HAL
open science

Conception et caractérisation d'un dispositif à base de nanopores destiné à l'enregistrement électrique de l'activité de canaux ioniques membranaires

Raphaël Marchand

▶ **To cite this version:**

Raphaël Marchand. Conception et caractérisation d'un dispositif à base de nanopores destiné à l'enregistrement électrique de l'activité de canaux ioniques membranaires. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. UPS Toulouse - Université Toulouse 3 Paul Sabatier, 2016. Français. NNT : . tel-01416500v1

HAL Id: tel-01416500

https://laas.hal.science/tel-01416500v1

Submitted on 14 Dec 2016 (v1), last revised 13 Jul 2017 (v2)

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

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Raphaël Marchand

Le mercredi 13 juillet 2016

Titre :

Conception et caractérisation d'un dispositif à base de nanopores destiné à l'enregistrement électrique de l'activité de canaux ioniques membranaires

---

ED SDM : Nano-physique, nano-composants, nano-mesures - COP 00

Unité de recherche :

LAAS - CNRS

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Emmanuelle Trévisiol
Pr. Christophe Vieu

Rapporteurs :

Dr. Anne-Marie Haghiri-Gosnet
Dr. Olivier Français

Autre(s) membre(s) du jury :

Pr. Alain-Michel Boudet (Examinateur)
Dr. Bernard Bartenlian (Examinateur)
Dr. Christophe Thibault (Invité)

A la Vie …

Ah ! La vie ☺

Dans le tumulte de la rédaction
De ces choix interminables
Un spectacle chaque jour m'attendrissait le cœur
Chaque jour recommencé, chaque jour renouvelé.

Près de la cascade, des mouettes et des canards
Bronzent au soleil et regardent l'eau filer
Sur des rochers et des troncs … il ne leur manque plus qu'un café
Certains font même du toboggan sur la cascade en riant.

Ce spectacle, chaque jour recommencé
Me rappelait une vérité :
Au-delà de la complexité échafaudée des Hommes
Il est une réalité toute simple, et pourtant si forte
Cette réalité tu ne dois jamais l'oublier :

Jouer dans l'air, jouer dans l'eau, rigoler
Profiter d'un instant de soleil
Aimer sa moitié, aimer ses petits
Respirer

Profiter d'un instant de vie supplémentaire
Chaque jour renouvelé
Respirer, respirer
Vivre

To Life …

Ah ! Life ☺

Lost in the turmoil of the writing
Of these endless possibilities
A show tenderised my heart everyday
Everyday repeated, everyday renewed.

Close to the waterfall, there are seagulls and ducks
Sunbathing and looking at the flowing water,
Standing on rocks and tree trunks
All that's missing is the coffee
Some are even laughing and playing slip and slide on the waterfall.

This show, repeated everyday
Was reminding me of a truth:
Beyond the complexity built by Humans
There is a reality, very simple and yet so strong
This reality, never forget it:

Playing in the air, playing in the water, laughing
Enjoying a sunshine moment
Loving one's other half, loving one's children,
Breathing

Enjoying another moment given
Each day renewed
Breathing, breathing
Living

Résumé

Les canaux ioniques sont des protéines membranaires permettant le transport ionique au travers des membranes biologiques. Du fait de leur omniprésence dans l'organisme, ils représentent une classe de cibles thérapeutiques encore actuellement peu exploitée du fait de limitations expérimentales dans leur étude.

La mesure électrique de l'activité des canaux ioniques au sein de bicouches biomimétiques reconstituées *in vitro* permettrait de répondre à ces limitations. Cependant, il n'existe actuellement pas de système satisfaisant au cahier des charges complet pour de telles analyses : stabilité et pureté de la bicouche, faible niveau de bruit, insertion rapide des canaux ioniques, intégration dans un dispositif fluidique, possibilité de mener une caractérisation optique simultanée.

L'objectif de ces travaux de thèse était d'évaluer dans quelle mesure l'utilisation d'un substrat SOI (Silicon On Insulator) comprenant des nanopores pourrait permettre de répondre à tous ces critères. Des nanopores de diamètre compris entre 10 nm et 160 nm ont été réalisés à partir d'un substrat SOI. Une cellule fluidique transparente est utilisée pour l'adressage fluidique. Cette cellule permet d'autre part la double caractérisation électrique et optique.

Les propriétés électriques en milieu liquide du dispositif ont été étudiées et permettent de dégager des perspectives d'amélioration. La double caractérisation électrique et optique est démontrée au moyen d'expériences de capture de nanoparticules fluorescentes sur les nanopores. Enfin, des premiers résultats prometteurs d'obtention d'une bicouche lipidique suspendue sont présentés.

Remerciements

Je suis heureux d'avoir pu vivre cette expérience si enrichissante qu'a été la thèse. Enrichissante tant sur le plan humain que scientifique. De par la pluridisciplinarité du sujet, j'ai été amené à interagir avec de nombreuses personnes afin de ne pas réinventer la poudre pour chaque thématique abordée. La fabrication des dispositifs, leur caractérisation morphologique et électrique ainsi que leur utilisation en tant que laboratoire dédié aux bicouches lipidiques, ont nécessité autant de savoirs et savoir-faire à acquérir, dont une grande partie m'a été transmise par des prédécesseurs ou des collaborateurs. Je souhaite donc remercier toutes ces personnes d'une part pour leur professionnalisme, mais aussi pour la bienveillance, la sympathie, et le plaisir de transmettre que j'ai rencontrés partout sur mon chemin. Chaque rencontre a été l'occasion d'un échange plus ou moins approfondi, et « ces petits riens que j'ai mis bout-à-bout » m'ont fait dans l'ensemble beaucoup grandir.

Pour commencer, je souhaiterais remercier chaleureusement les rapporteurs, Anne-Marie Haghiri-Gosnet et Olivier Français, ainsi que les examinateurs Alain-Michel Boudet et Bernard Bartenlian, de m'avoir consacré leur temps et énergie pour l'évaluation de cette thèse. Leurs retours constructifs, formulés lors de la soutenance, ont rendu ce moment très enrichissant. Je remercie ensuite très sincèrement et très chaleureusement mes deux directeurs de thèse, Emmanuelle Trévisiol et Christophe Vieu, ainsi que Christophe Thibault qui a participé de près à ce projet, pour tout ce qu'ils m'ont apporté pendant ma thèse. Ensemble vous m'avez beaucoup aidé à améliorer ma communication, m'avez apporté un regard critique et m'avez enseigné votre démarche rationnelle scientifique. Je suis reconnaissant de l'exigence que vous avez montrée à mon égard, qui m'a tiré vers le haut, et pense sincèrement que vos enseignements me serviront tout le long de ma vie, tant sur le plan professionnel que personnel. Je remercie aussi très chaleureusement mon référent TEAM, Franck Carcenac, pour le temps qu'il m'a consacré, ainsi que la bienveillance et la patience qu'il a montré à mon égard. Ce n'est pas seulement une démarche scientifique que tu m'as transmis, mais tout un esprit critique à l'égard de moi-même et des choix à accomplir dans la réalisation de ces travaux de thèse. Tes nombreux enseignements me servirons aussi tout au long de ma vie, tant sur le plan professionnel que personnel. Je remercie aussi chaleureusement Angélique Coutable, qui m'a transmis son savoir-faire « phospholipides ».

Grâce à la qualité des infrastructures et de l'organisation du LAAS, j'ai pu bénéficier de l'aide de nombreuses personnes, appartenant à différents services ou équipes de recherches. Ces travaux de thèse n'auraient pu être réalisés sans elles. Je remercie donc chaleureusement : Bernard Legrand pour ses explications sur le bruit électrique, Sandrine Assié-Souleille, Pierre Temple-Boyer, Emeline Descamp, Fadhila Sekli, Valentina Castagnola et Nicolas Mauran pour leur aide sur la partie mesures électriques et mesures électriques en milieu liquide. Charline Blatché et Sandrine Assié-Souleille de m'avoir ouvert les portes de la salle C-211, formé à son utilisation, et apporté tout au long de la thèse de nombreuses réponses à de nombreuses questions. Christine Fourcade, Monique Benoît, Vinciane Luque et Hugues Granier de m'avoir ouvert les portes de la salle blanche. Jean-Baptiste Doucet pour ses réponses sur la partie chimie, Benjamin Reig pour la partie caractérisation en salle blanche. Adrian Laborde et Laurent Mazenq pour la partie photolithographie. Fabien Mesnilgrente pour les dépôts en

phase vapeur. Eric Imbernon et Bernard Rousset pour l'oxydation thermique. Aurélie Lecestre et Pascal Dubreuil pour la gravure ionique réactive. Xavier Dollat pour la réalisation d'un moule en polymère pour le PDMS. Franc Carcenac et Emmanuelle Daran pour la préparation du PMMA et de son développeur. Laurent Malaquin, Vincent Picot, Marc Fouet, Aurélien Bancaud et Sandrine Assié-Souleille pour leur coup de pouce sur la partie microfluidique. Julien Roules, Charline Blatché et Aline Cerf pour leur coup de pouce sur la partie microscopie. Je remercie aussi chaleureusement Serges Mazères et Laurence Salomé pour leur aimable collaboration sur la partie FRAP. Je remercie aussi chaleureusement pour leur bienveillance tous les chercheurs qui m'ont apporté un conseil, une explication, un point de vue, etc., Thierry, Aline, Liviu, Laurent, Emeline, Christian, Etienne, Bernard, Jérôme, Pierre, Fadhila, David.

Un grand merci aussi aux deux directeurs successifs du laboratoire, Jean Arlat et Liviu Nicu, de m'avoir accueilli au LAAS pour cette thèse, et à tous les membres des nombreux services du laboratoire qui ont été nécessaires pour réaliser ces travaux, pour le sourire et l'accueil chaleureux que j'ai rencontré partout : service informatique, service du personnel, de la documentation, de la communication, de la reprographie, de la restauration, de l'entretien, du ménage, du ménage de la salle blanche, de l'accueil du LAAS, de la sécurité, du secrétariat, du magasin, ainsi que l'atelier d'électronique. Un grand merci aussi à tous les autres doctorants ou stagiaires d'avoir été là, au bureau, dans les couloirs, en salle blanche, aux Bi-R sessions, à la fête du LAAS, à la fête de la science ou au match permanent thésard : Aude, Aziliz, Adhitya, Aïva, Kayum, Emma, Erwan, Cécile, Aliki, Valentina, Aurore, Sabrina, Florian, Denis, Pattamon, Laurene, Yingning, Lin, Aliki, Amandine, Marie, Hélène, Maxime, Sylvain, Amel, Sabeha, Jonathan, Marion, Flavien, Angélique, Amélie, Nicolas, Brieux, Audrey, Olga, Richard, Alexandre, Pricillia, Jean, etc …

Merci à Aude et Veljko de m'avoir aidé à représenter le mieux possible les doctorants et post-doctorants au conseil de laboratoire. Un grand merci à tous les membres du conseil de laboratoire pour la richesse des discussions et réunions que nous avons eu. Merci aux musiciens pour leur participation aux concerts lors de la fête du LAAS, Naoko, Maximilien, Veljko, Thierry, Estelle, Yingning, Jing, Aude, Mehdi, André, Franck, Carine, Jean-Marie etc, ainsi qu'à tous ceux qui s'impliquent pour la vie du laboratoire, qui fait que globalement on se sent bien en cet endroit : organisateurs du match permanent thésard, de la fête de la science, des Bi-R sessions, de la fête du LAAS, des séminaires, etc.

Merci aussi à mes colocs et mes proches qui m'ont supporté pendant ces années, avec qui j'ai bien rigolé ☺ et qui m'ont beaucoup changé : Florian, Paulin, Adélaïde, Lily, Gabriel, Noémie, Brian, Mélanie, Jules, Margaux, Robin, Charlène, Christian, Bina, Mustapha, Dijana, Marius, Michaelle, Bertrand, Benjamin, Matéo, Thibault, Laurène, Luce, Julien, Olivier, Emilie, Lisadie, Guillaume, Héloïse, Coralie, Estelle, David, etc... Merci aussi à mes parents et mes deux sœurs de m'avoir soutenu et d'avoir été présent pour la soutenance de thèse ☺ Merci aussi à tous ceux que j'aurais oublié de citer … Enfin, un immense, incommensurable, merci à toi, Carine, qui m'a tant apporté et m'a tant fait grandir pendant ces années.

Prologue (ou plutôt épilogue) Foreword

Merci à Ben et Alexandra pour leurs améliorations dans la traduction du poème et de ce prologue.

Aujourd'hui, alors qu'un nouveau chapitre commence, je projette de réaliser un voyage autour du monde en tant que guitariste chanteur.
Je ne sais pas où ce voyage me conduira, mais je suis confiant dans l'avenir et j'espère pouvoir dire un jour en toute connaissance de cause à mes enfants, aux jeunes, et à tout le monde :

Ayez le courage de réaliser vos rêves,
Même s'ils contiennent une part de risque et si quelquefois vous êtes la seule personne à y croire.

C'est ce qui vous fera donner le meilleur de vous-même, vous fera réaliser les plus grandes choses.

Cela vous fera affronter vos peurs, et vous rendra ainsi plus fort.

Cela vous fera grandir et devenir un adulte rayonnant et épanoui.

Et n'est-ce pas ce que l'on peut rêver de mieux ?
Ce que l'on peut donner de mieux à ses enfants, à ses proches, et à tous les êtres humains que l'on rencontre ?

Now a new chapter of my life begins. I am planning to travel around the world with my guitar and my voice.

I don't know where this will take me, but I am confident in the future and I hope, one day, to be able to tell my children, young people and everybody else:

Have the courage to fulfil your dreams,
Even if they represent a risk and if at times you are the only person to believe in them.

Only then can we reach our full potential and accomplish the greatest things.

Fulfilling your dreams will help you to
Face your fears, and this is what makes you stronger.

Fulfilling your dreams will make you grow and become an accomplished person.

And isn't this the best that one can dream for?
The best one can give to his children
To his loved ones, and to every person with whom he shares his story?

Tables des matières

Liste des abréviations **1**

Introduction générale **5**

Chapitre 1 : Etat de l'art **9**

1. Introduction : des membranes biologiques à la caractérisation électrique de l'activité des canaux ioniques membranaires 9

1.1. Les membranes biologiques 9

1.2. Transport membranaire 12

1.3. Les canaux ioniques, description et enjeu biomédical 14

1.4. Caractérisation électrique des potentiels d'action et du courant ionique transmembranaire au sein de neurones d'animaux disséqués 16

1.4.1. Potentiel de membrane au repos 17

1.4.2. Potentiel d'action 17

1.4.3. Caractérisation électrique des potentiels d'action et ordres de grandeur 18

1.4.4. Caractérisation électrique du courant ionique transmembranaire à potentiel fixé, mise en évidence du mode d'activation des canaux voltage-dépendant 18

1.4.5. Conclusion 20

1.5. Méthode de « patch-clamp » 21

1.5.1. Enregistrements à l'échelle du canal unique 23

1.5.2. Enregistrements en configuration cellule entière 25

1.6. Etude pharmacologique à grande échelle des canaux ioniques au sein de cellules vivantes 27

1.7. Bilan, limites de l'étude des canaux ioniques au sein de cellules vivantes 28

2. Mesure électrique *in vitro* de l'activité de canaux ioniques au sein de bicouches biomimétiques 29

2.1. Présentation des bicouches biomimétiques 29

2.2. Reconstitution des canaux ioniques au sein de bicouches biomimétiques, rôle central des liposomes 34

2.3. Mesure de l'activité de canaux ioniques au sein de bicouches suspendues formées en utilisant un solvant organique 37

2.3.1. Utilisation d'une cloison de polymère : la bicouche suspendue « classique » 37

2.3.2. Description des sources de bruit dans un banc de mesure de l'activité de canaux ioniques au sein d'une bicouche suspendue 40

2.3.3. Diminution du niveau de bruit par une optimisation de la géométrie du dispositif, des matériaux utilisés et de la connectique 47

2.3.4. Amélioration de la longévité de la bicouche grâce à une réduction du diamètre et/ou une modification de la géométrie des pores 51

2.3.5. Dispositifs permettant la caractérisation simultanée par microscopie optique à haute résolution 55

2.3.6. Utilisation de dispositifs comprenant une interface fluidique 57

2.3.7. Bilan, conclusion sur les dispositifs permettant d'obtenir une bicouche suspendue en utilisant un solvant organique 64

2.4. Formation de bicouches suspendues intégrant directement des canaux ioniques, obtenues par rupture de liposomes 65

2.4.1. Formation d'une bicouche suspendue par rupture d'une GUV 65

2.4.2. Formation d'une bicouche suspendue par fusion et rupture de SUV et de LUV 67

3. Bilan et positionnement du projet 74

3.1. Bilan 74

3.2. Positionnement du projet 78

4. Références 80

Chapitre 2 : Fabrication et caractérisation morphologique des dispositifs 87

1. Introduction : 87

2. Fabrication et caractérisation des nanopores et du nanocanal enfoui 88

2.1 Lithographie électronique des nanopores 89

2.2 Gravure ionique réactive des nanopores 93

2.3 Gravure humide de l'oxyde enfoui 97

2.4 Oxydation thermique 100

2.5 Conclusion 107

3. Fabrication des cellules microfluidiques 107

4. Assemblage du dispositif 112

5. Conclusion 114

6. Références 115

Chapitre 3 : Caractérisation électrique des dispositifs en milieu liquide 117

1. Modèle électrique 117

1.1. Résistance des microcanaux 118

1.2. Couplage capacitif entre le compartiment 1 et le compartiment 2 119

1.2.1. Couplage capacitif via le PDMS 119
1.2.2. Couplage capacitif via le substrat SOI pour une géométrie simplifiée..... 120
1.2.3. Couplage capacitif via le substrat SOI pour la géométrie réelle des microcanaux . 122
1.2.4. Perspectives d'amélioration 124
1.3. Résistance de fuite 124
1.4. Résistance des nanopores et du nanocanal enfoui 125
1.4.1. Résistance associée au nanocanal $R_{nanocanal}$ et $R_{interpore}$ 126
1.4.2. Résistance associée aux nanopores 127
1.4.3. Calcul de la résistance totale $R_{réseau}$ 130
1.5. Calcul du saut de courant attendu lors du scellement des nanopores par des nanoparticules ou une bicouche suspendue 132
2. Validation du modèle 136
2.1. Matériel utilisé et montages 136
2.2. Mesure de la résistance des microcanaux fluidiques 136
2.3. Mesure du couplage capacitif entre les compartiments 1 et 2 139
2.3.1. Caractérisation de substrats SOI oxydés sans nanopores avec une cellule de PDMS à deux réservoirs et sans microcanaux 139
2.3.2. Caractérisation de dispositifs complets 141
2.4. Mesure de la résistance de fuite entre les compartiments 1 et 2 143
2.5. Mesure de la résistance $R_{réseau}$ des nanopores et du nanocanal enfoui via une caractérisation I(V) 148
3. Conclusion 149
4. Références 149

Chapitre 4 : Etude du scellement des nanopores par des nanoparticules ou par une bicouche suspendue 151

1. Introduction 151
2. Expériences de scellement des nanopores par des nanoparticules 152
2.1. Description de l'expérience 152
2.1. Présentation des travaux 153
2.2. Discussion 157
2.3. Conclusion 162
3. Formation de bicouches lipidiques supportées et suspendues à partir de vésicules lipidiques 163
3.1. Introduction 163
3.2. Résumé du protocole de formation des liposomes 165

3.3. Caractérisation par FRAP de la formation d'une bicouche supportée sur des substrats SOI 166

3.3.1. Présentation de la méthode de FRAP 166

3.3.2. Dispositif expérimental dédié au FRAP 168

3.3.3. Observations préliminaires en microscopie par fluorescence, choix des conditions expérimentales 169

3.3.4. Résultats, discussion 170

3.3.5. Conclusion 171

3.4. Mesure électrique in situ du scellement des nanopores par une bicouche lipidique suspendue 172

3.4.1. Caractérisation de la résistance d'un dispositif avant et après incubation de liposomes 173

3.4.2. Mesure de la résistance de dispositifs simultanément à l'incubation d'une suspension de liposomes 177

Influence de la taille des nanopores 180

3.4.3. Mise en évidence d'une bicouche supportée suivant les parois de nanopores de diamètre nominal 107 nm 183

Conclusion 184

4. Bilan, difficultés expérimentales, perspectives 185

5. Références 187

Conclusion générale 189

Annexe 1 : Protocoles expérimentaux 193

1. Fabrication des puces de silicium : 193

1.1 Enduction de PMMA 193

1.2 Lithographie électronique 193

1.3 Développement 195

1.4 Gravure RIE 195

1.5 Gravure humide 195

1.6 Oxydation thermique 196

1.7 Caractérisation 197

2. Fabrication des cellules fluidiques et assemblage 198

2.1 Fabrication des moules 198

2.2 Préparation et réticulation du PDMS 198

2.3 Assemblage 199

2.4 Préparation du PBS 199

2.5 Remplissage des dispositifs 199
3. Préparation des SUV/LUV 200
3.1 Mélange des phospholipides et évaporation du chloroforme 200
3.2 Mise en suspension et extrusion 200
3.3 Caractérisation 201
4. Caractérisation d'une bicouche supportée sur une surface de SiO_2 par microscopie de fluorescence et par FRAP 201
5. Mesures électriques 203
6. Expériences de capture de nanoparticules 204
7. Simulation avec le simulateur en ligne PartSim 205
8. Traitement des données avec le logiciel Igor Pro 207
9. Références 207

Annexe 2 : Démonstration des calculs de résistances et de sauts de courants 209

1. Calcul de $R_{réseau}$ en prenant en compte $R_{interpore}$ 209
2. Calcul du premier saut de courant en négligeant $R_{interpore}$ 210
3. Calcul des sauts de courant en prenant en compte $R_{interpore}$. 211

Liste des abréviations

AFM : microscopie à force atomique (atomic force microscopy)

ADN : acide désoxyribonucléique

ARDE : gravure aspect-ratio dépendante (aspect ratio dependant etching)

ARN : acide ribonucléique

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ATP : adénosine triphosphate

BOX : oxyde enfoui (buried oxide)

(Cellule) **CHO :** cellule d'ovaire de hamster chinois (chinese hamster ovary cell)

CPEO3 : Cholésterylpoly(éthylenoxy) thiol

CVD : dépôt chimique en phase vapeur (chemical vapour deposition)

dB : décibel

DDAB : bromure de dimethyldioctadecylammonium

DHPE : 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine

DLS : diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering)

DOATP : chlorure de 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-3-trimethylammonium-propane

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

DOPE : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine

DPhPC : 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DPPTE : 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphothioethanol

DPTL : 2,3-Di-O-phytanoyl-sn-glycerol-1-tetraethylene glycol-DL-a-lipoic acid ester

(Gravure) **DRIE :** gravure ionique réactive profonde (deep reactive ion etching)

DSP : densité spectrale de puissance

E. Coli : Escherichia Coli

EIS : spectroscopie d'impédance électrochimique (electrochemical impedance spectroscopy)

FDTS : perfluorodécyltrichlorosilane

FOTS : tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl trichlorosilane

FIB : faisceau d'ions focalisés (focused ion beam)

FRAP : recouvrement de fluorescence après photobleaching (fluorescence recovery after photobleaching)

FRET : transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (fluorescence resonance energy transfert ou Förster resonance energy transfert)

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier transform Infrared spectroscopy)

GABA : acide gamma aminoburytique

GUV : vésicule unillamellaire géante (giant unilamellar vesicle)

(Cellule) **HEK :** cellule rénale d'embryon humain (human embryo kidney cell)

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

hERG : human Ether-à-go-go related gene

IPA : isopropanol

LUV : vésicule unilamellaire de grande taille (large unilamellar vesicle)

MEB : microscope électronique à balayage

MIBK : méthylisobutylcétone

MTSET : 2-(triméthylammonium) éthylméthanethiosulfonate

NBD : nitrobenzoxadiazole

NBD-PC : 1-acyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodécanoyl}-sn-glycéro-3-phosphocholine

OTS : octadecyltrichlorosilane

PBS : tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)

PC : phosphatidylcholine

PDMS : Poly(DiMéthylSiloxane)

PECVD : dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (plasma enhanced chemical vapor deposition)

PEG : poly(éthylène glycol)

PET : poly(téréphtalate d'éthylène) (polyethylene terephtalate)

PMMA : poly(méthacrylate de méthyle) (PolyMethylMethAcrylate)

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine

POPG : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

POPS : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-sérine

pp : crête-à-crête (peak to peak)

PVDF : poly(fluorure de vinylidène)

PTFE : poly(tétrafluoroéthylène)

QCM-D : microbalance à quartz avec dissipation (quartz cristal microbalance with dissipation)

(Gravure) **RIE :** gravure ionique réactive (reactive ion etching)

RMS : moyenne quadratique (root mean square)

RMN : résonance magnétique nucléaire

SAM : monocouche auto-assemblée (self-assembled monolayer)

Sccm : Centimètre cube par minute dans les conditions standards (Standard cubic centimeter per minute)

SDS : laurysulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate)

SNOM : microscopie optique en champ proche (scanning near-field optical microscopy)

SOI : silicium sur isolant (silicon on insulator)

SOPC : 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

SLM : litre standard par minute (standard liter per minute)

SPR : résonance plasmonique de surface (surface plasmon resonance)

(microscopie) **STED :** microscopie à déplétion par émission stimulée (stimulated emission depletion microscopy)

SUV : vésicule unilamellaire de petite taille (small unilamellar vesicle)

TAMRA : 5-Carboxytetramethylrhodamine

TMA : chlorure de tétraméthylammonium

TMAH : Hydroxyde de tétraméthylammonium (tetramethylammonium hydroxide)

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

wt. : en masse (weight)

Introduction générale

Notre compréhension du vivant et des différentes briques qui le constituent a considérablement évolué depuis le début siècle dernier. Cette évolution a été possible grâce à l'avancée conjointe de différents domaines et disciplines scientifiques. Notamment, les nouvelles technologies ont permis, d'une part, de rendre plus efficace l'acquisition et le traitement des données, mais aussi de fabriquer des nouveaux systèmes permettant de sonder le vivant. Ainsi, grâce au développement des micro et nanotechnologies, nous avons pu fabriquer des systèmes dont la taille est similaire ou plus petite que celle des cellules vivantes donnant ainsi accès à des mesures à l'échelle sub-cellulaire. Ces mesures locales, totalement inédites ont mis à jour les propriétés électriques ou mécaniques des structures moléculaires protéiques auto-organisées au sein de la cellule comme les canaux ioniques ou les nanomoteurs actine-myosine du cytosquelette. Le nombre important de travaux réalisés au cours des dernières décennies dans les micro et nanotechnologies pour la biologie témoigne de la fertilité de ce domaine interdisciplinaire.

Nos travaux s'inscrivent dans cette démarche visant à mettre les micro et nanotechnologie au service de l'étude du vivant. Plus particulièrement, notre approche s'intéresse à la mesure électrique des courants ioniques au travers d'une bicouche lipidique, structure à la base des membranes cellulaires, reconstituée au sein d'un dispositif de silicium. Notre projet peut répondre à un besoin du secteur pharmaceutique concernant la caractérisation des canaux ioniques. Ces protéines membranaires confèrent aux membranes biologiques une perméabilité ionique sélective. Du fait de leur omniprésence dans les cellules des êtres vivants, les canaux ioniques sont impliqués dans diverses maladies. Ils représentent donc à ce titre un enjeu médical important. Une particularité des canaux ioniques est que leur fonctionnalité peut être mesurée électriquement au moyen d'un montage comprenant une électrode de chaque côté de la bicouche lipidique dans laquelle se trouve le canal ionique. Ces mesures permettent d'étudier le fonctionnement des canaux ioniques et de tester l'influence de potentielles molécules pharmaceutiques sur leur fonctionnalité.

L'étude électrique de l'activité des canaux ioniques a été d'abord réalisée par les électrophysiologistes sur des membranes de cellules vivantes au moyen de micropipettes en verre, avec la méthode dite de « patch-clamp ». Cette méthode étant manuelle, elle requiert un savoir-faire important et ne permet pas un criblage pharmaceutique visant à étudier l'influence de milliers de molécules différentes sur l'activité d'un canal ionique. Différents travaux ont visé à automatiser et paralléliser la méthode de patch-clamp, et des plateformes de patch-clamp automatiques ont ainsi vu le jour et sont aujourd'hui disponibles commercialement.

Une autre démarche, entreprise par différents groupes de recherche, a consisté à reproduire *in vitro* des bicouches biomimétiques et d'y insérer des canaux ioniques au préalable extraits ou synthétisés, afin de mesurer électriquement leur activité. Ces études se sont heurtées à plusieurs difficultés. Tout d'abord, une grande partie des méthodes développées nécessitent l'usage d'un solvant organique pour former la bicouche. Une partie de ce solvant reste dans la bicouche à l'issue de sa formation, ce qui pose des problèmes de compatibilité avec les canaux ioniques à étudier. Par ailleurs, une faible stabilité mécanique de la bicouche a souvent été observée, restreignant la durée des études possibles

à la durée de vie de la bicouche. Enfin, comme nous allons le voir, l'étape d'insertion des canaux ioniques dans la bicouche biomimétique est souvent critique et imprévisible.

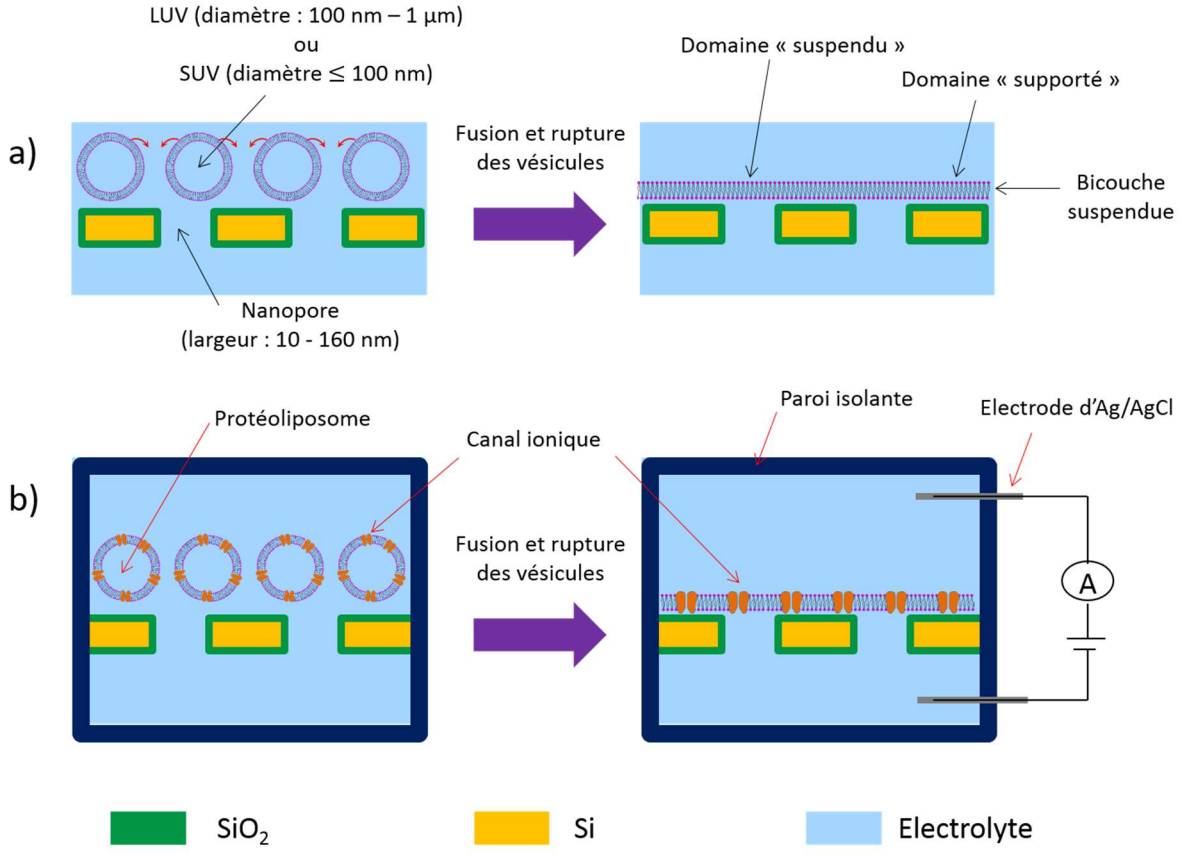


Figure 1 : schéma montrant le principe de fonctionnement du dispositif développé dans cette thèse. a) obtention d'une bicouche suspendue à partir de LUV ou de SUV. b) l'utilisation de protéo-LUV ou de protéo-SUV permettra par la suite d'obtenir directement une bicouche suspendue comprenant les canaux ioniques dont on souhaite enregistrer l'activité électrique.

Notre approche, schématisée sur la Figure 1, permettrait de répondre à ces limitations : Nous avons développé un dispositif de silicium présentant des nanopores (dimension latérale comprise entre 10 nm et 160 nm). Nous espérons former une bicouche dite *suspendue,* sans solvant organique, scellant des nanopores, en exploitant un mécanisme de fusion et rupture de *vésicules lipidiques unilamellaires* de diamètre compris entre 100 nm et 1 µm (LUV : vésicules unilamellaires de grande taille) ou inférieur ou égal à 100 nm (SUV : vésicules unilamellaires de petite taille). Ces vésicules ont en effet la particularité, lorsqu'on les met en présence d'une surface hydrophile (e. g. SiO_2) et dans certaines conditions, de fusionner entre elles et de se rompre, ce qui aboutit à la formation d'une bicouche lipidique dite *supportée* par auto-assemblage sur la surface.

Comme nous allons le voir, ce processus a déjà pu être reproduit sur une surface présentant des nanopores, et aboutit bien à la formation d'une bicouche suspendue scellant les nanopores. Dans cette thèse, l'architecture du dispositif de silicium utilisé permet en plus de mener des enregistrements électriques. Nous allons dans ce mémoire présenter la fabrication et la caractérisation de ce dispositif. Nous montrerons aussi des premiers résultats concernant la formation d'une bicouche suspendue à partir de LUV et de SUV (Figure 1 a). Outre l'absence de solvant organique, cette méthode permettra dans le futur d'insérer dans la bicouche les canaux ioniques directement au moment de sa formation,

en utilisant des protéo-LUV ou des protéo-SUV, vésicules intégrant déjà les canaux ioniques à étudier (Figure 1 b).

Ce manuscrit de thèse est divisé en quatre chapitres. Dans le premier chapitre, nous présenterons les différents systèmes qui ont été développés pour mesurer électriquement l'activité des canaux ioniques. Nous présenterons de manière plus détaillée les avantages et inconvénients de ces systèmes, et montrerons en quoi l'approche que nous avons choisie permet de répondre à diverses limitations. Dans le chapitre 2, nous présenterons le procédé de fabrication des dispositifs. Dans le chapitre 3, nous réaliserons une caractérisation électrique des dispositifs en milieu liquide, afin notamment d'évaluer la possibilité de détecter les évènements de scellement des nanopores à l'échelle du nanopore individuel. Dans le chapitre 4, nous validerons expérimentalement la détection de ces évènements individuels grâce à l'étude de la capture de nanoparticules par les nanopores, et présenterons des premiers résultats de formation d'une bicouche suspendue sur les nanopores.

Chapitre 1 : Etat de l'art

1. Introduction : des membranes biologiques à la caractérisation électrique de l'activité des canaux ioniques membranaires

Dans ce paragraphe, nous allons présenter les membranes et le transport au travers des membranes chez les organismes vivants, en particulier dans le cas des ions. Nous présenterons la méthode de « patch-clamp », qui permet de quantifier le transport au sein des canaux ioniques se trouvant sur la membrane extérieure de cellules vivantes.

1.1. Les membranes biologiques

Les membranes biologiques jouent un rôle essentiel chez les organismes vivants : elles permettent de définir des compartiments, tels que les cellules et les organites, dont la composition chimique peut être maintenue différente de leur environnement extérieur. La membrane extérieure des cellules, appelée membrane plasmique, est ainsi une véritable frontière entre la cellule et son environnement extérieur, frontière nécessaire pour que la cellule puisse exister en tant que « système biochimique coordonné » [1]. On trouve aussi à l'intérieur des cellules eucaryotes différents organites séparés du reste de la cellule par une membrane [2]. Ces organites sont visibles sur la Figure 1, qui montre la structure d'une cellule animale. Ils remplissent différentes fonctions au sein de la cellule, telles que la production d'énergie, la synthèse de molécules biologiques et la dégradation d'éléments toxiques. Ces fonctions nécessitent chacune un environnement chimique particulier et elles ne pourraient pas coexister sans la présence de membranes pour séparer les milieux de composition chimique différentes. Outre ce rôle de cloisonnement, les membranes biologiques régulent aussi les échanges de matière entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule ou des organites, ce qui permet *in fine* d'en réguler la composition chimique. Enfin, un troisième rôle important des membranes est de permettre des échanges d'information, échanges à la base de la communication entre les cellules ou entre les organites.

Pour remplir ces différentes fonctions, les membranes biologiques ont une composition chimique spécifique selon le type de cellule et l'emplacement de la membrane dans la cellule. Elles ont cependant une structure commune, décrite par le modèle de la mosaïque fluide [3]. La Figure 2 a) montre une vue en coupe de membrane plasmique de cellule animale. Des molécules amphiphiles, les phospholipides, sont organisées en une bicouche lipidique fluide de 4 - 5 nm d'épaisseur. Ces phospholipides s'orientent de sorte que seule leur tête polaire hydrophile (Figure 2 b) se trouve en

contact avec les molécules d'eau, agencement favorable énergétiquement. Diverses protéines, dites protéines membranaires intégrales, sont insérées dans la bicouche lipidique et peuvent y diffuser latéralement. Ces protéines peuvent traverser totalement la bicouche (on parle dans ce cas de protéine transmembranaire), ou bien être insérées dans un seul des deux feuillets lipidiques. Les protéines intégrales sont fortement liées à la membrane, et ne peuvent en être extraites uniquement après dissolution de celle-ci avec des détergents. D'autres protéines, dites protéines membranaires périphériques, sont plus faiblement liées à la membrane : elles sont en interaction non covalente avec des phospholipides ou des protéines membranaires intégrales, et peuvent être détachées de la membrane par des procédés tels que l'exposition à des solutions de faible ou de forte force ionique, ou de pH extrêmes [4].

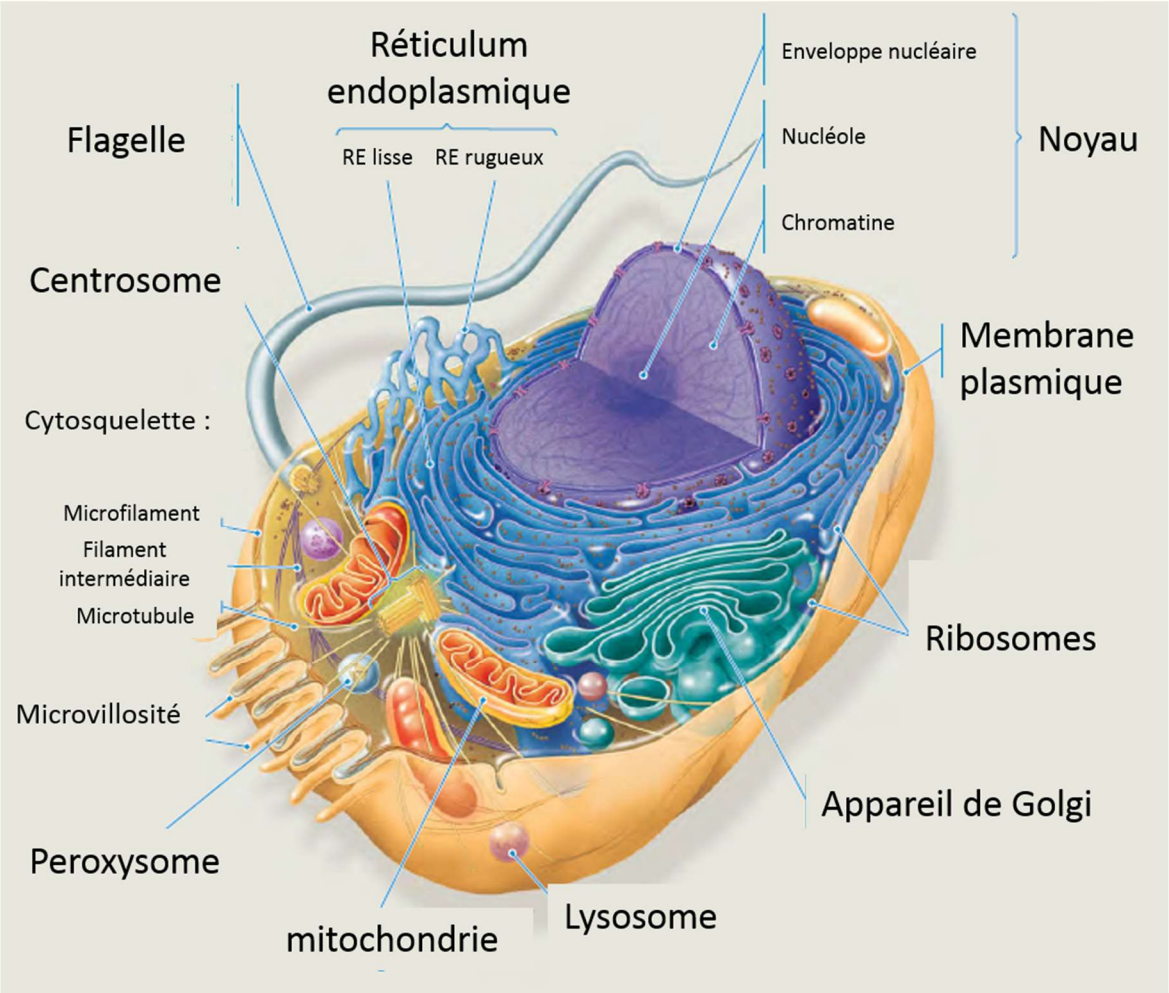


Figure 1 : schéma d'une cellule animale, adapté d'après [2].

