trouver les trois grandeurs caractéristiques d'un piège optique.

Une bille piégée dans la chambre liquide de l'échantillon qui est placé sur la plateforme piézoélectrique est bougée avec un mouvement sinusoïdal d'amplitude A_s et une fréquence f_s. Le mouvement, x(t), de la plateforme est donné par :

$$\boldsymbol{x(t) = A_s sin(2\pi f_s t)} \tag{1.11}$$

Alors que le piège reste statique. Lorsque ce mouvement est implémenté le spectre de densité de puissance s'écrit :

$$\boldsymbol{S(f) = \frac{D}{\pi^2(f^2 + f_c^2)} + \frac{A_s^2}{2\left(1 + \frac{f_c^2}{f_s^2}\right)}\delta(f - f_s)} \tag{1.12}$$

Ou δ est la fonction pic de Dirac et D le coefficient de diffusion donné par la relation de diffusion :

$$\boldsymbol{D = \frac{K_b T}{\gamma}} \tag{1.13}$$

Avec $\gamma = 6\pi\eta R$ le coefficient de drag de la sphère.

La densité spectrale est tracée sur la **Figure 1-18**, on retrouve la lorentzienne caractéristique du mouvement brownien de la bille dans le piège et on observe un pic à la fréquence de modulation.

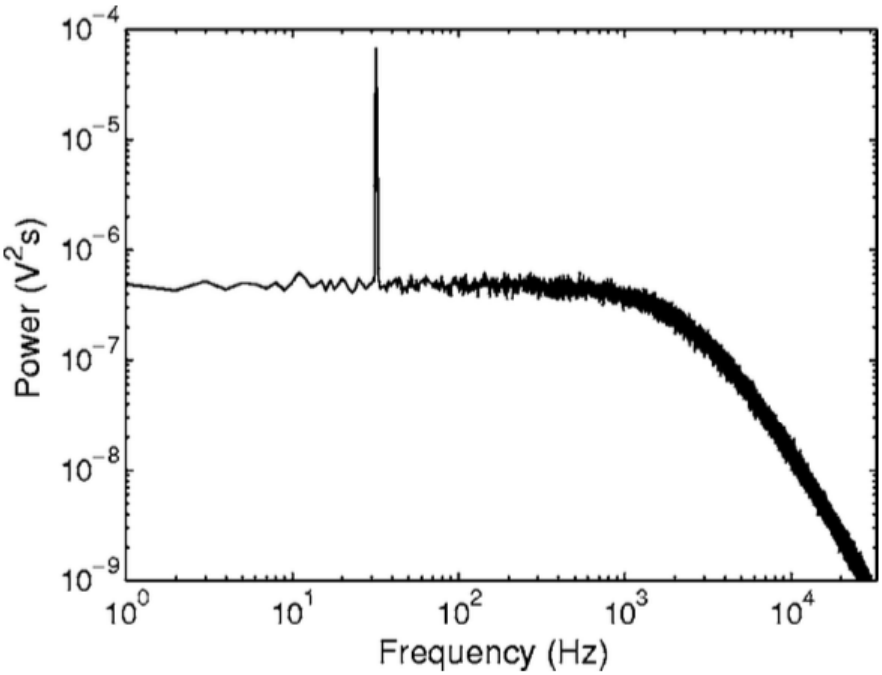


Figure 1-18 : *Densité spectrale de puissance pour une bille piégée avec un mouvement sinusoïdal de la plateforme piézoélectrique. Les données sont récupérées de l'article de Tolić-Nørrelykke [23].*

Cette méthode permet de retrouver les grandeurs caractéristiques du piège en mesurant la puissance du pic de la fréquence de modulation et la fréquence de coupure et le plateau. On a donc la sensibilité qui s'écrit :

$$\boldsymbol{\beta} = \sqrt{\frac{\boldsymbol{W_{exp}}}{\boldsymbol{W_{th}}}} \tag{1.14}$$

Où W_{exp} est la puissance mesurée du pic et W_{th} est la valeur théorique exprimée comme :

$$\boldsymbol{W_{th}} = \frac{\boldsymbol{A_s^2}}{\boldsymbol{2\left(1+\frac{f_c^2}{f_s^2}\right)}} \tag{1.15}$$

Une fois la sensibilité déterminée, on peut trouver la raideur expérimentale du piège par la relation :

$$\boldsymbol{k_{exp} = 2\pi f_c \frac{k_b T \beta^2}{D^{volt}}} \tag{1.16}$$

Ou D^{volt} est le coefficient de diffusion mesuré en volt. En se servant de l'équation de la diffusion donnée plus haut, on trouve pour le coefficient de drag :

$$\boldsymbol{\gamma_{exp} = \frac{K_b T \beta^2}{D^{volt}}} \tag{1.17}$$

Avec ces calibrations les caractéristiques du piège sont bien déterminées. Elles sont réalisées sur une bille piégée mais dans certains cas elles ne peuvent pas s'appliquer. Pour des cylindres, la caractéristique la plus dure à trouver est le coefficient de drag. De par la géométrie de la particule cette grandeur est différente selon l'axe étudié.

- **Le calibrage du décalage temporel**

Lorsqu'on veut faire des expériences avec les pinces optiques il faut s'assurer que les données enregistrées sont cohérentes au niveau temporel. En effet, il est possible d'observer un décalage (drift) des signaux dans le temps : l'intensité reçue par les détecteurs change alors que le piège reste statique. Il faut donc déterminer le temps adéquat pour les expériences afin que les données ne soient pas faussées par ce drift. La méthode dite de la variance d'Allan permet d'estimer ce décalage dans le temps [24].

L'idée est d'analyser une longue séquence de données, en faisant la moyenne sur des intervalles de temps d'une longueur donnée τ. Ensuite, faire la somme quadratique des moyennes des intervalles tout en remettant à l'échelle par un facteur 2(n-1), où n est le nombre d'intervalles considérés.

$$\boldsymbol{\sigma^2(\tau) = \frac{1}{2(N-1)} \sum_{i=1}^{N-1} (y_{i+1} - y_i)^2} \tag{1.18}$$

En utilisant cette méthode, il est possible d'avoir une mesure quantitative de la variation de la valeur moyenne à un instant τ. Pour des courtes périodes la valeur de la variance d'Allan est dominée par le bruit du détecteur. La meilleure stabilité est donnée pour un temps τ pour lequel la variance d'Allan est minimisée.

L'ensemble de ces calibrations permet la détermination des grandeurs caractéristiques d'un piège optique (k, β et γ). Cependant il n'existe aucune méthode de calibration capable de déterminer ces

trois paramètres pour chaque dimension (x, y et z) en une seule expérience, c'est la combinaison de plusieurs expériences qui permet de remonter à tous les paramètres.

1.6. Conclusion

Pour sa découverte des pinces optiques Arthur Ashkin s'est vu récompensé par le prix Nobel de physique en 2018. Nous avons vu que la lumière peut être utilisée pour déplacer des micro-objets. C'est le transfert de quantité de mouvement des photons à la particule et la force de gradient qui permette leur manipulation. La première démonstration de la lévitation optique en 1986 a beaucoup évolué depuis. Ces outils de manipulation optique capables de piéger des molécules ou des particules uniques ont ouvert la voie à de nombreuses applications variées comme l'étude de brin d'ADN [9], [17], ou encore la détermination de la force développée par les moteur moléculaires [18]. En passant par des applications plus originales avec l'avènement des pinces optiques multiples [20].

C'est dans ce contexte que mes recherches débutent, le dispositif des pinces optiques à ma disposition présenté plus haut nous permet de manipuler des particules de l'ordre de 500 nm de diamètre. Mon sujet de recherche se base sur la manipulation de particules dédiées pour la mise au point d'un AFM sans cantilever. Dans un premier temps je me concentrerai sur la fabrication de ces particules puis sur leur utilisation avec les pinces optiques.

[1] E.-L. Florin, A. Pralle, J. K. Heinrich Hörber, et E. H. K. Stelzer, « Photonic Force Microscope Based on Optical Tweezers and Two-Photon Excitation for Biological Applications », *Journal of Structural Biology*, vol. 119, n° 2, p. 202-211, juill. 1997, doi: 10.1006/jsbi.1997.3880.

[2] A. Rohrbach, C. Tischer, D. Neumayer, E.-L. Florin, et E. H. K. Stelzer, « Trapping and tracking a local probe with a photonic force microscope », *Review of Scientific Instruments*, vol. 75, n° 6, p. 2197-2210, juin 2004, doi: 10.1063/1.1753097.

[3] L. Friedrich et A. Rohrbach, « Surface imaging beyond the diffraction limit with optically trapped spheres », *Nature Nanotechnology*, vol. 10, n° 12, p. 1064-1069, déc. 2015, doi: 10.1038/nnano.2015.202.

[4] A. Ashkin, « Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure », *Physical Review Letters*, vol. 24, n° 4, p. 156-159, janv. 1970, doi: 10.1103/PhysRevLett.24.156.

[5] A. Ashkin, « Trapping of Atoms by Resonance Radiation Pressure », *Physical Review Letters*, vol. 40, nº 12, p. 729-732, mars 1978, doi: 10.1103/PhysRevLett.40.729.
[6] A. Ashkin et J. M. Dziedzic, « Observation of Radiation-Pressure Trapping of Particles by Alternating Light Beams », *Physical Review Letters*, vol. 54, nº 12, p. 1245-1248, mars 1985, doi: 10.1103/PhysRevLett.54.1245.
[7] A. Ashkin et J. M. Dziedzic, « Optical Levitation by Radiation Pressure », *Applied Physics Letters*, vol. 19, nº 8, p. 283-285, oct. 1971, doi: 10.1063/1.1653919.
[8] J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, et S. Chu, « Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles », p. 3.
[9] K. C. Neuman et S. M. Block, « Optical trapping », *Review of Scientific Instruments*, vol. 75, nº 9, p. 2787-2809, sept. 2004, doi: 10.1063/1.1785844.
[10] A. Rohrbach et E. H. K. Stelzer, « Optical trapping of dielectric particles in arbitrary fields », *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 18, nº 4, p. 839, avr. 2001, doi: 10.1364/JOSAA.18.000839.
[11] A. Ashkin, « Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime », *Biophysical Journal*, vol. 61, nº 2, p. 569-582, févr. 1992, doi: 10.1016/S0006-3495(92)81860-X.
[12] J. E. Molloy et M. J. Padgett, « Lights, action: Optical tweezers », *Contemporary Physics*, vol. 43, nº 4, p. 241-258, juill. 2002, doi: 10.1080/00107510110116051.
[13] J. A. Lock et G. Gouesbet, « Generalized Lorenz–Mie theory and applications », *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, vol. 110, nº 11, p. 800-807, juill. 2009, doi: 10.1016/j.jqsrt.2008.11.013.
[14] Y. Cao, A. B. Stilgoe, L. Chen, T. A. Nieminen, et H. Rubinsztein-Dunlop, « Equilibrium orientations and positions of non-spherical particles in optical traps », *Optics Express*, vol. 20, nº 12, p. 12987, juin 2012, doi: 10.1364/OE.20.012987.
[15] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, et T. Yamane, « Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams », *Nature*, vol. 330, nº 24, p. 769-771, 1987, doi: 10.1038/330769a0.
[16] A. Ashkin, K. Schiitzet, J. M. Dziedzic, U. Euteneuert, et M. Schliwat, « Force generation of organelle transport measured in vivo », vol. 348, p. 3, 1990.
[17] E. A. Abbondanzieri, W. J. Greenleaf, J. W. Shaevitz, R. Landick, et S. M. Block, « Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase », *Nature*, vol. 438, nº 7067, p. 460-465, nov. 2005, doi: 10.1038/nature04268.
[18] K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp, et S. M. Block, « Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry », *Nature*, vol. 365, nº 6448, p. 721-727, oct. 1993, doi: 10.1038/365721a0.
[19] J. T. Finer, R. M. Simmons, et J. A. Spudich, « Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps », *Nature*, vol. 368, nº 6467, p. 113-119, mars 1994, doi: 10.1038/368113a0.
[20] E. R. Dufresne et D. G. Grier, « Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics », *Review of Scientific Instruments*, vol. 69, nº 5, p. 1974-1977, mai 1998, doi: 10.1063/1.1148883.
[21] K. Svoboda, « Biological Applications of Optical Forces », p. 39.
[22] M. W. Allersma, F. Gittes, M. J. deCastro, R. J. Stewart, et C. F. Schmidt, « Two-Dimensional Tracking of ncd Motility by Back Focal Plane Interferometry », *Biophysical Journal*, vol. 74, nº 2, p. 1074-1085, févr. 1998, doi: 10.1016/S0006-3495(98)74031-7.
[23] S. F. Tolić-Nørrelykke, E. Schäffer, J. Howard, F. S. Pavone, F. Jülicher, et H. Flyvbjerg, « Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane », *Review of Scientific Instruments*, vol. 77, nº 10, p. 103101, oct. 2006, doi: 10.1063/1.2356852.
[24] D. W. Stockwell, « Bias Stability Measurement: Allan Variance », p. 5.

2. Les pinces optiques rotatives

2.1. Description et principe physique

- **Contexte**

Les pinces optiques classiques permettent de piéger une particule dans un faisceau laser focalisé et de mesurer ses mouvements dans les trois dimensions par rapport au centre du piège. Par contre la particule, quand elle est sphérique, est libre dans ses mouvements de rotation. L'idée des pinces optiques rotatives est donc de pouvoir contrôler la rotation de la particule, en l'occurrence une particule cylindrique, sur un axe. La technique développée ici permet d'appliquer à une particule un couple de rotation mais également de le mesurer. Cette capacité à pouvoir entraîner la particule en rotation est due à une caractéristique du matériau utilisé pour la fabrication des particules : La biréfringence.

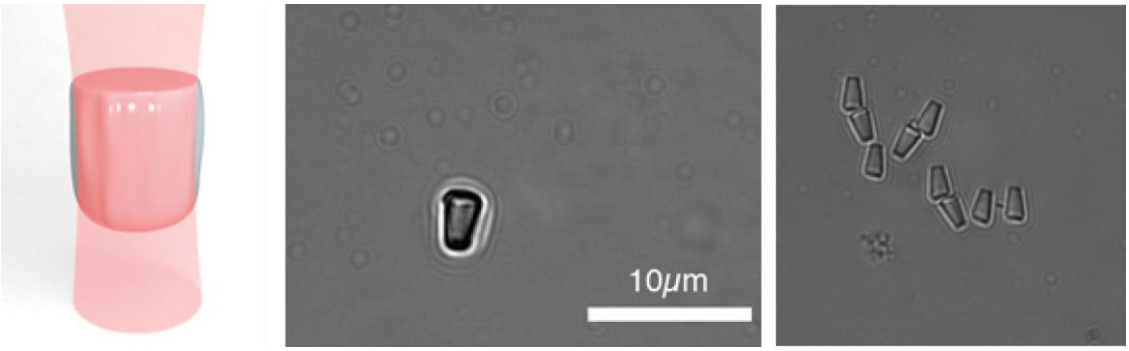


Figure 2-1 : *Schéma d'un cylindre piégé dans le faisceau laser et photos optiques des cylindres en solution.*

L'application initialement visée, grâce au contrôle de la rotation, était l'étude des moteurs de flagelles des bactéries. Leurs moteurs protéiniques font partie des moteurs les plus puissant [1]. Utilisant l'énergie de la force motrice ionique, ce moteur fait tourner activement un long filament hélicoïdal qui propulse la bactérie permettant la chimiotaxie (déplacement). Bien que les flagelles ont fait l'objet d'études approfondies pendant plusieurs décennies, il manque une compréhension complète du cycle mécano-chimique de ce moteur réversible de 50 nm (capable d'atteindre le régime KHz) : le mécanisme fondamental de génération du couple de rotation reste insaisissable et les détails du comportement dynamique rapide du moteur restent inexplorés.

Le but de l'expérience schématisée sur la **Figure 2-2** est de se servir d'un cylindre piégé et attaché à un flagelle de bactérie pour l'étudier. Grâce au contrôle de la rotation et des déplacements du cylindre il est possible d'étirer et de mesurer le couple induit par le moteur de flagelle sur le cylindre piégé. Cependant, réussir à attacher un cylindre sur un flagelle est très difficile et les quelques résultats obtenus ne sont pas ceux espérés. De plus, une autre technique, disponible dans notre laboratoire, utilisant des pinces electromagnétiques à la place des pinces optiques a donné plus de résultats avec plus de facilité. Les pinces magnétiques permettent de piéger des particules magnétiques de petites tailles (environ 100 nm) non pas avec la lumière d'un laser mais avec un champ magnétique.

Néanmoins, le développement d'un procédé de fabrication collective de cylindres biréfringents a été fait et quelques expériences de rotation de cylindres avec les pinces optiques ont été faites. La fabrication des cylindres fait partie de mes travaux de thèse et a constitué le point de départ de toutes mes recherches sur le PhFM. C'est pourquoi dans ce chapitre j'expliquerai comment sont fabriqués les cylindres et nous verrons comment ils sont utilisés dans les expériences de rotations.

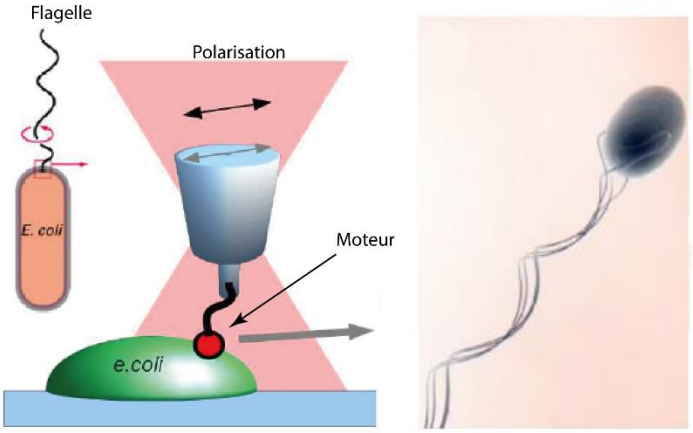


Figure 2-2 *: Schéma du principe de mesure du couple d'un moteur de flagelle à l'aide d'un cylindre tournant dans un dispositif de pinces optiques et photo d'une bactérie avec ses flagelles.*

- **Principe de fonctionnement**

La biréfringence caractérise la propriété physique d'un matériau dans lequel la lumière se propage de façon anisotrope. L'indice de réfraction du milieu dit biréfringent n'est pas constant, on distingue deux types de milieu : les milieux uniaxes et les milieux biaxes. Dans le premier cas le milieu possède deux indices de réfraction principaux, un indice dit « ordinaire » et un autre dit « extraordinaire ». La biréfringence d'un tel matériau est donnée par la différence de ces deux indices. Beaucoup de cristaux naturels possèdent cette propriété tels que le quartz, la calcite, le saphir, le TiO2 en phase rutile… Dans le cas d'un milieu biaxe on a trois indices de réfractions principaux.

Pour ce type de matériaux la susceptibilité électrique, comme l'indice optique, n'est pas isotrope. La polarisation **P** générée sur une particule diélectrique par un champ électrique externe **E** s'écrit :

$$\vec{P} = \chi\vec{E} \tag{2.1}$$

Avec χ la susceptibilité électrique du matériau. Pour une particule biréfringente la susceptibilité devient une grandeur vectorielle, la polarisation s'écrit alors :

$$\vec{P} = \chi_x E_x \vec{e}_x + \chi_y E_y \vec{e}_y + \chi_z E_z \vec{e}_z \tag{2.2}$$

Avec, x, y et z les vecteurs unitaires selon les axes principaux du cristal et χx, χy, χz les susceptibilités correspondantes. Pour un milieu biréfringent uniaxe deux des susceptibilités sont égales et sont notées χo pour l'axe ordinaire et la troisième est différente et est notée χe pour l'axe extraordinaire. Dans un matériau tel que le quartz l'axe extraordinaire est plus facilement polarisable que l'axe ordinaire. Par conséquent la polarisation induite par un champ externe tendra vers l'axe extraordinaire (Voir ***Figure 2-3***). En d'autres termes, il y a une alignement de la polarisation du laser et d'un des axes optiques de la particule de quartz [2]. Le non alignement du champ électrique et de la polarisation va engendrer un couple, noté τ. Une polarisation rectiligne de la lumière exercera un couple sur la particule qui tendra à aligner l'axe extraordinaire du quartz avec le champ électrique. Une rotation de la polarisation engendrera donc la rotation de la particule [3]. Le couple de rotation **τ** transféré à la particule piégée s'exprime comme suit :

$$\tau = \tau_0 sin(2x) \tag{2.3}$$

Avec τ_0 le couple maximum (fonction de l'intensité du laser, de la géométrie de la particule et de sa biréfringence) et x l'angle entre la polarisation du laser et l'axe extraordinaire du cylindre.

D'autres types de pinces optiques capables d'exercer un couple de rotation sur la particule piégée existent et les méthodes pour arriver à la rotation sont différentes. Par exemple, en utilisant des microparticules absorbantes avec un laser polarisé il est possible d'appliquer un couple de rotation à

la particule grâce à la lumière du laser [4]. Il est aussi possible de tirer parti de la géométrie de la particule pour appliquer le couple de rotation [5]. Cependant, ces solutions sont problématiques pour l'étude de molécules uniques (comme les flagelles de bactéries) car elles utilisent soit des particules absorbantes qui diminuent la stabilité de la molécule dans le piège, soit des particules asymétriques qui compliquent l'analyse des signaux mesurés.

La rotation de la microparticule offre de nouvelles possibilités notamment dans la mesure de moment angulaire et sur l'étude de moteurs biologiques.

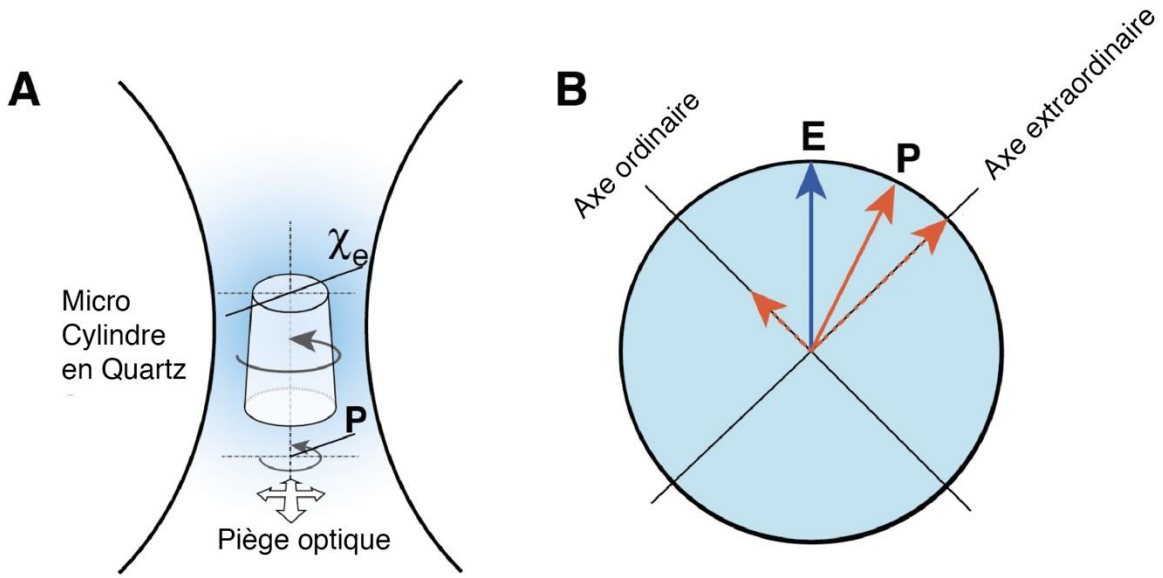


Figure 2-3 : *(A) Schéma du cylindre dans le piège optique orienté selon la polarisation du laser. (B) Illustration de la polarisation résultante (qui se décompose sur les deux axes) sur la particule par l'action du champ électrique* ***E****. Lorsqu'elle n'est pas alignée avec le champ un couple est induit à la particule.*

Grâce à ce nouvel aspect des pinces optiques : la rotation de la microparticule piégée, des phénomènes jusque-là simulés par informatique peuvent être étudiés directement. Par exemple, l'ADN, souvent étudié à l'aide de pinces optiques classiques (voir Partie 1), est aussi caractérisé par son enroulement. Un sur-enroulement du brin provoque la formation de plectonèmes (illustré sur la **Figure 2-4**).

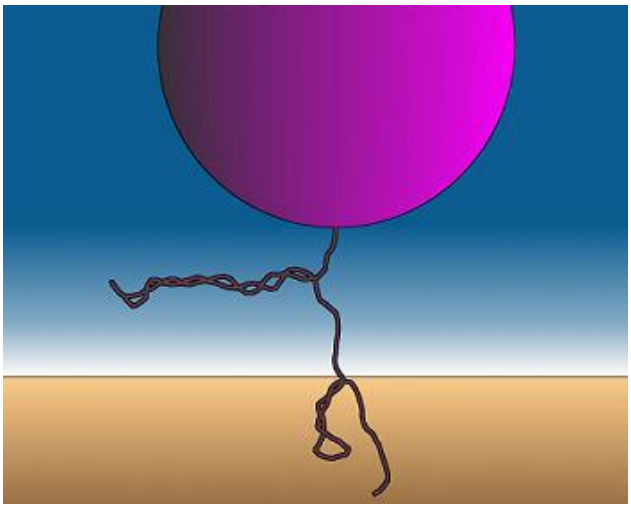


Figure 2-4 : *Schématisation d'un plectonème. Le brin d'ADN est attaché à une microbille d'un côté et sur une plaque de l'autre, on peut voir qu'il est enroulé sur lui-même. [6]*

Avec les pinces optiques rotatives il devient possible d'étudier ce type de conformation car on peut dérouler ces « nœuds » ainsi que mesurer les forces mises en jeu. D'autres applications peuvent être

envisagées mais ne sont pas encore réalisées, comme faire de la nano rhéologie en cylindre tournant pour des mesures de viscosité locale.

On s'intéresse de plus en plus au développement de protocoles simples, rapides et peu coûteux pour produire un grand nombre de cylindres de quartz à l'échelle submicronique, un cristal biréfringent uniaxe, à utiliser pour de telles mesures de couple de rotation. Je vais donc décrire le protocole suivi pour la fabrication de ces cylindres. Se basant sur la lithographie par interférence laser, c'est une méthode reconnue pour sa simplicité. Elle répond à ces exigences et produit des particules cylindriques de quartz que nous utilisons avec succès pour appliquer et mesurer le couple de rotation appliqué par les pinces optiques rotatives.

2.2. Fabrication des cylindres

- **Cahier des charges**

Les particules que nous cherchons à fabriquer doivent avoir une géométrie de type cylindrique ou tronconique. Pour qu'elles soient piégeables, elles doivent être transparentes et leurs dimensions en adéquation avec la taille du piège qui est de l'ordre de 1 µm dans l'axe perpendiculaire du faisceau et de 2 µm dans l'axe parallèle. L'orientation dans le piège est conditionnée par les dimensions de la particule. Pour nos applications, les cylindres doivent se piéger parallèlement à l'axe du faisceau laser (comme illustré sur la ***Figure 2-3*** **(A)**). C'est le rapport diamètre/hauteur qui définit l'orientation dans le piège, pour avoir ce que nous souhaitons la hauteur doit faire environ 3 fois le diamètre de la particule. Typiquement, au vu de la taille du piège, nous visons un diamètre de 500 nm pour une hauteur de 1500 nm. Le but de l'expérience est d'appliquer et mesurer le couple de rotation appliqué par les pinces optiques rotatives. Nous avons vu que la rotation de la particule est possible grâce à la biréfringence de celle-ci. Il est donc nécessaire de partir d'un matériau qui possède cette particularité. Les pinces optiques fonctionnent en phase liquide : le laser traverse une chambre (formée par deux lamelles de verres) composée de liquide et de particule à piéger. Afin d'avoir la possibilité de travailler avec des cylindres, il faut pouvoir les repérer et en avoir suffisamment dans la chambre. Une fabrication collective d'un grand nombre de cylindres avec une faible dispersion de tailles entre eux est donc nécessaire.

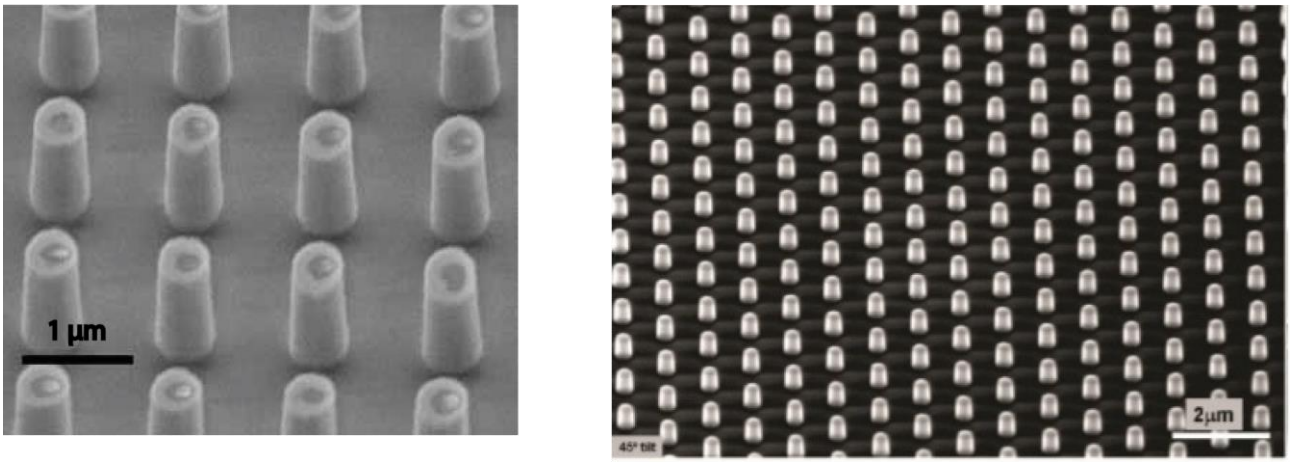
- **État de l'art**

Dans les expériences de piège optique, une des parties importantes est la fabrication de microparticules piégeables. Plusieurs types de particules peuvent être fabriquées, par exemple, des cylindres biréfringents qui permettent, entre autre, d'étudier l'enroulement d'un filament d'ADN unique. Plusieurs possibilités sont envisageables pour fabriquer ces micro-cylindres biréfringents en quartz. Dans la plupart des cas, un recours à la gravure par plasma est nécessaire en raison de son anisotropie. La gravure physique permet de graver de manière directionnelle et donc de former des cylindres si on utilise le bon motif. Pour obtenir des cylindres le motif que l'on doit avoir est de type réseau de disque périodique.

Les différences de fabrication se situent surtout sur la façon d'obtenir le motif « disque ». Obtenir des disques de résine nécessaires à la fabrication des cylindres peut être fait grâce à une photolithographie classique comme dans l'article de C.Deufel et al. [7]. Dans cette publication, les auteurs étudient le sur-enroulement de l'ADN, la surface du wafer de quartz est fonctionnalisée pour pouvoir attacher un brin d'ADN. L'étape suivante consiste à faire un dépôt de résine photosensible puis de l'exposer aux UV avec le motif « disque », c'est une lithographie UVs classique. Finalement les cylindres sont obtenus par gravure physique avec les dimensions suivantes : 1,1 µm en hauteur, 0,53 µm de diamètre et un angle de 87°. (Voir **Figure *2-5* (A)**)

La lithographie optique ne permet pas de réduire la taille des cylindres au-delà de 400 nm. Ce qui pose

un problème lorsqu'on veut réaliser des cylindres avec une forme différente à une extrémité, une pointe nanométrique permettant de lier un brin d'ADN plus facilement. Pour avoir cet aspect la lithographie électronique est une technique plus adéquate que la lithographie optique. C'est ce qui est expliqué dans l'article de Huang et al. [8], dans cette publication c'est la technique utilisée pour appliquer le motif de disque sur la résine. Grâce à la lithographie électronique on est en mesure de faire des cylindres plus petits (200 nm de diamètre) mais on peut également faire des cylindres plus grands. Il est aussi possible de faire des matrices de cylindres comme en lithographie optique. Ici la résine utilisée est sensible à un flux d'électrons, en utilisant un microscope électronique pour « dessiner » le motif voulu sur l'échantillon on peut exposer la résine puis après développement obtenir le motif de disque. Sur la **Figure *2-5* (B)** on peut voir les cylindres fabriqués par le biais de la lithographie électronique. Les principaux défauts de cette technique sont sa difficulté de mise en place (équipement lourd et difficile à régler), le coût et aussi la longueur d'exposition pour faire une matrice de cylindres qui peut prendre beaucoup de temps (une nuit d'exposition).



(A) (B)

Figure 2-5: *(A) Photos MEB des cylindres fabriqués par Deufel et al. [7] par lithographie optique et gravure plasma. (B) Photos des cylindres fabriqués par Huang et al.[8] par lithographie électronique et gravure plasma.*

- **Matériau à notre disposition**

J'ai à ma disposition du quartz X-cut, matériau de formule chimique SiO_2 il présente un arrangement monocristallin et a la propriété d'être biréfringent. Les cylindres que l'on doit fabriquer doivent être manipulables par les pinces optiques et s'orienter correctement, dans l'axe de propagation du faisceau, dans le piège. L'étude de Cao et al. *[9]* se base sur des simulations dynamiques pour observer le comportement des particules dans le piège optique. Ils montrent que selon la tailles des cylindres, leur orientation dans le piège peut changer : la particule peut être orientée verticalement, horizontalement ou dans un état intermédiaire comme on le voit sur ***Figure 2-6***. C'est en se basant sur cette étude que nous avons déterminé les dimensions optimales des cylindres pour notre expérience. (celles-ci sont disponibles sur le schéma de la ***Figure 2-6***)

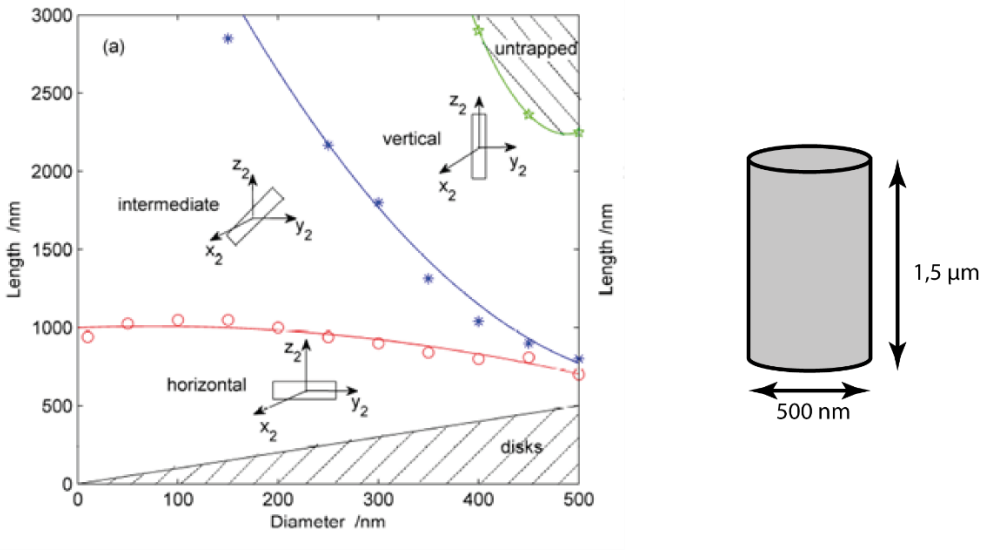


Figure 2-6 : *Orientation du cylindre dans le piège selon ses dimensions, l'étude est menée par Cao et al. [9] (à gauche) et schéma d'un cylindre avec les dimensions visées pour les expériences en pinces optiques rotatives.*

Les échantillons de quartz sont découpés en carrés de 2 cm x 2 cm. Comme notre expérience se passe en milieu liquide il est nécessaire de fabriquer un nombre important de cylindres identiques qui pourront être utilisés dans le piège. Les techniques de lithographie énoncées plus haut ne permettent pas d'atteindre ces objectifs. La meilleure alternative pour faire toute une matrice de disques en moins de temps possible est la lithographie interférentielle.

- **La lithographie interférentielle**

Pour obtenir le motif de disque sur la résine photosensible j'ai opté pour la technique de lithographie interférentielle qui permet d'appliquer un motif périodique sur une large zone en peu de temps. Le procédé ne nécessite pas l'utilisation de masque. Cette lithographie est basée sur l'obtention d'interférence entre deux faisceaux cohérents qui vont servir à « l'impression » du schéma d'interférence sur la résine photosensible préalablement appliquée sur notre substrat. Les motifs ainsi transférés sont périodiques *[10], [11]*.

Le montage optique a été développé par Roland Teissier de l'équipe Nanomir de l'IES pour produire des lignes à un pas précis pour des applications dans les lasers à cascade quantique. Nous avons utilisé ce montage en développant un support spécifique à notre usage pour produire notamment des réseaux réguliers de disques.

Le montage optique est décrit dans la **Figure 2-7 (A)** : un laser de longueur d'onde λ de 405 nm passe à travers un obturateur actionnable par l'utilisateur puis illumine un sténopé de diamètre 10 µm. Le faisceau gaussien devient divergent et est dirigé vers deux miroirs contigus inclinés à 45° par rapport à l'axe optique et eux-mêmes orientés d'un angle θ l'un par rapport à l'autre. Ces deux miroirs créent deux sources virtuelles, créant deux faisceaux cohérents qui interfèrent entre eux dans une zone que l'on nomme le plan d'interférences.

Les interférences (constructives et destructives) produites sont un ensemble de lignes parallèles à la normale de l'axe formé par les deux sources virtuelles. La période spatiale de ces interférences est :

$$\Lambda = \frac{\lambda}{2\sin\frac{\theta}{2}} \qquad (2.4)$$

Le plan d'interférence peut être vu alors comme une succession de lignes claires et sombres. Si l'on place un échantillon recouvert d'une résine photosensible dans ce plan, le schéma d'interférence sera transféré sur l'échantillon. Sur notre dispositif la zone d'illumination prend une surface d'environ 3 cm x 3cm et un irradiance de 0.16 mW/cm² ce qui impose des expositions de l'ordre de quelques minutes pour des résines photosensibles standard (comme l'AZ MIR 701). En jouant sur l'angle entre les deux miroirs on pourra modifier la période des franges d'interférences donnée par l'équation *(2.4)*. Il est possible de générer des motifs avec des pas allant de 400 nm jusqu'à 2400 nm. La durée d'exposition est réglée pour produire la dose optimale pour insoler complètement la résine au niveau du plan d'interférence constructive. En changeant ce temps il est possible de changer le ratio entre la résine exposée et non-exposée pour ajuster la largeur des lignes ou du diamètre des disques tout en gardant le pas constant (voir ***Figure 2-8*** **(A), (B)** et **(C)**). Il est à noter également que les interférences se produisent également dans la normale au plan ce qui implique d'utiliser des résines minces. Également l'utilisation de couches anti reflet, minimisant la différence d'indice permet d'améliorer la technique. Nous n'en avons pas utilisé cependant.

En ajoutant des expositions avec des angles différents il est possible d'obtenir des motifs plus complexes en trois dimensions ou encore des arrangements périodiques de points *[12]*. Ici pour créer un motif de disques périodiques, deux expositions successives inclinées de 90° dans le plan de l'échantillon sont nécessaires. Grâce au seuil d'exposition de la résine, nous pouvons créer un motif de disques comme illustré à la ***Figure 2-8*** **(D)** et **(E)** sur une grande surface avec une bonne reproductibilité. Une image de l'un des échantillons, après l'étape d'exposition et le développement, est présentée à la ***Figure 2-8*** **(D)**.

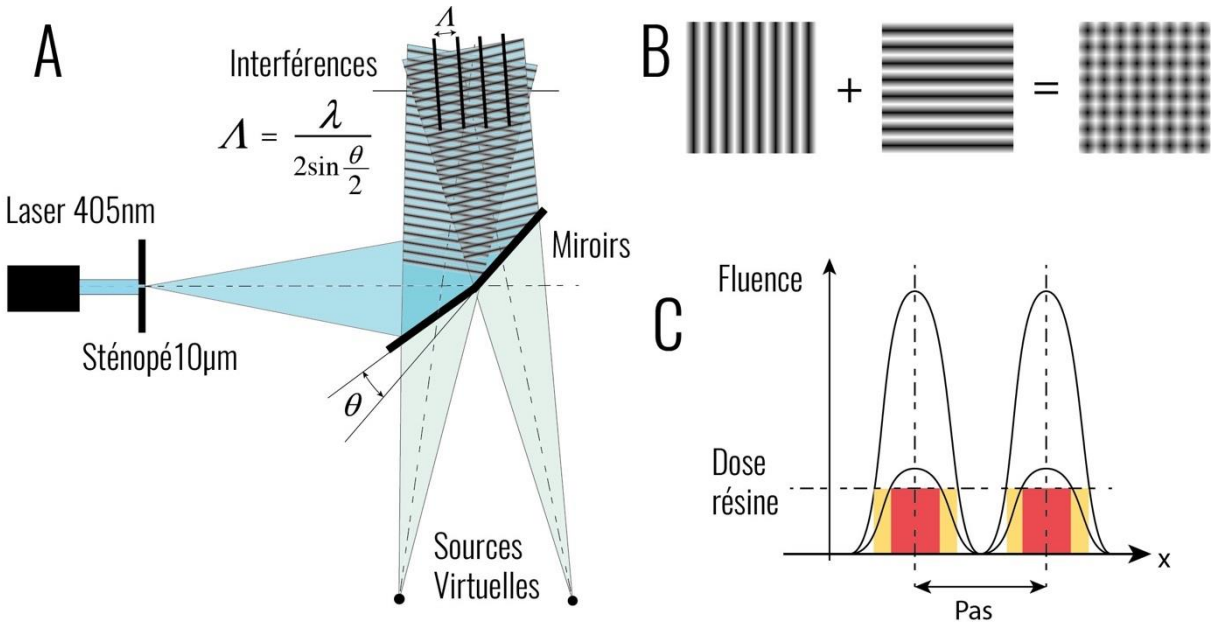


Figure 2-7 : *(A) Schéma du montage optique pour la lithographie interférentielle, le pas du motif final est contrôlé par l'angle entre les deux miroirs. (B) Addition des deux motifs d'interférence nécessaires pour produire une structure de disque sur l'échantillon et (C) effet du temps de la dose reçue (fonction du temps d'insolation) sur le rapport d'aspect des lignes obtenues.*

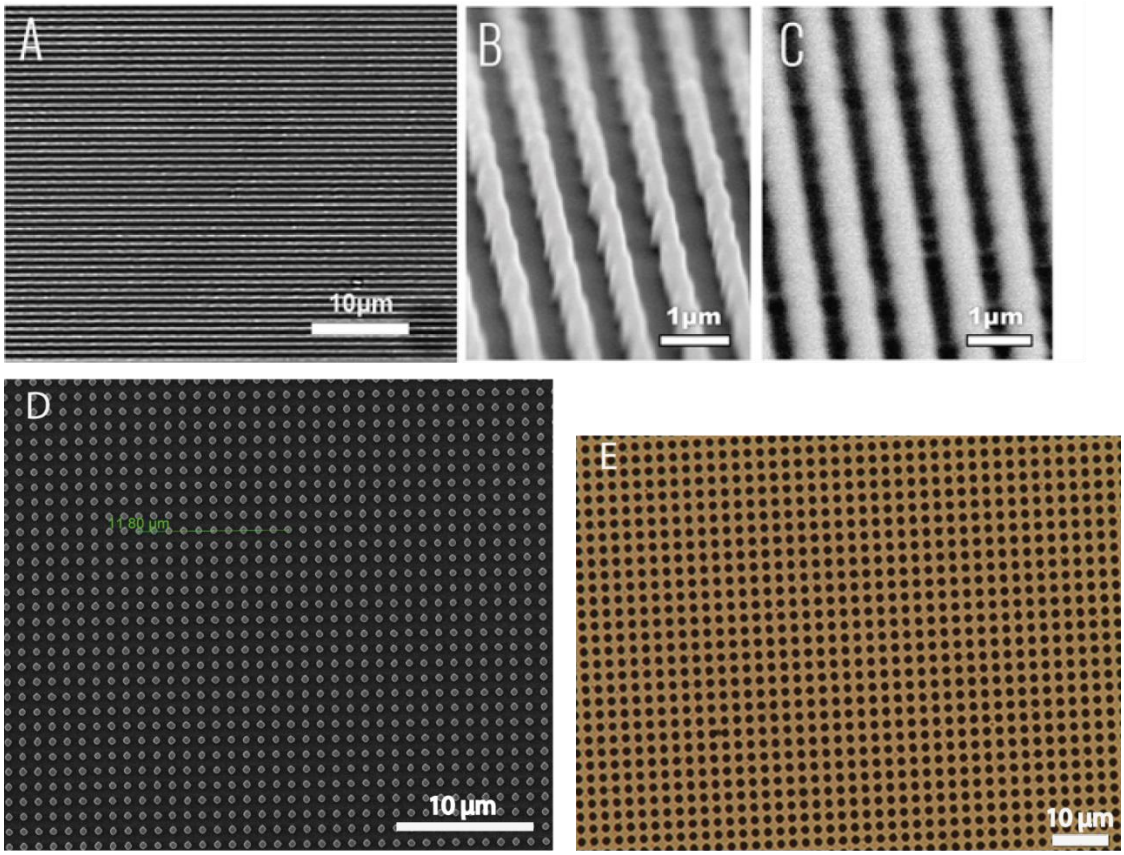


Figure 2-8: *(A) Images MEB de lignes parallèles fabriquées par la technique de lithographie d'interférence laser, les lignes présentées ont un pas de 800nm et plusieurs rapports d'aspect correspondant à différents temps d'exposition (B) et (C). Résine AZ 701 sur verre. (D) et (E) **i**mages MEB et au microscope optique de réseaux de disques en résines fabriqués par la technique de lithographie d'interférence laser, Les pas sont de 1,18 µm (D) et de 2,3µm (E).*

Le développement de la résine se fait avec un procédé standard, avec un développeur au TMAH en prenant soin toutefois de maîtriser le temps de développement surtout lorsque l'accroche entre la résine et le substrat est faible, ce qui est notre cas ici.

Suite à l'étape de lithographie, il faut faire une gravure qui permet d'obtenir des cylindres en conservant la dimension du diamètre du disque de résine. Généralement cette étape de gravure est faite par gravure plasma.

- **La Gravure Ionique Réactive**

La gravure ionique réactive (RIE en anglais pour *Reactive Ion Etching*) fait partie de la famille des gravures physiques aussi appelée sèche. Le principe consiste à bombarder d'ions la surface de l'échantillon à graver, qui sera préalablement passé par l'étape de lithographie (optique, électronique ou interférentielle…). Le bombardement est généralement assuré par un plasma (gaz ionisé). Il existe deux types de gravures aux plasmas :

  - La gravure ionique (IBE)
  - La gravure ionique réactive (RIE)

Dans la salle blanche nous disposons d'un réacteur de gravure ionique réactive par plasma induit par couplage inductif ou ICP-RIE en anglais (Inductively Coupled Plasma Reactive Ion Etching). Le réacteur utilisé pour toutes les gravures plasma est un ICP fluorée Corial 250 IL qui génère des plasmas à base

de gaz rares, d'azote et de gaz fluorés connus pour graver les composés du silicium, une photo annoté est donné sur la ***Figure 2-9*** **(A)**. L'échantillon est placé dans une enceinte dans laquelle on va créer un plasma. L'enceinte est placée sous-vide à l'aide de deux pompes : une pompe turbo-moléculaire elle-même branchée sur une pompe secondaire. Elle est aussi composée d'un système d'introduction des gaz avec contrôle de flux et un dispositif de génération plasma. Ce dispositif qui permet de maintenir le plasma est un réacteur ICP (Inductively Coupled Plasmas) composé d'un générateur LF à 2 MHz qui permet d'induire, par le biais de bobines placées autour du réacteur, un champ dans l'enceinte qui maintient le plasma et permet d'obtenir de fortes densités à basse pression. Un second générateur RF à 13,56 MHz connecté au porte substrat qui permet d'accélérer les ions du plasma vers la surface de l'échantillon.

La principale difficulté dans la génération d'un plasma est de maintenir la stabilité de celui-ci. Un petit changement dans les différents paramètres variables tels que la pression de travail, le flux des gaz réactant, ainsi que les puissances délivrées par les deux générateurs peut entraîner l'extinction du plasma. La puissance absorbée par le gaz nécessaire à son ionisation n'est pas directement celle délivrée par le générateur car on a une composante de puissance réfléchie. Pour obtenir un plasma il faut que cette composante réfléchie soit la plus petite possible (moins de 5% de la puissance délivrée). Cet équilibre est contrôlé par le biais d'un ordinateur qui sert à modifier tous les paramètres cités, les paramètres qui jouent un rôle prépondérant dans l'efficacité du processus d'absorption sont le « RF Tune » et « RF load » (pour la puissance délivrée par le générateur RF en Watt) et aussi le « LF Tune » et « LF Load » (pour la puissance délivrée par le générateur LF en Watt). En jouant sur ces paramètres on peut mettre au point différentes recettes de gravure avec un plasma stable. Deux courbes de puissances réfléchies tracées en temps réel permettent de savoir si on génère un plasma ou non. Si la puissance réfléchie est trop grande, on ne transmet aucune énergie au gaz et celui-ci ne s'ionise pas, on ne génère donc aucun plasma et par conséquent l'échantillon ne sera pas gravé.

Le suivi d'une gravure se fait à l'aide de la sonde Laser. Un Laser d'une longueur d'onde de 660-680 nm pointe sur la surface de l'échantillon à graver (voir ***Figure 2-9*** **(C)**) on obtient un signal de réflexion. Le faisceau est réfléchi une première fois et une autre fois sur l'interface entre deux couches. La somme des faisceaux réfléchis crée une figure d'interférence. Le signal obtenu est donc périodique, de période :

$$\boldsymbol{T} = \frac{\boldsymbol{\lambda}}{\boldsymbol{2n}} \tag{2.5}$$

Avec n l'indice du milieu et λ la longueur d'onde du Laser. Cette période représente la quantité gravée par le plasma. Le nombre de période indiquera donc l'épaisseur gravée.

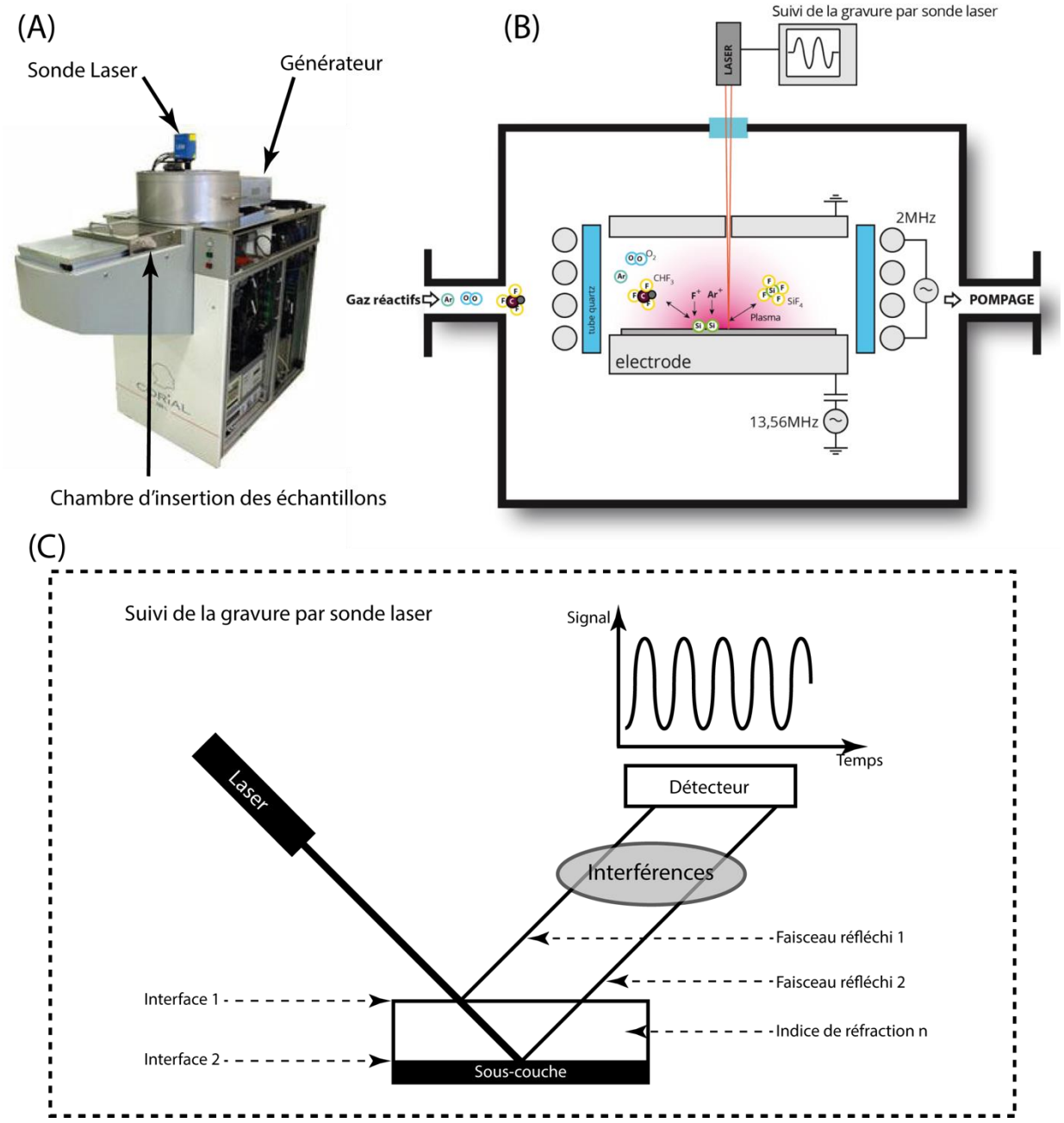


Figure 2-9: *(A) Photo du réacteur ICP-RIE Corial 250 IL utilisé en salle blanche avec un schéma de l'intérieur du réacteur avec les réaction mise en jeu lors de la gravure plasma (B). Et (C) le suivi de la gravure par sonde laser. Les deux images (A) et (B) sont issues de fascicules disponibles sur le site de la Centrale Technologique de Micro et nano fabrication (CTM : http://www.ctm.univ-montp2.fr/).*

La technique de gravure RIE combine à la fois la gravure physique et la gravure chimique. D'une part, on a un aspect physique parce qu'on va créer un plasma pour bombarder la surface de notre échantillon d'ions qui vont graver notre surface. D'autre part, on a un aspect chimique parce qu'on ajoute un gaz réactif au gaz neutre nécessaire à la formation du plasma. Ces gaz réactants ajoutés présentent des radicaux libres (exemple : F, Cl, O) qui vont interagir avec l'espèce chimique de la surface du substrat pour former un composé volatile qui sera expulsé. Par exemple, la gravure du silicium intervient avec la réaction des ions F (Fluor) et Si, la stœchiométrie de la réaction est la suivante *[13]* :

$$Si + 4F \rightarrow SiF_4$$

Le composé formé est volatile et peut être expulsé dans le flux de gaz traversant le réacteur. Les gaz disponibles avec notre réacteur sont : l'oxygène (O_2), le Trifluorométhane (CHF_3) Hexafluorure de soufre (SF_6), le méthane (CH_4), l'hydrogène (H_2) et l'argon (Ar). Chaque gaz peut être utilisé pour graver plusieurs espèces chimiques, la combinaison des gaz est aussi possible pour améliorer la qualité de la gravure (Surface, vitesse…). Par exemple pour la gravure du silicium il est possible d'utiliser une combinaison de CHF_3, O_2, et de SF_6 ou alors séparément. Dans ce cas précis, la combinaison des gaz permet de limiter les phénomènes de re-dépôt : le composé formé après réaction n'est pas évacué et il se dépose sur notre échantillon. Dans certains cas ce phénomène est utilisé pour réaliser des gravures plus profondes (dizaines de µm), c'est le procédé dit « *Bosch* ». Le re-dépôt permet une passivation des parois ce qui les protège de la gravure.