De nombreuses protéines membranaires sont organisées en hélice(s) α (Figure 2 c), structure qui permet à une chaîne peptidique d'être stable au sein d'une bicouche lipidique : le squelette peptidique est enroulé en hélice sous l'effet de liaisons hydrogène entre les groupements amide de la chaine polypeptidique. Les chaines latérales des acides aminés étant ici majoritairement hydrophobes, elles s'orientent vers l'extérieur de l'hélice, et stabilisent celle-ci dans l'environnement apolaire que constitue le cœur de la bicouche lipidique. Certaines protéines membranaires contiennent une seule hélice α, qui peut traverser totalement la bicouche ou être insérée dans un seul des deux feuillets lipidiques. D'autres protéines, dites protéines à plusieurs passages, sont constituées d'une longue

chaîne polypeptidique présentant plusieurs hélices α. Les différentes hélices interagissent entre elles dans la bicouche pour former une seule entité (Figure 2 d). Nous ne présenterons pas ici les protéines transmembranaires organisées en feuillets β car la casse particulière de protéines transmembranaires sur laquelle nous allons nous focaliser, les canaux ioniques, ne sont que rarement constitués de feuillets β.

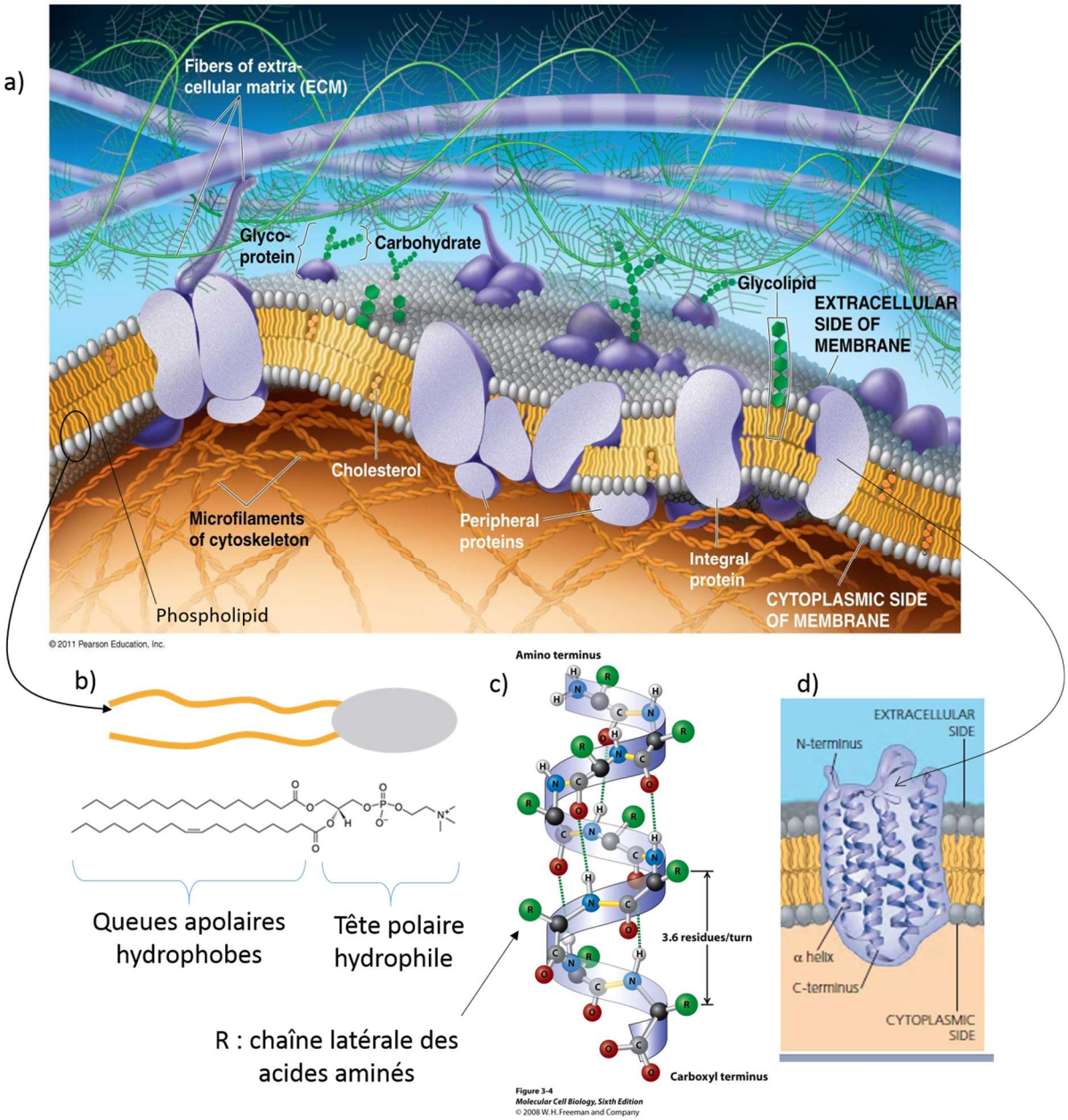


Figure 2 : a) vue en coupe d'une membrane plasmique de cellule animale, tiré de [5]. b) structure d'un phospholipide courant : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), adapté d'après www.avantilipids.com. c) structure d'une hélice α, adapté d'après [6]. d) schéma d'une protéine transmembranaire à plusieurs passages, tiré de [5].

Les phospholipides et les protéines sont les constituants principaux des membranes biologiques, cependant celles-ci peuvent aussi contenir des sphingolipides ainsi que du cholestérol. Le cholestérol peut se trouver en quantités importantes (jusqu'à une molécule de cholestérol pour une molécule de phospholipide) dans les membranes plasmiques des cellules eucaryotes [4]. Par ailleurs, les

membranes plasmiques contiennent aussi une part importante d'oligo ou de polysaccharides sur la face extracellulaire. Ces sucres sont associés à des protéines ou à des phospholipides, formant les glycoprotéines et les glycolipides, et jouent notamment le rôle de marqueur dans la reconnaissance cellulaire. Une autre spécificité des membranes plasmiques est qu'elles reposent sur le cytosquelette de la cellule, dont la zone périphérique, appelée zone corticale, est riche en filaments d'actine. Des protéines membranaires ancrent la membrane à ces filaments. Lors du processus d'endocytose, par exemple, cet ancrage permet que la membrane suive le cytosquelette et forme une vésicule qui entre vers l'intérieur de la cellule.

1.2. Transport membranaire

C'est la partie phospholipidique qui confère aux membranes biologiques leur caractère de barrière : le cœur de la bicouche lipidique étant hydrophobe, il laisse passer les molécules liposolubles telles que les stéroïdes ou le dioxygène (Figure 3 a). A l'inverse, les espèces chimiques fortement solubles dans l'eau telles que les ions ne diffusent que très lentement au travers d'une bicouche lipidique à cause de la barrière d'énergie à franchir lors du processus de désolvatation, processus nécessaire pour que l'ion quitte la solution aqueuse et passe au travers de la bicouche lipidique. Ainsi, beaucoup d'éléments nécessaires au métabolisme d'une cellule sont arrêtés par la bicouche lipidique. Pour les transporter à l'intérieur de la cellule ou des organites, il existe des protéines membranaires particulières appelées protéines de transport membranaire. Ces protéines peuvent être de deux types : canal ou transporteur. Les transporteurs (Figure 3 b) possèdent un ou plusieurs sites présentant une affinité spécifique au soluté à transporter. Une modification de la conformation du transporteur entraîne le passage du soluté de l'autre côté de la membrane. Les canaux (Figure 3 c) interagissent de manière plus faible avec le soluté. Ils forment un pore pouvant être ouvert ou fermé. Dans son état ouvert, ce pore laisse passer un ou plusieurs solutés de manière spécifique. Toutes les cellules contiennent par exemple des canaux ioniques, qui laissent passer un ou plusieurs ions de manière spécifique, et des aquaporines, qui augmentent la perméabilité des membranes vis-à-vis de l'eau. Nous reviendrons, dans le cas des canaux ioniques, sur l'origine de la spécificité des canaux vis-à-vis du soluté transporté.

En l'absence de protéine de transport, les molécules qui diffusent au travers de la bicouche lipidique le font dans le sens de leur gradient de concentration (Figure 3 d), c'est-à-dire qu'elles vont globalement depuis le côté de la membrane où elles sont présentes en plus forte concentration vers le côté de la membrane où elles sont présentes en plus faible concentration. On parle alors de transport passif. Un autre cas de transport passif est celui où un transporteur ou un canal facilite la diffusion du soluté au travers de la bicouche, diffusion se faisant là encore dans le sens du gradient de concentration du soluté. On parle alors de diffusion facilitée. A l'inverse, lorsque des protéines transportent le soluté dans le sens inverse de son gradient de concentration, on parle de transport actif. Ce transport actif ne peut être effectué que par les transporteurs et non par les canaux car il nécessite un changement de conformation de la protéine de transport : une des conformations présente une affinité relativement faible avec le soluté et l'autre une affinité plus forte. Cette différence d'affinité permet que le soluté soit « capturé » du côté de la membrane où il est présent en faible concentration et soit « expulsé » du côté où il est présent en forte concentration, entrainant ainsi son transport dans le sens inverse de son gradient de concentration. On appelle pompes les transporteurs effectuant un transport actif.

Le transport actif nécessite une source d'énergie, qui peut être par exemple l'hydrolyse d'une molécule d'ATP ou le transport simultané d'un autre soluté dans le sens de son gradient de concentration. Ainsi, par exemple, dans la plupart des cellules, une pompe dite « potassium / sodium » permet de maintenir une concentration en ions sodium 10 à 30 fois inférieure à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur, et une concentration en ions potassium 10 à 30 fois supérieure à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur [7]. Cette pompe utilise l'énergie dégagée par l'hydrolyse de l'ATP pour faire entrer les ions potassium dans la cellule et en faire sortir simultanément les ions sodium. Le gradient en ions sodium peut ensuite être utilisé pour actionner le transport actif d'autres molécules. Par exemple, dans le cas du transport du glucose au travers des cellules épithéliales de l'intestin (Figure 4), le glucose est transporté depuis la lumière intestinale vers l'intérieur des cellules épithéliales au moyen d'une pompe utilisant le gradient en sodium au niveau de la membrane plasmique (NB : la pompe est appelée symport car elle transporte le glucose et le sodium dans le même sens de la membrane). Un transporteur situé dans le domaine basal des cellules épithéliales facilite la diffusion du glucose depuis l'intérieur de la cellule jusqu'au fluide extracellulaire où il passe ensuite dans le sang.

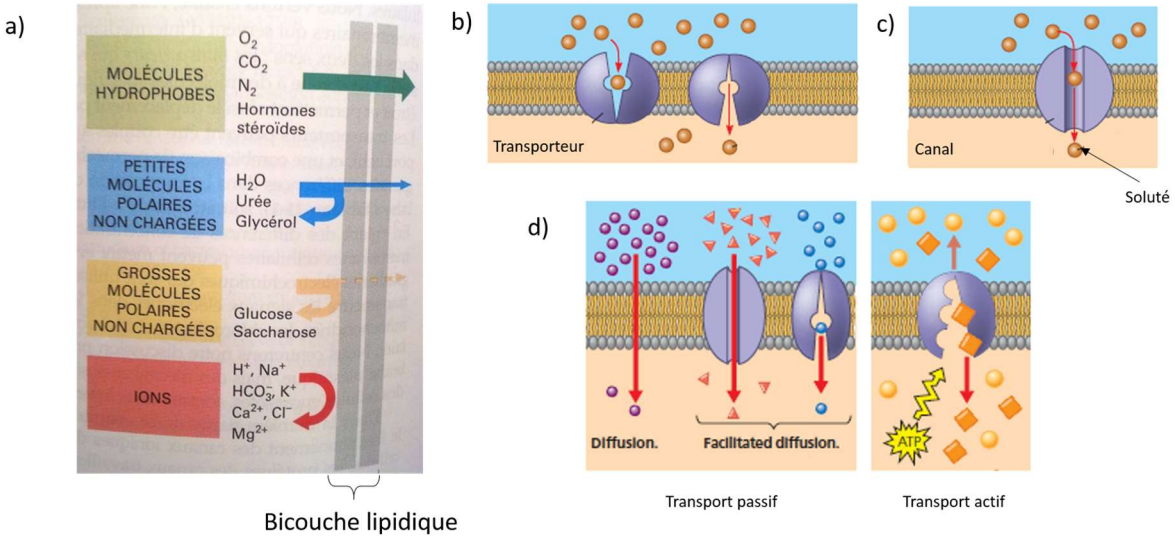


Figure 3 : a) diagramme schématisant la perméabilité des bicouches lipidiques vis-à-vis de différents types d'espèces chimiques, tiré de [7]. b) schéma en coupe d'un transporteur montrant deux conformations intervenant dans le transport du soluté. c) schéma en coupe d'un canal. d) schéma expliquant le transport passif et le transport actif. schémas tirés de [5].

La diffusion facilitée et le transport actif sont utilisés par les organismes vivants pour transporter les nutriments et autres éléments nécessaires au métabolisme cellulaire, pour éliminer les déchets, pour maintenir le pH neutre du cytosol ou le pH acide de certains organites tels que les lysosomes, et de manière générale pour contrôler la composition chimique des différents milieux biologiques. Nous allons maintenant nous intéresser de manière plus spécifique au transport des ions *via* les canaux ioniques.

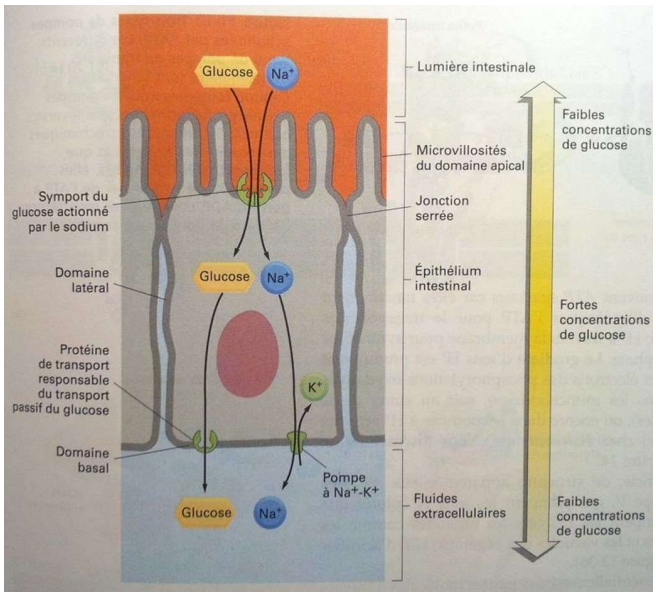


Figure 4 : schéma montrant le transport du glucose au travers des cellules épithéliales de l'intestin, tiré de [7]. Le transport au travers de la membrane apicale est actionné par le gradient sodique au niveau de cette membrane.

1.3. Les canaux ioniques, description et enjeu biomédical

Les canaux ioniques sont des canaux qui laissent passer certains ions de manière spécifique au travers des membranes biologiques. On les classe habituellement selon leur spécificité à un ion donné ou à une classe d'ions : les canaux potassiques (spécifiques à l'ion potassium K^+), les canaux sodiques (Na^+), les canaux calciques (Ca^{2+}), les canaux chloriques (Cl^-), les canaux spécifiques aux cations, aux anions, aux cations monovalents, etc. Les canaux ioniques peuvent laisser passer jusqu'à 10^8 ions par seconde, soit 10^5 fois plus que la vitesse de transport maximale observée pour les transporteurs [7]. Les mécanismes qui permettent à la fois une telle vitesse de transport et une telle sélectivité ont été en partie dévoilés grâce à l'obtention de la structure de certains canaux à la résolution atomique, comme par exemple le canal potassique bactérien KcsA [8]. Le développement et l'amélioration récente des outils de simulation de dynamique moléculaire ont cependant ouvert de nouvelles questions concernant les mécanismes de transport dans les canaux ioniques, questions qui restent encore débattues aujourd'hui [9].

La Figure 5 montre une représentation simplifiée de la structure du canal KcsA. Celui-ci est formé de quatre sous-unités identiques (dont deux représentées ici) assemblées en une structure à symétrie cylindrique. Des hélices α délimitent un pore débouchant sur une cavité appelée vestibule. Ce vestibule est rempli d'une cinquantaine de molécules d'eau et est entouré de petites hélices α polarisées pointant vers lui. Cet environnement électrostatique permet, pour le cas des ions positifs, d'abaisser la barrière d'énergie associée à la perte de la sphère de solvatation de l'ion [8], [10], sphère qui comprend environ 500 molécules d'eau et qui ne pourrait pas être conservée dans le canal [11]. Le pore rempli d'eau permet un transport rapide des ions sur une distance égale à la moitié de l'épaisseur

de la bicouche. Les ions passent ensuite par un filtre de sélectivité. Les groupements carbonyles du squelette peptidique y sont orientés de sorte qu'ils tapissent la paroi de ce canal. Le filtre de sélectivité permet que seuls les ions potassium ne passent, et ce avec une vitesse de transport élevée. Le mécanisme exact de transport dans le filtre de sélectivité est encore débattu aujourd'hui [9].

Figure 5 : représentation de deux des quatre sous-unités du canal KcsA, adapté d'après [8].

Une autre particularité des canaux ioniques est la présence de chaines peptidiques jouant le rôle de « vanne » qui peuvent obstruer l'entrée du canal et le faire basculer dans un état fermé. Ces vannes sont dans la plupart des cas actionnées par un stimulus extérieur [7] : la liaison d'un ligand (canal ligand-dépendant) [12], la variation de la différence de potentiel au niveau de la membrane (canal voltage-dépendant) [13], une expansion de la membrane (canal mécano-sensible) [14], ou une augmentation de la température (canal activé thermiquement) [15]. Les canaux ligand-dépendant sont par exemple impliqués dans la communication entre deux neurones par les neurotransmetteurs. Les canaux voltage-dépendant sont à l'origine des potentiels d'action dans les cellules excitables. Les canaux mécano-sensibles jouent par exemple un rôle de régulation de la pression osmotique dans certaines cellules telles que les bactéries, empêchant leur rupture lorsque cette pression est trop élevée. Les canaux activés thermiquement jouent par exemple un rôle dans la sensation de brûlure.

Les canaux ioniques sont présents dans les cellules de tous les organismes [16–18], non seulement dans la membrane plasmique mais aussi dans les membranes des organelles [19,20]. On suppose aujourd'hui, par le biais d'analyses du génome humain, qu'il existe environ 400 canaux ioniques différents chez l'Homme [21]. A mesure que de nouveaux mécanismes mettant en jeu des canaux ioniques sont découverts, l'enjeu pharmaceutique et scientifique qu'ils représentent grandit. Un nombre important de maladies, appelées canalopathies, sont dues au dysfonctionnement d'un canal ionique [22,23]. Du fait de l'omniprésence des canaux ioniques, les canalopathies peuvent affecter différents systèmes et organes : système neuromusculaire (e. g. épilepsie, ataxie, myotomie, arythmie cardiaque), système hormonal (e. g. syndrome de Morvan), système osseux (e. g. ostéopétrose), tissus épithéliaux (e. g. mucovisidose, syndrome de Bartter). Les canaux ioniques représentent donc des cibles thérapeutiques possibles dont le potentiel est largement sous-exploité aujourd'hui [21].

1.4. Caractérisation électrique des potentiels d'action et du courant ionique transmembranaire au sein de neurones d'animaux disséqués

Historiquement, ce sont des études menées sur les cellules excitables d'animaux disséqués, telles que les neurones ou les cellules musculaires, qui ont permis de mettre en évidence l'existence les canaux ioniques. En particulier, la caractérisation des potentiels d'actions sur des axones géants de calamar a permis de comprendre comment l'ouverture et la fermeture de canaux ioniques sodique et potassique voltage-dépendant sont responsables de l'occurrence des potentiels d'action. La Figure 6 a) montre l'organisation d'un neurone : celui-ci comprend un corps cellulaire appelé *soma* et de nombreuses projections partant de ce corps cellulaire. Des petites projections, appelées dendrites, captent les *stimuli* électriques provenant d'autres neurones, et une longue projection, appelée axone, transmet des *stimuli* électriques vers d'autres neurones *via* les synapses, qui sont les connexions entre neurones.

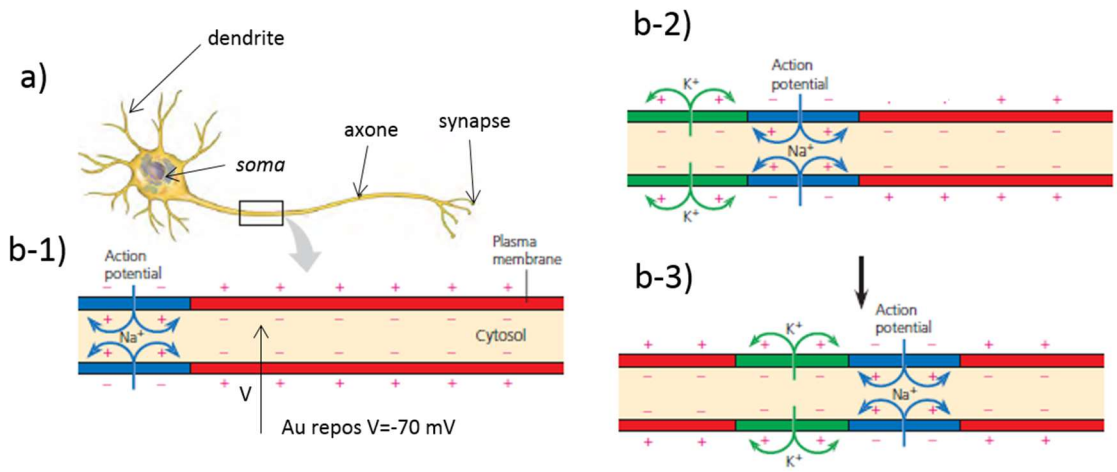


Figure 6 : a) schéma montrant l'organisation d'un neurone, adapté d'après [24]. b) schéma montrant le mécanisme à l'origine de la propagation d'un potentiel d'action dans un neurone, adapté d'après [24]. b-1) ouverture rapide des canaux sodiques conduisant à l'augmentation du potentiel de membrane jusqu'à V = + 30 mV (dépolarisation). b-2) ouverture plus lente des canaux potassiques conduisant à un retour du potentiel de membrane vers sa valeur de repos de – 70 mV (repolarisation). b-3) propagation du potentiel d'action.

Comme nous allons le voir, il existe au repos une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur d'un neurone, appelée potentiel de membrane. Les potentiels d'action correspondent à une modification soudaine de ce potentiel de membrane suite à l'ouverture de canaux sodiques, suivie d'un retour à l'équilibre après ouverture de canaux potassiques. A l'inverse des *stimuli* électriques captés par le *soma* et les dendrites, les potentiels d'actions ont une signature électrique bien caractéristique (amplitude d'environ 100 mV, durée d'environ 2 ms). Au sein des neurones, ils sont observés uniquement dans l'axone, et permettent de transmettre les informations nerveuses d'un point à un autre de l'organisme. On les observe aussi dans les autres cellules excitables, telles que les cellules musculaires ou certaines cellules endocrines. Ils y jouent un rôle dans le déclenchement au sein de la cellule d'une réponse commandée par le système nerveux, par exemple la contraction pour une cellule musculaire ou la sécrétion d'insuline pour une cellule bêta pancréatique.

1.4.1. Potentiel de membrane au repos

Comme dans la plupart des cellules, la composition ionique intracellulaire des neurones est différente de celle du milieu extracellulaire. En particulier, le milieu extérieur est riche en ions sodium et le milieu intérieur est riche en ions potassium (Tableau 1). Cette différence de concentration est maintenue par des pompes sodium-potassium dans la membrane plasmique du neurone qui font sortir de manière active les ions sodium et entrer les ions potassium. Par ailleurs, dans l'état de repos, des canaux potassiques sont ouverts (un ordre de grandeur typique est 0,5 canal ouvert par micromètre carré [25]). Des ions potassium diffusent donc vers l'extérieur de l'axone en suivant leur gradient de concentration, ce qui résulte en un excès de charge positive à l'extérieur de l'axone et un excès de charge négative à l'intérieur de celui-ci (domaine en rouge sur la Figure 6 b-1). Ces charges se répartissent au niveau de la membrane, ce qui se traduit par une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de l'axone. La différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule est appelée le potentiel de membrane de la cellule. Par convention, celui-ci est défini comme le potentiel à l'intérieur de la cellule moins le potentiel à l'extérieur. Dans l'état de repos, le potentiel de membrane typique d'un neurone de mammifère est d'environ - 70 mV.

Ion	Concentration intracellulaire	Concentration extracellulaire
Sodium Na^+	15 mM	150 mM
Potassium K^+	140 mM	5 mM

Tableau 1 : concentrations ioniques en potassium et en sodium typique d'un neurone de mammifère, d'après [24].

1.4.2. Potentiel d'action

Le corps du neurone reçoit en permanence des *stimuli* électriques provenant des autres neurones. Ces différents *stimuli* correspondent à des variations locales du potentiel de membrane. Si le potentiel de membrane est localement supérieur à la valeur de repos de - 70 mV, ont dit que la membrane est dépolarisée. Si au contraire il est inférieur au potentiel de repos, on dit que la membrane est hyperpolarisée. Les différents *stimuli* s'additionnent, de sorte que la membrane à l'entrée de l'axone peut être dépolarisée au-delà d'une valeur seuil d'environ - 55 mV. Une telle valeur de potentiel de membrane déclenche l'ouverture relativement rapide et brève de canaux sodiques voltage-dépendants, et l'activation plus lente de canaux potassiques voltage-dépendants. Lorsque les canaux sodiques s'ouvrent (en bleu sur la Figure 6 b-1), des ions sodium diffusent vers l'intérieur de l'axone, ce qui a pour effet d'amplifier la dépolarisation de la membrane. Le potentiel de membrane augmente alors jusqu'à + 30 à + 40 mV. A ce stade, les canaux sodiques se referment, et l'ouverture plus lente des canaux potassiques devient effective, ce qui tend à ramener le potentiel de membrane vers sa valeur d'équilibre de - 70 mV par diffusion des ions potassium vers l'extérieur (Figure 6 b-2). L'augmentation du potentiel de membrane lors de l'ouverture des canaux sodiques tend à dépolariser la membrane qui se trouve un peu plus loin sur l'axone, si bien que le phénomène se propage le long de l'axone (Figure 6 b-3). Suite à leur ouverture, les canaux sodiques passent dans un état inactivé, c'est-à-dire qu'ils se referment jusqu'à ce que le potentiel de membrane retrouve sa valeur de repos. Cette propriété empêche le potentiel d'action de se propager vers le corps du neurone.

1.4.3. Caractérisation électrique des potentiels d'action et ordres de grandeur

Ce sont sur les axones géants de calamar qu'a été mesurée pour la première fois avec précision la valeur du potentiel de membrane et sa variation lors du passage d'un potentiel d'action [26]. Le gros diamètre de ces axones (jusqu'à 1 mm) permet en effet de placer une électrode à l'intérieur de l'axone et une autre à l'extérieur sur la membrane, ce qui donne accès à la valeur exacte du potentiel de membrane. La Figure 7 a) montre un enregistrement typique du potentiel de membrane en fonction du temps lors du passage d'un potentiel d'action. Un modèle électrique de l'axone permet d'estimer la quantité de charges déplacées lors du potentiel d'action : en assimilant la membrane de l'axone à un condensateur de capacité surfacique 1 µF/cm² [25], une variation de potentiel membranaire de 100 mV correspond à une variation de charge de 10^{-15} C par micromètre carré de membrane, d'après la relation suivante, où Q est la densité de charge surfacique en C/cm², C est la capacité surfacique en F/cm² et U le potentiel de membrane en V :

$$(1) \qquad Q = CU$$

Cette quantité de charge correspond à environ 6 000 ions déplacés par micromètre carré de membrane. La quantité d'ions déplacés lors d'un potentiel d'action est en général négligeable devant la quantité d'ions présents dans l'axone : pour un axone de 1 mm de diamètre, le passage d'un potentiel d'action modifie la concentration des ions d'un rapport de 1 pour 10^5, alors que pour un axone de 100 nm de diamètre, ce rapport est de 10 % [25].

1.4.4. Caractérisation électrique du courant ionique transmembranaire à potentiel fixé, mise en évidence du mode d'activation des canaux voltage-dépendant

Les mesures du potentiel de membrane en fonction du temps ont vite été remplacées par des mesures de courant en fonction du temps à potentiel de membrane fixé, qui se sont révélées très informatives pour comprendre les mécanismes à l'origine des potentiels d'action [27–29]. Dans ces mesures, un montage électronique spécifique permet à l'expérimentateur de fixer le potentiel de membrane (V) et d'enregistrer le courant ionique transmembranaire (I) en fonction du temps. De telles mesures ont pu être réalisées sur des axones géants de calamar au moyen d'un dispositif permettant d'encapsuler l'axone et de mesurer le courant traversant la membrane d'une portion de celui-ci (Figure 7 b) [27]. La Figure 7 c) montre le courant enregistré lorsque la membrane de l'axone est maintenue à son potentiel de repos puis (à t = 0) hyperpolarisée de 65 mV (courbe A) ou dépolarisée de 65 mV (courbe B). Dans le cas de l'hyperpolarisation, le courant est le courant ionique passant dans les canaux potassiques ouverts dans l'état de repos (environ 0,5 canal par micromètre carré de membrane, d'après [25]). Dans le cas de la dépolarisation, un courant plus important est mesuré, qui correspond à l'ouverture des canaux sodiques (courant positif) puis potassiques (courant négatif).

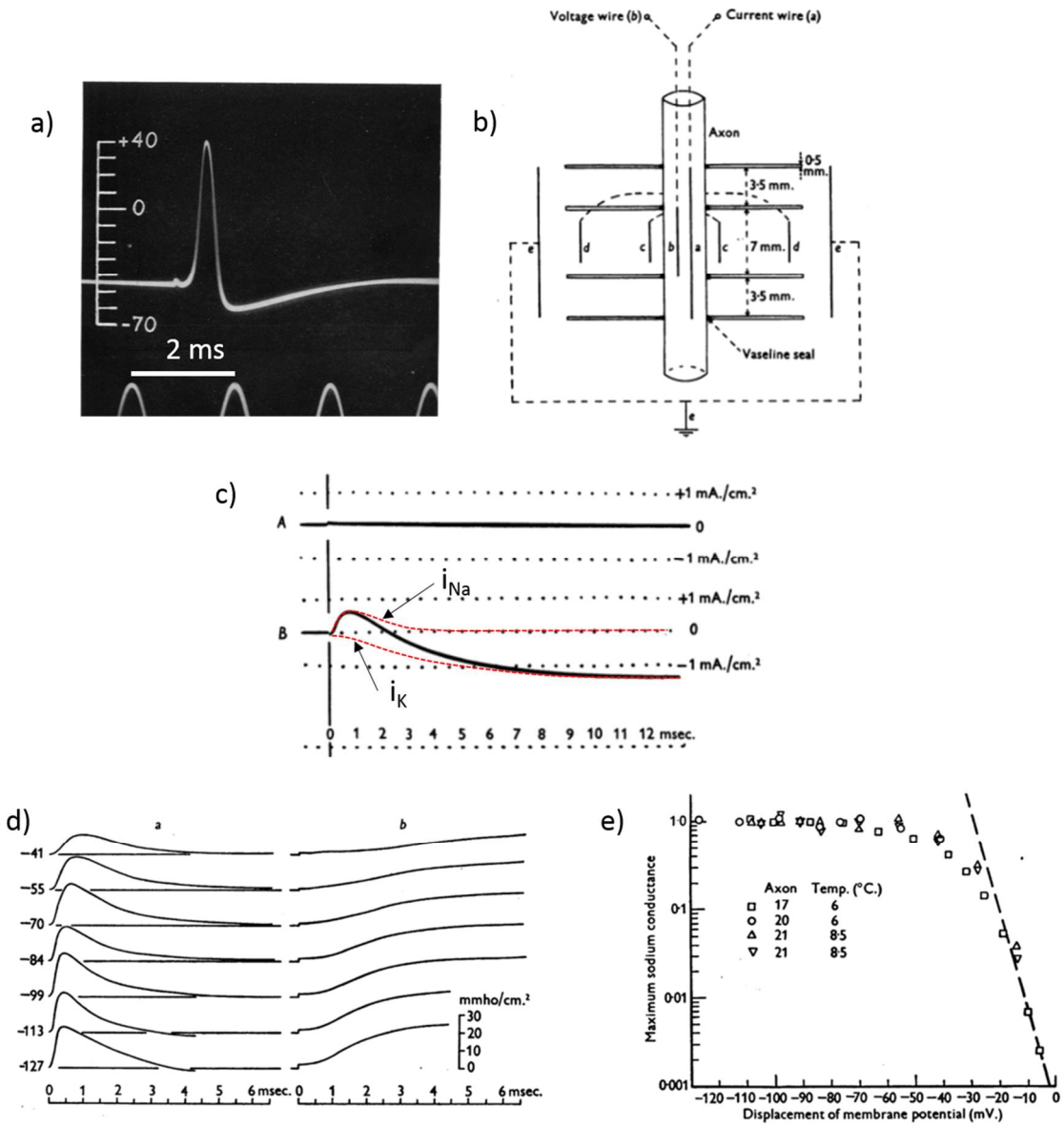


Figure 7 : a) enregistrement du potentiel de membrane en fonction du temps lors du passage d'un potentiel d'action, enregistrement effectué sur la membrane d'un axone géant de calamar entre une électrode intracellulaire et une électrode extracellulaire, adapté d'après [26]. b) schéma du dispositif utilisé par Hodgkin et al. pour les mesures de conductance membranaire à potentiel de membrane fixé, tiré de [27]. c) enregistrement du courant ionique transmembranaire en fonction du temps pour une hyperpolarisation de 65 mV (A) ou une dépolarisation de 65 mV (B), d'après [27]. Pour t<0, la membrane est à son potentiel de repos. Les courbes en pointillées sont des schémas montrant l'allure du courant sodique et potassique obtenus après un traitement de données d'expériences réalisées pour plusieurs valeurs de la concentration extracellulaire en sodium. d) enregistrements des conductances sodique (a) et potassique (b) en fonction du temps après une dépolarisation (t = 0) dont la valeur est indiquée en début de chaque courbe, tiré de [28]. NB : d'après la convention adoptée par les auteurs, une valeur de potentiel négative correspond à une dépolarisation. e) relation entre la conductance sodique maximale, obtenue sur les courbes (a) de la figure d), et la dépolarisation appliquée. NB : d'après la convention adoptée par les auteurs, une valeur de potentiel négative correspond à une dépolarisation.

En faisant varier la concentration en sodium du milieu extracellulaire, Hodgkin et Huxley ont pu dissocier le courant ionique transmembranaire associé au potassium i_K du courant associé au sodium i_{Na} [28]. Ces deux courants sont indiqués par les courbes en pointillés sur la courbe B (Figure 7 c). La valeur de ces courants en fonction du temps, et le fait que le potentiel de membrane soit fixé par

l'expérimentateur et constant, a permis d'extraire la conductance membranaire sodique et potassique en fonction du temps, qui est proportionnelle au nombre de canaux sodiques et potassiques ouverts : pour un ion donné (sodium ou potassium), nous avons la relation suivante, où i_{ion} est la densité de courant ionique associée à un ion (ici potassium ou sodium), n_{ion} est le nombre par unité de surface de canaux ioniques ouverts sélectifs à cet ion, g_{ion} est la conductance associée à un canal unique ouvert (constante), et E_{ion} le potentiel d'équilibre de l'ion (définit plus bas) :

$$(1) \qquad i_{ion} = n_{ion}\, g_{ion}(V - E_{ion})$$

Le potentiel d'équilibre étant donné par la relation de Nernst, où E_{ion} est le potentiel d'équilibre de l'ion considéré, R est la constante des gaz parfaits, T est la température, z est la charge de l'ion, F est la constante de Faraday, C_e la concentration extracellulaire de l'ion et C_i sa concentration intracellulaire :

$$(2) \qquad E_{ion} = \frac{RT}{zF} ln\left(\frac{C_e}{C_i}\right)$$

Sachant que les conductances associées à un canal ionique unique g_K et g_{Na} sont constantes (on prendra pour la discussion la valeur typique de 20 pS, d'après [25]), que le potentiel de membrane V est fixé dans l'expérience, et que le potentiel d'équilibre de chaque ion est constant car les concentrations ioniques sont considérées comme constantes d'après ce qui a été dit plus haut, la variation de la conductance potassique et sodique en fonction du temps est donc associée à la variation du nombre de canaux potassiques $n_K(t)$ et sodiques $n_{Na}(t)$ ouverts :

$$(1) \qquad i_{ion}(t) = n_{ion}(t)\, g_{ion}(V - E_{ion})$$

La Figure 7 d) montre les conductances sodiques et potassiques en fonction du temps pour plusieurs valeurs de dépolarisation différentes, indiquées au début de chaque courbe (le signe « moins » correspond à une dépolarisation, d'après la convention utilisée par les auteurs). En utilisant la valeur typique de 20 pS/canal [25], une conductance membranaire de 20 mS/cm² (NB : l'unité utilisée sur la figure, le mho, est une ancienne appellation du Siemens) correspond à 10 canaux ouverts par micromètre carré de membrane. On constate donc que le nombre maximal de canaux ouverts est de 5 à 10 canaux par micromètre carré de membrane en fonction de la dépolarisation appliquée, ce qui correspond à 10 à 20 fois le nombre de canaux potassiques ouverts par micromètre carré de membrane dans l'état de repos. La conductance membranaire maximale potassique et sodique peut être tracée en fonction de la dépolarisation. On obtient ainsi une caractéristique « I(V) » du canal ionique qui fait apparaître l'effet d'activation des canaux ioniques par la valeur du potentiel de membrane (Figure 7 e).

1.4.5. Conclusion

En conclusion, les études menées sur les neurones d'animaux disséqués ont permis d'étudier les canaux ioniques voltage-dépendant se trouvant dans leur membrane plasmique. Au moyen d'une électrode intracellulaire, la conductance de la membrane a pu être mesurée dans des conditions où le potentiel de membrane est imposé par l'expérimentateur. Ces mesures ont permis de mettre en évidence le mécanisme d'activation des canaux voltage-dépendant par le potentiel de membrane. La portée de ces travaux a valu le prix Nobel de physiologie de 1963 à leurs auteurs, Hodgkin et Huxley.

L'utilisation de microélectrodes très fines (diamètre inférieur ou égal à 100 nm) a par la suite permis de mener des études comparables sur d'autres cellules excitables animales : ces microélectrodes sont plongées à l'intérieur de la cellule afin de fixer le potentiel de membrane [30,31]. Cependant, cette technique est relativement invasive pour la cellule : l'électrode intracellulaire, malgré son petit diamètre, créée des fuites qui limitent la durée des expériences et rendent les mesures sur les petites cellules impossibles. Ces limitations seront résolues par la méthode de « patch-clamp », que nous allons décrire à présent.

1.5. Méthode de « patch-clamp »

La méthode de « patch-clamp » a été mise au point à la fin des années 1970 [32–34]. Celle-ci a marqué un tournant dans l'étude des canaux ioniques : d'une part car elle a permis de mener des enregistrements de courant à potentiel de membrane fixé sur un nombre extrêmement large de cellules, y compris des petites cellules eucaryotes telles que les globules rouges (largeur 8 µm), ce qui a ouvert la voie à l'étude de canaux ioniques d'origines très diverses. D'autre part elle a permis de diminuer le niveau de bruit des enregistrements électriques jusqu'à pouvoir résoudre le courant passant dans un canal unique. Les études menées avec cette résolution ont permis de montrer qu'au niveau individuel, les canaux ioniques ont une dynamique d'ouverture et de fermeture aléatoire. Cette dynamique peut être décrite par un formalisme mathématique basé sur les probabilités que le canal se trouve dans un état donné, la valeur de ces probabilités pouvant être modifiée par le stimulus extérieur responsable de l'activation ou de l'inactivation du canal. Il a ainsi été montré que le caractère déterministe du courant ionique transmembranaire à l'échelle d'une cellule résulte de l'addition des contributions probabilistes de chaque canal.