Cette technique de gravure ionique réactive présente donc les avantages de la gravure physique (anisotropie) et les avantages de la gravure chimique (vitesse plus élevée, forme de sélectivité). En ajustant les paramètres de pression, puissance et les types de gaz nous sommes en mesure de produire des cylindres de quartz.

- **Résultats**

Le procédé de fabrication complet est décrit dans la ***Figure 2-10***. Tout d'abord, Les échantillons sont nettoyés avec une solution de Piranha (mélange d'acide sulfurique avec de l'eau oxygénée). Puis on dépose une couche de Chrome de 40 nm par évaporation par canon à électron (UNIVEX 350), le métal est chauffé au-dessus de sa température de fusion et est vaporisé vers le substrat qui lui fait face, les dépôts de couches minces sont réalisés par Mr. Fréderic Pichot. Cette couche métallique, que l'on nomme masque dur, est nécessaire car la gravure plasma, avec le mélange de gaz que nous utilisons, n'a pas une sélectivité suffisante pour utiliser la résine seule comme masque de gravure. En effet, le procédé de photolithographie que nous utilisons et la taille des disques de résine nous contraint à utiliser des fines couches de résine (0,6µm) qui ne résistent pas à toute l'étape de gravure ICP Fluorée. En effet, la présence d'oxygène dans le plasma fait disparaître la résine photosensible rapidement. Le Cr est donc utilisé comme masque dur lors de la gravure du quartz ce qui permet d'améliorer la sélectivité. Les masques durs sont souvent utilisés dans la gravure au plasma *[14], [15]*, en particulier pour empêcher le rétrécissement de la résine. Il est aussi possible d'utiliser une couche épaisse de résine SU8 pour faire office de masque dur *[16]*. Ici nous faisons le choix de prendre la couche de chrome comme masque dur. Quelques tests préalables de dépôts ont été effectués avec plusieurs épaisseurs différentes puis gravés au plasma pour contrôler leur efficacité. L'épaisseur idéale pour ce type de gravure est de 40 nm, la couche n'est pas trop épaisse ce qui permet une gravure plus facile au plasma Ar mais elle est assez haute pour protéger la résine sous-jacente lors des étapes de gravure au plasma CHF_3/O_2.

Dans un deuxième temps, nous déposons une fine couche de résine AZ 701 MIR (Merck Performance Materials GmbH) à 4000 tr/min pendant 30 s, suivi d'un chauffage à 95°C pendant 1 min. La résine est diluée (2:1) pour obtenir une épaisseur finale de 600 nm. L'échantillon de quartz est alors exposé sur le banc de lithographie par interférence, réglé avec des paramètres qui permettent de former des franges d'interférence avec un pas de 1 µm. L'exposition se fait en deux étapes de 140 s chacune en tournant l'échantillon de 90° dans le plan de l'échantillon entre les deux expositions. Après l'exposition, l'échantillon est soumis à un recuit de 110°C pendant 1 min et développé avec le développeur AZ 726 pendant 20 s sous agitation douce. Ce temps de développement est un des paramètres critique du procédé.

La ***Figure 2-11*** **(A)** montre une image MEB de disques de résine obtenus après développement. On remarque que l'on obtient effectivement un réseau régulier de disques en résine avec un pas précis très proche d'un micron, mais que les disques ne sont pas parfaitement circulaires. Cela n'a toutefois pas été un gros problème dans la suite des expériences

L'étape suivante consiste à transférer le motif de disque en résine sur le substrat en quartz. Pour cela, nous avons eu recours à la gravure ionique réactive pour graver la couche de chrome et transférer le motif sur cette couche. Ensuite, on aura une deuxième gravure plasma pour creuser le quartz. La première gravure est une gravure avec un plasma d'argon (Voir recette en annexe ***Tableau 6-1***) pour pulvériser le chrome sur les parties non résinées. Cette gravure est non-réactive car aucun gaz réactant n'est injecté dans l'enceinte (sauf l'Ar). Le contrôle de la gravure s'effectue à l'aide d'une sonde LASER placée au-dessus du réacteur ICP-RIE. Le Laser est pointé sur la surface de notre échantillon sur une zone où il n'y a pas de résine. On reçoit un signal de réflexion (réflexion du Laser sur le chrome), qu'on essaye de maximiser en réglant la focalisation du Laser (position et focus). Lorsqu'on grave ce signal augmente un petit peu, cette augmentation est due à la gravure de la surface qui devient plus plane et sans aspérité. Une fois la couche de chrome gravée, le signal sera égal au signal de réflexion sur le quartz qui est beaucoup moins élevé car une partie importante du signal est transmise dans le matériau qui est transparent à cette longueur d'onde (660nm). La chute brusque du signal de réflexion nous donne une indication sur l'état de la gravure. Le plasma est éteint lorsque le signal optique n'évolue plus (environ 15 min pour pulvériser 30 nm de Cr) et qu'une courte étape de sur gravure (environ 1 min) est réalisée pour pallier au manque d'homogénéité de la gravure plasma dans le plan.

Une fois la couche de masque dur gravée, nous procédons dans le même bâtie à l'étape de gravure du quartz. Celle-ci est réalisée par une seconde recette ICP-RIE, en utilisant un mélange de Ar (10 sccm), CHF_3 (60 sccm) et O_2 (10 sccm), pour une pression interne de 10 mTorr (recette en annexe ***Tableau 6-2***). Lors de cette étape on utilise l'avantage de la gravure chimique de la RIE. La gravure du quartz, de formule chimique SiO2, tire parti des réactions Silicium-Fluor pour ajouter une composante de réaction chimique dans le processus de gravure au plasma.

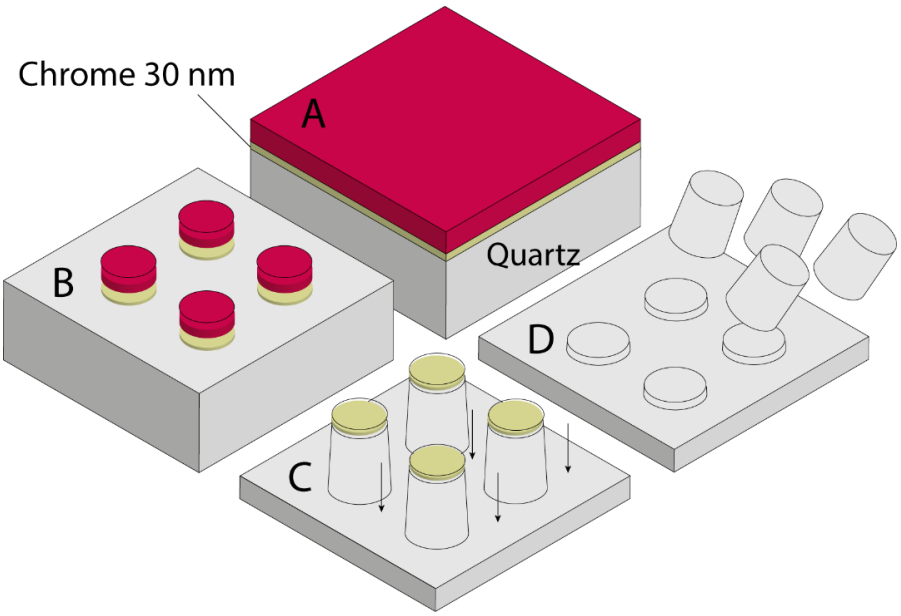


Figure 2-10 : *Schéma du procédé de fabrication des cylindres en quartz. A. Déposition de la couche de chrome et dépôt de la résine positive. B. Lithographie interférentielle et gravure du chrome par plasma Ar. C. Gravure du quartz par plasma $CHF_3/O_2/Ar$. D. Clivage des cylindres pour les mettre en solution.*

Grâce à ce procédé de fabrication plusieurs types de cylindres sont fabriqués comme nous pouvons le voir sur les photos **(B)**, **(C)** et **(D)** de la ***Figure 2-11***. Les particules utilisées pour les expériences sur les moteurs flagellaires (photo **(B)** de la ***Figure 2-11***) sont de types cylindriques d'une longueur de 1400 nm avec une base de 490 nm de diamètre. Nous pouvons remarquer qu'un angle d'environ 80° s'est formé lors de l'étape de gravure plasma. Le diamètre n'est donc plus constant sur toute la longueur, la base haute, elle, mesure 330 nm. Sur des particules de cette hauteur cet angle n'a aucune influence dans l'orientation du cylindre dans le piège et les expériences sont réalisables. L'étape de gravure au

plasma CHF_3/O_2 (photos **(B)** et **(C)** de la ***Figure 2-11***) est douce et permet d'obtenir une surface lisse sans aspérité, idéale pour l'étape de clivage.

Une fois les cylindres obtenus, il ne reste plus qu'à enlever la couche de chrome résiduelle à l'aide d'une solution de gravure chimique qui est composée d'acide perchlorique ($HClO_4$), et de Nitrate de cérium et d'ammonium $(NH_4)2[Ce(NO_3)6]$ pendant quelques minutes, jusqu'à disparition des résidus de chrome dont le contrôle se fait à l'œil. Enfin les échantillons sont nettoyés à la solution piranha.

- **Clivage**

Toutes les particules sont produites à partir d'échantillons de quartz et sont gravés directement dessus. Les expériences de piégeage optique n'utilisent qu'une seule particule, il est donc nécessaire d'en récolter quelques-unes sur l'échantillon. Pour cela nous avons recours au « rasage » des cylindres afin de les cliver à leur base pour les mettre en solution et les utiliser par la suite. Ce clivage est fait manuellement à l'aide d'une lame de scalpel ou microtome, lors du passage de la lame une poudre visible à l'œil se dépose sur le bord du scalpel, cette poudre, constituée de nos particules, est ensuite diluée dans un mélange d'eau milliQ et BSA (10 mg/ml). Cette méthode est assez étonnante à la vue des dimensions des particules que nous cherchons à récolter mais elle fonctionne. L'action mécanique permet de cliver les cylindres à leur base, on peut voir les plans de clivage sur la photo MEB **(B)** de la ***Figure 2-11***. Il est important de noter que les particules ne se détériorent pas lors de cette étape et que c'est grâce à cette résistance que nous pouvons les récupérer de cette façon.

Une alternative est envisagée afin de récupérer les particules fabriquées sans avoir recours au clivage mécanique qui peut parfois être critique s'il est mal réalisé (dérapage de la lame, perte de particules…). L'idée serait d'utiliser une couche sacrificielle sur laquelle un dépôt d'oxyde est réalisé. Cette couche d'oxyde serait alors utilisée pour la fabrication des cylindres. Cependant, ici l'application visée est la rotation de la particule dans le piège et pour avoir cette rotation il faut que le matériau utilisé soit biréfringent. Il nous est impossible de faire un dépôt d'une couche d'un matériau biréfringent sur une couche sacrificielle. Nous avons donc abandonné l'idée de faire une couche sacrificielle et nous avons gardé le protocole initial.

Les cylindres sont ensuite mis en solution, classifiés par dimension et aliquotés pour être utilisés dans des expériences de pinces optiques rotatives. Un échantillon de 2x2 cm contient environ 300 millions de particules et permet de faire une centaine d'expériences.

Le procédé de fabrication présente l'avantage d'être simple et assez flexible. Il est possible de fixer facilement le diamètre des cylindres grâce à la lithographie interférentielle et la gravure permet de faire des cylindres de plusieurs hauteurs en utilisant un masque dur en chrome adéquat (de la bonne épaisseur). La géométrie du cylindre peut être modifiée selon les gaz utilisés dans la recette de gravure.

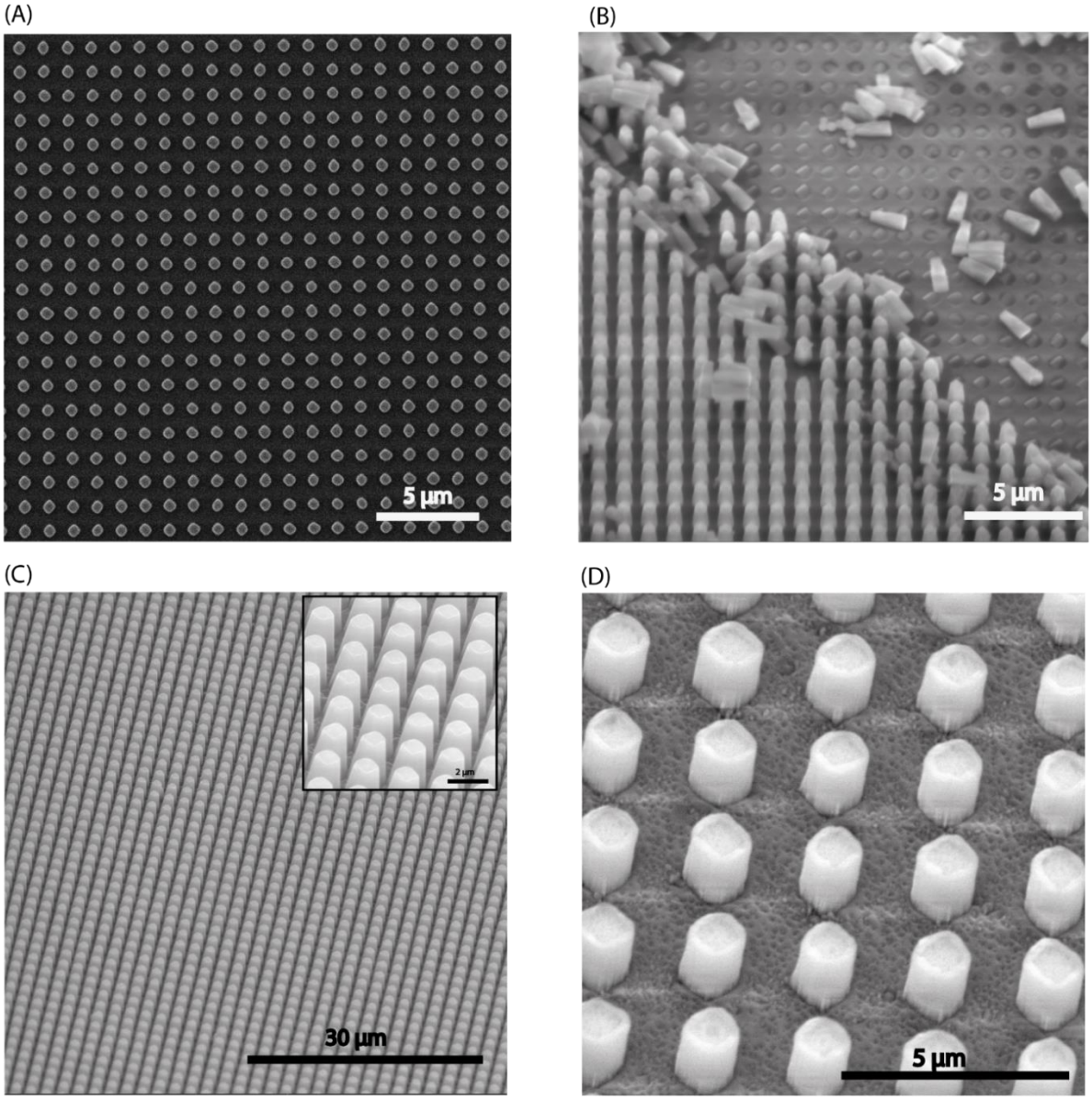


Figure 2-11 : *Photos MEB des cylindres fabriqués. (A) Photo MEB de la résine après exposition et développement, le pas est de 1 µm. (B) Photos de cylindres fabriqués pour les expériences sur les moteurs flagellaires avec les pinces optiques rotatives issue de l'article de Z. Santybayeva et al. [17]. (C) Cylindres fabriqués avec un pas plus grand (2 µm) et gravés plus longtemps ce qui accentue le profil conique. (D) Cylindres fabriqués à partir d'une recette de gravure à base de SF_6.*

- **Cylindres ou troncs de cônes ?**

Comme mentionné plus haut, les particules produites sont tronconiques : la base des cylindres et leur apex n'ont pas les mêmes dimensions. Afin d'obtenir des cylindres bien droits, quelques changements sont nécessaires dans les recettes de gravure plasma. Avec la recette à base de $CHF_3/O_2/Ar$ les cylindres ont une forme plus conique avec un angle de paroi d'environ 80 ° comme on peut le voir sur la ***Figure 2-11*** **(C)**. Pour limiter la formation de cet angle il est possible de modifier la recette de gravure. En rajoutant du SF_6 dans le mélange les cylindres formés présentent une paroi droite, le résultat de cette nouvelle recette est visible sur la ***Figure 2-11*** **(D)** et nous pouvons voir la différence de géométrie lorsqu'ils sont en milieu aqueux sur la ***Figure 2-12***. Les cylindres sont bien définis avec des parois bien droites, cependant on remarque que l'état de surface parait rugueux ce qui peut engendrer quelques problèmes lors du rasage. La surface présentant beaucoup d'aspérités, l'étape de rasage peut générer

des poussières de quartz qui se retrouvent dans la solution et peuvent perturber le piège. De plus, l'ajout de SF_6 rend la recette plus instable et agressive ce qui provoque la détérioration du masque dur en chrome. Avec cette recette, il n'est pas possible de faire des gravures longues et par conséquent la hauteur des cylindres est limitée à 1 µm pour une couche de chrome de 30 nm ce qui est insuffisant pour notre application et pour la forme finale souhaitée.

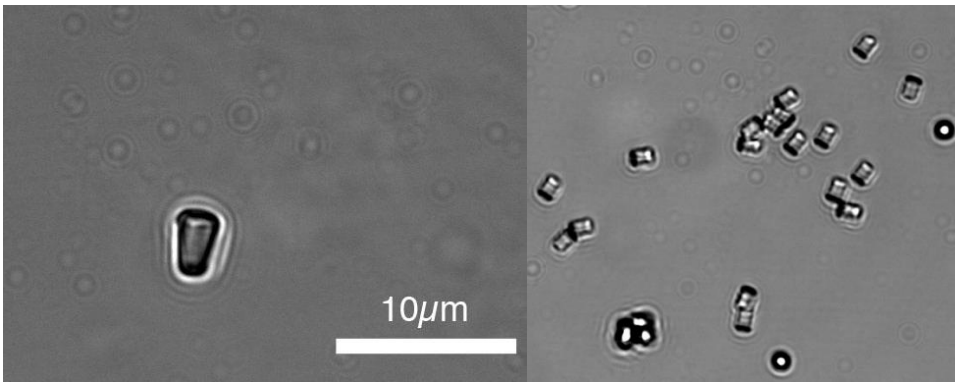


Figure 2-12: *Particules tronconiques et cylindriques en solution*

En ajoutant le gaz SF_6 dans la recette nous avons réussi à obtenir des cylindres et même si l'état de surface n'est pas optimal il est possible de les cliver et de les mettre en solution. Une investigation plus poussée sur la gravure SF_6 nous permettrait à terme d'avoir des cylindres idéals avec des dimensions ajustables (selon le temps de gravure).

- **Fabrication collective**

Dans chaque technique de fabrication il est important d'aborder le rendement et d'effectuer des statistiques pour pouvoir discuter de l'efficacité de la méthode. Les échantillons utilisés ont une surface de 4 cm², si toutes les particules fabriquées sont identiques on se retrouve avec 400 millions de cylindres par échantillon en prenant un pas de 1 µm. Sachant que sur chaque échantillon il y a des zones de perte : les angles et les côtés sont généralement perdus. Cette perte peut être évaluée à 20 % environ ce qui nous laisse avec 320 millions de particules à examiner. En divisant la plaque en trois zones distinctes sur lesquelles on mesure les dimensions des cylindres (hauteur, diamètre haut et base) on réalise une étude statistique pour avoir une idée de la fiabilité du procédé de fabrication. Cette étude a été réalisée par Afaf Meghit, stagiaire en 2016, qui a été la première à fabriquer les cylindres avant que je ne prenne la relève. Les résultats sont les suivants :

Tableau 2-1 : *Dimensions des cylindres fabriqués avec le procédé de fabrication décrit plus haut.*

Dimension (nm)	Moyenne	Écart type
Diamètre haut	330	40
Base	490	50
Hauteur	1400	60

2.3. Les experiences de rotation

- **La rotation des cylindres avec nos pinces optiques angulaires**

Nous avons vu que pour bien définir un piège optique, trois grandeurs caractéristiques sont nécessaires :

- La sensibilité β, qui nous sert à convertir les signaux en volt reçus par les détecteurs (photo détecteur et détecteur de sensibilité de position) en distance réelle donnée en microns.
- La raideur du piège, k, qui caractérise la force appliquée par le piège sur la particule en fonction de la distance par rapport à sa position d'équilibre.
- Le coefficient de trainée γ (drag en anglais) qui dépend du milieu dans lequel évoluent les particules ainsi que de leur géométrie et de leurs dimensions.

Pour les pinces optiques angulaires il existe trois grandeurs équivalentes : la sensibilité du couple de rotation, la raideur angulaire et le coefficient de trainé angulaire. Les calibrations pour déterminer ces trois caractéristiques sont décrites en détails dans l'article de F.Pedaci *et al*. [18].

Le montage optique utilisé pour nos expériences est similaire à celui décrit dans l'introduction pour la partie piège optique. Une nouvelle section est ajoutée ayant pour but de faire tourner la polarisation du laser en vue d'appliquer un couple de rotation sur nos cylindres. L'orientation de la polarisation linéaire du laser est contrôlée dynamiquement par un modulateur électro-optique (MEO ou EOM en anglais) combiné à une plaque quart d'onde [19], [20]. La plaque quart d'onde permet de changer l'état de polarisation de la lumière : Elle permet de passer d'une polarisation rectiligne à une polarisation elliptique voire circulaire, et *vice versa.* Le modulateur tire parti de l'effet électro-optique : cet effet correspond à une modification de la propagation d'une onde électromagnétique dans un matériau. Cette modification est due à la présence d'un champ électrique quasi statique. Le dispositif optique (MEO), dans lequel un élément à commande de signal présente l'effet électro-optique, est utilisé pour moduler un faisceau de lumière. La modulation peut être imposée sur la phase, la fréquence, l'amplitude ou la polarisation du faisceau.

Dans nos expériences, nous contrôlons la fréquence ω de rotation de la polarisation linéaire en commandant l'EOM avec un signal de tension en dents de scie à fréquence variable. La polarisation peut être mise en rotation dans les deux sens avec ω dans la plage de 0 à quelques kHz.

Le couple transféré est mesuré en comparant les composantes circulaires de la polarisation à la sortie du piège par rapport à l'entrée. Après étalonnage du piège angulaire [18], des mesures absolues du couple sont effectuées à une fréquence d'échantillonnage de 20 kHz.

Dans la **Figure 2-13**, on retrouve les mesures dynamiques du couple transféré sur un seul cylindre dans le piège optique, effectuées pour différentes fréquences de rotation ω de la polarisation linéaire du laser. Comme le prévoit l'équation (**2.3**), lorsque la polarisation linéaire tourne à une fréquence ω, la réponse dynamique du système est "excitable" et peut être bien décrite par le mouvement unidimensionnel d'une particule le long d'un potentiel périodique incliné [20].

- Pour ω faible (entre les points c et d), l'axe extraordinaire du cylindre suit la rotation de la polarisation. Dans ce régime, le couple optique moyen transféré à la particule est linéairement proportionnel à ω, comme le montre la **Figure 2-13 (A),** entre -40 et +40Hz. Les traces du couple exercé sur la particule dans le temps sont caractéristiques du mouvement brownien confiné d'une particule piégée, comme le montre la **Figure 2-13 (B)**.
- Au point d, Lorsque ω atteint la valeur critique $\omega_c = \tau_o/\gamma$ (avec τ_o donné dans l'équation de la partie « description et principe physique » et γ le coefficient de traînée angulaire du cylindre), le cylindre ne peut plus suivre en phase la rotation de la polarisation. La force de frottement du cylindre dans le fluide, le drag excède la force appliquée à la particule par la rotation de

polarisation. Dans ce régime, les fluctuations induites par le mouvement brownien (d'origine thermique) déclenchent des événements stochastiques d'échappements. La particule ne suit plus la polarisation mais est « rembrayée » lorsque la polarisation s'aligne avec l'axe extraordinaire au tour suivant, c'est l'effet « clé dynamométrique » ou *optical torque wrench.* Ce mécanisme de saut de phase est lié aux mouvements browniens ce qui lui confère un comportement stochastique que l'on peut observer sur la trace de la **Figure 2-13 (C)** qui montre le couple transféré dans le temps.

- A partir du point d, Le couple moyen transféré à la particule diminue avec l'augmentation de ω (**Figure 2-13 (C)**), et les événements d'échappement sont plus fréquents car la vitesse de rotation de la polarisation du couple est trop importante pour que la particule puisse la suivre en phase, et le couple moyen chute rapidement vers zéro (**Figure 2-13 (D)**).

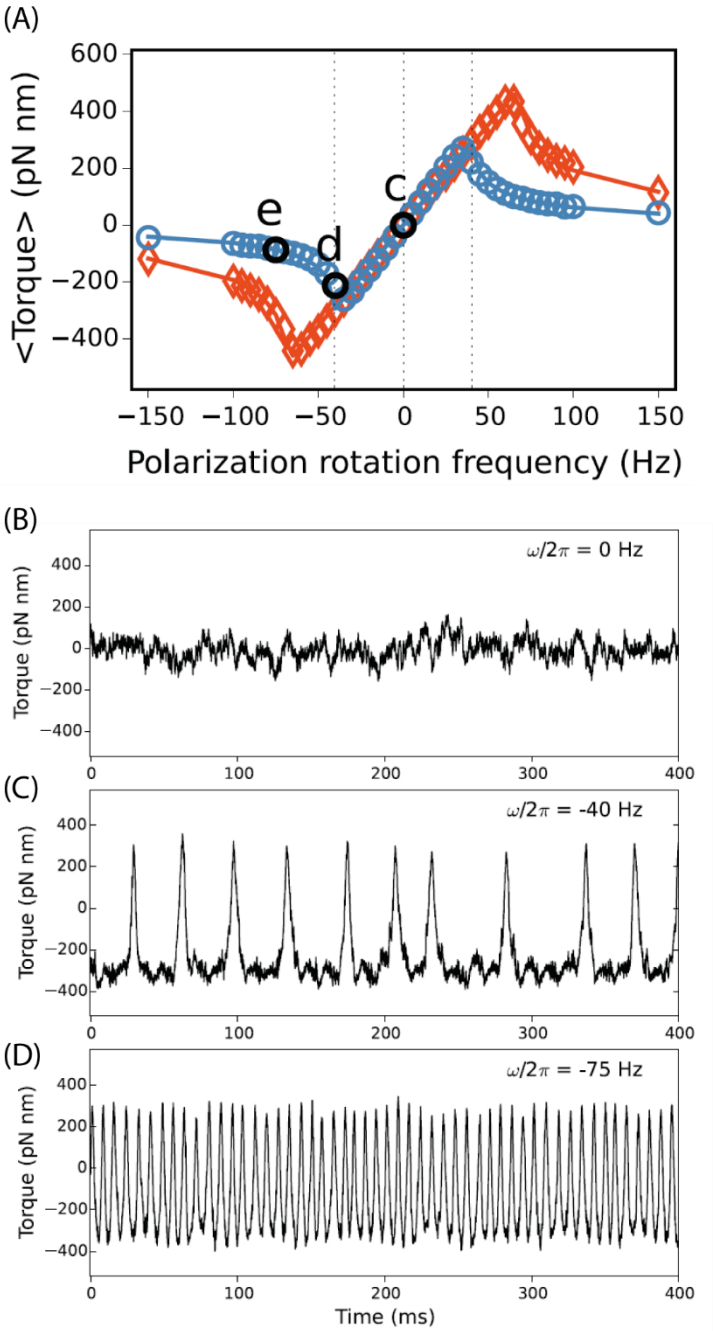


Figure 2-13 *: Mesure du couple de rotation transféré au cylindre piégé. (A) Couple moyen transféré à la particule en fonction de la fréquence de rotation de la polarisation ω. Puissance laser = 55 mW (bleu),*

92 mW (orange). (B)-(D) Les courbes de couple instantanées enregistrées aux valeurs indiquées sur ω, comme indiqué également en (b).

L'étalonnage du signal optique permet des mesures absolues du couple en unités physiques (pN.nm) et fournit une valeur pour le coefficient de traînée angulaire γ de la particule immergée dans l'eau *[18]*. Pour un cylindre faisant partie du lot fabriqué dans la partie précédente illustré sur la photo MEB de la **Figure 2-11 (B)**, dont les dimensions sont celles indiquées dans le tableau des dimensions finales de la partie sur la fabrication, l'étalonnage donne un de γ de 1,1 +/- 0,2 pN.nm.s. Cette valeur est compatible avec la valeur théorique de 0,9 pN.nm.s pour un cylindre avec les mêmes dimensions *[21]*. Ce comportement dynamique de cylindre piégé, bien décrit par le modèle, confirme que le couple optique dans la plage de pN/nm, pertinent dans le domaine de la molécule unique, peut être transféré et mesuré sur ces cylindres biréfringents piégés. Une idée originale nous a poussé à faire quelques premiers tests préliminaires de fabrication, l'expérience envisagée consiste à fabriquer des particules fonctionnalisées que l'on puisse piéger et mettre en rotation en vue de faire une nano-disqueuse.

Initialement développé pour l'étude des moteurs flagellaires de bactéries vivantes ce dispositif n'a, pour le moment, pas fait ses preuves. En effet la difficulté de mise en œuvre, notamment de réussir à trouver un cylindre attaché à un moteur, et la compétition avec un autre dispositif (les pinces électromagnétique) qui a déjà montré des résultats plus intéressants a eu raison de ces expériences.

Cependant, le résultat général de l'article sur la fabrication des cylindres et leur utilisation que je viens de présenter permet d'envisager des possibilités originales. Pouvoir faire rentrer en rotation une particule piégée présente des avantages considérables et les domaines d'applications sont variés.

- **Perspectives**

Il existe plusieurs expériences de mécanique des fluides qu'il est possible de réaliser avec le montage de pinces optiques rotatives. Tout d'abord, l'effet Magnus qui est responsable des mouvements des ballons de football qui sont mis en rotation au moment du tir. Cet effet intervient quand un solide, en mouvement dans un fluide tourne sur lui-même. La dissymétrie des conditions de circulation du fluide sur sa surface, induite par la rotation de ce solide, induit une force perpendiculaire au mouvement du fluide qui va tendre à modifier le mouvement du solide. En introduisant un mouvement laminaire du liquide autour du cylindre piégé, on devrait pouvoir quantifier, via la mesure de la position du cylindre en x et y, la force résultante de l'effet Magnus. Cet effet a surtout été étudié pour des fortes valeurs du coefficient de Reynolds, qui rappelons le, sert à classer les écoulements étudiés en laminaires ou turbulents. Dans notre cas, au vue des dimensions du système, nous aurons une très faible valeur du coefficient de Reynolds. Un autre effet dont l'étude, à l'échelle micrométrique, serait possible grâce aux pinces optiques angulaires est l'effet Weissenberg. Cet effet se manifeste lors de la rotation d'une tige cylindrique dans un fluide non newtonien : Le fluide monte le long de la tige lors de la rotation *[22]*. Avec les pinces optiques angulaires, cet effet se traduirait par une force résultante sur le cylindre piégé dirigée vers le haut ce qui le déplacerait de sa position d'équilibre.

Une autre étude possible serait la nano-rhéologie en cylindre tournant. La rhéologie est l'étude de la viscosité de divers fluides et de leur réponse lorsqu'ils subissent une contrainte mécanique de type cisaillement [23]. L'outil le plus répandu pour l'étude rhéologique des fluides est un rhéomètre en cylindre tournant. Il permet d'étudier fondamentalement les propriétés d'écoulement d'un liquide, d'une suspension, d'une pâte (ou autre), en réponse à une force appliquée. Un fluide remplit l'espace entre deux pièces coaxiales (le rotor et le stator), lorsque le rotor rentre en mouvement, il applique une force de cisaillement sur le fluide ce qui permet de remonter au grandeurs viscoélastiques caractéristiques du fluide étudié (Viscosité dynamique, taux de cisaillement, contrainte tangentielle…). Il est possible d'imaginer que la viscosité d'une cellule, par exemple, peut changer selon l'endroit où l'on se trouve sur la cellule. L'idée serait d'utiliser les cylindres piégés dans le faisceau comme rhéomètre (voir illustration de la **Figure 2-14**) pour mesurer des grandeurs locales voire directement dans la cellule elle-même.

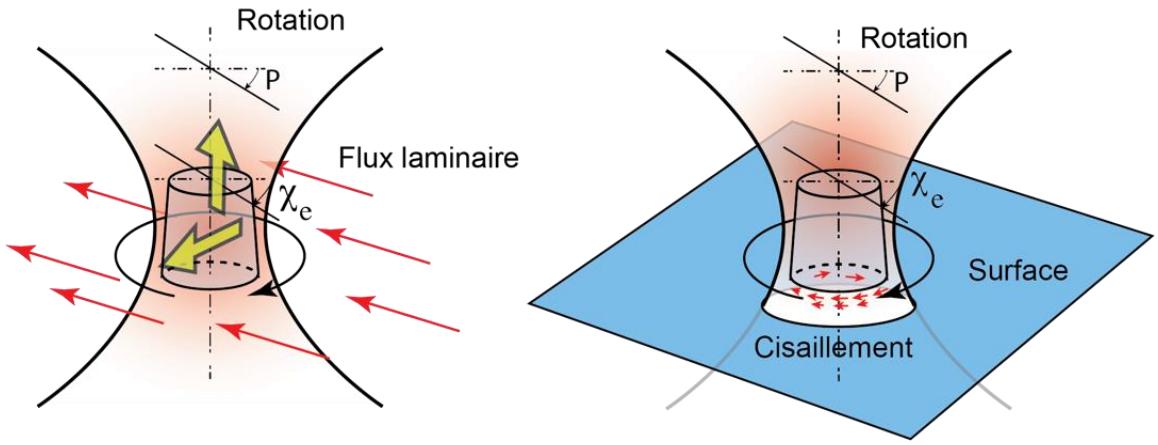


Figure 2-14 : *Expériences possibles à l'aide de pinces optiques rotatives. A gauche, l'étude des effets Magnus et Weissenberg en mesurant le déplacement du cylindre lorsqu'il tourne dans un fluide non newtonien pour l'effet Weissenberg et dans un fluide se déplaçant de manière perpendiculaire à l'axe optique pour l'effet Magnus. A droite, nano-rhéologie en cylindre tournant, le cylindre est mis en rotation au-dessus d'une surface fixe.*

La possibilité de mettre en rotation des particules dans un piège permet d'étudier certains phénomènes physiques (comme expliqué plus haut) mais aussi la mise en place de micromoteurs capables de générer des flux à l'intérieur de canaux microfluidiques ou encore de manipuler indirectement d'autres micro-objets par le biais de rotors activés optiquement.

- **État de l'art : les micro-moteurs et micro-pompes activés optiquement**

La micro-robotique à commande optique est un domaine émergent qui exploite la dynamique de la lumière pour piloter des systèmes micro-mécaniques. La manipulation de particules qui diffusent fortement la lumière est quasi impossible avec les pinces optiques et il est aussi parfois impossible de manipuler des objets biologiques sans les endommager. Pour pallier à ce problème, il est possible d'utiliser des micro moteurs qui, une fois actionnés par plusieurs pièges optiques, peuvent servir à la manipulation d'objets qui diffusent la lumière ou encore des cellules *[24]*. Le principe de fonctionnement est illustré sur la ***Figure 2-15*** **(A)**: les micro-rotors piégés à l'aide de plusieurs pinces optiques sont mis en rotation et créent un flux de liquide autour d'eux. Ce flux est contrôlable par le biais des rotors et il est possible de piéger des particules grâce à la combinaison des flux autour des rotors. Ce système permet de manipuler des micro-particules avec les forces générées par des flux de liquide seulement, leurs actions sont indépendantes de la composition de la particule à manipuler et n'endommage pas les systèmes biologiques.

Un système à plusieurs pièges optiques est aussi utilisé dans le domaine de la micro-fluidique. La possibilité de générer des flux de liquide optiquement permet de créer des micro-pompes capables de mettre en mouvement un fluide dans un canal micro fluidique *[25]*. Dans la publication de Leach *et al. [25]*, deux micro-sphères biréfringentes sont piégées dans deux pièges différents. Elles sont mises en rotation grâce au transfert du moment de spin angulaire d'un faisceau polarisé circulairement. La rotation génère un flux autour des particules, en les plaçant de part et d'autre du canal microfluidique le flux résultant est dirigé au travers du canal, comme nous pouvons le voir sur la photo de la ***Figure 2-15*** **(B)**.

Une idée originale de mise au point de micro-pompes est exposée dans l'article de Lin *et al [26],* ici un seul piège optique est nécessaire pour générer un flux. En piégeant une particule qui a une forme de vis et en appliquant une rotation sur celle-ci, il est possible de générer un flux dans un canal microfluidique. Sur la ***Figure 2-15*** **(C)** nous pouvons voir un schéma du canal avec à son extrémité la particule piégée dans le faisceau du laser. Lorsqu'elle rentre en rotation, celle-ci génère un flux capable de mettre en mouvement des nano-objets, par exemple une microbille dans le canal. Les photos de la

***Figure 2-15* (C)** montrent d'une part la particule fabriquée servant à la génération du flux par le biais du piège et d'autre part l'expérience en action à plusieurs intervalles de temps après la mise en rotation de la particule. Nous pouvons distinguer une microbille qui se déplace vers le piège dans le canal.

La possibilité d'utiliser les pinces optiques pour activer des micro-moteurs nous a donné une idée originale. Quelques tests préliminaires de fabrication ont été mené, l'expérience envisagée consiste à fabriquer des particules fonctionnalisées que l'on puisse piéger et mettre en rotation en vue de faire une nano-disqueuse.

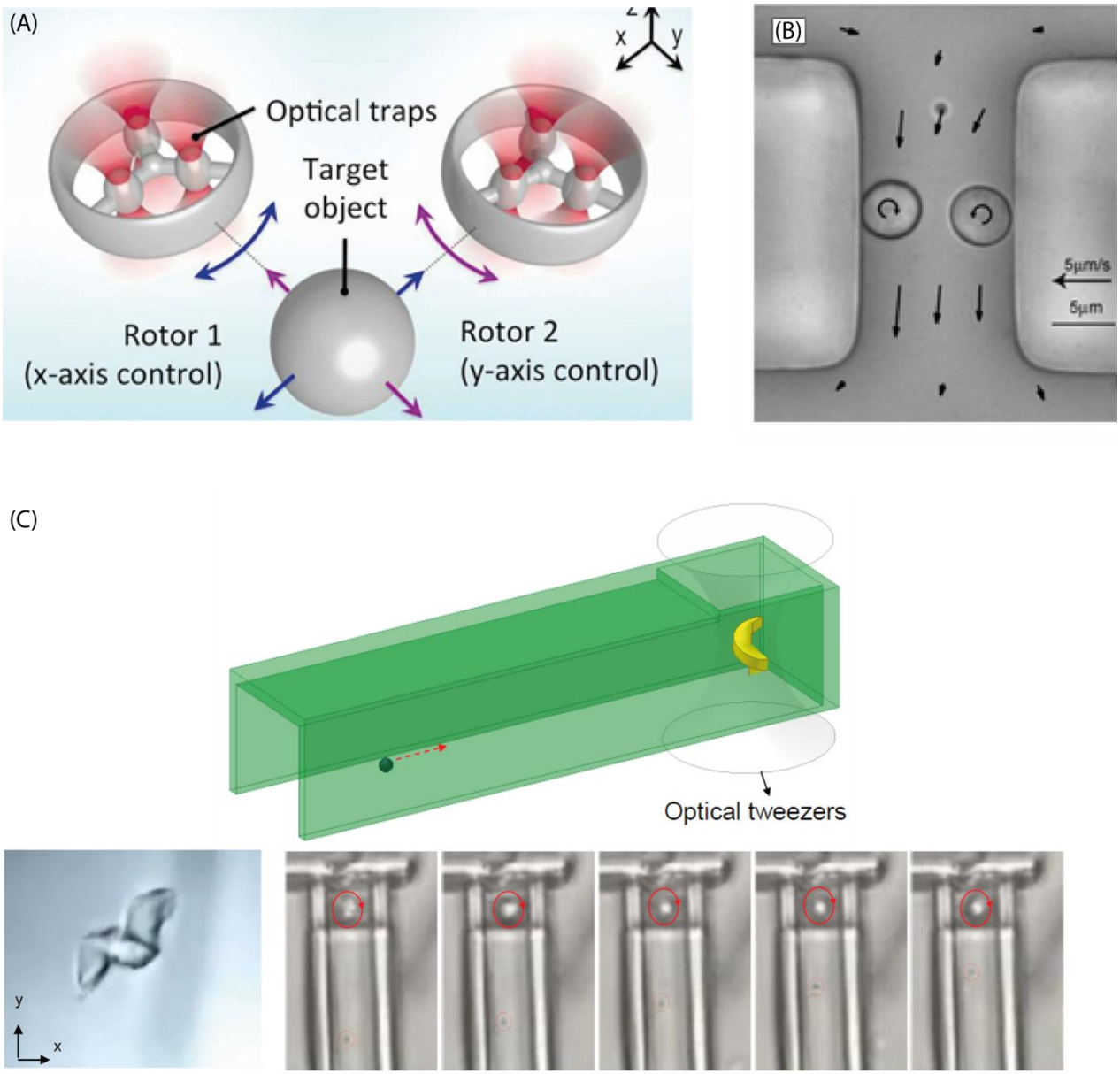


Figure 2-15 : *(A) Illustration de la manipulation d'une bille grâce à l'utilisation de micro-rotors actionnés optiquement. Le schéma est issu de l'article de Būtaitė et al. [24]. (B) Canal microfluidique avec un flux généré optiquement. Deux particules sphériques tournent en contrarotatif ce qui permet de générer le flux. Photo tirée de l'article de Leach et al. [25]. (C) Canal microfluidiques dont le flux est généré par une particule avec une géométrie de vis. Les images sont tirées de l'article de Lin et al. [26]*

- **Projet adjacent au sujet principal : la nano-disqueuse**

Dans la partie précédente, on a vu qu'il est possible de faire tourner une particule cylindrique piégée dans le dispositif des pinces optiques en tournant la polarisation du laser. Cette possibilité a fait émerger une idée originale d'application. Le but est de fabriquer un nouveau type de particule avec un corps cylindrique sur lequel un disque cranté assez fin serait positionné dessus. En piégeant le cylindre et en le faisant tourner on pourrait faire une nano-disqueuse (comme illustrée sur le schéma de la ***Figure 2-16***) et peut-être réussir à découper des corps cellulaires. Pouvoir ouvrir une cellule vivante à l'aide de micro-outils est une idée intéressante et pourrait ouvrir la porte à un nouveau domaine d'application.

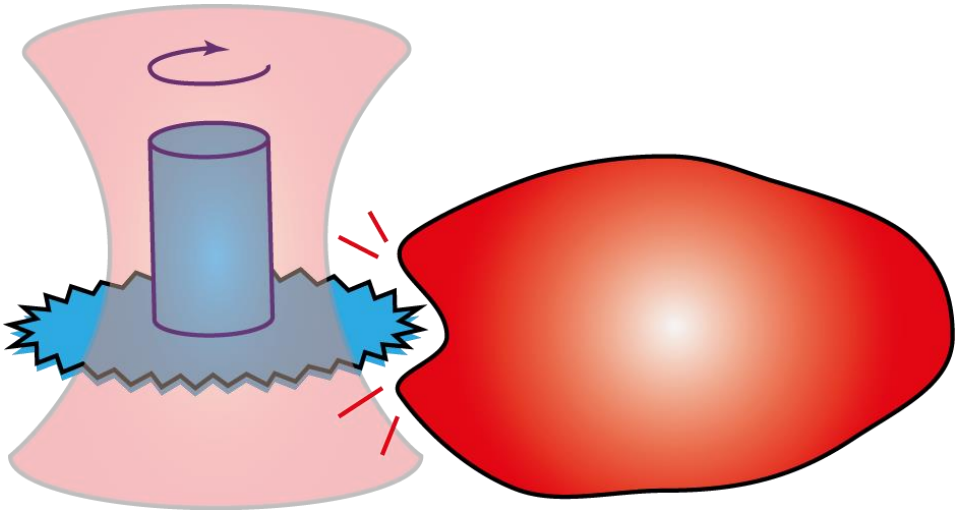


Figure 2-16 : *Schéma du Principe de fonctionnement de la nano-disqueuse.*

La fabrication de telles particules est un challenge relevé. D'une part, il faut que le disque cranté soit centré sur le cylindre et assez fin pour avoir un effet « lame » et d'autre part les dimensions du cylindre doivent être en adéquation avec le piège. Il faut que la nano-scie se piège dans l'axe du faisceau. De plus, pour permettre la rotation, la partie cylindrique doit conserver son arrangement cristallin (quartz x-cut).

Le procédé de fabrication envisagé est décrit dans la ***Figure 2-17***. La première étape sera la fabrication de cylindres en quartz plus larges et plus longs que ceux déjà fabriqués précédemment. Ici la différence réside dans l'étape de lithographie, le pas des cylindres doit être le même que celui de la seconde étape de lithographie avec l'impression du motif de disque cranté. Pour les premiers tests, une lithographie optique est réalisée pour les cylindres puis pour les disques crantés. Pour avoir des cylindres plus longs, l'étape de gravure plasma du quartz est allongée. Une fois les cylindres obtenus, une couche de résine est déposée en laissant la partie haute du cylindre à nu. On dépose une couche d'oxyde de silicium par-dessus qui formera par la suite la lame crantée. La lithographie optique pour les disques crantés doit être parfaitement alignée sur les cylindres, elle est réalisée à l'aide d'un aligneur EVG. La gravure du SiO_2 est faite par plasma O_2/CHF_3 puis on enlève la résine par un bain à l'acétone.

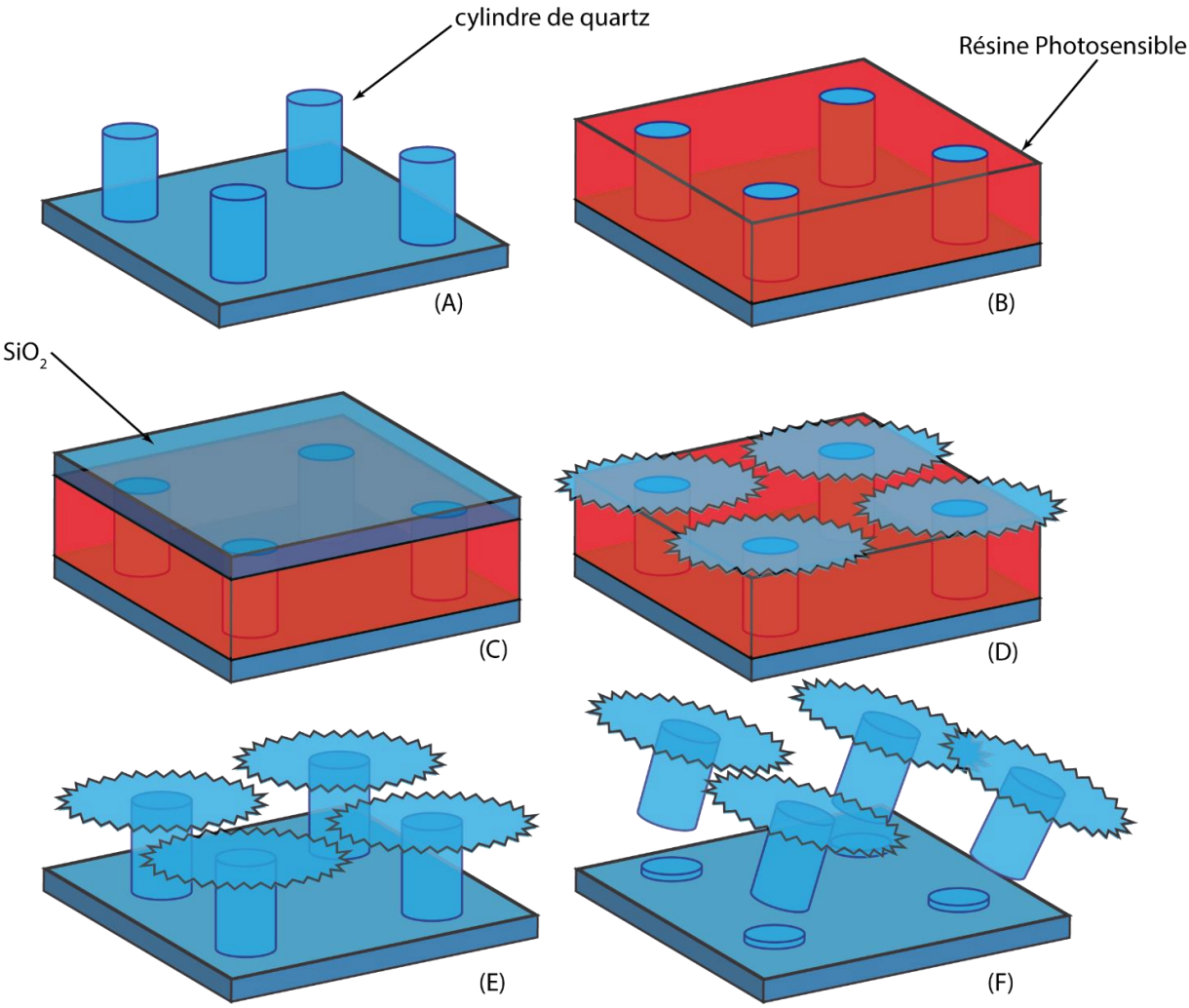


Figure 2-17 : *Procédé de fabrication envisagé pour la création de nano-disqueuse. (A) Cylindre de quartz fabriqué par la technique décrite dans la partie précédente. (A) Dépôt de résine photosensible et passage au plasma O_2 pour mettre à nu le haut des cylindres. (C) dépôt d'oxyde et dépôt de résine photosensible. (D) lithographie optique pour faire le motif de scies alignées sur les cylindres et gravure du SiO_2. (E) Dissolution de la résine à l'acétone puis (F) rasage des particules.*

Quelques premiers tests de fabrication ont été menés en suivant le protocole de la ***Figure 2-17***. Les résultats sont illustrés sur la ***Figure 2-18***. Tout d'abord, j'ai effectué des tests d'expositions sur la résine afin d'obtenir un disque cranté disposant de picots les plus pointus possible (Photo de microscope optique de la ***Figure 2-18*** **(A)**). Les cylindres fabriqués sur la photo (B) de la ***Figure 2-18*** mesurent 3,3 µm de haut pour une largeur de 3,5 µm à la base et 2 µm sur la partie haute. Enfin on a effectué un premier essai de lithographie optique sur le SiO_2 pour faire le disque cranté sur le cylindre. Le résultat est sur la ***Figure 2-18*** **(C)**, le disque tient bien sur le cylindre de quartz en revanche il n'est pas du tout centré. Le masque comportant le motif de disque est positif, c'est-à-dire que le motif est en noir. C'est pourquoi le centrage du disque n'est pas optimal et assez difficile à réaliser.

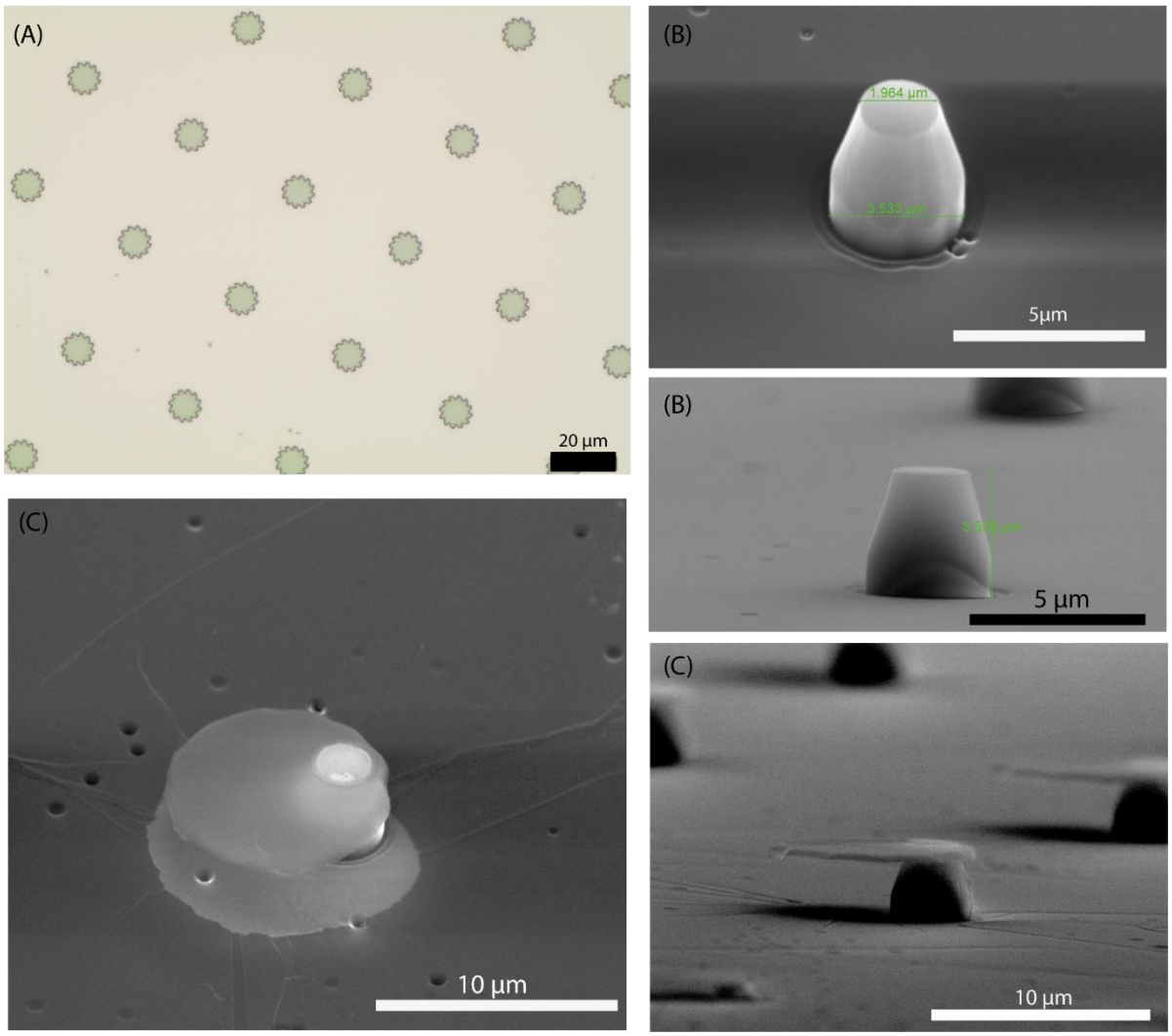


Figure 2-18 : *Photos des premiers tests de fabrication de nano-disqueuses. (A) test d'exposition de la résine AZMIR701 pour former les disques crantés. (B) Photos MEB, avec différents angles (45° et 90°), de la partie cylindrique sur laquelle sera fixée la lame. (C) Photos MEB, avec différents angles (45° et 90°) de la particule après dissolution de la résine, le disque n'est pas centré.*

Seuls ces premiers tests ont été effectués pour le moment. Il en ressort que l'étape de lithographie pour l'obtention de disque cranté est primordiale. L'alignement va être crucial pour avoir de belles nano-disqueuses. De plus, aucun test de clivage et de manipulation par les pinces optiques n'a été fait. Nous ne savons pas si les particules se piégeront correctement (avec la bonne position) et si il est possible de les mettre en rotation. Cependant, ces résultats montrent qu'avec quelques essais de plus la fabrication de cet objet est faisable. L'idée de la nano-disqueuse n'est donc pas abandonnée et d'autres tests seront réalisés dans un futur proche.