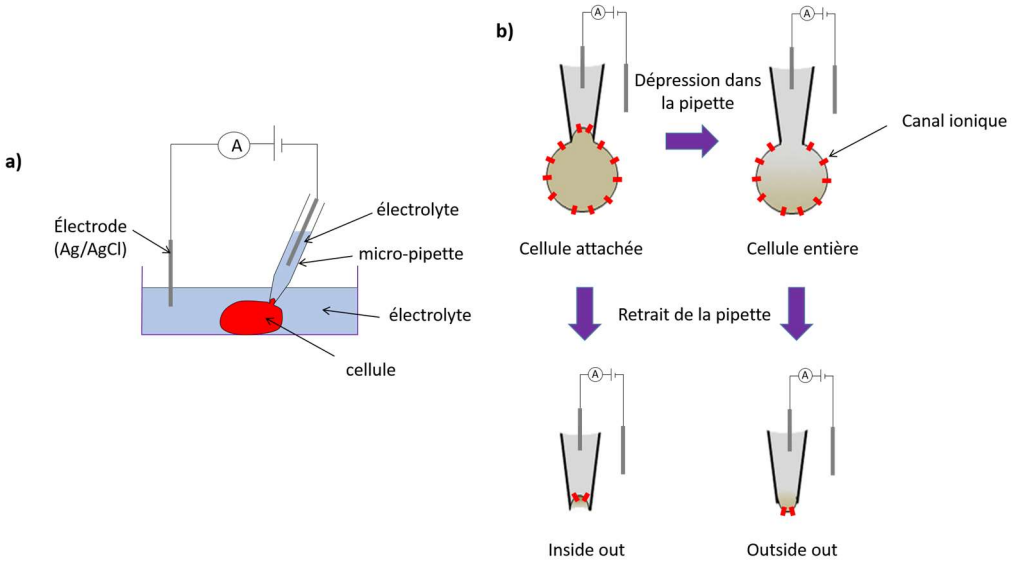


Figure 8 : a) schéma montrant le montage d'une expérience de « patch-clamp », en configuration cellule-attachée. b) schéma montrant les quatre configurations des expériences de « patch-clamp ».

Le principe de la méthode est schématisé sur la Figure 8 a) et b). Une cellule est immergée dans un bain de solution électrolytique (par exemple une solution aqueuse saline de composition ionique proche du milieu extracellulaire de la cellule étudiée) contenant une électrode d'Ag/AgCl. Une micropipette de verre (de diamètre intérieur au niveau de la pointe de 500 nm à quelques micromètres

[34,35]) est appliquée sur la membrane de la cellule. Cette micropipette contient une solution électrolytique ainsi qu'une deuxième électrode d'Ag/AgCl. Lorsqu'une légère dépression est appliquée dans la pipette, la membrane de la cellule se déforme et adhère à la surface intérieure de la pipette. Si cette surface est très propre (i. e. pas de débris ni de poussières), l'interaction entre la membrane cellulaire et la surface de la pipette est telle que la résistance mesurée entre les deux électrodes prend une valeur typique de 10 à 100 GΩ. On appelle le scellement ainsi obtenu le « Gigaohm seal », ou « Gigaseal », que l'on traduit par **scellement gigaohm**.

Comme nous le verrons dans paragraphe 2.3.2 et 2.3.3, ce scellement gigaohm est un élément important pour obtenir un faible niveau de bruit dans les enregistrements. Par ailleurs, lorsque le scellement gigaohm est obtenu, l'interaction entre la membrane cellulaire et la surface intérieure de la pipette est telle que plusieurs configurations peuvent être obtenues sans altérer la qualité du scellement. La configuration initiale est appelée « cell-attached » ou **« cellule attachée »**. A partir de cette configuration, il est possible de retirer la pipette, ce qui a pour effet d'arracher à la cellule le bout de membrane qui scelle la pipette. On obtient de cette manière la configuration **« inside out »**, dans laquelle le côté intracellulaire de ce morceau de membrane est directement en contact avec la solution du bain. A partir de la configuration cellule attachée, il est aussi possible de déchirer le morceau de membrane se trouvant dans la pipette en appliquant une dépression dans celle-ci. On obtient de cette manière la configuration « whole cell », ou **« cellule entière »**. NB : dans la configuration « cellule entière », le contenu de la pipette se mélange au cytosol par diffusion. Pour ne pas introduire d'artefact, on remplit alors la pipette avec une solution de composition ionique proche du milieu intracellulaire de la cellule à étudier [35,36]. Enfin, à partir de la configuration « cellule entière », il est possible d'arracher un bout de membrane à la cellule en retirant la pipette. Ce morceau de membrane se réarrange et scelle la pipette. On obtient alors la configuration « **outside out** », dans laquelle c'est le côté extracellulaire de la membrane qui est en contact avec la solution du bain.

Lorsque la configuration voulue est obtenue, les enregistrements électriques sont effectués en fixant la différence de potentiel entre les deux électrodes et en mesurant le courant circulant entre elles, d'une manière analogue aux mesures présentées dans le paragraphe 1.4. Pour l'étude des canaux voltage-dépendant, on applique des sauts de tension afin de dépolariser, repolariser ou hyperpolariser la membrane. Des séquences contenant plusieurs sauts peuvent être utilisées en fonction des mécanismes que l'on souhaite étudier [37]. Enfin, grâce à la méthode de « patch-clamp », il est possible de quantifier l'activité d'une molécule sur un canal ionique en insérant celle-ci dans la solution de la pipette. Cependant, alors que le milieu du bain peut être changé plusieurs fois au cours de l'expérience, le contenu de la pipette est fixé au début de l'expérience [35], à moins d'utiliser un dispositif particulier [38]. Cette limitation rend les différentes configurations plus ou moins adaptées selon que l'on souhaite étudier l'action des molécules sur le domaine extracellulaire ou intracellulaire des canaux ioniques. Par exemple, on pourra utiliser la configuration « cellule entière » pour tester l'action de plusieurs molécules successivement sur le domaine extracellulaire des canaux ioniques, alors qu'on pourra avec cette configuration tester l'influence d'une seule molécule par expérience sur le côté intracellulaire des canaux ioniques, en l'ajoutant à la solution de la pipette au début de l'expérience.

1.5.1. Enregistrements à l'échelle du canal unique

Les configurations « cellule attachée », « inside out » et « outside out » permettent de mener des **enregistrements à l'échelle du canal unique** (« single channel recordings ») : la pipette ayant un petit diamètre (de 500 nm à quelques micromètres) le morceau de membrane qui la scelle contient un seul ou un petit nombre de canaux ioniques[1]. Le courant mesuré est alors déterminé par la dynamique d'ouverture et de fermeture de ce(s) canal(aux), ce qui permet de rendre visible les différents niveaux de conductance du canal et le passage de l'un à l'autre. Un exemple d'enregistrement à l'échelle du canal unique est montré dans la Figure 9.

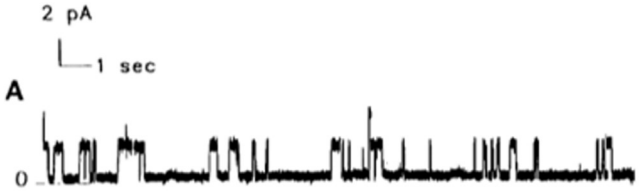


Figure 9 : enregistrement i(t) à l'échelle du canal unique (configuration inside out) réalisés sur un cardiomyocyte de lapin, pour un potentiel de membrane appliqué de + 40 mV. Le canal est le K_{ATP} natif du cardiomyocyte, tiré de [39]. Bande passante : 1 kHz.

Ce type d'enregistrement est utilisé lorsque l'on souhaite étudier le mode d'activation d'un canal à l'échelle moléculaire : la manière dont un *stimulus* physique modifie la statistique de distribution entre les états d'ouverture permet de comprendre comment ce *stimulus* agit sur le canal au niveau moléculaire. Ce type d'étude est notamment utilisé en pharmacologie lorsque l'on s'intéresse au mode d'action d'une molécule sur un canal ionique [37,39].

Comme nous le verrons dans le paragraphe 2.3.2, les enregistrements du courant en fonction du temps i(t) sont réalisés à une certaine bande passante B, fenêtre fréquentielle délimitée par un filtre passe-bas placé dans la chaîne d'acquisition. La définition de la bande passante par rapport à la fréquence de coupure du filtre dépend des caractéristiques du filtre utilisé et de la convention choisie. Nous prendrons dans cette thèse B = f_c, où f_c est la fréquence de coupure du filtre, définie comme la fréquence à laquelle l'atténuation est de - 3 dB. Le fait de réduire la bande passante a pour effet de diminuer le niveau de bruit. Cependant, pour une fréquence de coupure du filtre donnée, un temps de montée t_r (risetime) peut être définit, qui correspond, lorsque l'on applique une marche carrée à l'entrée du filtre, à l'intervalle de temps que met le signal en sortie du filtre pour passer de 10 % à 90 % de la nouvelle valeur. La valeur de ce temps de montée varie en fonction des caractéristiques du filtre. Dans cette discussion, nous prendrons $t_r = 0{,}33/f_c$ [40]. Ainsi, lorsque l'on filtre à une bande passante B = f_c, les fluctuations plus rapides que $2t_r$ seront déformées : elles apparaîtront après filtrage d'amplitude moindre et d'une largeur de l'ordre de $2t_r$ (Figure 10 a).

[1] Le nombre de canaux par micromètre carré de membrane, ainsi que la nature des canaux, dépend du type de cellule et de la zone de membrane étudiée. Comme nous le verrons par la suite, les cellules peuvent être modifiées génétiquement pour qu'elles surexpriment un canal à étudier. Les protocoles expérimentaux permettent alors d'ajuster ce nombre.

La Figure 10 b) montre l'effet du filtrage sur un enregistrement à l'échelle du canal unique : lorsque l'on réduit la bande passante, le niveau de bruit diminue, cependant, les fluctuations les plus rapides sont atténuées et disparaissent. La possibilité de détecter un créneau associé au passage par un autre niveau de conduction dépendra donc d'une part de son amplitude par rapport à l'amplitude du bruit, et d'autre part de sa durée. Le niveau de bruit obtenu pour une bande passante donnée B est généralement donné par sa valeur RMS, que l'on notera σ. La valeur crête-à-crête du bruit est de l'ordre de 6 σ (Figure 10 c). Cette valeur correspond à la largeur de la distribution gaussienne associée à un niveau de conductance, lorsque l'on représente l'enregistrement sous la forme d'histogramme (Figure 10 d) : en notant I_0 l'intensité moyenne du niveau de conduction considéré, 99,6 % des valeurs d'intensité seront dans l'intervalle [I_0 – 3 σ ; I_0 + 3 σ]. Pour pouvoir détecter un créneau ou un pic associé au passage par un autre niveau de conduction, il faudra que son amplitude après filtrage soit plus grande qu'une valeur appelée **seuil de détection**, que nous prendrons, dans cette thèse, égale à 5 σ. Si la durée du créneau avant filtrage est supérieure à $2t_r$, son amplitude ne sera pas réduite par le filtrage. Si cette amplitude est supérieure à 5 σ, le créneau sera détecté. Si le créneau est de largeur inférieur à $2t_r$, son amplitude sera réduite par le filtrage, il sera détecté uniquement si la valeur après filtrage dépasse 5 σ.

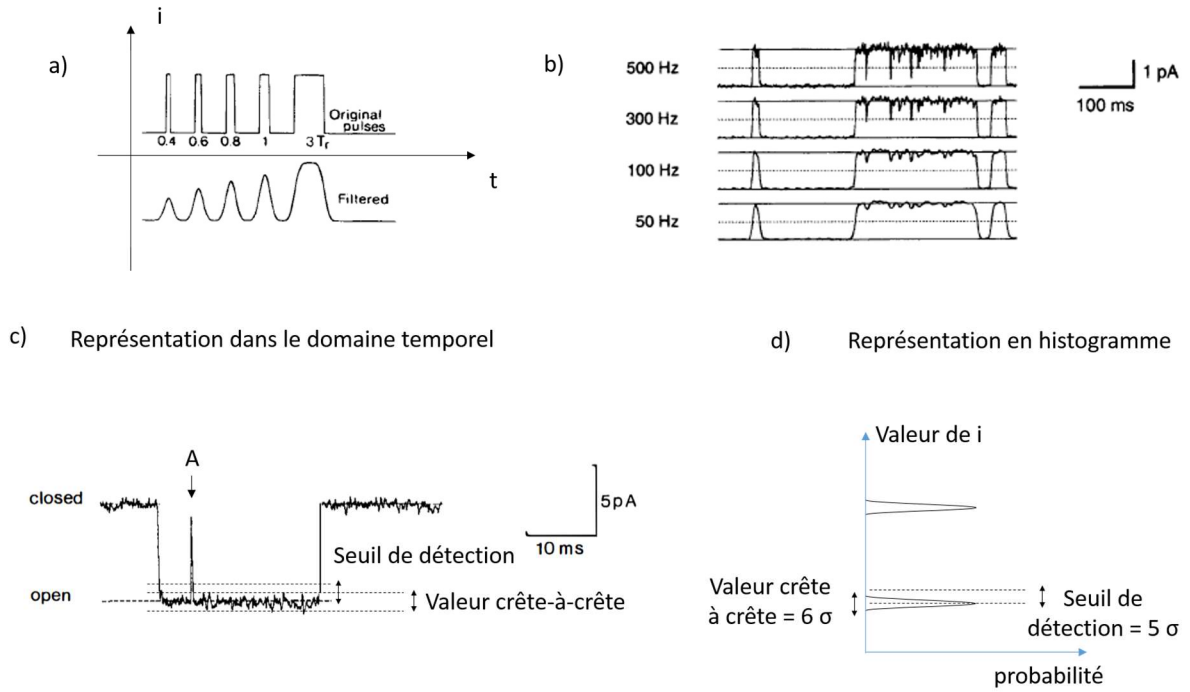


Figure 10 : a) schéma d'un enregistrement i(t) fictif présentant des créneaux de différente largeur, et illustration de la déformation de ces créneaux par le filtre passe-bas, lorsque la largeur des créneaux est comprises entre 0,4 et 3 fois le temps de monté du filtre, tiré de [40]. b) enregistrements électriques i(t) à l'échelle du canal unique, filtrés avec différentes fréquences de coupure, indiquées à gauche des enregistrements, tiré de [41]. c) enregistrement électrique i(t) à l'échelle du canal unique, et illustration des notions de valeur crête-à-crête du bruit, ainsi que du seuil de détection, adapté d'après [35]. d) représentation en histogramme correspondante.

Pour les enregistrements à l'échelle du canal unique, la méthode de « patch-clamp » permet généralement d'avoir un seuil de détection de 0,3 pA pour une bande passante de 1 kHz, ou de 0,9 pA pour une bande passante de 5 kHz [34]. Lorsque des précautions particulières sont prises, le niveau de bruit peut être encore diminué [42–44]. Ainsi, Parzefall et al. [43] ont un montage expérimental qui

leur permet d'avoir un seuil de détection de 60 fA pour une bande passante de 1 kHz, de 0,3 pA pour une bande passante de 5 kHz, de 2 pA à une bande passante de 10 kHz, ou encore de 15 pA à une bande passante de 100 kHz.

1.5.2. Enregistrements en configuration cellule entière

Dans la configuration « cellule entière », le courant enregistré est celui qui passe par l'ensemble des canaux ioniques de la cellule. Le nombre de canaux est typiquement de quelques centaines à quelques milliers, et les courants mesurés de 100 pA à quelques nA. Ces enregistrements sont appelés « whole-cell recordings », ou **enregistrements en configuration cellule entière**. Ils ne font pas apparaître l'ouverture ou la fermeture d'un canal individuel, mais donnent une moyenne de l'activité des canaux de la cellule, ce qui permet d'évaluer si un paramètre ou une molécule a un effet activateur ou inhibiteur sur le canal ionique étudié, sans passer par une analyse statistique des niveaux d'ouverture, analyse nécessaire pour le cas des enregistrements à l'échelle du canal unique.

Les enregistrements en configuration cellule entière pourront être menés sur une cellule non modifiée génétiquement si celle-ci exprime majoritairement un seul type de canaux ioniques sur sa membrane plasmique. En effet, dans le cas contraire, le courant enregistré provient de canaux ioniques de différents types, et un traitement des données est nécessaire pour décolérer le courant associé aux différents types de canaux ioniques, d'une manière similaire à celle que nous avons décrite dans le paragraphe 1.4, Figure 7 c). La possibilité de transfecter des cellules en culture avec de l'ADN ou de l'ARN codant pour un canal ionique déterminé permet d'obtenir des cellules possédant majoritairement dans leur membrane plasmique une population de canaux identique [45,46]. On choisit pour cela des cellules n'exprimant pas ou peu de canaux ioniques dans l'état natif [47,48]. Comme nous le verrons dans le paraphe suivant, ce moyen d'expression des canaux ioniques a marqué un nouveau paradigme dans les études pharmacologiques des canaux ioniques, permettant d'étudier à grande échelle l'action de potentielles molécules pharmaceutiques sur des canaux ioniques humains exprimés dans des cellules en culture.

La Figure 11 a) montre un exemple d'enregistrement en configuration cellule entière réalisé sur un fibroblaste (L929) transfecté pour qu'il exprime majoritairement dans sa membrane plasmique le canal récepteur au neurotransmetteur GABA (acide gamma-aminoburytique) α_1 β_1 γ_{2S} $GABA_A$. Les différentes courbes correspondent à l'application de différentes concentrations en GABA dans le milieu extracellulaire, pendant un intervalle de temps indiqué au-dessus de chaque courbe par un trait. Ce type d'expérience permet en traçant le courant maximal obtenu en fonction de la concentration en GABA, d'obtenir une courbe « dose-réponse » (Figure 11 b), qui montre l'effet activateur du GABA sur le récepteur, et permet, en utilisant un modèle empirique développé par Hill [49], d'extraire la concentration efficace médiane CE_{50}, valeur de la concentration à partir de laquelle la moitié de l'effet activateur est observé. Ce type de courbes est très utilisé dans les études de criblage pharmacologique sur les canaux ioniques.

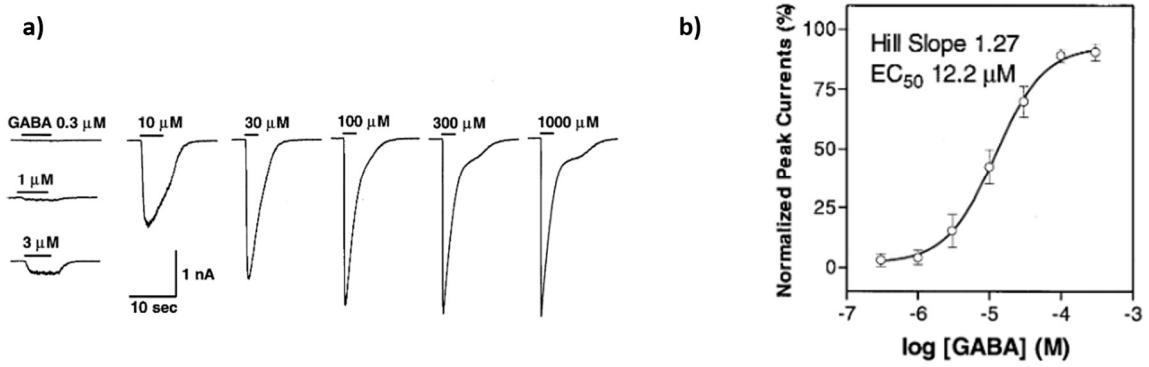


Figure 11 : a) enregistrements i(t) en configuration cellule entière menés sur des cellules L929 transfectées avec l'ADN complémentaire du récepteur $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}GABA_A$, pour un potentiel de membrane appliqué de – 75 mV et pour plusieurs valeurs de concentration de GABA (acide γ-aminobutyrique), tiré de [50]. L'application de GABA est faite sur un intervalle de temps indiqué au-dessus de chaque courbe. Bande passante : 2 kHz. b) Relation concentration-réponse correspondante, obtenue en traçant le courant maximal en fonction de la concentration en GABA. La courbe est modélisée avec le modèle empirique de Hill.

Conclusion

Pour conclure, la méthode de « patch-clamp » permet de caractériser la fonctionnalité des canaux ionique par une mesure du courant qui les traverse à un potentiel de membrane fixé par l'expérimentateur. Ces mesures peuvent être effectuées sur un grand nombre de types cellulaires, au sein de tissus ou de cultures, et pour des cellules aussi petites que des globules rouges. L'influence d'un paramètre physique ou d'une molécule sur l'activité d'un canal ionique peut ainsi être quantifiée, soit à l'échelle du canal unique, qui donne accès au mode d'action au niveau moléculaire, soit à l'échelle d'une population de canaux identiques, ce qui permet d'obtenir directement une moyenne portant sur l'ensemble des canaux. La possibilité de transfecter une cellule en culture avec l'ADN de la protéine que l'on souhaite exprimer permet que cette cellule exprime au sein de sa membrane plasmique majoritairement le canal que l'on souhaite étudier, ce qui facilite la caractérisation. Ainsi, notre connaissance actuelle des canaux ioniques est en grande partie issue d'expériences de « patch-clamp » menées sur différentes cellules.

La méthode a cependant des limites : **i)** elle est très laborieuse et nécessite une grande technicité. **ii)** elle ne permet pas d'étudier les canaux ioniques des organites s'ils ont une taille inférieure à quelques micromètres, taille nécessaire pour que le scellement gigaohm de la pipette puisse être fait. Il est dans ce cas nécessaire de faire grossir artificiellement l'organite [51]. Certaines bactéries sont aussi trop petites pour les expériences de « patch-clamp », et possèdent une paroi cellulaire empêchant l'accès à la membrane plasmique. Dans ce cas, il est nécessaire de fabriquer des structures telles que les sphéroblastes géants à partir de la bactérie, objets de taille suffisante pour les expériences de « patch-clamp », et sans paroi cellulaire [52]. **iii)** elle manque de flexibilité dans le contrôle des paramètres expérimentaux : composition de la membrane, composition des milieux intracellulaires et extracellulaires.

1.6. Etude pharmacologique à grande échelle des canaux ioniques au sein de cellules vivantes

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.3, les canaux ioniques sont omniprésents dans les cellules des organismes vivants et remplissent de nombreuses fonctions. Le nombre important de canalopathies fait des canaux ioniques des cibles potentielles pour les molécules pharmaceutiques. Or, la méthode de « patch-clamp » permet de quantifier l'activité d'une molécule sur un canal ionique. Dès lors, elle représente un intérêt majeur pour les laboratoires pharmaceutiques, qui mènent couramment des études appelées criblage à haut débit : ces études consistent à tester de manière parallèle ou séquentielle l'action d'un grand nombre de molécules potentiellement actives sur une cible afin de ne retenir que les molécules réellement actives et avec le moins d'effets secondaires possibles [53]. Une autre application du criblage à haut débit sur les canaux ioniques est la toxicité potentielle des molécules pharmaceutiques : différentes molécules pharmaceutiques ont été retirées du marché car elles présentaient une activité inhibitrice du canal potassique cardiaque codé par le gène hERG, entraînant une arythmie cardiaque et la mort du patient [54]. Le contrôle négatif de l'activité d'une nouvelle molécule pharmaceutique sur le canal hERG est maintenant devenu un test routinier dans la mise sur le marché d'une nouvelle molécule pharmaceutique.

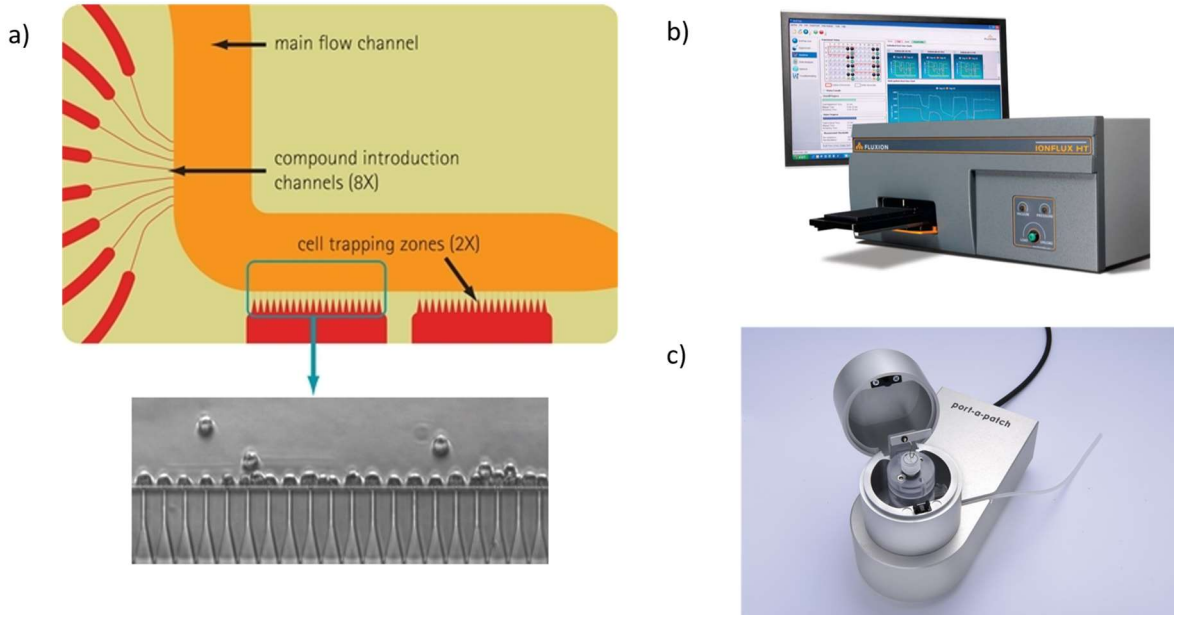


Figure 12 : a) schéma de principe et image en microscopie optique correspondante du système Ionflux développé par Fluxion. b) photographie de l'appareil Ionflux. a) et b) sont tirées de http://fluxionbio.com/ionflux/. c) dispositif Port-a-Patch®, de Nanion, tiré de http://www.nanion.de

Afin de s'adresser à ces marchés, différentes entreprises (e. g. Sophion, Nanion Technologies, Cytocentrics, MDS et Fluxion) ont commercialisé des systèmes permettant de réaliser des mesures de « patch-clamp » de manière automatique et parallèle (Figure 12) [55]. L'automatisation a été permise grâce au fait que la méthode de « patch-clamp » est applicable à de nombreux types cellulaires, y compris des petites cellules sphériques pouvant être cultivées et mises en suspension : les canaux ioniques humains à étudier sont obtenus dans la membrane plasmique de ces cellules par transfection. Après leur mise en culture et l'expression des canaux ioniques, les cellules sont mises en suspension puis introduites dans l'appareil de « patch-clamp » automatique. Un algorithme permet alors de

capturer automatiquement les cellules sur un pore micrométrique et d'obtenir un scellement gigaohm. Diverses molécules sont ensuite introduites dans la chambre où se trouvent les cellules. L'enregistrement, en configuration « cellule entière » révèle alors l'activité inhibitrice ou activatrice des molécules. Les lignées cellulaires utilisées ont généralement peu de canaux ioniques natifs, le signal enregistré provient donc principalement des canaux ioniques recombinants [47,48]. Des mesures à l'échelle du canal unique peuvent aussi être effectuées avec ces appareils, mais pour le criblage à haut débit, on utilise généralement la configuration « cellule entière » qui donne directement une activité moyenne sans avoir à effectuer une analyse statistique des niveaux de conduction des canaux individuels.

Les appareils de « patch-clamp » automatique existent en différents formats et à différents prix, depuis les appareils fonctionnant avec des plaques standards de 96 ou 384 puits, conçus pour réaliser plusieurs milliers de courbes doses-réponse en une journée, jusqu'aux systèmes qui n'opèrent qu'une mesure à la fois, tel que le dispositif Port-a-patch® de Nanion (Figure 12 c). Ce dernier, par une semi-automatisation du mode opératoire, permet de réduire le niveau de savoir-faire requis par rapport à la méthode de « patch-clamp » manuelle et d'atteindre un débit plus élevé (plusieurs dizaines de mesures par jour) que le « patch-clamp » manuel, sans toutefois nécessiter le coût d'investissement élevé d'un appareil à haut débit. Les appareils de « patch-clamp » automatique, relativement récents, sont donc prometteurs pour la recherche pharmaceutique sur les canaux ioniques. Cependant, ils ne sont pas adaptés à l'étude de tous les canaux ioniques : ceux qui ne peuvent pas être exprimés dans des lignées cellulaires compatibles avec ces appareils et les canaux ioniques d'organites ou de bactéries. Par ailleurs, ces dispositifs ne sont pas optimisés pour des enregistrements à très faibles bruits [42–44], qui ne peuvent être obtenu qu'en utilisant la méthode de « patch-clamp » manuelle.

1.7. Bilan, limites de l'étude des canaux ioniques au sein de cellules vivantes

Nous avons vu que les canaux ioniques constituent un enjeu scientifique et médical important, et représentent des cibles thérapeutiques potentielles encore largement sous exploitées aujourd'hui. La méthode de « patch-clamp » permet de caractériser des canaux ioniques natifs ou recombinants présents dans la membrane plasmique des cellules. Cette méthode permet deux types de caractérisation : des enregistrements à l'échelle du canal unique, qui sont utilisés pour comprendre le mode d'activation d'un canal à l'échelle moléculaire, et les enregistrements en configuration cellule entière, qui sont utilisés de manière routinière dans les études pharmacologiques pour savoir si une molécule agit sur canal ionique et pour extraire la courbe dose-réponse correspondante. La méthode de « patch-clamp » manuelle étant très laborieuse à mettre en œuvre, avec un savoir-faire nécessaire important, des appareils de « patch-clamp » automatiques ont été développés. Ceux-ci existent dans des versions « hautement parallélisées » qui sont compatibles avec des plaques 96 ou 384 puits et sont destinées aux études de criblage à haut débit, ou dans des versions à plus petite échelle et à moindre coût qui ne contiennent qu'un seul site de mesure et où l'accent est mis sur l'automatisation de la procédure afin de réduire le niveau de savoir-faire requis.

Il est à prévoir que les appareils de « patch-clamp » automatiques jouent un rôle important dans le futur pour tester l'impact de nouveaux médicaments agissant sur les canaux ioniques. Cependant, les organites ou les bactéries ne peuvent pas être étudiés avec ces appareils, alors qu'ils constituent aussi

un enjeu pharmaceutique important [19]. Il en est de même des canaux ioniques qui ne peuvent pas être exprimés dans une lignée cellulaire compatible avec les appareils de « patch-clamp » automatique. Enfin, la flexibilité dans le contrôle des paramètres expérimentaux est limitée : contrôle de la composition de la membrane ou des milieux extra et intracellulaire. Nous allons à présent décrire des méthodes *in vitro* de mesure électrique de l'activité de canaux ioniques, méthodes qui pallient ces différentes limitations.

2. Mesure électrique *in vitro* de l'activité de canaux ioniques au sein de bicouches biomimétiques

De nombreux mécanismes biologiques peuvent être reproduits *in vitro* afin d'être étudiés dans cet environnement ou encore exploités pour des applications industrielles. Par rapport à l'environnement *in vivo*, l'environnement *in vitro* offre une plus grande flexibilité dans les méthodes de caractérisations, un meilleur contrôle des conditions expérimentales, et donc la possibilité de réduire le nombre de paramètres expérimentaux. Diverses questions relatives aux membranes biologiques peuvent être étudiées au sein de bicouches lipidiques modèles, fabriquées artificiellement à partir de phospholipides purs. Ces bicouches sont appelées bicouches biomimétiques, bicouches artificielles, ou bicouches modèles [56]. Dans cette partie, après une brève description des différents types de bicouches biomimétiques, nous montrerons comment celles-ci peuvent être utilisées pour mener des enregistrements électriques de l'activité de canaux ioniques.

2.1. Présentation des bicouches biomimétiques

Les phospholipides peuvent être extraits de cellules et purifiés [57] ou synthétisés [58]. La Figure 13 montre quelques phospholipides couramment utilisés pour réaliser des bicouches biomimétiques, ainsi que la nomenclature utilisée. Les phospholipides sont caractérisés premièrement par le substituant se trouvant sur la partie hydrophile de la molécule : par exemple, PC (phosphatidylcholine) désigne un phospholipide dont le substituant est la choline. Les autres substituants courants sont l'éthanolamine (PE pour phosphatidyléthanolamine), le glycérol (PG), et la sérine (PS). Les deux chaînes carbonées des phospholipides peuvent aussi varier en nombre de carbones et de doubles liaisons. Le terme « oléoyl » désigne une chaîne carbonée à 18 carbones comprenant une double liaison (que l'on peut désigner aussi avec le code 18:1). Le terme « palmitoyl » désigne une chaîne à 16 carbones ne comprenant pas de double liaison (16:0). POPC désigne une molécule de phosphatidylcholine comprenant une chaîne « palmitoyl » et une chaîne « oléoyl ». DOPC désigne une molécule de phosphatidylcholine comprenant deux chaînes « oléoyl ».

Les phospholipides extraits disponibles commercialement sont souvent des mélanges de phospholipides ayant le même substituant mais des longueurs de chaînes carbonées variables. C'est le cas par exemple de la phosphatidylcholine (PC) extraite du jaune d'œuf de poule (que l'on désignera ici par le terme « egg-PC »). Au contraire, les phospholipides synthétiques ont des chaînes carbonées bien définies, par exemple POPC, DPPC, etc. Les phospholipides peuvent être marqués par fluorescence pour réaliser des études en microscopie de fluorescence. Le NBD ou la rhodamine sont deux exemples de fluorophores utilisés, qui peuvent être greffés à une des deux chaînes carbonées du

phospholipide (par exemple le PC marqué par NBD, voir Figure 13), ou alors au substituant (par exemple le PE marqué par rhodamine, Figure 13).

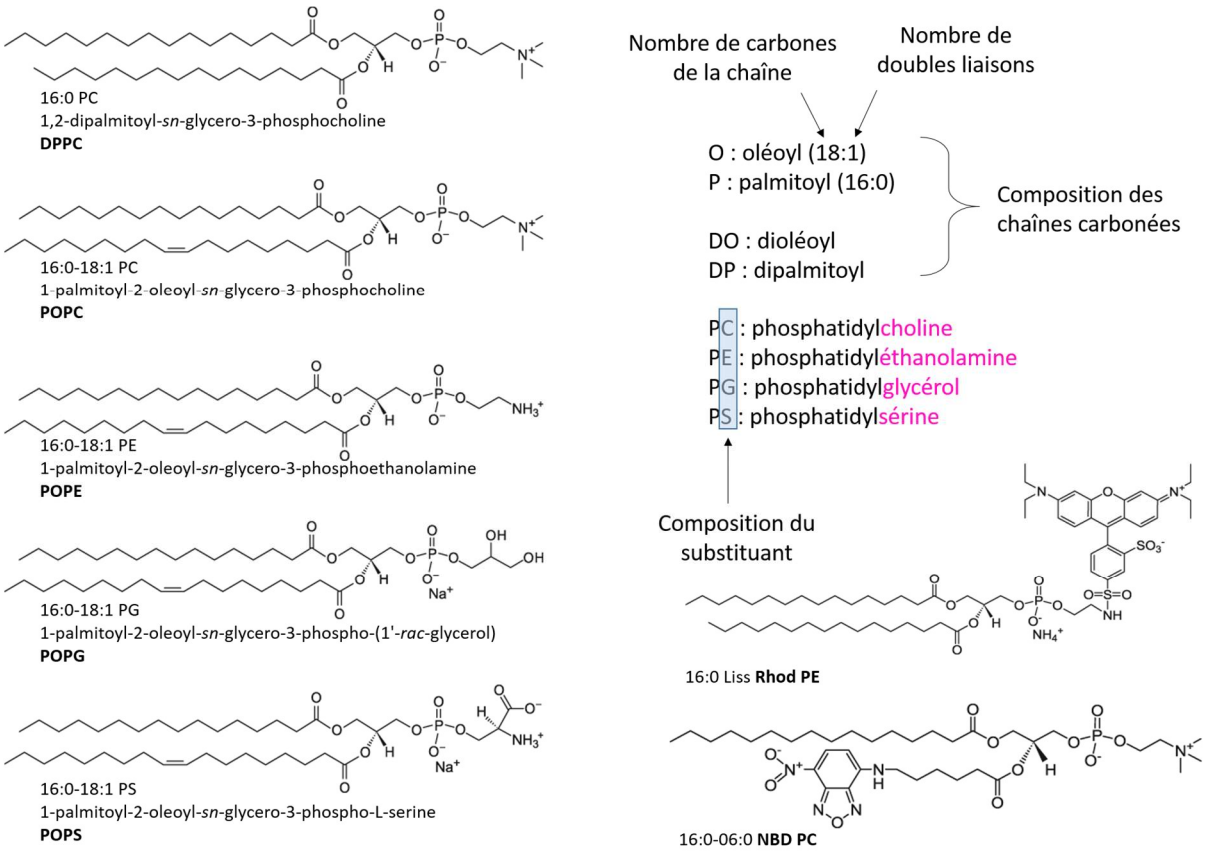


Figure 13 : exemple de quelques phospholipides courants, et schéma expliquant la nomenclature, d'après http://www.avantilipids.com

Du fait de leur nature amphiphile et de la présence de deux chaînes carbonées au sein de la molécule, les phospholipides ont tendance à s'auto-assembler en bicouche lorsqu'ils sont mis en présence d'eau [59]. On peut ainsi former des bicouches biomimétiques à partir de phospholipides purifiés en les mélangeant avec une solution aqueuse, selon divers procédés. Les phospholipides sont solubles dans des solvants organiques tels que le chloroforme ou le décane. Dans ces solvants, contrairement au cas de l'eau, ils se trouvent à l'état de monomère, de sorte que l'on peut réaliser des compositions définies de phospholipides en mélangeant différents phospholipides. C'est cette méthode qui est utilisée pour former une bicouche biomimétique comportant un mélange de phospholipides. En fonction du type de bicouche que l'on souhaite former, le solvant pourra être évaporé dans un premier temps (ce qui aboutit au dépôt des phospholipides, par exemple dans un flacon de verre qui contient la solution avant évaporation du solvant) puis remplacé par la solution aqueuse dans laquelle on souhaite former la bicouche, ou alors, la solution solvant organique –phospholipide pourra être mélangée à un volume de solution aqueuse, le solvant s'évaporant par la suite. Cette dernière approche est utilisée dans la méthode de « painting » et de Montal-Mueller, qui sera décrite plus loin. Les solutions aqueuses souvent utilisées dans les travaux cités dans cette thèse sont des solutions tampon de pH entre 7 et 8,5, dans lesquelles un sel (par exemple KCl ou NaCl) est dissout à une concentration comprise entre 100 mM et 1 M. La présence d'ions est nécessaire pour les mesures électriques sur les canaux ioniques, et l'utilisation de solution tampon permet de contrôler le pH, paramètre important dans les systèmes biochimiques et qui est contrôlé chez les êtres vivants. Le tampon phosphate salin (PBS, pH = 7,4 à

25°C) peut ainsi être utilisé, ou une solution saline comportant du Tris (pK_a = 8,07 à 25 °C) ou de l'HEPES (pK_{a2} = 7,5 à 25°C). NB : dans la suite de cette thèse **nous utiliserons le terme de solution saline** pour désigner ces solutions aqueuses salines de pH contrôlé couramment utilisées pour la formation de bicouches biomimétiques.

La Figure 14 montre les différents types de bicouches biomimétiques que l'on peut former :

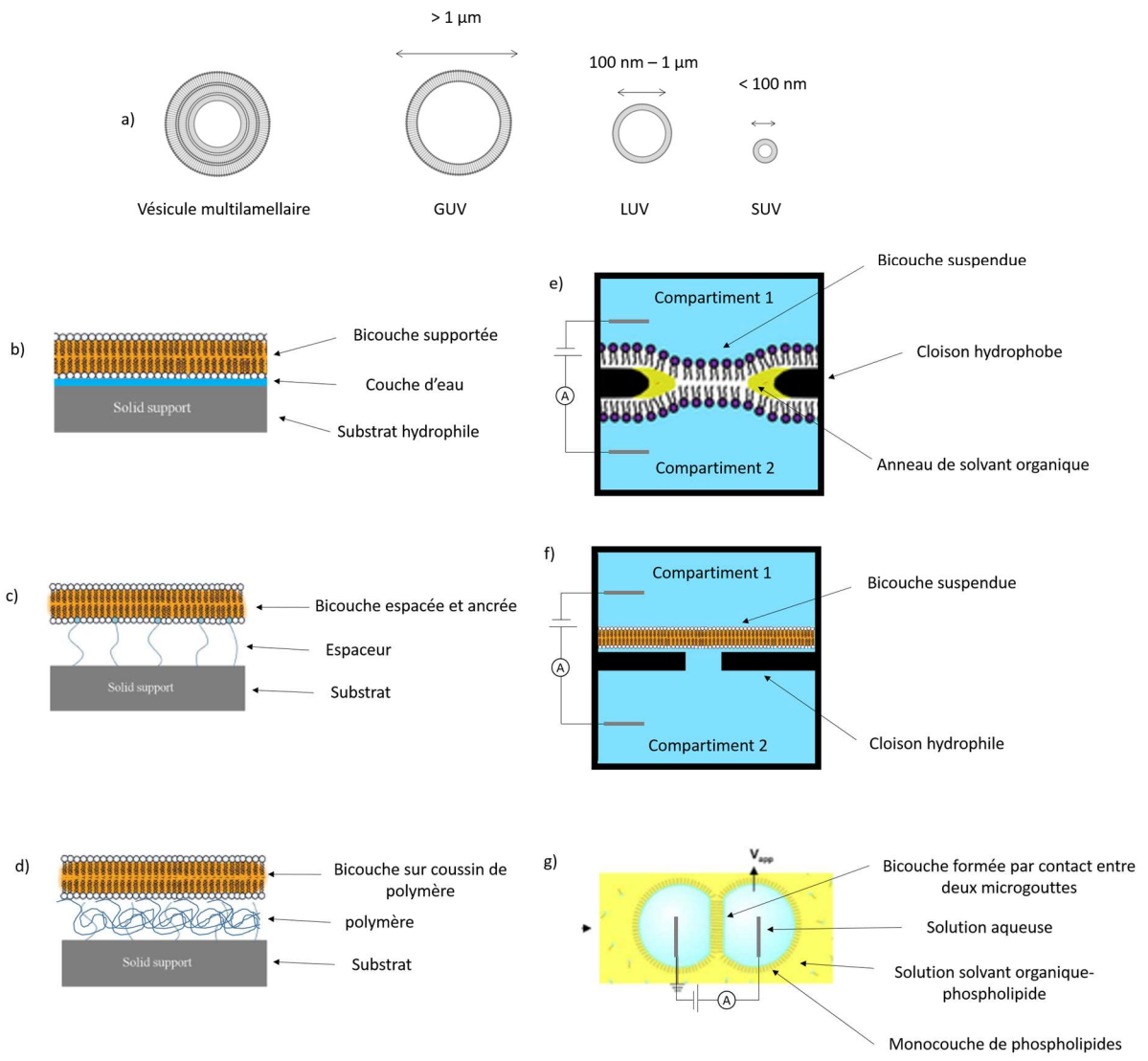


Figure 14 : schéma montrant la structure a) de liposomes, b) d'une bicouche supportée, c) d'une bicouche espacée / ancrée, d) d'une bicouche espacée, e) d'une bicouche suspendue à une cloison hydrophobe, f) d'une bicouche suspende à une cloison hydrophile, g) d'une bicouche obtenue par contact entre deux gouttes de solution aqueuse immergées dans une solution phospholipide / solvant organique. Adapté d'après [60–62].