2.4. Conclusion

Dans cette partie, j'ai décrit une nouvelle configuration de pinces optiques capable de faire tourner les particules piégées dans le faisceau en faisant tourner la polarisation du laser. Pour que cette rotation soit possible, il faut que la particule en question soit biréfringente. Conçu pour l'étude de moteurs moléculaires, le dispositif est capable d'appliquer et de mesurer un couple de rotation sur une particule cylindrique [17], [18], [20]. L'idée de l'expérience envisagée était d'attacher sur un cylindre de quartz un flagelle de bactérie et ainsi recueillir des informations sur les forces et le couple développé par ce type de moteur moléculaire. Il fallait donc avoir à disposition des cylindres de quartz fabriqués collectivement avec une méthode peu coûteuse et rapide. Grâce à la lithographie interférentielle et à la gravure plasma, les cylindres ont été réalisés et des expériences préliminaires ont démontré que le dispositif optique peut appliquer un couple sur les cylindres fabriqués. Ces résultats, ainsi que la fabrication des cylindres ont fait l'objet d'une publication scientifique dont le contenu est largement décrit dans la partie fabrication et résultats. La difficulté de mise en œuvre de l'expérience avec les bactéries et l'obtention de meilleurs résultats avec les pinces electro-magnétiques aussi disponible dans notre laboratoire a contribué à l'abandon de cette manipulation sur les flagelles pour le moment. Cependant, la technique étant encourageante, nous avons en tête de faire d'autres expériences de rotation de particules à des fins différentes. Par exemple, nous avons fait des premiers tests de fabrication de nano-disqueuse. Le but étant de fabriquer une particule avec un corps cylindrique et un disque cranté sur le haut qui ferait office de lame. Aucune expérience de rotation n'a été effectuée pour le moment mais les particules sont en cours de fabrication.

Enfin la mise au point d'un procédé de fabrication collective de cylindres en quartz est une réussite et ces résultats me permettent d'envisager de nouveaux types de particules piégeables capables d'accomplir des mesures inédites sur des objets biologiques.

[1] Y. Sowa et R. M. Berry, « Bacterial flagellar motor », *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 41, n° 2, p. 103- 132, mai 2008, doi: 10.1017/S0033583508004691.
[2] M. E. J. Friese, T. A. Nieminen, N. R. Heckenberg, et H. Rubinsztein-Dunlop, « Optical alignment and spinning of laser-trapped microscopic particles », *Nature*, vol. 394, n° 6691, p. 348- 350, juill. 1998, doi: 10.1038/28566.
[3] A. La Porta et M. D. Wang, « Optical Torque Wrench: Angular Trapping, Rotation, and Torque Detection of Quartz Microparticles », *Physical Review Letters*, vol. 92, n° 19, mai 2004, doi: 10.1103/PhysRevLett.92.190801.
[4] M. Capitanio, D. Normanno, et F. Saverio Pavone, « High-precision measurements of light-induced torque on absorbing microspheres », *Optics Letters*, vol. 29, n° 19, p. 2231, oct. 2004, doi: 10.1364/OL.29.002231.
[5] L. Oroszi, P. Galajda, H. Kirei, S. Bottka, et P. Ormos, « Direct Measurement of Torque in an Optical Trap and Its Application to Double-Strand DNA », *Physical Review Letters*, vol. 97, n° 5, août 2006, doi: 10.1103/PhysRevLett.97.058301.
[6] P. Gross, N. Laurens, L. B. Oddershede, U. Bockelmann, E. J. G. Peterman, et G. J. L. Wuite, « Quantifying how DNA stretches, melts and changes twist under tension », *Nature Physics*, vol. 7, n° 9, p. 731- 736, sept. 2011, doi: 10.1038/nphys2002.
[7] C. Deufel, S. Forth, C. R. Simmons, S. Dejgosha, et M. D. Wang, « Nanofabricated quartz cylinders for angular trapping: DNA supercoiling torque detection », *Nature Methods*, vol. 4, n° 3, p. 223- 225, mars 2007, doi: 10.1038/nmeth1013.
[8] Z. Huang, F. Pedaci, M. van Oene, M. J. Wiggin, et N. H. Dekker, « Electron Beam Fabrication of Birefringent Microcylinders », *ACS Nano*, vol. 5, n° 2, p. 1418- 1427, févr. 2011, doi: 10.1021/nn1034108.
[9] Y. Cao, A. B. Stilgoe, L. Chen, T. A. Nieminen, et H. Rubinsztein-Dunlop, « Equilibrium orientations and positions of non-spherical particles in optical traps », *Optics Express*, vol. 20, n° 12, p. 12987, juin 2012, doi: 10.1364/OE.20.012987.
[10] Q. Xie, M. H. Hong, H. L. Tan, G. X. Chen, L. P. Shi, et T. C. Chong, « Fabrication of nanostructures with laser interference lithography », *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 449, n° 1- 2, p. 261- 264, janv. 2008, doi: 10.1016/j.jallcom.2006.02.115.
[11] J. de Boor, N. Geyer, J. V. Wittemann, U. Gösele, et V. Schmidt, « Sub-100 nm silicon nanowires by laser interference lithography and metal-assisted etching », *Nanotechnology*, vol. 21, n° 9, p. 095302, mars 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/9/095302.
[12] M. Maldovan et E. L. Thomas, *Periodic Materials and interference Lithography : For Photonics, Phononics and Mechanics*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.
[13] R. Legtenberg, H. Jansen, M. de Boer, et M. Elwenspoek, « Anisotropic Reactive Ion Etching of Silicon Using SF6/O2/CHF3 Gas Mixtures », *J. Electrochem. Soc.*, vol. 142, n° 1, p. 9, 1995.
[14] T. Abe et M. Esashi, « One-chip multichannel quartz crystal microbalance žQCM/ fabricated by Deep RIE », p. 5, 2000.
[15] L. Li, T. Abe, et M. Esashi, « Fabrication of miniaturized bi-convex quartz crystal microbalance using reactive ion etching and melting photoresist », *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 114, n° 2- 3, p. 496- 500, sept. 2004, doi: 10.1016/j.sna.2003.12.031.
[16] H. Chen et C. Fu, « An investigation into the characteristics of deep reactive ion etching of quartz using SU-8 as a mask », *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 18, n° 10, p. 105001, oct. 2008, doi: 10.1088/0960-1317/18/10/105001.
[17] Z. Santybayeva *et al.*, « Fabrication of quartz microcylinders by laser interference lithography for angular optical tweezers », *Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS*, vol. 15, n° 3, p. 034507, sept. 2016, doi: 10.1117/1.JMM.15.3.034507.
[18] F. Pedaci, Z. Huang, M. van Oene, et N. H. Dekker, « Calibration of the optical torque wrench », *Optics Express*, vol. 20, n° 4, p. 3787, févr. 2012, doi: 10.1364/OE.20.003787.
[19] B. Gutiérrez-Medina, J. O. L. Andreasson, W. J. Greenleaf, A. LaPorta, et S. M. Block, « An Optical Apparatus for Rotation and Trapping », in *Methods in Enzymology*, vol. 475, Elsevier, 2010, p. 377- 404.

[20] F. Pedaci, Z. Huang, M. van Oene, S. Barland, et N. H. Dekker, « Excitable particles in an optical torque wrench », *Nature Physics*, vol. 7, nº 3, p. 259- 264, mars 2011, doi: 10.1038/nphys1862.
[21] M. M. Tirado et J. G. de la Torre, « Rotational dynamics of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders », *The Journal of Chemical Physics*, vol. 73, nº 4, p. 1986- 1993, août 1980, doi: 10.1063/1.440288.
[22] N. Dietrich, C. Zhao, X. Frank, S. Poncin, N. Midoux, et H. Z. Li, « Étude de l'effet Weissenberg microscopique par micro-PIV », p. 7, 2007.
[23] C. J. Pipe, T. S. Majmudar, et G. H. McKinley, « High shear rate viscometry », *Rheologica Acta*, vol. 47, nº 5- 6, p. 621- 642, juill. 2008, doi: 10.1007/s00397-008-0268-1.
[24] U. G. Būtaitė, G. M. Gibson, Y.-L. D. Ho, M. Taverne, J. M. Taylor, et D. B. Phillips, « Indirect optical trapping using light driven micro-rotors for reconfigurable hydrodynamic manipulation », *Nature Communications*, vol. 10, nº 1, déc. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-08968-7.
[25] J. Leach, H. Mushfique, R. di Leonardo, M. Padgett, et J. Cooper, « An optically driven pump for microfluidics », *Lab on a Chip*, vol. 6, nº 6, p. 735, 2006, doi: 10.1039/b601886f.
[26] C.-L. Lin, G. Vitrant, M. Bouriau, R. Casalegno, et P. L. Baldeck, « Optically driven Archimedes micro-screws for micropump application », *Optics Express*, vol. 19, nº 9, p. 8267, avr. 2011, doi: 10.1364/OE.19.008267.

3. Microscope à force photonique

La microscopie à force photonique ou Photonic Force Microscopy (PhFM) est une technique d'imagerie en champ proche basée sur la capacité de mesurer avec une résolution nanométrique la position d'une particule piégée optiquement tout en balayant une surface [1]–[3]. Par rapport aux microscopes à force atomique conventionnels (*Atomic Force Microscopy* AFMs), la technique PhFM a l'avantage potentiel d'appliquer une force minimale inférieure de plus d'un ordre de grandeur sur l'échantillon, typiquement des pN pour le PhFM contre nN pour l'AFM. Ceci offre la possibilité de sonder des matériaux mous et déformables comme des membranes cellulaires, sans la déformation qui accompagne souvent l'imagerie AFM de ces matériaux. De plus, l'absence d'un porte-à-faux physique permet le balayage dans des régions topologiquement restreintes, comme à l'intérieur des cellules. Cependant, la résolution latérale en PhFM reste limitée par la géométrie de l'objet piégé, qui est souvent choisi sphérique. Dans cette partie je vais présenter un procédé de nanofabrication simple et économique de microcylindres de quartz avec une pointe sur une extrémité, basé sur des travaux antérieurs [4], qui imitent la pointe d'un AFM, et que nous utilisons comme sonde en imagerie PhFM. En raison de la géométrie des particules et de la biréfringence, le piège optique à polarisation linéaire contraint tous les degrés de liberté du cylindre, permettant un piégeage stable et une résolution de l'ordre du nm dans la détection de la position des particules dans les trois directions. La taille de la pointe permet une résolution latérale de 30 nm, tout en appliquant une force aussi faible que 1 pN sur l'échantillon. Ces résultats contribuent au développement d'une imagerie par balayage à haute résolution fiable des interfaces biologiques molles.

3.1. État de l'art sur le PhFM/AFM

- **L'AFM : Microscope à Force Atomique**

La microscopie à force atomique est une technique d'imagerie de surface d'un échantillon. Découverte en 1986 par G. Binnig, F.C. Quate et Ch. Gerber [5], elle se base sur l'interaction entre la surface de l'échantillon et le bout de la pointe de la sonde. Les forces d'interactions entre les deux objets sont faibles (de l'ordre du nN) ce qui permet d'avoir une résolution latérale de 30 Å (10^{-10} m) et moins de 1 Å pour la résolution verticale.

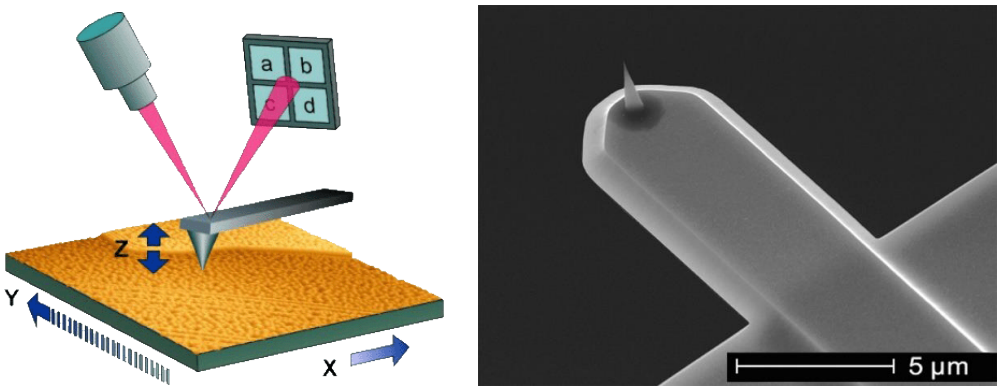


Figure 3-1 : *A gauche, schéma du principe de fonctionnement d'un AFM. La sonde balaye une surface, un laser focalisé sur le levier permet de reconstruire la topographie d'une surface en mesurant à l'aide d'un photo détecteur la déflexion du faisceau. A droite, c'est un photo MEB d'une pointe AFM avec un levier court. Ces pointes sont disponibles dans le commerce. L'image est issue d'un site commercial spécialisé dans la vente de pointe AFM (https://www.nanoandmore.fr/sonde-AFM-USC-F1.5-k0.6) et le schéma vient de la page web du groupe « nanoprobe » basé à l'université de Yale. (https://www.eng.yale.edu/nanomechanics/research_methods.html)*

La pointe (protrusion + levier) est généralement fabriquée à partir de silicium, grâce à la gravure anisotrope du Si dans le KOH et avec la bonne orientation des plans cristallins du silicium il est possible de générer une pointe qui sera taillée au niveau atomique. Les images générées disposent d'une résolution sub-nanométrique.

Il existe trois options de fonctionnement pour les AFM (Voir description sur la **Figure 3-2**) :

- Le mode contact
- Le mode intermittent ou dit « *tapping* »
- Le mode sans contact

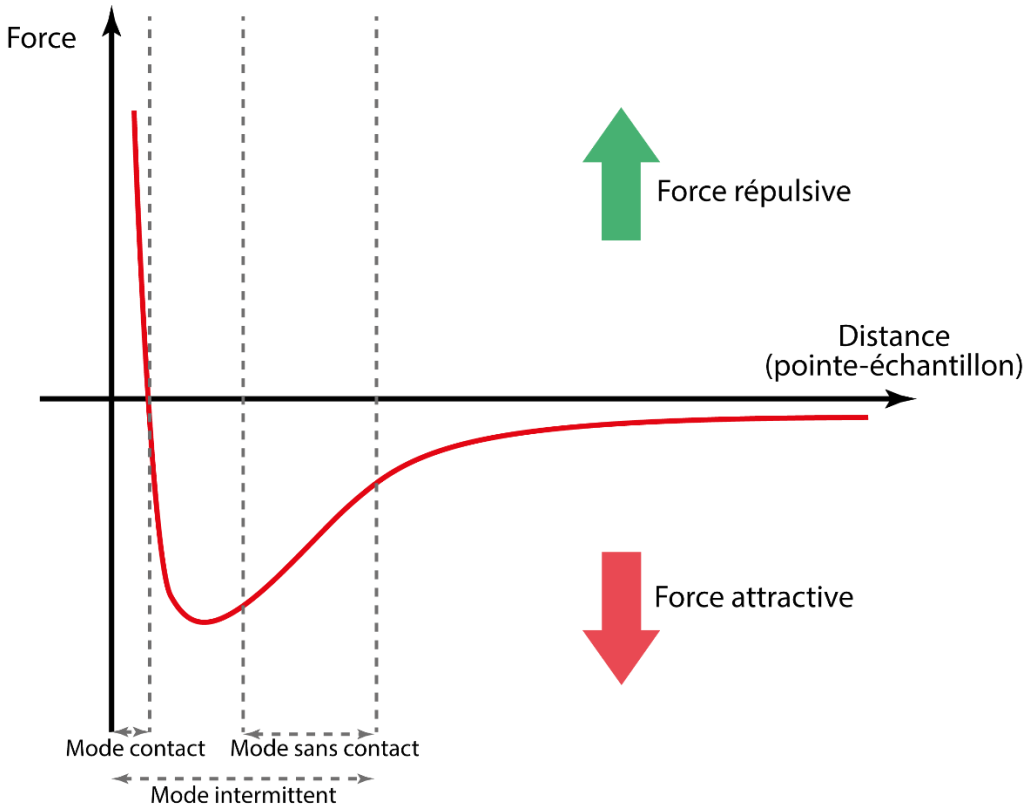


Figure 3-2 : *Graphique de la force exercée sur un échantillon en fonction de la distance pointe-surface avec une illustration des trois modes de fonctionnement d'un AFM*

Le mode contact où, comme son nom l'indique, la pointe est en contact avec la surface de l'échantillon permet de mesurer les forces pointe-échantillon avec une bonne précision. Le principe du balayage de surface est schématisé sur la **Figure 3-1**. Un laser est focalisé et réfléchi sur le dessus de la poutre, le faisceau est ensuite collecté sur un photo-détecteur. Lorsque le balayage est effectué chaque changement dans la topographie fera bouger le levier, ce mouvement sera visible par la déflexion du laser sur le détecteur. Il sera alors possible de reconstruire la topographie de la surface balayée en interprétant ces changements de signal du laser comme une variation de la topographie. En mode contact la distance pointe-échantillon reste inchangée et c'est le signal reçu par le photo-détecteur qui change.

Ces mesures permettent, par exemple, d'évaluer les forces intermoléculaires [6]. En liant la pointe de l'AFM à une bille d'agarose, à l'aide de biotine et d'avidine, il est possible de mesurer la force de détachement de paires moléculaires des polymères. En faisant une courbe d'approche-retrait avec la pointe de l'AFM sur une bille partiellement recouverte d'avidine on remarque la « marche » qui représente cette force. Le principe de la mesure est visible sur la **Figure 3-3 (A)** sur la courbe C. En

recouvrant partiellement la surface de la bille d'agarose d'agents bloquants la liaison pointe-bille ne se fait que pour un nombre limité de polymère. On a donc une mesure sur une molécule unique, la force de détachement d'une paire de polymère est de 160 pN pour la biotine. Le mode contact est utilisé pour l'étude des forces mises en jeu dans les interactions pointe-échantillon mais les images générées comportent souvent des artefacts dus à des problèmes d'accrochage de la pointe sur la surface. De plus, pour des échantillons fragiles le mode contact peut aussi abimer la surface.

C'est dans cette optique qu'il est préférable d'utiliser le mode dit « *tapping* ». Le levier est mis en vibration à sa fréquence de résonance avec une certaine amplitude, lorsque la pointe interagit avec une surface cette amplitude décroît (la fréquence de résonance change). Une boucle de retro-action rentre alors en jeu pour conserver l'amplitude initiale en faisant bouger la hauteur de la pointe. L'image est ainsi reconstruite en répertoriant ces changements de hauteur. Sur la **Figure 3-3 (B)** il y a une comparaison entre deux images d'AFM de la même surface. L'une est réalisée en mode contact (celle du dessus) et l'autre en mode *tapping* (celle du dessous). On voit bien que l'image obtenue en mode *tapping* comporte beaucoup plus de détails et est mieux résolue. Ces deux images AFM ont été prises par Q. Zhong et al [7]. Ce mode peut être aussi bien utilisé en phase liquide que dans l'air. C'est grâce à l'AFM en phase liquide qu'il est possible de sonder des échantillons biologiques [8]. En mode *tapping*, le milieu liquide permet d'avoir plus de pic de résonance et de ce fait permet d'obtenir des images d'objets biologiques.

Le dernier mode est le mode sans contact. Difficile à mettre en œuvre et difficile à interpréter, il peut avoir une résolution atomique. Comme dans le mode *tapping* le levier oscille à sa fréquence de résonance mais la pointe est positionnée juste au-dessus de la surface de l'échantillon ce qui permet d'avoir une cartographie du champ des forces présentes sur l'échantillon. On peut voir l'image obtenue par Sweetman et al [9] d'une molécule composée de plusieurs atomes d'hydrogène (photos de la **Figure 3-3** (C)), on voit littéralement la disposition des atomes dans la molécule.

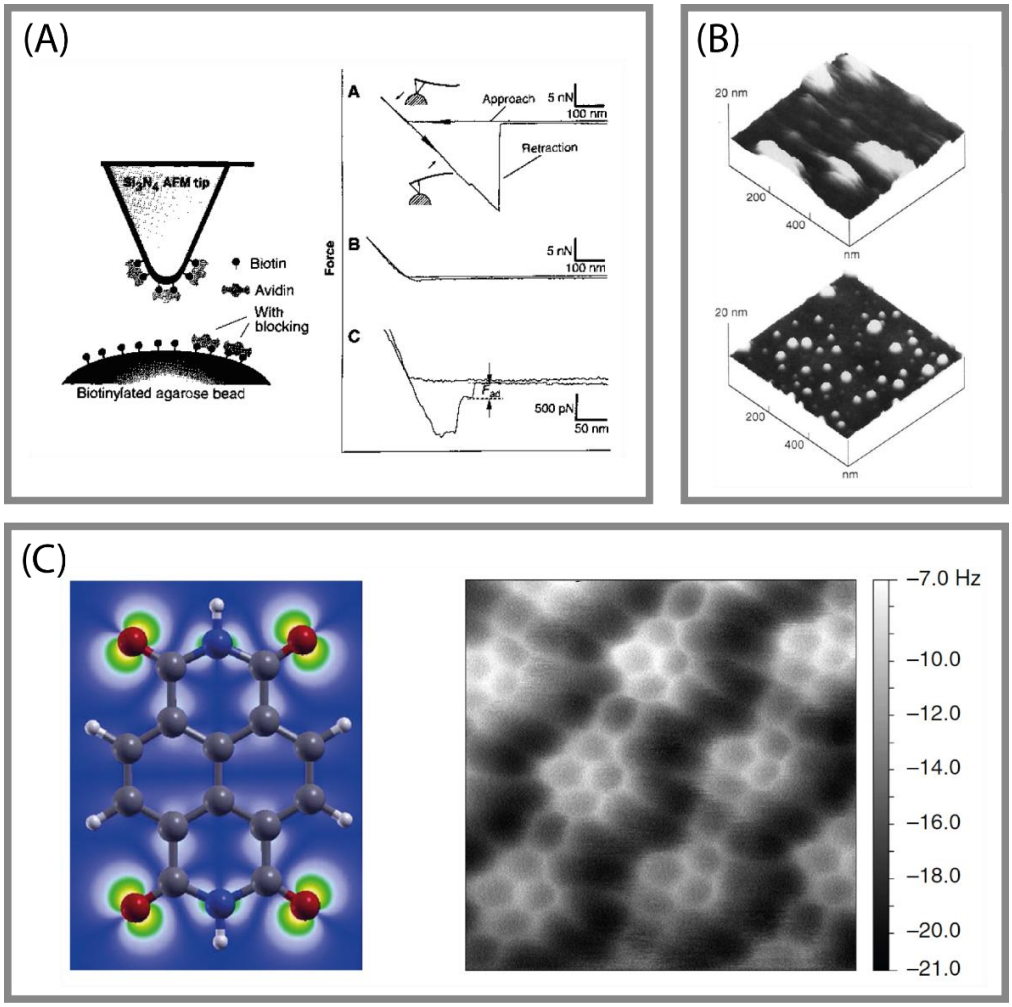


Figure 3-3 : *Images et photos tirées des articles pour illustrer les trois mode d'un AFM. (A) à gauche le principe de la fonctionnalisation de la pointe AFM et à droite 3 courbes d'approche-retrait avec pour A la courbe de référence, c'est-à-dire sans agent bloquant sur la bille d'agarose, B la bille est totalement recouverte d'agent bloquant et C celle-ci est partiellement recouverte c'est sur cette dernière qu'on peut voir la marche due au détachement de la paire moléculaire. L'illustration est issue de l'article de Florin et al [6]. (B) Images AFM d'une surface de fibre optique en silice contenant un revêtement de polymère résiduel, l'image du haut est obtenue en mode contact alors que celle du bas est obtenue en mode tapping. Les deux images sont issues de l'article de Q. Zhong et al [7]. (C) A gauche c'est un schéma d'une molécule d'un assemblage d'atome d'hydrogène (NTCDI : Diimide de naphtalène tétracarboxylique) et à droite une image AFM en mode sans contact de ce complexe. La taille de l'image est de 2x2 nm et elle est issue de l'article de Sweetman et al [9].*

L'AFM s'impose comme la référence en terme d'imagerie à sonde locale. La résolution d'un tel dispositif n'est pas encore égalée. C'est un outil flexible qui permet de travailler avec quasiment tout type de matériaux et dans plusieurs environnements différents : air, liquide, ou dans le vide. La principale limitation réside dans l'obtention d'images sur des surfaces molles. En effet, il est possible de faire des balayages de surfaces molles mais un levier très souple est nécessaire ce qui détériore la résolution. Souvent les échantillons souples nécessitent des traitements impactant leur structure comme le besoin de fixer chimiquement (généralement au glutaraldéhyde) les objets biologiques comme par exemple les globules rouges [10]. La force exercée sur les échantillons souples par l'AFM, qui est généralement de l'ordre de 1 nN mais peut être plus faible (100 pN), les déforme ce qui se voit sur l'image finale. L'émergence d'une nouvelle technique de microscopie à sonde locale pourrait venir combler ce manque : c'est la microscopie à force photonique.

- **Le PhFM : Microscope à Force Photonique**

La microscopie à force photonique utilise le principe des pinces optiques, une particule est piégé dans le centre focal d'un faisceau laser. C'est avec cette particule piégée qu'on va obtenir la topographie de surface d'un échantillon. La lumière diffusée par la particule et celle non diffusée sont collectées par une lentille et projetées sur un appareil de détection qui permet de connaître la position de la bille dans les trois dimensions de l'espace dans le piège. Les premières études de cette technique d'imagerie datent de 1993 et sont menées par L. P. Ghislain et W. W. Webb [3]. Ils utilisent un dispositif de pinces optiques pour piéger une particule de verre pointue qui sert de sonde (ou pointe AFM) pour reconstruire une image. La reconstruction n'est possible que sur un plan 2D, la résolution dans l'axe optique n'étant pas connue.

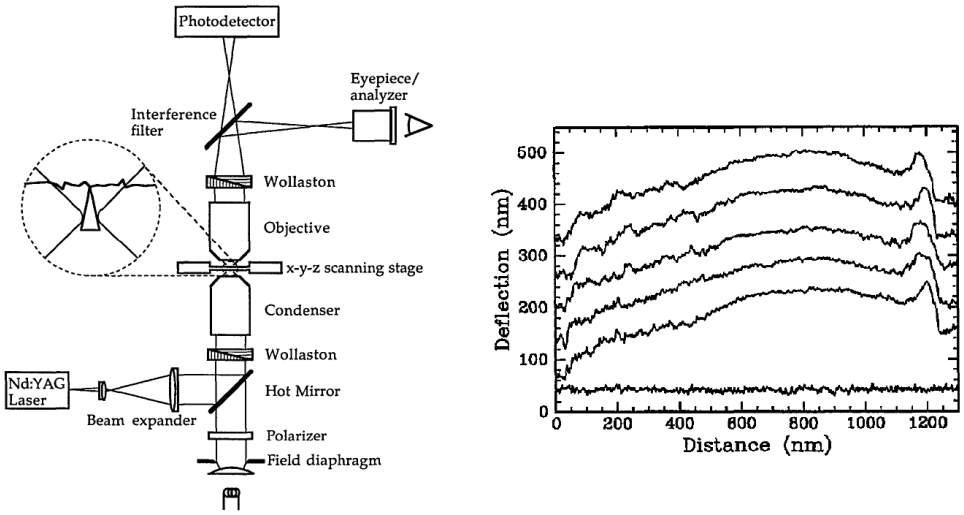


Figure 3-4 : *Dispositif utilisé par L.P. Ghislain et al. pour faire du balayage de surface avec des pinces optiques (à gauche) et un graphique montrant les résultats d'un balayage (sur une seule ligne) d'une surface couverte de résine (à droite). La particule est en contact avec la surface et est bougée sur une ligne par une plateforme piézoélectrique. La trace du bas représente une ligne acquise loin de la surface.*

La **Figure 3-4** présente le dispositif utilisé et un des résultats obtenus lors d'un balayage d'une surface. On peut distinguer un pic qui est dû à une perturbation de la position de la particule dans le piège. Cette perturbation est générée par un élément physique de la surface qui pousse la particule hors de sa position d'équilibre. Tout ceci peut être interprété et permet de reconstruire une surface. Ces premiers résultats montrent la possibilité d'utiliser une particule à la géométrie particulière, piégée dans les pinces optiques, pour faire de la topographie de surface 2D (sans les dimensions sur l'axe optique z). D'après les auteurs, cet instrument permet de détecter des forces de l'ordre de 10^{-13} N (soit 0.1 pN) donc bien en dessous des leviers mécaniques disponibles dans la commerce pour des AFMs. Cette particularité ouvre la porte à la possibilité de faire de l'imagerie sur des surfaces biologiques telles que des cellules ou autres macromolécules.

Les premières images d'objets biologiques ont été obtenues par E. L. Florin et ses partenaires en 1997. Dans l'article [1], il montre une image d'un neurone obtenue par microscopie à force photonique (voir image de la **Figure 3-5**). Ici, l'image reconstituée est une topographie réelle d'un neurone. Le principe de la mesure est l'utilisation d'une bille piégée fluorescente qui sera balayée sur une surface sur laquelle des neurone et axone sont collés. La résolution latérale est donnée par la taille de la bille (200 nm dans l'article) et grâce à la fluorescence de la bille qui est activée par le laser utilisé (λ = 1064 nm)

il est possible d'avoir les dimensions dans l'axe optique et donc une topographie complète de la zone balayée (x, y et z).

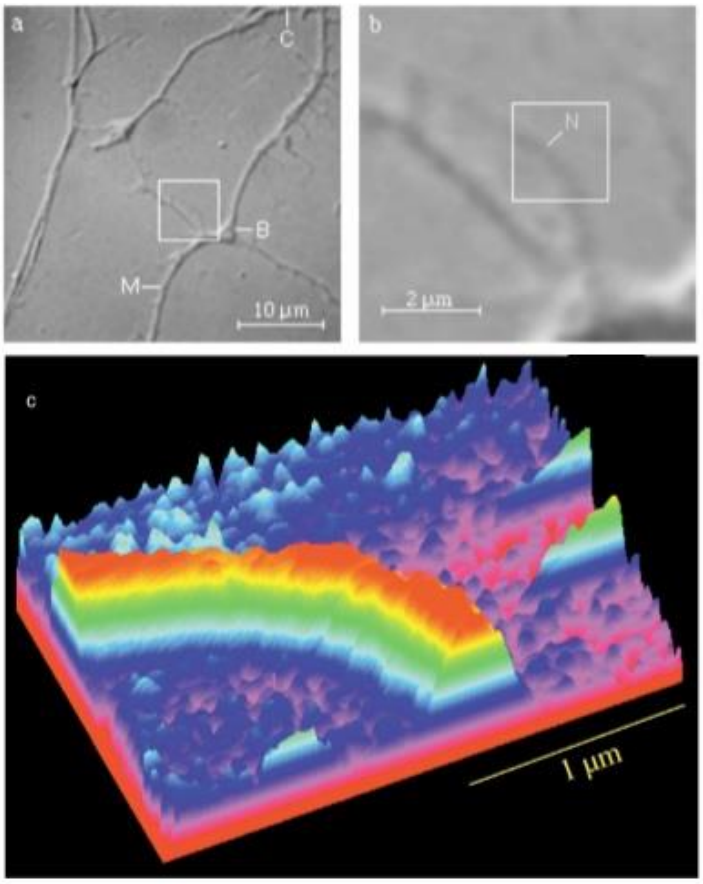


Figure 3-5 : *(a) et (b) Photo d'un neurone obtenue à l'aide d'un microscope optique, (c) image de la topographie d'un neurone obtenue par la technique de microscopie à force photonique. Ces résultats sont ceux de Florin et al [1].*

Plus récemment, Rohrbach et Friedrich [11] ont mis en place un système de microscopie à force photonique capable de reconstruire la topographie d'agglomérats de billes. Le système utilise une bille de polystyrène de 190 nm comme une sonde pour scanner les autres billes avec des diamètres qui varient de 280 à 500 nm. Le principe du balayage de surface et le résultat est donné sur la **Figure 3-6**

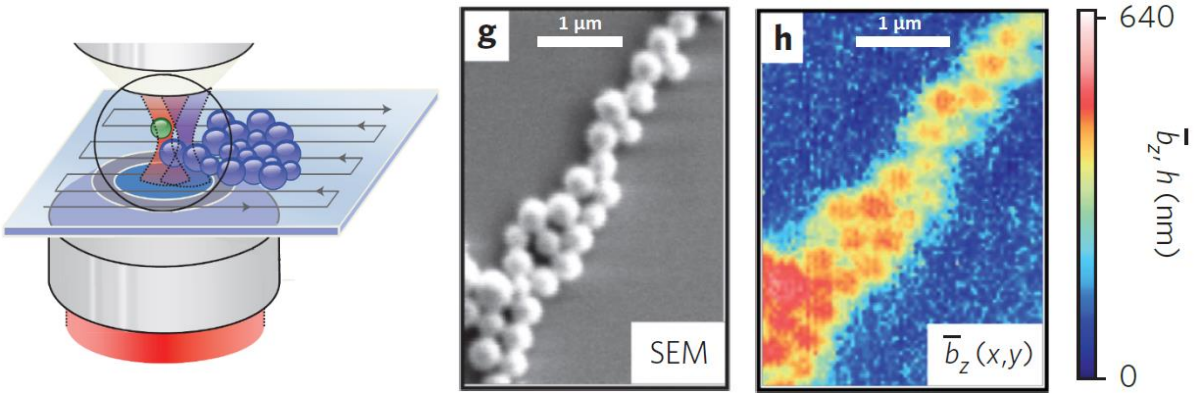


Figure 3-6 : *Technique de microscopie à force photonique utilisée par Rohrbach et Friedrich [11]. Le schéma et les deux photos sont tirées de l'article. Nous voyons un agglomérat de billes sur la photo MEB (au centre) et l'image reconstruite de cet agglomérat par PhFM (à droite).*

Cette technique de microscopie s'affirme de plus en plus dans le domaine de l'imagerie d'objets biologiques et s'affranchir des contraintes mécaniques d'un levier pourrait permettre l'acquisition d'images dans des zones difficiles d'accès (Pour un AFM conventionnel).

La taille du plus petit objet que l'on peut distinguer dépend donc de la taille de la particule piégée, plus la particule est petite plus la résolution sera élevée. Les pinces optiques permettent de piéger des particules de différentes géométries : billes, cylindres… Pour améliorer la résolution il serait alors judicieux d'utiliser une pointe, comme sur un AFM, pour augmenter la résolution. La fabrication de cylindres taillés en pointes ou alors de cônes permettra cela.

Pour rappel l'idée générale du projet est la mise au point d'un microscope à force photonique qui utilise des microparticules spécialement conçues pour l'application. Ces particules doivent avoir un corps cylindrique et une protrusion sur une extrémité qui mime une pointe AFM comme illustré sur la **Figure 3-7**. Dans la suite, je vais expliquer comment fabriquer ces pointes et comment elles ont été utilisées dans un dispositif de pinces optiques pour faire de l'imagerie de topographie de surface.

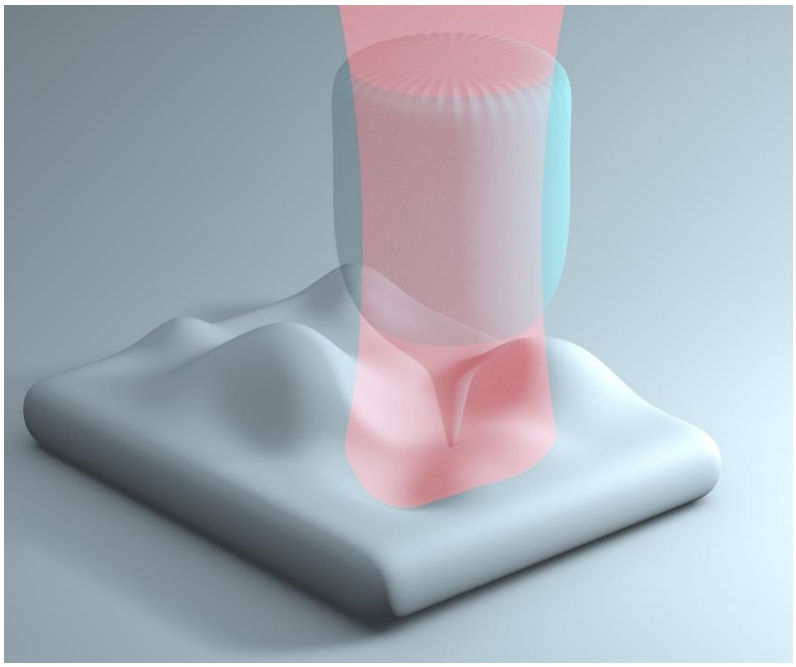


Figure 3-7 : *illustration du concept de microscope à force photonique. Un cylindre taillé en pointe est piégé dans un faisceau laser et balaye une surface. L'objectif est de reconstruire la topographie en regardant le déplacement de l'objet par rapport à sa position d'équilibre dans le piège.*

3.2. Micro fabrication des pointes

- **Matériaux à notre disposition / Cahier des charges**

Une des premières taches de mon doctorat a été la mise au point d'un procédé de fabrication de cylindres taillés en pointes. Le matériau utilisé pour la fabrication est le quartz monocristallin de formules chimique SiO_2. Deux coupes différentes ont été testées : le quartz Z-cut et X-cut. Ces deux découpes font référence aux axes des plans cristallins dans la maille de quartz. Elles sont illustrées sur le schéma de la **Figure 3-8**.

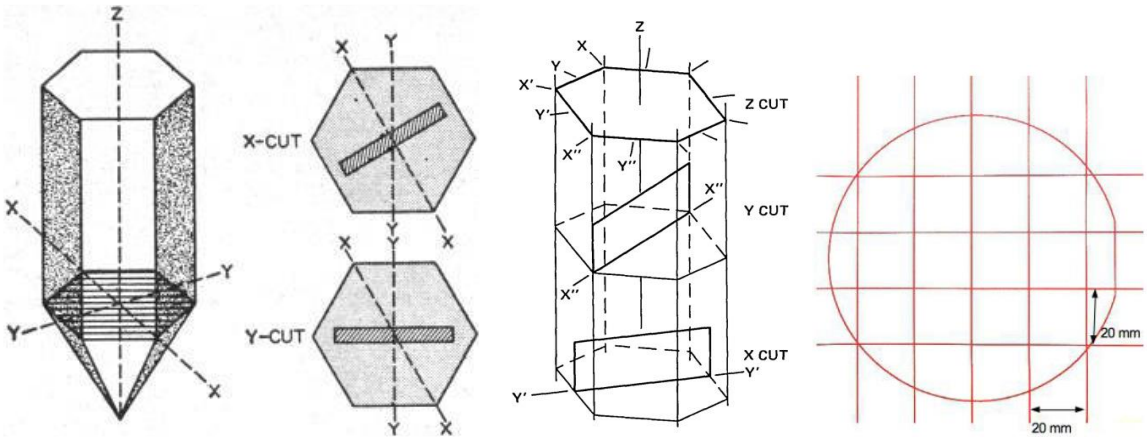


Figure 3-8 : *Illustration des diverses découpes du quartz avec les différents plans dans le cristal. J'ai à ma disposition des wafers de quartz X-cut et Z-cut. Et sur la droite un plan de découpe des échantillons sur lesquels les cylindres seront fabriqués.*

Les plans de découpe sont importants vis-à-vis de la gravure humide, à l'aide d'un acide, car la vitesse n'est pas la même selon les plans cristallins. Le procédé est développé pour le quartz car il est transparent (indice de réfraction compris entre 1.445 et 1.553) ce qui limite la perte du signal lors des expériences de piégeage. De plus c'est un matériau biréfringent, la polarisation du laser conditionnera donc la position de la particule en rotation selon l'axe du piège. Pour finir il est non invasif : il ne perturbe pas le fonctionnement d'une cellule par exemple, ce qui est primordial si on veut faire des images d'objets biologiques.

Comme je l'ai expliqué plus haut, une particule cylindrique peut avoir plusieurs états stables dans le piège optique. Selon les dimensions du cylindre fabriqué il peut se piéger horizontalement, verticalement ou en biais selon les résultats de l'étude menée par Cao *et al.* sur le sujet [12].

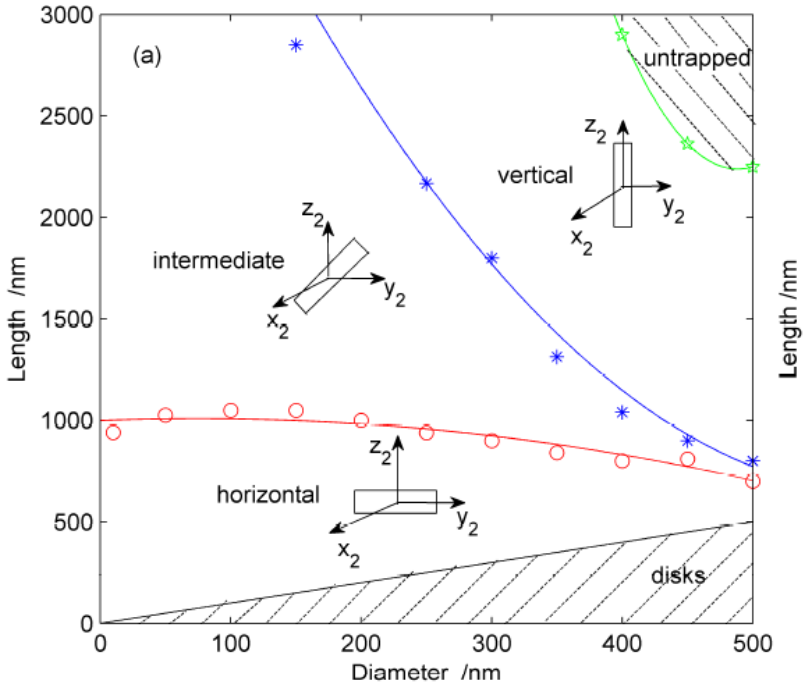


Figure 3-9 : *zone d'orientation de micro-cylindres dans un piège optique selon les dimensions de la particule. Pour notre application, les particules fabriquées doivent être orientées verticalement dans le piège (dans l'axe de propagation du faisceau). En extrapolant ce graphique pour des dimensions plus*

grande, nos cylindres se situent dans la zone de piège vertical (diamètre de 1µm et hauteur de 2 µm). Ces résultats sont issus de la publication de Cao et al [12].

La **Figure 3-9** résume les diverses possibilités d'orientation selon les dimensions de l'objet et donne une sorte de diagramme de phase de la piégeabilité d'une particule cylindrique en fonction de ses dimensions. Au vu des dimensions des cylindres dans l'étude, nous nous sommes permis de faire une extrapolation pour des cylindres plus grands. L'utilisation de particules plus grandes dans le piège est un bonne option car, une fois piégées, les cylindres prennent tout le volume disponible dans le faisceau laser ce qui permet de limiter les perturbations des signaux dus aux mouvements Browniens de la particule dans le piège. Les dimensions visées sont résumées sur la **Figure 3-10**. L'objectif est de fabriquer deux types de microparticules : des cylindres avec une pointe sur une extrémité et des cônes.

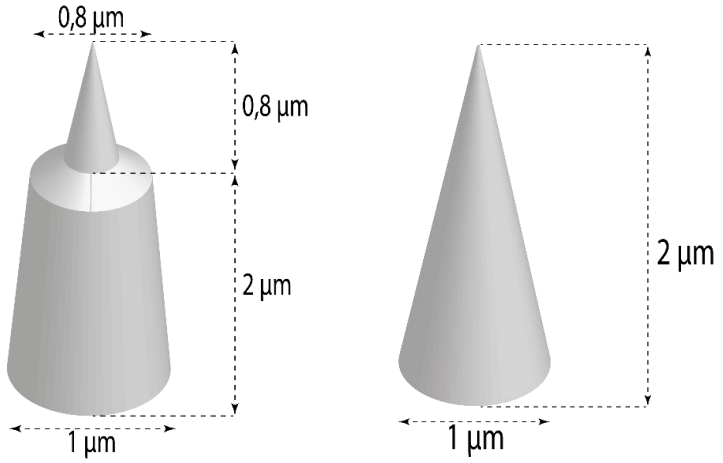


Figure 3-10 : *Dimensions visées pour les microparticules fabriquées pour de la microscopie à force photonique.*

La technique couramment utilisée pour obtenir des pointes par micro usinage consiste à partir d'un masque de gravure de forme cylindrique et d'attaquer le matériau sur lequel est déposé ce dernier par une gravure isotrope. Il est possible d'obtenir ce caractère isotrope de la gravure soit à partir d'un procédé plasma, à sec, soit par voie liquide avec un bain d'acide par exemple.

La gravure au plasma a l'avantage d'un meilleur contrôle du temps de gravure mais également d'être moins sujette aux contraintes mécaniques de l'agitation du liquide et des forces de capillarité pendant le séchage. Au niveau des inconvénients, nous avons les aspects thermiques puisque l'application du plasma chauffe les structures et une faible sélectivité de la gravure entre le matériau à graver, le masque dur et la résine. La **Figure 3-11** ci-dessous montre un exemple de production de pointes en silicium monocristallin à partir d'une gravure ionique réactive au gaz SF_6. On remarque que la pointe se forme par l'effet de la gravure dans toutes les directions du plasma. On peut noter au passage la réduction du disque de résine par la faible sélectivité de la gravure SF_6/O2 vis-à-vis de la résine, d'où l'intérêt d'utiliser un masque dur. La complexité de l'opération, réside dans la détermination du temps de gravure qui doit être suffisant pour ne pas produire une pointe à tête plate (**Figure 3-11**) mais pas trop longue sous peine de lisser la pointe une fois le masque dur décollé (**Figure 3-11**). Enfin nous pouvons noter également que la gravure ionique réactive peut également produire un état de surface avec une certaine rugosité, ce qui peut être gênant dans une application comme la nôtre, notamment pour la diffusion de la lumière du laser de piégeage. Notons, enfin qu'une dernière technique possible est d'affiner les pointes par oxydation et gravure sélective de l'oxyde. Évidemment cette technique nécessite des matériaux oxydables, ce qui n'est pas le cas du Quartz.

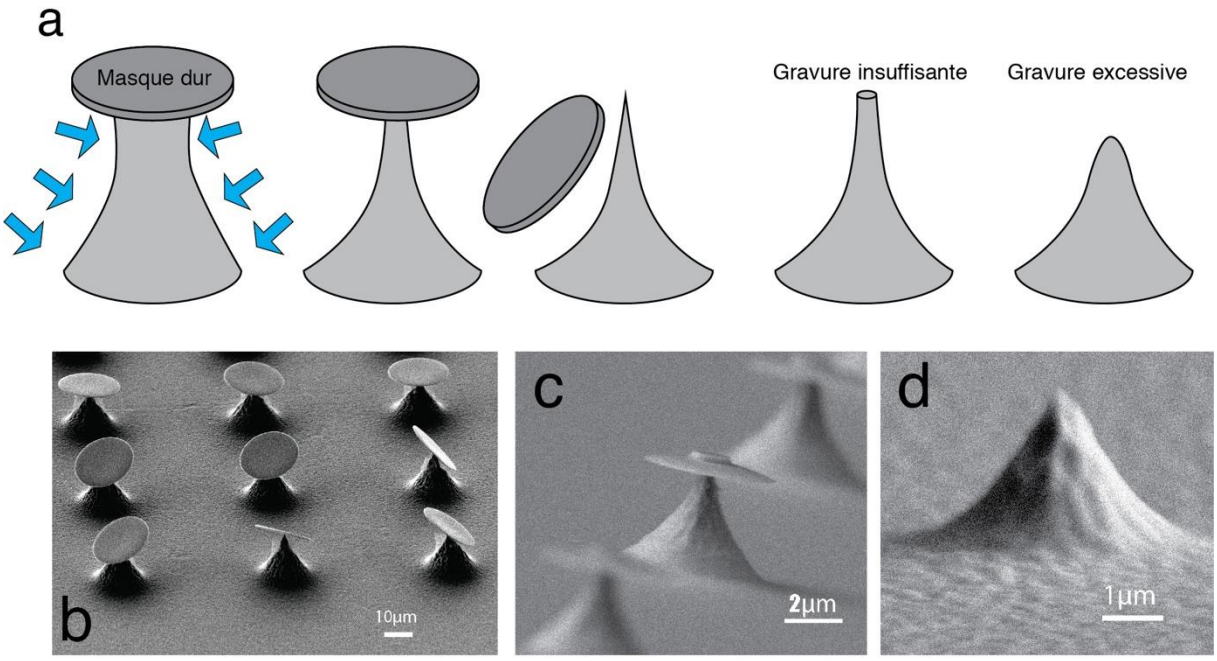


Figure 3-11 : *a. Principe du procédé de microfabrication par gravure au plasma pour l'obtention de pointes. Le caractère isotrope de la gravure au plasma est mis à profit pour obtenir des pointes sous un disque. (Images B.Charlot, LIMMS CNRS Univ. Tokyo). b. images au microscope électronique à balayage de pointes en silicium monocristallin obtenues par attaque au plasma SF6 sous un masque dur en SiO2. c. Pointe non suffisamment gravée et d. pointe excessivement gravée.*

La seconde technique utilisable pour obtenir des pointes est d'avoir recours à une gravure par voie humide, dans un bain d'acide. Cette solution offre une meilleure sélectivité, basée uniquement sur la chimie des réactions, mais un temps de gravure qu'il est plus compliqué de contrôler précisément puisque les cinétiques de gravure sont souvent sensibles à la température mais également aux conditions d'agitation du bain ou à la dénaturation de la solution d'attaque.

- **Gravure du quartz par plasma**

Cahier des charges : Une particule cylindrique aux bonnes dimensions pour une bonne stabilité dans le piège avec une pointe sur un des plans.

Pour parvenir au cahier des charges, nous allons combiner diverses recettes de gravure, isotrope et anisotrope, dans le but d'obtenir des cylindres pointus en se basant sur le procédé de fabrication des cylindres [4]. La première étape de gravure plasma doit être isotrope dans le but d'amincir la partie située sous le masque dur en chrome (comme sur la **Figure 3-12** à l'étape C). L'amincissement doit être à la limite de la rupture afin d'avoir une pointe affûtée au maximum sans pour autant se détruire en vue de l'étape de gravure anisotrope qui suit pour former le cylindre. Ces premiers tests de gravure sont faits sur du quartz X-cut.

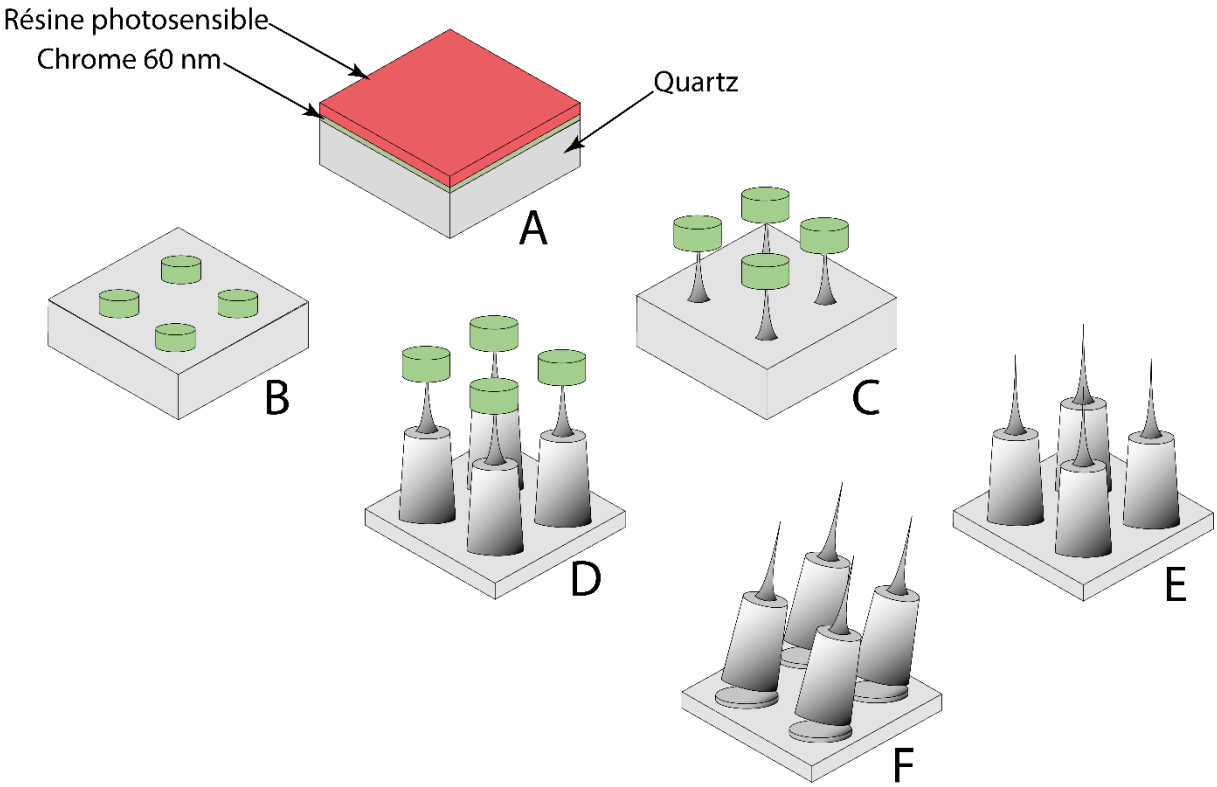


Figure 3-12 : *Procédé de fabrication de pointe idéal. Ce procédé n'est pas encore achevé. (A) déposition de Chrome par canon à électron et dépôt de résine AZ MIR 701, (B) Lithographie interférentielle et gravure du Cr par sputtering argon. Ces deux premières étapes sont identiques au procédé de fabrication des cylindres [4]. (C) Gravure plasma SF6 (recette à déterminer) pour former la pointe suivie d'une gravure plasma CHF_3 pour former le cylindre (D). Enfin on enlève le chrome et on rase les particules pour les mettre en solution (E) et (F).*

Grâce au réacteur ICP-RIE la gravure anisotrope (étape (D) sur la **Figure 3-12**) est bien maîtrisée et l'obtention de cylindre est assez simple. En revanche faire une gravure isotrope dans le quartz qui permet de graver sous le masque dur en chrome s'est avéré beaucoup plus complexe. Le plasma utilisé pour faire ce type de gravure est généralement le plasma SF_6, l'isotropie de la gravure dépend de plusieurs paramètres tels que les puissances RF et LF ainsi que la pression de travail. Les gravures isotropes sont obtenues à haute pression (60 et 140 mTorr) avec une puissance RF de 140 W dans les deux recettes utilisées pour générer les profils de gravure sur la **Figure 3-13** selon la publication de Legtenberg *et al.* [13]. Leurs recettes sont testées sur du silicium et les résultats sont visibles sur l'image de la **Figure 3-13**. Les profils de gravure sur le quartz devraient être équivalents étant donné la composition de celui-ci (quartz : SiO_2).