Les liposomes, ou vésicules lipidiques (Figure 14 a), sont des agencements sphériques de phospholipides. Ils peuvent être formés de plusieurs bicouches repliées sur elles-mêmes (vésicules multilamellaires) ou d'une seule bicouche repliée sur elle-même (vésicule unilamellaire). Dans le cas des vésicules unilamellaires, on parle de GUV (vésicule unilamellaire géante) si le diamètre de la vésicule est supérieur à 1 µm, de LUV (vésicule unilamellaire de grande taille) si son diamètre est

compris entre 100 nm et 1 µm, et de SUV (vésicule unilamellaire de petite taille) si son diamètre est inférieur à 100 nm [63]. Comme nous le verrons dans le paragraphe 2.2, les LUV et les SUV ont un rôle central dans l'étude *in vitro* des canaux ioniques, car elles constituent un environnement stable dans lequel les canaux ioniques peuvent être conservés dans un état fonctionnel avant d'être introduits dans d'autres types de bicouches biomimétiques. Leur formulation en suspension est pratique car la suspension peut être congelée, transportée, décongelée et introduite dans un dispositif d'analyse. NB : lorsque des canaux ioniques (ou plus généralement une protéine membranaire) sont insérés dans la bicouche d'une SUV, LUV ou GUV, la structure formée porte le nom de protéo-SUV, protéo-LUV ou protéo-GUV.

Les applications analytiques des (protéo-)SUV, (protéo-)LUV et (protéo-)GUV sont diverses : Les (protéo-)GUV ont l'avantage de présenter une surface de bicouche relativement importante et libre de toute interaction avec un substrat, elles sont donc adaptées aux des études par microscopie de fluorescence de la dynamique des bicouches lipidiques, telles que l'étude de leur fluidité ou la formation de domaines au sein de bicouches comportant plusieurs phospholipides différents [64,65]. Les (protéo-)SUV et les (protéo-)LUV peuvent être utilisées pour étudier par microscopie de fluorescence l'interaction entre une protéine membranaire et une molécule, par exemple dans le cadre de l'immunologie [63]. Les études par microscopie de fluorescence impliquent d'immobiliser les (protéo-)GUV, les (protéo-)SUV ou les (protéo-)LUV sur une surface afin de pouvoir former une image. Il est aussi possible de mener des études en suspension, en utilisant par exemple comme méthode de caractérisation la fluorimétrie. La fonctionnalité des canaux ioniques peut ainsi être étudiée en utilisant un fluorophore (présent en solution ou dans la bicouche des liposomes) dont les propriétés d'absorption et d'émission sont sensibles à la concentration en un ion [66] ou au potentiel de membrane de la bicouche [67]. Les protéo-GUV, protéo-LUV et protéo-SUV ne sont cependant pas adaptées à la caractérisation électrique des canaux ioniques, car leur fragilité (dans le cas des GUV) et leur petite taille (dans le cas des LUV et des SUV) écarte la possibilité d'introduire une électrode à l'intérieur.

Des bicouches biomimétiques peuvent aussi être formées sur la surface d'un substrat solide (Figure 14 b, c, d). Cette configuration est avantageuse car elle permet d'utiliser différentes techniques de caractérisation qui nécessitent habituellement une surface plane et/ou mécaniquement stable, par exemple la réflectivité de neutrons [68], l'ellipsométrie [69], l'interférométrie optique [70], la microscopie optique de super-résolution [71], la SPR [68], les microscopies en champ proche [72], la QCM-D [73]. Par ailleurs, l'utilisation d'électrode [74] comme support permet aussi d'utiliser une caractérisation électrique, par exemple en mesurant la variation de la capacité associée à la bicouche lorsqu'un analyte se lie à une protéine membranaire présente dans la bicouche, ou la variation de la résistance de la bicouche comprenant des canaux ioniques modifiés pour qu'ils passent dans un état ouvert en la présence de l'analyte à détecter [75]. Ce principe de détection peut aussi être décliné en utilisant un transistor à effet de champ comme substrat [76].

Les bicouches biomimétiques formées sur un substrat solide se prêtent donc bien à des applications de biodétection mettant en jeu une protéine membranaire, comme par exemple les dosages immunologiques. Lorsque la bicouche est formée directement sur la surface d'un substrat hydrophile, on parle de bicouche supportée (Figure 14 b). Une fine couche d'eau de 1 à 2 nm d'épaisseur sépare dans ce cas la bicouche du substrat [77]. Les matériaux permettant de les obtenir sont par exemple le SiO_2 [78], le mica [79], l'or [80], le TiO_2 [80]. Lorsque l'on souhaite utiliser des protéines

transmembranaires présentant un large domaine extra-membranaire, les bicouches supportées ne sont pas adaptées à cause de la présence du substrat qui peut dénaturer de telles protéines ou empêcher leur insertion dans la bicouche. Par ailleurs, l'interaction entre le substrat et la bicouche n'est pas suffisante pour que la bicouche supportée conserve son intégrité pendant de longues périodes (par exemple un mois) ou lors d'une exposition à l'air, ce qui serait utile dans des applications où les biocapteurs doivent être stockés et transportés [75,81].

Différentes stratégies ont été utilisées pour espacer la bicouche du substrat en utilisant une molécule « espaceur », et/ou ancrer la bicouche sur le substrat afin d'en augmenter la durée de vie, voire de rendre possible son exposition à l'air [82]. De nombreuses approches ont été développées [75,81], nous en décrivons ici deux exemples : la bicouche peut être espacée et ancrée (Figure 14 c) en utilisant une molécule espaceur telle qu'un polymère, un polypeptide ou un lipide. Ces molécules sont greffées par exemple sur une surface d'or en utilisant un groupement thiol ou sur SiO_2 en utilisant un groupement silane. Les espaceurs s'insèrent spontanément dans la bicouche s'ils possèdent par exemple un domaine liposoluble ou s'ils sont liés de manière covalente à un phospholipide. Deng et al. [82] ont ainsi montré qu'il est possible d'obtenir une bicouche espacée et ancrée qui conserve sa fonctionnalité après exposition à l'air, en utilisant comme espaceur une couche de PEG sur lequel est greffé des groupements cholestéryl. Outre ces bicouches espacées et ancrées, il existe aussi des bicouches espacées sans être ancrées, par exemple dans le cas des « bicouches sur coussin de polymère » (Figure 14 d). Celles-ci sont formées sur une couche de polymère hydrophile (par exemple PEG, agarose, cellulose, dextran, polyélectrolyte). Contrairement aux bicouches ancrées, le polymère ne présente pas de domaine liposoluble, de sorte que la bicouche est adsorbée sur cette couche de polymère.

Des enregistrements de l'activité de canaux ioniques à l'échelle du canal unique ont aussi pu être obtenus avec une bicouche espacée et ancrée : Andersson et al. [83] ont pour cela utilisé un dispositif comprenant des électrodes d'or de 100 µm de côté, sur lequel est formé une bicouche espacée avec du DPTL. La relativement petite surface des électrodes entraîne une résistance de scellement élevée, supérieure à 1 GΩ et donc la possibilité de mener des enregistrements électriques. Cependant, une fois formé, le compartiment se trouvant en dessous de la bicouche a un volume limité, ce qui empêche de réaliser une longue caractérisation à cause de la déplétion des ions au cours de l'expérience. Par ailleurs, la composition de ce compartiment est fixée et ne peut pas être modifiée au cours de l'expérience. Les bicouches supportées formées sur un substrat solide sont donc prometteuses pour des applications de biodétection mais pas pour la caractérisation électrique de canaux ioniques.

Deux types de bicouches sont particulièrement utilisés pour l'enregistrement électrique de l'activité de canaux ioniques : les bicouches suspendues (Figure 14 e et f) et les bicouches formées par contact entre deux microgouttes (Figure 14 g). Ces bicouches ont l'avantage d'être placées entre deux compartiments accessibles électriquement, et possèdent une résistance de scellement élevée, supérieure à 1 GΩ. Le contenu des deux compartiments peut aussi être modifié au cours de l'expérience. Les bicouches suspendues sont formées sur une cloison comportant un pore micrométrique ou nanométrique, la surface de la cloison pouvant être hydrophobe, ou hydrophile. Dans le cas d'une surface hydrophobe, les queues des phospholipides sont au contact de la surface, et la bicouche est formée à l'intérieur du pore par contact entre deux monocouches. Un anneau de solvant organique (un solvant pouvant être utilisé pour former la bicouche) peut être présent sur le pourtour du pore, stabilisant l'interface entre les deux monocouches et la bicouche. Dans le cas d'une

cloison hydrophile, la bicouche recouvre le pore, ce sont les têtes polaires des phospholipides qui sont en contact avec la surface, d'une manière similaire au cas des bicouches supportées (Figure 14 b). Les bicouches formées par contact entre deux microgouttes sont obtenues en insérant dans une solution phospholipide / solvant organique deux microgouttes de solution aqueuse. À l'interface entre chacune des microgouttes et la solution de phospholipides, une monocouche de phospholipides se forme. La mise en contact des deux microgouttes entraîne la formation d'une bicouche.

Nous avons décrit les différents types de bicouches biomimétiques que l'on peut former. Nous nous focaliserons maintenant sur les bicouches suspendues et les bicouches formées par contact entre deux microgouttes, car ce sont celles qui offrent le plus de possibilité pour les enregistrements électriques des canaux ioniques et serviront de références pour nos travaux de thèse. Au préalable, nous allons montrer comment il est possible de reconstituer des canaux ioniques fonctionnels au sein d'autres bicouches biomimétiques telles que les bicouches suspendues ou les bicouches formées par contact entre deux microgouttes.

2.2. Reconstitution des canaux ioniques au sein de bicouches biomimétiques, rôle central des liposomes

Pour pouvoir étudier les canaux ioniques au sein de bicouches biomimétiques, il faut être capable de les produire ou les extraire de cellules vivantes, les stocker sans les dénaturer, et les insérer dans la bicouche biomimétique. Comme nous allons le voir, la production d'une protéine peut généralement se faire de deux manières : la production cellulaire et la production acellulaire. Ces deux méthodes sont aussi utilisées pour la production de canaux ioniques. Cependant, les canaux ioniques étant des protéines membranaires intégrales, des précautions particulières doivent être prises pour conserver leur structure lors de la synthèse et/ou de la purification. Dans ce paragraphe, nous allons présenter les deux modes de synthèse permettant d'obtenir des canaux ioniques, et montrer comment les liposomes sont des outils privilégiés permettant de conserver les canaux ioniques synthétisés en conservant leur fonctionnalité, et de les insérer dans d'autres types de bicouches biomimétiques, telles que les bicouches suspendues.

Des cellules en culture peuvent être modifiées génétiquement pour qu'elles sur-expriment une protéine recherchée. Cette **synthèse,** dite **cellulaire**, peut être appliquée pour la production de canaux ioniques (Figure 15, gauche). Il existe de nombreux systèmes d'expression cellulaire [84] : les cellules hôtes peuvent être des bactéries (e. g. Escherichia coli), des levures, des cellules d'insectes ou des cellules de mammifère (e. g. CHO, HEK 293). Les canaux ioniques produits de cette manière se trouvent dans une membrane de la cellule hôte : dans la membrane plasmique pour des canaux normalement exprimé dans la membrane plasmique d'une cellule, ou dans la membrane d'un organite pour un canal normalement présent dans la membrane de cet organite. Les cellules sont ensuite détruites par broyage, sonication ou filtration. Des étapes de centrifugation sont ensuite réalisées afin de séparer les différents constituants cellulaires. A l'issue de ces étapes, la fraction retenue est une suspension qui contient majoritairement des vésicules lipidiques composées de morceaux de membrane plasmique ou de membrane d'organites. Cette suspension peut alors être insérée dans un des compartiments de mesure d'une bicouche suspendue ou formée par contact entre deux microgouttes. La fusion d'une ou de quelques vésicules avec la bicouche entraîne l'insertion des canaux ioniques dans la bicouche, comme nous le verrons dans les paragraphes 2.3.1 et 2.3.6.

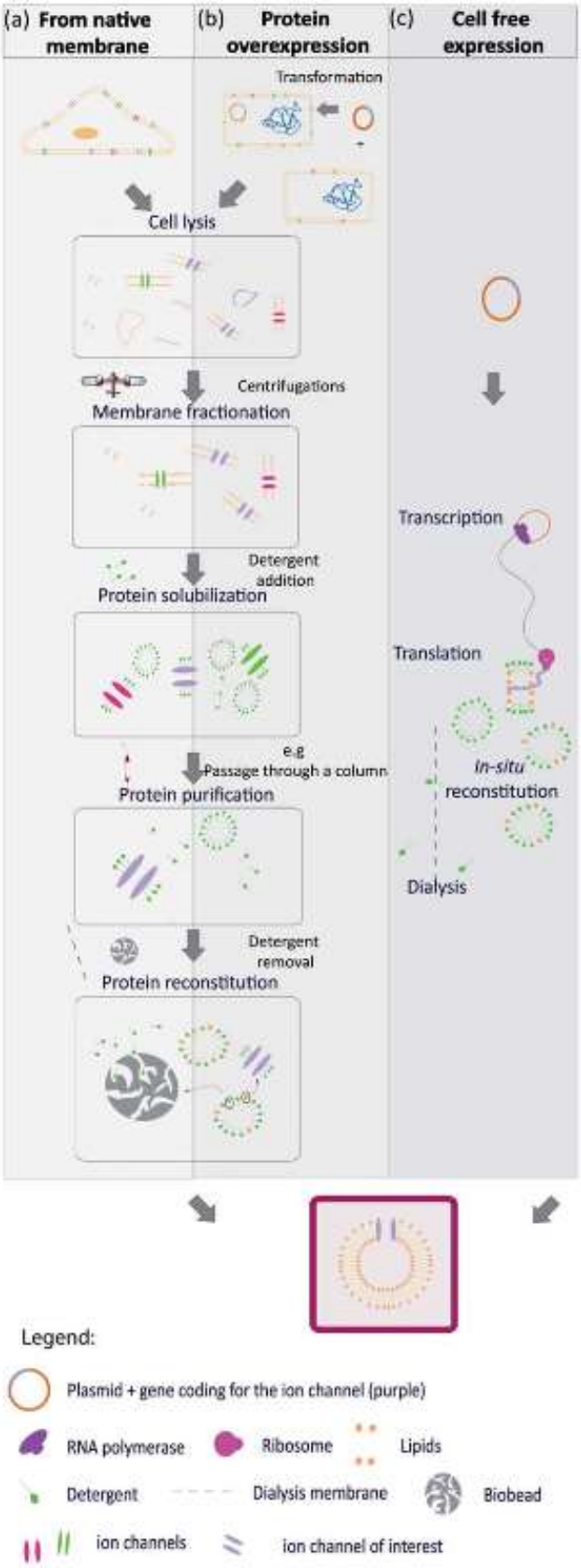


Figure 15 : schéma montrant les deux modes de production des canaux ioniques permettant d'obtenir les canaux ioniques dans des bicouches biomimétiques : le mode de production cellulaire (a et b) et le mode de production acellulaire (c). Tiré de [85].

Les canaux ioniques peuvent aussi être purifiés afin de les séparer des autres constituants membranaires présents dans les vésicules obtenues à l'issue de la lyse cellulaire. Pour cela, les vésicules sont dissoutes en utilisant un détergent (e. g. SDS, Triton X-100). Celui-ci solubilise les membranes et forme des micelles phospholipide / détergent et protéine-détergent. Les canaux ioniques se trouvent ainsi au sein de micelles en émulsion dans la phase aqueuse. Ils sont alors purifiés dans cet environnement par des méthodes de purification conventionnelles telles que la chromatographie d'affinité. Une séquence particulière peut être ajoutée sur l'ADN codant pour le canal ionique pour que celui-ci présente une étiquette sur une extrémité (par exemple une succession d'histidines). Cette étiquette permet une purification plus efficace par exemple par chromatographie d'affinité métallique [85]. Les canaux ioniques ainsi purifiés peuvent ensuite être reconstitués au sein de liposomes de composition phospholipidique contrôlée (on parle alors de protéoliposome car les liposomes contiennent des protéines) [86]. Pour cela, des phospholipides sont ajoutés à l'émulsion contenant les canaux ioniques. Les phospholipides s'insèrent dans les micelles détergent-protéine, et le détergent est ensuite retiré par exemple par dialyse, par dilution, par filtration sur gel ou en utilisant des billes de polystyrène fonctionnalisées pour qu'elles présentent une affinité avec le solvant. La diminution de la concentration en détergent dans l'émulsion entraîne son retrait des micelles et la formation de protéoliposomes. Les protéoliposomes peuvent alors être insérés dans une bicouche suspendue ou formée entre deux microgouttes, par fusion entre des protéoliposomes et la bicouche [87–89]. NB : Le diamètre des protéoliposomes obtenus à l'issue de la purification est généralement inférieur à 300 nm [86]. Ce sont donc des protéo-LUV ou des protéo-SUV.

La synthèse cellulaire de canaux ioniques n'est pas toujours possible : la surexpression d'une protéine peut être toxique pour la cellule, et les cellules ne possèdent pas nécessairement tous les éléments nécessaires à la synthèse d'une protéine recherchée (notamment les enzymes nécessaires aux modifications post-traductionnelles). Une alternative à la synthèse cellulaire de protéines est leur synthèse *in vitro*, dite **synthèse acellulaire** (Figure 15, droite) [90]. Celle-ci consiste à reproduire *in vitro* le mécanisme de transcription de l'ADN en ARN messager, et celui de traduction de l'ARN messager en polypeptide. Pour cela, l'ADN codant pour la protéine d'intérêt et les constituants cellulaires intervenant dans ces réactions sont mis en solution (e. g. pour la transcription : ATP, nucléotides, facteurs de transcription. Pour la traduction : acides aminés, ribosomes, ARNt, facteurs d'initiation), et la température contrôlée pour que se déroule la synthèse de la protéine voulue. Dans le cas des protéines membranaires tels que les canaux ioniques, un environnement amphiphile est ajouté dans le milieu réactionnel afin que les protéines s'y insèrent et y acquièrent leur structure finale : celui-ci peut être constitué par exemple de liposomes, de micelles de détergent, de vésicules de membrane provenant de cellules lysées [91,92]. Après l'étape de synthèse, dans le cas où un détergent est utilisé comme environnement amphiphile, la protéine synthétisée peut être purifiée et reconstituée au sein de protéoliposomes, d'une manière similaire au cas de la synthèse cellulaire [93]. Dans le cas où des liposomes ou des vésicules provenant de cellules lysées sont utilisés, ceux-ci sont séparés du reste du milieu réactionnel en utilisant par exemple la centrifugation dans un gradient de sucrose [94]. Les protéoliposomes ou les vésicules provenant de cellules lysées contenant les canaux ioniques peuvent alors être insérés dans une bicouche suspendue ou formée entre deux microgouttes, comme mentionné plus haut.

NB : Certains canaux ioniques, principalement des toxines d'insectes, de champignons ou de bactéries (e. g. mélitine, α-hémolysine, gramicidine, alaméthicine) sont secrétés par les cellules qui les produisent, et sont solubles dans l'eau. On peut les extraire directement du milieu de culture cellulaire par des méthodes classiques de purification de protéines solubles dans l'eau telles que la chromatographie en phase liquide [95]. Ils sont ensuite lyophilisés pour leur conservation, et peuvent être utilisés et insérés au sein de bicouches biomimétiques par simple addition dans la phase aqueuse environnant la bicouche : ces canaux ioniques s'insèrent spontanément lorsqu'ils sont en contact d'une bicouche lipidique, propriété à la base de leur fonction de toxine. Ces canaux ioniques sont disponibles commercialement, et leur relative simplicité d'utilisation fait qu'on les utilise souvent comme démonstrateur lorsque l'on veut prouver qu'une bicouche biomimétique dans une certaine configuration permet bien de mener des enregistrements électriques sur les canaux ioniques.

En conclusion, nous avons vu qu'il est possible de reconstituer les canaux ioniques au sein de protéoliposomes ou de vésicules extraites de cellules lysées soit par une synthèse cellulaire, soit par une synthèse acellulaire. Les canaux ioniques sont stables au sein de ces structures, ils peuvent être conservés, éventuellement transportés, et insérés au sein d'autres types de bicouches biomimétiques permettant la caractérisation électrique, tells que les bicouches suspendues ou les bicouches formées par contact entre deux microgouttes. De cette manière, les canaux ioniques d'organites ou de bactérie, inaccessibles à la méthode de « patch-clamp », peuvent être étudiés électriquement au sein de ces bicouches artificielles. Nous allons maintenant présenter les différentes approches qui ont été développées pour obtenir une bicouche suspendue, ou une bicouche entre deux microgouttes.

2.3. Mesure de l'activité de canaux ioniques au sein de bicouches suspendues formées en utilisant un solvant organique

2.3.1. Utilisation d'une cloison de polymère : la bicouche suspendue « classique »

Depuis les années 1960, des dispositifs fabriqués manuellement permettent d'obtenir une bicouche suspendue : une cloison faite d'un polymère hydrophobe résistant aux solvants organiques, tel que le PTFE [96], le PVDF [97], le delrin (poly(oxyméthylène)) ou le polysulfone [98], est montée entre deux compartiments remplis d'une solution saline. Cette cloison contient un pore micrométrique de 100 µm à 250 µm de diamètre, sur lequel la bicouche est formée par la méthode de « painting » ou par la méthode de Montal-Mueller, que l'on décrit ci-dessous. Le montage peut être réalisé en insérant une feuille de polymère entre deux compartiments, comme le montre la Figure 16 a), ou bien en utilisant des récipients circulaires, comme par exemple le dispositif commercialisé par Warner Instrument (« planar bilayer workstation », Figure 16 d) [98].

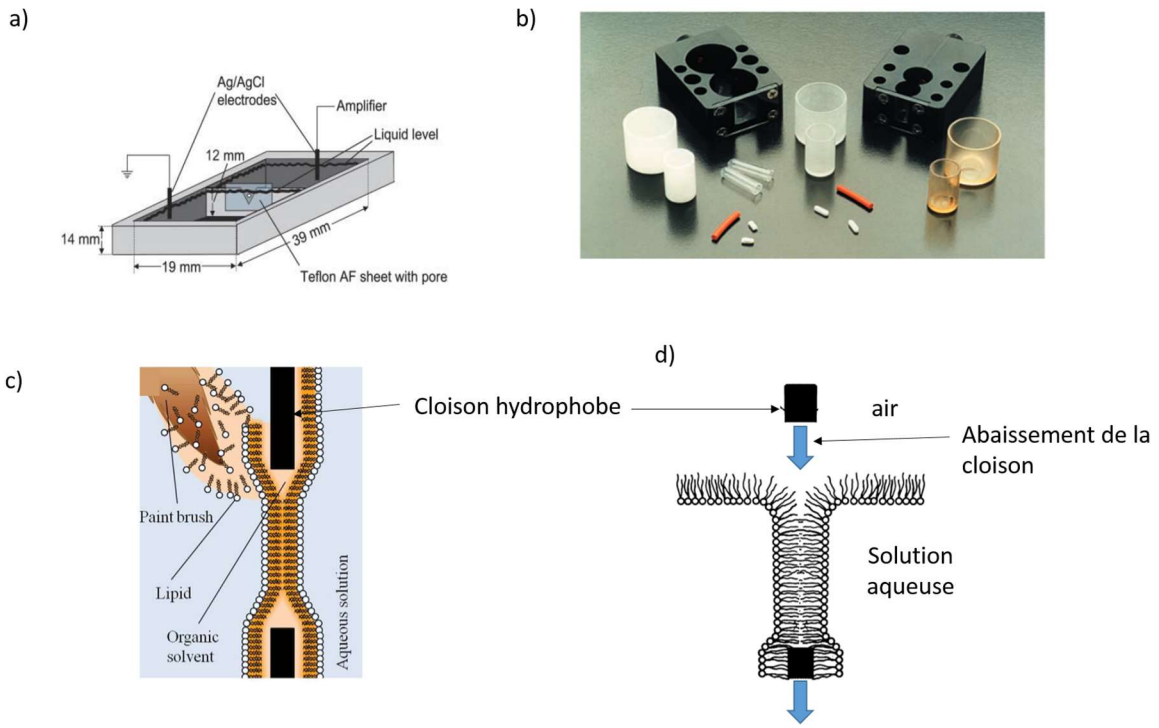


Figure 16 : a) schéma d'un montage permettant de former une bicouche suspendue classique, tiré de [99]. b) photographie du dispositif planar bilayer workstation®, de Molecular Devices, tiré de [98]. c) schéma montrant le principe de la méthode de « painting », tiré de [60]. d) schéma montrant le principe de la méthode de Montal-Mueller, adapté d'après [100].

La méthode de « painting » (Figure 16 a) consiste à étaler avec un pinceau une solution phospholipide / solvant organique sur le pore alors que celui-ci est immergé dans la solution saline [99, 100]. Ce procédé entraîne la formation, au sein du pore, d'une goutte de solvant entourée de phospholipides. La diffusion du solvant et son évaporation entraîne l'amincissement de la bulle jusqu'à ce qu'une bicouche lipidique se forme par contact entre deux monocouches. Les solvants couramment utilisés sont les alcanes, par exemple le décane [56]. Ce solvant reste présent à la fin du procédé de formation de la bicouche sous la forme d'un anneau, qui entoure la bicouche et stabilise l'interface entre les monocouches et la bicouche. Dans la méthode de Montal-Mueller (Figure 16 d), une monocouche de phospholipide est d'abord formée à la surface d'une cuve remplie de solution saline en y insérant une solution phospholipide / solvant organique. La solution s'étale à la surface de la cuve, et l'évaporation du solvant entraîne la formation d'une monocouche de phospholipides à l'interface eau-air. La cloison hydrophobe comprenant le pore micrométrique est alors plongée dans la cuve, ce qui aboutit à la formation d'une bicouche suspendue au pore [100].

Dans le cas de canaux solubles dans l'eau et s'insérant spontanément dans les bicouches lipidiques, tels que la gramicidine ou l'alpha-hémolysine (voir paragraphe 2.2), l'ajout du canal dans un des compartiments aboutit à son insertion dans la bicouche lipidique. Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe 2.2, des canaux ioniques obtenus par synthèse acellulaire ou cellulaire et reconstitués au sein de protéoliposomes peuvent aussi être insérés dans la bicouche par fusion avec celle-ci des protéoliposomes [96, 97, 102]. La méthode de « painting » ainsi que celle de Montal-Mueller permettent d'obtenir un scellement gigaohm entre les deux compartiments. Il en résulte un niveau de bruit suffisamment bas dans les enregistrements électriques pour atteindre l'échelle du canal unique (les aspects liés au bruit seront discutés plus en détails dans le paragraphe 2.3.2). Grâce

à ces relativement bonnes caractéristiques en termes de bruit, ces dispositifs ont été très utilisés pour la recherche sur les canaux ioniques inaccessibles avec la méthode de « patch-clamp », tels que les canaux d'organites [20], et de bactéries [17].

De tels dispositifs présentent cependant plusieurs limitations :

i) la taille de ces dispositifs ainsi que les méthodes manuelles de formation de la bicouche empêche leur utilisation dans des applications telles que le criblage à haut débit de molécules pharmaceutiques, où l'on cherche des dispositifs miniaturisés et automatisés, afin de mener de nombreuses mesures en parallèle,

ii) la durée de vie de la bicouche varie de quelques minutes à quelques heures, en fonction des phospholipides utilisés [104]. Ceci constitue une fois de plus une limitation pour des applications telles que le criblage à haut débit de molécules pharmaceutiques, où une durée de vie plus longue est souhaitable pour réaliser un grand nombre d'expériences successivement. Par ailleurs, cela pose aussi un problème pour l'insertion des canaux ioniques,

iii) le processus de fusion des protéoliposomes avec la bicouche suspendue n'est pas toujours efficace : celui-ci, d'une part, nécessite que le compartiment où sont insérés les protéoliposomes ait une concentration osmotique plus élevée que le deuxième compartiment, et éventuellement contienne des ions divalents tels que Ca^{2+} [105]. D'autre part, la fusion est possible uniquement pour certains canaux ioniques [106]. Une méthode basée sur l'addition dans la bicouche des protéoliposomes de nystatine et d'ergostérol[2], permet la fusion pour d'autres canaux ioniques [106], cependant, cette méthode rend la composition chimique du système plus complexe, ce qui représente une source possible d'artefacts. Une autre méthode consiste à faire fusionner manuellement les protéoliposomes avec la bicouche suspendue en utilisant un outil permettant de toucher la bicouche avec les protéoliposomes [107]. Une telle méthode est intéressante dans la mesure où elle permet la fusion immédiate des protéoliposomes avec la bicouche. Son automatisation n'a cependant pas encore été démontrée.

iv) Comme nous l'avons mentionné, le niveau de bruit obtenu avec ces dispositifs est suffisamment bas pour pouvoir mener des enregistrements à l'échelle du canal unique. Il est cependant supérieur à celui obtenu dans le cas de la méthode de « patch-clamp » : Kol et al. [96] ont par exemple un niveau de bruit de 0,8 pA RMS à une bande passante de 1 kHz en utilisant une bicouche suspendue formée dans un pore de 100 µm de diamètre usiné dans une feuille de téflon (la valeur du bruit a été estimée en divisant par 6 la valeur crête à crête lue sur les courbes, voir discussion correspondante paragraphe 1.5.1). Ceci correspond à un seuil de détection de 4 pA à cette bande passante, à comparer au seuil de détection de 0,3 pA couramment obtenu avec la méthode de « patch-clamp » pour la même bande passante (voir paragraphe 1.5.1).

v) Dès lors qu'un solvant organique est utilisé pour former la bicouche il peut, en fonction des phospholipides utilisés, diffuser et se trouver à l'état de traces à l'intérieur de la bicouche. Les propriétés de celle-ci peuvent s'en trouver modifiées [108], et présenter une source d'artefact dans l'étude des canaux ioniques. NB : dans le cas de la méthode de Montal-Mueller, on laisse le solvant s'évaporer avant la formation de la bicouche. Cependant, la cloison de polymère est souvent conditionnée en réalisant au préalable un dépôt de solvant afin d'améliorer la stabilité

[2] La nystatine est une molécule antibiotique qui se combine avec l'ergostérol pour former un canal ionique facilitant la fusion de protéoliposomes avec une bicouche suspendue

mécanique de la bicouche [109], si bien que cette problématique concerne aussi les bicouches formées avec la méthode de Montal-Mueller.

Nous allons dans la suite présenter les différentes stratégies qui ont été mises en place pour dépasser ces limitations : le **niveau de bruit** pourra être diminué par une miniaturisation du dispositif et une optimisation de la géométrie du pore et du matériau utilisé pour la cloison. Ces aspects seront décrits dans les paragraphes 2.3.2 et 2.3.3). La **stabilité de la bicouche suspendue** pourra être améliorée par une miniaturisation du dispositif, par une modification de la chimie de surface de la cloison et par une optimisation de la géométrie du pore. Ces aspects seront vus dans le paragraphe 2.3.4. **L'intégration, et l'automatisation** de ces dispositifs seront décrites dans le paragraphe 2.3.6. La formation de bicouches suspendues **sans solvant** sera vue dans le paragraphe 2.4 en utilisant une cloison hydrophile permettant la formation d'une bicouche par rupture de GUV, de SUV ou de LUV. Dans le cas des LUV et des SUV, cette approche permettra une **insertion améliorée des canaux ioniques** dans la mesure où la bicouche suspendue pourra être formée à partir de protéo-LUV ou de protéo-SUV, cette stratégie étant le fil conducteur de nos travaux.

2.3.2. Description des sources de bruit dans un banc de mesure de l'activité de canaux ioniques au sein d'une bicouche suspendue

L'objectif de ce paragraphe est de présenter les différentes sources de bruit d'un banc de caractérisation de canaux ioniques au sein d'une bicouche suspendue. Ceci nous permettra d'expliquer l'origine du bruit relativement élevé des bicouches suspendues « classiques », présentées dans le paragraphe 2.3.3, et de montrer quelles optimisations peuvent être effectuées afin de réduire ce niveau de bruit. Des dispositifs où sont effectuées ces optimisations seront présentés dans le paragraphe 2.3.3.

La Figure 17 a) montre une représentation schématique en coupe d'une bicouche suspendue à une cloison de polymère. Les valeurs courantes des différents éléments sont indiquées, pour le cas d'une bicouche suspendue « classique », dans le Tableau 2. A et B représentent les connections entre les électrodes et l'appareil de mesure. La cloison sépare un compartiment 1 et un compartiment 2. Cette cloison étant isolante et immergée dans un électrolyte conducteur, elle est équivalente électriquement à une capacité que l'on appelle la capacité de substrat C_s. Pour une bicouche suspendue « classique », l'épaisseur de la cloison est de 50 µm à 1 mm, et C_S est de l'ordre de 3 à 10 pF [99,110]. La bicouche est aussi équivalente électriquement à une capacité que l'on appelle C_b. La capacité surfacique d'une bicouche est de l'ordre de 0,8 µF/cm² [110]. La valeur de C_b en fonction du diamètre de la bicouche est indiquée dans le Tableau 3. Le diamètre d'une bicouche suspendue « classique » étant de 100 à 250 µm, la capacité correspondante est de 60 pF à 400 pF. Il existe aussi une capacité parasite liée au dispositif d'acquisition (capacité entre les électrodes, entre les fils, capacité d'entrée de l'appareil de mesure). Nous l'appellerons capacité d'entrée du dispositif d'acquisition, ou C_e. Celle-ci est généralement de 4 à 10 pF [99,111]. R_b représente la résistance de scellement entre la bicouche et le substrat, qui est, dans le cas d'un scellement gigaohm, de l'ordre de 10 à 100 GΩ. R_a représente la résistance d'accès à la bicouche, qui est dominée par la résistance du pore micrométrique sur lequel

est formée la bicouche. Celle-ci est généralement de 5 kΩ à 100 kΩ[3], en fonction du diamètre du pore et de l'épaisseur de la cloison. R_e correspond à la résistance de transfert de charge des électrodes et de la portion d'électrolyte se trouvant entre les électrodes et le pore. Elle a une valeur inférieure à 500 Ω [112], et est donc négligeable devant R_a et l'impédance associée à C_S pour les fréquences, inférieures à 100 kHz considérées ici. Pour C_S = 10 pF, par exemple, l'impédance à 100 kHz correspondante est de $1/(2\pi f C) = 200\ k\Omega$ (f étant la fréquence).

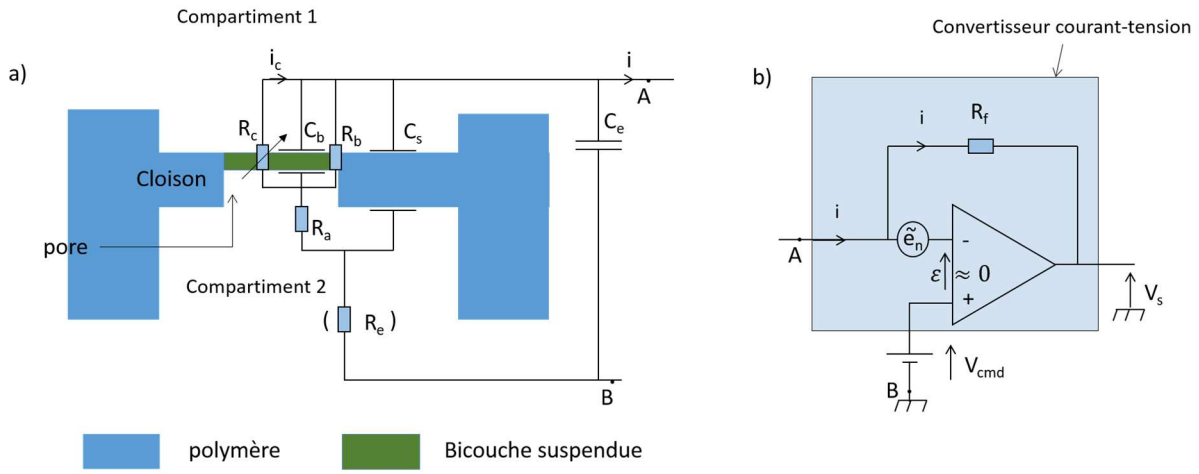


Figure 17 : schéma en coupe d'une bicouche suspendue « classique », et montage électrique équivalent. b) montage convertisseur courant-tension couramment appliqué aux bornes de A-B pour effectuer des enregistrements électriques.

Elément	Valeur courante pour une bicouche suspendue « classique »
C_b	60 pF – 400 pF
C_S	3 pF – 10 pF
C_e	4 – 10 pF
R_a	5 kΩ - 100 kΩ
R_e	< 500 Ω
R_b	10 GΩ - 100 GΩ
R_f	50 GΩ
e_n	$S_v^2 = 4$ à $9.10^{-18} V^2/Hz$ ou $S_v = 2$ à $3\ nV/\sqrt{Hz}$
V_{cmd}	0 – 150 mV

Tableau 2 : valeurs des différents éléments indiqués sur la Figure 17 pour le cas d'une bicouche suspendue « classique ».

Le courant que l'on souhaite mesurer est le courant i_c passant dans la résistance variable R_c associée aux canaux ioniques. Le dispositif est branché à un montage convertisseur courant-tension, représenté sur la Figure 17 b). Celui-ci applique une tension fixe V_{cmd} aux bornes des électrodes, et délivre une tension V_s proportionnelle au courant i circulant entre les deux électrodes. R_f est la résistance d'asservissement du convertisseur courant-tension. Pour les enregistrements à l'échelle du canal

[3] Ces valeurs correspondent à deux cas extrêmes : diamètre de pore 100 µm, longueur 500 µm, et diamètre de pore de 250 µm, longueur 50 µm, en utilisant le modèle présenté dans le paragraphe sur le bruit « RC », plus loin dans ce paragraphe.

unique, celle-ci a une valeur de 50 GΩ ou peut être remplacée par une capacité afin de supprimer le bruit thermique associé à R_f (voir la discussion sur le bruit thermique plus loin), comme dans le cas de l'amplificateur Axopatch 200 B® de Molecular devices, l'amplificateur commercial proposant le niveau de bruit le plus bas actuellement. Par ailleurs, l'amplificateur utilisé pour le montage génère un bruit qui est équivalent à une tension alternative e_n (e_n est la tension de bruit à l'entrée de l'amplificateur). Les caractéristiques courantes de e_n seront présentées plus loin.

Diamètre de la bicouche	Capacité C_b
1 µm	6 fF
10 µm	600 fF
30 µm	6 pF
50 µm	20 pF
100 µm	60 pF
200 µm	250 pF
250 µm	400 pF

Tableau 3 : valeur de C_b calculée pour différents diamètres de bicouche, en supposant que la capacité surfacique de la bicouche vaut 0,8 µF/cm². NB : pour le cas d'une bicouche suspendue « classique », le diamètre de la bicouche est plus petit que le diamètre du pore micrométrique à cause de la présence de l'anneau de solvant.

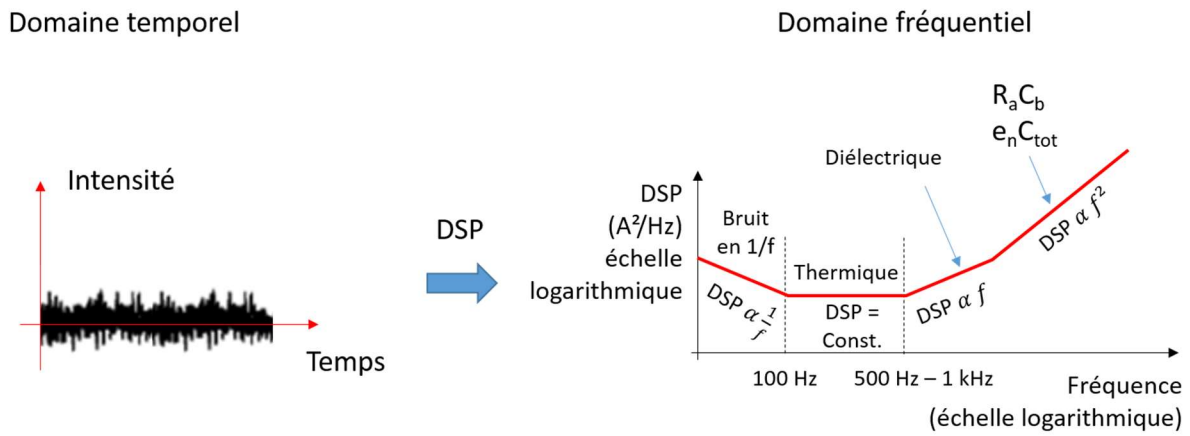


Figure 18 : schéma montrant un enregistrement i(t) dans le domaine temporel et sa DSP. L'allure de la DSP est tirée de [113], et les valeurs de fréquence limite sont tirées de [114].