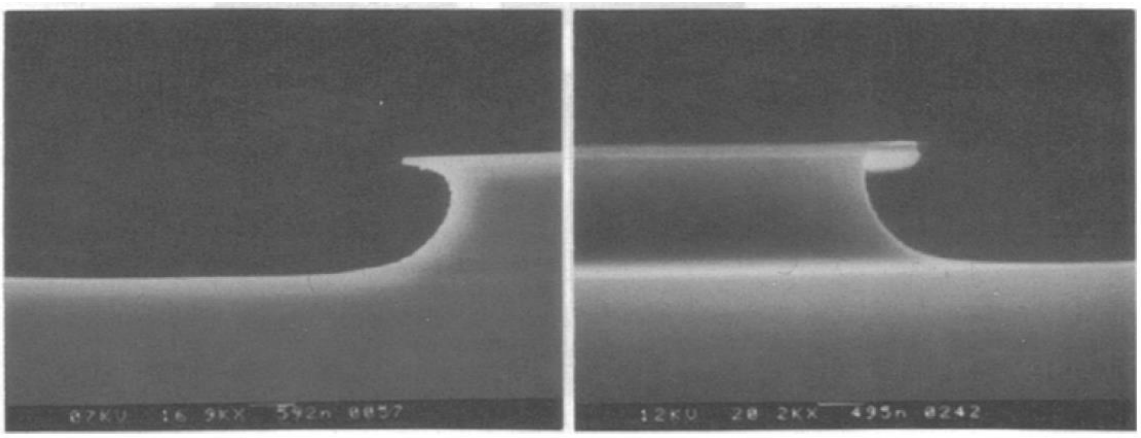


Figure 3-13 : *Photos issues de l'article de Legtenberg et al* [13]*. Ce sont des profils de gravure ICP RIE avec un plasma à base de SF6 et CHF3. Les deux recettes sont différentes : puissance identique de 140 W et pressions de travail différentes : 60 mTorr pour la photo de gauche et 140 mTorr pour celle de droite. On voit bien la sur-gravure du Si dans les deux cas. Ces profils sont les gravures que je cherche à obtenir pour créer la pointe du cylindre.*

Un plasma ne peut être généré seulement si le gaz absorbe assez de puissance. Maintenir un plasma SF_6 est plutôt difficile car la recette est très sensible aux changements de puissance et de pression, un petit changement (de quelques Watts) peut augmenter brutalement la puissance réfléchie entraînant la perte du plasma. Deux recettes SF_6 ont été testées, la première (disponible dans l'annexe **Tableau 6-3**) nous a permis d'obtenir des cylindres bien droits comme on le voit sur les photos de la **Figure 3-14**. Aucune sous gravure n'est observée, mais le plasma issu de la combinaison de plusieurs gaz est stable. Il est important de noter que la gravure génère une surface rugueuse (comme observé aussi sur le silicium sur la **Figure 3-11**) qui peut poser problème lors du rasage des particules.

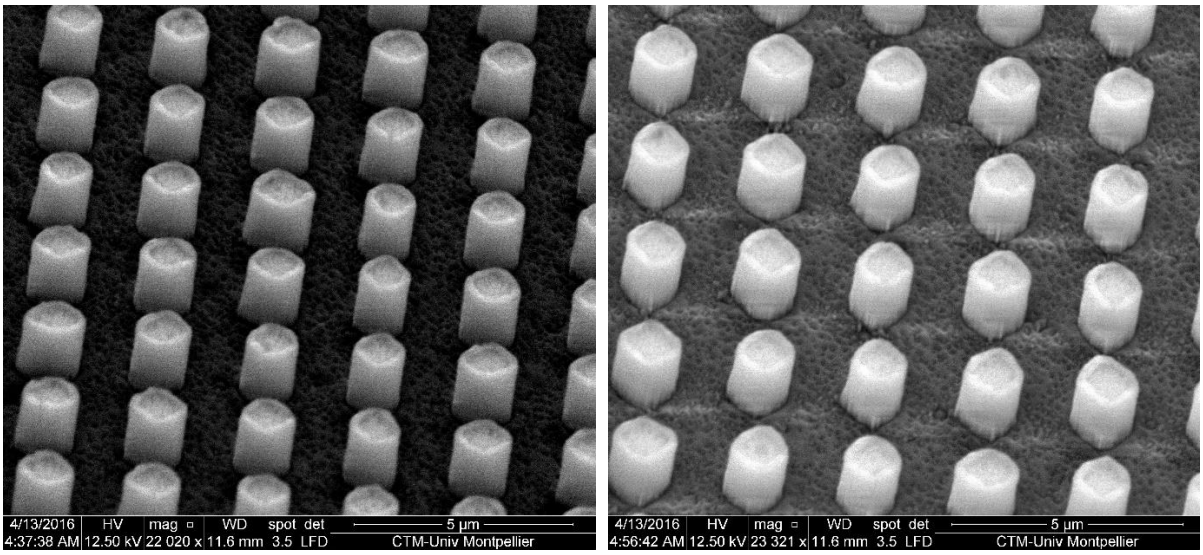


Figure 3-14: *Photos MEB de cylindres gravés par une combinaison de plasma Ar/SF_6/CHF_3. Ici la puissance utilisée est de 120 W pour la RF et 400 W de LF à une pression de 10 mTorr.*

Ensuite, j'ai testé une recette différente avec une pression plus élevée (25 mTorr) en gardant les autres paramètres identiques (recette donnée en ANNEXES). Le résultat de cette gravure est illustré sur la photo de la **Figure 3-15**. Aucune sous-gravure n'est observée. On peut noter un début de gravure isotropique mais insuffisant : le problème vient de la pression de travail. Dans la publication les

pressions utilisées sont beaucoup plus élevées, mais avec le réacteur RIE à ma disposition il est impossible de monter au-delà de 30 mTorr.

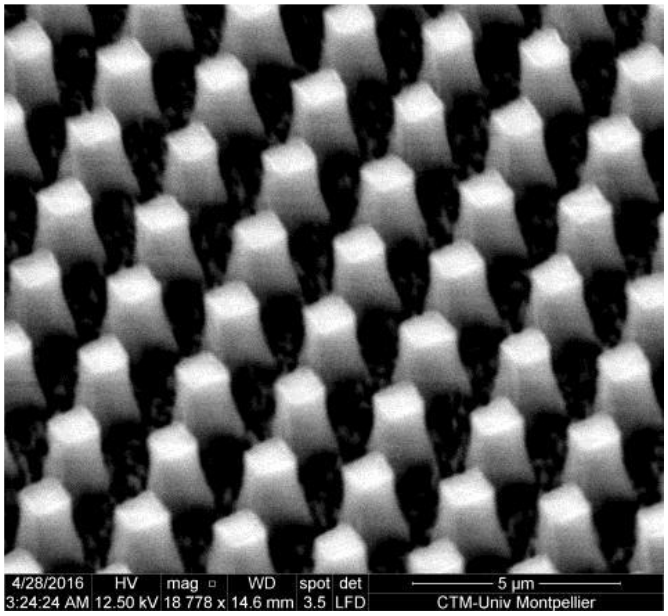


Figure 3-15 : *Photos MEB de cylindres gravés par une combinaison de plasma Ar/SF_6/CHF_3. Ici la puissance utilisée est de 120 W pour la RF et 400 W de LF à une pression de 25 mTorr. On peut voir qu'il y a peu d'isotropie de la gravure, on a seulement un angle qui se forme à la base des cylindres.*

Le profil généré par la première recette de gravure **Figure 3-14** est intéressant au vu des flancs très droits obtenus. Même si aucune isotropie n'a été constaté, les cylindres fabriqués sont réussis et peuvent être utilisés pour des expériences futures, notamment pour les essais de gravure humide. Le seul problème vient de l'état de surface suite à la gravure par plasma SF_6. Celui-ci abîme fortement les échantillons et détruit partiellement le masque dur en chrome de 60 nm, faire des cylindres plus grands nécessite une couche plus épaisse (une centaine de nanomètre environ) qui est beaucoup plus longue à graver par plasma Ar.

Finalement, l'idée de faire les pointes en quartz directement avec une gravure plasma n'est pas si simple. Une recherche plus approfondie sur les plasmas à base de SF6 est nécessaire mais sort du sujet de base. Dès lors, je me suis focalisé sur l'étude de la gravure du quartz par voie chimique pour réaliser les cylindres pointus et micro-pointes.

- **Gravure du quartz par voie chimique**

Le quartz cristallin, de formule chimique SiO_2 n'est pas un matériau facile à graver chimiquement. Il possède une grande résistance et il ne peut être gravé qu'avec de l'acide Fluorhydrique (HF). Les réactions se produisant sont des neutralisations acide base suivantes :

$SiO_2 + 4\ HF \rightarrow SiF_4 + 2\ H_2O$

$SiO_2 + 6\ HF \rightarrow H_2SiF_6 + 2\ H_2O$

Mais les cinétiques de gravure vont largement dépendre de l'arrangement cristallin du matériau, c'est-à-dire que la vitesse de gravure ne sera pas la même si l'on est en présence de Quartz (cristal), ou de silice cristalline ou amorphe.

Le HF est un acide très dangereux avec lequel il faut prendre beaucoup de précautions : le travail de gravure s'effectue sous une hotte dédiée. L'utilisateur s'équipe en conséquence : une seconde paire

de gants plus épaisse, un tablier et un masque protégeant entièrement le visage. Généralement, l'acide Fluorhydrique est utilisé pour enlever les couches d'oxyde natif du silicium ou encore pour la gravure du verre. Il réagit avec les oxydes ce qui en fait un acteur de choix pour la gravure du quartz. Typiquement pour de la silice (SiO_2 sans arrangement cristallin) la vitesse de gravure dans l'acide fluorhydrique est de 130 nm/min [14], seulement nous disposons d'un quartz monocristallin dont la vitesse de gravure n'est pas répertoriée, de plus la gravure n'est pas isotrope mais anisotrope. On va donc graver préférentiellement selon certains plans cristallins. Deux types de quartz monocristallin sont à disposition : le quartz X-cut et le Z-cut (voir les axes de découpes sur le schéma de la **Figure 3-8**).

Les premiers tests de gravure ont été faits sur le quartz X-cut avec une concentration de HF de 5%. D'après une publication [15] la gravure du quartz cristallin est très lente, j'ai laissé mon échantillon prés de 1h10 dans l'acide pour obtenir les premières pointes nous donnant une vitesse de gravure d'environ 16 nm/min. Par la suite j'ai testé une concentration d'acide de 10 % (plus forte) qui permet une gravure plus rapide. On procède par bains successifs dans de l'acide fluorhydrique 10 %, suivis d'une vérification au MEB. Le contrôle de la gravure s'avère très difficile, passé un certain point le masque dur en chrome se détache. C'est ce moment précis que je cherche à cibler pour avoir des pointes parfaites. Le principal problème est que lorsque ce point critique est dépassé je grave sur toute la surface et donc je perds les pointes (voir **Figure 3-16**), d'autre part les temps de gravure varient très fortement d'un échantillon à l'autre. Il est donc primordial de ne pas faire des bains trop longs et de vérifier après chaque bain la gravure. C'est un procédé très dépendant de l'utilisateur mais il reste reproductible si toutes les étapes de vérifications sont correctement effectuées. Le procédé de fabrication final est présenté sur la **Figure 3-17**.

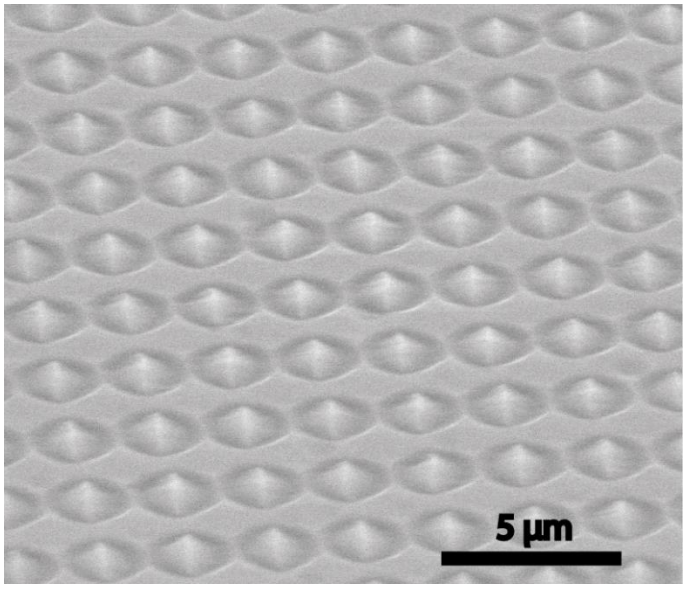


Figure 3-16 : *Échantillon de quartz sur-gravé, toutes les pointes ont été dissoutes par l'HF.*

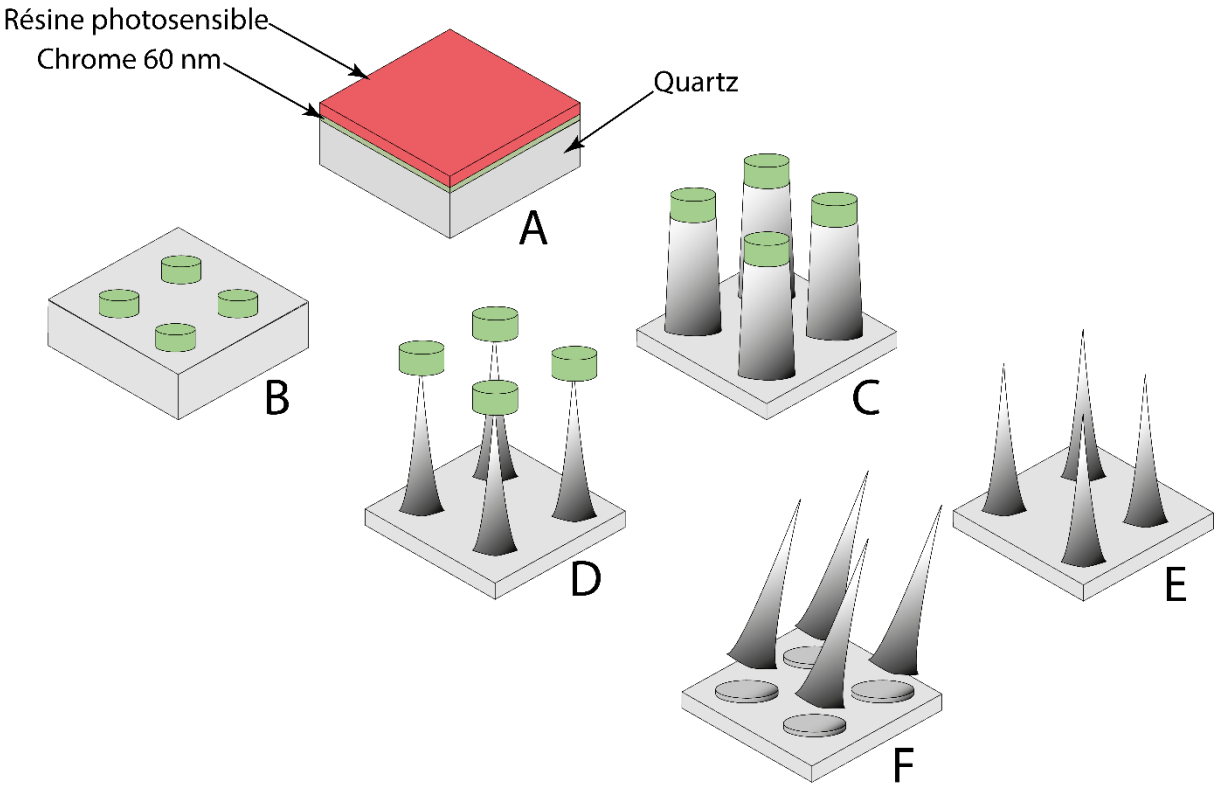


Figure 3-17 : *Procédé de fabrication des micro-cônes en quartz X-cut (ou Z-cut). (A) Dépôt de Cr (60 nm) et spincoating de la résine (AZ MIR 701) sur un échantillon de quartz. (B) Lithographie interférentielle puis gravure du Cr au plasma Ar. (C) gravure du quartz au plasma Ar/CHF_3. (D) Gravure du quartz à l'acide Fluorhydrique pour former les cônes (environ 10 min pour une solution concentrée à 10 % et 1h15 pour une concentration de 5 %). La gravure humide est terminée lorsque le masque dur en Cr s'en va. (E) gravure des résidus de Cr par voie humide et (F) rasage des cônes…*

Pendant ces premiers tests il s'est avéré que la gravure du quartz X-cut ne produit pas des cônes comme supposé au préalable. La gravure est anisotrope ce qui génère un profil particulier : les microparticules produites ressemblent plus à des arrêtes comme on le voit sur la photo (B) de la **Figure 3-18**. Selon l'angle d'observation, on peut penser que la gravure a produit des cônes très pointus comme sur les photos (A) et (B) de la **Figure 3-18** seulement lorsqu'on tourne l'échantillon de 90° les particules apparaissent plus plates et moins pointues. C'est un problème pour l'obtention d'images assistées par pince optique. Les pointes n'étant pas symétriques la résolution ne sera pas optimale et selon la direction de balayage il est possible de générer des artefacts sur l'image finale (astigmatisme). Ces pointes ont été utilisées pour quelques expériences préliminaires de balayage de surface. Les résultats sont présentés plus bas dans la partie sur les premiers tests de scan.

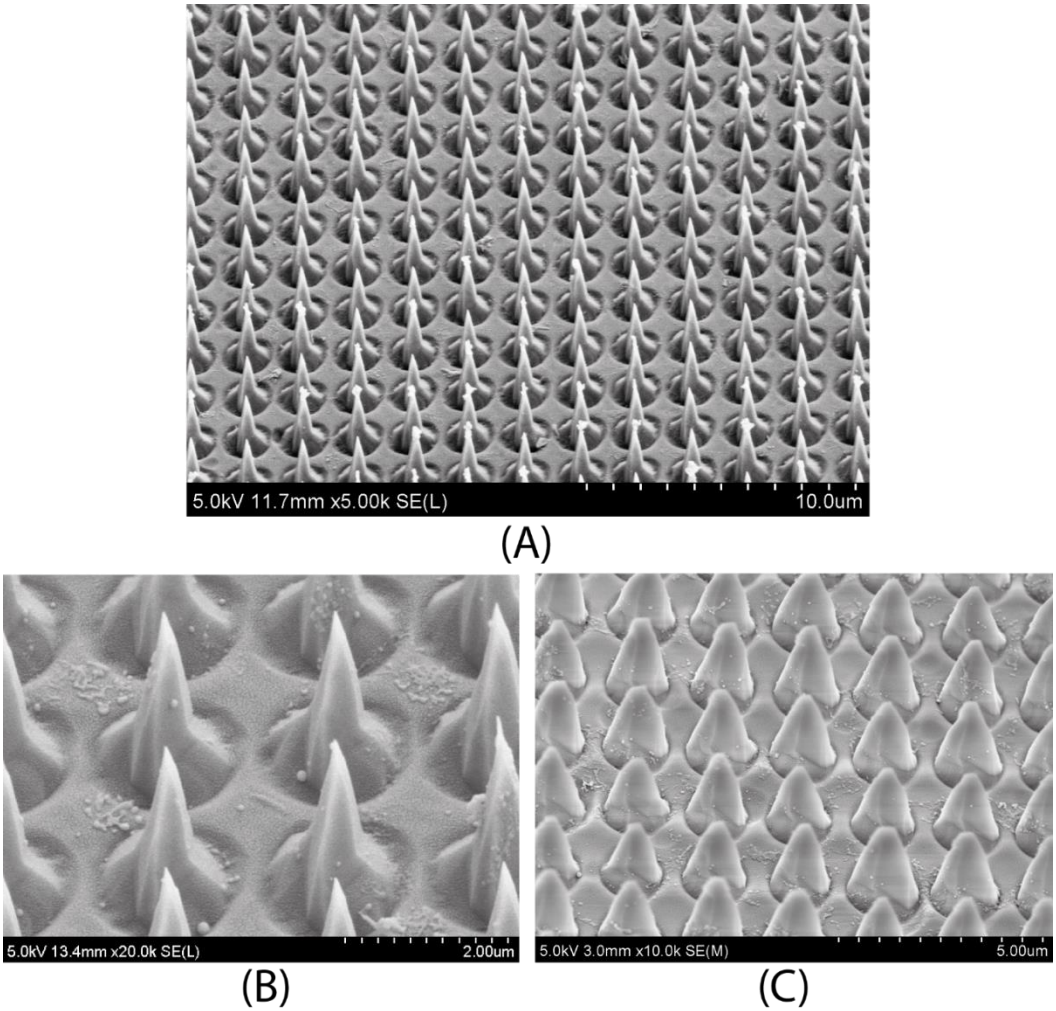


Figure 3-18 : *Photos MEB de nano-cônes fabriqués en sale blanche avec le procédé de fabrication décrit en* ***Figure 3-17****. La photo (A) est prise avec un angle de 45° et la photo (B) est un zoom de la première photo. La photo (C) présente le même échantillon mais tourné de 90°. La gravure n'est pas isotrope ce qui donne ces profils de pointes/arrêtes. Ces photos MEB ont été prises dans un service de microscopie MET-MEB à l'IMPC (Institut des Matériaux de Paris Centre) par David Montero.*

- **Changement d'orientation cristalline du substrat Quartz**

En s'appuyant sur la forme de la maille cristalline du quartz et la découpe X-cut (Sur la **Figure 3-8**) on peut supposer que la forme finale de la particule sera une arrête au vu de l'axe de découpe. En revanche, en utilisant le quartz Z-cut, qui est une découpe dans l'axe horizontal de la maille cristalline, on peut espérer avoir une pointe qui se forme naturellement lors de la gravure à l'acide. Dans la publication de Rangsten [16] une étude de la gravure du quartz Z-cut est effectuée et montre la possibilité de former une pyramide grâce à la gravure anisotrope.

Nous avons utilisé un procédé de microfabrication analogue à celui présenté sur la **Figure 3-17**. Ici le masque dur en Chrome est retiré avant la gravure HF pour générer une pointe directement à la gravure chimique. J'ai essayé de produire des cônes avec une pointe symétrique. Les recettes de gravure à l'acide sont les mêmes que citées plus haut. Les photos de la **Figure 3-19** présentent le profil de gravure sur du quartz Z-cut. On voit que certaines pointes se sont formées naturellement lors de la gravure mais pour la plupart des autres cylindres aucune pointe n'est visible. De plus au vu de l'état de surface obtenue, l'étape de clivage des particules ne sera pas optimale et générera beaucoup de poussières

de quartz qui se retrouveront dans la solution. Ces particules ne présentant aucune pointe n'ont pas été testées dans le piège optique.

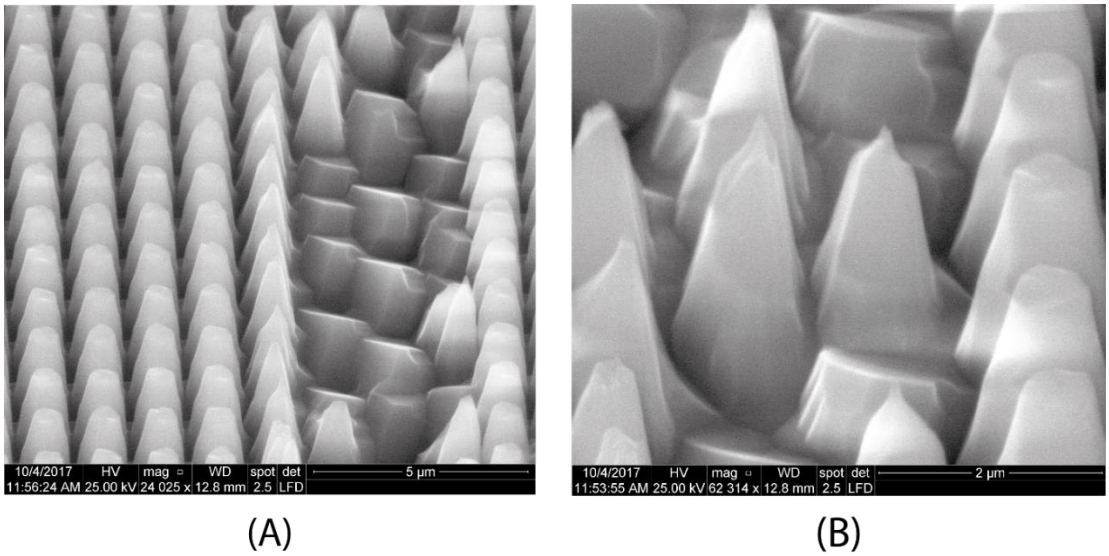


Figure 3-19 :*Photos MEB de particules obtenues avec le procédé de fabrication de la* ***Figure 3-17****. Le quartz utilisé est du quartz Z-cut. On voit sur certaines particules une pointe qui s'est formée naturellement à la gravure. Ici la gravure à l'acide Fluorhydrique a duré 140 minutes.*

Pour conclure, la gravure sur quartz massif (X-cut ou Z-cut) ne permet pas d'obtenir des pointes de qualité et ces pointes ne permettront pas d'obtenir de belles images. Une étude plus approfondie de la gravure anisotrope du quartz (des deux types de découpes) est nécessaire pour bien appréhender et contrôler les profils finaux des particules. Au vu du temps que cela pouvait prendre je n'ai pas fait cette étude et j'ai préféré trouver une alternative pour la fabrication de pointes.

- **L'ajout de la couche de SiO_2 amorphe**

L'autre alternative était de faire un dépôt d'oxyde de silicium (SiO_2) amorphe au-dessus du quartz pour faire nos pointes. L'idée générale est d'avoir un corps cylindrique en quartz massif et une pointe sur une extrémité en SiO_2 comme sur le schéma de la **Figure 3-10**. Le dépôt est réalisé par PE-CVD, dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma, avec un réacteur Corial D250 à 280 °C. Un plasma est généré avec des gaz précurseurs : Ar, SF_6, N_2, N_2O, NH_3 puis le gaz Silane (SiH_4) est injecté dans le réacteur. Le plasma va ainsi décomposer la molécule de SiH_4 et des atomes de Si vont être transportés vers la surface de l'échantillon et s'y déposer. Suivant les mélanges de gaz présents dans la chambre et les conditions de réaction, température et pression, il est possible de déposer des oxydes et nitrures de Silicium mais également du silicium amorphe hydrogéné avec des vitesses de dépôt typiquement d'une centaine de nm/min. Le dépôt est effectué à une température de 280 °C, la recette est donnée en détails dans l'annexe.

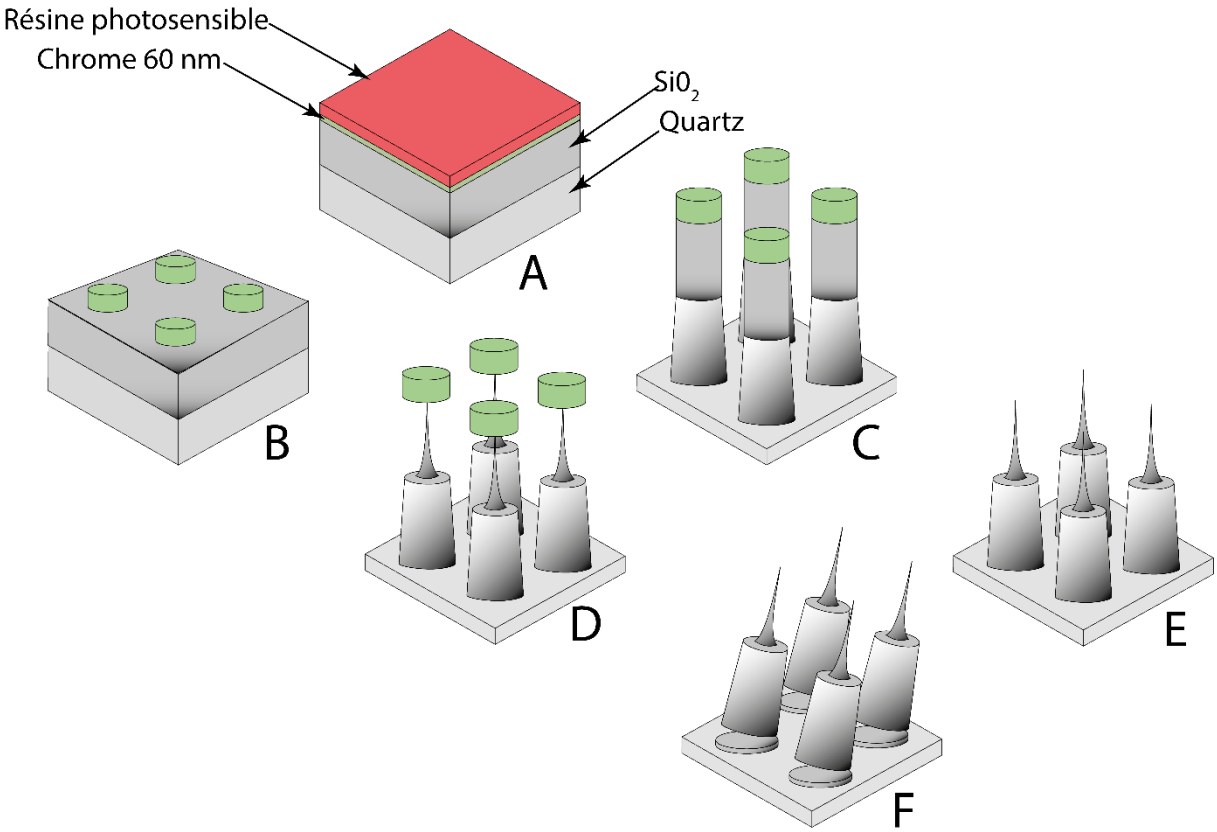
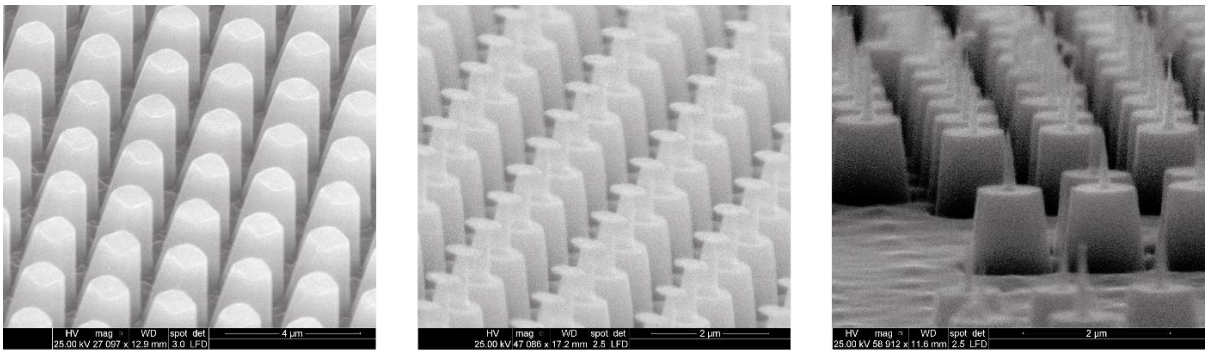


Figure 3-20 : *Procédé de fabrication des cylindres taillés en pointe, la partie cylindrique est faite de quartz cristallin X-cut et la pointe est faite d'oxyde de silicium amorphe. (A) dépôt de la couche de SiO_2 par PE-CVD et dépôt de chrome au canon à électron. (B) Lithographie interférentielle et gravure du chrome par RIE (plasma Ar), (C) gravure des cylindres par plasma $Ar/CHF_3/SF_6$ ou $Ar/O_2/CHF_3$ sur 3 µm (1 µm de SiO_2 et 2 µm de quartz). (D) formation des pointes par gravure à l'acide Fluorhydrique pendant 3 min (plusieurs bains successifs de 20 secondes) puis gravure du chrome résiduel et clivage des particules (E) et (F).*

Je dépose une couche de 1 µm d'oxyde avant de faire le dépôt métallique de chrome comme on le voit sur l'étape (A) de la **Figure 3-20** . La suite est basée sur le même procédé de fabrication que pour les cylindres puis je passe à la gravure par voie humide pour affiner la partie haute (le SiO_2) du cylindre. La gravure est sélective c'est-à-dire que le SiO_2 se grave plus rapidement que le quartz dans l'acide fluorhydrique. Les vitesses de gravure sont de 240 nm/min pour le SiO_2 [14] contre 16 nm/min pour le quartz X-cut (valeur expérimentale). Pour former la pointe le masque dur en chrome joue un rôle essentiel : sans lui l'oxyde serait gravé par le dessus et je n'aurais aucune pointe à la fin. Avec le disque de Cr l'acide ne pénètre les cylindres que par les côtés, les pointes se forment donc par affinage de la partie en SiO_2 du cylindre. Cette gravure par voie chimique est un point critique dans la fabrication. Comme pour les nano-particules fabriquées précédemment (dans la partie gravure du quartz par voie chimique) il faut déterminer le temps nécessaire pour former la pointe. C'est le moment précis où le disque de chrome se détache (comme illustré sur la **Figure 3-11**). Pour ne pas rater la gravure je fais des bains successifs dans l'acide tout en prenant soin de bien vérifier entre chaque bain la gravure à l'aide du MEB. Sur cette étape l'acide est dilué à 5 % et les temps de gravure sont très courts. Les bains ne durent que 20 secondes car on a une réelle différence de vitesse de gravure entre le quartz et le SiO_2 et en dépassant de quelques secondes à peine le point de rupture du masque dur le SiO_2 disparaît. Tout au long des tests de gravure et de la fabrication des particules, aucune gravure de la partie cylindrique en quartz n'a été observée.

Les toutes premières pointes obtenues par gravure humide ont nécessité un bain de seulement 3 minutes (en additionnant tous les temps des bains successifs). Sur la **Figure 3-21** on peut voir le suivi de la gravure HF sur les cylindres, la dernière photo (C) correspond à l'étape numérotée D sur la **Figure 3-20**.



(A) (B) (C)

Figure 3-21 : *Photos MEB prise à trois stades différents de la gravure à l'acide fluorhydrique. (A) Cylindre obtenu suite à la gravure plasma (20 min), ici il n'y a pas encore eu de bain de HF. (B) Les cylindres après avoir passé 1 min 55 s dans le HF et finalement la photo (C) montre les pointes obtenues après un bain de 2 min 50 s.*

Faire un dépôt de SiO_2 pour former les pointes m'a permis d'avoir un profil de cylindre avec une pointe au bout (voir la photo (C) de la **Figure 3-21**). Cependant, certaines dimensions pour une microparticule ne permettent pas de piéger optiquement, ou avec une orientation dans le piège qui n'est pas en adéquation avec mon application. Une longueur supérieure à 2,5 µm pour la partie cylindrique (la partie pointe n'étant pas prise en compte) ne permet pas le piégeage optique. Une longueur similaire à la taille de la base du cylindre permet de piéger mais l'orientation n'est pas bonne. En effet, la particule s'oriente horizontalement (la pointe est parallèle à la propagation du faisceau) ce qui est problématique pour une application qui nécessite que la pointe soit dirigée vers le bas (dans l'axe de propagation). L'étape de gravure plasma est donc primordiale car elle conditionnera les dimensions finales des micro-pointes fabriquées et par conséquent la possibilité de piéger ou non. Les premières pointes fabriquées (Voir la **Figure 3-21**) n'ont pas les bonnes dimension. La partie cylindrique fait 1,1 µm de diamètre pour une hauteur de 1,2 µm, lors des premiers tests de piège on s'est rendu compte que la pointe était piégée horizontalement. Cela peut être intéressant pour faire du balayage sur une surface verticale mais pour le moment on se limite aux surfaces horizontales. Pour remédier à ce problème l'étape de gravure plasma doit être plus longue afin de produire des cylindres assez grands, en prenant en compte la couche de SiO_2, qui se piègent dans l'orientation souhaitée. Les dimensions idéales, pour la partie cylindrique, sont de 1 µm de largeur et 2 µm pour la hauteur. La partie qui fait office de pointe fait généralement dans les 600 nm de haut et le rayon de courbure est de 35 nm. Cette hauteur est une donnée moyenne sur les pointes fabriquées, il peut y avoir quelques variations dues à la gravure humide qui peut provoquer quelques différences au niveau du point de rupture du masque dur en chrome.

Finalement, en rallongeant l'étape de gravure plasma, les cylindres produits sont plus hauts mais s'élargissent à la base. Ceci est un artefact créé par la gravure plasma. Malgré cet élargissement de la base les cylindres obtenus (Voir la **Figure 3-22**) se piègent dans l'orientation qu'il faut, c'est-à-dire dans l'axe du faisceau laser, ce qui va nous permettre de faire du balayage de surface et de reconstruire une image de la topographie. Lors de l'étape de clivage des pointes on perd beaucoup de pointes, la pointe faite de SiO_2 est plus fragile et le rasage mécanique a tendance à les couper. Pour avoir une idée du rendement j'ai déposé sur une lamelle de microscope une goutte de la solution qui contient mes

cylindres taillés en pointes. Ensuite, j'ai fait évaporer l'eau en posant la lamelle sur une plaque chauffante. Plusieurs images MEB ont été prises et j'ai compté pour chaque image le nombre total de particules et le nombre de celles qui avaient encore la pointe. Finalement, Lorsqu'elles sont en solution il y a 26 % de cylindres avec une pointe. C'est acceptable au vu du nombre de pointes fabriquées sur un seul échantillon.

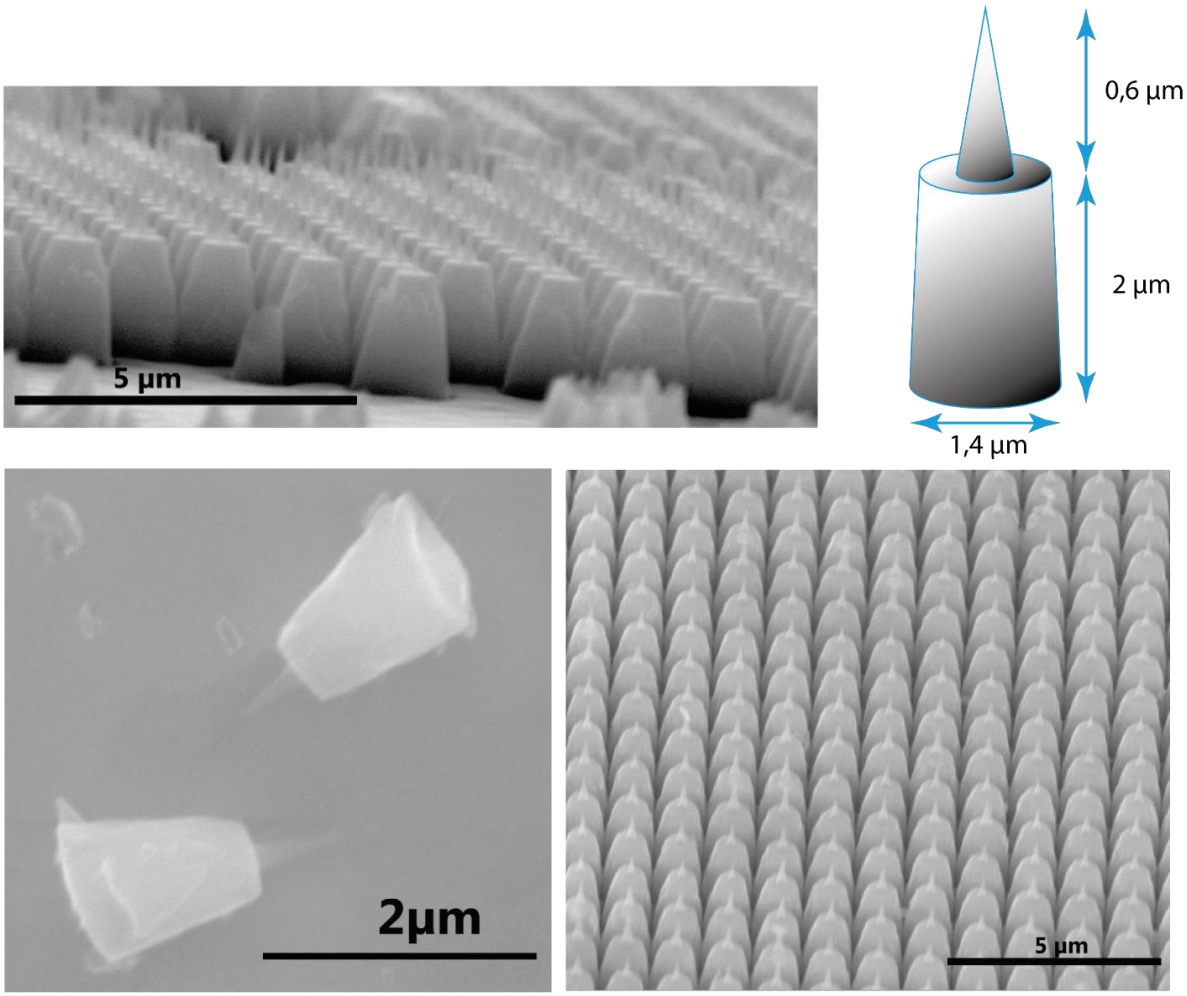


Figure 3-22 : *Photos MEB des pointes fabriquées pour les expériences de balayage de surface assisté par pinces optiques. Le pas est de 1,2 µm.*

- **Récapitulatif**

Dans cette partie, j'ai expliqué comment obtenir des pointes. Plusieurs voies ont été explorées : partir du quartz massif pour former directement des cylindres pointus ou des cônes et faire un dépôt d'oxyde par-dessus pour avoir un cylindre avec une pointe au bout. Les premiers tests de gravure isotrope sur quartz par plasma se sont avérés inefficaces et nécessitent une étude plus approfondie de la physique des plasmas à base de SF_6. Le recours à la gravure humide (par acide fluorhydrique) m'a permis d'arriver à un premier résultat concluant aux premiers abords avec la formation d'arêtes qui ont été utilisées pour des tests préliminaires de scan de surface. Pour finir c'est en faisant un dépôts d'oxyde qu'il a été possible de former des particules à la géométrie souhaitée. La sélectivité quartz/SiO_2 de la gravure à l'acide m'a permis de former des pointes quand la gravure plasma permet de faire des cylindres. La combinaison des deux m'a permis d'obtenir les particules idéales. Les dimensions

exposées dans la **Figure 3-22** permettent à la particule d'être stable dans le piège qui englobe tout le volume du piège avec la bonne orientation. Les expériences et les résultats sont exposés dans la partie suivante.

3.3. Les particules dans le piège et les premiers tests de scan

- **Premiers tests avec les arêtes comme sonde**

Pour rappel, j'ai fabriqué deux types de pointes : des cylindres avec une pointe sur une extrémité (**Figure 3-22**) et des cônes avec une arête au bout (**Figure 3-18**). Ces dernières sont les premières particules que j'ai fabriqué et qui ont été testées pour faire du balayage de surface. Sur une lamelle de microscope (24x60 mm de 1 mm d'épaisseur) on dépose des billes de 1 µm de diamètre (données constructeur), les billes sont en phase aqueuse, elles sont prélevées à l'aide d'une pipette et on dépose une goutte sur la lamelle qui est évaporée ne laissant que les billes collées sur la surface. On forme ensuite une chambre en posant par-dessus une seconde lamelle de microscope (22x22 mm de 1mm d'épaisseur). Les deux lamelles sont séparées par des bandes de parafilm. La chambre est illustrée sur la **Figure 3-23**. Le milieu dans lequel évolue les pointes est composé d'eau milli-Q et de BSA (*Bovine Serum Albumine*, Albumine de sérum bovin). L'eau milli-Q est de l'eau qui est distillée et dé-ionisée plusieurs fois, elle est caractérisée par sa résistivité (18.2 MΩ.cm à 25 °C).

L'albumine, dans la solution de BSA, est une glycoprotéine hydrosoluble (66 KDa) qui se dépose sur la surface des pointes et qui limite les problèmes d'adhésion des particules entre elles ou sur la surface de l'échantillon. Typiquement, nous utilisons une concentration en BSA de 10 mg/ml. Une fois la solution préparée nous rasons quelques pointes que l'on introduit dans la préparation à la pipette. Les solutions sont conservées à 5 °C pour limiter la contamination par des bactéries qui pourrait perturber le piège, en effet ces dernières peuvent facilement être attirées dans le piège et se coller sur la particule. La solution tampon dans laquelle les cylindres évoluent est ajustable : la concentration en BSA peut être changée selon l'échantillon étudié. Pour une surface de verre une solution tampon eau milliQ + BSA est suffisante. La BSA passive les cylindres et aucune bactérie n'est présente dans l'eau milliQ. En revanche pour des objets biologiques les tampons utilisés sont différents. Il faudra alors faire de nouvelles solutions contenant des cylindres, que nous passiverons à la BSA au préalable, qui sera compatible avec l'objet étudié.

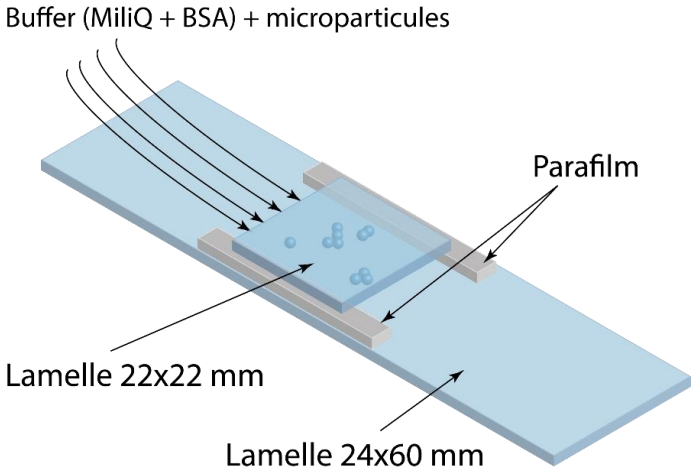


Figure 3-23 : *Schéma de la chambre qui est confectionnée pour les expériences de pinces optiques et de microscopie à force photonique. Ici on introduit les particules fabriquées dans la chambre, on a déposé des billes sur la lamelle du dessous pour avoir des structures de test pour faire du balayage de surface.*

Une fois piégées, les pointes peuvent être utilisées pour le scan de surface. Pour réaliser un scan avec le dispositif des pinces optiques, il est nécessaire d'avoir une surface très propre et un piège correctement aligné. Le scan se déroule de la façon suivante :

- Une particule est attrapée dans le piège, si la particule a un sens, nous nous assurons que sa partie pointue est dirigée vers le bas.
- Une approche en Z est effectuée pour mener la particule en contact avec le substrat.
- Le substrat est balayé par les moteurs piezoélectriques en définissant une gamme de déplacement (typiquement quelques microns) avec un chemin de balayage de type serpentin, allers et retours en x décalés en y d'un certain pas à chaque ligne.
- La topographie de la surface décale la particule par rapport au centre du piège dans les 3 dimensions.
- La position en x et y est enregistrée par le PSD (*Position Sensitivity Detector*), la position en z par le photo-détecteur.
- L'image est reconstituée.

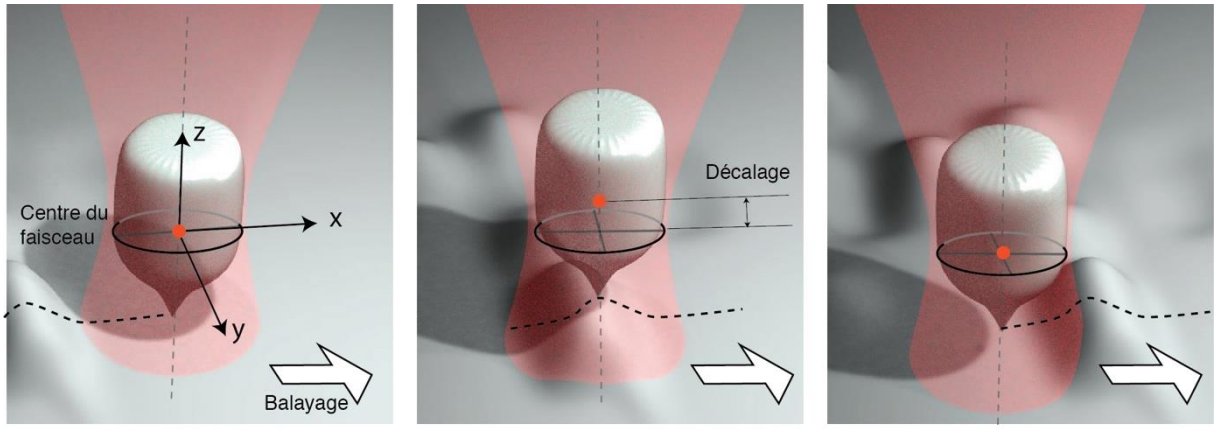


Figure 3-24 : *Schéma du principe du balayage de surface*

Le mouvement de la pointe est schématisé sur la **Figure 3-24**. L'intensité reçu sur le photo-détecteur (signal de z) est caractéristique de notre pointe. Ce signal caractéristique sera changé lorsque la pointe touchera la surface et aussi lorsqu'elle touchera une structure. C'est ce changement dans l'intensité qui nous permet de reconstruire une image topographique de la zone de scan. Cela correspond à un déplacement de la pointe, vers le haut ou le bas. Les signaux de x et y issus d'un détecteur PSD sont aussi interprétés pour reconstruire des images non pas de topographie mais d'écart de la pointe par rapport à sa position d'équilibre dans le piège. Le balayage de surface s'effectue par le biais de la plateforme en imprimant un mouvement en forme de serpentin.

Les tout premiers scans effectués sur des billes sont sur la **Figure 3-25** qui présente une comparaison entre deux scans de la même surface avec une bille de 1 µm comme sonde (**Figure 3-25** (A)) et puis un cône/arête (**Figure 3-25** (B)). On remarque que sur l'image obtenue avec une bille comme sonde on a une ligne d'arête quasi continue sur le dessus des quatre billes scannées alors qu'avec l'utilisation d'une arête cette ligne n'est plus continue. On a réussi à sonder l'espace interstitiel entre deux billes successives grâce à notre pseudo pointe alors qu'une bille du même diamètre que celles scannées ne peut pas résoudre la topographie à cause de sa géométrie. Cependant sur l'image issue d'une arête on peut remarquer que la partie sommitale de chaque bille est décalée vers la droite et que l'on peut observer une sorte « d'ombre » sur toute la surface de la fenêtre de balayage. Ces artefacts sont sûrement dus la convolution du relief par la forme de notre particule, qui n'est pas une pointe.

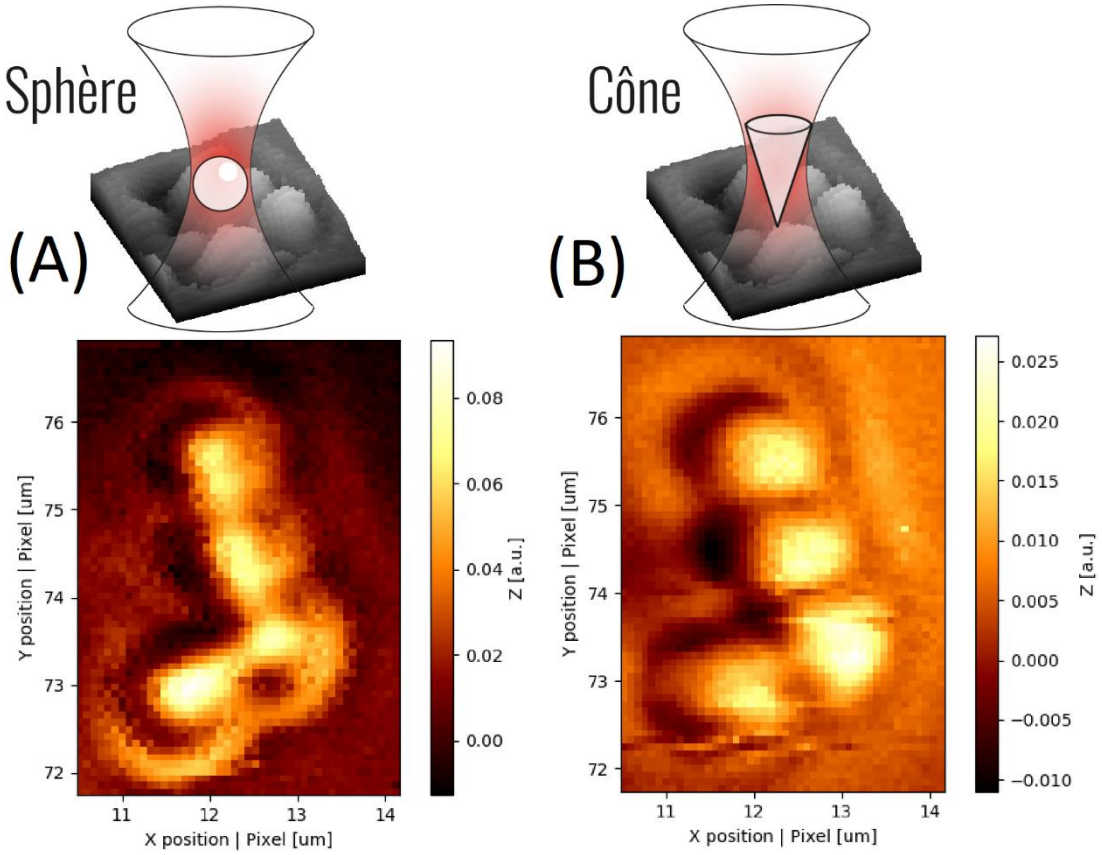


Figure 3-25 : *Premiers tests de balayage de surface à l'aide (A) d'une bille dans le piège et (B) d'un cône/arête dans le piège. On a déposé sur la surface d'une lamelle de microscope des billes de 1 µm de diamètre (données du constructeur) et fait deux images de ces billes avec le microscope à force photonique. Ces images ne sont pas calibrées : la barre de l'échelle en z est donnée en unité arbitraire et ne reflète pas les hauteurs réelles. Ces premiers scans ont été réalisés Z. Santybayeva.*

Ces premiers résultats sont encourageants pour la suite. En effet, ils montrent que l'utilisation d'une particule dédiée pour le balayage de surface permet d'améliorer la résolution du microscope. La prochaine étape est donc l'utilisation de réelles pointes sur des structures de référence dont on connaît la topographie pour pouvoir avoir une comparaison. Les pointes avec le profil cylindrique et la protrusion au bout semblent toutes indiquées pour ces expériences.

- **Les cylindres avec une pointe à l'extrémité dans le piège**

Lorsqu'un cylindre est piégé, le signal reçu par le photo détecteur est caractéristique de la particule. L'intensité brute est typique d'un mouvement brownien dans un espace confiné. Comme je l'ai dit dans la partie 2 sur les pinces optiques, le piège représente un volume dans l'espace et la particule est confinée dans cet espace. En effectuant une transformée de Fourrier sur ce signal et en le traçant sur une échelle logarithmique on se retrouve avec une Lorentzienne caractérisée par une amplitude et une fréquence de coude, un exemple du signal d'un cylindre piégé est donné sur la **Figure 3-26**. Les données brutes sont tracées en gris et un fit de la courbe est donné en rouge afin de faire ressortir les données importantes (fréquence de coupure et amplitude). La ligne verticale en pointillé est placée à la fréquence de coupure.

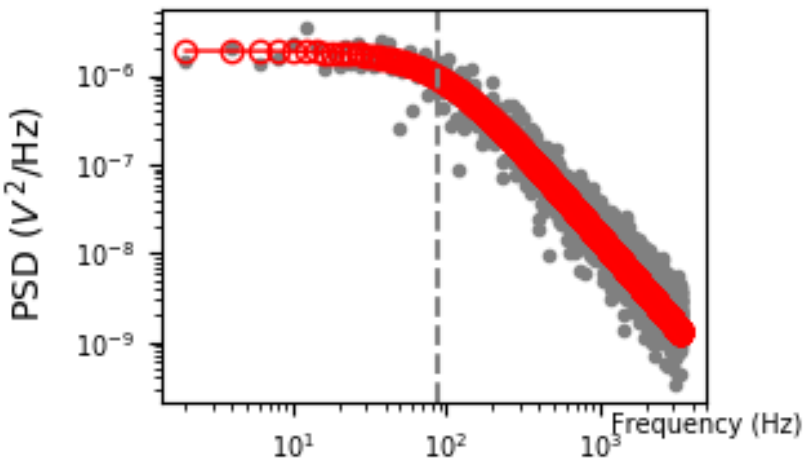


Figure 3-26 : *Signal caractéristique d'un cylindre piégé.*

Avant de se lancer dans le scan avec des cylindres piégés en guise de pointe il convient de faire quelques étalonnages. En effet, lors des premiers tests de piège des cylindres avec pointe nous nous sommes rendu compte que la présence de la pointe n'avait pas ou très peu d'influences sur l'orientation de la particule dans le piège. La particule peut alors être piégée pointe vers le haut ou vers le bas avec la même probabilité.