Le signal mesuré i(t) peut être représenté dans le domaine spectral en calculant sa densité spectrale de puissance (DSP). Dans le cas de la mesure de courant, celle-ci est exprimée en A^2/Hz et on la note $S_n^2(f)$. (Dans certain articles, c'est la racine carrée de la densité spectrale qui est tracée, donnée en $A/\sqrt{Hz}$). La Figure 18 montre l'allure d'un spectre communément obtenu pour un enregistrement au sein d'une bicouche suspendue ou d'un montage de « patch-clamp ». Ce spectre met en évidence la répartition spectrale du bruit sur la mesure i(t). On peut constater différents domaines, en fonction du type de dépendance entre la DSP et la fréquence. Ainsi, à basse fréquence (f < 100 Hz pour le cas représenté ici), la densité spectrale est proportionnelle à l'inverse de la fréquence, ce qui correspond à un bruit dit en 1/f. Pour des fréquences moyennes (100 Hz à 500 Hz – 1 kHz), la densité spectrale est indépendante de la fréquence. Comme nous allons le voir, ce domaine correspond à un bruit thermique dû à la résistance de scellement R_b. Enfin, pour des fréquences supérieures à 500 Hz – 1

kHz, on observe un domaine où la densité spectrale est proportionnelle à la fréquence, puis un domaine où elle est proportionnelle au carré de la fréquence. Ces deux domaines correspondent à trois sources de bruit, que l'on appellera bruit à haute fréquence, et qui sont décrites plus loin. NB : la valeur des fréquences limite des domaines peut varier selon les dispositifs expérimentaux, en fonction de l'amplitude des différentes sources de bruit. Par exemple, par rapport au cas illustré dans la Figure 18 b), si le bruit thermique est plus élevé et le bruit à haute fréquence plus petit, la limite entre le bruit thermique et le bruit à haute fréquence se fera à une fréquence plus grande. Nous reviendrons sur cet effet dans le paragraphe 2.3.3.

Lorsque l'on réalise une mesure i(t), on place un filtre passe bas qui permet de supprimer le bruit associé à des fréquences plus élevées que la fréquence de coupure du filtre. Une bande passante B est ainsi définie, égale à l'intervalle des fréquences non coupées et qui se trouvent représentées dans l'enregistrement après acquisition. En définissant σ comme la valeur RMS du bruit dans l'enregistrement, soit environ 1/6ème de la valeur crête-à-crête (voir la Figure 10 b et c, p. 24), le niveau de bruit sur l'enregistrement est déterminé en fonction de la bande passante B et de la DSP $S_n^2(f)$ par la relation suivante :

$$(2) \qquad \sigma = \sqrt{\int_B S_n^2(f)df}$$

Ainsi, si la bande passante est très réduite, 100 Hz pour le cas représenté sur la Figure 18, le bruit de l'enregistrement sera dominé par le bruit en 1/f. Ce cas est relativement rare dans le cas des enregistrements à l'échelle du canal unique. Pour une bande passante relativement petite de 600 Hz à 1 kHz, le bruit sera dominé par le bruit blanc de la résistance de scellement R_b. Pour une bande passante de l'ordre de 1 à 5 kHz, la contribution du bruit blanc sera du même ordre que celle du bruit à haute fréquence. Enfin, pour des bandes passantes élevées, supérieures à 10 kHz, le bruit total sera principalement dû au bruit à haute fréquence. Ainsi, en fonction de la bande passante utilisée, les sources de bruit à minimiser ne seront pas les mêmes : pour une bande passante inférieure ou égale à 1 kHz, une amélioration significative des enregistrements seront obtenus en augmentant la résistance de scellement, alors que pour une bande passante de 10 kHz ou plus, le niveau de bruit sera diminué en réduisant les sources de bruit à haute fréquence.

Nous allons maintenant décrire l'origine des différentes sources de bruit. Le Tableau 4 récapitulatif de la page 46 donne l'expression de la densité spectrale de bruit du courant dans la branche A-B résultant de ces différentes sources, d'après [114,115].

Bruit « en 1/f » : celui-ci est présent sur toutes les mesures d'un paramètre en fonction du temps et est attribué au nombre important d'éléments en interaction dans le montage expérimental. Sa DSP caractéristique est inversement proportionnelle à la fréquence, d'où son nom de bruit en 1/f.

Bruit thermique (bruit blanc) : Les résistances R_f et R_b génèrent un courant de bruit thermique qui s'additionne, dans la branche A-B (voir Figure 17), au courant i_c que l'on souhaite mesurer. La densité spectrale de ce courant de bruit est indépendante de la fréquence, et inversement proportionnelle à la valeur de la résistance qui le produit. Afin de diminuer le niveau de bruit thermique, on a intérêt à augmenter au maximum la valeur de la résistance de scellement R_b. Lorsque cette résistance est inférieure à 500 MΩ - 1 GΩ, le niveau de bruit obtenu est trop important pour pouvoir mener des enregistrements à l'échelle du canal unique. La résistance R_f peut aussi être remplacée par une

capacité afin de réduire encore le niveau de bruit, comme dans le cas de l'amplificateur Axopatch 200B® de Molecular devices. NB : les canaux dont l'activité est enregistrée produisent aussi un bruit thermique : par exemple pour canal unique ouvert, de conductance 20 pS, la résistance correspondante est de 50 GΩ. Le niveau de bruit obtenu sera ainsi celui qui correspond à une résistance de 50 GΩ même si la résistance de scellement est plus élevée. Ainsi, plus le nombre de canaux ouverts sera important, plus le signal sera bruité.

Bruit diélectrique ($\propto f$) : celui-ci est dû au fait que la capacité C_s n'est pas idéale[4] : en régime alternatif, il existe une résistance parasite dissipative entre les deux armatures (non représentée sur la Figure 17 a) qui génère un bruit appelé bruit diélectrique. Ce bruit a une amplitude d'autant plus élevée que la capacité C_S est élevée et que le coefficient de pertes diélectriques du matériau D (sans unité) est élevé. On aura donc intérêt, pour réduire ce bruit, à diminuer au maximum C_S, et/ou à utiliser pour la cloison un matériau à faible coefficient de pertes diélectriques. La valeur du coefficient de pertes peut varier sur plusieurs ordres de grandeur : il est par exemple de 10^{-5} pour le cas du quartz, et de 9.10^{-3} pour le cas de certains verres [115]. Le téflon amorphe, utilisé par Mayer et al. [99] a un coefficient D de 2.10^{-4}. Pour diminuer C_S, il faudra par exemple augmenter l'épaisseur de la cloison ou diminuer sa surface. En effet, la valeur d'une capacité est donnée par l'équation (où ε_0 représente la permittivité diélectrique du vide, ε_r la permittivité relative du matériau diélectrique utilisé pour la cloison, S représente la surface de la cloison, et e son épaisseur) :

$$(3) \qquad C = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{S}{e}$$

Bruit de l'amplificateur e_n combiné aux capacités C_S, C_b et C_e ($\propto f^2$): l'amplificateur utilisé pour le convertisseur courant-tension génère un bruit qui est équivalent à une source de tension alternative e_n. E_n est appelé « tension de bruit à l'entrée de l'amplificateur », et est caractérisée par sa densité spectrale de puissance, qui peut être considérée, pour les amplificateurs de « patch-clamp » couramment utilisés, comme indépendante de la fréquence et de l'ordre de 2 à 3 $nV/\sqrt{Hz}$, soit 4 à 9. 10^{-18} V^2/Hz [116]. Cette source de tension, étant appliquée aux bornes de A-B, génère un courant dans la branche A-B. L'amplitude de ce courant est déterminée par l'impédance de cette branche, qui comporte une forte composante capacitive associée à C_b et C_s et C_e. Les capacités étant placées en parallèle, la capacité totale C_{tot} est égale à la somme de ces trois capacités. Il s'ensuit que le courant de bruit résultant dans la branche A-B est proportionnel à C_{tot}. Ce bruit est noté sur la Figure 18 bruit « $e_n C_{tot}$ », et a une densité spectrale proportionnelle au carré de la fréquence. On conclut donc que le bruit associé à e_n sera minimisé si les différentes capacités C_e, C_s, et C_b sont réduites. Pour C_S, il faudra soit réduire la surface de la cloison en contact avec la solution saline, soit augmenter son épaisseur (voir équation (3)). Pour C_b, il faudra réduire le diamètre du pore sur lequel est formée la bicouche, afin de réduire le diamètre de la bicouche. En ce qui concerne C_e, nous verrons dans le paragraphe 2.3.4 qu'il est possible de réduire sa valeur en intégrant le dispositif d'acquisition au substrat sur lequel est fabriqué la cloison et le pore micrométrique.

Bruit « RC » (bruit de la résistance d'accès R_a combiné à la capacité C_b) ($\propto f^2$) : la résistance R_a est aussi une source de bruit thermique. Cependant, la présence de la capacité C_b en série atténue à basses fréquences le courant de bruit résultant dans la branche A-B. La densité spectrale du courant de bruit

[4] La contribution dans le bruit diélectrique de C_e et de C_b est moins important que celle de C_S, d'après Mayer et al. [99].

dans la branche A-B est alors proportionnelle au carré de la fréquence. Par ailleurs, pour les valeurs de R_a usuelles (voir Tableau 3, p. 42), l'amplitude du bruit est diminuée si l'on diminue C_b pour R_a fixé, ou si l'on diminue R_a pour C_b fixé (voir Figure 19 a). Ceci implique, pour réduire ce bruit, d'utiliser des pores de géométrie conique. En effet, la résistance R_a d'un pore comprend généralement deux termes [117] : un terme que l'on appelle résistance de convergence et qui correspond à la convergence des lignes de courant à l'entrée et à la sortie du pore (voir Figure 19 b), et un terme que l'on appelle résistance intérieure, correspondant à la résistance de la portion d'électrolyte se trouvant dans le pore. La résistance de convergence vaut (pour l'ensemble entrée et sortie, où ρ est la résistivité de l'électrolyte, et r est le rayon à l'entrée du pore) :

$$(4) \qquad R_{conv} = \frac{\rho}{2r}$$

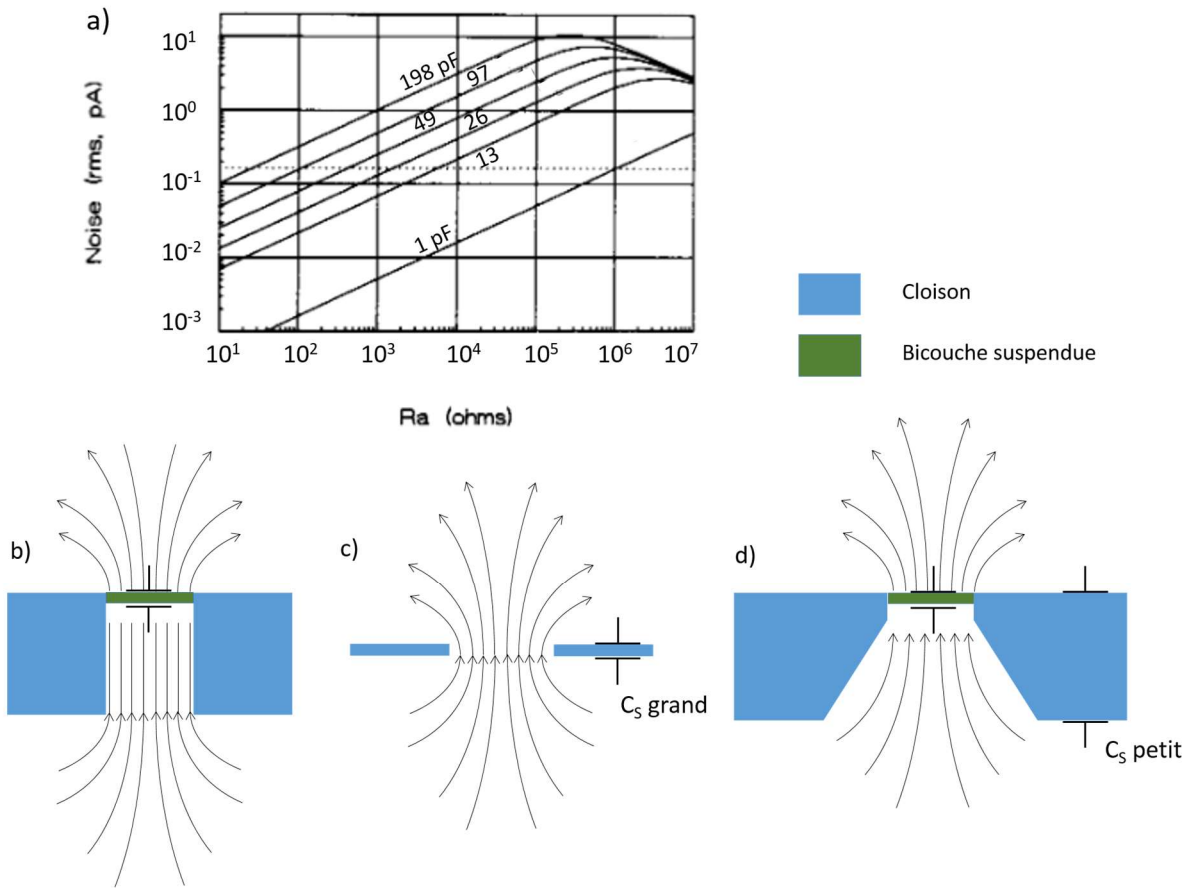


Figure 19 : niveau de bruit « RC » dans la branche A-B (en valeur RMS) calculé pour une bande passante de 5 kHz, en fonction de R_a et pour plusieurs valeurs de C_b, tiré de [110]. b) schéma en coupe d'une bicouche suspendue, dans une configuration où la résistance R_a possède une contribution de la résistance de convergence et de la résistance intérieure. c) configuration où la résitance R_a est limité à la résistance de convergence, mais où la capacité C_S est élevée. d) configuration optimale où la résistance R_a est limitée à la résistance de convergence, et où la capacité C_S est petite.

Et la résistance intérieure du pore vaut, pour le cas d'un pore cylindrique (où l désigne la longueur du pore) :

$$(1) \qquad R_{int} = \frac{\rho l}{\pi r^2}$$

Ainsi, pour un diamètre de bicouche donné, et donc une capacité C_b donnée, la résistance R_a pourrait être diminuée en réduisant l'épaisseur de la cloison de sorte que R_a tende vers la valeur de la résistance de convergence (Figure 19 c). Cependant, procéder ainsi augmente la valeur de la capacité C_s et entraîne une augmentation du bruit de l'amplificateur combiné à la capacité C_S ainsi que du bruit diélectrique. La configuration optimale en termes de bruit est donc d'utiliser des pores coniques (Figure 19 d), ce qui permet d'approcher la valeur optimale du cas où seule la résistance de convergence est présente, tout en maintenant C_S a une petite valeur [110]. NB : Nous verrons dans le paragraphe 2.3.3 que la résistance R_a peut aussi être diminuée en augmentant la concentration de la solution saline. Cependant, cette solution n'est pas satisfaisante pour l'étude des canaux ioniques car elle implique un environnement qui s'écarte des conditions physiologiques.

Type de bruit	Signature spectrale	DSP du courant de bruit résultant dans la branche A-B et i_{RMS} correspondant pour une bande passante B	Précautions permettant de limiter le bruit
Bruit thermique	constant	$S_n^2 = 4kT/R$ $i_{RMS} = \sqrt{4kTB/R}$	• Augmenter R_b en améliorant le scellement du pore • Utiliser un gain élevé (R_f = 50 GΩ ou asservissement capacitif)
Bruit diélectrique de la cloison	$\propto f$	$S_n^2(f) = 8\pi kTDC_S f$ $i_{RMS} = \sqrt{4\pi kTDC_S B^2}$	• Diminuer C_S en augmentant l'épaisseur de la cloison • Diminuer le coefficient de pertes diélectriques D du matériau de la cloison
Bruit dû à e_n combiné à la capacité totale $C_{tot} = C_S + C_e + C_b$	$\propto f^2$	$S_n^2(f) = 4\pi^2 {C_{tot}}^2 f^2 S_v^2$ $i_{RMS} = \sqrt{\frac{4}{3}\pi^2 {C_{tot}}^2 B^3 S_v^2}$	• Diminuer C_S en augmentant l'épaisseur de la cloison • Diminuer C_b en réduisant le diamètre du pore • Diminuer C_e en optimisant la connectique
Bruit « RC »	$\propto f^2$	$S_n^2(f) = \frac{(2\pi f R_a C_b)^2}{R_a[1 + (2\pi f R_a C_b)^2]}$	• Diminuer R_a en utilisant des pores de formes conique • Diminuer R_a en réduisant l'épaisseur de la cloison (à condition que C_S n'augmente pas trop afin de limiter les autres sources de bruit)

Tableau 4 : récapitulatif des différentes sources de bruit, avec l'expression analytique de la densité spectrale du courant de bruit dans la branche A-B, et la valeur RMS du courant de bruit pour une bande passante B, tiré de [114].

2.3.3. Diminution du niveau de bruit par une optimisation de la géométrie du dispositif, des matériaux utilisés et de la connectique

Nous avons vu dans le paragraphe 2.3.1 que les bicouches suspendues « classiques » ont un niveau de bruit plus élevé que le cas des expériences de « patch-clamp ». Ce niveau de bruit est principalement dû au bruit de l'amplificateur combiné à la capacité totale. En effet, pour un diamètre de pore de 100 à 250 µm, la capacité de la bicouche est de 60 à 400 pF (voir Tableau 2, p. 41), valeur bien plus grande que pour le cas de la méthode de « patch-clamp », où le diamètre intérieur de la pipette de 500 nm à quelques micromètres entraîne une valeur de capacité C_b inférieure à 1 pF (Tableau 3, p. 42). Comme nous l'avons mentionné (Figure 18, p. 42), ce bruit est prépondérant à haute fréquence. Comparativement, le bruit à basse fréquence (bruit thermique) est relativement faible, du même ordre que celui obtenu pour les expériences de « patch-clamp », car la résistance de scellement est du même ordre, de 10 à 100 GΩ. C'est pourquoi les bicouches suspendues « classiques » permettent de mener des enregistrements à l'échelle du canal unique, à condition de limiter la bande passante à une valeur relativement basse (typiquement inférieure ou égale à 1 kHz) par rapport aux expériences de « patch-clamp » où une bande passante de 1 à 10 kHz est souvent utilisée. Par exemple Kol et al. [96] étudient un canal (TRPV3 humain) dont le courant dans l'état ouvert est de 10 pA pour les conditions utilisées[5]. Une bande passante de 1 kHz leur permet d'avoir un seuil de détection (5 σ, voir paragraphe 1.5.1) d'environ 5 pA et donc de détecter l'ouverture du canal. Rosenberg et al. [97] étudient un canal (canal bactérien « Shaker ») dont le courant dans l'état ouvert est d'environ 2 pA dans les conditions expérimentales utilisées[6]. Pour pouvoir observer l'ouverture du canal, ils réduisent la bande passante à 200 Hz, ce qui leur permet d'avoir un seuil de détection d'environ 0,6 pA.

Afin de réduire le niveau de bruit par rapport aux bicouches suspendues « classiques », Mayer et al. [99] ont développé un procédé de fabrication de pores micrométriques dans une feuille de téflon amorphe, permettant d'obtenir de réduire le diamètre des pores jusqu'à une valeur de 2 µm. Des précautions sont aussi prises afin de réduire le bruit diélectrique et le bruit « RC » : le bruit diélectrique est réduit en utilisant un matériau, le téflon amporphe, de relativement faible coefficient de pertes diélectrique ($D = 2{,}0\ 10^{-4}$). Le bruit « RC » est réduit grâce à la géométrie conique des pores, et au fait que la concentration utilisée est relativement élevée (1 M KCl). Dans ces conditions, le niveau de bruit à une bande passante de 1 kHz est de 0,09 pA RMS, ce qui correspond à un seuil de détection de 0,5 pA. Pour une bande passante de 4,3 kHz, le niveau de bruit est de 0,4 pA RMS, correspondant à un seuil de détection de 2 pA. Enfin, pour une bande passante de 10 kHz, le niveau de bruit est d'environ 1 pA RMS, (estimé en divisant par 6 la valeur crête à crête lue sur les courbes, voir discussion correspondante dans le paragraphe 1.5.1), ce qui correspond à un seuil de détection de 5 pA. Les auteurs montrent que le niveau de bruit diminue en fonction du diamètre des pores micrométriques utilisés pour former la bicouche, jusqu'à un diamètre de 30 µm : en dessous de 30 µm, la capacité C_b devient plus petite que celle de la cloison relativement fine (9 pF, épaisseur 60 µm) et celle de la connectique (10 pF), de sorte que le niveau de bruit de l'amplificateur combiné à la capacité totale ne peut plus être réduite par une diminution de la capacité de la bicouche.

Si la réduction du diamètre de la bicouche suspendue permet diminuer de manière significative le niveau de bruit de l'enregistrement, elle rend difficile en pratique l'insertion de canaux ioniques par

[5] 100 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES – KOH, pH 7, potentiel de membrane appliqué 80 - 120 mV.

[6] 350 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM K-HEPES, pH 7 d'un côté de la bicouche, 50 mM KCl, le reste identique de l'autre côté de la bicouche, potentiel de membrane appliqué 120 – 160 mV.

fusion de protéoliposomes avec la bicouche, la probabilité de fusion entre un protéoliposome et la bicouche suspendue étant proportionnelle à la surface de la bicouche suspendue. C'est pourquoi les dispositifs comprenant une bicouche suspendue de petit diamètre, tels que ceux décrits dans le présent paragraphe, sont appliqué à l'étude de canaux ioniques solubles dans l'eau et s'insérant spontanément dans la bicouche suspendue formée (e. g. gramicidine, alaméthicine, etc.), l'insertion étant plus efficace dans ce cas. Comme nous le verrons dans le paragraphe 2.4.1, une manière de contourner cette limite est d'utiliser une autre méthode de formation de la bicouche suspendue, où l'insertion des canaux ioniques se fait en même temps que la formation de la bicouche suspendue.

L'entreprise Nanion commercialise un dispositif de « patch-clamp » automatique (port-a-patch®, mentionné Figure 12 d, p. 27) qui peut être utilisé pour former une bicouche suspendue à partir d'une GUV [111] (cette méthode de formation de la bicouche sera présentée dans le paragraphe 2.4.1, p. 65). Ce dispositif est optimisé, d'une manière similaire aux travaux de Mayer et al. [99] présentés ci-dessus, pour que le niveau de bruit soit réduit par rapport aux bicouches suspendues « classiques » : la surface de la cloison (constituée d'un substrat de verre) se trouvant entre les deux compartiments est réduite du fait du petit volume des compartiments (de l'ordre de quelques microlitres). Ceci résulte en une capacité C_S relativement faible, de l'ordre de 0,5 pF [111], permettant, d'une part, de réduire le niveau de bruit diélectrique, et d'autre part le bruit de l'amplificateur combiné C_S. Le diamètre du pore est de l'ordre de 1 µm, ce qui limite la valeur de la capacité de la bicouche C_b à quelques femtofarads. La résistance d'accès R_a est limitée (1 MΩ pour solution saline 500 mM KCl [111]) malgré le petit diamètre du pore, grâce à la géométrie conique de celui-ci. Il en résulte un niveau de bruit « RC » limité. Enfin, la capacité de la connectique C_e est de l'ordre de 4 pF, ce qui permet de réduire le niveau de bruit de l'amplificateur combiné avec C_e. Dans ces conditions, un niveau de bruit d'environ 1 pA RMS pour une bande passante de 10 kHz est obtenu [111], correspondant à un seuil de détection de 5 pA à cette bande passante. Gaβmann et al. [118] ont utilisé le même dispositif avec une bande passante de 1 kHz et ont un niveau de bruit d'environ 0,15 pA (estimé en divisant par 6 la valeur crête-à-crête du bruit des enregistrements présentés dans la référence), ce qui correspond à un seuil de détection de 0,75 pA.

Afin de réduire la valeur de la capacité de la connectique, Rosenstein et al. [119] ont développé un dispositif où le montage convertisseur courant tension est intégré sur une puce de silicium, celle-ci comprenant par ailleurs un puit de SU-8 (épaisseur 5 µm, diamètre 20 µm) sur lequel est formé la bicouche (Figure 20 a). Dans ces conditions la somme des capacités $C_b + C_S + C_e$ vaut environ 3 pF, dont 1,4 pF attribué à la bicouche. Le bruit diélectrique est faible à cause de la petite valeur de C_S. Par ailleurs, le diamètre important du pore en comparaison de sa longueur, ainsi que l'utilisation d'un électrolyte de conductivité relativement élevée (1 M KCl) entraîne une petite valeur de la résistance R_a et donc du niveau de bruit « RC ». Cependant, l'amplificateur ayant été conçu pour de la détection d'analytes traversant un nanopore solide [113], il est calibré pour mesurer un courant relativement élevé (15 nA) dans un régime non saturé. Dans cette configuration, le niveau de bruit thermique généré par l'asservissement du montage convertisseur courant tension est relativement élevé, équivalent à celui qu'aurait un asservissement par une résistance R_f de 170 MΩ. La Figure 20 d), courbe A, montre la densité spectrale de puissance obtenue lorsqu'une bicouche suspendue est formée sur le pore. On peut constater que la fréquence à partir de laquelle le bruit à haute fréquence devient prépondérant sur le spectre est de l'ordre de 20 kHz. Cette valeur est plus élevée par rapport au cas représenté dans la Figure 18, p. 42. Ceci est dû au fait que le niveau de bruit thermique est relativement élevé et le niveau de bruit à haute fréquence est relativement bas. Ainsi, pour une bande passante de 10 kHz, le

bénéfice d'une petite valeur de la capacité totale $C_e + C_S + C_b$ est annulé par le bruit thermique élevé : le niveau de bruit obtenu pour une bande passante de 10 kHz est de 1 pA RMS, soit identique à celui obtenu par Sondermann et al. avec le dispositif port-a-patch®, mentionné plus haut. La situation est différente pour une bande passante supérieure à 10 kHz, où le bruit thermique devient négligeable devant le bruit à haute fréquence : pour une bande passante de 100 kHz, le niveau de bruit obtenu est de 4,4 pA RMS, correspondant à un seuil de détection de 22 pA, niveau comparable à celui obtenu au sein de dispositifs de « patch-clamp » optimisés pour le faible bruit (voir par exemple le cas de Parzefall et al. [43], paragraphe 1.5.1). Le dispositif de Rosenstein et al. permet ainsi de réaliser des enregistrements avec une bande passante encore plus grande, de 1 MHz, soit la plus grande bande passante mentionnée jusqu'à présent pour des enregistrements à l'échelle du canal unique. Pour cela, les auteurs utilisent une concentration de solution saline élevée (3 M KCl), et un potentiel de membrane appliqué de 150 mV, de sorte que les niveaux de conductions associés au canal ionique étudié (gramicidine) sont espacés d'environ 500 pA. Ceci leur permet d'observer des créneaux de transitions entre deux niveaux de conductions, extrêmement brefs, d'une durée de 3 µs, malgrés le seuil de détection élevé pour cette bande passante (490 pA, correspondant à un bruit RMS de 61 pA).

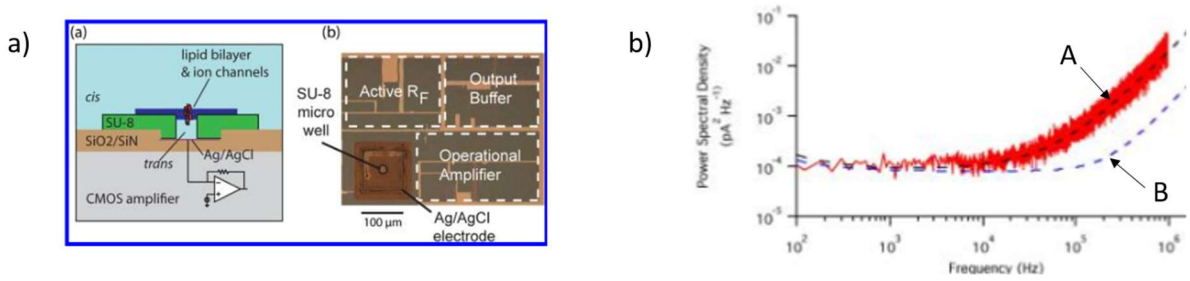


Figure 20 : a) schéma et photographie du dispositif de Rosenstein et al. b) DSP obtenue par Rosenstein et al. pour lorsqu'une bicouche suspendue est formée (courbe A) et lorsque le dispositif n'est pas rempli de solution saline (courbe B), ce qui correspond au cas où seul C_e est présent, sur le schéma de la Figure 17. La courbe rouge correspond aux données expérimentales, et les courbes en pointillés correspondent à leur ajustement avec un modèle théorique. Tiré de [119].

On peut constater par ailleurs que la contribution de C_b et/ou C_S dans le bruit à haute fréquence obtenu par Rosenstein et al. [119] est relativement importante : la Figure 20 b), courbe B, montre la densité spectrale de puissance obtenue lorsque le dispositif n'est pas rempli de solution saline. Ceci est équivalent à remplacer la portion de circuit regroupant C_b, R_b, R_c, R_a et C_S dans la Figure 17, p. 41, par un interrupteur ouvert, et ne garder que la capacité C_e. On constate que le niveau de bruit obtenu dans ce cas est réduit de manière significative. La capacité de la bicouche C_b étant de 1,4 pF, soit la moitié de la valeur de la capacité totale, nous pouvons supposer qu'une diminution significative du bruit à haute fréquence pourrait être obtenue en réduisant le diamètre du pore sur lequel est formée la bicouche. Par ailleurs, la tension de bruit d'entrée de l'amplificateur utilisé est plus élevée ($S_v^2 = 2{,}5\ 10^{-17} V^2/Hz$) que celle d'un amplificateur « patch-clamp » tel que Axopatch 200B® ($S_v^2 = 4$ à $9\ 10^{-18} V^2/Hz$, voir la discussion sur le bruit de l'amplificateur combiné aux capacités C_S, C_b et C_e dans le paragraphe 2.3.2), de sorte que le bruit à haute fréquence pourrait encore être diminué avec un amplificateur de bruit plus faible. Nous pouvons conclure que le dispositif développé par Rosenstein et al. est très prometteur pour mener des enregistrements de l'activité de canaux ioniques avec un très faible niveau de bruit. Il nécessite cependant encore quelques optimisations, qui sont i) l'utilisation d'un asservissement capacitif ou avec une résistance de 50 GΩ, ii) la réduction du diamètre du pore dans lequel est formé la bicouche, iii) la réalisation d'un amplificateur avec une tension de

bruit d'entrée plus petite. iii) il faudra que la partie qui soit en contact avec les échantillons biologiques puisse être jetable, afin de pouvoir mener des analyses successive sur une même puce électronique et réduire ainsi le coût de l'analyse.

Pour conclure sur ce paragraphe, nous avons vu que, pour le cas des bicouches suspendues « classiques », le scellement gigaohm entraîne un niveau de bruit thermique suffisamment bas pour pouvoir mener des enregistrements à l'échelle du canal unique avec une bande passante de quelques centaines d'hertz à 1 kHz. L'utilisation d'une bande passante plus grande est en pratique impossible à cause du bruit à haute fréquence, dominé par le bruit de l'amplificateur combiné avec la capacité de la bicouche C_b. Nous avons vu que ce bruit pouvait être réduit en diminuant le diamètre du pore sur lequel est formé la bicouche, ce qui a pour effet de réduire la surface de la bicouche et donc C_b. Les autres sources de bruit peuvent aussi être diminuées en utilisant pour fabriquer la cloison un matériau présentant un petit coefficient de pertes diélectriques, et en réduisant la valeur de la capacité de la cloison C_S et celle de la connectique C_e. L'entreprise Nanion commercialise un dispositif où ces optimisations sont réalisées, de sorte qu'il est possible d'obtenir sur une bicouche suspendue un niveau de bruit comparable au cas des expériences de « patch-clamp ». Enfin, le niveau de bruit peut être encore diminué en en utilisant un dispositif où le montage convertisseur courant tension est intégré sur le substrat utilisé pour former la bicouche. Dans ce dispositif, la capacité totale $C_e + C_S + C_b$ est égale à 3 pF, ce qui a pour effet de réduire fortement le niveau de bruit à haute fréquence, et d'augmenter jusqu'à une valeur de 1 MHz la bande passante pouvant être utilisée. Cependant, une des conséquences de la réduction de la surface de la bicouche est qu'il est impossible d'insérer dans la bicouche des canaux ioniques se trouvant au sein de protéoliposomes, à moins de forer la bicouche à partir d'une GUV contenant les canaux ioniques, méthode de formation dont nous reparlerons dans le paragraphe 2.4.1, p. 65. Le Tableau 5 récapitule le seuil de détection obtenu pour les différentes technologies.

Technologie	Seuil de détection pour une bande passante de 1 kHz	S.D. pour une B.P. de 5 kHz	S.D. pour une B.P. de 10 kHz	S.D. pour une B.P. de 100 kHz	Réf.
« Patch clamp »	0,3 pA	0,9 pA	---	---	[34]
« Patch-clamp » optimisé pour réduire le niveau de bruit	60 fA	0,3 pA	2 pA	15 pA	[43]
Bicouche suspendue « classique »	5 pA	---	---	---	[96]
Cloison téflon avec un diamètre de pore réduit	0,5 pA	2 pA (pour B = 4,3 Khz)	5 pA	---	[99]
Bicouche suspendue formée sur le dispositif Port-a-patch®	0,75 pA	---	5 pA	---	[111], [118]
Dispositif intégré sur silicium	---	---	5 pA	22 pA	[119]

Tableau 5 : comparaison du niveau de bruit obtenu pour différents systèmes. Le seuil de détection correspond à 5 fois la velur RMS du bruit obtenu (voir discussion correspondante dans le paragraphe 23).

2.3.4. Amélioration de la longévité de la bicouche grâce à une réduction du diamètre et/ou une modification de la géométrie des pores

Nous avons mentionné dans le paragraphe 3.1 que les bicouches suspendues « classiques » présentent une relativement faible durée de vie. Comme nous l'avons vu, un anneau de solvant organique entoure la bicouche suspendue et joue le rôle d'interface entre la bicouche et les parois du pore. Dans le cas de la méthode de « painting », cet anneau provient du fait que la bicouche est formée en étalant une solution solvant/phospholipide sur le pore. Dans le cas de la méthode de Montal-Mueller, il provient du conditionnement préalable du pore avec le solvant. Or, il a été montré que la géométrie de l'anneau est importante pour stabiliser l'interface entre la bicouche et les parois du pore [120]. Cette géométrie dépend d'une part de celle du pore (diamètre, longueur, géométrie conique ou cylindrique, rugosité, bords anguleux ou arrondis), et, d'autre part de la chimie de surface du pore, *via* les tensions de surface solvant-polymère et phospholipide-polymère. Ceci implique que la stabilité des bicouches suspendue peut éventuellement être améliorée en modifiant ces différents paramètres. Un autre facteur pouvant expliquer la faible durée de vie des bicouches suspendues « classiques » est le fait que les polymères comme le téflon sont facilement déformables (module d'Young relativement bas), ce qui conduit à une amplification des vibrations mécaniques au niveau du centre de la cloison de polymère, là où est formée la bicouche [121].

Dans ce contexte, la « filière silicium » a été considérée comme une solution prometteuse pour l'obtention de bicouches suspendues plus stables. Il est possible de réaliser un dépôt de matériau diélectrique (par exemple Si_3N_4 ou SiO_2) sur la face avant d'un substrat de silicium. Des pores peuvent être fabriqués dans cette couche de diélectrique avec les procédés standards de microfabrication, et rendus accessibles par l'autre côté du substrat au moyen d'une gravure de la face arrière. Le diélectrique étant un matériau isolant, le substrat de silicium peut alors être placé entre deux compartiments de mesure et jouer le rôle de cloison. Cette approche permet de contrôler le diamètre des pores à l'échelle du micromètre et, dans une certaine mesure, leur géométrie, ainsi que leur chimie de surface grâce à l'utilisation de monocouches auto-assemblées basées par exemple sur la liaison Si-silane. Par ailleurs, les modules d'Young du silicium, du Si_3N_4, et du SiO_2 sont plus élevés que celui d'un polymère tel que le téflon, de sorte que pour une même épaisseur et surface de cloison, l'amplitude des vibrations mécaniques est moindre que pour le cas d'une cloison de téflon. Enfin, les dispositifs de silicium peuvent être fabriqués en série et se prêtent bien à la réalisation de dispositifs intégrés pour des applications telles que le criblage de molécules pharmaceutiques. Nous détaillerons ce point dans le paragraphe 2.3.6.

De tels dispositifs ont été développés par exemple par Hirano-Iwata et al. (Figure 21 a, b) [109] et Peterman et al. [121] (Figure 21 c). Le dispositif d'Hirano-Iwata et al. présente des pores de 20 à 30 µm de diamètre, gravés dans une couche de Si_3N_4 de 240 nm d'épaisseur. Ces pores ont un profil en biseau (Figure 21 b), leur gravure étant réalisée de manière isotrope par voie humide. La surface de SiO_2 qui recouvre le Si_3N_4 est fonctionnalisée avec un dépôt de 3-cyanopropyl-diméthylchlorosilane. Le dispositif de Peterman et al. présente des pores de géométrie cylindrique de diamètre compris entre 20 et 250 µm, obtenus avec une gravure anisotrope par plasma dans une couche de Si_3N_4 d'épaisseur 500 nm). Les parois du pore sont fonctionnalisées avec un dépôt d'octyltrichlorosilane. Dans le cas des pores en biseau, l'interface entre la bicouche et les parois du pore suffisamment stable pour qu'il soit possible de former la bicouche par la méthode de Montal-Mueller sans conditionner le pore au préalable avec un solvant. Ainsi, une bicouche exempte de solvant peut être obtenue, d'une durée de

vie de un à deux jours. Dans le cas où les parois du pore sont verticales, un conditionnement préalable du pore (hexadécane/hexane ou hexadécane/pentane) est nécessaire pour la formation de la bicouche avec la méthode de Montal-Mueller. La durée de vie obtenue n'a pas pu être caractérisée sur une durée supérieure à 8 h à cause du fait que les compartiments de mesure sont petits et que l'eau s'évapore. Cependant, un potentiel de membrane de 400 à 800 mV peut être appliqué sans qu'il y ait rupture de la bicouche. En comparaison pour une bicouche suspendue classique, la rupture a lieu pour un potentiel de membrane compris entre 150 mV et 500 mV [100].

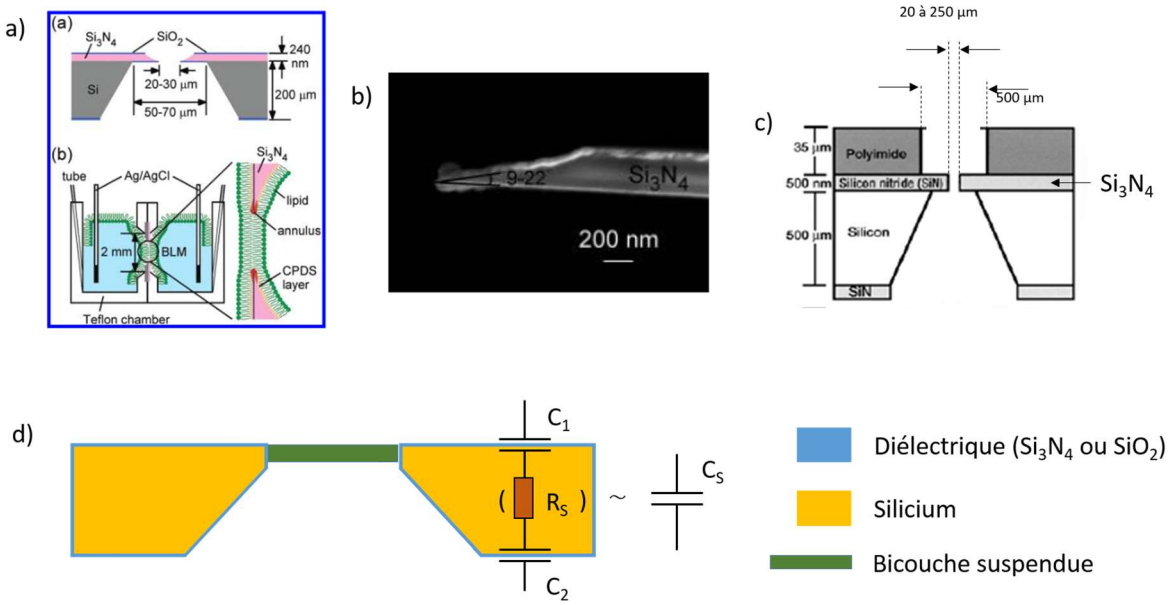


Figure 21 : a) schéma du dispositif d'Hirano-Iwata et al., tiré de [109]. b) image en microscopie électronique à balayage du pore micrométrique réalisé au sein de ce dispositif. c) schéma du dispositif de Peterman et al., tiré de [121]. d) schéma en coupe d'une bicouche formée sur un dispositif de silicium, montrant l'origine de la capacité C_S.

Dans les dispositifs présentés ci-dessus, une couche mince SiO_2 ou de Si_3N_4 est formée sur la totalité du substrat, afin de passiver les deux faces (Figure 21 d). Ces couches minces, obtenues par les procédés standards de fabrication du silicium, ont rarement une épaisseur de plus de quelques micromètres. Or, le silicium étant un matériau semi-conducteur, lorsque l'on immerge le substrat dans une solution saline, chaque couche diélectrique se trouve entre deux milieux conducteurs et se comporte donc comme une capacité. En appelant C_1 la capacité associée à la face avant et C_2 la capacité associée à la face arrière, la capacité totale du substrat C_S est donnée par la formule :

$$(2) \qquad C_S = \frac{C_1 C_2}{C_1 + C_2}$$

Si les couches diélectriques ont une même épaisseur, la capacité totale vaudra donc $C_{tot} = C_1/2$. La valeur de la capacité correspondante pour deux couches de SiO_2 ($\varepsilon_r = 3{,}9$) est donnée dans le Tableau 6, pour une surface de substrat entre les deux compartiments de mesure de 1 cm² et de 0,25 cm². NB : Pour un substrat de 1 cm de côté et de résistivité 1 000 Ω.cm (cas d'un substrat non dopé), la résistance R_S est inférieure à 100 Ω, et peut donc être négligée devant l'impédance associée à C_1 et C_2 (voir la discussion sur R_e dans le paragraphe 2.3.2). Dans le cas d'un substrat dopé, la résistivité est plus petite et donc la résistance encore plus faible.

Epaisseur de la couche de SiO_2 couvrant la face avant et la face arrière du substrat	Capacité C_S correspondante pour une surface de 1 cm²	Capacité C_S correspondante pour une surface de 0,25 cm²
500 nm	3,5 nF	860 pF
1 µm	1,7 nF	430 pF
10 µm	170 pF	43 pF

Tableau 6 : valeur de capacité C_S correspondant au cas où le substrat de silicium est entrouré d'une couche de SiO_2 (épaisseur identique entre le face avant et la face arrière) pour différentes épaisseur de cette couche et pour différentes surfaces de susbtrat inséré entre les deux compartiments. Nous avons pris comme permitivité relative $\varepsilon_r = 3,9$.

Les valeurs de capacités C_S sont donc élevées par rapport au cas où $C_S < 10$ pF lorsqu'une cloison de polymère est utilisée (voir Tableau 2, p. 41). Comme nous l'avons vu dans les paragraphes 2.3.2 et 2.3.3, ceci entraîne un bruit à hautes fréquences élevé (bruit diélectrique et bruit dû à l'amplificateur), ce qui nécessite de limiter la bande passante. Ainsi Hirano-Iwata et al. ont un dispositif dont la capacité C_S est d'environ 250 pF, et le niveau de bruit obtenu est de 0,6 pA RMS (correspondant à un seuil de détection de 3 pA) avec une bande passante de 1 kHz. Pour réduire la capacité de substrat, Peterman et al. utilisent un dépôt par « spin-coating » de polyimide (résine photosensible) de 35 µm d'épaisseur, qui permet d'augmenter l'épaisseur de diélectrique total et donc de réduire la capacité C_S. La partie centrale de la puce, comprenant les pores micrométriques, est dégagée en réalisant une photolithographie et le développement du polyimide, laissant un carré de cloison de Si_3N_4 de 500 µm de côté exempt de résine. Ils obtiennent une capacité C_S d'environ 45 pF, et un niveau de bruit de 2,3 pA RMS (i. e. seuil de détection de 11,5) avec une bande passante de 5 kHz. La capacité C_S pourrait être encore diminuée soit en réduisant la surface de Si_3N_4 non recouverte de polyimide, soit la surface de contact entre les compartiments de mesures et la puce de silicium (le diamètre des compartiments utilisés est de 5 mm), soit en réalisant un dépôt de diélectrique d'épaisseur plus importante que celui utilisé. L'approche consistant à déposer une résine pour réduire la capacité C_S présente plusieurs inconvénients : i) elle implique une étape supplémentaire de photolithographie. ii) La surface obtenue est moins inerte chimiquement qu'une surface de SiO_2 ou de Si_3N_4 : des traitements de nettoyage tels qu'un traitement plasma ne peuvent pas être effectués. iii) en fonction de la résine utilisée, il y a des risques de contamination organique du milieu expérimental. iv) le contact mécanique des compartiments de mesure avec la résine peut conduire à une délamination de la résine et à un vieillissement prématuré du dispositif.

Par rapport aux travaux d'Hirano-Iwata et al. et de Peterman et al., la durée de vie a pu encore être améliorée en réduisant le diamètre des pores utilisés pour former la bicouche suspendue : Han et al. [104] ont réalisé un dispositif de silicium comportant un réseau de nanopores de 200 nm à 800 nm de diamètre, réalisé dans un film de Si_3N_4 de 300 nm d'épaisseur (Figure 22 a). La surface est rendue hydrophobe par dépôt de (tridécafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl) trichlorosilane et (tridécafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl) diméthyl-chlorosilane. Les bicouches suspendues sont formées par la méthode de « painting » ou de Montal-Mueller (conditionnement préalable du substrat avec un mélange pentane/hexadécane). Une durée de vie moyenne de 3 à 6 jours a pu ainsi être obtenue, durée qui est plus longue lorsque les nanopores de 200 nm sont utilisés : par exemple, pour une bicouche formée de POPC, la durée de vie est de 3 jours pour les nanopores de 800 nm et de 4 jours pour les nanopores de 200 nm. La durée de vie observée dépend aussi de la nature des phospholipides : pour un nanopore de diamètre 200 nm, la durée de vie d'une bicouche formée avec

de la phosphatidylcholine extraite de soja est de 3 jours, alors qu'elle est de 4 jours pour une bicouche formée de POPC synthétique.

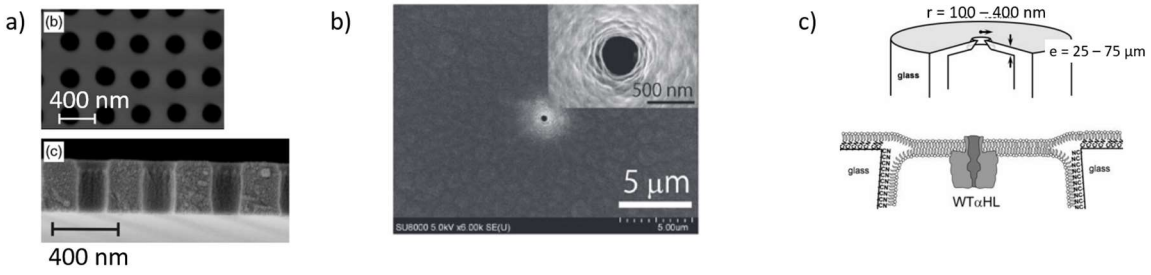


Figure 22 : a) image par microscopie électronique à balayage des nanopores du dispositif d'Han et al., tiré de [104]. b) image en microscopie électronique à balayage d'un nanopore fabriqué dans une couche de parylène, tiré de [122]. c) schéma montrant un nanopore formé dans un tube de verre, réalisé par White et al., tiré de [123].

Des nanopores destinés à l'obtention d'une bicouche suspendue ont aussi pu être réalisés dans une cloison de polymère : Kawano et al. [122] ont utilisé une cloison de parylène (poly(p-xylylène)), d'environ 10 µm d'épaisseur et qui comporte un pore de diamètre 500 nm dans sa zone la plus resserrée (Figure 22 b). Cette cloison est obtenue en réalisant un premier dépôt de parylène sur un substrat de silicium. Un pore de 5 µm de diamètre est obtenu par photolithographie et gravure par plasma, puis, après avoir retiré la cloison du substrat, le diamètre du pore est réduit au moyen d'un deuxième dépôt conforme de parylène. Cette cloison de parylène est insérée dans un dispositif intégré, qui permet de former la bicouche de manière automatique, et dont le principe sera décrit dans le paragraphe 2.3.6. La durée de vie obtenue est de 2 à 5 jours. L'avantage de cette approche, par rapport à l'utilisation d'une cloison de silicium, est qu'il n'y a pas besoin de réduire la capacité C_S *a posteriori* par un dépôt de résine, avec les inconvénients soulevés plus haut qui en résultent. Un inconvénient cependant de la fabrication de nanopores au sein d'une cloison de polymère, par rapport à la « filière silicium », est que la géométrie et le diamètre des pores sont moins bien contrôlés.

Enfin, une durée de vie de bicouche suspendue particulièrement longue a été obtenue par White et al. [123] au sein de tubes de verre (épaisseur 25 à 75 µm) comportant un pore de 200 à 800 nm de diamètre de diamètre, de forme conique (angle du cône : 20°) (Figure 22 c). Ce pore est obtenu en insérant un fil de platine taillé en pointe dans le tube de verre chauffé au préalable. Le platine est retiré par gravure électrochimique. Le verre est rendu hydrophobe par dépôt de 3-cyanopropyldiméthylchlorosilane. La bicouche est obtenue avec la méthode de « painting ». La durée de vie observée de la bicouche est de l'ordre de 2 semaines avec la possibilité de réaliser des enregistrements à l'échelle du canal unique pendant toute cette période. Cette durée de vie très longue est probablement due à une combinaison de plusieurs facteurs : la chimie de surface, le diamètre des pores, ainsi que leur forme conique. Cette approche n'est cependant pas adaptée à la réalisation de dispositif intégrés et parallélisés pour des applications telles que le criblage de molécules pharmaceutiques. En outre, la méthode de fabrication du pore est manuelle et ne se prête donc pas à une automatisation du procédé de fabrication.

En conclusion, nous avons vu que les bicouches suspendues « classiques » présentaient une durée de vie relativement courte, de l'ordre de quelques heures, ce qui pose un problème pratique pour l'étude

des canaux ioniques dans ces bicouches biomimétiques. Cette durée de vie a pu être augmentée en remplaçant la cloison de polymère par un substrat de silicium comprenant des pores micrométrique de géométrie et de diamètre contrôlé. Ces pores sont réalisés dans une couche mince de SiO_2 ou de Si_3N_4 déposé sur la face avant du substrat. La face arrière est gravée pour que les pores soient rendus accessibles des deux côtés, et le dispositif est inséré entre deux compartiments de mesure. Utilisant des pores de profil en biseau, Hirano-Iwata et al. ont ainsi pu former avec la méthode de Montal-Mueller une bicouche exempte de solvant et stable pendant un à deux jours. Han et al. ont obtenu des bicouches suspendues d'une durée de vie de 3 à 6 jours en utilisant des nanopores cylindriques de 200 nm et de 800 nm de diamètre. Un inconvénient de l'utilisation de substrat de silicium est la capacité C_S importante qui résulte du caractère semi-conducteur du silicium, et du fait que les films minces déposés sur le substrat sont relativement fins, de l'ordre de quelques micromètres. Cette capacité peut être réduite en réalisant un dépôt de résine photosensible, les pores étant ensuite dégagés par photolithographie et développement. Cette approche permet de réduire la capacité C_S et donc le niveau de bruit à haute fréquence. Cependant, elle confère au dispositif une certaine fragilité mécanique et chimique et un risque potentiel de contamination organique. Des nanopores ont aussi pu être réalisés dans une cloison de polymère, avec une durée de vie de la bicouche suspendue de 2 à 5 jours. Cette approche est de moindre coût par rapport à des nanopores fabriqués dans un dispositif de silicium, et ne nécessite pas de passivation *a posteriori* par dépôt de résine, mais offre un contrôle limité de la géométrie du pore. Enfin, une durée de vie particulièrement longue a pu être obtenue dans le cas où un tube de verre est utilisé comme cloison, dans lequel un pore nanométrique conique est réalisé. Cependant, cette approche ne se prête pas à la réalisation d'un dispositif intégré, et la méthode de fabrication du nanopore est manuelle.

2.3.5. Dispositifs permettant la caractérisation simultanée par microscopie optique à haute résolution

Les dispositifs présentés jusqu'à présent sont généralement insérés entre deux compartiments, au sein d'une cellule uniquement conçue pour les enregistrements électriques. Afin de pouvoir mener simultanément une caractérisation optique, certaines équipes ont réalisé des dispositifs permettant de former la bicouche horizontalement à proximité d'une lamelle de microscope, de telle manière que la distance entre la bicouche et l'objectif du microscope soit de l'ordre de 100 µm : cette distance de travail permet en effet d'utiliser des objectifs à forte ouverture numérique, nécessaires par exemple pour l'imagerie de super-résolution ou l'imagerie de fluorophore unique.

Ide et al. [124] ont ainsi réalisé le dispositif représenté sur la Figure 23 a) et b) : le compartiment du haut est constitué d'un tube de verre dont le bas est scellé par une feuille de polypropylène. Cette feuille est percée d'un pore micrométrique d'un diamètre de l'ordre de 200 µm. La feuille de polypropylène est posée sur une lamelle de microscope sur laquelle un gel d'agarose a été déposé au préalable. La lamelle est scellée à un cristallisoir qui définit le compartiment du bas. L'agarose, gel conducteur ionique, permet un accès électrique à la face inférieure de la bicouche tout en maintenant celle-ci à une distance de travail de 100 µm par rapport à l'objectif du microscope. La bicouche est ainsi formée dans le pore micrométrique par la méthode de « painting » et repose sur le gel d'agarose. Il s'agit donc d'une bicouche hybride suspendue / sur coussin de polymère.

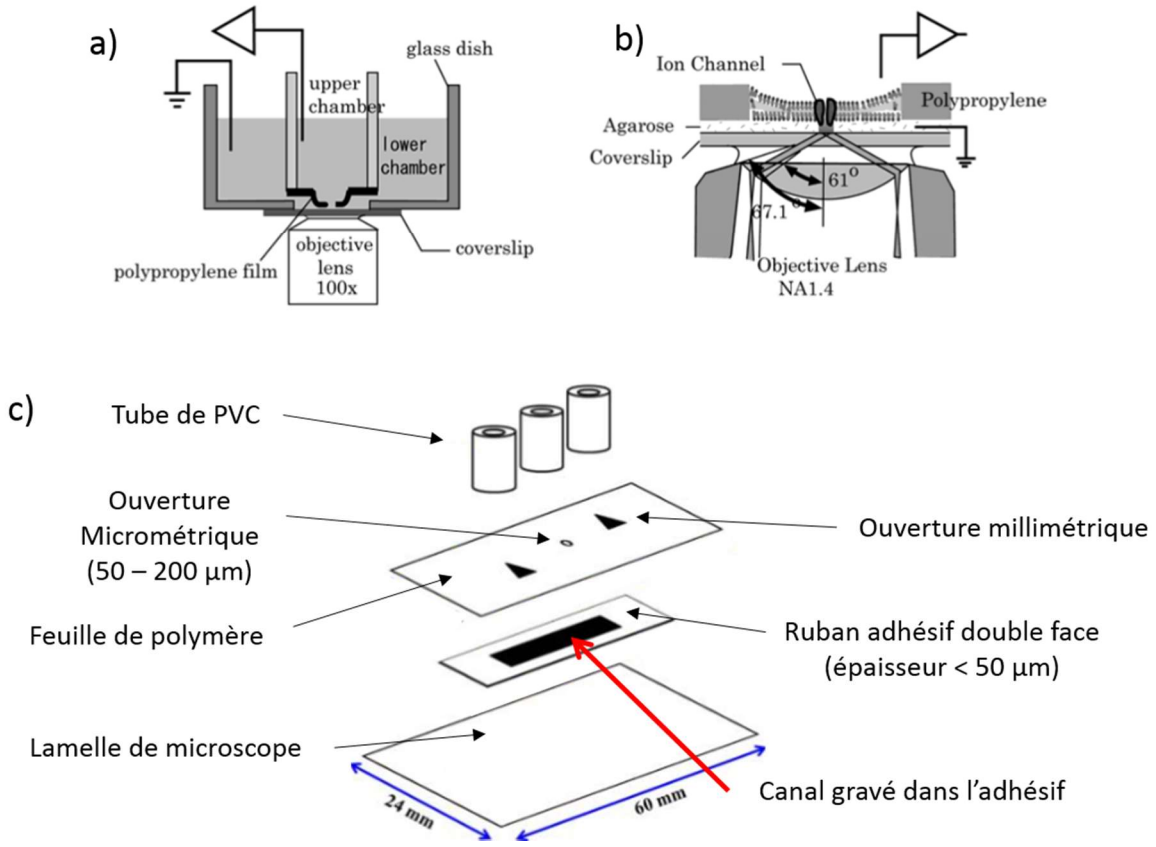


Figure 23 : a) et b) schéma en coupe du dispositif d'Ide et al., tiré de [124]. c) schéma du dispositif de Rajapaksha et al., tiré de [125].

Plus récemment, Honigmann et al. [126], ainsi que Rajapaksha et al. [125] ont développé des dispositifs permettant de s'affranchir du soutien de la bicouche par le gel d'agarose : l'élément clef utilisé est un ruban adhésif double faces d'épaisseur inférieure à 50 µm, dans lequel est gravé un canal (le dispositif de Rajapaksha et al. est représenté Figure 23 c). Ce ruban permet de séparer de la lamelle une feuille de polymère (par exemple PTFE) comprenant un pore micrométrique. De cette manière, une bicouche suspendue peut être formée sur le pore à une distance de l'ordre de 100 µm de l'objectif, et est accessible électriquement des deux côtés et de manière indépendante.

Ces dispositifs, conçus pour des observations en microscopie à haute résolution, permettent par exemple de visualiser le changement de conformation d'un canal ionique par microscopie utilisant le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET), et d'enregistrer simultanément le courant à l'échelle du canal unique, ce qui permet par exemple de montrer que plusieurs conformations différentes sont associées à un seul niveau de conductance [127]. La caractérisation optique de la bicouche suspendue peut aussi être réalisée au sein de tels dispositifs : Honigmann et al. [126] ont par exemple pu imager a séparation en différentes phases d'une bicouche suspendue constituée d'un mélange de phospholipides. Par rapport au dispositif de Ide et al., le dispositif d'Honigmann et al. ou de Rajapaksha et al. permet des conditions où la bicouche et les canaux ioniques sont exempts de toute interaction avec un support.

2.3.6. Utilisation de dispositifs comprenant une interface fluidique

Contrairement au « patch-clamp » automatique présenté dans le paragraphe 1.6, les dispositifs *in vitro* dont nous avons parlé jusqu'à présent ne sont pas prévu pour mener des études de criblage sur les canaux ioniques : d'une part, parce que la mise en place des électrodes, le remplissage des compartiments de mesure avec les solutions salines, la formation de la bicouche, l'insertion des canaux ioniques et le lancement de l'acquisition sont fait manuellement, ce qui limite le nombre d'expérience que peut mener en parallèle un expérimentateur. D'autre part, le contenu des compartiments ne peut pas être changé au cours de l'expérience, ce qui empêche de tester de manière séquentielle l'influence de diverses molécules sur un canal ionique.

Afin de dépasser ces limitations, différents systèmes microfluidiques ont été développés pour automatiser et paralléliser la caractérisation électrique des canaux ioniques au sein de bicouches biomimétiques. Nous décrirons dans ce paragraphe trois différentes approches : **i)** l'intégration d'une puce de silicium permettant de former une bicouche suspendue. **ii)** l'intégration d'une cloison de polymère permettant de former une bicouche suspendue. **iii)** la réalisation d'une bicouche lipidique par contact entre deux microgouttes au sein d'un dispositif microfluidique fait de polymère.

2.3.6.1. <u>Bicouches suspendues, dispositifs « silicium » et dispositifs « polymère »</u>

Suzuki et al. [128] ont développé une puce intégrée silicium/verre, représentée sur la Figure 24 a) : des pores micrométriques sont fabriqué dans la puce de silicium, ainsi que des électrodes et des canaux (largeur 500 µm, hauteur 100 µm) de part et d'autre du substrat, permettant d'adresser ces pores. Les pores sont carrés (150 µm de côté) et ont un profil en biseau, comme le montre le schéma en coupe de la Figure 24 a).

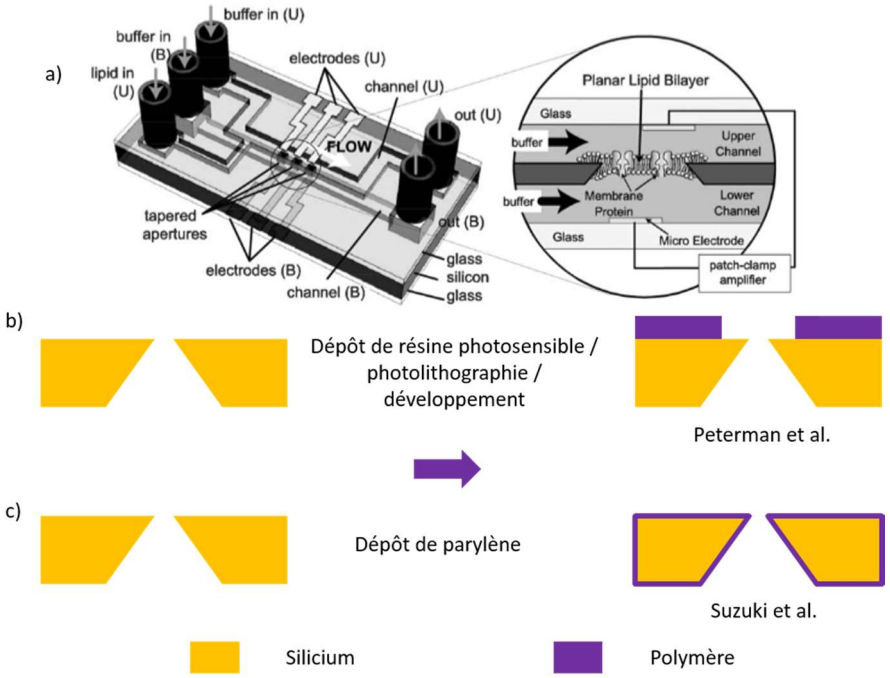


Figure 24 : a) schéma du dispositif de Suzuki et al., tiré de [128]. b) et c) comparaison entre deux approches pour réduire la capacité C_S associée à un substrat de silicium.

Ce profil est obtenu par une gravure anisotrope du silicium avec une solution de TMAH. Un dépôt de parylène de 5 µm d'épaisseur est ensuite réalisé sur les deux côtés de la puce de silicium afin de rendre la surface et les parois du pore hydrophobe, et de réduire le niveau de bruit des mesures en réduisant la capacité C_s (voir paragraphe 2.3.3). La puce de silicium est ensuite scellée entre deux lames de verre contenant des électrodes ainsi que des entrées et sorties pour les fluides. Ce dispositif permet de former une bicouche de manière semi-automatique, en remplissant le canal du bas par une solution saline, et en faisant passer dans le canal du haut, successivement, un mélange phospholipide / solvant (phosphatidylcholine extraite de soja / n-décane), puis de l'air, puis une solution saline. L'interfaçage microfluidique de ce dispositif permet ainsi de former la bicouche de manière automatique. Par ailleurs, le système étant fermé, il n'y a pas d'évaporation de l'eau des solutions salines utilisées, ce qui permet d'envisager l'acquisition sur de longues durées, sans qu'il y ait de fluctuations dans la concentration des solutions salines. Nous discuterons des aspects liés au bruit un peu plus loin dans ce paragraphe lorsque nous comparerons « l'approche silicium » et « l'approche polymère » pour l'a réalisation de dispositifs intégrés comprenant une bicouche suspendue. NB : nous avons vu dans le paragraphe 2.3.4 que la valeur de la capacité C_S pouvait être diminuée dans le cas de substrats de silicium par le recouvrement partiel du substrat avec un dépôt de résine photosensible suivit d'une photolithographie/développement pour dégager les pores (Figure 24 b). Nous pouvons ici noter que l'utilisation d'un dépôt de parylène est une autre possibilité pour réduire la valeur de C_S. Une différence importante est que le parylène n'est pas retiré au niveau des pores micrométriques (Figure 24 c). Celui-ci est déposé de manière conforme (le dépôt étant réalisé par phase vapeur) sur l'ensemble de la puce, y compris sur les parois des pores. Cette technique entraîne donc une modification de la géométrie et de la chimie de surface des pores.

Des dispositifs utilisant des matériaux polymères pour la cloison et pour son intégration ont aussi été développés [87,122,129–131]. La Figure 25 a) montre par exemple le dispositif de Suzuki et al. [129], usiné mécaniquement dans du PMMA. Celui-ci comprend un pore micrométrique (diamètre 100 µm) reliant un canal (en-dessous) et une chambre (au-dessus). Le canal est scellé par une lamelle de verre, ce qui permet une caractérisation optique, par le dessous, de la formation de la bicouche suspendue. La bicouche est formée de la manière suivante : la chambre est d'abord remplie de solution saline. La solution s'arrête au niveau du pore à cause de l'hydrophobicité de ses parois. Une solution phosholipide (asolectine) / n-décane est ensuite introduite dans le canal puis retirée à l'aide d'un coton. Cette procédure a pour effet de piéger une goutte de solution phospholipide / solvant dans le pore. Une solution saline est alors à nouveau introduite dans le canal. Lorsqu'une pression hydrostatique est appliquée (en remplissant la chambre à un niveau suffisant), la goutte de solution phospholipide / solvant s'amincit jusqu'à l'obtention d'une bicouche lipidique. La pression hydrostatique peut aussi être remplacée par une pression d'air en utilisant un dispositif similaire où la chambre est connectée à un régulateur de pression [132].

Ainsi, nous pouvons noter que la formation de la bicouche n'est pas aussi spontanée que dans le cas du dispositif de silicium mentionné plus haut, résultat qui peut être dû à la géométrie ou la chimie de surface différente du pore. Un résultat similaire a été obtenu par Zagnoni et al. [87] au sein d'un dispositif de polymère où la cloison est réalisée en PMMA ou en PTFE (épaisseur 50 µm), et le pore, de diamètre de 100 µm, est usiné mécaniquement ou par gravure laser : pour former la bicouche, il est nécessaire d'appliquer la procédure suivante : dans un premier temps, le dispositif est totalement rempli de solution saline (la chambre qui adresse le dessus de la cloison et le canal qui en adresse le dessous). La chambre est ensuite vidée. Une goutte de solution phospholipide / solvant (POPE / POPG

/ n-décane) est apposée sur le pore, et la chambre remplie à nouveau de solution saline. Cette procédure a pour effet de piéger une goutte de solution phospholipide / solvant dans le pore. Pour que cette goutte se transforme en bicouche, il faut alors vider à nouveau la chambre afin d'exposer à l'air le pore. L'exposition de la goutte à l'air a pour effet d'amorcer un processus d'amincissement de la goutte. Enfin la chambre est remplie à nouveau de solution saline, le processus d'amincissement s'achevant alors par l'obtention d'une bicouche suspendue. Un tel protocole de formation de la bicouche est relativement complexe, et ne se prête pas bien à une automatisation.

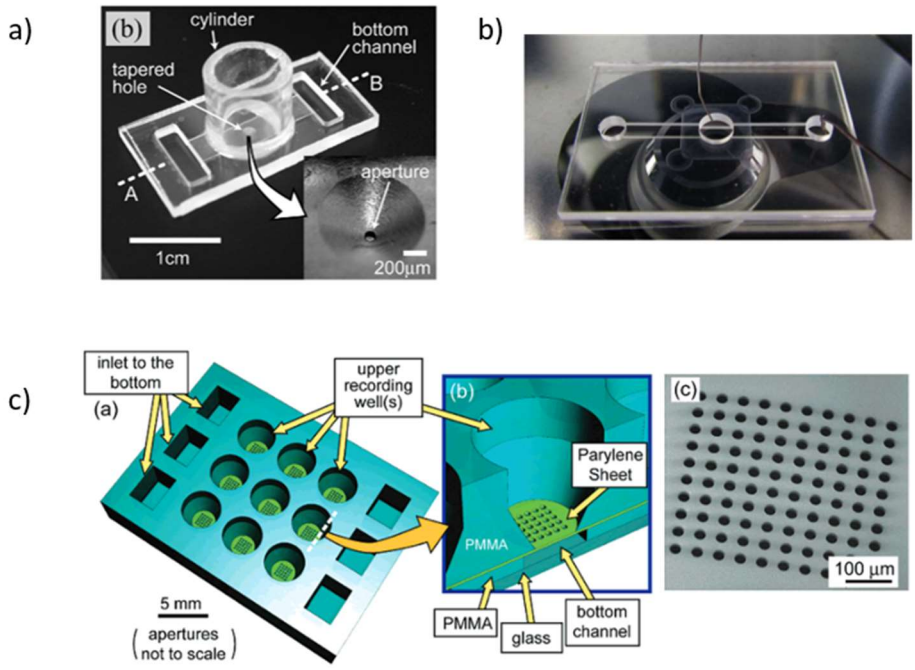


Figure 25 : a) photographie du dispositif de Susuki et al., tiré de [129]. B) photographie du dispositif de Wang et al., tiré de [131]. C) schéma du dispositif de Le Pioufle et al., et image en microscopie électronique à balayage d'un réseau de pores micrométriques fabriqués dans une cloison de parylène, intégrée dans ce dispositif. Tiré de [130].

La procédure de formation de la bicouche suspendue a pu être simplifiée en utilisant pour la cloison une fine feuille de parylène (épaisseur 10 – 20 µm), celle-ci étant insérée entre deux pièces de PMMA usinées [130,131]. La Figure 25 b) montre le dispositif de Wang et al. [131]. Celui-ci contient une cloison de parylène de 10 µm d'épaisseur comportant des pores (20 à 100 µm de diamètre) fabriqués par gravure ionique réactive du parylène (plasma à oxygène, masque d'aluminium). La cloison de parylène est insérée entre une pièce supérieure de PMMA qui comprend une chambre, et une pièce inférieure qui comprend un canal, le canal étant scellé en dessous par une lamelle de microscope. La procédure de formation de la bicouche est ainsi simplifiée par rapport au dispositif de Suzuki et al. : celle-ci est formée en remplissant dans un premier temps la chambre avec une solution saline, puis en en insérant à l'entrée du canal une solution de phospholipides (DPhPC) dans du n-décane, puis une solution saline. La formation de la bicouche est dans ce cas spontanée et ne requiert pas d'appliquer une pression hydrostatique au niveau de la chambre. La finesse de la cloison de parylène est un élément important permettant une formation spontanée de la bicouche. La durée de vie de la bicouche formée est de l'ordre d'une heure. Une version parallélisée de ce dispositif a été développée, permettant de mener des mesures simultanément en parallèle (Figure 25 c, [130]). Notons que l'utilisation d'une chambre pour adresser un des côtés de la bicouche offre moins de flexibilité que lorsque les deux côtés de la

bicouche sont adressés par un canal (Figure 24 a), configuration qui permet de changer la composition chimique des deux compartiments en cours d'expérience.

Un nanopore a aussi pu être utilisé pour former une bicouche suspendue au sein d'un dispositif similaire [122]. Nous avons déjà mentionné ce dispositif dans le paragraphe 2.3.4 (voir Figure 22 b, p. 54). Le nanopore est formé dans une cloison de parylène d'environ 10 µm d'épaisseur, monté entre deux pièces de PMMA usinées. Le nanopore est adressé par deux canaux microfluidiques, placés de part et d'autre de la cloison de parylène. La bicouche y est formée en utilisant un protocole similaire : les canaux sont d'abord remplis de solution saline. Puis une solution de phospholipide solvant (DPhPC / n-décane) est insérée dans l'un des canaux, et enfin à nouveau une solution saline. La durée de vie de la bicouche formée est de 2 à 5 jours en utilisant cette approche.

2.3.6.2. Comparaison des deux approches (« silicium »/« polymère ») en termes de propriétés électriques

Nous avons vu dans les paragraphes 2.3.2 et 2.3.3 qu'il est important d'avoir une petite valeur (par exemple ≤ 5 pF) de capacité C_S pour obtenir des enregistrements avec un faible niveau de bruit, à cause, d'une part, de la tension de bruit à l'entrée de l'amplificateur e_n, qui produit un courant de bruit circulant dans cette capacité (ainsi que dans la capacité C_b et C_e qu'il est important de réduire aussi) et du bruit diélectrique qui est proportionnel à C_S. Comme nous allons le voir, lorsqu'un substrat de silicium est utilisé pour la cloison, l'obtention d'une petite valeur de C_S impose des contraintes sur l'interfaçage fluidique qui ne sont pas présentes lorsqu'une cloison de polymère est utilisée.

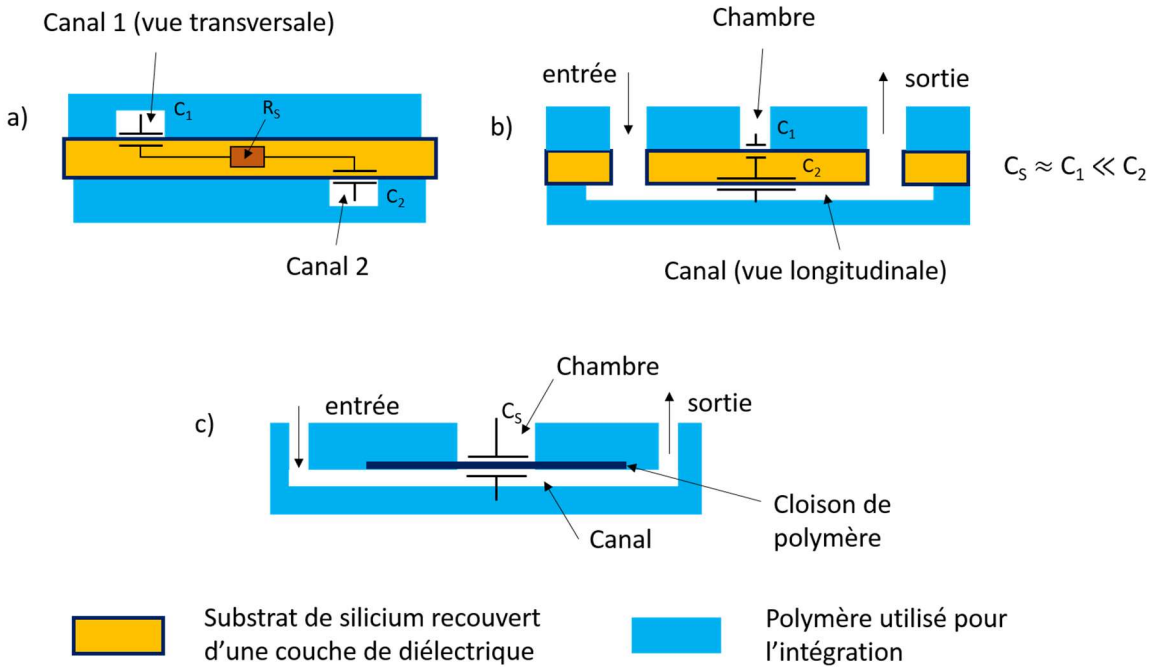


Figure 26 : a) schéma montrant le couplage capacitif entre les deux compartiments de mesure pour le cas d'un substrat de silicium. b) réduction de C_S pour un substrat de silicium en utilisant pour l'un des compartiments une chambre de diamètre réduit. c) couplage capacitif entre les deux compartiments de mesure pour le cas d'une cloison de polymère.

La Figure 26 a) schématise, pour le cas d'un substrat de silicium, le couplage capacitif C_S existant entre des canaux microfluidiques se trouvant de part et d'autre du substrat. Comme nous l'avons vu dans le

paragraphe 2.3.4, Figure 21, p. 52, dans le cas d'un substrat de silicium, C_S résulte de la mise en série de deux capacités C_1 et C_2 associées à chaque double-interface solution saline / diélectrique / semi-conducteur. Il en résulte que le couplage capacitif existe même si les canaux sont éloignés l'un de l'autre, via la résistance du substrat R_S. Si chaque face comporte un canal avec une entrée et une sortie microfluidique, la surface (que l'on appelle A_1 pour la face 1 du substrat et A_2 pour la face 2) de solution saline en contact avec le substrat sera importante, de l'ordre de 10-20 mm². Une couche de diélectrique relativement épaisse sera alors nécessaire pour obtenir une capacité C_S compatible avec des enregistrements à faible bruit (i. e. $C_S \leq 5$ pF, voir paragraphe 2.3.3). En considérant le cas du dispositif de Suzuki et al. (Figure 24 a), il faudrait par exemple, pour avoir $C_S = 5$ pF, en supposant que $A_1 = A_2 = 20$ mm², une épaisseur de parylène ($\varepsilon_0 \approx 3$) de 53 µm pour avoir $C_1 = C_2 = 10$ pF, et donc $C_S = 5$ pF. Une telle épaisseur modifierait la géométrie des canaux microfluidiques et des pores micrométriques utilisés pour former la bicouche de manière significative, et nécessiterait de redimensionner le dispositif. Une autre stratégie pour réduire C_S est d'utiliser une chambre pour adresser un des côtés de la bicouche suspendue (Figure 26 b). Si cette chambre a une petite surface de contact avec le substrat, par exemple de 1 mm², une capacité C_S de 5 pF pourra être obtenue avec un dépôt de parylène de 5 µm d'épaisseur. En effet, C_1 et C_2 étant en série, C_S est dominé par la plus petite capacité (équation (2), p. 52), qui est ici C_1.

La situation est différente dans le cas où une cloison de polymère est utilisée : celle-ci étant isolante, le couplage capacitif se fait uniquement entre les solutions salines se trouvant de part et d'autre de la cloison (Figure 26 c). La surface du condensateur fictif C_S correspond alors à la surface de « l'intersection » (en vue de dessus), *via* la cloison, entre le compartiment de la face supérieure et le compartiment de la face inférieure du dispositif. Il s'ensuit une flexibilité plus grande pour l'interfaçage fluidique par rapport au cas où un substrat de silicium est utilisé, et la possibilité d'utiliser une cloison de relativement faible épaisseur par rapport au cas des bicouches suspendues « classiques » : C_S pourra en effet être maintenue à une valeur faible en utilisant par exemple un canal microfluidique sur chacune des faces, placés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre, configuration qui résulte en une petite surface « d'intersection ». Si besoin, il est possible de diminuer encore C_S en réduisant la largeur de l'un des canaux au niveau de « l'intersection ». Dans le cas où l'une des faces est adressée par une chambre et non un canal, la chambre pourra être de diamètre plus important par rapport au cas du substrat de silicium mentionné ci-dessus, car la surface de « l'intersection » pourra être limitée en réduisant la largeur du canal se trouvant de l'autre côté de la cloison. Ainsi, le dispositif de Le Pioufle et al. [130] permet de mener des enregistrements avec un niveau de bruit d'environ 0,17 pA RMS (estimé en divisant par 6 la valeur crête à crête lue sur les courbes) à 1 kHz, correspondant à un seuil de détection de 0,9 pA.

2.3.6.3. Insertion et étude pharmacologique de canaux ioniques

La majorité des études mentionnées dans ce paragraphe ont été réalisées avec des canaux ioniques solubles dans l'eau, et s'insérant spontanément dans les bicouches suspendues, telles que la gramicidine [130], l'alaméthicine [129,130], le canal bactérien OprM [131] ou encore l'α-hémolysine [122,129]. Zagnoni et al. [87] ont cependant utilisés des canaux ioniques (bactériens KcsA produits par synthèse cellulaire) reconstitués au sein de protéoliposomes. La fusion des liposomes avec la bicouche est réalisée en appliquant un gradient de concentration ionique de part et d'autre de la bicouche suspendue, en agitant le contenu de la chambre où sont insérés les protéoliposomes (par retrait et réinsertion d'une petite quantité de volume de la chambre), et en en ajoutant le couple

Nystatine/ergostérol dans la bicouche des protéoliposomes afin de promouvoir la fusion, technique que nous avons mentionné dans le paragraphe 2.3.1, p. 39, iii). Des courbes doses-réponse de l'action du tétraméthylammonium sur le canal KcsA ont pu être obtenues grâce à l'utilisation d'un dispositif permettant de faire circuler un fluide dans un canal se trouvant au-dessous de la bicouche [133]. La cloison de ce dispositif est constituée d'une couche de résine photosensible (TMMF) dans laquelle un pore de 20 à 100 µm de diamètre est défini par photolithographie. La cloison est rendue hydrophobe avec un traitement par plasma (CF_4/O_2). Notons que cette cloison permet d'obtenir une bicouche suspendue (DPhPC/décane) particulièrement stable : en l'absence de flux dans le canal, la durée de vie est d'environ 10 jours, et de quelques heures lorsqu'un flux de 0,4 à 0,5 µL / min est appliqué.

2.3.6.4. Bicouches formées par contact entre deux gouttes ou microgouttes de solution saline immergées dans une solution organique

Récemment, des systèmes fluidiques ont été développés dans lesquels une bicouche est obtenue par contact entre deux gouttes ou microgouttes [134], [62] : la Figure 27 a et b) montre un dispositif développé par Funakoshi et al. [134]. Une goutte de solution saline est introduite dans une chambre (4 mm de diamètre, 2 mm de profondeur, usinée dans du PMMA) remplie de solution phospholipide / solvant organique (DPhPC / n-décane) (Figure 27 a).