- **Détermination du sens de la pointe**

Lors du piégeage, seul le corps de la particule, la partie cylindrique, rentre en compte. Deux états stables sont accessibles quand on piège le cylindre : soit la pointe est orientée vers le haut soit vers le bas. Mais ces deux positions fournissent des signaux sur le photodétecteur, caractérisant la position dans l'axe du faisceau (z), qui sont différents et caractéristiques. La première calibration à effectuer vise donc à différencier ces deux états. La pointe n'a pas d'état préférentiel parmi les deux positions. Elle peut se piéger aussi bien dans un sens que dans l'autre. En éteignant le laser on relâche la particule et en le rallumant quelques secondes après il est possible de la récupérer dans le piège. Les mouvements browniens subis par la particule, lorsque le piège est éteint, permettent quelquefois d'opérer une rotation de la particule sur elle-même et ainsi de la retourner.

La **Figure 3-27** montre une courbe d'indentation d'une particule piégée dans deux sens différents. Deux signaux distinct sont discernables, en rouge et en bleu sur la courbe. Afin de déterminer le sens de la particule dans le piège pour chaque signal il convient de faire une courbe d'approche-retrait (d'indentation) sur une surface dure. La plateforme piézoelectrique effectue un mouvement rectiligne dirigé vers le haut (dans l'axe du faisceau) afin de toucher la particule piégée et de la déplacer hors de sa position d'équilibre d'une centaine de nanomètres (800 nm) puis la plateforme revient sur sa position initiale. C'est en faisant cette manipulation que nous obtenons les signaux de la **Figure 3-27** issus du photodétecteur. Lors de la phase d'approche les signaux restent constants, lorsque nous touchons la surface de la lamelle les signaux augmentent linéairement sur 600 nm après le point de contact puis s'atténuent lorsque la particule n'est plus dans le potentiel harmonique du piège. Grâce à cette calibration nous sommes en mesure de déterminer le point de contact de la particule piégée avec la surface. Nous remarquons aussi que ce point de contact est différent selon l'orientation de la pointe dans le piège. Pour le signal d'intensité plus grande (le rouge) le contact avec le verre apparaît plus tôt dans le déplacement de la plateforme. Nous pouvons donc en conclure que le cylindre est

piégé avec la pointe orientée vers le bas car celle-ci, ne rentrant pas ou peu en compte pour la position d'équilibre dans le piège, touche la surface avant.

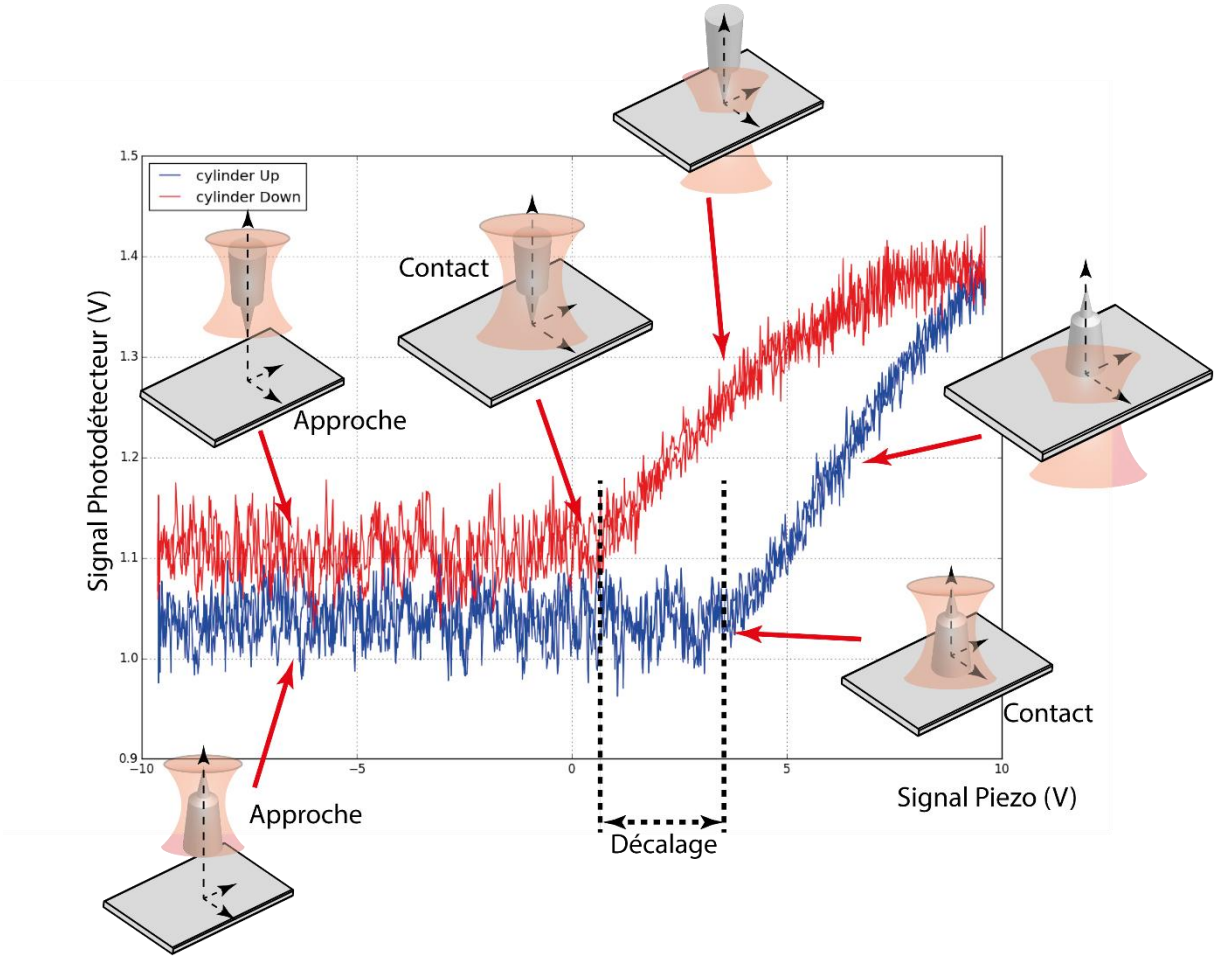


***Figure 3-27** : schématisation la position de la pointe dans le piège pour les deux états stables lors d'un mouvement vers la surface de la lamelle de verre. L'axe des abscisses correspond au mouvement de la plateforme piézoélectrique (ici on bouge de 2 µm) et l'axe des ordonnées est l'intensité reçue par le photodétecteur (signal de z).*

Une fois cette calibration effectuée il suffit de sélectionner la zone de scan voulue, une camera CMOS permet de suivre en temps réel le déplacement de la particule dans une zone autour du piège et ainsi de pouvoir sélectionner une zone de scan. Grâce à la plateforme piézoélectrique, pilotée par l'ordinateur ou directement par l'utilisateur à l'aide de vis mécanique, il est facile de bouger la pointe (située au-dessus de la surface) vers l'endroit souhaité.

- **La reconstruction de la topographie de la zone balayée**

Le balayage de la surface prend la forme d'un serpentin comme on le voit sur la **Figure 3-28** (A), les paramètres du balayage peuvent être modifiés à souhait. L'utilisateur doit définir le point de départ ainsi que la taille des pas (x et y) effectués par la plateforme piézoélectrique ce qui définira la taille finale de l'image en µm.

L'image finale générée est une matrice de pixels, la taille des pixels est ajustable ainsi que le temps d'acquisition pour chaque point. En effet, une particule piégée est contrainte dans ses déplacements mais pas immobile dans le volume du piège, il faut donc laisser assez de temps pour que la pointe

touche plusieurs fois la zone du pixel. Généralement, le cylindre prend 10 ms pour visiter tout le volume, il faut attendre au minimum 5 fois plus longtemps pour acquérir une position moyenne et avoir une bonne définition de la valeur du pixel. A la suite du scan on récupère les données brutes (un exemple de données brutes est affiché sur la **Figure 3-28** (C)). Elles sont découpées en autant d'intervalles que de pixels et on fait la moyenne des points contenus dans chaque intervalle, illustrés par le cadre noir, ce qui donne un intensité moyenne pour le pixel. Ce traitement de données est effectué par un programme en langage python.

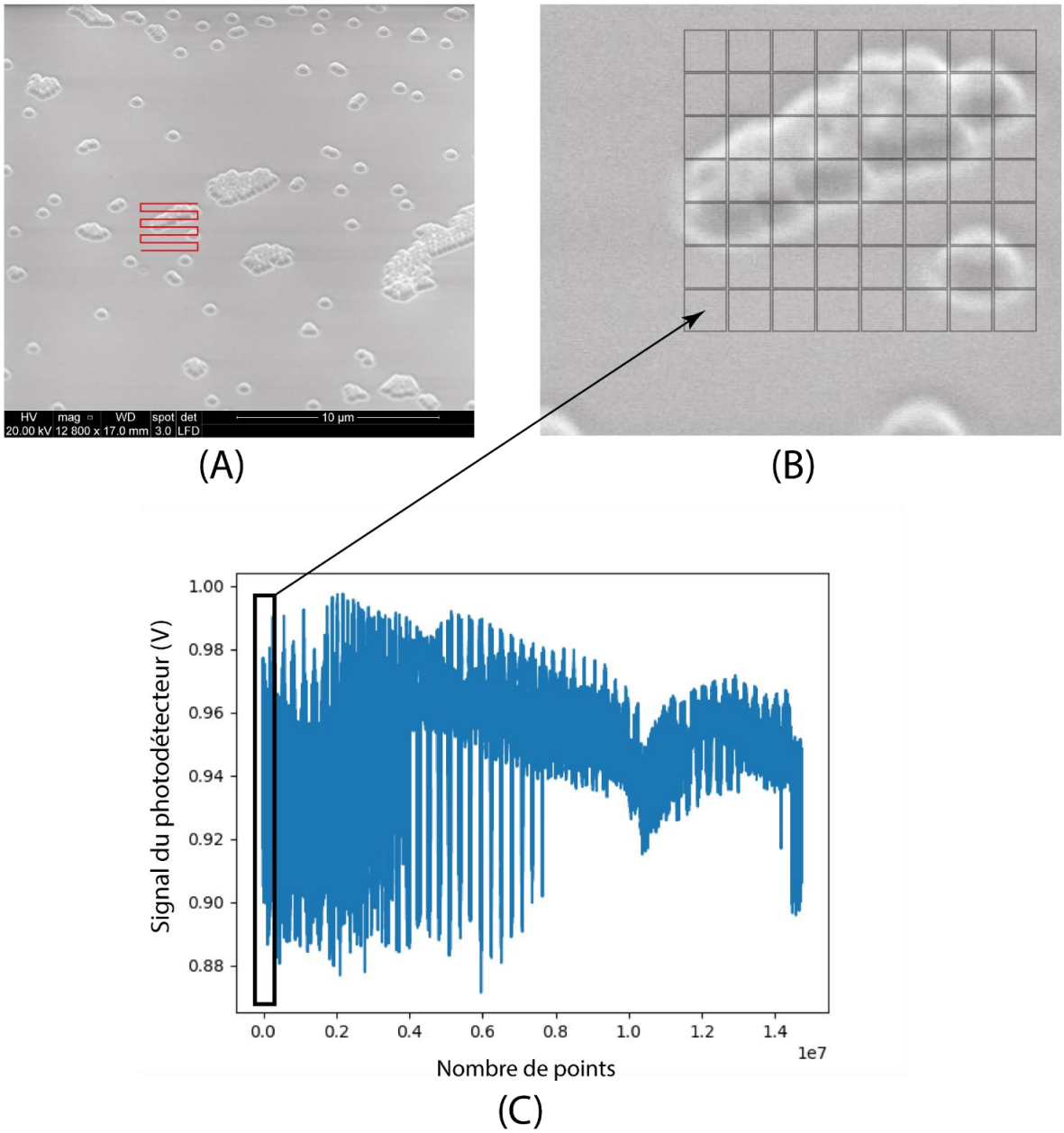


Figure 3-28 : *La reconstruction de la zone de balayage. (A) Photo MEB d'une structure dédiée à l'acquisition de scan de surface, c'est une lamelle de verre sur laquelle est gravé un motif issu de billes de 300 nm. (B) Zoom de la zone d'intérêt et (C) signal brut issu du photodétecteur.*

Une fois l'image reconstruite, comme les deux images de la **Figure 3-25** il faut faire un étalonnage afin de convertir l'intensité (V) en distance réelle (µm). Pour réaliser cette conversion il faut avoir au préalable effectué une courbe d'indentation avant le lancement du scan ou à la fin. Grâce à cette

courbe il est possible d'associer une intensité moyenne d'un pixel à une hauteur en µm. L'amplitude du déplacement de la plateforme piézoélectrique est définie par l'utilisateur et le point de contact de la pointe avec la surface de la lamelle est repérable sur la courbe. Ce point de contact avec la surface est associé à l'origine pour le déplacement du piézoélectrique.

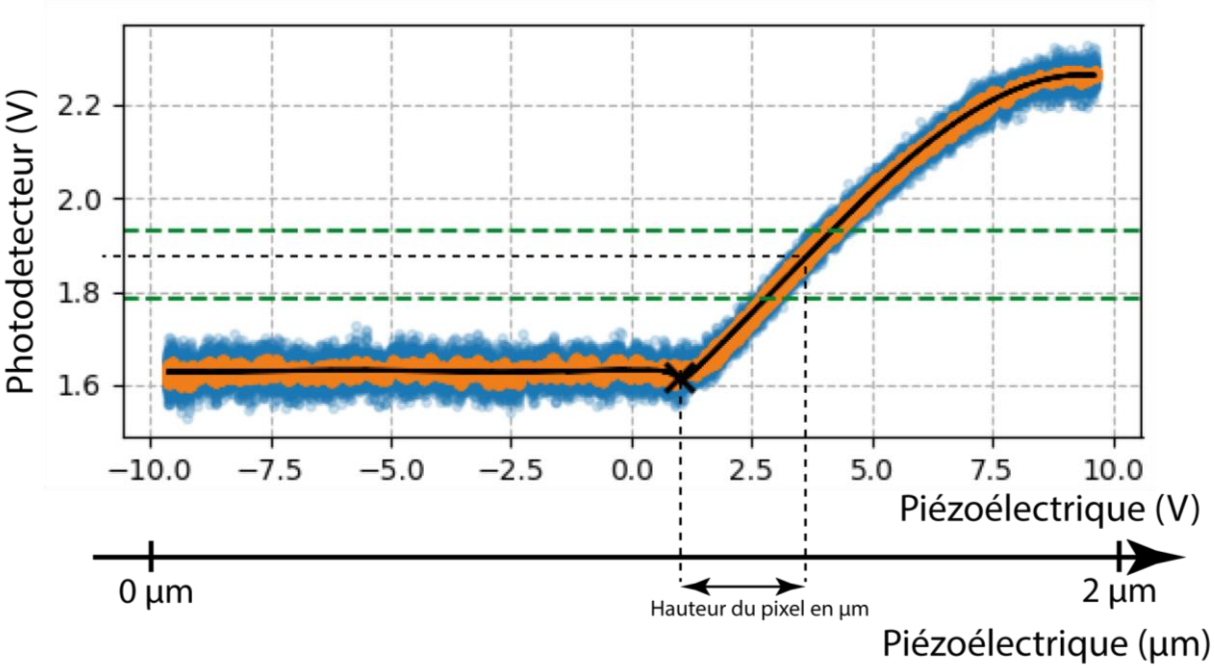


Figure 3-29 : *Courbe d'indentation destinée à la calibration de l'image. L'image totale est comprise entre les deux lignes en pointillé vert. Ici on fait correspondre l'intensité moyenne d'un pixel à une hauteur en µm. Les données brutes sont représentées par le nuages de points en bleu et des données filtrées (moyennées) sont représentées en orange.*

Un exemple de conversion de pixel de Volt à µm est montré sur la **Figure 3-29**. L'image totale donnée en volt est comprise entre les deux lignes en pointillé vert, pour faire la conversion il suffit de prendre chaque intensité de chaque pixel et de les faire correspondre à un déplacement du piézoélectrique. La ligne en pointillé noir illustre ce procédé, la hauteur du pixel sera la différence entre la position du piézoélectrique quand il touche la surface et la position de la pointe dans le piège.

- **Premières conclusions**

Les particules fabriquées peuvent être utilisées pour faire du balayage de surface et donne une assez bonne résolution au vu des premiers scans sur les billes. Il est possible de connaître l'orientation de la pointe dans le piège et on peut faire une conversion des signaux reçus de Volt en micromètre à l'aide de la courbe d'indentation. Ces premiers résultats de scan sont encourageants, cependant en regardant la courbe d'indentation de la **Figure 3-29** on s'aperçoit que cette conversion ne peut être effectuée que pour des hauteurs comprises dans la partie linéaire des données. Généralement cette partie linéaire est de l'ordre de 600 nm donc pour des objets plus grands comme les billes de 1 µm scannés (Scan de la **Figure 3-25**) il est impossible de faire l'étalonnage et une méthode de correction des images est nécessaire. Cette conversion est indispensable pour pouvoir comparer notre technique d'acquisition d'images à la technique référente dans le domaine : l'AFM. Les prochains essais de scan doivent se faire sur des structures de référence que l'on peut aussi bien scanner avec le PhFM qu'avec un AFM.

3.4. Structure dédiée au scan pour la comparaison PhFM/AFM

- **Structure « Mésa » dédiée au scan : Fabrication**

Afin de pouvoir mettre en place une correction de nos scans et pouvoir comparer nos images de scan à celles obtenues par AFM il faut créer de nouvelles structures de référence dont on connaît les dimensions et où il est facile de repérer les structures à scanner. L'idée est donc de fabriquer des structures gravées directement sur les lamelles de 24x60 mm avec une grille de repérage pour trouver facilement les zones intéressantes. Deux types de structures sont réalisées : une créée à partir de billes de 100 nm de diamètre et l'autre à l'aide d'une technique de lithographie originale nommée lithographie Talbot.

La lithographie Talbot permet de reproduire facilement une structure périodique sur une large surface. L'idée générale repose sur l'utilisation d'interférences créées lors du passage de la lumière au travers d'un réseau périodique de trous. Ces interférences sont ensuite utilisées pour insoler la résine photosensible et ainsi former un motif périodique sur notre lamelle. (Cette technique sera décrite plus en détail dans un autre chapitre). Les étapes de fabrication sont les suivantes :

- Nettoyage des lamelles de verre 24x60 mm à la solution piranha, un mélange d'acide sulfurique et d'eau oxygénée.
- Spincoating de la résine photosensible, c'est la résine AZ 701 MIR qui est déposée à 4000 tr/min pendant 30 secondes.
- Lithographie Talbot suivie d'une lithographie classique (UV) pour faire une grille de repérage.
- Gravure des lamelles dans un réacteur ICP RIE (Corial 250D), utilisation d'un plasma CHF_3 pendant 4 min.
- Nettoyage des lamelles au Piranha.

Ces structures ont pour but de mettre en place une correction sur les scans. L'idée de la correction est de réaliser un scan de référence sans utiliser de pointe piégée. Scanner avec le laser à vide permet d'avoir l'image de diffusion du faisceau par l'objet que l'on souhaite scanner. Ensuite lorsque nous réalisons un balayage avec la pointe il suffira de soustraire cette référence pour avoir exactement ce que la pointe a sondé.

Le deuxième type de structure est identique à celles évoquées sur la **Figure 3-28 (C)**, c'est une gravure au motif de billes sur une surface. Pour les fabriquer, je dépose une couche de nano-billes sur toute la surface de la lamelle. Les billes sont achetées dans le commerce et sont en solution aqueuse, elles ont un diamètre de 100 nm et sont faites d'oxyde de silicium. Pour le dépôt j'utilise une tournette à 1500 tr/min pendant 30 secondes puis un séchage sur plaque chauffante (80 °C) pendant 2 min. Il est aussi possible d'avoir des billes de diamètres différents, plusieurs structures avec différentes tailles de bille ont été fabriquées, le protocole suivi est le suivant :

- Nettoyage des lamelles de verre 24x60 mm à la solution piranha.
- Dépôt des billes à la tournette à 2000 tr/min pendant 30 secondes.
- Gravure des lamelles au plasma CHF_3 pendant 4 min.
- Lithographie optique : grille de repérage sur la lamelle.
- Gravure plasma CHF_3 pendant 2 min.
- Nettoyage au piranha.

La solution de nano-billes utilisée est une dilution faite à partir de la solution achetée dans le commerce. La concentration en billes est importante pour éviter de former des agglomérats de billes qui ne seraient pas faciles à scanner à cause de la diffusion du laser par cet objet. Lors de l'étape de

gravure plasma, les billes jouent le rôle de masque et ainsi je transfère le motif formé par celles-ci sur la lamelle, la profondeur de gravure dépend du temps dans le plasma. Le motif de grille sur la lamelle permet d'avoir un repère pour retrouver les structures à scanner aussi bien avec le PhFM que l'AFM. Les photos MEB et AFM de la **Figure 3-30** illustrent les structures fabriquées pour les tests de scan de surface. Nous pouvons voir le réseau numéroté qui sert à situer les diverses zones de scans.

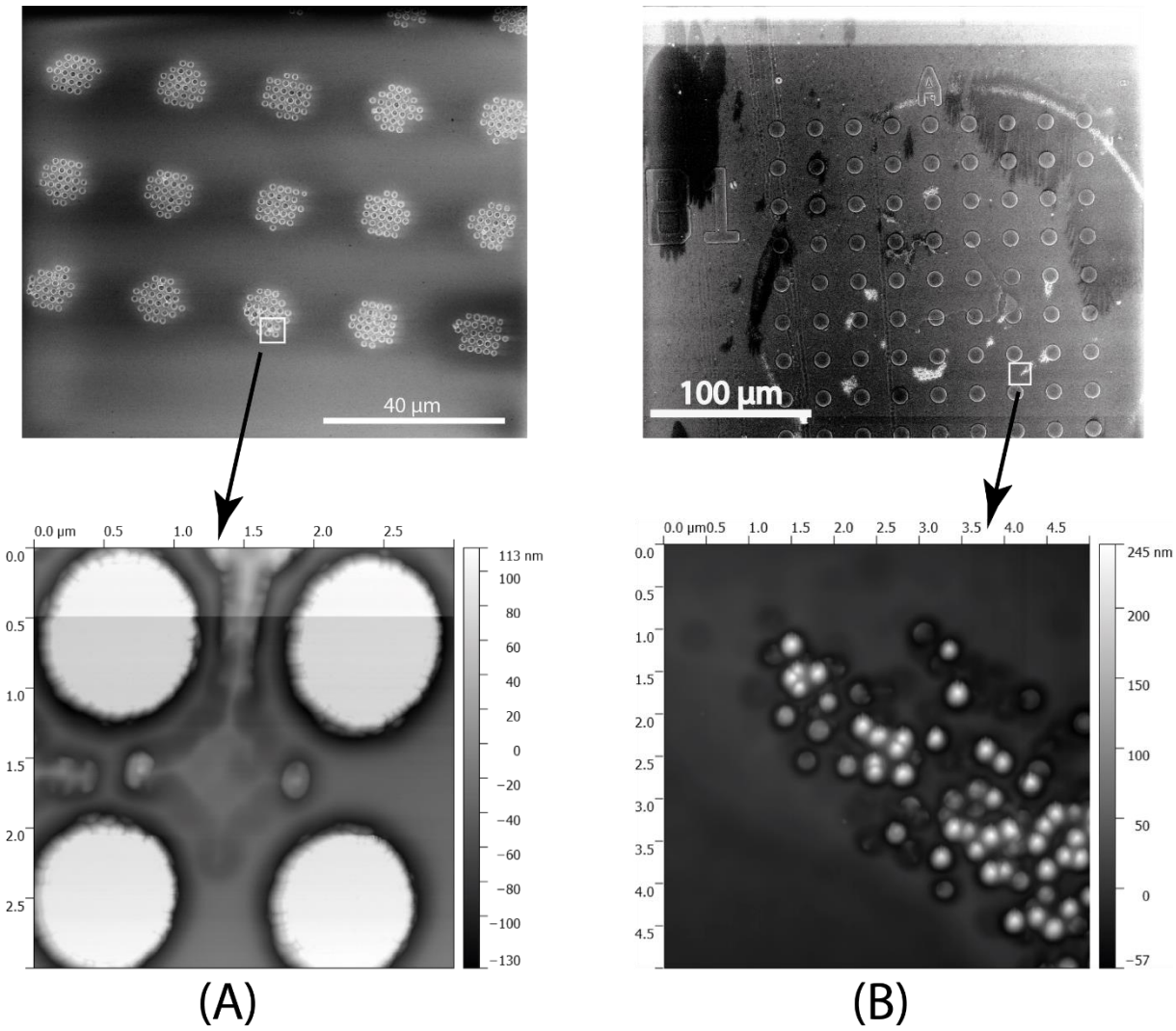


Figure 3-30 : *Photos MEB (en haut) et AFM (en bas) des structures fabriquées pour le scan de surface. (A) Motif réalisé par lithographie Talbot, l'image AFM est un zoom de la zone encadrée en blanc sur la photo MEB. (B) Motif réalisé par dépôt de billes de 100 nm de diamètre, de même l'image AFM est un zoom de ma zone encadrée en blanc.*

- **Structures dédiées au scan : premiers scans, correction et calibration**

Chaque structure fabriquée est utilisé comme illustré sur la **Figure 3-23**, une chambre est confectionnée à partir de la lamelle structurée, de bandes de parafilm et d'une lamelle de verre plus petite par-dessus. Les premiers scans réussis sur les structures fabriquées par lithographie Talbot (**Figure 3-30 (A)**) sont disponibles sur la **Figure 3-31**. Les deux premiers (**Figure 3-31 (A)**) montrent une bonne résolution de notre technique en comparant avec l'image AFM (disponible sur la **Figure 3-30 (A)**) qui donne une idée des structures auxquelles on a affaire. Malheureusement, les scans ne sont pas calibrés et la zone de scan n'est pas la même entre AFM et PhFM. Pour améliorer notre résolution, une correction des scans bruts est testée, comme on le voit sur la **Figure 3-31 (B)** deux acquisitions

d'images ont été réalisées. La première est une image classique de balayage effectué avec une de mes pointes alors que la seconde est effectuée avec le laser seul. L'image obtenue avec le piège vide permet d'obtenir une image de référence qui représente la diffraction de la lumière du laser par l'objet étudié. Cette image est, en fait, dissimulée dans nos données lors d'un scan classique (avec pointe). Une fois que les deux images sont disponibles, le but est de faire la soustraction des deux pour avoir l'image réelle de ce que « voit » la pointe sans avoir ce que « voit » le laser. Seitz a fait un traitement similaire pour ces données [17]. Le problème pour nous est dû au décalage dans le temps de notre plateforme piézoélectrique. Entre deux scans successifs la position du point de départ, même si à la lecture des positions sur l'ordinateur je suis au même point, n'est plus la même à cause de ce décalage. (Voir la partie sur le « drift » dans le chapitre sur le dispositif et ses caractéristiques)

Quand on regarde les images du scan brut et la correction on se rends compte qu'il manque des informations. Les structures plus fines que l'on devine entre les 4 disques sur le scan brut disparaissent lors de la correction. On perd des informations sur la structure que l'on veut étudier donc cette correction n'est pas bonne. Il faut donc se limiter à l'étude d'objets qui ne diffractent pas notre laser afin de se passer de cette correction comme des structures petites (100-300 nm) et transparentes. Les structures faites à partir de billes devraient donner des résultats satisfaisants sans avoir recours à des corrections.

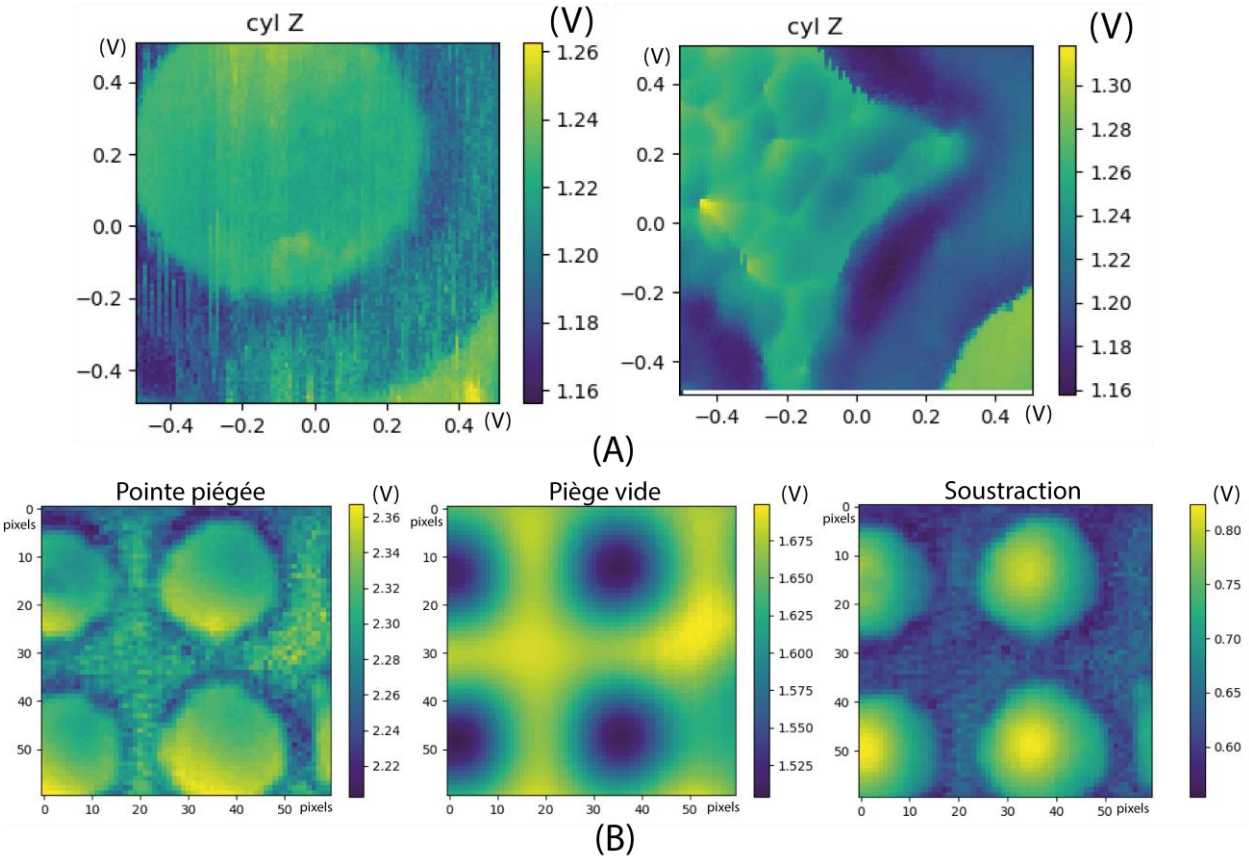


Figure 3-31 : *Scans sur les structures Talbot. (A) Deux des plus beaux scans où on peut voir des petits détails entre chaque disque, les deux scans font 1x1 µm avec un pas de 10 nm. (B) Comparaison d'un scan effectué avec une pointe et d'un autre effectué à vide (sans pointe dans le piège) et enfin la soustraction des deux. Ces scans font 2x2 µm avec un pas de 40 nm.*

Lors des premiers scans sur les structures de billes une autre comparaison est faite : sur la même zone j'ai fait deux scans. L'un avec la pointe vers le bas et le second avec la pointe vers le haut, cette expérience permet de mettre en évidence que l'utilisation d'une pointe augmente la résolution. En

effet, avec la pointe vers le haut je scanne la surface avec la base du cylindre, pour rappel elle mesure 1,4 µm de diamètre et elle est plane (grâce au clivage des particules), j'attends donc une image ou on ne verra pas les détails d'une centaine de nanomètre disponibles sur la structure. Ces tests de résolution sont faits sur la lamelle dont on voit les photos sur la **Figure 3-30**. Les résultats de cette comparaison sont sur la **Figure 3-32 (A)**. Comme attendu lorsque le scan est effectué avec la pointe vers le haut on ne distingue aucune bille parce que la base du cylindre est bien trop grande pour pouvoir détecter des structures de la taille des billes (100 nm). L'utilisation de la pointe nous permet d'améliorer la résolution et nous permet de détecter des changements topographiques de l'ordre de 20 nm. La résolution latérale est conditionné par le rayon de courbure de la pointe, les cylindres fabriqués présentent une pointe avec un rayon de courbure d'environ 25 nm ce qui donne une résolution latérale d'environ 30 nm. De plus la force appliquée sur l'échantillon est faible (1,5 pN) ce qui ouvre la possibilité de scan de surface molle.

D'autres scans de surface ont été effectués sur ces même structures. Un des scans est disponible sur la **Figure 3-32 (B)**, plusieurs images sont visibles sur cette figure. L'image nommée « image_z0 (V) » est l'image reconstruite de la topographie de la zone balayée mais non calibrée, elle est issue du signal d'intensité reçu par le photodétecteur. Pour récupérer ce signal il faut filtrer le faisceau total reçu par les détecteurs dans la partie détection du dispositif optique à l'aide d'un diaphragme. Pour avoir la topographie il faut récupérer le centre du faisceau (Voir la partie sur le dispositif), si on prend l'ensemble du faisceau on obtient l'image nommée « image_sum (V) » sur la **Figure 3-32 (B)**. Elle englobe toutes les caractéristiques issues de x, y et z. Grâce au filtrage on est capable de différencier les divers signaux au sein du faisceau et reconstruire une topographie ainsi qu'une carte des positions des structures. L'image finale calibrée est nommée « image_z0_um_2 (um) », on distingue plusieurs billes qui forment un agglomérat. La hauteur des structures mesurée au profilomètre (dektak) fait 150 nm. Avec la calibration la hauteur mesurée est aussi environ 150 nm donc la méthode de calibration est correcte.

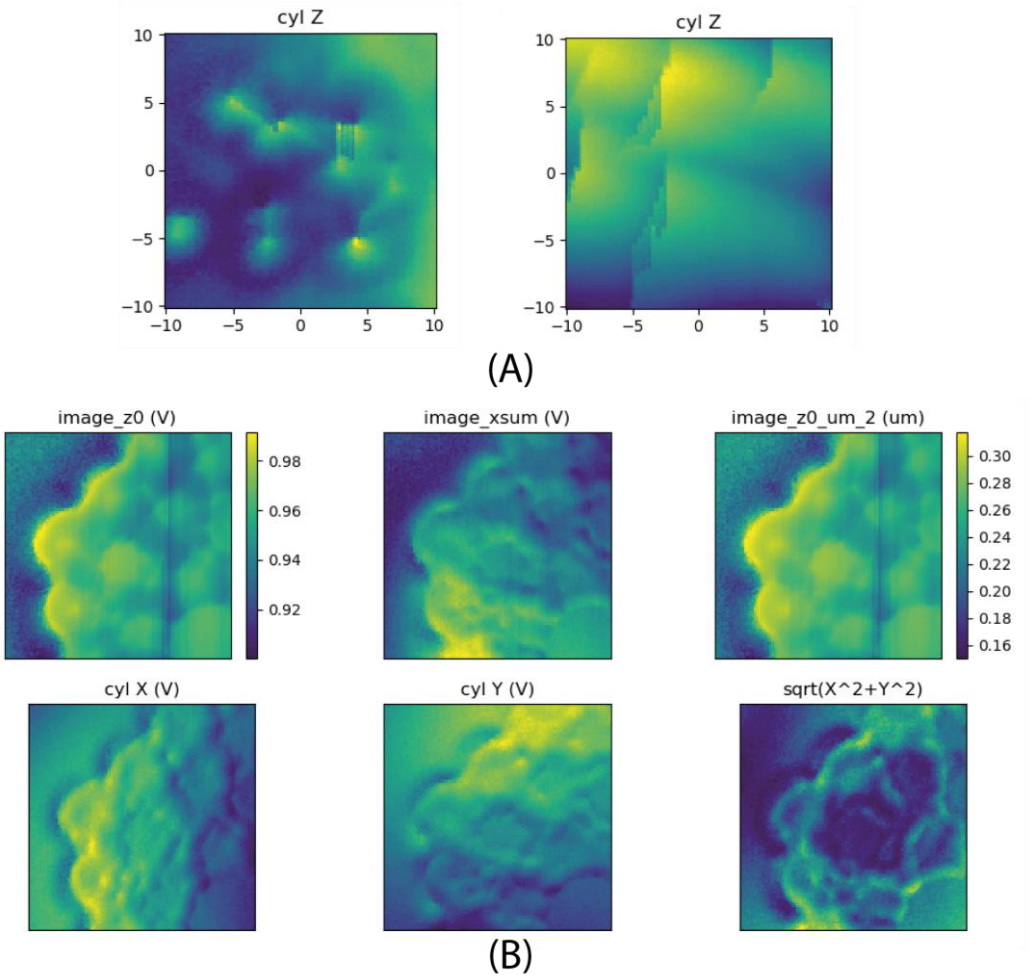


Figure 3-32 : *Scans de surfaces de structures issus de la gravure des nano-billes. (A) Les scans de surfaces sont effectués sur la même zone de 1x1 µm avec un pas de 10 nm et les billes utilisées font 100 nm de diamètre, à gauche le balayage est effectué avec la pointe vers le bas et à droite avec la pointe vers le haut. Les axes des abscisses et des ordonnées ne sont pas calibrés, ici ils sont donnés en Volt et correspondent aux déplacements du piézolélectrique. (B) Scan de surface calibré. Les diverses images disponibles sont les signaux (x, y et z) traités par python. Ici la structure a été fabriquée à partir de bille de 300 nm de diamètre et gravée pendant 4 min dans un plasma CHF_3 ce qui donne une profondeur finale d'environ 200 nm. Le scan est fait sur une surface de 1x1 µm avec un pas de 10 nm.*

- **Structures dédiées au scan : Comparaison PhFM/AFM**

Grâce à la grille les zones scannées sont repérables et peuvent être scannées par l'AFM afin de faire une comparaison des deux méthodes. Quand on compare les balayages de surfaces effectuées par le PhFM et obtenues par AFM disponibles sur la **Figure 3-33** on arrive facilement à reconnaître les zones scannées. Les deux images reconstruites par notre pointe font 1x1 µm avec un pas de 10 nm. La position des structures est comparable aux positions détectées par l'AFM, notre technique est donc satisfaisante. Cependant, on voit qu'on est encore assez loin de la résolution disponible avec l'AFM mais notre objectif n'est pas de concurrencer cet outil. Le but de notre dispositif est de justement proposer une alternative pour pallier aux limitations rencontrées par l'AFM comme par exemple l'obtention de topographies de surfaces molles.

Ici je présente les premiers tests de notre microscope à force photonique, la résolution n'est pas au niveau d'un AFM cependant on voit facilement les mêmes structures, ce qui indique que notre dispositif fonctionne et qu'on peut faire confiance au images reconstruites. De plus, les hauteurs

mesurées par les deux techniques sont du même ordre de grandeur (centaine de nm) ce qui confirme encore un peu plus que la méthode que j'utilise pour convertir l'image en volt en une image en µm a du sens et montre une topographie réelle d'un objet. Il est important de noter que les images AFM sont obtenues dans l'air alors que le PhFM s'utilise dans un milieu liquide dans notre cas.

Au vu de ces résultats on peut conclure que l'outil PhFM permet d'obtenir des topographies de structures fines de l'ordre de la centaine de nanomètre. L'utilisation d'une pointe spécialement fabriquée pour ces expériences a permis de s'approcher de la résolution d'un AFM standard en restant tout de même en dessous des performances atteignables par l'AFM. Comme mentionné plus haut la technique n'a pas pour but de remplacer l'AFM mais de pouvoir obtenir des images de surfaces molles. Maintenant que nous pouvons avoir confiance en notre technique, je vais pouvoir me lancer dans des expériences sur des objets biologiques de préférence mous.

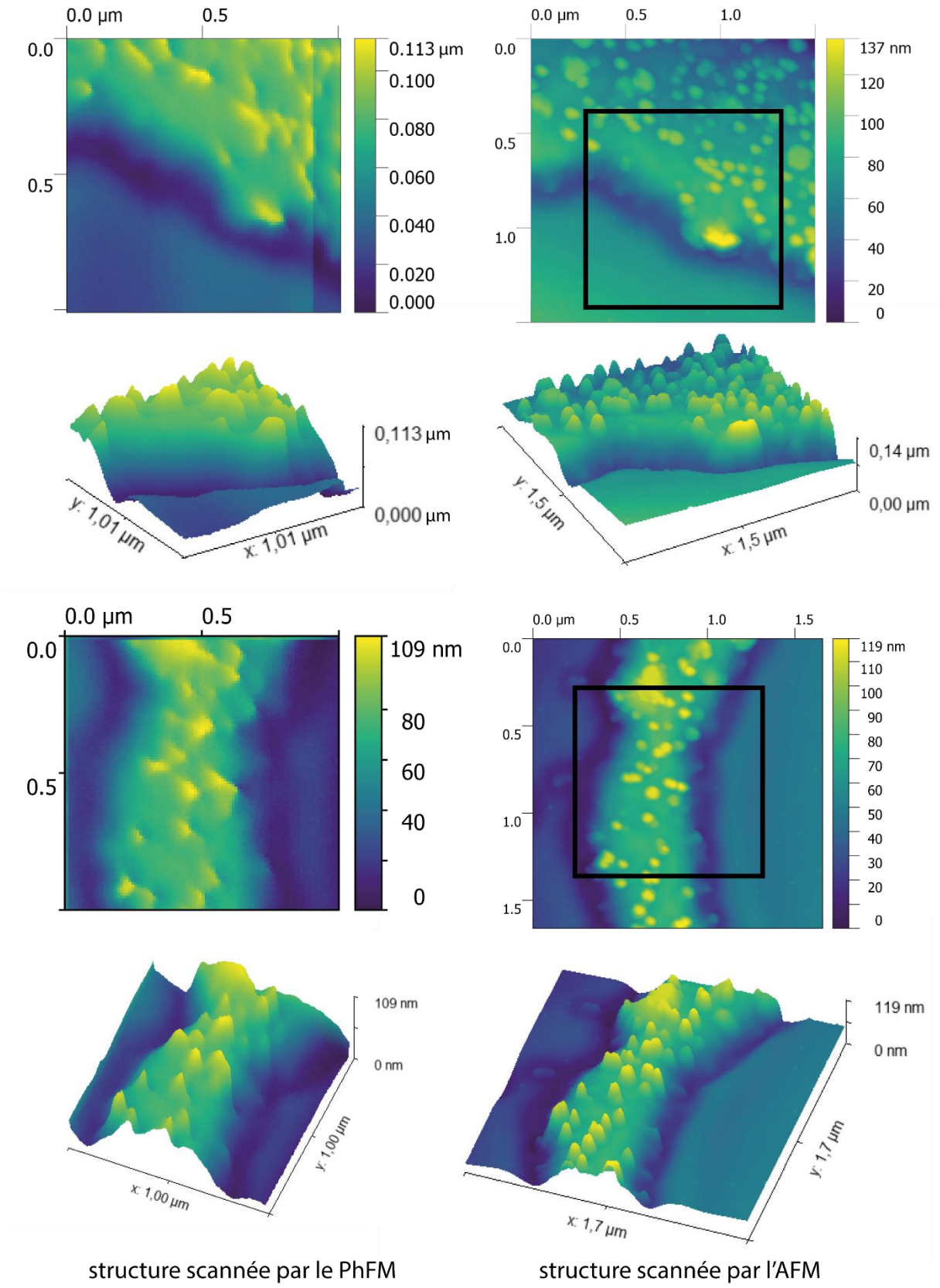


Figure 3-33 : *Comparaison de balayage de surface effectué par PhFM (à gauche) et par l'AFM (à droite). Un rendu 3D de chaque scan est effectué à l'aide de l'outil du logiciel « Gwyddion ». Les carrés noirs sur les deux images AFM correspondent aux deux images obtenues par PhFM.*

3.5. Les expériences sur les objets biologiques

- **Les premiers tests sur des microtubules**

Les premiers objets biologiques qui ont été testés dans le dispositif du PhFM sont les microtubules (MT). Ce sont des fibres qui constituent le cytosquelette (entre autre) de la cellule, ils se présentent sous la forme de filament à longueur variable avec un diamètre de 25 nm. Les filaments de MT, schématisés sur la **Figure 3-34**, sont des dimères composés d'un assemblage hélicoïdal de tubuline α et β qui s'enroulent en spirale pour former un tube. Les MTs sont des filaments rigides (longueur de persistance de 300 µm) qui jouent notamment un rôle dans la division cellulaire en permettant le déplacement des chromosomes dans le noyau mais également le transport actif de vésicules le long des axones de neurones via les moteurs moléculaire kinésines et dynéines en reptation sur ces filaments. Les microtubules sont également des objets dynamiques, se polymérisant et se fragmentant de manière dynamique et faisant ainsi évoluer dans le temps la rigidité des cellules.

Pour être imagés par les techniques à sonde locale, les filaments doivent être stabilisés et collés sur une surface préparée par silanisation. Au vu de ces propriétés et de la simplicité de leur forme ils sont les candidats adéquats pour commencer les premiers tests de scans sur des échantillons biologiques.

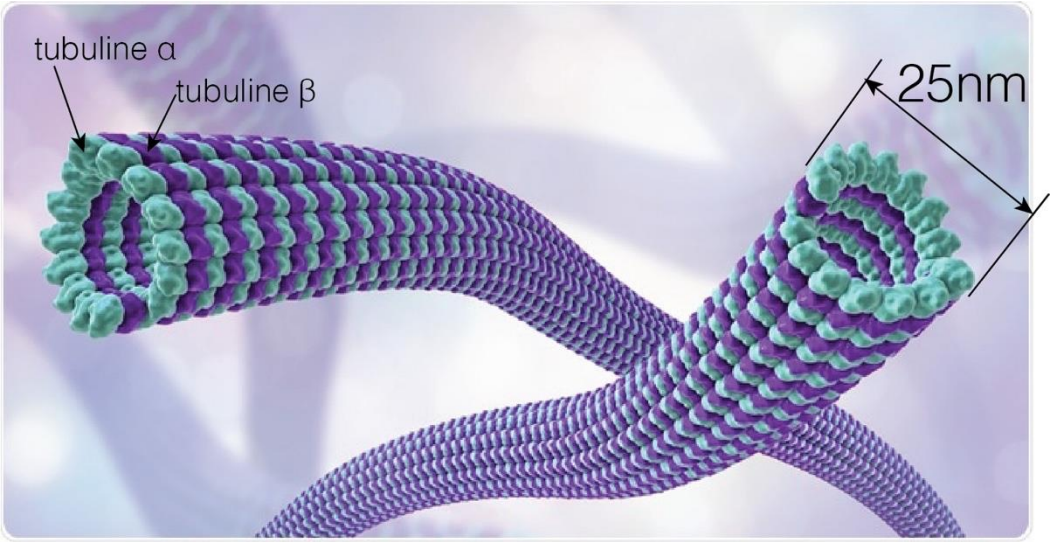


Figure 3-34 : *Rendu en 3D de microtubule (image Medical News Today)*

La silanisation d'une surface est un procédé chimique qui permet de fixer sur une lamelle de verre des organosilanes, structures composées d'au moins une liaison silicium carbone (Si-C). Largement utilisée pour la fixation d'échantillons biologiques [18], [19], cette technique va nous permettre de coller des microtubules sur notre lamelle de verre pour ensuite les scanner avec nos pointes. Ce procédé de silanisation de nos lamelles est effectué par Mr Didier Portran (Chercheur CNRS) qui nous fournit aussi les microtubules. Le protocole suivi afin de fonctionnaliser la surface est le suivant :

- Nettoyage des lamelles de verre 24x60 mm à la solution piranha.
- Préparation de la solution de silanisation (Dichlorodiméthylsilane + trichloréthylène).
- Incubation dans la solution pendant 1h.
- Rinçage des lamelles au méthanol.

Une fois silanisées les lamelles peuvent être conservées à l'abri.

De par leur petites tailles (25 nm de diamètre) les Mts ne peuvent pas être vus à la camera disponible sur le dispositif optique. Il est nécessaire d'ajouter une composante de microscopie par fluorescence pour repérer les MTs. On choisit d'installer un dispositif de microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF, Total internal refraction fluorescence en anglais) car il permet d'exciter la fluorescence des microtubules sur une hauteur fine au-dessus de la surface de l'échantillon (200 nm). Grâce à cette propriété il est possible de voir les MT qui sont collés sur la surface sans être gêné par ceux encore présents dans la solution. Sur la **Figure 3-35** est décrit le dispositif TIRF qui nous permet d'obtenir les photos des MTs (Un exemple est donné sur la **Figure 3-35**).

Les MTs sont aliquotés (10 µl par aliquot), ils sont stabilisés avec GMPCPP (Guanosine-5'-[(α,β)-methyleno]triphosphate) et Glutaraldéhyde (0,25%). Ils peuvent être conservés congelés à -80°C pendant plusieurs mois.

Pour fixer les MTs sur la lamelle silanisée :

- Décongeler rapidement les MTs à 37°C (bain-marie si disponible ou à la main).
- Les garder à température ambiante et les protéger de l'exposition directe à la lumière.
- Diluer les MTs 500 fois dans BRB80 1x.
- Insérer les MTs dans la chambre d'écoulement illustrée sur la **Figure 3-23** (couper la pointe de la pipette pour éviter de casser les MTs).
- Laisser les MTs adhérer à la surface pendant 5-10 min.
- Laver la chambre d'écoulement avec au moins 10 fois le volume de la chambre avec du BRB80 1x.
- Écouler la solution pluronic-F127 (2%) et incuber à la température ambiante pendant 5 minutes.
- Laver la chambre d'écoulement avec au moins 10 fois le volume de la chambre avec du BRB80 1x.

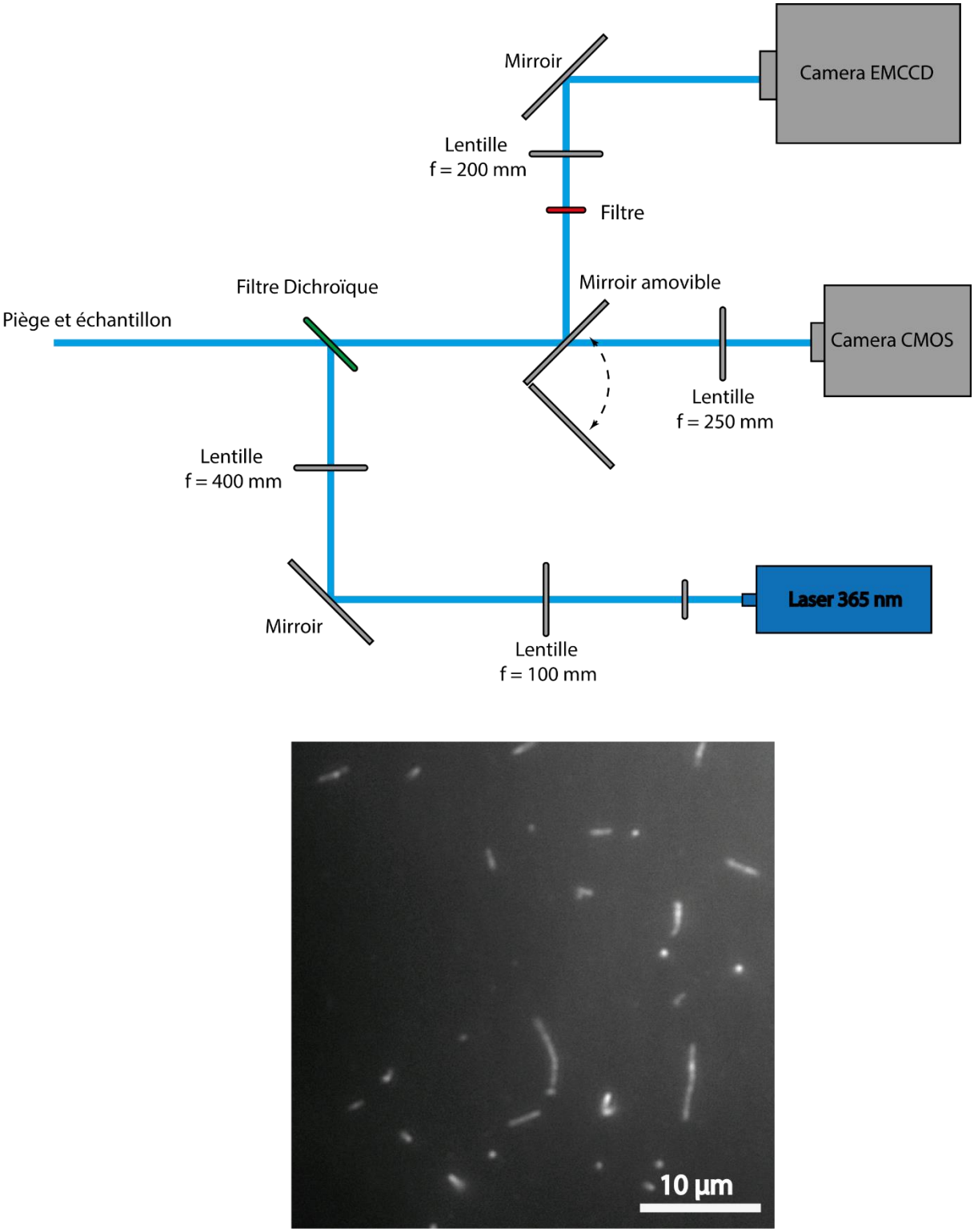


Figure 3-35 : *Schéma du dispositif de microscopie en fluorescence installé en complément sur le dispositif des pinces optiques et photo obtenue de microtubules adhérés sur une surface*

Une fois que les MTs sont adhérés sur la surface il faut insérer les cylindres dans la chambre. Afin de ne pas perturber le milieu dans lequel les MTs évoluent, il faut que le tampon soit compatible. Ici, la solution tampon est le BRB80 1x. Les cylindres passivés BSA sont mis dans la solution tampon et peuvent être introduits dans la chambre contenant les MTs adhérés sur la surface. Une fois repérés à l'aide du TIRF, les MTs sont scannés avec la pointe du cylindre piégé. La **Figure 3-36** présente deux scans différents du même microtubule. Sur le scan (A) on peut mesurer une hauteur pour le MT de 40

nm. A priori cette dimension n'est pas bonne, on s'attend à mesurer autour de 24nm, et il est possible qu'en réalité il y ait un amas de MT : plusieurs microtubules enroulés entrent eux. On observe sur le scan en **(B)** les lignes droites générées par la pointe à chaque passage sur le microtubule. Ici aussi les hauteurs mesurées ne correspondent pas au diamètre des microtubules en général. Il est aussi possible que la calibration ne soit pas optimale car pour obtenir l'image je place la pointe à la limite de la surface pour limiter le phénomène d'adhérence de la pointe. Par conséquent les intensités reçues par le photodétecteur pour chaque pixel ne couvre pas une large bande et peuvent être confondues avec le signal standard de la pointe dans le piège.

A plusieurs reprises la sonde a été perdue à cause de ce problème, celle-ci se colle sur le microtubule et il est impossible de la décrocher. Tout le scan est perdu et il faut tout recommencer : retrouver une nouvelle particule avec une pointe et une nouvelle zone à scanner.

Les premiers balayages de surfaces sur des échantillons biologiques nous ont permis de faire des images de microtubules. Ces résultats ont aussi mis en lumière plusieurs problèmes que l'on va rencontrer pour chaque nouvel échantillon étudié. D'une part il faut sélectionner le bon tampon et pouvoir y mettre nos particules passivées et d'autre part chaque objet biologique est susceptible de nous faire perdre la pointe (à cause de l'accrochage). La passivation de nos pointes est la clé pour réussir le scan de surfaces d'objets biologiques. Le protocole pour déposer les microtubules est assez lourd et ils sont très fragiles. Il est arrivé qu'à plusieurs reprise les MTs n'adhèrent pas à la surface ou se détériorent totalement lors de l'introduction des cylindres dans la chambre. De plus, devoir à chaque fois passer d'une caméra à l'autre est contraignant et source d'erreurs sur la localisation. De par leur forme simple (tubulaire) et leur rigidité je pensais que l'obtention d'images résolues serait facile mais au vu des difficultés rencontrées sur cette expérience, j'ai décidé de changer d'objet d'étude. Afin de profiter pleinement du potentiel du PhFM je me suis donc orienté sur l'étude des surfaces molles, c'est pourquoi les prochains objets biologiques étudiés sont les globules rouges.