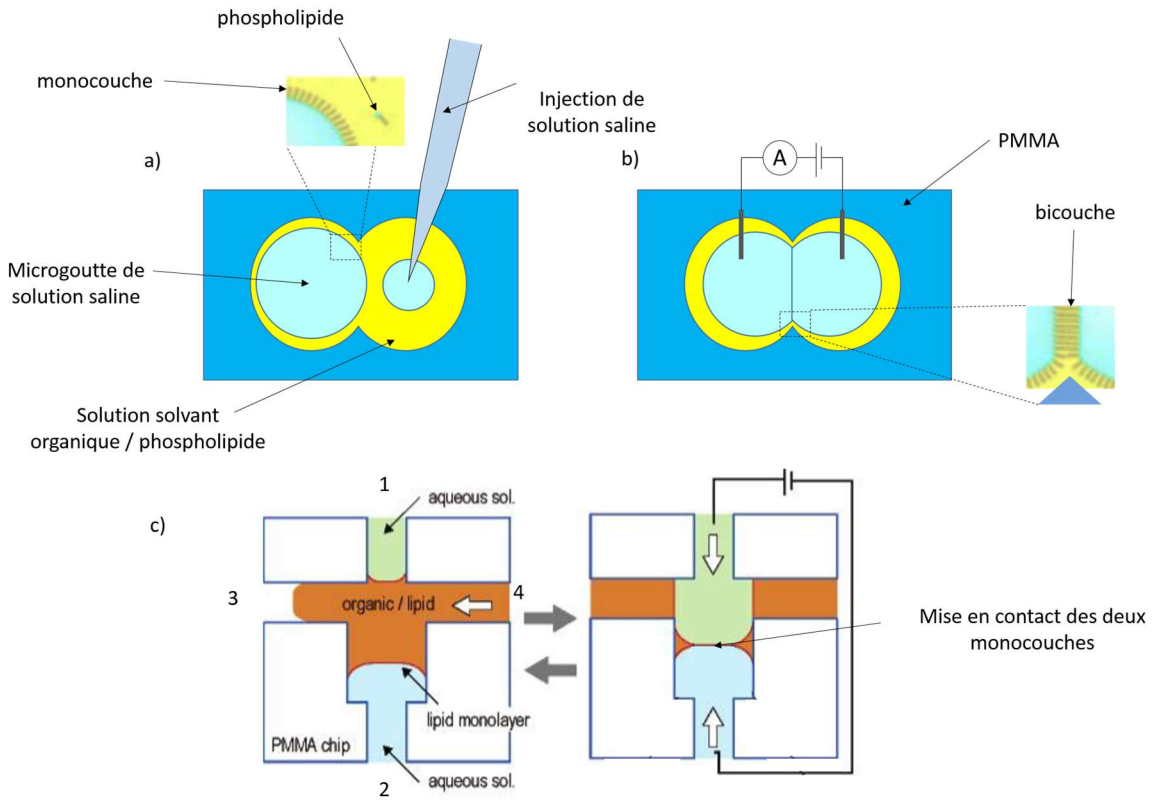


Figure 27 : a, b) schéma montrant un protocole de formation d'une bicouche par contact entre deux gouttes de solution saline immergées dans un volume de solution organique, pour le cas où les gouttes sont confinées par des chambres. c) schéma montrant un protocole de formation de la bicouche suspendue pour le cas où un dispositif microfluidique est utilisé, tiré de [134].

A l'interface entre la solution saline et la solution organique se forme une monocouche de phospholipides. Une deuxième goutte est introduite dans une chambre adjacente. La forme des chambres est conçue pour que les gouttes soient confinées et entrent en contact après leur formation (Figure 27 b). L'activité de canaux ioniques peut ensuite être enregistrée en insérant des électrodes et en injectant dans une des microgouttes des canaux ioniques solubles dans l'eau ou des protéoliposomes. Le confinement et la mise en contact des deux microgouttes peut aussi être fait par le biais d'un système microfluidique, comme le montre par exemple la Figure 27 c) [134] : deux volumes de solution aqueuse sont introduits dans les canaux 1 et 2. La solution phospholipide / solvant organique est introduite dans le canal 4 et est poussée vers le canal 3 pour remplir l'espace entre les canaux 1 et 2. Les microgouttes sont alors mises en contact en augmentant la pression dans les canaux 1 et 2. L'avantage de cette approche par rapport à l'intégration dans un dispositif microfluidique d'une bicouche suspendue est la reproductibilité d'obtention, la stabilité et la durée de vie de la bicouche ainsi formée : une durée de vie de quelques jours à quelques semaines est couramment obtenue [62].

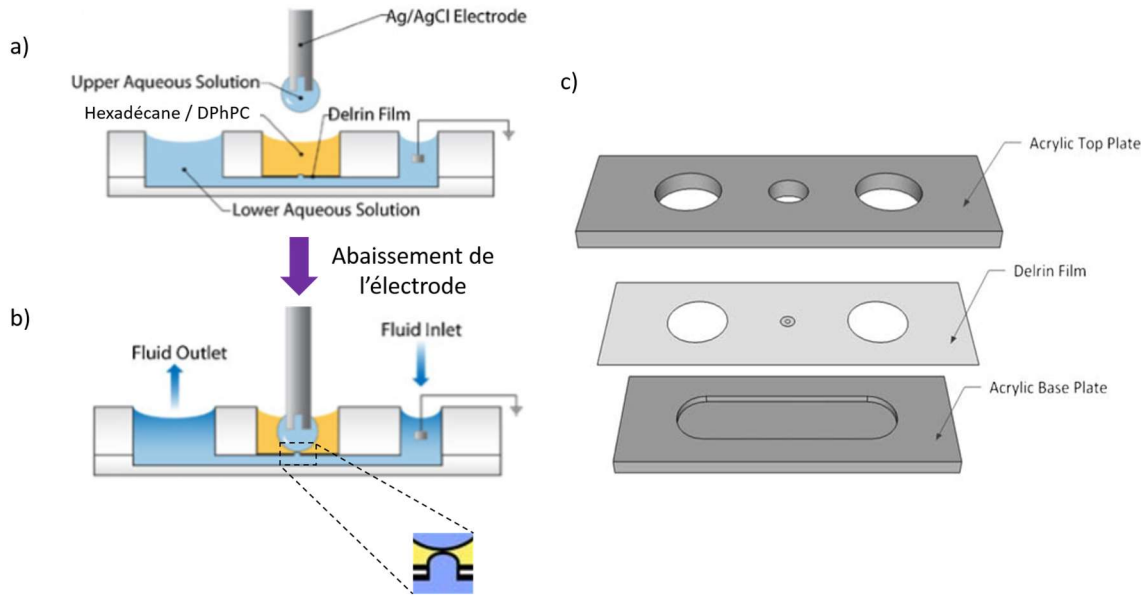


Figure 28 : schéma du dispositif de Portonovo et al., adapté d'après [135,136]. a) avant immersion de la microgoutte. b) après immersion de la microgoutte et formation de la bicouche. c) vue éclatée du dispositif.

Portonovo et al. [136] ont réalisé un dispositif utilisant cette approche, et permettant de changer le contenu d'un des compartiments au cours de l'expérience (Figure 28 a, b et c). Ce dispositif a été utilisé pour obtenir des courbes dose-réponse de modulateurs de l'activité des canaux humains hERG et TRPV1 [135,137]. Il comporte un socle en acrylique dans lequel un canal est usiné (Figure 28 c). Une cloison de Delrin® (épaisseur 75 µm) percée d'un pore (50 µm à 200 µm) sépare ce canal d'une chambre placée au-dessus. La bicouche est formée de la manière suivante (Figure 28 a) : le canal est d'abord rempli de solution saline, et la chambre remplie d'une solution phospholipide / solvant organique (DPhPC / hexadécane). Une goutte de solution saline (1 - 2 µL) est formée sur une électrode en plongeant au préalable celle-ci dans un volume de solution saline. L'électrode est ensuite immergée dans la solution organique. Un temps d'attente est nécessaire (environ 30 min) pour qu'une monocouche de phospholipides se forme autour de la microgoutte [137], puis l'électrode est abaissée jusqu'à ce qu'il y ait contact entre les deux monocouches (Figure 28 b). La présence du pore micrométrique permet de confiner les interfaces solution saline / solution organique, ce qui rend la bicouche obtenue relativement stable et immobile vis-à-vis d'une variation de pression entre les deux

compartiments. Le contenu du compartiment du bas peut alors être modifié en appliquant un gradient de pression aux bornes du canal. Les canaux hERG et TRPV1 sont obtenus par synthèse cellulaire, et sont insérés dans la bicouche par le biais d'une suspension de vésicules extraites de cellules lysées exprimant le canal ionique d'intérêt. Cette suspension est soit introduite dans le canal du bas, soit utilisée pour former la microgoutte. Les mesures peuvent être effectuées soit sur une population de canaux ioniques, soit sur un canal unique, en ajustant la concentration de la suspension utilisée.

En termes de bruit, les bicouches formées par contact entre deux microgouttes n'ont pas encore été optimisées : les bicouches obtenues au sein d'un dispositif sans pore micrométrique ont une capacité C_b relativement élevée, par exemple 130 pF dans le cas du dispositif de la Figure 27 c). Le niveau de bruit n'est pas caractérisé dans la référence [134], mais on peut donc s'attendre dans ce cas à un niveau de bruit comparable à celui des bicouches suspendues « classiques ». Lorsqu'un pore micrométrique est utilisé (Figure 28), la surface de la bicouche est restreinte à une valeur largement inférieure à celle du pore micrométrique. Cependant, les valeurs de capacité C_b obtenues ne sont pas indiquées avec précision en fonction des conditions expérimentales (notamment le diamètre du pore) dans les références [135–137], et la reproductibilité dans la valeur de la capacité obtenue n'est pas discutée. Par ailleurs, le dispositif présente une capacité C_e de 30 à 40 pF, valeur qui n'est pas optimisée par rapport par exemple au dispositif port-a-patch® (C_e = 4 pF) présenté dans le paragraphe 2.3.3

2.3.6.5. Conclusion

En conclusion, nous avons vu que les bicouches suspendues « classiques » présentaient comme limite le fait que la formation de la bicouche est manuelle, et ne peut donc pas être automatisée pour des applications telle que le criblage à haut débit sur les canaux ioniques de molécules pharmaceutiques. Pour répondre à cette limitation, des dispositifs comportant une interface fluidique ont été développés, permettant de former une bicouche biomimétique uniquement par des opérations d'injection de différentes solutions dans le dispositif, opérations qui peuvent être automatisées. Deux approches ont été développées, des bicouches suspendues à une cloison intégrée dans le dispositif, et des bicouches formées par contact entre deux volumes de solution aqueuses séparés par une solution organique. Des courbes doses-réponse de modulateurs de l'activité de canaux ioniques ont pu être obtenues pour des canaux humains et bactériens, préalablement reconstitués au sein de protéoliposomes ou de vésicules extraites de lysats cellulaires, et insérés dans la bicouche suspendue ou formée par contact entre deux gouttes.

2.3.7. Bilan, conclusion sur les dispositifs permettant d'obtenir une bicouche suspendue en utilisant un solvant organique

Nous avons présenté dans ce paragraphe différentes approches permettant de former une bicouche suspendue (ou par contact entre deux monocouches) en utilisant un solvant organique dans le protocole de formation de la bicouche. Les premiers systèmes, où sont formées des bicouches que l'on appelle bicouches suspendues « classiques », sont obtenues manuellement par la méthode de « painting » ou de Montal-Mueller sur une cloison de polymère montée entre deux compartiments. Ces bicouches suspendues présentent un niveau de bruit élevé, une durée de vie limitée à quelques heures, et leur opération n'est pas automatisée.

Nous avons vu que le niveau de bruit pouvait être diminué en optimisant la géométrie du dispositif, les matériaux utilisés, et la connectique, de manière à minimiser l'influence des différentes sources de bruit sur le courant mesuré i. En particulier nous avons vu que la miniaturisation du dispositif et du pore sur lequel est formé la bicouche, l'utilisation d'une cloison épaisse de diélectrique comportant un pore conique, ainsi que l'intégration de l'amplificateur sur le même substrat que le dispositif permettent de réduire le bruit de manière significative. Nous avons vu par ailleurs que la stabilité de la bicouche pouvait être améliorée en optimisant le diamètre du pore, sa géométrie et sa chimie de surface. Cette optimisation peut être faite par l'utilisation de substrats de substrats de silicium, qui permettent de contrôler dans une certaine mesure ces différents paramètres. Nous avons aussi présenté des dispositifs permettant de former la bicouche suspendue à l'horizontal, de sorte qu'il est possible d'utiliser des techniques de caractérisation optique nécessitant un objectif à forte ouverture numérique. Enfin, nous avons vu comment des dispositifs comprenant une interface fluidique permettent de former la bicouche de manière automatique, et de réaliser des courbes doses-réponse de modulateurs de l'activité de canaux ioniques.

Dans tous ces systèmes, l'insertion des canaux ioniques reste une étape critique, comme nous l'avons vu dans le paragraphe 2.3.1 : l'utilisation d'un solvant organique pour former la bicouche empêche d'intégrer les canaux ioniques au moment de la formation de la bicouche. Les canaux ioniques sont insérés ultérieurement en faisant fusionner avec la bicouche des protéoliposomes ou des vésicules provenant de lysats cellulaires, et dans la bicouche desquels se trouvent les canaux ioniques. Cependant, la fusion de ces vésicules n'est pas spontanée, elle nécessite l'application d'un gradient de concentration saline de part et d'autre de la bicouche suspendue, et des agents permettant de promouvoir la fusion sont souvent nécessaire (e. g. couple nystatine/ergostérol). Par ailleurs, plus le diamètre de la bicouche est petit (ce qui est préférable pour réduire le niveau de bruit), plus les évènements de fusion sont rares et l'insertion des canaux ioniques difficile. Une autre limitation est la présence du solvant utilisé pour former la bicouche : celui-ci reste présent à l'état de traces dans la bicouche et peut être une source d'artefact.

Nous allons maintenant voir d'autres approches permettant de former la bicouche sans solvant, et d'intégrer les canaux ioniques au moment de sa formation.

2.4. Formation de bicouches suspendues intégrant directement des canaux ioniques, obtenues par rupture de liposomes

2.4.1. Formation d'une bicouche suspendue par rupture d'une GUV

Une méthode de formation d'une bicouche suspendue à partir d'une GUV a été mise au point, permettant d'intégrer directement les canaux ioniques au moment de la formation de la bicouche suspendue, et d'obtenir une bicouche exempte de solvant [118,138]. La Figure 29 montre le principe de cette méthode : une GUV est positionnée sur un pore micrométrique réalisé dans une cloison hydrophile. L'interaction entre les phospholipides de la GUV et la surface hydrophile (sous l'effet de forces électrostatiques ou de van der Waals) entraîne l'étalement de la GUV sur la surface jusqu'à sa

rupture. Une bicouche suspendue est alors formée sur le pore micrométrique. L'hydrophilie de la cloison entraîne une configuration où ce sont les têtes hydrophiles des phospholipides qui sont en contact avec la cloison (voir Figure 14 f, p. 31).

Kresàk et al. [138] ont obtenu une bicouche de cette manière en utilisant une cloison de Si_3N_4 formée sur un substrat de silicium gravé en face arrière. La cloison a une épaisseur de 100 nm et un ou plusieurs pores de 50 nm à 600 nm y ont été gravés avec un faisceau d'ions focalisé. Une suspension de GUV (DPhPC) est amenée à sédimenter sur la cloison préalablement immergée dans une solution saline (100 mM KCl, 5 mM HEPES, pH 7). Le milieu intérieur des GUV contient du sucrose à une concentration de 200 mM pour obtenir la sédimentation de la suspension. Une GUV déposée près du ou des pore(s) est ensuite positionnée manuellement sur le(s) pore(s) avec une pipette actionnée par un micromanipulateur. Sa rupture entraîne la formation d'une bicouche suspendue avec une résistance de scellement d'environ 10 GΩ.

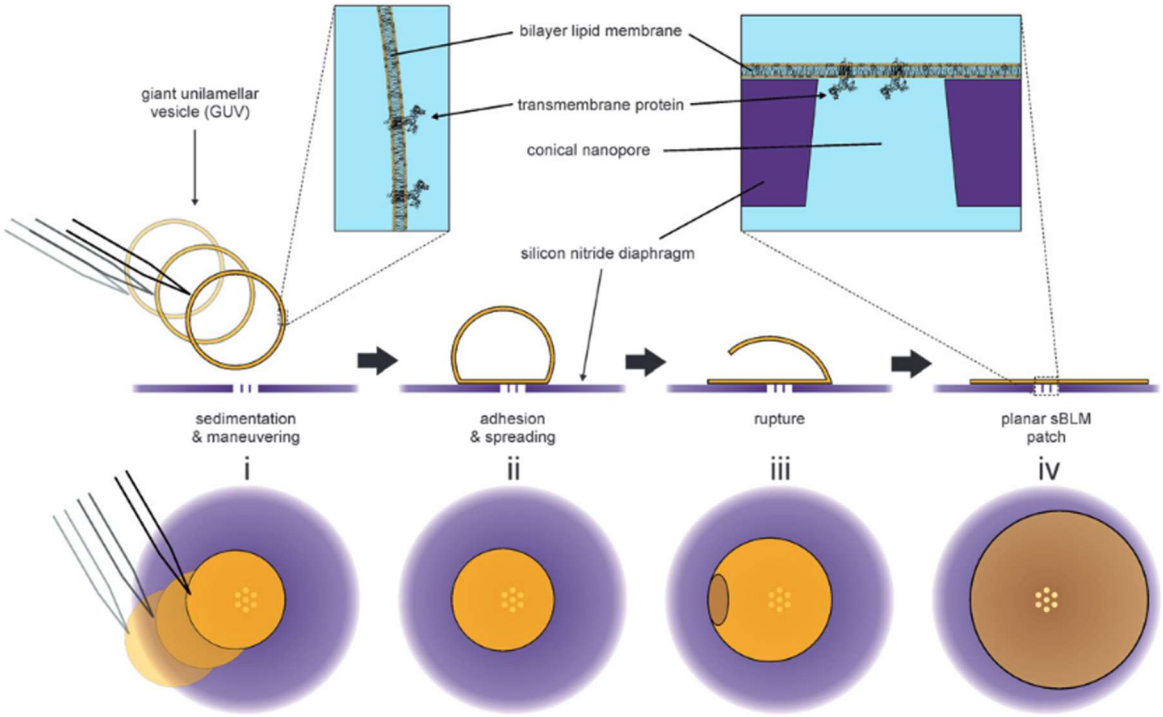


Figure 29 : schéma montrant le principe de formation de la bicouche suspendue par rupture de GUV dans le cas du dispositif de Kresàk et al., tiré de [138].

Un résultat comparable a été obtenu par Gaβmann et al. [118], en utilisant un dispositif commercial (port-a-patch®, Nanion), que l'on a mentionné dans le paragraphe 2.3.3. Celui-ci comprend une cloison de verre dans laquelle est réalisé un pore de 1 à 2 µm de diamètre. Les GUV sont constituées d'un mélange DPhPC/cholestérol, et contiennent le canal ionique connexine 26 reconstitué au sein de la bicouche de la GUV. Après insertion de la suspension de GUV dans le dispositif, une dépression est appliquée d'un côté de la cloison, ce qui permet d'attirer une GUV sur le pore. Cette opération aboutit à la rupture de la GUV et à la formation d'une bicouche suspendue avec une résistance de scellement

de 10 à 100 GΩ. L'activité des canaux ioniques se trouvant initialement dans la GUV peut ainsi être mesurée directement après formation de la bicouche. Le dispositif utilisé est optimisé pour avoir un niveau de bruit relativement bas (voie paragraphe 2.3.3, p. 47), notamment grâce au petit diamètre du pore micrométrique. Un tel diamètre aurait rendu impossible l'insertion de canaux ioniques par fusion de protéoliposomes avec une bicouche formée préalablement. La formation de la bicouche suspendue avec la GUV permet ainsi de contourner l'étape critique d'insertion des canaux ioniques sur un pore d'un tel diamètre.

La formation d'une bicouche à partir de GUV dans lesquels les canaux ioniques sont insérés présente cependant un inconvénient : la méthode nécessite de former au préalable des GUV et d'y reconstituer les canaux ioniques, ce qui représente des étapes supplémentaires préliminaires à l'expérience [140], [141], [142].

2.4.2. Formation d'une bicouche suspendue par fusion et rupture de SUV et de LUV

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 2.2, les canaux ioniques sont généralement reconstitués dans un premier temps au sein de protéo-LUV ou de protéo-SUV, environnement stable qui permet de les conserver sans les dénaturer. Il serait donc intéressant de pouvoir former une bicouche suspendue directement à partir de ces protéo-LUV ou protéo-SUV, afin de limiter le nombre d'étapes intermédiaire pour mener la caractérisation électrique. Nous avons mentionné dans le paragraphe 2.1 l'existence de bicouches dites supportées obtenues sur des surfaces telles que le SiO_2, le TiO_2, le mica ou l'or. Une méthode utilisée pour former une bicouche supportée est l'incubation sur la surface d'une suspension de SUV ou de LUV [78] : comme pour le cas des GUV mentionné dans le paragraphe 2.4.1, le caractère hydrophile de la surface entraîne l'adsorption de SUV ou de LUV sur la surface (Figure 30).

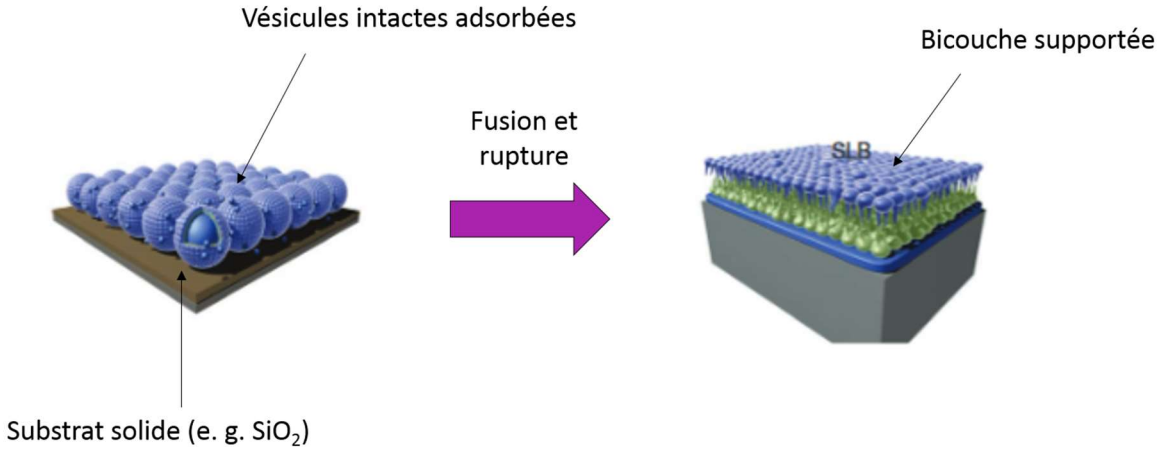


Figure 30 : schéma montrant l'obtention d'une bicouche supportée sur une surface hydrophile à partir de l'incubation d'une suspension de LUV ou de SUV sur la surface, tiré de [80].

Lorsqu'une concentration surfacique critique est atteinte, les vésicules fusionnent entre elles et éclatent, ce qui aboutit à la formation d'une bicouche supportée résultant de la coalescence d'un grand nombre de vésicules. Ce processus a été caractérisé par différentes méthodes telles que la QCM-D,

l'EIS, la SPR ([143], [144]), l'ellipsométrie, l'AFM [79], l'interférométrie [145]. Son occurrence dépend notamment de la solution saline dans laquelle se déroule le processus (force ionique, pH, présence d'ions divalents tels que les ions Ca^{2+}), des phospholipides utilisés (et de leur charge positive, négative ou neutre au pH expérimental), ainsi que de la chimie de surface du substrat (et de sa densité de charge au pH expérimental).

Ainsi, nous pourrions envisager obtenir une bicouche suspendue à partir de SUV ou de LUV en réalisant l'incubation des vésicules sur un substrat hydrophile (par exemple SiO_2) présentant des pores de diamètre nanométrique (voir figure 1, dans l'introduction de la thèse). Le postulat sous-jacent est que si le diamètre de ces pores est suffisamment petit par rapport à celui des SUV ou LUV, le processus de fusion et rupture des vésicules ne devrait pas être affecté par la présence des nanopores. On devrait donc obtenir à l'issue de l'incubation une bicouche suspendue recouvrant et scellant l'ensemble des nanopores, présentant des « régions supportées » sur la surface du substrat et des « régions suspendues » au-dessus des nanopores. Un intérêt de cette approche est que l'on peut envisager insérer les canaux ioniques dans la bicouche suspendue directement au moment de sa formation, en utilisant des protéo-SUV ou des protéo-LUV pour l'incubation. En ajustant le rapport molaire canal ionique / phospholipides des protéoliposomes ainsi que le nombre et la taille des nanopores, il devrait être possible de mener des enregistrements à l'échelle du canal unique ou bien des enregistrements portant sur un grand nombre de canaux.

Différentes études ont confirmé expérimentalement qu'il est possible d'obtenir une bicouche suspendue scellant des nanopores à partir de LUV [146–153]. Nous avons regroupé dans le Tableau 7, p. 73, certains paramètres expérimentaux utilisés dans ces études. La majorité de ces travaux ont été réalisés avec des LUV ne contenant pas de canaux ioniques, l'objectif étant de démontrer la possibilité de former la bicouche suspendue par incubation des LUV. Les canaux ioniques sont alors insérés ultérieurement dans la bicouche et leur fonctionnalité mesurée afin de montrer que la structure formée est bien une bicouche suspendue. Une étude a permis de montrer qu'une bicouche suspendue contenant des canaux ioniques fonctionnels (canal bactérien modifié génétiquement $MscL^{G22C}$) peut être obtenue directement par incubation de protéo-LUV (Urban et al. [149]). Cette étude a été réalisée avec des nanopores de 70 nm à 120 nm de diamètre, réalisés dans une surface de SiO_2. L'activité du canal inséré est caractérisée par microscopie de fluorescence, comme nous le décrivons ci-dessous.

2.4.2.1. Méthodes de caractérisation utilisées

Trois méthodes de caractérisation ont été utilisées en fonction du type de substrat sur lesquels sont menées les expériences : les substrats présentant des nanopores non débouchant (Figure 31 a) [146,147], ou débouchant sur une microcavité (Figure 31 b) [148,149,154] ont été caractérisés par AFM ou par microscopie en fluorescence. Les substrats présentant des nanopores débouchant sur un compartiment indépendant accessible électriquement (Figure 31 c) [150–153] ont pu être caractérisé par des mesures électriques : EIS ou mesures « I(V) ». **L'AFM** permet d'observer une profondeur apparente des nanopores plus petite dans le cas où ils sont scellés par une bicouche suspendue (Figure 32 a, Steltenkamp et al. [146]). **L'EIS** permet d'extraire la résistance de scellement et la capacité de la bicouche suspendue R_b et C_b. L'ajustement avec un modèle théorique permet de montrer que la configuration obtenue est bien une bicouche suspendue scellant les nanopores (Figure 32 b, Schmitt et al. [151]). La **microscopie de fluorescence** permet aussi de montrer que les nanopores sont scellés

après incubation des vésicules (Kleefen et al. [148], Urban et al. [149], Kumar et al. [147]) : un fluorophore est mis dans la solution au moment de l'incubation des liposomes (Figure 32 d). Ce fluorophore est encapsulé dans les nanopores, ou dans une microcavité située sous les nanopores, par la bicouche suspendue formée. Le fluorophore reste ainsi capturé même après le rinçage de la solution (Figure 32 e).

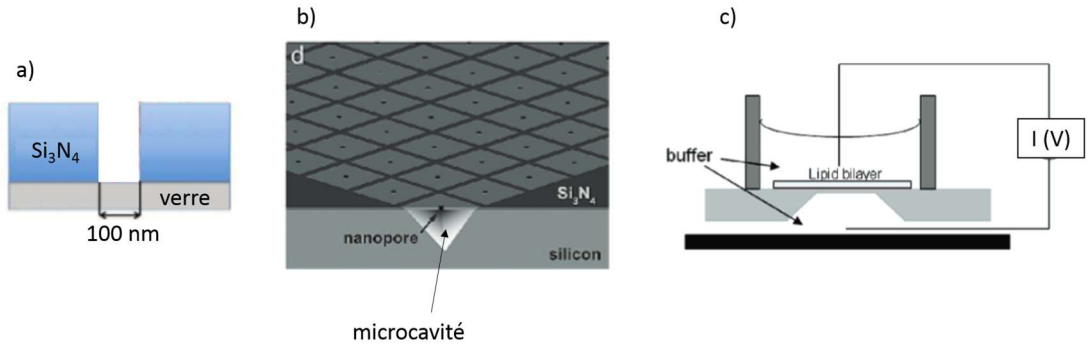


Figure 31 : a) schéma montrant le cas de nanopores non travesants, tiré de [147]. b) Schéma montrant le cas de nanopores débouchant sur des microcavités gravées en-dessous, tiré de [148]. c) Schéma montrant le cas de nanopores débouchant sur un deuxième compartiment accessible électriquement, tiré de [153].

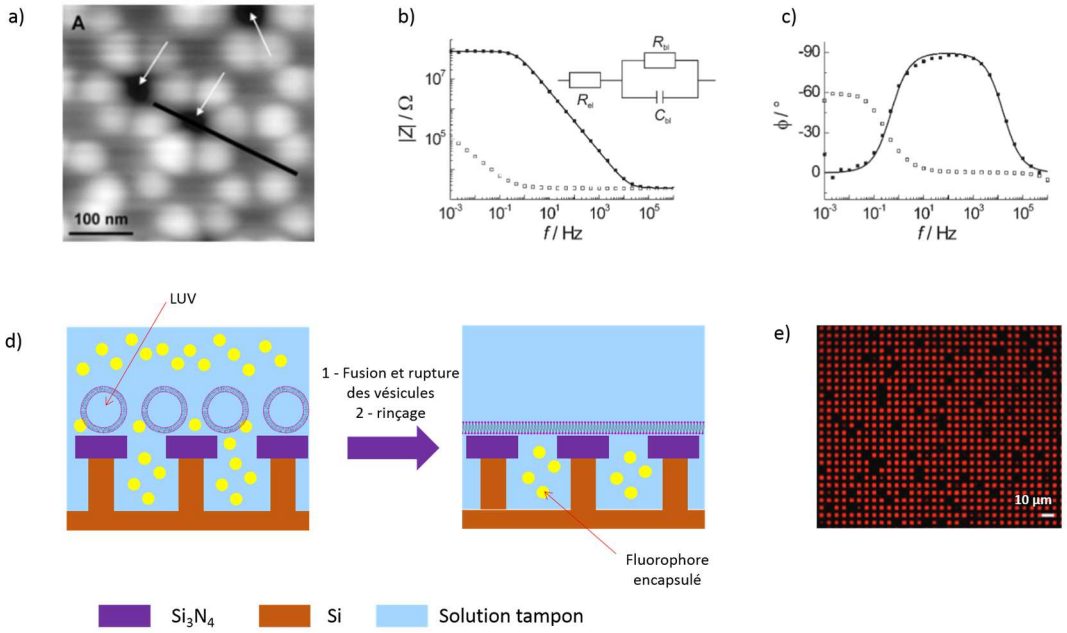


Figure 32 : a) image AFM d'une bicouche suspendue formée sur un réseau de nanopores fabriqués dans un susbtrat d'alumine. La bicouche est formée de DDAB DOATP, qui ne sont pas des phospholipides, tiré de [146] (voir le Tableau 7, p. 73 pour les conditions expérimentales). b) et c) spectre d'impédance obtenu entre deux électrodes placées de part et d'autre d'un substrat d'alumine comprenant un réseau de nanopores traversant, avant incubation de LUV (courbe grise) et après incubation de LUV (courbe noire). Les points correspondent aux résultats expérimentaux, et la courbe à l'ajustement de ces résultats avec le modèle montré en insert. Tiré de [151] (voir le Tableau 7, p. 73 pour les conditions expérimentales). d) schéma montrant le principe de la capture de fluorophores dans les microcavités scellés par la bicouche suspendue. d) image en microscopie par fluorescence correspondant à la capture du fluorophore TAMRA par une bicouche formé sur des nanopores 46 nm de diamètre, tiré de [148] (voir le Tableau 7, p. 73 pour les conditions expérimentales).

2.4.2.2. Morphologie de la bicouche suspendue recouvrant les nanopores

Les résultats obtenus par ces différentes études montrent que lorsque le diamètre moyen des LUV est grand devant le diamètre des nanopores utilisés, l'incubation des LUV conduit à la formation d'une bicouche suspendue qui couvre la majorité des nanopores (Figure 32 a et e). Les durées de vie de la bicouche obtenues sont de l'ordre de quelques jours (Urban et al. [149], Korman et al. [152], Schmitt et al. [151]). La preuve qu'une bicouche scelle les nanopores est donnée par l'insertion de canaux ioniques et la vérification de leur fonctionnalité : dans le cas des études par fluorescence, le fluorophore encapsulé dans les cavités diffuse plus rapidement lorsqu'un canal ionique est inséré dans la bicouche. Dans le cas des mesures électriques, la résistance mesurée entre les électrodes situées de part et d'autre de la bicouche diminue lorsque des canaux ioniques sont insérés. Les canaux ioniques n'étant fonctionnels que s'ils se trouvent dans une bicouche, du fait de leur structure, ceci prouve que la structure formée sur les nanopores est bien une bicouche suspendue.

NB : Dans le cas des substrats hydrophiles (Si_3N_4, SiO_2 ou fonctionnalisation par acide 3-mercaptopropionique dans le cas de Steltenkamp et al. [146]), l'agencement de la bicouche sur la surface est *a priori* celui qui a été montré dans la Figure 14 f, p. 31. Schmitt et al., ont au contraire utilisé une fonctionnalisation par cholestérylpoly(éthylènoxy) thiol (CPEO3) greffé sur un dépôt préalable d'or. Cette molécule contient une chaîne carbonée et un groupement cholestérol qui s'insère dans la bicouche, de sorte que les régions en contact avec le substrat sont espacées-ancrées (voir Figure 14 c, p. 31). Enfin, Korman et al. ont utilisé une fonctionnalisation hydrophobe (OTS ou FOTS déposé sur Si_3N_4), de sorte que la bicouche est à priori agencée d'une manière similaire au cas de la Figure 14 e, p. 31. Si c'est bien le cas, le processus de fusion est nécessairement différent du cas de la fusion sur une surface hydrophile, puisque les deux feuillets de la bicouche doivent se séparer afin que les queues hydrophobes des phospholipides soient en contact avec la surface hydrophobe du substrat.

Le fait qu'il y ait une seule bicouche qui couvre plusieurs nanopores est montré par une caractérisation par FRAP. Nous reviendrons dans le chapitre 4 sur cette méthode de caractérisation. Brièvement, des LUV qui contiennent 0,1 à 1 % de phospholipides marqués par fluorescence sont utilisées pour l'incubation, ce qui conduit à la formation d'une bicouche fluorescente sur le substrat. Une zone de la bicouche formée est ensuite photoblanchie avec un pulse laser (la zone étant délimitée par un diaphragme), qui détruit les fluorophores de cette zone. L'observation d'un retour de la fluorescence après photoblanchiment montre que la surface est recouverte d'une bicouche continue s'étalant sur une zone plus large que la zone photoblanchie. Cette caractérisation a été réalisée dans le cas d'Urban et al. [149] et de Korman et al. [152] et montre que la structure formée est bien une bicouche qui recouvre l'ensemble des nanopores, avec des « régions supportées » et des « régions suspendues ».

2.4.2.3. Statistique de scellement des nanopores, cas des nanopores non scellés

La caractérisation par AFM et par fluorescence a montré qu'à l'issue de l'incubation, les nanopores ne sont pas tous scellés. Le pourcentage de nanopores scellés croit lorsque le diamètre des nanopores diminue (Kleefen et al. [148]), ou que le diamètre moyen des LUV augmente (Kumar et al. [147]). Dans le cas des nanopores non scellés, Kumar et al. [147] ont observé que la bicouche est présente mais est supportée et suit les parois du pore comme le montre la Figure 33 a). En effet, des images en microscopie de fluorescence réalisées après incubation de LUV contenant des phospholipides marqués par fluorescence (0,2 % wt.) présentent un signal de fluorescence important à l'emplacement des nanopores (Figure 33 b), ce qui est interprété comme le fait que la bicouche fluorescente suive les

parois des nanopores, vu par le dessus. Des images réalisées avec un microscope confocal (qui a un pouvoir de résolution plus important qu'un microscope classique) sur des nanopores plus grand (500 nm de diamètre) montrent que le signal de fluorescence est dans ce cas confiné aux parois des nanopores (Figure 33 c, haut). Cette observation est confirmée avec une meilleure résolution par des images en microscopie de super résolution STED (Figure 33 c, bas).

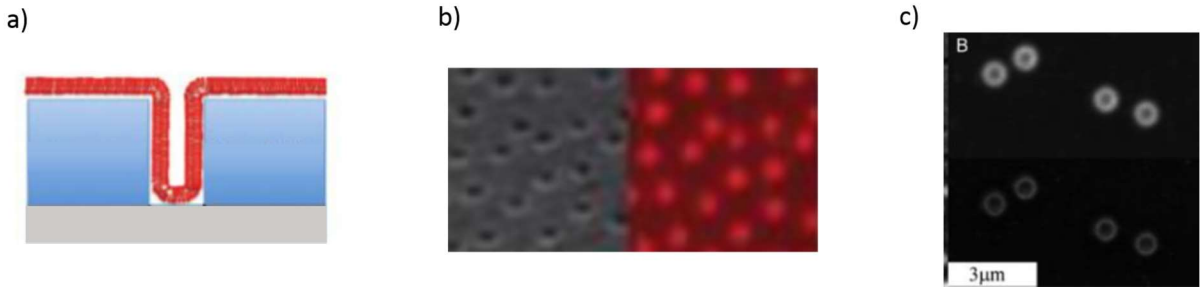


Figure 33 : schéma montrant le cas où la bicouche est supportée et suit les parois du nanopore, adapté d'après [147] b) image en microscopie optique (gauche) et en microscopie par fluorescence (droite) d'une surface présentant des nanopores de 200 nm de diamètre après incubation de LUV de 130 nm de diamètre, le fluorophore ajouté étant le DOPE-RhoB, tiré de [147]. c) image en microscopie confocale (haut) et en microscopie de super-résolution STED (bas) de pores de 500 nm de diamètre après incubation de LUV de 75 nm de diamètre (fluorophore ajouté : DOPE-RhoB), tiré de [147].

Cette configuration peut être due, soit au fait que des vésicules plus petites que les nanopores entrent dans les nanopores pendant l'incubation et forment une bicouche supportée sur leurs parois, soit au fait que les vésicules se trouvant adsorbées autour du nanopore ne sont pas suffisamment grandes pour recouvrir le nanopore en fusionnant. La bicouche serait dans ce cas adsorbée sur les parois au niveau de l'entrée du pore et migrerait vers l'intérieur par diffusion, d'une manière similaire à l'expansion, déjà observée, d'une bicouche supportée sur un substrat plan [155–157].

2.4.2.4. Résistance de scellement de la bicouche formée et enregistrements électriques

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe 2.3.2, une condition nécessaire pour pouvoir mener des enregistrements à l'échelle du canal unique est que la résistance de scellement R_b obtenue soit supérieure à 1 GΩ. La valeur de la résistance de scellement obtenue à l'issue de l'incubation des LUV varie selon les études : Korman et al. [152] ont obtenu des résistances de scellement de quelques gigaOhms, Schmitt et al. [151] une résistance de 0,5 MΩ à 80 MΩ, et Quist et al. [153] une résistance de 40 GΩ. Ces variations importantes peuvent provenir de différents facteurs, tels que les phospholipides utilisés, la chimie de surface, ou encore le nombre de nanopores en parallèle et la surface totale occupée par les nanopores : dans le cas de Korman et al. la puce de silicium contient 40 000 nanopores de 130 nm de diamètre. Dans le cas de Schmitt et al, les nanopores couvrent la totalité du substrat (diamètre des nanopores : 60 nm, distance entre les nanopores de l'ordre de 80 nm), et la surface exploitée pour les mesures, délimitée par la cellule utilisée pour les mesures électriques, vaut 2 à 3 mm². Cette configuration implique donc un nombre de nanopores en parallèle très élevé en comparaison des travaux de Korman et al. Enfin, Quist et al. utilisent un dispositif de silicium qui ne contient qu'un seul nanopore dont le diamètre est de 70 à 150 nm.

L'activité de canaux ioniques a pu être mesurée à l'échelle d'une population de canaux : Korman et al. ainsi que Quist et al. ont mesuré une baisse de la résistance entre les deux électrodes lors de l'insertion dans la bicouche de canaux ioniques solubles dans l'eau (gramicidine). Schmitt et al. ont [151] mesuré

le courant associé à l'activité de pompes à protons activés par la lumière. Même si une résistance de scellement supérieure à 1 GΩ est obtenue par Korman et al., et par Quist et al., des enregistrements à l'échelle du canal unique n'ont pas été réalisés dans ces études.

2.4.2.5. Conclusion

En conclusion, différents travaux ont montré qu'il est possible de former par incubation de LUV une bicouche suspendue qui scelle un réseau de nanopores. Le scellement obtenu est suffisamment hermétique pour pouvoir encapsuler un fluorophore dans les nanopores ou dans des microcavités situées en-dessous. La stabilité de la bicouche formée est de plusieurs jours, ce qui est du même ordre que le cas des bicouches suspendues à des nanopores, obtenues avec la méthode de « painting » ou de Montal-Mueller, présentées dans le paragraphe 2.3.4. Par ailleurs, la possibilité d'intégrer directement des canaux ioniques fonctionnels dans la bicouche suspendue a été démontrée, ce qui représente une amélioration significative par rapport aux bicouches suspendues formées par le biais d'un solvant organique. Enfin, la méthode de formation de la bicouche ne nécessite que l'injection dans le dispositif de la suspension de (protéo-)LUV ou (protéo-)SUV, cette opération étant automatisable.

En ce qui concerne les résistances de scellement, celle-ci varie de 0,5 MΩ à 40 GΩ selon les études. L'enregistrement électrique de l'activité de canaux ionique a été réalisé à l'échelle d'une population de canaux ioniques, mais pas à l'échelle du canal unique.