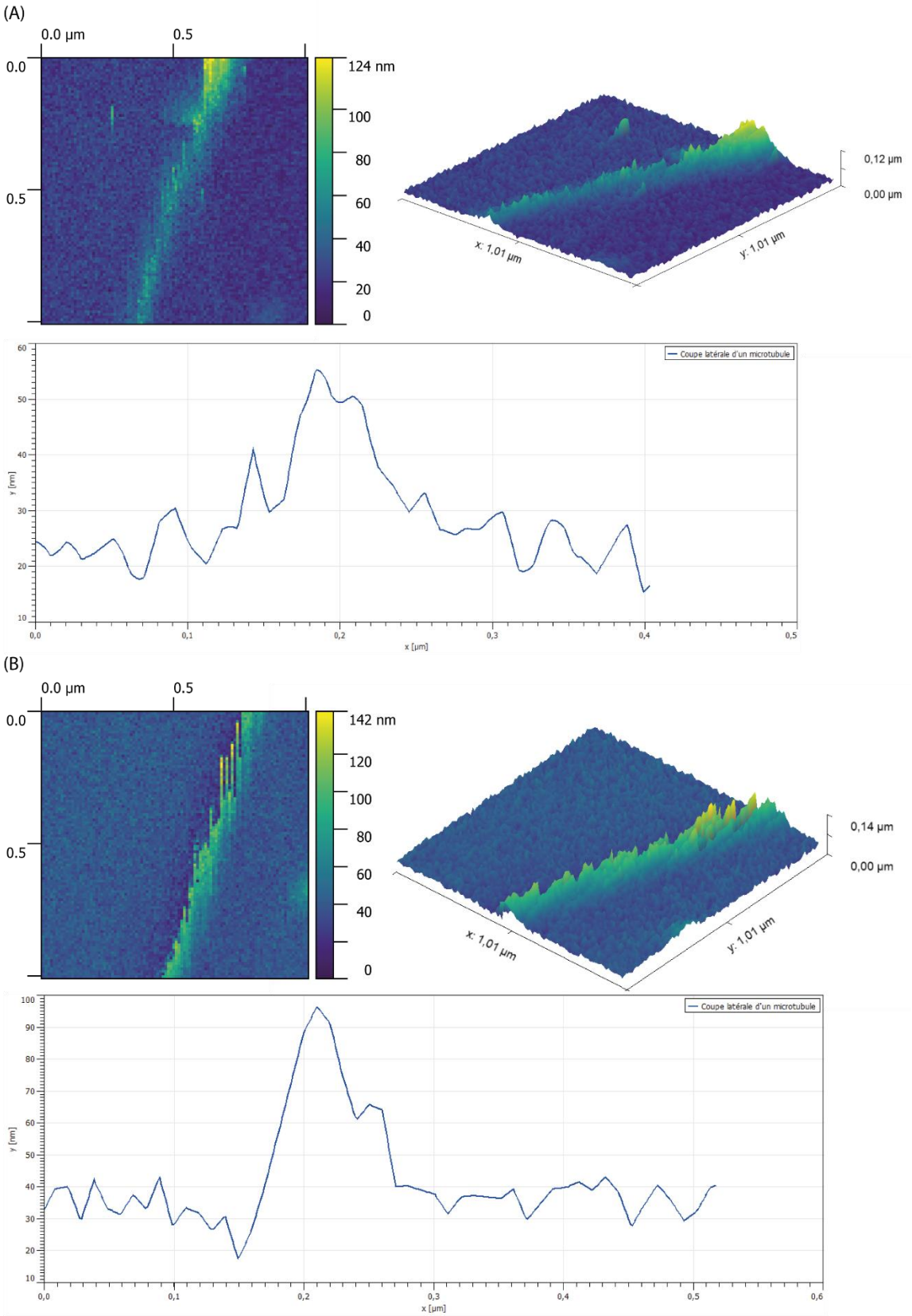


Figure 3-36 : *Balayage de surfaces sur microtubules adhérées sur une lamelle de microscope. Les scans sont effectués sur une surface de 1x1 µm avec un pas de 10 nm pour les deux. (A) Ici il n'y a pas eu de problèmes durant le scan et sur la coupe latérale on peut mesurer une hauteur de 40 nm pour le microtubule. (B) Ici la pointe s'est accrochée sur la surface de l'échantillon ce qui crée les lignes droites sur le scan. Ces aberrations se retrouvent presque sur tous mes scans de microtubules.*

- **Obtention d'images de globules rouges (GR)**

Les globules rouges, aussi appelés hématies ou érythrocytes, sont les cellules du sang chargées du transport de l'hémoglobine et de l'oxygénation des tissus. Ils présentent une forme circulaire biconcave et sont hautement déformables. Le diamètre moyen de ces cellules sanguines est environ de 7 µm. Leur surface est molle ce qui rend l'obtention d'image des celle-ci assez difficile. L'utilisation d'un AFM pour obtenir des images est possible mais complexe [10], [20]–[22]. La force exercée par un AFM à tendance à déformer la surface, il y a donc besoin de traitements particuliers pour durcir le globule comme les fixer au Gluturaldéhyde [22], les éclater par cisaillement [21] ou encore les lyophiliser [10]. Dans l'article de Hategan *et al.* [20], pour obtenir la topographie d'un globule rouge par AFM (en mode *tapping*) ils les collent sur une surface fortement concentrée en PLL et balayent la surface en appuyant jusqu'à ressentir la rigidité du verre sous-jacent. En connaissant l'épaisseur de la couche bi-lipidique il est possible de remonter à la topographie. L'image obtenue est celle du cytosquelette de la cellule, il est arrangé en forme de quasi-nid d'abeilles et est composé de spectrine. Cependant, en appuyant entre deux nœuds du cytosquelette la membrane se déforme localement et l'information topographique n'est plus accessible. C'est pourquoi, dans ce cas, le recours au pinces optiques pour faire du scan de surface peut être une solution qui permettrait d'imager des topographies locales sans déformer l'objet étudié. L'idée générale de l'expérience consiste à réussir à produire des images par PhFM où l'on voit le cytosquelette comme pour un AFM, puis réussir à obtenir une image sans déformer le globule.

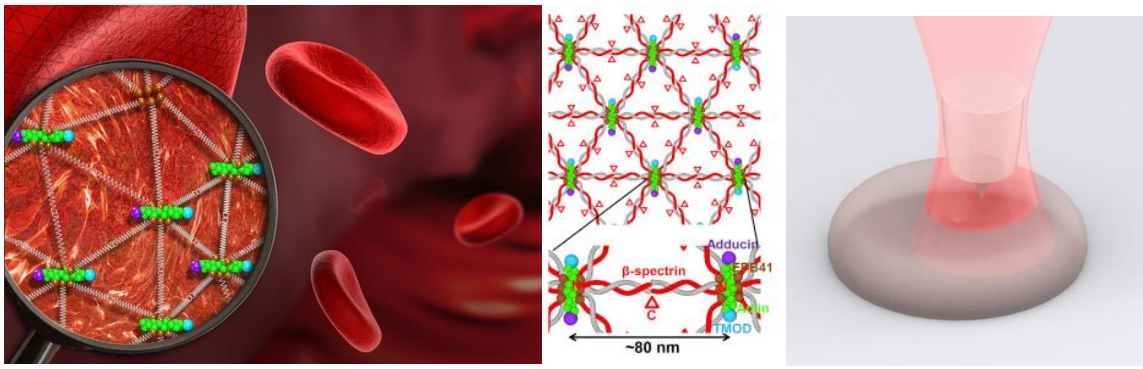


Figure 3-37 : *Vue en 3D de globules rouges et détail du réseau de spectrine montrant la forme et les dimensions du réseau [23] et vue en 3D du principe de scan de la surface d'un globule rouge au PhFM.*

Les globules rouges sont déposés sur une lamelle de verre sur laquelle est déposée une couche de Poly-L-Lysine (PLL). Ce polymère est très chargé positivement et s'adsorbe facilement en monocouche sur la surface de verre qui contient des charges négatives. Cette couche permet l'adhésion des érythrocytes sur la surface. Le protocole suivi pour le dépôt de PPL est le suivant :

- Nettoyage des lamelles de verre 24x60 mm à la solution piranha.
- Préparation de la solution de PLL à partir d'une solution mère de 0,1 % PLL, dilution 10 fois dans l'eau milliQ pour avoir des globules fortement adhérés de types *ghost*.
- Sur une surface plane : on prépare une feuille de papier absorbant humide sur laquelle on étend une couche de parafilm.
- La solution est déposée en gouttelettes sur le parafilm (hydrophobe). Il faut compter environ 80 µL par lamelle.
- Les lamelles sont passés au plasma O_2 pendant 2 min. Cette étape rend les lamelles hydrophiles ce qui permet à la solution de bien s'étaler sur la lamelle.
- On dépose les lamelles sur les gouttelettes et on laisse incuber pendant 45-60 min.

- On rince les lamelles au PBS (Deux fois) et ensuite à l'eau milliQ (Deux fois).
- Pour le séchage plusieurs options sont possibles : les laisser sécher à température ambiante dans un récipient qui permet de maintenir les lamelles verticales et qui peut se couvrir (pour limiter la contamination de poussière), les faire sécher à l'aide d'une soufflette d'azote (qui peut laisser des traces) ou alors les mettre au four à 60 °C pendant 1h30.
- Les lamelles peuvent être conservées dans une boite à l'abri de la lumière pour 15 à 20 jours à 4°C.

Selon la concentration de PLL les globules peuvent être fortement adhérés ou à l'inverse faiblement adhérés. Dans le cas d'une adhésion forte la forme du globule est altérée, il prend la forme d'une demi-sphère et dans certains cas il se vide de leur hémoglobine : création de *ghost*. Les *ghosts* sont des résidus post-hémolytiques de globules rouges. On suppose généralement que ces résidus sont dépourvus de structure intracellulaire et consistent principalement en une membrane cellulaire. C'est pourquoi les *ghosts* sont largement utilisés dans l'étude de la composition, de la structure et de la fonction de la membrane des globules rouges. [24]

Dans le cas d'une adhésion faible la forme n'est pas altérée, on retrouve un disque biconcave attaché sur la surface de la lamelle. De par son isotonicité et sa non-toxicité pour les cellules, le PBS est utilisé comme solution tampon pour les globules rouges. Nous ajoutons du glucose dans la solution pour que les globules puissent se « nourrir » et donc rester en vie plus longtemps (une semaine). Avant le montage sur le dispositif des pinces optiques le buffer est changé : un mélange de PBS 1x et BSA (15 mg/mL) dans lequel on trouve aussi nos cylindres pointus qui serviront de sonde pour le scan de surface. La BSA permet d'éviter l'adhésion des cylindres sur la surface de la lamelle. L'introduction des globules dans la chambre est effectuée à l'aide d'une pipette. Le protocole suivi est :

- Préparation de la chambre avec une lamelle PLL comme sur la **Figure 3-23**.
- Introduction des GR (0,1 % GR + PBS 1X + glucose)
- On laisse les GR se déposer sur la surface de la lamelle pendant 10 min.
- Passivation de l'enceinte avec du PBS 1X + BSA (15 mg/ml) 10 min.
- Introduction des cylindres pointus. Ceux-ci sont dans un milieu composé de PBS 1X + BSA (15 mg/ml).
- On scelle l'enceinte à l'aide de vernis transparent pour limiter l'évaporation.
- On monte la chambre sur les pinces optiques.

Une fois qu'on trouve l'image sur la camera CCD des globules rouges en solution avec nos cylindres, il faut trouver une particule avec une pointe et une bonne zone de scan. Le meilleur compromis est d'avoir une zone sans trop de globules rouges et sans poussières de quartz présentes dans la solution qui pourraient venir perturber l'acquisition des données. Ces poussières sont dues au rasage mécanique des pointes. Je fais du balayage de surface sur des *ghosts* car ils ne perturbent pas (ou très peu) le signal du laser.

Avant de lancer le scan je fais une courbe d'approche-retrait sur le verre pour faire l'étalonnage du déplacement dans la direction axiale (z). La même courbe est faite sur le *ghost* et en comparant les deux courbes obtenues, on voit que les deux ne sont pas identiques. En effet, on observe sur le graphique de la ***Figure 3-38*** une atténuation du signal lorsqu'on se trouve sur le globule. Ce changement est dû à la faible raideur de la membrane : la pointe s'enfonce dans le globule. Ce résultat indique qu'il faut utiliser la courbe obtenue sur le verre pour la calibration, car pour reconstruire une image calibrée on utilise l'écart de la pointe par rapport à sa position d'équilibre dans le piège. Sur une surface dure comme le verre on peut faire correspondre le déplacement de la pointe par rapport au déplacement de la plateforme piézoélectrique. En revanche sur une surface déformable, l'écart par

rapport à la position d'équilibre n'est pas corrélé au déplacement du piézoélectrique. Cela provoque une erreur dans la détermination de la topographie, cette erreur est symbolisée par l'écart entre les deux courbes. Sur le schéma explicatif de la ***Figure 3-38*** on se rend compte de cette erreur, il est primordial de calibrer l'image avec la courbes d'indentations faites sur du verre.

Une fois que la courbe est enregistrée il faut choisir une zone adéquate pour le scan sur le *ghost*. Généralement, je réalise un premier scan large de 5x5 µm avec un pas de 50 nm pour visualiser la topographie d'ensemble de l'objet. Les globules rouges sont fortement adhérés à la surface, ils présentent une forme de demi-sphère on s'attend donc à une forme similaire sur l'image reconstruite. Une fois que l'on s'est assuré que la forme est celle attendue on peut choisir une zone plus petite au centre du globule rouge pour faire un scan plus résolu (2x2 µm avec un pas de 20 nm). On se place au centre car la surface peut être considérée comme plane pour une petite zone (2x2 µm) et donc le faisceau du laser sera peu perturbé.

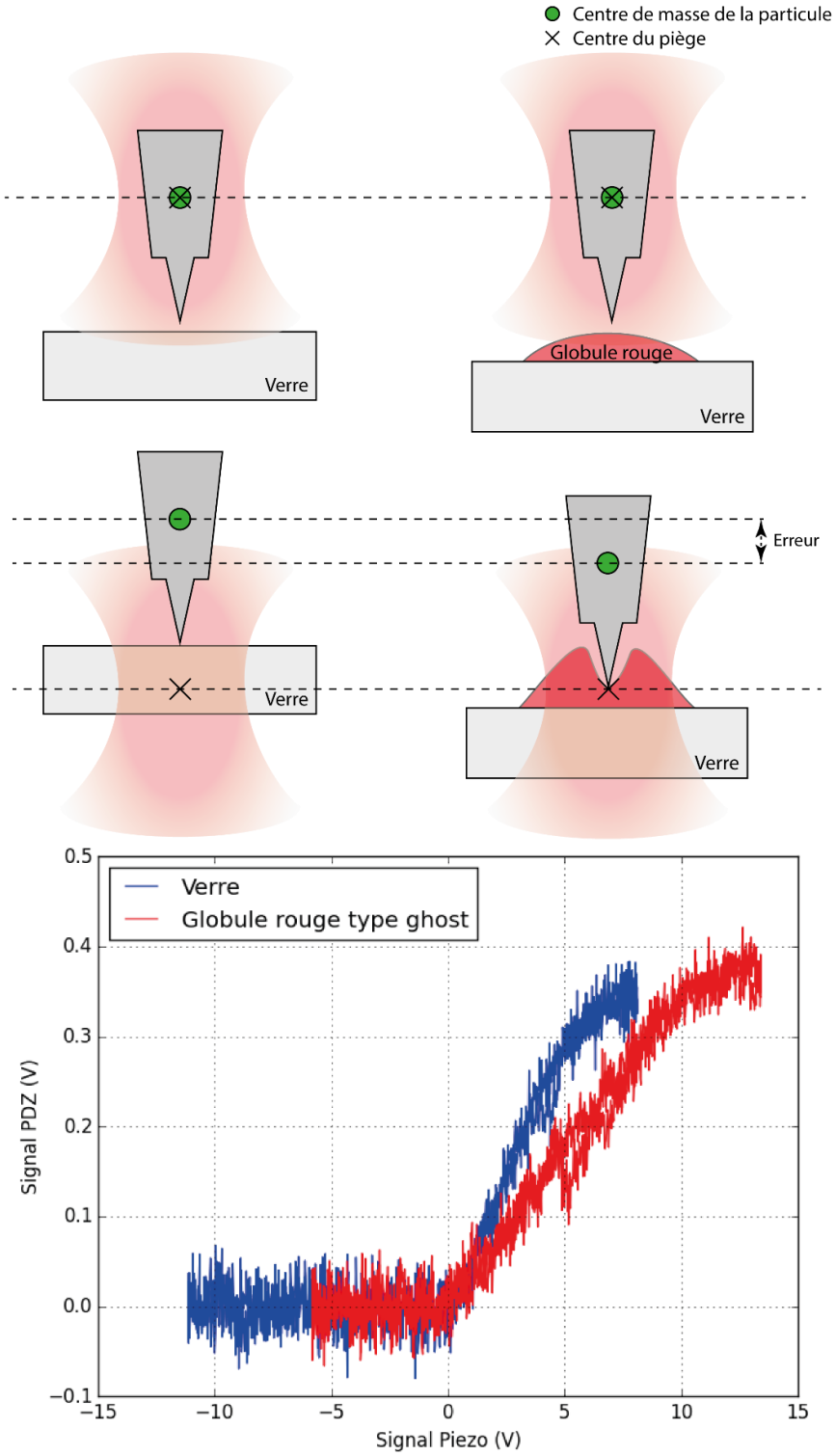


Figure 3-38 : *(en haut) Schéma explicatif de l'erreur commise sur une indentation faite sur du verre et sur un ghost et(en bas) comparaison de deux courbes d'indentations réalisées sur le verre (en bleu) et sur le « ghost » (en rouge). L'amplitude de déplacement est de 2 µm pour les deux indentations. La courbe rouge est décalée pour faire coïncider le point de contact de la pointe avec l'objet.*

Plusieurs résultats de scan sur les globules rouges sont montrés sur la **Figure 3-39**. On observe une topographie générale en forme de demi sphère comme attendu. Celle-ci est due à la PLL qui recouvre la lamelle de verre sur laquelle sont déposées les *ghosts*. Les deux scans qui sont sur la deuxième et troisième ligne sont faits sur un même *ghost* avec des paramètres de scans différents pour la surface

de scan. Celui sur la deuxième ligne est effectué sur une zone de 4x4 µm alors que le deuxième est plus résolu et est fait sur une surface de 2x2 µm. Ce qui est intéressant de souligner c'est que pour les deux scans on arrive à voir la même topographie de « nid d'abeilles » ce qui peut être vu comme le cytosquelette de la cellule. Pour être sûr qu'on a bien réussi à voir cette structure il faut un contrôle négatif, c'est-à-dire une destruction du cytosquelette pour montrer qu'on ne voit plus de structure sous-jacente lorsqu'on scanne la surface.

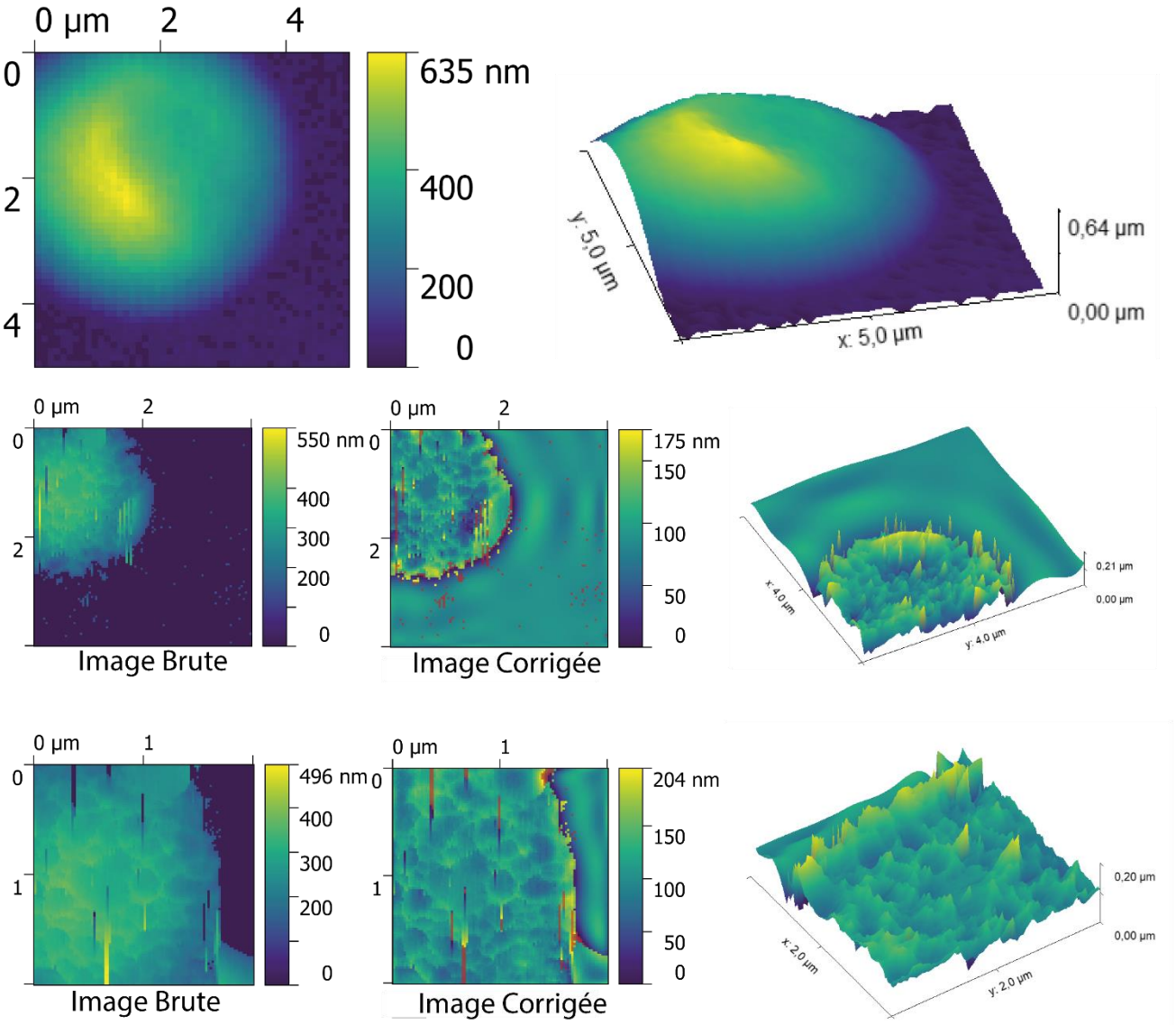


Figure 3-39 : *Scans de globules rouges de type ghost obtenus par PhFM. Le premier (en haut) est fait sur une surface de 5x5 µm avec un pas de 50 nm et les deux autres sont faits sur un même ghost différent du premier. Les zones de scan sont respectivement de 4x4 µm et 2x2 µm avec des pas de 40 nm et 20 nm. Les images corrigées sont générées par Gwyddion, un filtre est appliqué pour soustraire le plan de la topographie générale et les points aberrants sont supprimés. Le logiciel est également utilisé pour construire les images en 3 dimensions.*

Pour le contrôle négatif l'idée est de réaliser quelques scans sur des *ghosts* où l'on distingue une structure de type cytosquelette comme les images sur la **Figure 3-39**; puis sur un nouvel échantillon que l'on aura traité pour détruite le cytosquelette et enfin refaire des scans et montrer qu'aucune structure n'est visible. Sur les conseils de Manouk Abkarian (Chercheur au CBS) j'ai utilisé de l'urée pour détruire le squelette des cellules. L'urée est un composé chimique qui joue un rôle important

dans le métabolisme des composés azotés chez les animaux et est la principale substance contenant de l'azote dans l'urine des mammifères. C'est un solide incolore et inodore, hautement soluble dans l'eau. A forte concentration (4 à 8 mol/L) il est utilisé comme agent dénaturant pour détruire la structure spatiale des acides nucléiques et des protéines. Le cytosquelette des globules étant composé de spectrine, l'urée va provoquer la lyse (destruction) de sa structure.

Le premier objectif est de trouver la bonne concentration en urée pour détruire le cytosquelette du globule sans pour autant détruire la totalité de la cellule afin de faire un scan. Pour le premier essai de concentration, je suis parti sur une solution milliQ + urée à 2,5 mol/L. Le protocole suivi est similaire à celui pour la préparation de la chambre pour le scan. Suite à l'étape d'introduction des globules rouges et leur dépôt sur la surface de la lamelle (10 min) je mets ma solution d'urée et je la laisse faire son travail (10 min). Une fois monté sur le dispositif, je regarde à la camera CMOS l'état de mes globules et si je peux faire du scan. Après vérification, il semble que la dose était trop forte pour mes globules, ceux-ci ce sont flétris et ne semblent pas être bien collés à la surface, comme on le voit sur la photo de la **Figure 3-40 (A)**. Une concentration plus faible est donc nécessaire, pour le deuxième essai je diminue la concentration en urée à 1,5 mol/L. La photo à droite sur la **Figure 3-40 (A)** montre le globule qui semble bien collé sur la surface entraînant la formation d'un *ghost* et sa forme ne semble pas altérée. Les scans sont donc possibles sur cet échantillon. Les deux scans (B) et (C) de la **Figure 3-40** sont effectués sur deux globules rouges de type *ghost* différents. Le premier (B) est fait sur un *ghost* dont on a détruit la structure du cytosquelette avec l'urée concentré à 1,5 mol/L alors que le deuxième est effectué sur un *ghost* qui possède toujours sa structure. Ces résultats montrent bien que les structures qui apparaissent lors de nos scans sur des globules sains (sans altération de la structure) font partie du squelette de la cellule.

Réussir à obtenir de telles images avec notre dispositif est très encourageant pour les prochaines expériences. En AFM obtenir des images du cytosquelette a déjà été démontré par plusieurs méthodes comme je l'ai expliqué plus haut. Maintenant que nous sommes sûrs d'avoir eu le cytosquelette de la cellule il est intéressant de faire une comparaison plus approfondie avec l'AFM.

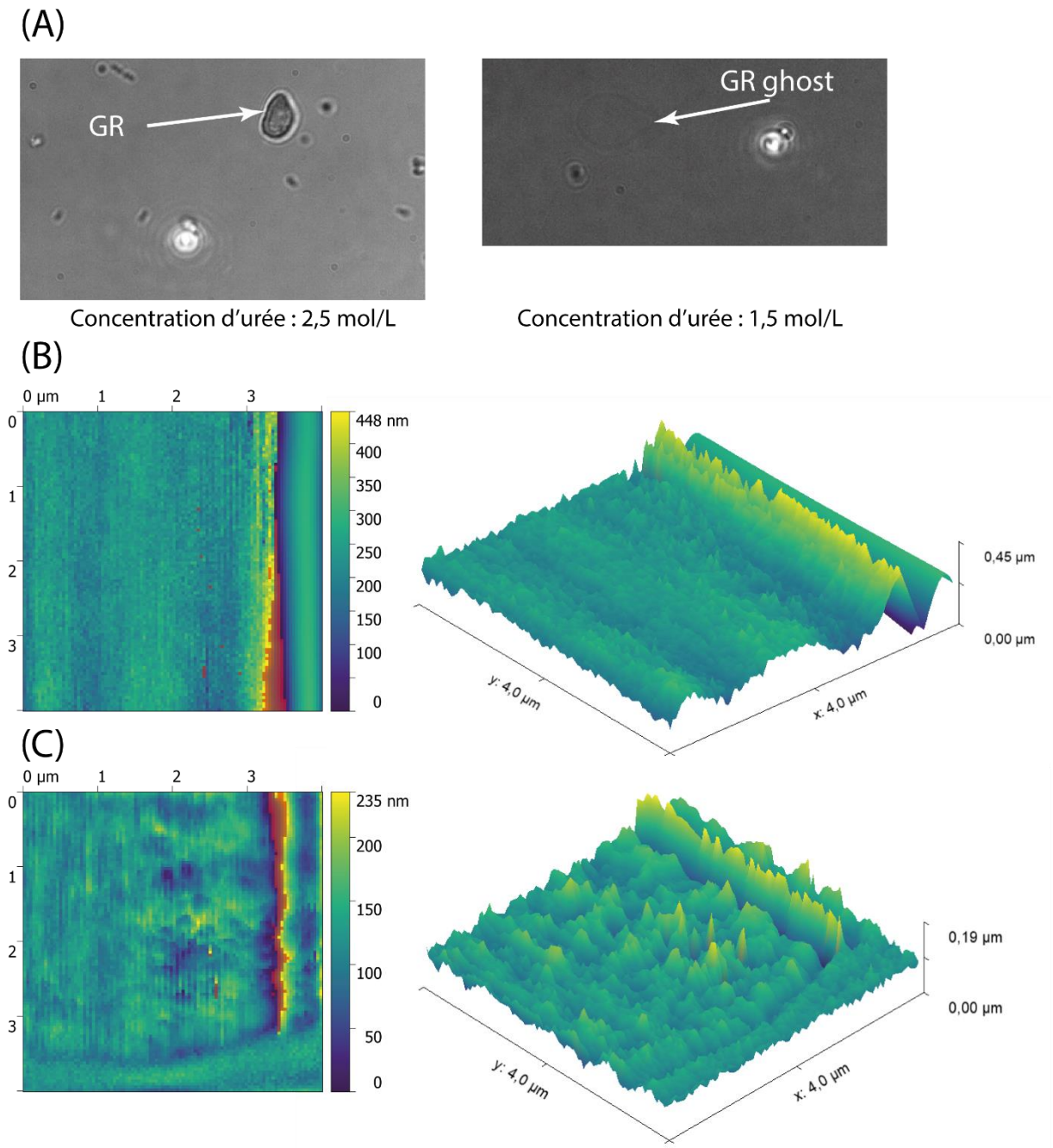


Figure 3-40 : *(A) Photos optiques de globules rouges avec deux concentrations d'urée différentes, à gauche la concentration est trop élevée ce qui provoque la lyse des globules et à droite la concentration est plus faible, on distingue un globule de type ghost sur la surface qui ne semble pas être mort. (B) Scan de surface effectué sur le globule ghost de la photo optique, on ne distingue aucune structure organisée comme c'est le cas sur un autre scan (C) effectué sur un globule qui n'était pas dans de l'urée. Les lignes ou artefacts sur les deux scans sont dus à des problèmes de perte des pointes (collage des pointes sur la surface des ghosts). Les deux scans font 4x4 µm avec un pas de 40 nm et ont été corrigés comme ceux de la* ***Figure 3-39****.*

Comme mentionné plus haut, obtenir des images de cytosquelette par AFM a déjà été fait sur des cellules fixées ou traitées pour les durcir. Dans l'article de Hategan et al. [20]. Ils réussissent à avoir le cytosquelette de cellules non fixées. Comme dans mon cas les cellules sont attachées sur une surface et sont très tendu : elles ont la forme d'une demi-sphère. Le principe de l'acquisition de l'image avec

un AFM, sur une cellule sanguine, est qu'il faut « appuyer » fortement sur le globule pour le déformer et arriver à l'écraser jusqu'à la lamelle sous-jacente. En AFM on raisonne en courbes d'indentations, ces courbes sont en fait des données importantes sur les interactions pointe-échantillon. Elles sont généralement présentées sous la forme de graphique de force appliquée sur l'objet en fonction de la distance pointe-échantillon (exemple sur la **Figure 3-2**). Sur des objets mous comme les globules, l'indentation faite est importante (2 nN) afin de comprimer la couche bilipidique sur le verre pour faire ressortir le cytosquelette lors du balayage de la surface comme sur la **Figure 3-42 (A)**. Les deux images AFM issues de l'article dévoilent le cytosquelette du globule, ces deux balayages sont effectués sur la même zone. Les structures sous-jacentes visibles ont une hauteur de 20 nm (valeur issu de l'article [20]).

Le réseau du cytosquelette présente des alvéoles, la plus petite distance mesurable entre deux nœuds de spectrine est de l'ordre de 80 nm selon l'article de K. Xu *et al.* [23]. Avec les images que nous avons obtenues par PhFM nous mesurons une distance entre deux nœuds d'environ 90 nm. La **Figure 3-41** présente un schéma du réseau de spectrine d'un cytosquelette ainsi que le profil tracé à partir d'une image PhFM. Les distances mesurées sont du même ordre que celle données dans l'article.

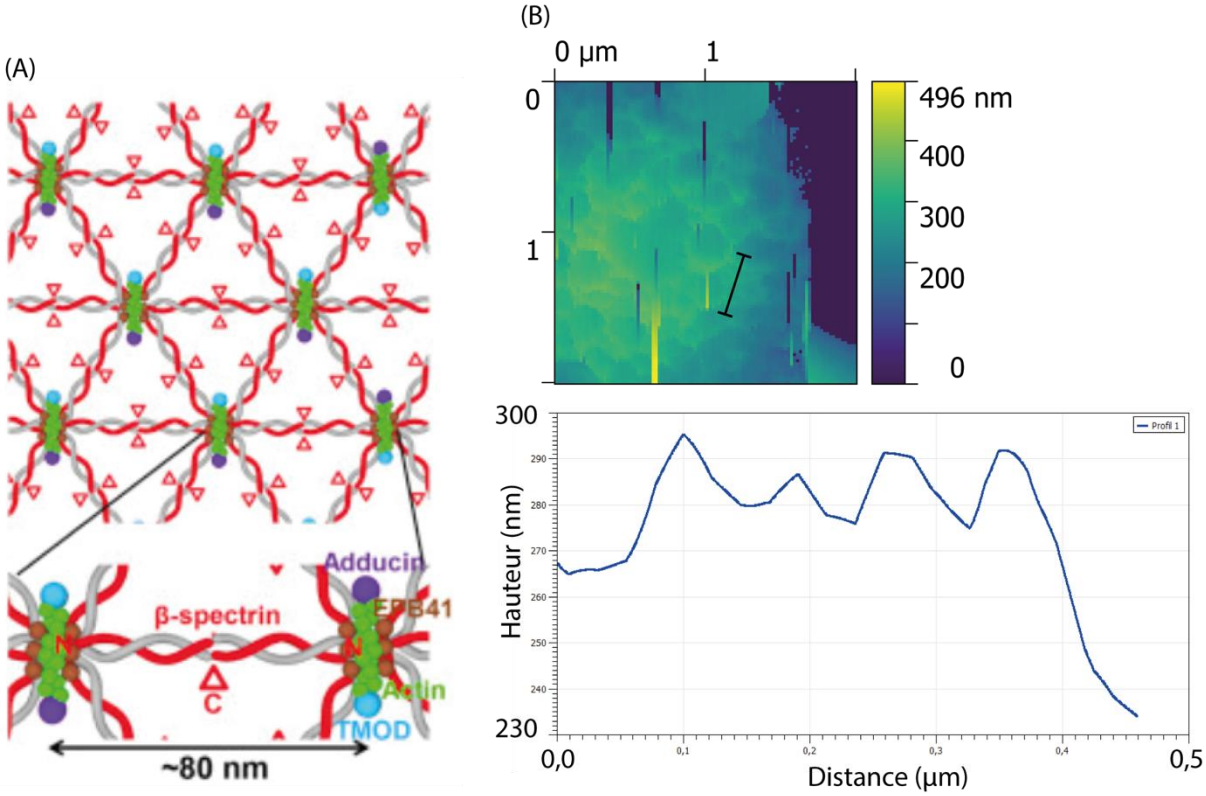


Figure 3-41 : *(A) Schéma issu de l'article de Xu et al. illustrant le réseau de spectrine qui constitue le cytosquelette des globules rouges. La plus petite distance mesurée d'un nœud à l'autre est de 80 nm. (B) Image obtenue par PhFM d'un ghost, le profil tracé en dessous correspond au segment en noir sur l'image. La plus petite distance mesurée ici est d'environ 90 nm.*

Nos images obtenues par PhFM sont semblables à celles de l'article de Hategan *et al.* : on distingue la structure du cytosquelette. Sur l'image de la **Figure 3-42 (B)** la hauteur des structures avoisine la trentaine de nm ce qui est en accord avec l'article. Ici la différence c'est que la force appliquée par la pointe sur l'échantillon est plus faible : 1,5 pN. On ne déforme quasiment pas le globule comme illustré sur le schéma de la **Figure 3-42 (B)**. Cette propriété du dispositif ouvre la porte à tout un champ de possibilités d'imagerie sur des objets biologiques mous. Pour le moment obtenir des images

d'échantillons mous reste encore difficile et il est nécessaire de traiter les cellules (les fixer chimiquement) pour les durcir. De plus, la déformation engendrée par la pointe AFM lors d'un balayage abîme l'échantillon et l'image obtenue n'est pas la réalité de la topographie.

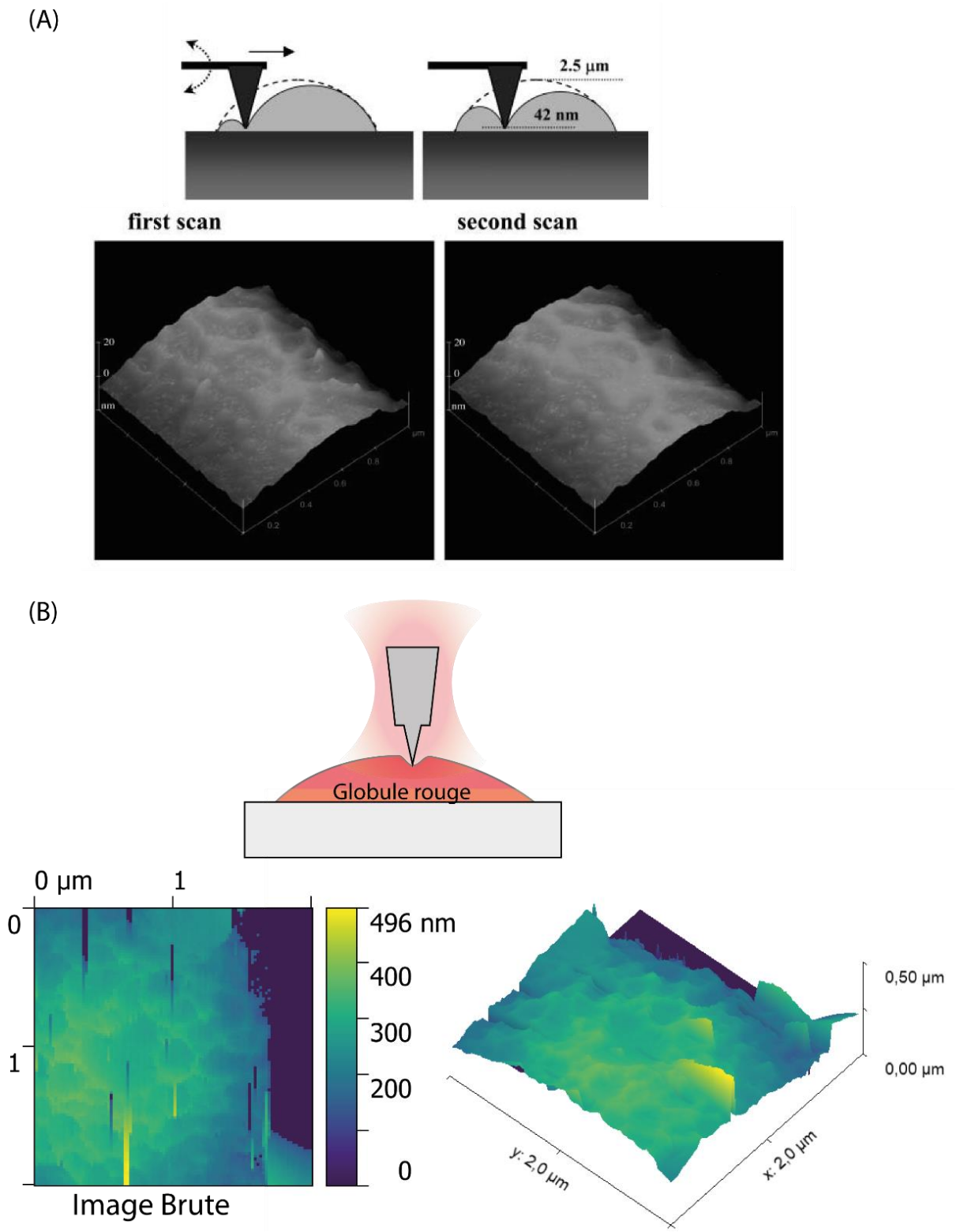


Figure 3-42 : *(A) schéma de la méthode de scanning par AFM sur des globules attachés sur une surface et résultats de deux scans sur un même globule, les deux scans sont effectués sur une surface de 1x1 µm. Images et schéma extraits de l'article de Hategan et al. [20]. (B) Méthode de scan d'un globule rouge de type ghost par PhFM avec le résultat sur une surface de 2x2 µm.*

Pendant tous ces tests de scan de surfaces de cellules sanguines, il est arrivé que certaines structures soient scannées aléatoirement. Sur certains scans il y a de petites appendices qui ressortent du globule. Aux premier abord, on aurait pu penser à un artefact dû à la qualité de la pointe mais pour un couple de scans sur une même zone ces appendices sont apparus par 2 fois aux mêmes endroits. En réalité ces protubérances seraient des vésicules qui apparaissent sur les globules rouges. En biologie, les vésicules sont des organites relativement petits, séparés du cytosol par au moins une bicouche lipidique (similaire à la membrane cytoplasmique). Elle fait partie du cytoplasme, et circulent dans le cytosol où elles peuvent stocker, transporter ou encore digérer des produits et des déchets cellulaires. Il existe plusieurs types de vésicules et elles sont réparties selon leur forme et composition. La plus répandue est de type sphérique avec un diamètre variable de 50 nm à 1 µm [25]. Leur formation est du le plus souvent à un stress physiologique que subit la cellule [26]. Dans notre cas, le globule rouge subit effectivement un stress car il est tendu sur un surface recouverte de PLL entraînant la formation de *ghosts*, il est donc normal de générer ce type de microparticules dérivées des globules rouges. Sur la photo optique de la **Figure 3-43 (A)** on voit le *ghost* sur lequel j'ai fait deux balayages de surfaces (**Figure 3-43 (B), (C)**). Il en ressort deux vésicules d'environ 60 nm de haut.

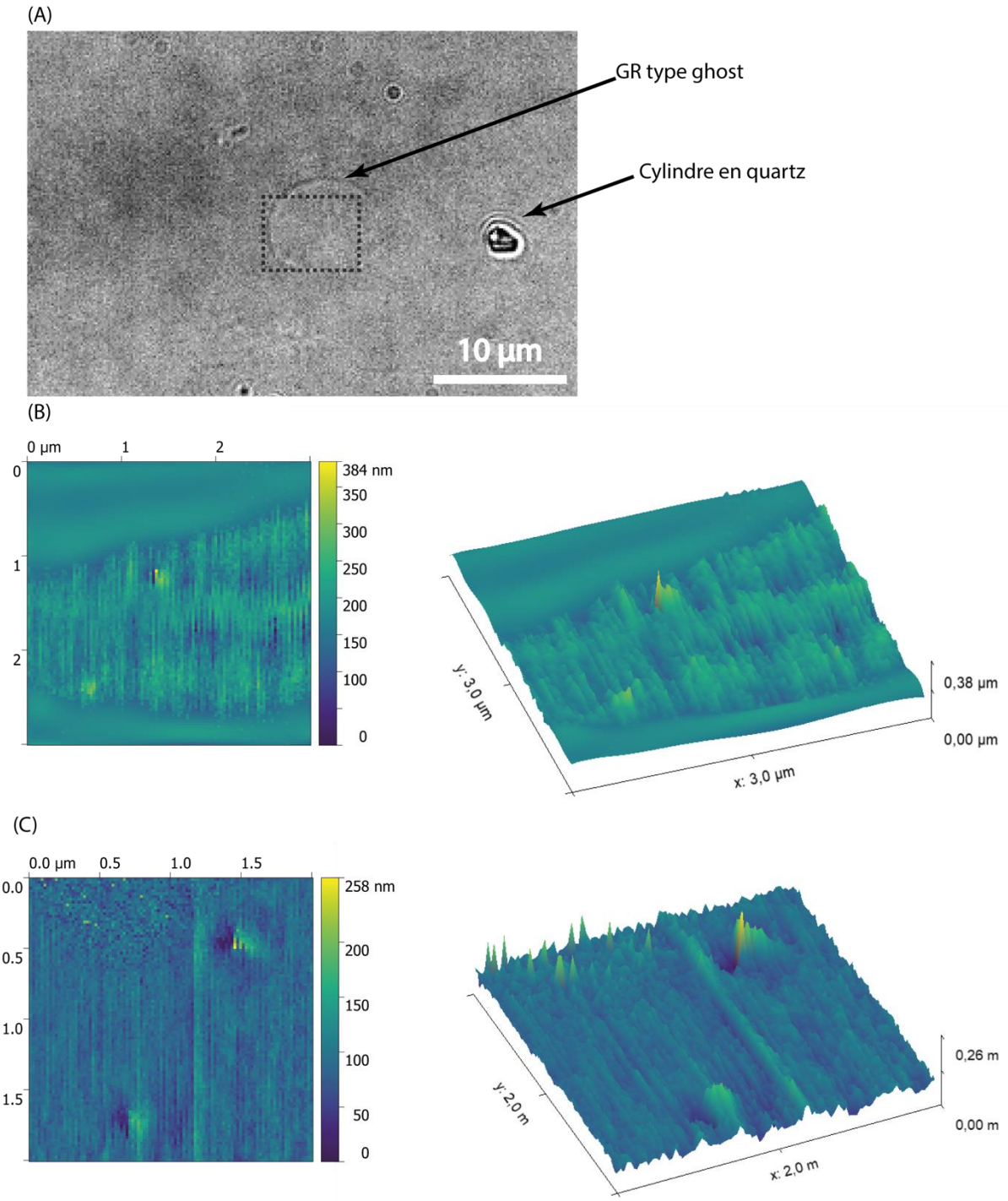


Figure 3-43 : *Scan de vésicules. (A) photo optique du ghost que je scanne prise par la camera du dispositif optique, le carré en pointillé noir est la zone de travail. (B) Premier scan effectué sur le ghost sur une surface de 3x3 µm avec un pas de 30 nm et (C) le deuxième scan sur une zone plus restreinte de 2x2 µm avec un pas de 20 nm.*

- **Scan de globules infectés**

Le fait qu'il soit possible de scanner ces vésicules avec le PhFM nous a donné une idée pour approfondir encore plus l'étude sur les globules rouges. La dynamique des globule rouges est très intéressante, ils sont hautement déformables et lorsqu'ils sont infectés par certains parasites ils se déforment d'une façon particulière. Par exemple, lors d'une infection au paludisme, maladie infectieuse due à un

parasite du genre Plasmodium, les globules rouges sont directement touchés. Les parasites (sous la forme mérozoïtes) s'accolent aux globules rouges, les envahissent, s'y développent en trophozoïtes puis s'y divisent (schizontes) jusqu'à provoquer l'éclatement de celui-ci créant une quantité de nouveaux parasites qui vont à leur tour infecter d'autres globules. Le fait intéressant dans cette infection c'est que lorsqu'un globule est infecté des petites protubérances ressortent à sa surface Voir les photos de la **Figure 3-44**). Elles forment comme des petits boutons appelés *« knobs »* en anglais. Généralement, les images AFM de ces objets sont obtenues à partir de globules fixés chimiquement et les boutons ont des hauteurs variables de 5 à 50 nm.

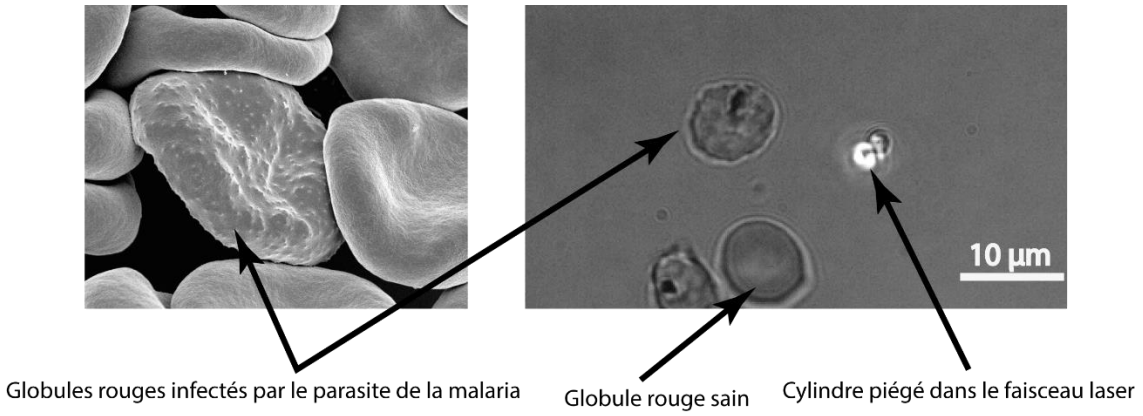


Figure 3-44 : *Photo MEB (à droite) et photo optique (à gauche) de globules rouges infectés par le paludisme. La photo MEB est issus d'internet.*

Il est possible d'utiliser le dispositif de pince optique pour scanner des globules parasités et ainsi voir leur état de surface. Avoir des cellules malades n'est pas chose aisée et beaucoup de précautions sont à prévoir car toute contamination serait problématique pour l'utilisateur. Pour se prémunir de toute contamination l'utilisateur doit s'équiper : d'une blouse, des gants, des lunettes de protection ainsi que d'un masque. Chaque objet (pipettes, papier, pince…) qui est entré en contact avec le sang contaminé doit être jeté dans une solution de javel afin de détruire les parasites.

Les premiers tests sont effectués sur des globules rouges infectés fixés pour avoir une idée au préalable des paramètres de scan. Les échantillons fixés ne sont plus aussi mous et sont plus simples à scanner. Ici les précautions à prendre ne sont plus aussi drastiques, les globules fixés sont morts, figés au stade de trophozoïte. Le protocole pour les introduire dans la chambre liquide qui va dans le PhFM est le même que celui pour des globules sains. Les globules infectés apparaissent plus foncés sur la caméra et on distingue la vacuole parasitaire à l'intérieur. Les parasites « mangent » l'hémoglobine du globule rouges, il y a donc des zones transparentes sur les cellules. Ce sont ces zones que je scanne car elles ne perturbent que très peu le laser. Des scans sur des surfaces petites (2x2 µm²) sont effectués. Le résultat d'un scan sur globule infecté fixé est exposé sur la **Figure 3-45 (A)**, On distingue plusieurs boutons de 25 nm de haut ce qui est en accord avec l'article de Rug [27]. Il est donc possible d'observer des *knobs* grâce au PhFM, les conditions de scan pour obtenir cette première image sont enregistrées et nous pouvons passer aux cellules non-fixées, donc vivantes. Le protocole suivi par Mme C. Breton-braun (chercheuse à l'université de Montpellier) pour la production de globules rouges infectés est le suivant :

La souche 3D7 de Plasmodium falciparum est cultivée dans des globules rouges humains en conditions standard [28] en milieu complet MC (RPMI 1640 additionné de 25mM HEPES, 0.5% albumax I, 100mM hypoxanthine - Sigma-Aldrich, 10 mg/mL gentamicin - Invitrogen). Les parasites sont synchronisés par traitement hebdomadaire des cultures au sorbitol 5% [29] ; les érythrocytes infectés sont récoltés et purifiés à plus de 95% de parasitémie sur colonne Variomacs (Milteny) au stade trophozoïte mûr-jeune

schizonte (33 à 36 heures post-invasion), lavés en milieu MC puis remis en suspension à un hématocrite de 1% en milieu MC.

Les expériences sur ce type d'échantillons doivent s'effectuer sur une seule journée car les globules infectés sont vivants et les parasites continuent de se transformer et dépassent le stade de trophozoïte, stade auquel les *knobs* apparaissent. Un scan est montré sur la **Figure 3-45 (B)**, les *knobs* apparaissent sur l'image et prennent la forme de petites protubérances à la surface du globule. Il est important de souligner que ces cellules ne sont pas fixées, ici nous observons l'état de surface d'un globule infecté vivant. Les deux scans exposés sur la **Figure 3-45** (C) et (D) sont effectués sur le même globule. Nous pouvons remarquer que les structures apparaissent aux mêmes endroits de la cellule. Ces résultats nous permettent de nous assurer de la reproductibilité de nos mesures. Nous sommes capables d'obtenir la topographie de globules infectés et en particulier les structures fines (environ 20 nm) formées par les *Knobs.*

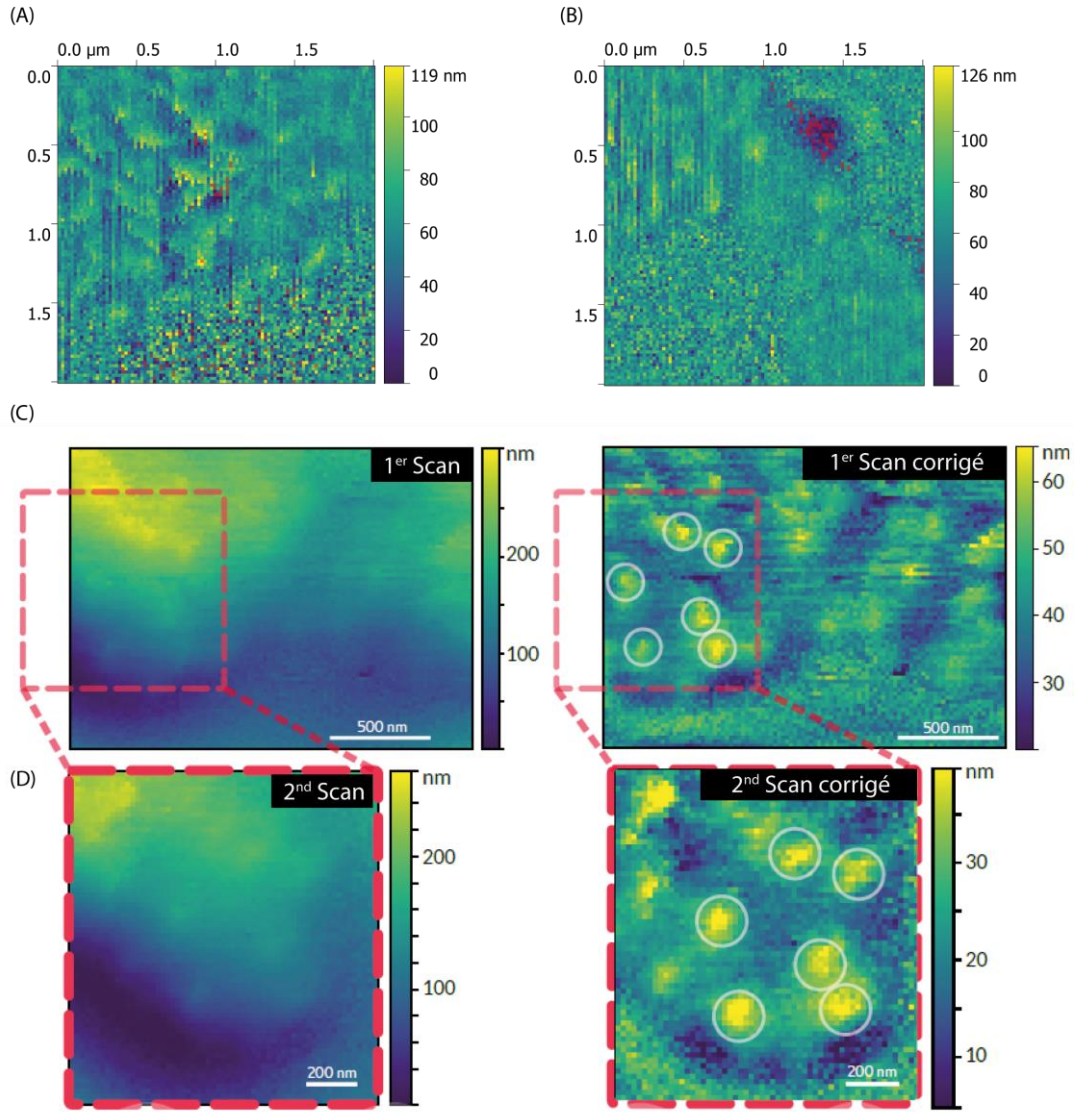


Figure 3-45 : *Expériences de scans de surfaces sur des globules rouges infectés par le virus de la malaria. (A) Résultat d'un scan effectué sur un globule infecté fixé au gluturaldéhyde. (B) le scan est effectué sur une cellule non fixée. (C) et (D) sont deux scans effectués sur la même cellule infectée. La correction des images consiste en la soustraction du plan de topographie générale.*

3.6. Conclusion et analyse

Dans ce chapitre j'ai montré comment fabriquer des particules de quartz capables de faire du balayage de surfaces à l'aide de pinces optiques aussi bien sur des échantillons durs (lamelles de verre gravées) que mous (globules rouges). Les micro-cylindres obtenus par combinaison de gravure plasma et gravure humide disposent d'une pointe de rayon de courbure d'environ 35 nm. La partie cylindrique est de 2 µm de haut pour un diamètre de 1,4 µm à la base. L'utilisation de la lithographie interférentielle a permis une fabrication collective des cylindres (environ 60 millions par échantillon). Les pointes faites en silice amorphe sont visibles sur toute les particules fabriquées, c'est lors de l'étape de clivage des particules qu'on est susceptible de les casser. Lorsqu'elles sont en solution le pourcentage de pointes encore sur le cylindre est d'environ 26 %.

Une fois piégées les pointes s'orientent dans l'axe de propagation du faisceau laser ce qui permet le balayage de surfaces. Deux états de stabilité sont accessibles dans le piège : pointe vers le haut et pointe vers le bas, mais nous avons vu qu'il est possible à la fois de détecter ce sens et de faire pivoter les particules pour qu'elles soient piégées pointe vers le bas. Les premiers tests de balayage de surfaces ont été effectués sur des lamelles de verre sur lesquelles des structures de 100 nm étaient gravées (agglomérats de billes). Les résultats exposés dans la partie **3.4** montrent qu'il est possible d'obtenir des images sur ces structures fines. La comparaison avec l'AFM nous a permis de conclure que le dispositif était fonctionnel avec une résolution spatiale toutefois inférieure mais qui s'approche de l'état de l'art des mesures AFM dans l'air.

Le point fort du PhFM réside dans la possibilité de faire des images sur des surfaces molles. La force appliquée par la pointe sur l'échantillon étant faible (environ 1,5 pN) un objet mou ne sera pas déformé. Le meilleur exemple est la capacité de faire des images de globules rouges non fixés adhérés sur une surface. La structure du cytosquelette sous-jacent est visible sur les images obtenues sans pour autant déformer la topographie générale de la cellule.

Pour finir des premiers tests sur des globules infectés par le virus de la malaria ont été faits et les résultats des scans montrent des petits boutons sur la surface des globules. On a donc bien une preuve que le dispositif peut sonder des structures de petites tailles sur des objets mous.

Le principal problème que j'ai rencontré pendant ces manipulations est la perte de la pointe sur l'échantillon. A plusieurs reprise la pointe se colle sur la surface et il est quasiment impossible de la récupérer. Pour l'avenir une étude plus approfondie sur la passivation de nos pointes serait une bonne chose et nous permettrait d'oublier ce problème et ainsi d'exploiter les extraordinaires capacités de cet outil d'imagerie.

[1] E.-L. Florin, A. Pralle, J. K. Heinrich Hörber, et E. H. K. Stelzer, « Photonic Force Microscope Based on Optical Tweezers and Two-Photon Excitation for Biological Applications », *Journal of Structural Biology*, vol. 119, n° 2, p. 202-211, juill. 1997, doi: 10.1006/jsbi.1997.3880.
[2] A. Rohrbach, C. Tischer, D. Neumayer, E.-L. Florin, et E. H. K. Stelzer, « Trapping and tracking a local probe with a photonic force microscope », *Review of Scientific Instruments*, vol. 75, n° 6, p. 2197-2210, juin 2004, doi: 10.1063/1.1753097.
[3] L. P. Ghislain et W. W. Webb, « Scanning-force microscope based on an optical trap », *Optics Letters*, vol. 18, n° 19, p. 1678, oct. 1993, doi: 10.1364/OL.18.001678.
[4] Z. Santybayeva *et al.*, « Fabrication of quartz microcylinders by laser interference lithography for angular optical tweezers », *Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS*, vol. 15, n° 3, p. 034507, sept. 2016, doi: 10.1117/1.JMM.15.3.034507.
[5] G. Binnig, C. F. Quate, et Ch. Gerber, « Atomic Force Microscope », *Physical Review Letters*, vol. 56, n° 9, p. 930-933, mars 1986, doi: 10.1103/PhysRevLett.56.930.
[6] E. Florin, V. Moy, et H. Gaub, « Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs », *Science*, vol. 264, n° 5157, p. 415-417, avr. 1994, doi: 10.1126/science.8153628.
[7] Q. Zhong, K. Kjoller, et V. B. Ehngs, « Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy », p. 5.
[8] C. A. Putman, K. O. van der Werf, B. G. de Grooth, N. F. van Hulst, et J. Greve, « Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy », *Biophysical Journal*, vol. 67, n° 4, p. 1749-1753, oct. 1994, doi: 10.1016/S0006-3495(94)80649-6.
[9] A. M. Sweetman *et al.*, « Mapping the force field of a hydrogen-bonded assembly », *Nature Communications*, vol. 5, n° 1, sept. 2014, doi: 10.1038/ncomms4931.
[10] M. Takeuchi, H. Miyamoto, Y. Sako, H. Komizu, et A. Kusumi, « Structure of the Erythrocyte Membrane Skeleton as Observed by Atomic Force Microscopy », *Biophysical Journal*, vol. 74, n° 5, p. 2171-2183, mai 1998, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77926-3.
[11] L. Friedrich et A. Rohrbach, « Surface imaging beyond the diffraction limit with optically trapped spheres », *Nature Nanotechnology*, vol. 10, n° 12, p. 1064-1069, déc. 2015, doi: 10.1038/nnano.2015.202.
[12] Y. Cao, A. B. Stilgoe, L. Chen, T. A. Nieminen, et H. Rubinsztein-Dunlop, « Equilibrium orientations and positions of non-spherical particles in optical traps », *Optics Express*, vol. 20, n° 12, p. 12987, juin 2012, doi: 10.1364/OE.20.012987.
[13] R. Legtenberg, H. Jansen, M. de Boer, et M. Elwenspoek, « Anisotropic Reactive Ion Etching of Silicon Using SF6/O2/CHF3 Gas Mixtures », *J. Electrochem. Soc.*, vol. 142, n° 1, p. 9, 1995.
[14] K. R. Williams, K. Gupta, et M. Wasilik, « Etch rates for micromachining processing-part II », *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 12, n° 6, p. 761-778, déc. 2003, doi: 10.1109/JMEMS.2003.820936.
[15] H. Oh, G. Kim, H. Seo, Y. Song, K. Lee, et S. S. Yang, « Fabrication of micro-lens array using quartz wet etching and polymer », *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 164, n° 1-2, p. 161-167, nov. 2010, doi: 10.1016/j.sna.2010.10.003.
[16] P. Rangsten, C. Hedlund, I. V. Katardjiev, et Y. Bäcklund, « Etch rates of crystallographic planes in *Z* -cut quartz - experiments and simulation », *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 8, n° 1, p. 1-6, mars 1998, doi: 10.1088/0960-1317/8/1/001.
[17] P. C. Seitz, E. H. K. Stelzer, et A. Rohrbach, « Interferometric tracking of optically trapped probes behind structured surfaces: a phase correction method », *Applied Optics*, vol. 45, n° 28, p. 7309, oct. 2006, doi: 10.1364/AO.45.007309.
[18] T. D. C. Company, « ORGANOSILANE TECHNOLOGY IN COATING APPLICATIONS », p. 16.
[19] E. P. Plueddemann, *Silane coupling agents.* Place of publication not identified: Springer-Verlag New York, 2013.
[20] A. Hategan, R. Law, S. Kahn, et D. E. Discher, « Adhesively-Tensed Cell Membranes: Lysis Kinetics and Atomic Force Microscopy Probing », *Biophysical Journal*, vol. 85, n° 4, p. 2746-2759, oct. 2003, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74697-9.

[21] A. H. Swihart, J. M. Mikrut, J. B. Ketterson, et R. C. Macdonald, « Atomic force microscopy of the erythrocyte membrane skeleton », *Journal of Microscopy*, vol. 204, nº 3, p. 212-225, déc. 2001, doi: 10.1046/j.1365-2818.2001.00960.x.
[22] J. E. Ortega, P. Barrón-González, M. A. Gracia-Pinilla, E. Pérez, et A. López-Aldrete, « Biological samples observed in vitro by Atomic Force Microscopy: Morphology and Elastic Properties », p. 10, 2014.
[23] L. Pan, R. Yan, W. Li, et K. Xu, « Super-Resolution Microscopy Reveals the Native Ultrastructure of the Erythrocyte Cytoskeleton », *Cell Reports*, vol. 22, nº 5, p. 1151-1158, janv. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.107.
[24] G. Schwoch et H. Passow, « Preparation and properties of human erythrocyte ghosts », *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 2, nº 2, p. 197-218, déc. 1973, doi: 10.1007/BF01795474.
[25] N. Arraud *et al.*, « Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration », *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 12, nº 5, p. 614-627, mai 2014, doi: 10.1111/jth.12554.
[26] M. Westerman et J. B. Porter, « Red blood cell-derived microparticles: An overview », *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 59, p. 134-139, juill. 2016, doi: 10.1016/j.bcmd.2016.04.003.
[27] M. Rug, « The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of P falciparum-infected human erythrocytes », *Blood*, vol. 108, nº 1, p. 370-378, juill. 2006, doi: 10.1182/blood-2005-11-4624.
[28] W. Trager et J. Jensen, « Human malaria parasites in continuous culture », *Science*, vol. 193, nº 4254, p. 673-675, août 1976, doi: 10.1126/science.781840.
[29] C. Lambros et J. P. Vanderberg, « Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture », *J. Parasitol.*, vol. 65, nº 3, p. 418-420, juin 1979.

4. La lithographie Talbot

Au cours de mes recherches sur la fabrication de micro-cylindres et micro-pointes j'ai mis en place une nouvelle technique de lithographie qui permet de faire des motifs périodiques sur une large zone en peu de temps à bas coût. Elle est basée sur le principe de la lithographie Talbot [1] qui permet d'obtenir des motif périodiques originaux en tirant partie des interférences générées à partir d'un réseau de trous dans un masque opaque [2]. Ici je présente une nouvelle méthode pour créer des nano-motifs hiérarchiques 2D avec un simple moule en PDMS constitué d'une réplique d'un réseau et d'un séparateur. Cette technique tire parti de l'effet Talbot, mais en n'utilisant pas un masque opaque mais un réseau régulier de cavités cylindriques dans le PDMS qui fait office de masque à décalage de phase. En combinant ce masque à décalage de phase en PDMS (Polydiméthylsiloxane) et un séparateur pour séparer le masque de la résine photosensible, nous pouvons exploiter les nombreuses interférences qui se créent à distance du plan du masque pour générer des structures plus petites que le réseau initial.

Dans cette partie je vais décrire la technique de lithographie en question en abordant d'abord l'état de l'art et le principe physique puis la mise en place et le protocole mis au point et enfin mes résultats d'exposition.

4.1. État de l'art : l'effet Talbot et son utilisation

- **Le principe de l'effet Talbot.**

L'effet Talbot est un phénomène de diffraction de la lumière par un réseau périodique de trous. Lorsqu'une onde plane passe au travers d'un réseau de diffraction, l'image de ce réseau se répète périodiquement. La période d'occurrence des images du réseau initial représente la « Longueur de Talbot » et l'image du réseau est appelée « image Talbot » [3]. Pour certaines fractions entières de la zone Talbot, la fréquence spatiale de l'image est un multiple de la fréquence du réseau ce qui permet de reconstruire l'image du réseau déphasé d'une demie période ou encore d'avoir un réseau avec une période spatiale réduite de moitié. Cet ensemble d'images Talbot constitue la zone Talbot, parfois appelée le tapis de Talbot, illustré sur la ***Figure 4-1***. L'effet Talbot est une conséquence de la diffraction de Fresnel, la longueur de la zone Talbot peut être calculée par la formule suivante :

$$Z_t = \frac{2a^2}{\lambda}$$

Avec, a la période du réseau et λ la longueur d'onde de la lumière incidente. Dans le cas où la période du réseau est comparable à la longueur d'onde il est nécessaire d'utiliser la formule suivante pour limiter les erreurs :

$$Z_t = \frac{\lambda}{1 - \sqrt{1 - \frac{\lambda^2}{a^2}}}$$

Grâce à cet effet de diffraction une nouvelle technique de lithographie a vu le jour : la lithographie Talbot. Tirant parti des interférences il est possible de réaliser des structures complexes avec une haute résolution (motif de 10 nm) et ainsi lever la limitation de Rayleigh vis-à-vis de la longueur d'onde d'éclairement.

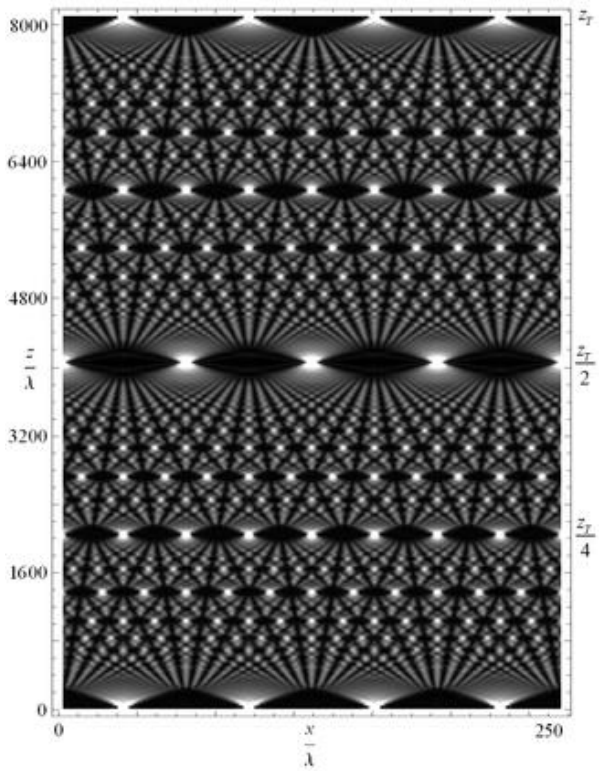


Figure 4-1 : *Simulation de la diffraction de la lumière par un réseau périodique, génération du tapis de Talbot. Cette image est tirée de Wikipedia (https://en.wikipedia.org/wiki/Talbot_effect)*

- **Les techniques de lithographie Talbot**

Principalement utilisées pour reproduire un réseau périodique sur un échantillon les techniques de lithographie se basant sur l'effet Talbot requièrent, le plus souvent, un équipement lourd. Dans l'article de Fucetola et al. [4], afin de produire des réseaux sur leur échantillon ils ont mis au point un équipement complet très précis (déplacement de 1 nm) afin de pouvoir se placer exactement à une période Talbot de distance masque-échantillon. Ce système, appelé CDL : Coherent Diffraction Lithography, permet aussi d'aligner précisément le masque avec l'échantillon si certains alignements par rapport à des structures déjà existantes sont nécessaires.

Une autre technique tirant parti de l'effet Talbot : lithographie Talbot en déplacement (DTL pour « *Talbot Displacement Lithography* » en Anglais) permet d'obtenir des motifs périodiques plus petits que le masque original [1]. La création de structures périodiques se fait en déplaçant l'échantillon d'une période Talbot pendant l'insolation au travers d'un masque constitué de trous comme illustré sur la **Figure 4-2 (A)**. Ce déplacement conduit à l'addition de toutes les images composant le tapis de Talbot, résultant en un motif périodique indépendant de l'écart entre l'échantillon et le masque. L'image finale obtenue est différente du réseau original. Pour un motif de réseau unidimensionnel (réseau constituant le masque photo lithographique), l'image finale est liée à la convolution de la fonction de transmission du réseau avec elle-même. Les deux photos (A) et (B) de la **Figure 4-2** présentent une structure périodique fabriquée par DTL.

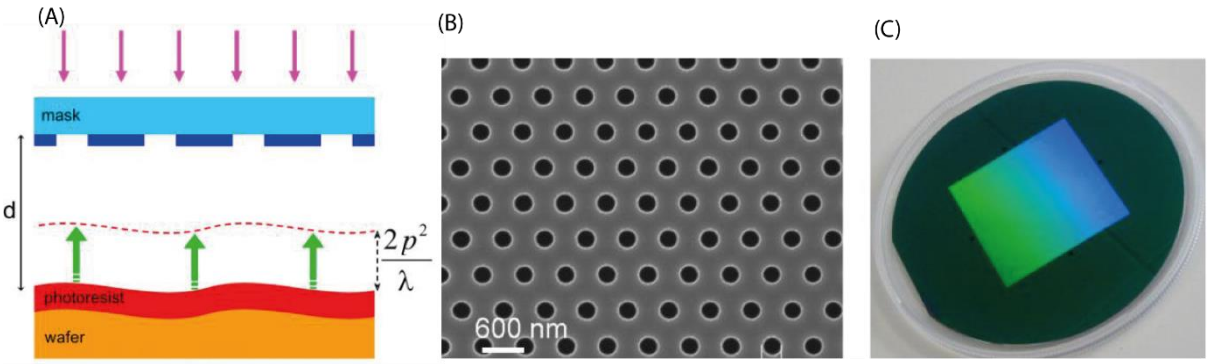


Figure 4-2 : *Figures tirées de l'article de Solak et al. [1]. (A) schéma du principe de la DTL, avec p le pas du réseau et λ la longueur d'onde d'insolation. (B) Photo MEB d'un motif réalisé par la DTL, c'est un réseau de trous de 300 nm de diamètre, le masque utilisé pour obtenir ce type de motif est composé de trous dans une fine couche opaque. (C) un échantillon photographié après la DTL sur un wafer 4''.*

La lithographie Talbot en déplacement permet non seulement de faire des structures périodiques mais aussi des motifs quasi périodiques en effectuant plusieurs expositions successives en décalant le masque d'un certain angle entre deux expositions *[5]* comme on peut le voir sur le schéma de la **Figure 4-3 (A)**. Ce type de structures est très intéressant car les motifs périodiques offrent, selon les dimensions et la forme du réseau, des propriétés particulières de diffusion de la lumière ou encore de surperhydrophobie *[6], [7]*.

En combinant plusieurs expositions décalées d'un angle particulier entre elles, il est possible de réaliser des structures originales comme des motifs de Moiré illustrés sur les photos MEB **(B)** et **(C)** de la **Figure 4-3**.

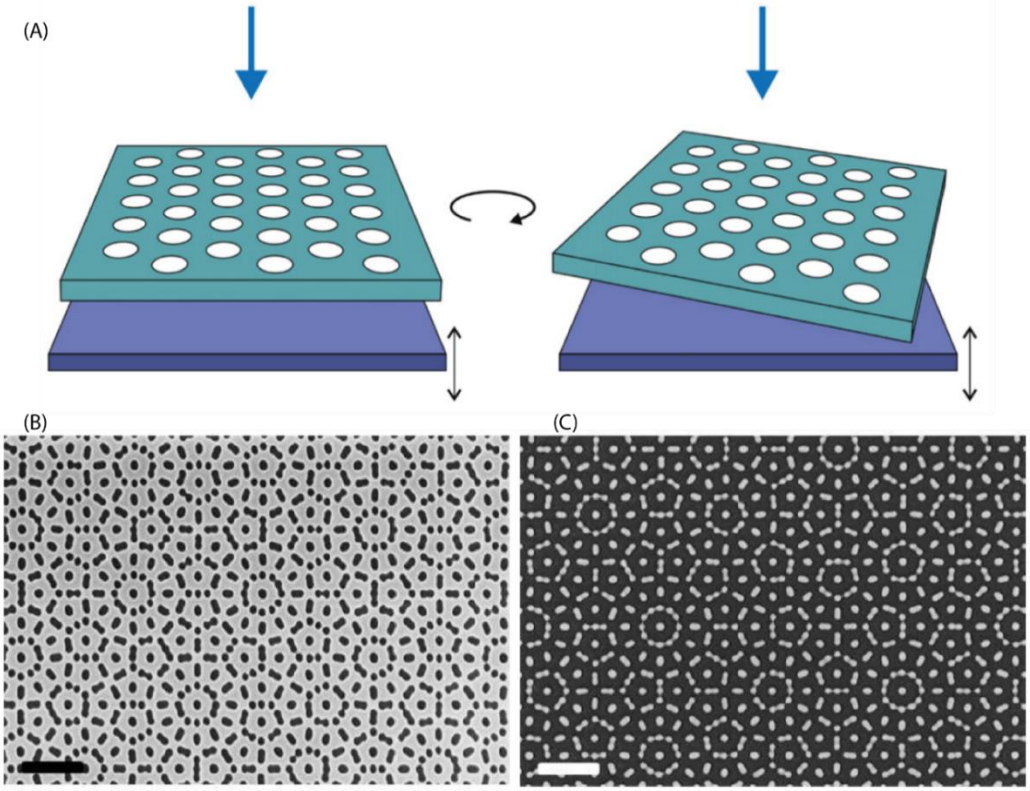


Figure 4-3 : *DTL avec rotation du masque entre chaque expositions. (A) schéma du principe de la technique et les structures générées par une double exposition avec une rotation du masque de 30 ° entre les deux pour une résine positive (B) et négative (C). Les figures sont tirées de l'article de Dais et al. [5]*

Grâce à l'effet Talbot on a vu qu'il est possible de reproduire des réseaux périodiques sur de larges surfaces. On remarque aussi sur le tapis de Talbot de la ***Figure 4-1*** qu'à l'intérieur de la zone Talbot des sous réseaux, fractions du réseau initial, apparaissent. En se plaçant à ces distances particulières il est possible d'insoler la résine photosensible d'un échantillon. On peut donc réduire le pas du réseau initial ou encore créer des motifs particuliers [2]. L'utilisation d'un séparateur permet d'avoir un contrôle sur la distance masque-échantillon et donc de sélectionner un motif particulier dans la zone Talbot. Dans l'article de Jeon et al. [2], ils utilisent un réseau de plots fabriqués en polymère transparent (NOA 68, *Norland Products*) qui diffracte la lumière et créé la figure d'interférences Talbot. Les séparateurs (*spacer* en Anglais) sont faits de PDMS, ils les placent de part et d'autre l'échantillon et le masque comme illustré sur le schéma du dispositif de la **Figure 4-4**. En contrôlant la hauteur de ces écarteurs, il est possible de « sélectionner » une tranche d'interférences qui insolera la résine. La simulation de la **Figure 4-4** illustre les interférences générées par un réseau de plot dans l'axe z, c'est-à-dire en profondeur. En observant par la tranche, les interférences dessinent un motif complexe dans le plan (xy) qui peut être transféré sur la résine. Pour chaque image MEB de la **Figure 4-4** ils font correspondre le plan d'interférences simulé correspondant.

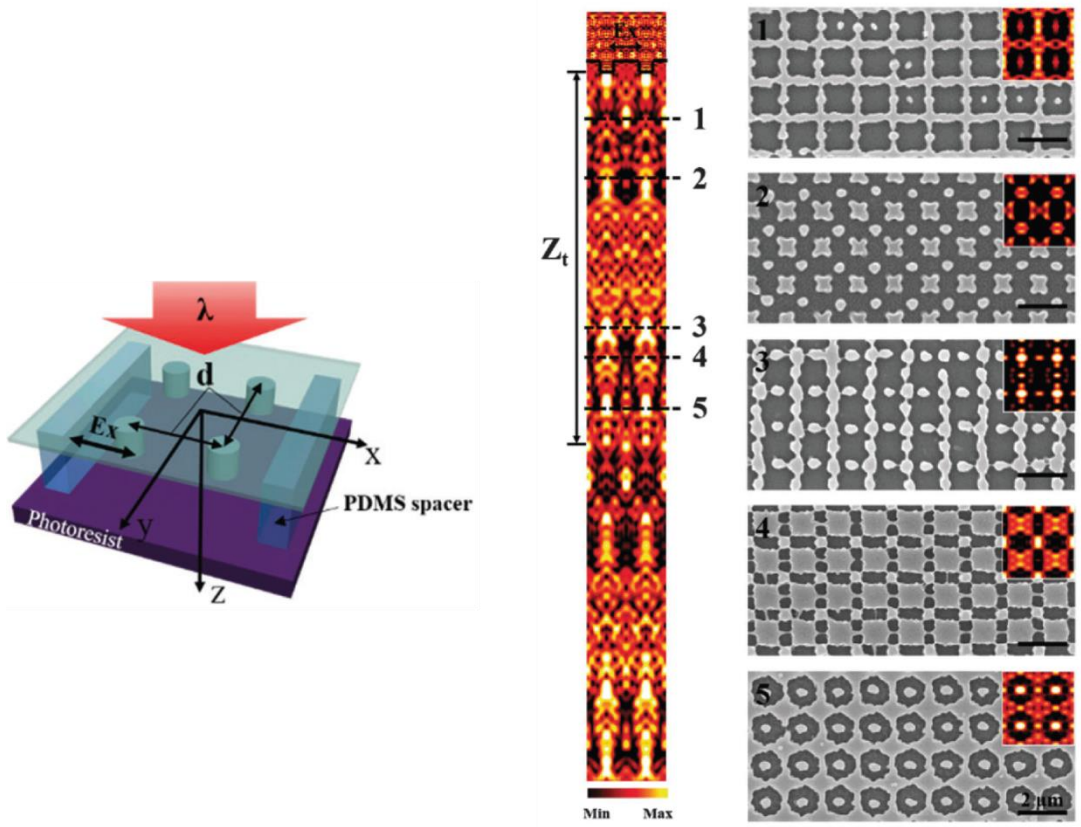


Figure 4-4 : *Dispositif, simulation et Photos issus de l'article de Jeon et al. [2] le schéma gauche représente le dispositif mis en place pour faire la lithographie et au centre on a une simulation FDTD du tapis de Talbot généré par leur réseau de plots avec un pas de 500 nm. Les photos MEB sur la droite sont des motifs réalisés sur les tranches du tapis notées de 1 à 5.*

Les structures fabriquées présentent des motifs originaux obtenus sur de larges surfaces (de l'ordre du cm²) en peu de temps. Obtenir de tels motifs est un enjeu important dans le domaine de la microfabrication où l'on cherche toujours à concevoir des méthodes simples et accessibles pour construire des structures toujours plus complexes ayant des propriétés particulières. Les nanostructures périodiques et hiérarchiques qui résultent de ce genre de lithographie sont prometteuses pour un large éventail d'applications. Par exemple, les nanostructures périodiques

peuvent être potentiellement utilisées pour des applications photoniques biomimétiques telles que la coloration structurelle trouvée chez les papillons Morpho [8]. Dans le cadre de mes recherches j'ai fabriqué beaucoup de réseaux périodiques par lithographie interférentielle dans le but de fabriquer des cylindres. Le motif prend la forme de disques périodiques dont le pas est ajustable. Désirant simplifié au possible mon procédé de fabrication, j'ai développé une technique de lithographie Talbot utilisant un masque en PDMS pour créer les interférences et ainsi reproduire des structures de disques périodiques en très peu de temps avec une bonne reproductibilité.

4.2. La lithographie Talbot via un masque de PDMS

La plupart des techniques décrites plus haut nécessitent un équipement lourd avec une très grande précision pour déplacer l'échantillon résiné, sauf dans le dernier cas où la technique proposée est simple dans sa mise en place. Mon idée pour créer un dispositif capable de tirer profit de l'effet Talbot se range dans cette optique : il faut que ce soit simple et peu couteux et ne nécessitant aucun équipement particulier. Pour générer des interférences je me sers d'un réseau de cavités cylindriques dans du PDMS, qui est obtenu par contre moulage des réseaux de cylindres en quartz que j'ai fabriqué précédemment. Le séparateur est aussi fait en PDMS et il positionné juste après le réseau de trous comme illustré sur la **Figure 4-5**.

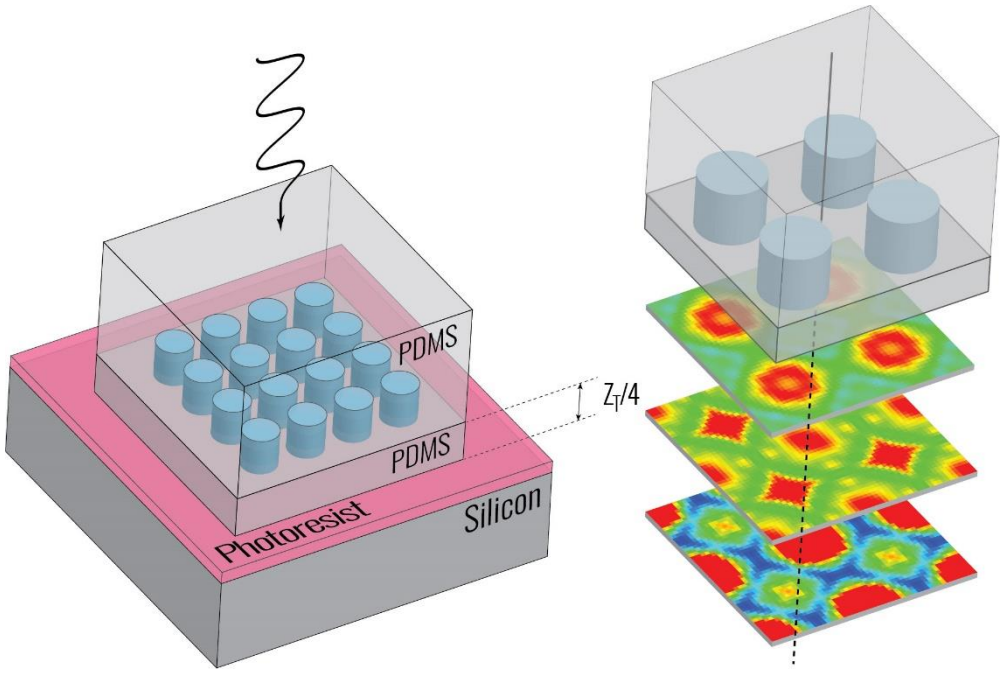


Figure 4-5 : *Schéma du procédé d'insolation des échantillons résinés avec le masque en PDMS et l'écarteur lui aussi en PDMS. Ici la taille de l'écarteur représente ¼ de la longueur Talbot. A droite on a le profil des interférences simulées par FDTD dans la zone Talbot.*

- **La fabrication du moule et de l'écarteur en PDMS**

La procédure de fabrication des divers masques PDMS commence par le moulage de la réplique du premier réseau : une structure périodique de résine photosensible est réalisée par lithographie interférentielle (LIL) sur un substrat de silicium ou de quartz de 2x2 cm, puis gravée avec un réacteur de gravure par plasma (ICP RIE) pour produire une matrice de cylindres de 1 µm de haut [9]. Le moule silicium ainsi qu'une photo MEB des cylindres sont visibles sur la **Figure 4-6**. Ensuite, un mélange de PDMS (DuPont Sylgard 184) et d'agent réticulant (10% de la masse de PDMS) est versé sur le réseau

de nanocylindres. La préparation visqueuse est ensuite dégazée sous vide et réticulée pendant 2 heures à 80°C. La pièce de PDMS durcie est ensuite extraite du moule positif (la matrice de cylindres).

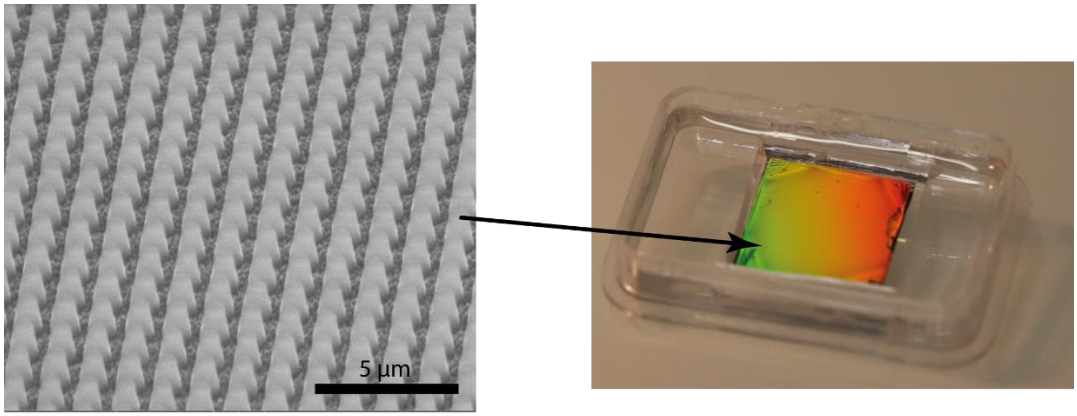


Figure 4-6 : *Photos MEB de l'échantillon qui nous sert de moule pour la création du masque en PDMS. La photo à droite est l'échantillon avant de verser le PDMS dessus.*

Ensuite, l'espaceur est fabriqué en déposant à la tournette une fine couche de PDMS dégazé sur une plaquette de silicium à 6000 tr/min pendant 10 min et cuite sur une plaque chauffante à 90°C pendant 20mn. Pour mesurer la hauteur exacte de l'entretoise, nous utilisons un profilomètre (DEKTAK). La hauteur du dépôt est un facteur essentiel car elle définit les fractions entières de la période Talbot que nous allons utiliser. La hauteur de dépôt est contrôlée par le temps de dépôt à la tournette. Le masque PDMS a un pas de 1,8 µm conduisant à une longueur Talbot de 16 µm (selon la formule donnée plus haut). Avec ces données, nous avons réussi à déposer à la tournette une couche de PDMS pour obtenir la bonne fraction de la période Talbot. Nous avons utilisé plusieurs séparateurs de différentes hauteurs : 1,4 µm, 2 µm, 2,9 µm, 3,6 µm, 4,1 µm et 4,6 µm.

La réplique du réseau et l'écarteur sont ensuite exposés à un plasma d'oxygène (Diener Nano) pendant 1 minute à faible puissance pour activer les surfaces. Ces deux parties sont finalement collées ensemble pour construire un masque souple comme on peut le voir sur la **Figure 4-7** où nous pouvons observer le réseau de trous cylindriques et l'écarteur qui a été partiellement enlevé pour la photographie.

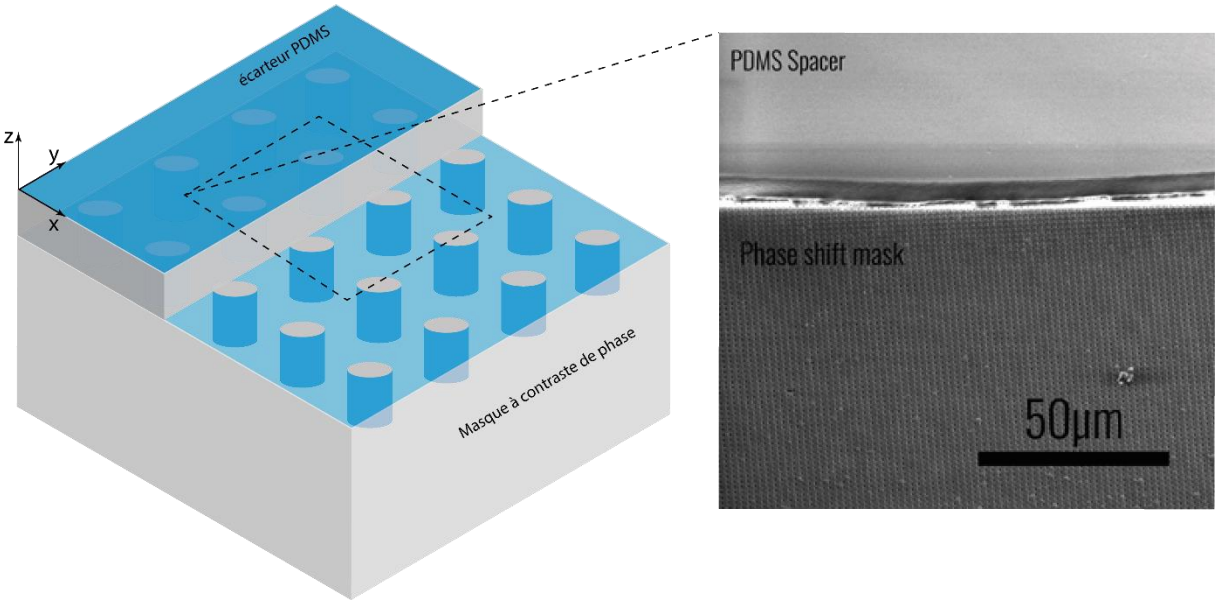


Figure 4-7 : *Image MEB de la fine membrane de PDMS qui joue le rôle d'écarteur sur la matrice de trous en PDMS aussi.*

Le bloc de PDMS sur lequel se trouve le réseau de trous peut être utilisé comme un masque de lithographie avec une transmission optique assez large allant jusqu'à une longueur d'onde de 300 nm dans l'UV. Afin de procéder à l'étape d'insolation nous n'avons besoin que de poser le PDMS en contact avec la résine photosensible à la surface de l'échantillon. Le bloc de PDMS étant mou, celui-ci épouse parfaitement la surface peu importe la topographie de l'échantillon ou la présence éventuelle de particules ou poussières. Lorsque nous exposons la résine avec le PDMS en contact sans écarteur, le motif obtenu est une réplique de l'initial. S'il y a un espaceur, nous pouvons choisir la fraction de la zone Talbot et de ce fait le motif d'interférence que nous voulons obtenir sur notre échantillon (**Figure 4-5**).

Tout type de résine photosensible peut être utilisé pourvu que l'épaisseur de la couche déposée reste faible par rapport au pas du réseau, afin d'éviter des interférences en dehors du plan (en profondeur). Dans la pratique j'ai utilisé deux types de résines : une positive (AZ MIR 701) avec une épaisseur déposée de 600 nm et un résine négative (AZ 2020) avec une épaisseur déposée de 900 nm.

L'exposition aux UVs se fait avec une lampe à vapeur de mercure, donc non cohérente, et un filtre UV pour n'utiliser que la ligne i de longueur d'onde 365 nm pour une irradiance de 10 mW.cm^{-2}. Les temps d'expositions sont de l'ordre de la seconde, cependant selon la taille de l'écarteur ce temps peut changer. Par exemple, avec un écarteur de 2 µm l'exposition est de 2 secondes et le temps de développement est de 30 secondes et pour un écarteur de 4,1 µm l'exposition dure 2,5 secondes pour un même temps de développement. L'insolation peut aussi être faite avec un laser pour ajouter un degré d'interférence plus important dû à la cohérence de la lumière, c'est notamment ce que nous avons entrepris à partir du montage utilisé pour la lithographie d'interférence avec un laser à 405nm, mais aucun motif pertinent n'en est ressorti (voir plus bas).

- **La visualisation du schéma d'interférences et les résultats de lithographie**

Afin de savoir si le PDMS avec le motif de trous allait remplir son rôle, c'est-à-dire de diffracter la lumière et former les interférences de Talbot nous avons collaboré avec Franziska Barho de l'équipe NANOMIR de l'IES et spécialiste de plasmonique et de simulation FDTD (*Finite Difference Time Domain* ou méthode de calcul de différences finies dans le domaine temporel pour résoudre les équations de

Maxwell). Sur la simulation de la **Figure 4-8**, effectuée pour un réseau périodique de trous avec un pas de 1,8 µm, nous obtenons une figure d'interférences complexe qui peut être assimilée à l'effet Talbot. La différence par rapport à la ***Figure 4-1*** vient du fait que les interférences ici proviennent d'un décalage de phase de la lumière passant entre ou à travers les cavités et donc de la différence d'indice optique entre l'air et le PDMS, alors que dans l'effet Talbot le masque est opaque et la lumière incidente est entièrement absorbée en dehors des trous.

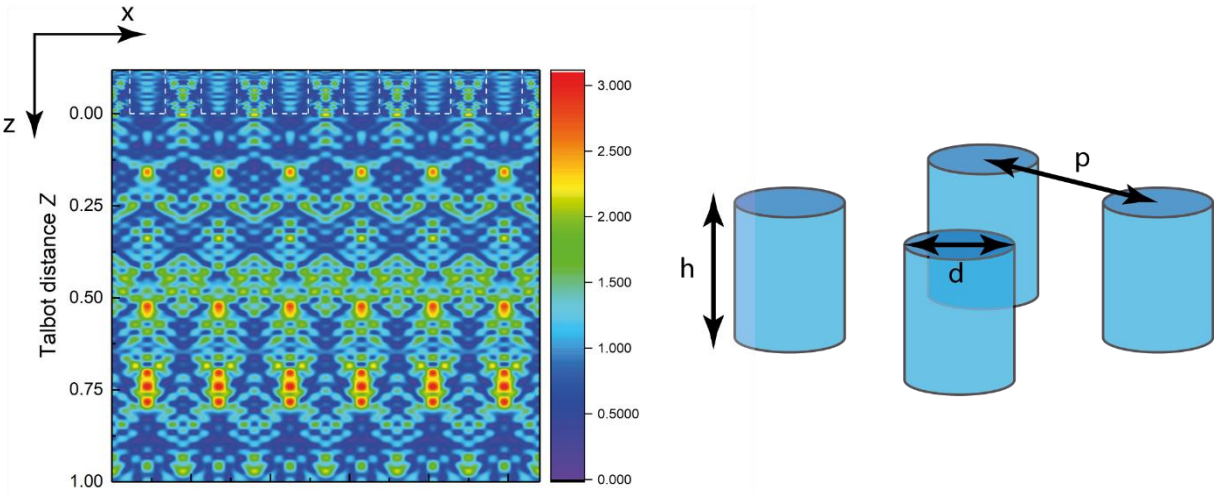


Figure 4-8 *: Simulations effectuées par F. Barho. Le bloc de PDMS avec les trous est modélisé comme un réseau de cylindres constitués d'air imprimé dans le PDMS. Leur hauteur (h) est de 1,9 µm pour un diamètre (d) de 0,9 µm et la période (p) du motif est de 1,8 µm. La simulation est effectuée sur une période de Talbot, c'est-à-dire 16 µm dans notre cas en prenant la formule de la longueur Talbot vue plus haut.*

Une fois notre bloc de PDMS fabriqué comme décrit plus haut, nous nous sommes assurés que le réseau de trous diffractait bien la lumière en générant des interférences de type Talbot. C'est dans cette optique que nous avons mis au point le dispositif optique de la **Figure 4-9**. Le bloc de PDMS est fixé sur une plateforme piézoélectrique permettant son déplacement suivant l'axe z, un objectif à immersion est placé en dessous et par le biais d'une lentille et de la camera CMOS nous sommes capables de visualiser les interférences se produisant à distance du réseau de trous. En effet, l'ouverture numérique de l'objectif étant de 1,2 la profondeur de champ de ce dernier est 740 nm. Ainsi l'objectif permet d'avoir une image nette sur environ 700 nm située à la distance de travail de l'objectif (170 µm) par rapport à sa première lentille. Cette profondeur de champ est d'une hauteur comparable à celle d'une résine photosensible notamment, ce qui permet d'observer le motif qui sera imprimé sur la résine.

En illuminant par le dessus avec une LED à 405 nm, le réseau diffracte la lumière et nous observons les interférences sur la caméra. Grâce à la plateforme piézoélectrique il est possible de déplacer le bloc de PDMS de quelques micromètres voire quelques nanomètres dans les trois dimensions de l'espace (x, y, z). En déplaçant la plateforme dans l'axe z (comme indiqué sur le schéma de la **Figure 4-9 (A)**), nous pouvons visualiser les schémas d'interférences correspondant à chaque plan (XY) noté z_i sur la **Figure 4-9 (B)** et **(C)**. Les images disponibles sur cette figure sont générées à partir d'un réseau de trous de 1,8 µm de pas. Avoir accès aux divers motifs périodiques de la zone Talbot nous permet de choisir la taille de l'écarteur adéquate, afin d'obtenir le schéma d'interférences sélectionné sur notre résine photosensible.

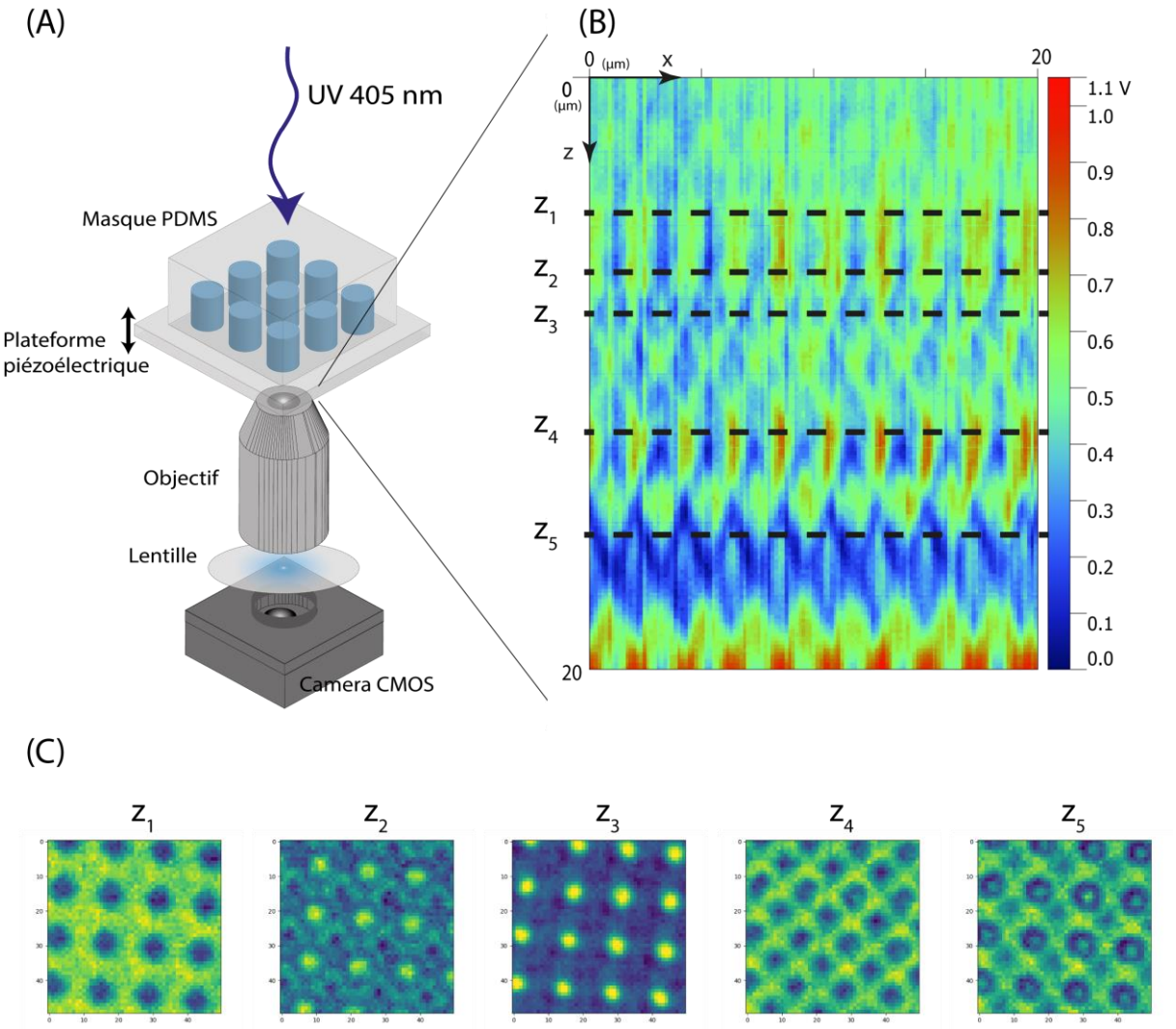


Figure 4-9 : *(A) Schéma de l'expérience de visualisation des interférences générées par le réseau de trous dans le bloc de PDMS. (B) Formation du tapis de Talbot expérimental. (C) Images en coupe du tapis de Talbot associées à différentes hauteurs (z_i).*

En comparant les profils obtenus par simulation et expérimentalement nous remarquons que les deux sont assez similaires, pas identiques, mais il est assez difficile d'être en parfait accord avec la simulation qui ne prend pas en compte par exemple la forme un peu tronc conique des cavités, la rugosité des cylindres ou même le léger retrait du PDMS pendant le démoulage (autour de 1,5% sur les dimensions).

Plusieurs tailles de séparateurs ont été utilisées sur des échantillons avec de la résine positive et négative. Des expositions sans séparateur ont aussi été faites pour vérifier que le motif reproduit était identique à celui du masque PDMS. Sur les photos (A) et (B) de la **Figure 4-10** nous avons réalisé deux expositions sur des résines négatives et positives, respectivement. Nous pouvons remarquer que dans les deux cas le motif initial du réseau de trous dans le PDMS est reproduit, en trous pour la résine négative (Photo (A)) et en disque pour la résine positive (photo (B)). Les deux types de résines sont utilisées pour s'assurer que le principe fonctionne pour les deux. Il est important de noter que pour la résine négative la couche déposée est plus importante (1,3 µm) alors que la couche de résine positive est plus fine (600 nm). Sur le motif imprimé sur la résine négative nous voyons une inclusion d'un autre petit motif ressemblant à 4 petit trous. Cette inclusion peut s'expliquer par le fait que la couche de résine est épaisse et aussi par la hauteur des trous dans le PDMS. En effet, la diffraction commence dès que la lumière passe au travers du réseau, les trous étant d'une hauteur de 1,8 µm, l'effet Talbot

est visible sur notre résine même sans écarteur. La hauteur de la couche de résine est donc un élément primordial à prendre en compte si nous voulons être précis sur le motif interférentiel sélectionné. Les autres expositions (Photos (C), (D), (E) et (F) de la **Figure 4-10**) sont réalisées sur de la résine positive AZ MIR 701 avec des tailles d'écarteur différentes : 1,4 µm, 2 µm, 2,9 µm et 4 µm respectivement. Pour chacun des quatre écarteurs utilisés nous remarquons l'inclusion d'un second réseau ou l'apparition de structures originales comme sur la photo **(D)** avec un réseau de trous et de carrés entrelacés.

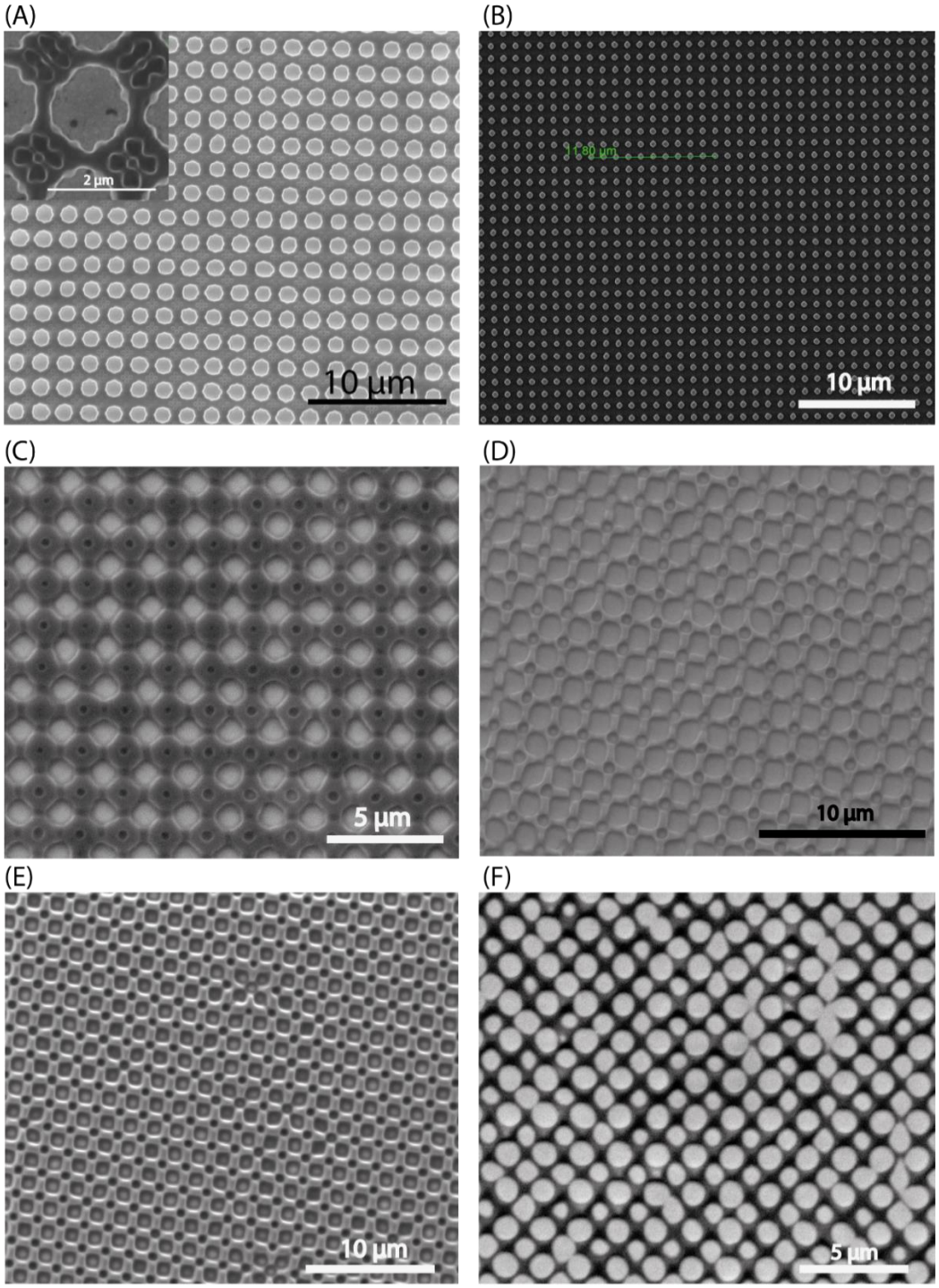


Figure 4-10 : *Photos MEB des diverses lithographies Talbot effectuées sur des résines photosensibles. (A) Résine négative (AZ2020) en contact avec un pas pour le réseau initial de 1,8 µm et (B) résine positive (AZ MIR 701) en contact avec un pas pour le réseau initial de 1 µm. (C), (D), (E) et (F) résine*

positive avec un pas de 1,8 µm pour le réseau initial et des écarteurs de 1,4 µm, 2 µm, 2,9 µm et 4 µm respectivement.

Nous avons aussi comparé les profils simulés et générés avec les motifs finaux obtenus sur de la résine photosensible. Le résultat de cette comparaison est exposé sur la **Figure 4-11**. Nous avons un bon accord entre la simulation FDTD, la capture optique et l'exposition d'une résine photosensible.

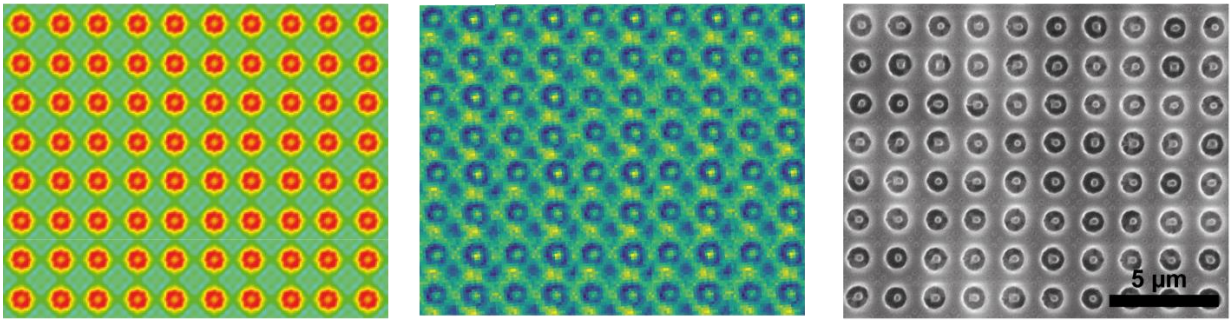


Figure 4-11 : *Comparaison d'un profil d'interférence Talbot simulé par FDTD (à gauche), imagé en illuminant le réseau de trous (au centre) et le motif obtenu sur la résine négative AZ2020 (à droite)*

Au vu des résultats d'exposition sur deux types de résines et de l'accord entre la théorie et le pratique, il semble possible de réaliser des structures périodiques complexes et intéressantes en peu de temps. La méthode est très simple et peu coûteuse, elle ne nécessite aucun équipement lourd ni étape d'alignement et elle peut être utilisée avec tout type de sources UVs et tout type de résines. Ces résultats ont été présentés lors d'une conférence scientifique, un *proceeding* est publié [10] et un article de journal est en cours de soumission. Il sera intéressant d'utiliser cette méthode pour fabriquer des structures périodiques complexes et de pouvoir les caractériser. Nos techniques de lithographie (LIL) nous limitent pour l'instant dans la production de réseaux à des pas d'environ 1µm, il serait intéressant de disposer par exemple de motifs submicroniques que l'on pourrait produire avec des techniques comme la lithographie électronique ou des steppers optiques.

4.3. Les premiers tests de fabrication de structures complètes et perspectives

- **Les structures résonnantes**

Dans le domaine de la plasmonique ou encore de la photonique les structures périodiques sont largement utilisées pour la mise au point de surface avec des propriétés uniques. Par exemple, des surfaces destinées à la spectroscopie infrarouge [11] ou encore des absorbeurs parfaits [12] pour améliorer la détection dans le domaine des infrarouges. Nous avons donc essayé de fabriquer une structure, en tirant profit de la technique de la lithographie Talbot, disposant d'un motif original caractérisé par une absorption particulière dans une gamme spectrale précise. Pour le moment seuls les tests de fabrication ont été réalisés et aucune caractérisation n'a été faite sur l'échantillon.

Pour cela nous avons collaboré avec l'équipe NANOMIR de l'IES qui développe des résonateurs plasmoniques à base de semi-conducteurs fortement dopés. Nous avons à notre disposition un substrat arséniure de gallium (GaAs) sur lequel est déposé une couche de InAs (Arséniure d'Indium) par épitaxie par jet moléculaire. L'InAs est un semi-conducteur de type III-V très utilisé dans l'optoélectronique. Un dépôt de SiN_x (Nitrure de silicium) est effectué par PE-CVD, cette couche est destinée à protéger la couche de InAs en faisant office de masque dur pour les étapes de gravure par plasma. Deux échantillons sont résinés : l'un avec une résine positive (AZMIR 701) et l'autre avec une

résine négative (AZ2020). En utilisant une résine de chaque type, nous obtenons deux motifs différents dont l'un est le négatif de l'autre. Notre masque de PDMS utilisé pour l'exposition dispose d'un écarteur de 2 µm qui nous permet d'obtenir un motif similaire à celui de la **Figure 4-10 (D)**. Les deux motifs complémentaires sont visibles sur les photos de la **Figure 4-12**. L'exposition aux UVs est réalisée à l'aide d'une lampe à vapeur de Mercure et j'utilise un filtre UV (comme mentionné plus haut). Les temps d'exposition sont de 4 secondes pour les deux et le développement de 2 min (développeur AZ726).

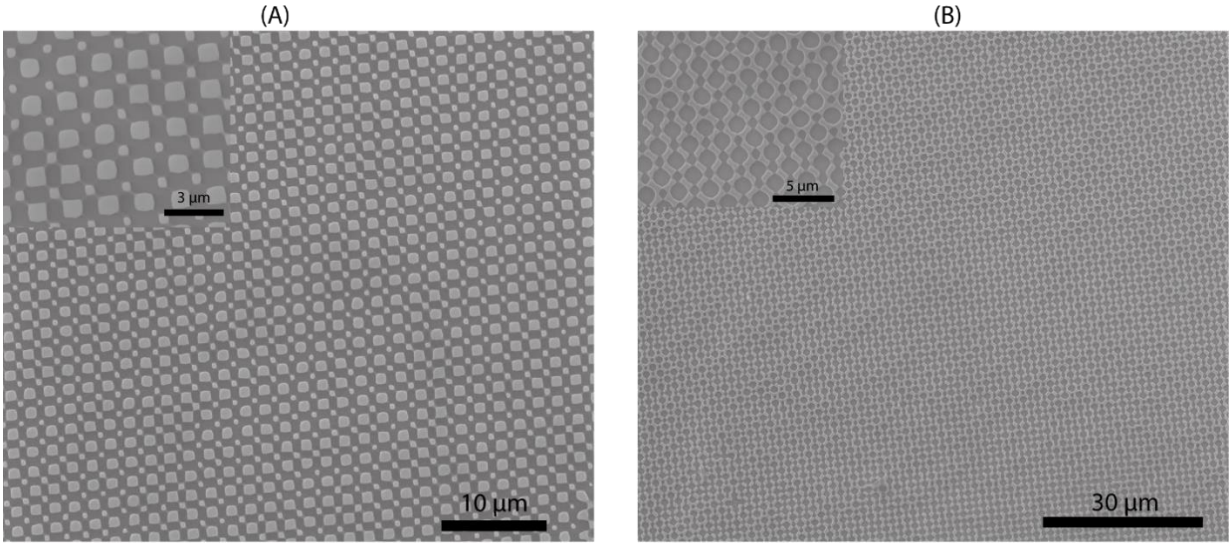


Figure 4-12 : *Photos MEB des deux échantillons utilisés après l'étape de lithographie Talbot avec le masque PDMS avec le réseau de 1,8 µm et un écarteur de 2 µm. (A) La résine est négative, on obtient un réseau de carré avec l'inclusion de carré plus petit et (B) la résine est positive, on obtient le motif négatif.*

Une fois la lithographie faite il nous faut passer à l'étape de gravure plasma afin de graver la couche de nitrure et celle d'InAs. La couche de nitrure est gravée avec un plasma CHF_3 avec le réacteur ICP RIE (Corial 150L) fluorée. La résine résiduelle est enlevée par un bain d'acétone suivi d'un nettoyage à l'isopropanol. La gravure de la couche d'InAs se fait dans un bâti de RIE différent : un réacteur RIE chloré. Le fonctionnement est le même, seuls les gaz réactant sont différents. La dernière étape consiste à retirer les résidus de nitrure avec un nettoyage à l'HF dilué à 1%. Lors de l'étape de gravure plasma nous avons perdu un des deux échantillons. En effet, celui qui était recouvert de résine négative n'était pas assez exposé et donc la surface de l'échantillon n'était pas ouverte. La gravure plasma n'a donc pas eu d'effet et a juste détérioré le motif. La suite du procédé de fabrication est réalisée sur un seul échantillon : celui avec la résine positive. Nous pouvons voir l'échantillon final sur les photos MEB de la **Figure 4-13**. Le motif final prend la forme de croisillons composés de rectangles bien définis.

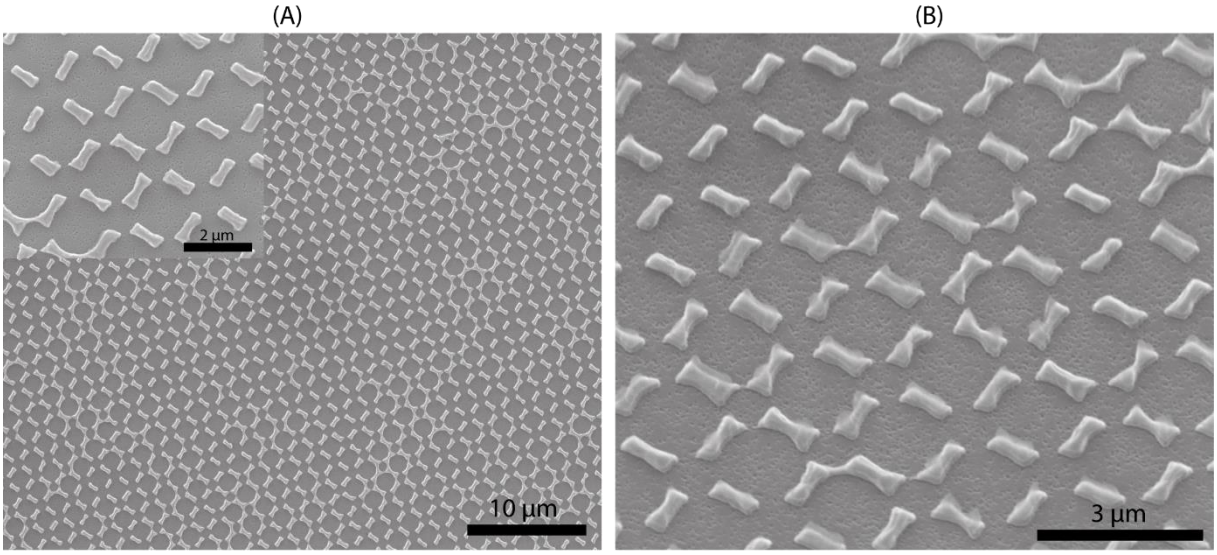


Figure 4-13 : *Photos MEB de l'échantillon après le nettoyage HF. (A) Ici la photo est prise en vue du dessus et la photo (B) avec un angle de 45 °.*

Pour tester et caractériser notre échantillon nous avons utilisé la technique de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier [13]. Cette technique permet d'obtenir le spectre d'absorption et d'émission d'un matériau. Le but de la spectroscopie d'absorption est de mesurer la quantité de lumière absorbée par un échantillon. La mesure n'a été effectuée qu'une seule fois sur notre échantillon sans malheureusement montrer de résultat concluant. Aucune absorption n'a été remarquée dans la gamme de fréquence mesurée, ceci est peut-être dû aux résidus de nitrure qui sont encore présents sur l'échantillon comme nous pouvons le voir sur la photo **(B)** de la **Figure 4-13**. Un bain HF plus long est envisagé mais l'état de la surface risque d'être endommagé. Pour le moment nous n'avons effectué aucun test additionnel. De plus nous avons perdu le deuxième échantillon lors de l'étape de gravure alors que celui-ci semblait avoir un motif plus intéressant. D'autres dispositifs seront fabriqués dans le futur pour avoir l'occasion de faire plus de tests notamment de fabrication avec des motifs différents.

- **La source de lumière et la réduction du réseau : la « Maskception »**

Toutes les expositions réalisées jusqu'à présent ont été faites avec la lampe à vapeur de mercure possédant une longueur d'onde 365 nm. Cette lampe possède un spectre en longueur d'onde plus large que celui d'un laser, il serait intéressant de tenter des lithographies Talbot avec un laser possédant une longueur d'onde bien marquée. Des premiers tests ont été réalisés sur de la résine positive déposée sur un échantillon de verre, sur lequel un dépôt d'oxyde de titane (TiO_2) est effectué préalablement. Le résultat, après développement, est exposé sur la **Figure 4-14**. Nous remarquons le réseau initial répliqué mais aucune structure périodique en plus n'est visible, la combinaison du laser et de la surface réfléchissante du TiO_2 conduit à un motif d'interférence complexe en trois dimensions.

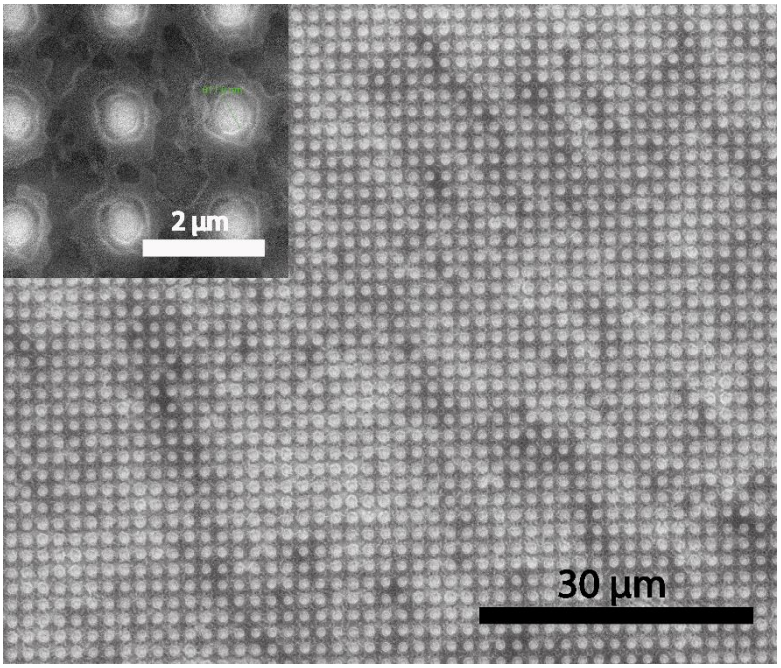


Figure 4-14 : *Photos MEB de la résine positive (AZMIR701) sur laquelle nous avons fait une lithographie Talbot avec un écarteur de 4 µm et un laser 405 nm pour source de lumière. Le motif final est complexe et aucune structure ne se dégage réellement.*

Enfin, nous avons remarqué qu'avec l'utilisation d'un séparateur, sur le réseau final, il y avait l'inclusion d'un second réseau à l'intérieur du premier, réduisant ainsi la période de la structure en combinant les deux réseaux. Nous nous sommes demandés s'il était possible de réduire encore plus cette période. Pour ce faire, l'idée que nous avons eu a été de refaire un masque PDMS à partir du réseau fabriqué par lithographie Talbot. A partir d'une structure fabriquée par lithographie Talbot avec le réseau de trous dans le PDMS et un écarteur, nous avons recréé un moule comme expliqué plus haut. Nous avons testé ce nouveau masque sur un échantillon avec de la résine positive. Aucun résultat probant n'en est ressorti. En effet, lors de la première étape de lithographie quelques défauts peuvent apparaître (parfois visible sur les photos MEB) par conséquent lorsqu'on refait un moule à partir de ces structures on accumule les défauts qui se retrouvent lors du développement. Aucune réduction du pas n'a été constatée sur les premiers tests. D'autres tests sont envisagés, notamment réussir à créer un masque sans défauts avec des écarteurs les plus plats possible afin de limiter les aberrations lors de l'étape de lithographie. En se calant sur une zone Talbot de ¼ il serait possible de diminuer le pas du réseau d'un facteur racine de deux à chaque itération, ce qui permettrait en théorie d'obtenir des réseaux nanométriques à partir d'un premier réseau micrométrique.

4.4. Conclusion

La lithographie Talbot avec un masque en PDMS dans lequel un réseau de trous est moulé permet de réaliser des structures périodiques avec des schémas complexes sur tout type de résine en peu de temps. La technique ne nécessite aucune étape d'alignement et il n'y a pas besoin d'équipements lourds, ce qui en fait une technique très simple et peu coûteuse. Les premiers tests d'exposition ont démontré l'efficacité de la technique et des structures ont été réalisées en vue de tester leur absorption dans l'infrarouge. Les résultats de ces spectres d'absorption ne sont pas probants mais avec quelques tests supplémentaires il pourra en ressortir des propriétés intéressantes. De plus, en approfondissant les recherches sur la source d'exposition et la conception d'un nouveau masque à partir d'un déjà fabriqué par ce procédé il pourra être possible de réduire le pas du réseau.

[1] H. H. Solak, C. Dais, et F. Clube, « Displacement Talbot lithography: a new method for high-resolution patterning of large areas », *Optics Express*, vol. 19, nº 11, p. 10686, mai 2011, doi: 10.1364/OE.19.010686.
[2] T. Y. Jeon, H. C. Jeon, S.-M. Yang, et S.-H. Kim, « Hierarchical nanostructures created by interference of high-order diffraction beams », *Journal of Materials Chemistry C*, vol. 4, nº 5, p. 1088-1095, 2016, doi: 10.1039/C5TC03240G.
[3] H. F. Talbot, « LXXVI. *Facts relating to optical science. No. IV* », *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 9, nº 56, p. 401-407, déc. 1836, doi: 10.1080/14786443608649032.
[4] C. P. Fucetola, A. A. Patel, E. E. Moon, T. B. O'Reilly, et H. I. Smith, « Coherent diffraction lithography: Periodic patterns via mask-based interference lithography », *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, vol. 27, nº 6, p. 2947, 2009, doi: 10.1116/1.3237093.
[5] C. Dais, F. Clube, L. Wang, et H. H. Solak, « High rotational symmetry photonic structures fabricated with multiple exposure Displacement Talbot Lithography », *Microelectronic Engineering*, vol. 177, p. 9-12, juin 2017, doi: 10.1016/j.mee.2017.01.021.
[6] L. Cao, H.-H. Hu, et D. Gao, « Design and Fabrication of Micro-textures for Inducing a Superhydrophobic Behavior on Hydrophilic Materials », *Langmuir*, vol. 23, nº 8, p. 4310-4314, avr. 2007, doi: 10.1021/la063572r.
[7] J. Homola, S. S. Yee, et G. Gauglitz, « Surface plasmon resonance sensors: review », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 54, nº 1-2, p. 3-15, janv. 1999, doi: 10.1016/S0925-4005(98)00321-9.
[8] R. H. Siddique, S. Diewald, J. Leuthold, et H. Hölscher, « Theoretical and experimental analysis of the structural pattern responsible for the iridescence of Morpho butterflies », *Optics Express*, vol. 21, nº 12, p. 14351, juin 2013, doi: 10.1364/OE.21.014351.
[9] Z. Santybayeva *et al.*, « Fabrication of quartz microcylinders by laser interference lithography for angular optical tweezers », *Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS*, vol. 15, nº 3, p. 034507, sept. 2016, doi: 10.1117/1.JMM.15.3.034507.
[10] R. Desgarceaux, F. Pedaci, et B. Charlot, « Talbot displacement lithography with soft elastomeric conformal phase masks », in *2018 Symposium on Design, Test, Integration & Packaging of MEMS and MOEMS (DTIP)*, Roma, 2018, p. 1-5, doi: 10.1109/DTIP.2018.8394218.
[11] T. G. Mayerhöfer et J. Popp, « Periodic array-based substrates for surface-enhanced infrared spectroscopy », *Nanophotonics*, vol. 7, nº 1, p. 39-79, janv. 2018, doi: 10.1515/nanoph-2017-0005.
[12] S. Ogawa, D. Fujisawa, H. Hata, M. Uetsuki, K. Misaki, et M. Kimata, « Mushroom plasmonic metamaterial infrared absorbers », *Applied Physics Letters*, vol. 106, nº 4, p. 041105, janv. 2015, doi: 10.1063/1.4906860.
[13] P. R. Griffiths et J. A. de Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

5. Conclusion générale

5.1. Résumé

Le but initial de ma thèse était la fabrication de microparticules piégeables et leur utilisation dans un dispositif de pinces ce que l'on peut nommer de l'ingénierie de particules piégées. La première application s'est portée sur la mesure du couple de rotation sur des moteurs moléculaires grâce à la possibilité de mesurer le couple d'un micro-cylindre piégé et attaché au rotor du moteur moléculaire. Dans un second temps je me suis concentré sur la mise au point d'un AFM sans cantilever. L'idée étant de produire des micro-cylindres taillés en pointe pour faire de la topographie de surface assistée par pince optique : c'est la microscopie à force photonique [1]–[4]. Enfin, au cours de ma thèse j'ai aussi mis au point un procédé de fabrication basé sur la lithographie Talbot [5]–[7] qui me permet de produire massivement des réseaux de disques ou avec des motifs complexes en très peu de temps (exposition de 3s).

- **La réalisation de micro-cylindres en quartz**

Nous avions à notre disposition un dispositif de pinces optiques avec un laser de 1064 nm et une puissance de 3W. Grâce au dispositif mis en place (décrit dans la première section du manuscrit) nous sommes capables de piéger des microparticules et d'exercer un contrôle dans les trois dimensions de l'espace. En ajoutant une composante dans ce dispositif (EOM) et en utilisant des particules biréfringentes nous pouvons appliquer un couple de rotation sur celle-ci par le biais de la polarisation du laser [8]–[10]. En effet, les particules biréfringentes, lorsqu'elles sont piégées, s'orientent dans un axe préférentiel selon la polarisation. En faisant tourner la polarisation il est possible de faire tourner les particules. Ma première tâche a donc été la fabrication de micro-cylindres en quartz biréfringents piégeables. Les travaux déjà réalisés sur la fabrication de micro-cylindres ont constitué mon point de départ. La méthode employée pour cette fabrication est celle développée dans l'article de Zhanna Santybayeva [11]. Ici les cylindres sont fabriqués collectivement sur des échantillons de quartz. L'étape d'insolation est réalisée par lithographie interférentielle, s'en suit une étape de gravure plasma pour l'obtention de cylindres. Le but de ces premières fabrications était, d'une part la familiarisation avec l'équipement et d'autre part la mise au point de la gravure plasma avec différentes recettes.

L'étape de gravure au plasma est primordiale car elle conditionne les dimensions finales de la microparticule (hauteur, diamètre). Deux gaz ont été testés : le CHF_3 et le SF_6, tous deux peuvent graver le quartz mais avec quelques différences : la gravure au plasma CHF_3 permet d'obtenir des profils de cylindre avec une forme conique avec un angle d'environ 80° et une bonne qualité de surface. La gravure au plasma SF_6 nous donne un profil de cylindre très droit sans angle mais avec une surface fortement abîmée. Les cylindres produits sont piégeables et nous avons réussi à appliquer une rotation contrôlée pendant qu'ils étaient piégés [11]. Cependant, leur utilisation pour étudier les forces mises en jeu sur les moteurs moléculaires s'est avérée très complexe. Le principal problème a été la fixation de la particule au rotor du moteur. L'émergence d'une autre technique, développée par Ashley Nord dans l'équipe de Francesco Pedaci et basée sur l'emploi de piège magnétique, a rapidement montré des résultats plus probants et nous a poussé à abandonner la pince optique pour cette application. D'autres applications sont en revanche envisagées avec ces cylindres et leur rotation avec notamment la mise au point d'une micro scie dont quelques premiers tests de fabrication ont été effectués.

- **La lithographie Talbot**

Lors de la fabrication des cylindres ou des pointes, une étape cruciale est celle de la lithographie interférentielle. Cette technique d'insolation permet de réaliser des motifs périodiques (lignes ou disques) sur la résine photosensible. Bien que très performante et relativement rapide comparée à la lithographie électronique, cette technique requiert quand même un montage optique complexe. Au cours de mes recherches j'ai mis au point une nouvelle technique d'insolation, basée sur l'effet Talbot [7], qui permet aussi de réaliser des structures périodiques originales en très peu de temps avec une méthode simple et robuste. L'effet Talbot est un phénomène interférentiel, à partir d'un masque et qui permet d'insoler certains types de résine photosensible. Les interférences sont créées à partir d'un masque souple en PDMS contre moulé à partir d'un réseau de piliers, en l'occurrence nos matrices de micro cylindres sur quartz. Lors de l'insolation le masque de PDMS, déformable, est simplement posé sur l'échantillon résiné, puis l'ensemble est exposé aux UVs. Les décalages de phase de la lumière induits par le réseau de cavités cylindriques dans le PDMS produisent une réplique du réseau initial. L'avantage de cette technique est qu'il est aussi possible, en insérant un espaceur (une pellicule de PDMS), entre le réseau et la surface de l'échantillon, de générer des motifs plus complexes, issus des interférences de la lumière (l'effet Talbot) comme il a été montré dans la section 4.

La technique ne nécessite aucune étape d'alignement et il n'y a pas besoin d'équipement dédié ce qui en fait une technique très simple et peu coûteuse. Les premiers tests d'exposition ont démontré l'efficacité de la technique et des structures ont été réalisées en vue de tester leurs caractéristiques ainsi que leur spectre d'absorption dans l'infrarouge. Les résultats de ces spectres ne montrent aucune résonance mais avec quelques tests supplémentaires il pourra en ressortir des propriétés intéressantes. De plus en approfondissant les recherches sur la source d'exposition et la conception d'un nouveau masque à partir d'un déjà fabriqué par ce procédé, il pourra être possible de réduire le pas du réseau.

- **Le microscope à force photonique**

Le microscope à force photonique se base sur l'utilisation de particules piégées pour obtenir des topographies de surfaces à l'échelle de la dizaine de nanomètres comme un AFM. La technique est déjà bien connue [1]–[4] cependant l'utilisation de particules dédiées en guise de sonde et non des sphères constitue une nouveauté et une grande innovation. J'ai consacré la majeure partie de ma thèse à l'élaboration et l'utilisation de micro-cylindres avec une pointe au bout pour faire de la microscopie à force photonique. Nos premières expériences se sont portées sur des objets durs puis sur des échantillons biologiques (objets mous). En effet, dans le domaine de la microscopie à sonde locale la force appliquée à l'échantillon lorsque la pointe appuie sur sa surface est un paramètre important. Dans le cas d'un AFM cette force est généralement de l'ordre de 100 pN à 1 nN ce qui est suffisant pour déformer des surfaces molles et de fait interdire la mesure de la topographie. Le PhFM permet d'appliquer des forces de l'ordre de 1 pN et c'est cette particularité qui nous a permis de produire des images sur des surfaces molles non déformées comme par exemple des globules rouges.

Nous avons exploré plusieurs pistes pour obtenir des particules piégeables et suffisamment pointues pour être utilisées dans le PhFM. A ceci se sont ajoutées les contraintes d'une fabrication collective (pour avoir suffisamment de pointes à disséminer dans le milieu), les contraintes de forme et taille pour la piégeabilité et enfin les contraintes de matériaux pour les aspects optiques (indice, et transparence).

Une première technique basée sur la gravure anisotrope du quartz dans le HF a été étudiée. Malheureusement nous avons obtenu des pointes coniques dont le sommet était formé d'une arête

plutôt que d'une pointe. Ces particules nous ont permis d'obtenir des premiers résultats de topographie mais la qualité des images obtenues n'était pas satisfaisante. Ces particules coniques sont très minces (500 nm à la base) ce qui les rend plus difficiles à manipuler et à contrôler (position et orientation dans le faisceau).

La seconde voie que nous avons suivi a été de partir de la technique permettant d'obtenir des cylindres et d'y adjoindre le dépôt d'un second matériau, une couche mince de SiO2, et de bénéficier de la sélectivité et du caractère isotrope d'une gravure pour affiner une pointe sur un cylindre.

Pour l'obtention des pointes, la première idée a été de les fabriquer avec une succession de gravure plasma, seulement durant les tests réalisés aucune gravure isotrope n'a été observée. Finalement la meilleure option était l'alternance de gravure plasma et de gravure humide (à l'acide fluorhydrique). Deux recettes de gravures plasma ont été testées pour la fabrication des cylindres, une à partir d'un plasma CHF_3 et l'autre avec un ajout de SF_6. Finalement c'est la gravure au plasma CHF_3 qui a été retenue en raison du profil des cylindres obtenus. La gravure humide accentuera le profil conique généré par la gravure au plasma CHF_3 jusqu'à l'obtention de pointes.

Ces particules cylindriques, ou plutôt tronc-coniques, disposant d'une pointe nous ont donné des résultats plus intéressants. Nous avons été en mesure de scanner des structures de test, gravées directement dans la lamelle de microscope en verre, de l'ordre de 100 nm de hauteur. La comparaison avec des images d'AFM (dans l'air et non en liquide) de ces mêmes structures nous a confirmé nos bons résultats : les structures ne sont pas aussi résolues que celles observées avec un AFM mais les deux techniques « voient » les mêmes choses aux mêmes endroits. Avec ces bons résultats nous sommes passés à des échantillons plus complexes : des objets biologiques.

Les premiers tests de scan sur des objets biologiques ont été effectués sur des microtubules. Ceux-ci sont déposés sur une lamelle de microscope silanisée, ce qui permet leur adhésion à la surface de la lamelle. Des images de microscopie par fluorescence (TIRF) sont effectuées dans un premiers temps pour repérer les microtubules et un scan est effectué une fois le microtubule repéré. Les images obtenues sont encourageantes mais la taille des microtubules mesurés, de l'ordre de 40 nm, n'est pas en accord avec la dimension de ces macromolécules (24nm de diamètre). De plus, il est très difficile de faire des scans sur ces objets car ils sont très fragiles et se détériorent très vite (dépolymérisation). Nous avons aussi rencontré beaucoup de problèmes de « collage » des pointes sur la surface. La combinaison de toutes ces difficultés nous a encouragé à changer d'objet biologique à étudier. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux globules rouges.

Les érythrocytes sont adhérés sur une lamelle de verre sur laquelle un dépôt de PLL a été préalablement fait. Lorsque la PLL est assez concentrée sur la surface, les globules prennent la forme de demi-sphère sur une surface et dans certains cas ils perdent leur hémoglobine : c'est la création de *ghost*. Les *ghosts* ne diffusent que très peu le faisceau laser ce qui nous permet de faire un scan de leur surface sans perdre en intensité du signal reçu par le photodétecteur et donc en résolution. En scannant les *ghosts* nous avons été en mesure de reconstruire des images topographiques de la surface d'un globule et nous avons pu observer le cytosquelette de la cellule. Celui-ci se présente sous la forme d'un réseau d'alvéoles ressemblant à un nid d'abeilles.

A ce jour c'est la première observation d'un cytosquelette avec un PhFM. En AFM, l'obtention de telles images est possible seulement si le globule est préalablement fixé chimiquement ou durci par un autre moyen [12]–[14].

D'autres images ont été réalisées sur des globules rouges infectés par le paludisme. Lorsqu'un globule est infecté par ce parasite il présente à sa surface des boutons (*Knobs* en anglais) [15]. Ces petites

protubérances ont ainsi pu être observées grâce au PhFM, d'autre expériences sont prévues sur ce type d'échantillon.
La microscopie à force photonique, combinée avec nos particules spécifiques, montre peu à peu l'étendue des possibilités d'observations inédites dans le domaine de l'imagerie biologique. L'utilisation d'une particule dédiée dans le piège nous donne de bons résultats. Grâce à ces résultats, la technique s'affirme comme une bonne alternative à l'AFM en liquide pour l'obtention d'images topographiques d'échantillons biologiques.

5.2. Perspectives

- **Les micro-moteurs et l'étude de phénomènes physiques**

Dans la partie sur les pinces optiques rotatives nous avons vu que les résultats sur l'étude des moteurs moléculaires ne sont pas encore d'actualité, cependant la mise en rotation combinée avec la mesure du couple de particules cylindriques a été démontrée. Nous avons donc envisagé plusieurs applications possibles grâce à cette particularité.

En premier lieu nous avons comme idée d'étudier des phénomènes physiques comme l'effet Magnus ou encore l'effet Weissenberg. Deux effets de frottements fluides s'exerçant sur un cylindre dans un flux de liquide. Pour cette étude il faut fabriquer des canaux microfluidiques et modifier le set up afin de pouvoir installer une pompe microfluidique qui permet de générer un flux dans le canal. En observant le cylindre et sa rotation dans le piège il serait possible de quantifier les deux effets physiques à l'échelle micrométrique. Une autre possibilité serait la mise au point d'un micro-rhéomètre en cylindre tournant nous donnant la possibilité de mesurer des viscosités locales, par exemple sur un endroit spécifique d'une cellule.

Enfin, des premiers tests de fabrication ont été réalisés pour la mise au point de micro-scie (voir partie 2). Les micro-moteurs activés optiquement constituent une nouvelle avancée dans le domaine des pinces optiques. La possibilité de découper des membranes de cellules ou autres composés organiques permettrait d'en apprendre davantage sur leur composition. La mise au point de scie circulaire à l'échelle micrométrique est un véritable challenge dans le domaine de la microfabrication. Les premiers tests sont cependant encourageants car ils ont montré la possibilité de faire tenir un disque de diamètre égal à 10 µm sur un corps cylindre de 3 µm de diamètre. Il reste encore beaucoup d'aspects encore non élucidés pour la fabrication comme le clivage des cylindres, la tenue de l'ensemble en solution ou encore l'épaisseur minimale pour la partie scie.

- **L'étude approfondie des surfaces molles**

Comme nous l'avons vu, un des avantages du PhFM est sa capacité à travailler avec un faible force (de l'ordre de 1 pN) comparé à l'AFM. C'est grâce à cette propriété qu'il est possible de faire du balayage de surface sur des objets mous comme un globule rouge par exemple. Cependant, la force déployée par le PhFM n'est pas déterminée précisément, pour le moment nous nous situons dans l'ordre du picoNewton mais il sera intéressant d'avoir une donnée précise de cette force. En effet, il n'existe aucun moyen de comparaison sur l'obtention d'image avec des forces si faibles.

La détermination de la force dans l'axe du faisceau (signal z) n'est pas facile. La littérature s'articule le plus souvent sur les forces générées dans le plan perpendiculaire au faisceau (x et y) et les méthodes pour les déterminer. Généralement ces méthodes ne s'appliquent pas pour la force en z ou nous donne des valeurs aberrantes. La mise au point d'une méthode de détermination de la force dans cet axe semble primordiale pour l'étude des surfaces molles.

- **Les dimères plasmonique sur cylindres**

Les pinces optiques à notre disposition permettent de piéger des objets de l'ordre de la centaine de nanomètre. Pour piéger des particules plus petites il est nécessaire de passer par ce qu'on appelle les nano pinces optiques (*Nano Optical Tweezers* en anglais) [16]. Ce type de technique fais intervenir une antenne plasmonique en forme de nœud papillon creusé au bout d'une fibre optique. Le champ électrique est exalté au centre de l'antenne ce qui permet de piéger des particules de l'ordre du nm.

Pour aller plus loin, nous avons envisagé la possibilité de fabriquer ces structures plasmoniques à l'extrémité d'un de nos cylindres. Le cylindre serait ensuite utilisé dans le piège optique et l'antenne plasmonique à son extrémité nous permettrait de piéger des particules encore plus petites comme une molécule : c'est un piège dans un piège.

Des tests de fabrication d'antenne plasmonique ont été lancés et une idée du procédé général de fabrication a été émise avec une combinaison de lithographie électronique et optique. Le challenge réside à la fois dans l'obtention du résonateur plasmonique puis à l'alignement des antennes sur la matrice de cylindres. Un autre problème, et non des moindres, se pose aussi quant à la détection des signaux pour le nano piège.

De la rotation de particules cylindriques à l'obtention d'images topographiques de globules rouges les possibilités offertes par les pinces optiques sont nombreuses. L'invention d'Arthur Ashkin ne cesse d'évoluer depuis près de 30 ans et il reste encore beaucoup de possibilités que nous n'avons pas encore explorées ou découvertes, ce qui laisse du travail à mes successeurs.

[1] E.-L. Florin, A. Pralle, J. K. Heinrich Hörber, et E. H. K. Stelzer, « Photonic Force Microscope Based on Optical Tweezers and Two-Photon Excitation for Biological Applications », *Journal of Structural Biology*, vol. 119, n° 2, p. 202- 211, juill. 1997, doi: 10.1006/jsbi.1997.3880.

[2] A. Rohrbach, C. Tischer, D. Neumayer, E.-L. Florin, et E. H. K. Stelzer, « Trapping and tracking a local probe with a photonic force microscope », *Review of Scientific Instruments*, vol. 75, n° 6, p. 2197- 2210, juin 2004, doi: 10.1063/1.1753097.

[3] L. Friedrich et A. Rohrbach, « Surface imaging beyond the diffraction limit with optically trapped spheres », *Nature Nanotechnology*, vol. 10, n° 12, p. 1064- 1069, déc. 2015, doi: 10.1038/nnano.2015.202.

[4] L. P. Ghislain et W. W. Webb, « Scanning-force microscope based on an optical trap », *Optics Letters*, vol. 18, n° 19, p. 1678, oct. 1993, doi: 10.1364/OL.18.001678.

[5] H. H. Solak, C. Dais, et F. Clube, « Displacement Talbot lithography: a new method for high-resolution patterning of large areas », *Optics Express*, vol. 19, n° 11, p. 10686, mai 2011, doi: 10.1364/OE.19.010686.

[6] R. Desgarceaux, F. Pedaci, et B. Charlot, « Talbot displacement lithography with soft elastomeric conformal phase masks », in *2018 Symposium on Design, Test, Integration & Packaging of MEMS and MOEMS (DTIP)*, Roma, 2018, p. 1- 5, doi: 10.1109/DTIP.2018.8394218.

[7] H. F. Talbot, « LXXVI. *Facts relating to optical science. No. IV* », *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 9, n° 56, p. 401- 407, déc. 1836, doi: 10.1080/14786443608649032.

[8] F. Pedaci, Z. Huang, M. van Oene, S. Barland, et N. H. Dekker, « Excitable particles in an optical torque wrench », *Nature Physics*, vol. 7, n° 3, p. 259- 264, mars 2011, doi: 10.1038/nphys1862.

[9] M. E. J. Friese, T. A. Nieminen, N. R. Heckenberg, et H. Rubinsztein-Dunlop, « Optical alignment and spinning of laser-trapped microscopic particles », *Nature*, vol. 394, n° 6691, p. 348- 350, juill. 1998, doi: 10.1038/28566.

[10] A. La Porta et M. D. Wang, « Optical Torque Wrench: Angular Trapping, Rotation, and Torque Detection of Quartz Microparticles », *Physical Review Letters*, vol. 92, n° 19, mai 2004, doi: 10.1103/PhysRevLett.92.190801.

[11] Z. Santybayeva *et al.*, « Fabrication of quartz microcylinders by laser interference lithography for angular optical tweezers », *Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS*, vol. 15, n° 3, p. 034507, sept. 2016, doi: 10.1117/1.JMM.15.3.034507.
[12] M. Takeuchi, H. Miyamoto, Y. Sako, H. Komizu, et A. Kusumi, « Structure of the Erythrocyte Membrane Skeleton as Observed by Atomic Force Microscopy », *Biophysical Journal*, vol. 74, n° 5, p. 2171- 2183, mai 1998, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77926-3.
[13] R. Nowakowski, P. Luckham, et P. Winlove, « Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1514, n° 2, p. 170- 176, oct. 2001, doi: 10.1016/S0005-2736(01)00365-0.
[14] A. H. Swihart, J. M. Mikrut, J. B. Ketterson, et R. C. Macdonald, « Atomic force microscopy of the erythrocyte membrane skeleton », *Journal of Microscopy*, vol. 204, n° 3, p. 212- 225, déc. 2001, doi: 10.1046/j.1365-2818.2001.00960.x.
[15] M. Rug, « The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of P falciparum-infected human erythrocytes », *Blood*, vol. 108, n° 1, p. 370- 378, juill. 2006, doi: 10.1182/blood-2005-11-4624.
[16] J. Berthelot, S. S. Aćimović, M. L. Juan, M. P. Kreuzer, J. Renger, et R. Quidant, « Three-dimensional manipulation with scanning near-field optical nanotweezers », *Nature Nanotechnology*, vol. 9, n° 4, p. 295- 299, avr. 2014, doi: 10.1038/nnano.2014.24.

6. ANNEXES

6.1. Recettes de gravure RIE et de dépôt PE-CVD

Tableau 6-1 : *Recette de gravure du Chrome à base d'un plasma Ar, la gravure est seulement physique.*

Paramètres	Valeurs	Unités
Ar	50	sccm
O_2	0	sccm
CHF_3	0	sccm
CHF_4	0	sccm
H_2	0	sccm
SF_6	0	sccm
Pression He	3,6	Torr
Pression de travail	10	mTorr
Pos. valve d'étranglement	Variable	-
Vitesse de la PTM	27 020	RPM
RF puissance appliquée	120	Watt
RF puissance réfléchie	2	Watt
RF puissance réelle	118	Watt
LF puissance appliquée	400	Watt
LF puissance réfléchie	0	Watt
LF puissance réelle	400	Watt
Temperature du refroidisseur	22	°C

Tableau 6-2 : *Recette de gravure du quartz à base d'un plasma $Ar/O_2/CHF_3$. La gravure est à la fois physique et chimique et produit des cylindres tronconiques*

Paramètres	Valeurs	Unités
Ar	10	sccm
O_2	10	sccm
CHF_3	60	sccm
CHF_4	0	sccm
H_2	0	sccm
SF_6	0	sccm
Pression He	3,6	Torr
Pression de travail	10	mTorr
Pos. valve d'étranglement	Variable	-
Vitesse de la PTM	27 020	RPM
RF puissance appliquée	120	Watt
RF puissance réfléchie	2	Watt
RF puissance réelle	118	Watt
LF puissance appliquée	400	Watt
LF puissance réfléchie	0	Watt
LF puissance réelle	400	Watt
Temperature du refroidisseur	22	°C

Tableau 6-3 : *Recette de gravure du quartz à base d'un plasma Ar/CHF_3/SF_6. La gravure est à la fois physique et chimique produit des cylindres droits.*

Paramètres	Valeurs	Unités
Ar	10	sccm
O_2	0	sccm
CHF_3	20	sccm
CHF_4	0	sccm
H_2	0	sccm
SF_6	50	sccm
Pression He	3,6	Torr
Pression de travail	10	mTorr
Pos. valve d'étranglement	Variable	-
Vitesse de la PTM	27 020	RPM
RF puissance appliquée	120	Watt
RF puissance réfléchie	2	Watt
RF puissance réelle	118	Watt
LF puissance appliquée	400	Watt
LF puissance réfléchie	0	Watt
LF puissance réelle	400	Watt
Temperature du refroidisseur	22	°C

Tableau 6-4 : *Recette de gravure à base d'un plasma Ar/CHF_3/SF_6 avec une pression de travail plus élevé (25 mTorr). La gravure est à la fois physique et chimique.*

Paramètres	Valeurs	Unités
Ar	10	sccm
O_2	0	sccm
CHF_3	20	sccm
CHF_4	0	sccm
H_2	0	sccm
SF_6	50	sccm
Pression He	3,6	Torr
Pression de travail	25	mTorr
Pos. valve d'étranglement	Variable	-
Vitesse de la PTM	27 020	RPM
RF puissance appliquée	120	Watt
RF puissance réfléchie	2	Watt
RF puissance réelle	118	Watt
LF puissance appliquée	400	Watt
LF puissance réfléchie	0	Watt
LF puissance réelle	400	Watt
Temperature du refroidisseur	22	°C

Tableau 6-5 : *Recette de dépôt de l'oxyde de silicium (SiO2).*

Paramètres	**Valeurs**	**Unités**
SiH_4	14	sccm
NH3	0	sccm
N2O	1000	sccm
N2	0	sccm
SF6	0	sccm
Ar	100	sccm
Pression de travail	1200	mTorr
Mesure N2	-	Sccm
Vitesse de la PTM	47 020	RPM
Penning Pressure	-	Nbar
RF puissance appliquée	250	Watt
RF puissance réfléchie	10	Watt
RF puissance réelle	240	Watt
Température réacteur	280	°C

6.2. Images de scans

- **Scans de billes et de structures fabriquées dans la lamelle de verre**

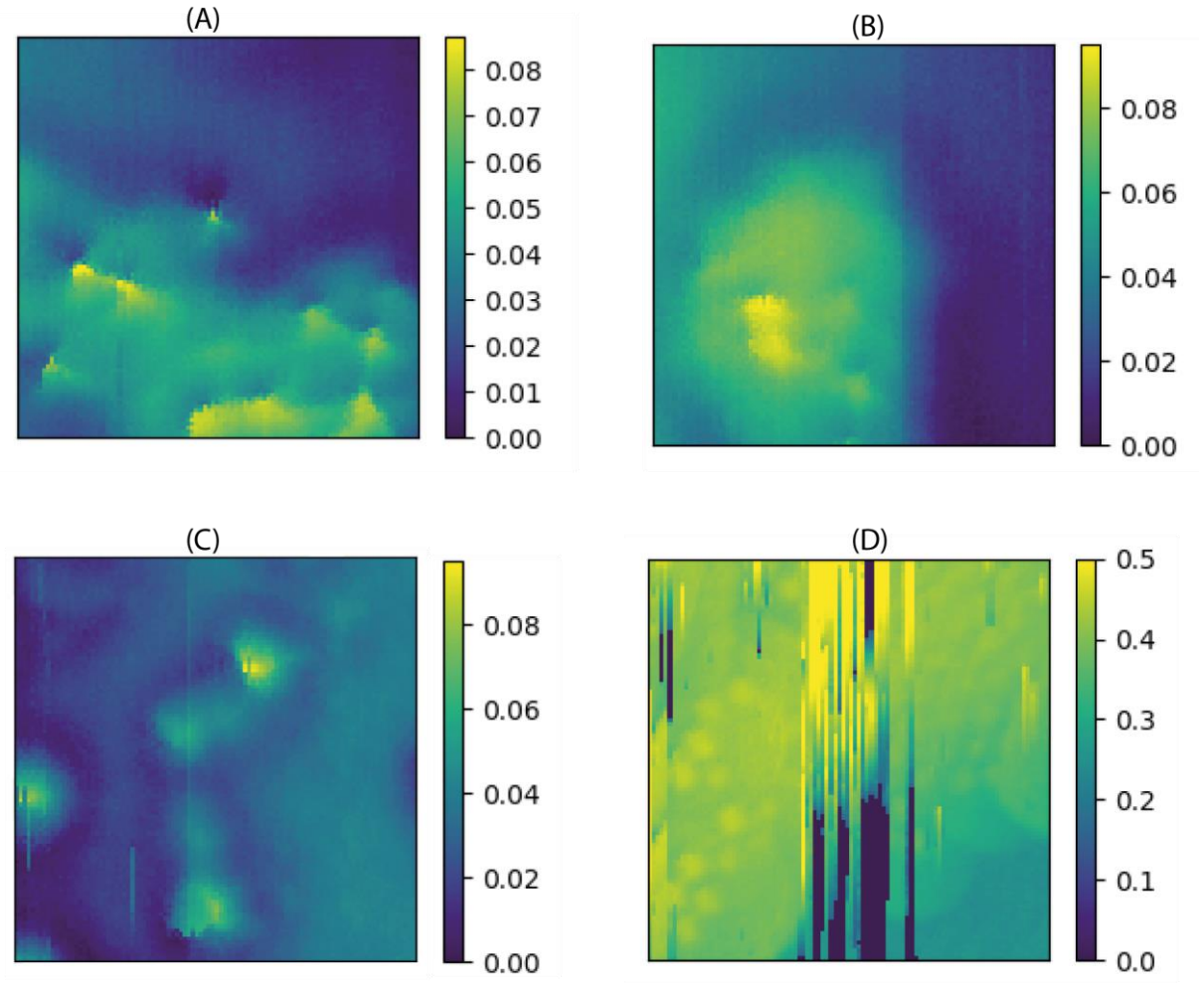


Figure 6-1 *: Images de scans (pas 10 nm et surface de 1x1 µm) de surfaces effectué sur des structures directement gravées sur la lamelle de verre (A), (B) et (C) et scan (pas de 20 nm et surface de 2x2 µm) de billes déposé sur la lamelle (D). Les barres sont en µm.*

- **Scans de GR**

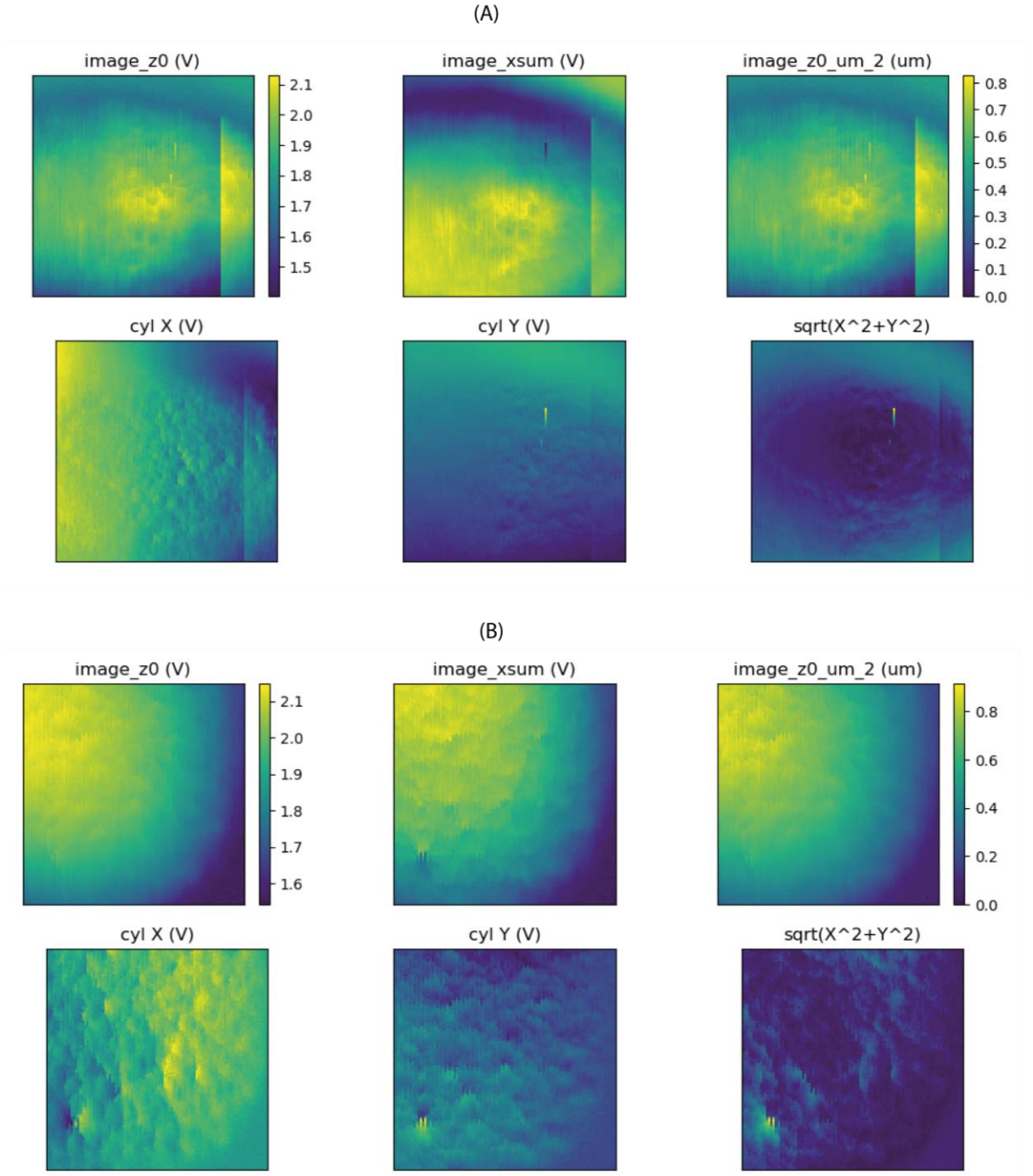


Figure 6-2 : *Scans effectués sur deux globules rouges différents. (A) Ici le scan est réalisé avec un pas de 40 nm sur une surface de 4x4 µm. (B) le pas est de 2x2 µm avec un pas de 20 nm. Tous les signaux enregistré (x, y, z) sont disponibles pour les deux scans. Les barres sont en µm.*

6.3. Listes des abréviations

AFM : Atomic Force Microscope / Microscope à Force Atomique

Ar : Argon

BSA : Bovine Serum Albumine / Albumine de sérum bovin

CHF_3 : Trifluorométhane

Cr : Chrome

CSFNP : Cube de Séparation de Faisceau Non Polarisant

DSP / PSD : Détecteur de sensibilité de position / Position Sensitivity Detector

GaAs : Arséniure de Gallium

GR : Globule Rouge

HF : Acide Fluorhydrique

H_2SiF_6 : Acide hexafluorosilicique

ICP-RIE : Inductively Coupled Plasma Reactive Ion Etching / gravure ionique réactive par plasma induit par couplage inductif

InAs : Arséniure d'Indium

LF : Low Frequence / Basse fréquence

MAO : Modulateur Acousto-Optique

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MEO : Modulateur Electro-Optique

MT : Microtubule

N_2 : Diazote

N_2O : Protoxyde d'azote

NH_3 : Ammoniac

O_2 : Dioxygène

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PE-CVD : Plasma Enhanced-Chemical Vapor Deposition / dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma

PhFM : Photonic Force Microscope / Microscope à Force Photonique

PLL : Poly-L-lysine

RF : Radio Fréquence

SF_6 : Hexafluorure de Soufre

SFP : Séparateur de Faisceau Polarisant

SiF_4 : Tétrafluorure de silicium

SiH_4 : Silane

SiN_X : Nitrure de Silicium

SiO_2 : Dioxyde de Silicium

TiO_2 : Dioxyde de Titane

TIRF : Total Internal Refraction Fluorescence / Fluorescence par Réflexion Totale Interne

UV : Ultra-Violet

Les pinces optiques permettent de piéger des particules microniques ou sub-microniques dans le cône d'un faisceau laser focalisé et, via un système d'asservissement du faisceau de déplacer et mesurer la position des particules avec une résolution nanométrique. Mais cet outil peut également servir de technique de microscopie à sonde locale pour produire une carte topographique d'une surface de quelques microns. La microscopie à force photonique (PhFM) est une technique d'imagerie en champ proche basée sur la mesure, à une résolution nanométrique, de la position d'une particule piégée optiquement tout en balayant la topographie d'une surface. Par rapport aux microscopes à force atomique (AFMs) conventionnels, cette technique à l'avantage d'appliquer une force largement plus faible sur l'échantillon, ouvrant la possibilité d'imager des matériaux très mous comme des membranes cellulaires, sans la déformation qui accompagne souvent l'imagerie AFM de ces matériaux. De plus, l'absence d'un cantilever permet le balayage dans des régions topologiquement restreintes. Cependant, la résolution latérale en PhFM reste limitée par la géométrie de l'objet piégé, qui est souvent choisi sphérique. Dans cette thèse, je présente un procédé de nanofabrication simple, économique et fiable pour la production en lot de microcylindres de quartz portant une pointe sur une extrémité. En raison de la géométrie allongée des particules et de la biréfringence du Quartz, le piège optique à polarisation linéaire contraint tous les degrés de liberté du cylindre, permettant un piégeage stable et une résolution de l'ordre du nm dans la détection de la position des particules dans les trois directions. La taille de la pointe permet une résolution latérale de 30 nm, tout en appliquant une force aussi faible que 1 pN sur l'échantillon. Outre les procédés de nanofabrication, ce travail s'est attaché à développer la technique du l'imagerie PhFM, la calibration des déplacements de la sonde pour démontrer son efficacité à analyser des surfaces rigides mais également des objets biologiques comme des microtubules ou des surfaces de cellule. A ce titre nous sommes parvenus à produire une image d'une membrane de globule rouge laissant apercevoir la structure sous-jacente du cytosquelette.

Optical Tweezers allow microscopic or sub-microscopic particles to be trapped in the beam waist of a focused laser and, via an optical control system, to move and measure the position of the particles with a nanometric resolution. But this optical setup can also be used as a local probe microscopy technique to produce a topographic map of a surface of a few microns. Photonic force microscopy (PhFM) is a near-field imaging technique based on the measurement, at nanometric resolution, of the position of an optically trapped particle while scanning the topography of a surface. Compared to conventional atomic force microscopes (AFMs), this technique has the advantage of applying a much lower force to the sample, opening up the possibility of imaging very soft materials such as cell membranes, without the deformation that often accompanies AFM imaging of these materials. In addition, the absence of a cantilever allows scanning in topologically restricted areas. However, the lateral resolution in PhFM remains limited by the geometry of the trapped object, which is often chosen spherical. In this thesis, I present a simple, economical and reliable nanofabrication process for the batch production of quartz microcylinders with a tip on one end. Due to the elongated particle geometry and birefringence of the Quartz, the linear polarized optical trap constrains all degrees of freedom of the cylinder, allowing stable trapping and nm resolution in detecting the particle position in all three directions. The size of the tip allows a lateral resolution of 30 nm, while applying a force as low as 1 pN to the sample. In addition to nanofabrication processes, this work focused on developing the PhFM imaging technique, the calibration of the probe's displacements to demonstrate its effectiveness in analyzing rigid surfaces but also biological objects such as microtubules or cell surfaces. As such, we were able to produce an image of a red blood cell membrane that shows the underlying structure of the cytoskeleton.