Réf.	Chimie de surface	Type de bicouche obtenue	Diamètre nanopores (nm)	Diamètre liposomes (nm)	Phospholipides	Canal ionique fonctionnel inséré	Mode d'insertion du canal	Méthode de caractérisation
Stelten-kamp et al.[146]	Acide 3-mercaptopropionique sur or (substrat : alumine)	Suspendue	30 et 90	600	DDAB DOATP (lipides)	Non	---	AFM
Kleefen et al. [148]	Si_3N_4 (CVD)	Suspendue	15 – 120	Non mentionné (LUV)	E. Coli (extraits polaires) / DOPC ou E. Coli (extraits polaires) / DOPC / cholestérol	α-hémolysine ou saponine	SOL[2]	Encapsulation de fluorophores
Urban et al. [149]	SiO_2 (CVD)	Suspendue	70 - 120	150 – 200	PC (soja) / E. Coli (extraits polaires) / DOPC ou PC (soja)	$MscL^{G22C}$ (bactérien modifié)	PROT[2]	Encapsulation de fluorophores
Kumar et al. [147]	Si_3N_4 (PECVD)	Suspendue et supportée[1]	40 - 500	75, 100 et 130	POPC / POPS / DOPE-RhoB (fluorescent) ou POPC / DOPE-RhoB	Non	---	Encapsulation de fluorophores et microscopie STED
Schmitt et al. [150], [151]	CPEO3 (thiol) sur or (substrat : alumine)	Suspendue / ancrée-espacée	60	600 - 730	DPhPC / DOPC	gramicidine, bactério-rhodopsine	SOL[2] et FUS[2]	EIS
Korman et al. [152]	OTS ou FOTS sur Si_3N_4 (CVD)	Suspendue (substrat hydophobe)	130	200	POPC / Texas Red DHPE (fluorescent)	gramicidine	SOL[2]	EIS
Quist et al. [153]	SiO_2 (PECVD)	Suspendue	70 - 150	Non mentionné	DOPC	gramicidine	SOL[2]	AFM, « I(V) »
Buchholz et al. [154]	SiO_2 (Oxydation thermique	Supportée[1]	800	100	SOPC / OregonGreen DHPE (fluorescent)	Non	---	Microscopie par fluorescence

Tableau 7 : résumé des conditions expérimentales utilisées par différentes équipes pour obtenir une bicouche suspendue à partir de SUV et de LUV. [1] Dans le cas d'une bicouche supportée, la bicouche suit les parois des nanopores [2] SOL : pour des canaux solubles dans l'eau, insertion depuis la solution après formation de la bicouche suspendue. PROT : formation de la bicouche suspendue à partir de protéo-LUV. FUS : fusion de protéoliposomes avec la bicouche suspendue déjà formée.

3. Bilan et positionnement du projet

3.1. Bilan

Les canaux ioniques représentent un enjeu scientifique et médical important du fait de leur omniprésence dans les membranes des cellules et des organites, et du nombre important de maladies ayant pour origine le dysfonctionnement d'un canal ionique. Une particularité des canaux ioniques est qu'il est possible de mesurer en temps réel le courant ionique qui les traverse, ce qui permet de caractériser la fonctionnalité d'un canal unique ou d'une population de canaux. Les mesures à l'échelle du canal unique sont utilisées lorsque l'on souhaite étudier les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal au niveau moléculaire. Les études portant sur une population de canaux sont par exemple utilisées pour le criblage à haut débit de molécules permettant potentiellement de déclencher l'ouverture ou la fermeture du canal ionique, dans le contexte d'une application pharmaceutique.

La mesure électrique de l'activité des canaux ioniques peut être réalisée avec la méthode de « patch-clamp » sur la membrane plasmique de cellules cultivées et modifiées génétiquement pour qu'elles sur-expriment dans cette membrane le canal ionique à étudier. Ces mesures peuvent être réalisées manuellement, ou de manière automatique grâce à des systèmes de « patch-clamp » automatisés. Cette approche n'est cependant pas adaptée à l'étude de canaux ioniques d'organelles ou de bactéries car ces entités sont difficilement accessibles et sont trop petites pour sceller la pipette ou l'ouverture micrométrique à la base du dispositif de mesure de « patch-clamp ». Par ailleurs, l'expression d'un canal ionique à étudier dans la membrane plasmique d'une cellule-hôte n'est pas toujours possible. Enfin, l'environnement *in vivo* dans lequel est effectuée la méthode de « patch-clamp » manque de flexibilité : le contrôle de la composition de la membrane cellulaire est impossible, le contrôle de la composition du milieu intracellulaire est limité, et la caractérisation simultanée de la membrane ou des canaux ioniques par d'autres méthodes de caractérisation n'est pas possible.

L'étude des canaux ioniques au sein de bicouches biomimétiques reconstituées *in vitro* permet de répondre à ces limitations. Parmi les différents types de bicouches biomimétiques existant, les bicouches suspendues et les bicouches formées par contact entre deux (micro-)gouttes permettent de mener la caractérisation électrique de l'activité de canaux ioniques avec la résolution du canal unique. Les canaux ioniques peuvent être synthétisés par synthèse cellulaire ou acellulaire, reconstitués au sein de protéo-LUV ou de proté-SUV puis insérés dans une bicouche suspendue par fusion des protéo-SUV ou protéo-LUV avec la bicouche suspendue ou formé par contact entre deux (micro-)gouttes. Cette approche a notamment permis d'étudier les canaux ioniques d'organites ou bactériens, inaccessibles par la méthode de « patch-clamp ». Les premières bicouches suspendues étaient formées manuellement, avec la méthode de « painting » ou de Montal-Mueller, sur une cloison en polymère hydrophobe comportant un pore de diamètre supérieur à 100 µm, usiné manuellement dans le polymère. Cette configuration résulte en une stabilité mécanique limitée de la bicouche, de sorte que sa durée de vie est généralement de quelques heures, limitant la durée des mesures. Cette durée de vie limitée est d'autant plus problématique que l'insertion des canaux ioniques au sein de la bicouche, *via* la fusion avec celle-ci de protéoliposomes, est un processus imprévisible qui peut être relativement long. Par ailleurs, le diamètre important de la bicouche suspendue entraîne un couplage

capacitif relativement important (plusieurs centaines de picofarads) entre les deux compartiments de mesure, ce qui résulte en un courant de bruit élevé généré par l'amplificateur utilisé pour les mesures. En outre, la présence de solvant organique dans la bicouche suspendue peut être source d'artefact dans la caractérisation des canaux ioniques. Enfin, la méthode de formation de la bicouche est manuelle, ce qui limite le nombre de mesures pouvant être réalisées par un expérimentateur.

Le niveau de bruit a pu être réduit en diminuant le diamètre du pore sur lequel est formé la bicouche suspendue jusqu'à une valeur de l'ordre de 10 µm. Les autres sources de bruit ont été diminuées en diminuant la capacité du substrat C_S (par une augmentation de son épaisseur ou une diminution de la surface de contact entre l'électrolyte et la cloison), en utilisant un matériau à faible coefficient de pertes diélectriques pour la cloison, en utilisant un pore de géométrie conique afin de réduire sa résistance R_a, et en diminuant C_e, capacité d'entrée du dispositif. Ces améliorations ont permis d'obtenir, dans le cas d'un dispositif adressé par un amplificateur conventionnel de « patch-clamp » un niveau de bruit presque aussi bas que celui obtenu dans la méthode de « patch-clamp », et, dans le cas d'un dispositif où l'amplificateur est intégré, des caractéristiques très prometteuses, quoique non optimisées encore.

Nous avons vu ensuite que la durée de vie de la bicouche pouvait être améliorée en réduisant le diamètre du pore, ou en modifiant sa géométrie et sa chimie de surface. En particulier, nous avons vu que l'utilisation de pores micrométriques dont le profil est en biseau, ou alors l'utilisation de pores submicrométriques permet d'obtenir une durée de vie moyenne de la bicouche suspendue de quelques jours. Une durée de vie particulièrement longue de une à quelques semaines a pu être atteinte dans le cas d'un nanopore fabriqué dans un tube de verre, ou dans le cas de bicouches formées en mettant en contact deux microgouttes de solutions aqueuses immergées dans une solution phospholipide / solvant organique.

Des dispositifs comprenant une interface fluidique ont aussi été développés afin de s'adresser à la question de l'automatisation et de la parallélisation des mesures. Ces dispositifs permettent de former une bicouche suspendue ou une bicouche obtenue par contact entre deux volumes de solution saline séparés par un volume de solution organique. La bicouche est formée uniquement avec des opérations d'injection ou de circulation de fluides dans des canaux fluidiques, opérations qui peuvent être automatisées. Des courbes dose-réponse de modulateurs de l'activité de canaux ioniques ont pu être réalisées dans de tels dispositifs. Pour cela, des solutions comportant le modulateur à différentes concentrations sont introduites de manière séquentielle dans un canal adressant la bicouche.

Les dispositifs mentionnés ci-dessus ne permettent cependant pas de résoudre le problème de la présence du solvant organique dans la bicouche et de l'insertion des canaux ioniques. Pour la question de l'insertion des canaux ioniques, il y a un compromis à réaliser entre une bicouche suspendue dont la surface est importante, ce qui facilite l'insertion des canaux ioniques ou une bicouche dont la surface est petite, ce qui réduit le niveau de bruit. Afin de résoudre ces deux limitations, la formation d'une bicouche suspendue sur un substrat hydrophile à partir d'une GUV ou d'un ensemble de LUV ou de SUV intégrant les canaux ioniques à étudier a été étudiée. Dans le cas d'une GUV, il a été montré que cette approche permet bien d'obtenir une bicouche exempte de solvant et intégrant directement le canal ionique à étudier. Cependant, l'insertion des canaux ioniques doit être réalisée au préalable dans la suspension de GUV. Les canaux ioniques étant souvent reconstitués dans des LUV ou des SUV, une approche prometteuse pour réduire le nombre d'étapes nécessaires à l'étude électrique des canaux

ioniques est de former une bicouche suspendue scellant des nanopores par incubation d'une suspension de protéo-LUV ou de protéo-SUV.

Dans ce contexte, plusieurs études ont montré qu'il est possible de former une bicouche suspendue scellant des nanopores à partir de LUV. Une étude a aussi montré qu'il est possible d'intégrer directement des canaux ioniques fonctionnels au moment de la formation de la bicouche suspendue, en utilisant des protéo-LUV. Ces études ont été menées en utilisant une caractérisation par microscopie de fluorescence, par AFM, ou par des mesures électriques. La mesure électrique de l'activité de canaux ioniques a été réalisée à l'échelle d'une population de canaux ioniques, mais pas encore à l'échelle du canal unique. Dans ce contexte, d'autres résultats portant sur cet aspect seraient bienvenus.

Le Tableau 8 récapitule les principaux systèmes que nous avons mentionnés dans ce chapitre, ainsi que leurs points forts et points faibles.

Système	Points forts	Points faibles	Réf.
« patch-clamp »	•Niveau de bruit faible : seuil de détection de 0,06 à 0,3 pA pour une bande passante de 1 kHz •Environnement in vivo	•Faible débit •Niveau de savoir-faire nécessaire élevé •Etude des canaux ioniques d'organites et de bactéries impossible •Composition de la bicouche et du milieu intracellulaire non contrôlés	[34] [43]
« patch-clamp » automatique	•Haut débit (plusieurs milliers de courbes dose-réponse par jour) •Savoir-faire requis relativement bas •Environnement in vivo	•Etude des canaux ioniques d'organites et de bactéries impossible •Composition de la bicouche et milieu intracellulaire non contrôlés •Coût élevé des dispositifs à haut débit. Un intermédiaire existe si un débit moyen (quelques dizaines de mesures par jour) est suffisant (port-a-patch®, Nanion)	[55] [158]
Bicouche suspendue « classique »	•Composition bicouche contrôlée •Composition des solutions salines de part et d'autre de la bicouche contrôlée	•Présence de solvant organique •Non automatique •Non miniaturisé •Savoir-faire nécessaire •Niveau de bruit plus élevé que le « patch-clamp » : seuil de détection de 5 pA pour une bande passante de 1 kHz •L'Insertion des canaux ioniques par fusion de protéoliposomes avec la bicouche n'est pas optimisée	[96] [97] [98]

Bicouche suspendue sur disp. silicium avec pores micrométriques ou nanométriques	•Durée de vie de la bicouche de l'ordre de quelques jours	•Niveau de bruit relativement élevé par rapport à la méthode de patch-clamp, à cause de la capacité C_S importante du substrat. Seuil de détection de 3 pA avec une bande passante de 1 kHz pour [109] •Insertion des canaux ioniques par fusion de vésicules impossible dans le cas de pores de diamètre de quelques micromètres ou nanométriques	[104] [109] [121]
Bicouche suspendue formée sur dispositif port-a-patch	• Niveau de bruit relativement bas par rapport aux bicouches suspendues classiques : seuil de détection de 0,75 pA pour une bande passante de 1 kHz	•Impossibilité d'insérer les canaux ioniques par fusion de protéoliposomes avec la bicouche, à cause de son petit diamètre (1 µm), les canaux ioniques sont insérés soit en formant la bicouche avec une protéo-GUV, soit en les ajoutant dans la solution saline s'ils sont solubles dans l'eau	[111] [118]
Systèmes comprenant une interface fluidique	•Formation de la bicouche pouvant être automatisée •Possibilité de changer le contenu d'un compartiment au cours de l'expérience	IDEM bicouches suspendues « classiques » : •Présence du solvant organique, •Insertion des canaux ioniques	[130] [131] [87] [133] [135] [134]
Bicouches suspendues formées par rupture d'une GUV	•Absence de solvant •Possibilité d'insérer les canaux ioniques au moment de la formation de la bicouche	•La formation des protéo-GUV nécessite une étape supplémentaire	[118] [138]
Bicouche formée par fusion de LUV	•Absence de solvant •Possibilité d'insérer les canaux ioniques au moment de la formation de la bicouche	•Enregistrements à l'échelle du canal unique pas encore démontrés	[146] [148] [149] [147] [150] [151] [152] [153] [154]

Tableau 8 : comparaison des points forts et des points faibles des différents dispositifs permettant de mener des mesures électriques sur les canaux ioniques avec la résolution du canal unique.

3.2. Positionnement du projet

Dans la continuité des études présentées dans le paragraphe 2.4.2, cette thèse vise au développement d'un dispositif permettant d'obtenir une bicouche suspendue par incubation de LUV ou de SUV sur des nanopores. L'objectif à terme est d'utiliser des protéo-LUV ou protéo-SUV pour former la bicouche, afin de caractériser électriquement les canaux ioniques qui s'y trouvent avec un nombre restreint d'étapes intermédiaires. Ceci permettra de résoudre le problème de l'insertion des canaux ioniques dans une bicouche suspendue, problème couramment posé, et aussi d'obtenir une bicouche exempte de solvant organique. Enfin, le processus de formation de la bicouche ne nécessitant que l'injection de la suspension de protéo-SUV / LUV, il serait possible ultérieurement de développer des dispositifs automatisés.

Comme le montre la Figure 34 a), notre dispositif est constitué d'une puce de silicium sur laquelle est assemblée une cellule fluidique de Poly(DiMéthylSiloxane) (PDMS). La puce de silicium est fabriquée à partir d'un substrat SOI (Silicon on Insulator). Elle contient des nanopores qui débouchent sur un nanocanal enfoui, gravé dans l'oxyde enfoui du substrat SOI. La cellule de PDMS contient deux microcanaux, adressés chacun par deux réservoirs traversant la cellule fluidique. Lorsque la cellule fluidique est assemblée sur la puce de silicium (Figure 34 b), deux compartiments indépendants sont ainsi matérialisés, reliés par le nanocanal enfoui. (NB : comme le montre la Figure 34 c, nous définissons chaque compartiment comme un microcanal et les réservoirs placés à ses deux extrémités.) Pour réaliser des mesures électriques, une électrode est insérée dans chaque compartiment. Une suspension de protéo-LUV ou de protéo-SUV pourra ensuite être introduite dans un des deux compartiments, et délivrée à l'emplacement des nanopores en ajustant le niveau des deux réservoirs du compartiment. La Figure 34 c) montre une vue en coupe de l'intersection entre les deux microcanaux et la ligne de nanopores. Nous espérons que la fusion et rupture des protéo-SUV ou protéo-LUV aboutira à la formation d'une bicouche suspendue couvrant les nanopores. Il sera alors possible, grâce aux deux électrodes, de fixer le potentiel entre les deux compartiments et de mesurer le courant pour caractériser électriquement l'activité des canaux ioniques.

Notons que les nanopores se trouvant dans un seul des compartiments sont utilisés pour former la bicouche. Les nanopores se trouvant dans l'autre compartiment sont uniquement utilisés pour fermer le circuit électrique. Notons par ailleurs que les microcanaux sont relativement rapprochés au niveau de la zone où ils croisent la ligne de nanopores. Cette configuration permet de limiter la longueur de nanocanal enfoui que doit parcourir le courant pour passer d'une électrode à l'autre, et donc la résistance associée à cette portion de circuit. Nous verrons dans la suite que restreindre cette résistance permet d'augmenter la sensibilité du dispositif vis-à-vis de la détection d'évènements de scellement des nanopores. Enfin, comme nous le verrons dans le prochain chapitre, la durée et donc le coût de l'étape de lithographie électronique utilisée pour définir les nanopores augmente avec le nombre de nanopores. Pour restreindre celle-ci, nous avons utilisé une ligne et non pas un réseau, et la longueur de la ligne a été fixée à 1 mm, une valeur minimale permettant un alignement manuel entre la cellule fluidique et la puce de silicium.

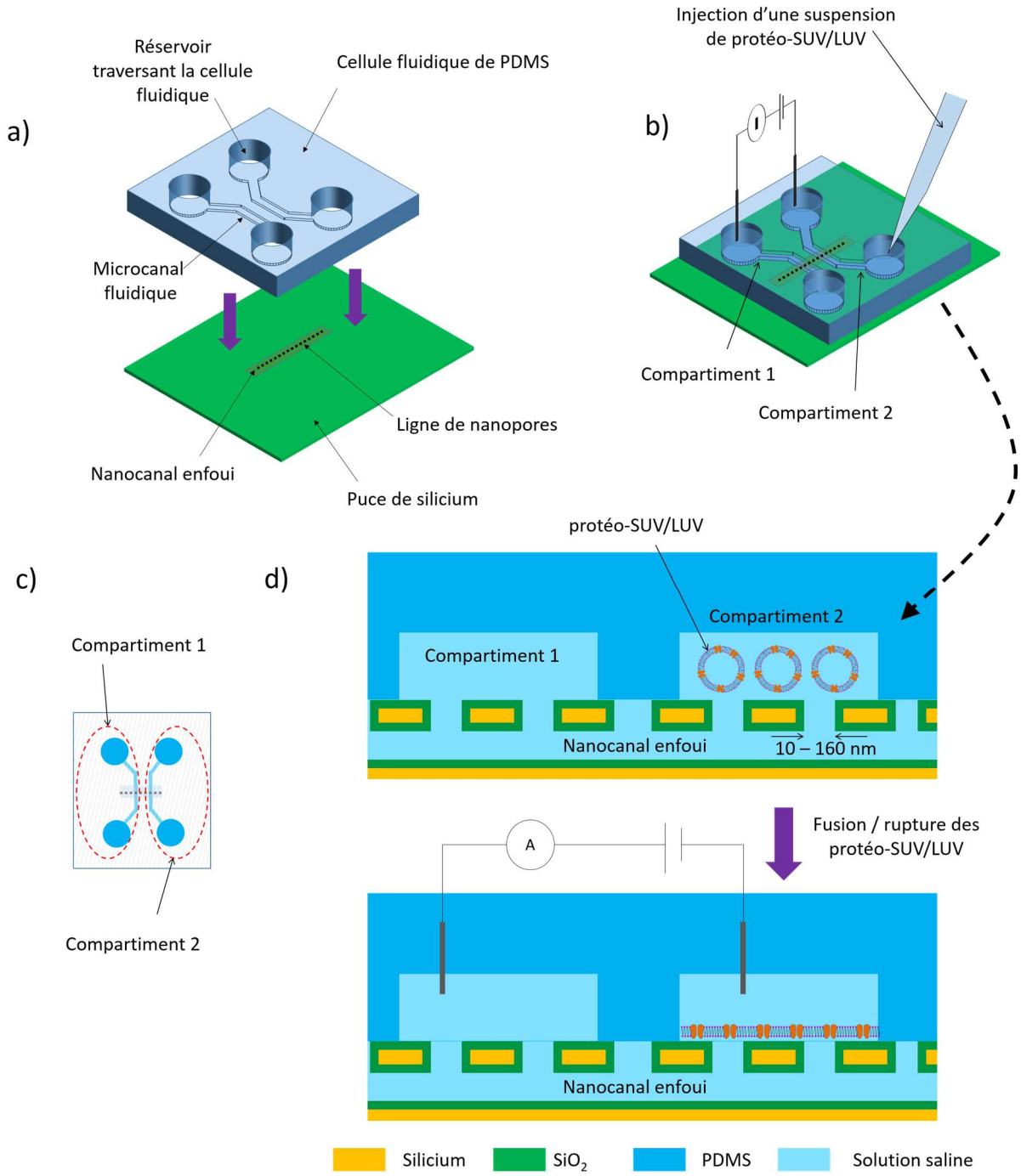


Figure 34 a) schéma en trois dimensions montrant la puce de silicium et la cellule fluidique de PDMS. b) configuration obtenue après assemblage des deux éléments. c) schéma en vue de dessus montrant comment chaque compartiment est défini. d) vue en coupe au niveau de l'intersection entre les microcanaux et la ligne de nanopore. Le nanocanal enfoui permet de relier électriquement le dessous de la bicouche suspendue à une électrode.

Le choix de l'utilisation de substrats de silicium pour réaliser le dispositif résulte de plusieurs éléments : **i)** l'oxyde de silicium, qui formera la surface active du dispositif, est connu pour déclencher le processus de fusion et rupture de (protéo-)LUV ou (protéo-)SUV, processus que l'on veut exploiter pour la formation de la bicouche suspendue. **ii)** La possibilité de réaliser des nanopores de diamètre contrôlé grâce aux techniques de nanofabrication du silicium. **iii)** l'inertie chimique du SiO_2 et sa biocompatibilité en fait un matériau adapté pour un dispositif d'analyses biochimiques. **iv)** Le SiO_2 peut

être fonctionnalisé si besoin. Le mode d'intégration utilisé présente plusieurs avantages : tout d'abord, il nécessite seulement d'usiner la face avant de la puce de silicium. Le procédé de fabrication ne nécessite donc pas de photolithographie et de gravure de la face arrière, avec l'alignement nécessaire entre les deux faces de la puce. Par ailleurs, le PDMS étant un matériau transparent, il est possible de mener une caractérisation optique et par fluorescence *in situ*. Le dispositif peut être placé au sein de différents bancs de mesures, et déplacé même s'il a été au préalable rempli, ce qui offre une certaine flexibilité à l'expérimentateur.

Dans cette thèse, nous travaillerons en l'absence de canaux ioniques, avec des SUV et des LUV. Ceci permettra de se focaliser sur la formation de la bicouche suspendue, et d'ajuster les paramètres expérimentaux afin d'obtenir une bicouche suspendue qui scelle les nanopores. Un des objectifs est que la résistance de scellement soit supérieure à 1 GΩ, afin que le niveau de bruit thermique soit suffisamment bas pour envisager la caractérisation électrique à l'échelle du canal unique. Par ailleurs le dispositif devra idéalement pouvoir fonctionner avec des vésicules dont le diamètre moyen est le plus petit possible, afin qu'il puisse être fonctionnel pour des équipes qui utilisent des protéo-SUV. Le diamètre des nanopores devra donc être inférieur à 100 nm. Nous nous attendons à ce que la probabilité qu'un nanopore soit non scellé à l'issue d'une incubation de SUV augmente lorsque le diamètre des nanopores diminue. Nous avons donc réalisé des dispositifs présentant des nanopores de dimension latérale comprise entre 10 nm et 160 nm afin de tester différentes configurations. Par la suite, notre équipe étant en partenariat avec une entreprise qui produit et commercialise des protéo-LUV, des études électriques pourront être menées au sein d'une bicouche formée avec des protéo-LUV.

La suite de ce mémoire de thèse est organisée de la manière suivante : dans le chapitre 2, nous décrirons le procédé de fabrication et d'assemblage du dispositif. Dans le chapitre 3, nous réaliserons la caractérisation en milieu liquide du dispositif, afin d'évaluer et de comparer notre technologie par rapport à l'état de l'art en termes de niveau de bruit, et d'anticiper le résultat des mesures réalisées dans le chapitre 4. Enfin, dans le chapitre 4, nous réaliserons des expériences de scellement des nanopores, dans un premier temps avec des nanoparticules, puis en utilisant une suspension de LUV ou de SUV. Ces évènements de scellement seront détectés électriquement.

4. Références

1 Alberts, B. *et al.* (2011) La cellule : Introduction. In *Biologie moléculaire de la cellule, cinquième édition* Lavoisier.

2 Reece, J.B. *et al.* (2011) A tour of the Cell. In *Biology 9th Edition : Campbell* Pearson Benjamin Cummings

3 Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731

4 Alberts, B. *et al.* (2011) Structure membranaire. In *Biologie moléculaire de la cellule, cinquième édition* Lavoisier.

5 Reece, J.B. *et al.* (2011) Membrane Structure and Function. In *Biology 9th Edition : Campbell* Pearson Benjamin Cummings

6 Lodish, H. *et al.* (2008) *Molecular Cell Biology*, 6th edition.Freeman and Company.

7 Alberts, B. *et al.* (2011) Transport membranaire de petites molécules et propriétés électriques des membranes. In *Biologie moléculaire de la cellule, cinquième édition* Lavoisier.

8 Doyle, D.A. *et al.* (1998) The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K+ Conduction and Selectivity. *Science* 280, 69–77
9 Stevenson, P. *et al.* (2015) Visualizing KcsA Conformational Changes upon Ion Binding by Infrared Spectroscopy and Atomistic Modeling. *J. Phys. Chem. B* 119, 5824–5831
10 Roux, B. and MacKinnon, R. (1999) The cavity and pore helices in the KcsA K+ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 285, 100–102
11 Mancinelli, R. *et al.* (2007) Hydration of Sodium, Potassium, and Chloride Ions in Solution and the Concept of Structure Maker/Breaker. *J. Phys. Chem. B* 111, 13570–13577
12 Hucho, F. and Weise, C. (2001) Ligand-Gated Ion Channels. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 3100–3116
13 Bezanilla, F. (2005) Voltage-Gated Ion Channels. *IEEE Trans. Nanobioscience* 4, 34–48
14 Haswell, E.S. *et al.* (2011) Mechanosensitive Channels: What Can They Do and How Do They Do It? *Structure* 19, 1356–1369
15 Cesare, P. *et al.* (1999) Ion channels gated by heat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 7658–7663
16 Rudy, B. (1988) Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25, 729–749
17 Martinac, B. *et al.* (2008) Ion Channels in Microbes. *Physiol. Rev.* 88, 1449–1490
18 Hedrich, R. (2012) Ion Channels in Plants. *Physiol. Rev.* 92, 1777–1811
19 Leanza, L. *et al.* (2013) Intracellular ion channels and cancer. *Front. Physiol.* 4,
20 Szabo, I. and Zoratti, M. (2014) Mitochondrial Channels: Ion Fluxes and More. *Physiol. Rev.* 94, 519–608
21 Bagal, S.K. *et al.* (2013) Ion Channels as Therapeutic Targets: A Drug Discovery Perspective. *J. Med. Chem.* 56, 593–624
22 Hübner, C.A. and Jentsch, T.J. (2002) Ion channel diseases. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2435–2445
23 Jentsch, T.J. *et al.* (2004) Ion channels: Function unravelled by dysfunction. *Nat. Cell Biol.* 6, 1039–1047
24 Reece, J.B. *et al.* (2011) Neurons, Synapses and Signaling. In *Biology 9th Edition : Campbell* Pearson Benjamin Cummings
25 Hille, B. (2001) Introduction. In *Ion Channels of Excitable Membranes* 3rd Edition.Sinauer Associates
26 Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1945) Resting and action potentials in single nerve fibres. *J. Physiol.* 104, 176
27 Hodgkin, A.L. *et al.* (1952) Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116, 424–448
28 Hodgkin, A. and Huxley, A. (1952) description of the time course of the current which flows through the mem. *J Physiol* 16, 449–472
29 Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544
30 Ling, G. and Gerard, R.W. (1949) The normal membrane potential of frog sartorius fibers. *J. Cell. Comp. Physiol.* 34, 383–396
31 Brette, R. and Destexhe, A. (2012) Intracellular recording. In *Handbook of Neural Activity Measurement* pp. chapter–3
32 Neher, E. and Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799–802
33 Sigworth, F.J. and Neher, E. (1980) Single Na+ channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature* 287, 447–449
34 Hamill, O.P. *et al.* (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch.* 391, 85–100
35 Sakmann, B. and Neher, E. (1984) Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 46, 455–472
36 Neher, E. (1992) Ion channels for communication between and within cells. *Neuron* 8, 605–612
37 Demo, S.D. and Yellen, G. (1991) The inactivation gate of the Shaker K+ channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron* 7, 743–753

38 Cull-Candy, S.G. *et al.* (1981) Single glutamate-activated channels recorded from locust muscle fibres with perfused patch-clamp electrodes. *J. Physiol.* 321, 195
39 Hu, K. *et al.* (1999) Adenosine-induced activation of ATP-sensitive K+ channels in excised membrane patches is mediated by PKC. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 276, H488–H495
40 Colquhoun, D. and Sigworth, F.J. (1995) Fitting and Statistical Analysis of Single-Channel Records. In *Single-Channel Recording* (Sakmann, B. and Neher, E., eds), pp. 483–587, Springer US
41 Heinemann, S.H. (1995) Guide to Data Acquisition and Analysis. In *Single-Channel Recording* (Sakmann, B. and Neher, E., eds), pp. 53–91, Springer US
42 Rae, J.L. and Levis, R.A. (1992) A method for exceptionally low noise single channel recordings. *Pflüg. Arch.* 420, 618–620
43 Parzefall, F. *et al.* (1998) Single channel currents at six microsecond resolution elicited by acetylcholine in mouse myoballs. *J. Physiol.* 512, 181–188
44 Shapovalov, G. and Lester, H.A. (2004) Gating transitions in bacterial ion channels measured at 3 µs resolution. *J. Gen. Physiol.* 124, 151–161
45 Sumikawa, K. *et al.* (1981) Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in Xenopus oocytes. *Nature* 292, 862–864
46 Gundersen, C.B. *et al.* (1984) Messenger RNA from human brain induces drug- and voltage-operated channels in Xenopus oocytes. *Nature* 308, 421–424
47 Gamper, N. *et al.* (2005) The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 51, 177–185
48 Dascal, N. (1987) The use of Xenopus oocytes for the study of ion channel. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 317–387
49 Weiss, J.N. (1997) The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 11, 835–841
50 Greenfield, L.J. and Macdonald, R.L. (1996) Whole-cell and single-channel α1 β1 γ2S GABAA receptor currents elicited by a "multipuffer" drug application device. *Pflüg. Arch.* 432, 1080–1090
51 Dong, X. *et al.* (2010) PI(3,5)P2 Controls Membrane Traffic by Direct Activation of Mucolipin Ca2+ Release Channels in the Endolysosome. *Nat. Commun.* 1,
52 Martinac, B. *et al.* (1987) Pressure-sensitive ion channel in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 2297–2301
53 Macarron, R. *et al.* (2011) Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 188–195
54 De Bruin, M.L. (2004) Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. *Eur. Heart J.* 26, 590–597
55 Yajuan, X. *et al.* (2012) A Comparison of the Performance and Application Differences Between Manual and Automated Patch-Clamp Techniques. *Curr. Chem. Genomics* 6, 87–92
56 Zagnoni, M. (2011) Miniaturised technologies for the development of artificial lipid bilayer systems. *Lab. Chip* 12, 1026
57 Hanahan, D.J. *et al.* (1951) The isolation of egg phosphatidyl choline by an adsorption column technique. *J. Biol. Chem.* 192, 623–628
58 Lindberg, J. *et al.* (2002) Efficient synthesis of phospholipids from glycidyl phosphates. *J. Org. Chem.* 67, 194–199
59 Stuart, M.C.A. and Boekema, E.J. (2007) Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid–detergent systems. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1768, 2681–2689
60 Kongsuphol, P. *et al.* (2013) Lipid bilayer technologies in ion channel recordings and their potential in drug screening assay. *Sens. Actuators B Chem.* 185, 530–542
61 Gutsmann, T. *et al.* (2015) Protein reconstitution into freestanding planar lipid membranes for electrophysiological characterization. *Nat. Protoc.* 10, 188–198
62 Bayley, H. *et al.* (2008) Droplet interface bilayers. *Mol. Biosyst.* 4, 1191–1208
63 Gómez-Hens, A. and Manuel Fernández-Romero, J. (2005) The role of liposomes in analytical processes. *TrAC Trends Anal. Chem.* 24, 9–19

64 Weso\lowska, O. *et al.* (2009) Giant unilamellar vesicles—a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochim Pol* 56, 33–39
65 Walde, P. *et al.* (2010) Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem* 11, 848–865
66 Orosz, D.E. and Garlid, K.D. (1993) A sensitive new fluorescence assay for measuring proton transport across liposomal membranes. *Anal. Biochem.* 210, 7–15
67 Chanda, B. and Mathew, M.K. (1999) Functional reconstitution of bacterially expressed human potassium channels in proteoliposomes: membrane potential measurements with JC-1 to assay ion channel activity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1416, 92–100
68 Schmidt, A. *et al.* (1992) Streptavidin binding to biotinylated lipid layers on solid supports. A neutron reflection and surface plasmon optical study. *Biophys. J.* 63, 1385
69 Stroumpoulis, D. *et al.* (2006) A kinetic study of vesicle fusion on silicon dioxide surfaces by ellipsometry. *AIChE J.* 52, 2931–2937
70 Andrecka, J. *et al.* (2013) Direct Observation and Control of Supported Lipid Bilayer Formation with Interferometric Scattering Microscopy. *ACS Nano* 7, 10662–10670
71 Hsieh, C.-L. *et al.* (2014) Tracking Single Particles on Supported Lipid Membranes: Multimobility Diffusion and Nanoscopic Confinement. *J. Phys. Chem. B* 118, 1545–1554
72 Tamm, L.K. *et al.* (1996) Nanostructure of supported phospholipid monolayers and bilayers by scanning probe microscopy. *Thin Solid Films* 284–285, 813–816
73 Keller, C.A. and Kasemo, B. (1998) Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.* 75, 1397–1402
74 Sackmann, E. (1996) Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* 271, 43–48
75 Jackman, J. *et al.* (2012) Biotechnology Applications of Tethered Lipid Bilayer Membranes. *Materials* 5, 2637–2657
76 Magliulo, M. *et al.* (2013) Electrolyte-Gated Organic Field-Effect Transistor Sensors Based on Supported Biotinylated Phospholipid Bilayer. *Adv. Mater.* 25, 2090–2094
77 Johnson, S.J. *et al.* (1991) Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular reflection of neutrons. *Biophys. J.* 59, 289–294
78 Brian, A.A. and McConnell, H.M. (1984) Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 6159–6163
79 Richter, R.P. and Brisson, A.R. (2005) Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry. *Biophys. J.* 88, 3422–3433
80 Cho, N.-J. *et al.* (2010) Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates. *Nat. Protoc.* 5, 1096–1106
81 Knoll, W. *et al.* (2000) Functional tethered lipid bilayers. *Rev. Mol. Biotechnol.* 74, 137–158
82 Deng, Y. *et al.* (2008) Fluidic and air-stable supported lipid bilayer and cell-mimicking microarrays. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 6267–6271
83 Andersson, M. *et al.* (2007) Detection of single ion channel activity on a chip using tethered bilayer membranes. *Langmuir* 23, 2924–2927
84 Junge, F. *et al.* (2008) Large-scale production of functional membrane proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1729–1755
85 Demarche, S. *et al.* (2011) Techniques for recording reconstituted ion channels. *Analyst* 136, 1077–1089
86 Rigaud, J.-L. and Lévy, D. (2003) Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes. 372 (Enzymology, B.-M. in, ed), pp. 65–86, Academic Press
87 Zagnoni, M. *et al.* (2007) Controlled delivery of proteins into bilayer lipid membranes on chip. *Lab. Chip* 7, 1176–1183
88 Studer, A. *et al.* (2011) Integration and recording of a reconstituted voltage-gated sodium channel in planar lipid bilayers. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1924–1928
89 Marius, P. *et al.* (2008) Binding of Anionic Lipids to at Least Three Nonannular Sites on the Potassium Channel KcsA is Required for Channel Opening. *Biophys. J.* 94, 1689–1698

90 Whittaker, J.W. (2013) Cell-free protein synthesis: the state of the art. *Biotechnol. Lett.* 35, 143–152
91 Junge, F. *et al.* (2011) Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins. *New Biotechnol.* 28, 262–271
92 Sachse, R. *et al.* (2014) Membrane protein synthesis in cell-free systems: From bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS Lett.* 588, 2774–2781
93 Berrier, C. *et al.* (2004) Cell-Free Synthesis of a Functional Ion Channel in the Absence of a Membrane and in the Presence of Detergent †. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 12585–12591
94 Wuu, J.J. and Swartz, J.R. (2008) High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 1237–1250
95 Bhakdi, S. and Tranum-Jensen, J. (1991) Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. *Microbiol. Rev.* 55, 733–751
96 Kol, S. *et al.* (2013) Heterologous expression and purification of an active human TRPV3 ion channel. *FEBS J.* 280, 6010–6021
97 Rosenberg, R.L. and East, J.E. (1992) Cell-free expression of functional Shaker potassium channels. *Nature* 360, 166–169
98 Warner Instruments - Planar Bilayer Workstation. . [Online]. Available: https://www.warneronline.com
99 Mayer, M. *et al.* (2003) Microfabricated teflon membranes for low-noise recordings of ion channels in planar lipid bilayers. *Biophys. J.* 85, 2684–2695
100 Montal, M. and Mueller, P. (1972) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 3561–3566
101 Mueller, P. *et al.* (1962) Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System. *Nature* 194, 979–980
102 Mueller, P. *et al.* (1963) Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* 67, 534–535
103 Dalziel, J.E. *et al.* (2007) Expression of human BK ion channels in Sf9 cells, their purification using metal affinity chromatography, and functional reconstitution into planar lipid bilayers. *J. Chromatogr. B* 857, 315–321
104 Han, X. *et al.* (2007) Nanopore arrays for stable and functional free-standing lipid bilayers. *Adv. Mater.* 19, 4466–4470
105 Cohen, F.S. *et al.* (1980) Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes. II. Incorporation of a vesicular membrane marker into the planar membrane. *J. Gen. Physiol.* 75, 251–270
106 Woodbury, D.J. (1999) Nystatin/ergosterol method for reconstituting ion channels into planar lipid bilayers. *Methods Enzymol.* 294, 319–339
107 Costa, J.A. *et al.* (2013) Wicking: A Rapid Method for Manually Inserting Ion Channels into Planar Lipid Bilayers. *PLoS ONE* 8, e60836
108 Richens, J.L. *et al.* (2015) The interactions of squalene, alkanes and other mineral oils with model membranes; effects on membrane heterogeneity and function. *J. Colloid Interface Sci.* 457, 225–231
109 Hirano-Iwata, A. *et al.* (2010) Free-Standing Lipid Bilayers in Silicon Chips−Membrane Stabilization Based on Microfabricated Apertures with a Nanometer-Scale Smoothness. *Langmuir* 26, 1949–1952
110 Wonderlin, W.F. *et al.* (1990) Optimizing planar lipid bilayer single-channel recordings for high resolution with rapid voltage steps. *Biophys. J.* 58, 289–297
111 Sondermann, M. *et al.* (2006) High-resolution electrophysiology on a chip: Transient dynamics of alamethicin channel formation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1758, 545–551
112 Geddes, L.A. *et al.* (1969) Optimum electrolytic chloriding of silver electrodes. *Med. Biol. Eng.* 7, 49–56
113 Rosenstein, J.K. *et al.* (2012) Integrated nanopore sensing platform with sub-microsecond temporal resolution. *Nat. Methods* 9, 487–492

114 Benndorf, K. (1995) Low-Noise Recording. In *Single-Channel Recording* (Sakmann, B. and Neher, E., eds), pp. 129–145, Springer US
115 Levis, R.A. and Rae, J.L. (1998) Low-noise patch-clamp techniques. In *Methods in Enzymology* 293 (Conn, P. M., ed), pp. 218–266, Academic Press
116 Sherman-Gold, R. (1993) *The Axon guide for electrophysiology & biophysics laboratory techniques*, Axon Instruments Inc.
117 Hall, J.E. (1975) Access resistance of a small circular pore. *J. Gen. Physiol.* 66, 531–532
118 Gaßmann, O. *et al.* (2009) The M34A mutant of Connexin26 reveals active conductance states in pore-suspending membranes. *J. Struct. Biol.* 168, 168–176
119 Rosenstein, J.K. *et al.* (2013) Single ion channel recordings with CMOS-anchored lipid membranes. *Nano Lett.* 13, 2682–2686
120 White, S.H. (1972) Analysis of the torus surrounding planar lipid bilayer membranes. *Biophys. J.* 12, 432–445
121 Peterman, M.C. *et al.* (2002) Ion channels and lipid bilayer membranes under high potentials using microfabricated apertures. *Biomed. Microdevices* 4, 231–236
122 Kawano, R. *et al.* (2010) A Polymer-Based Nanopore-Integrated Microfluidic Device for Generating Stable Bilayer Lipid Membranes. *Small* 6, 2100–2104
123 White, R.J. *et al.* (2007) Single Ion-Channel Recordings Using Glass Nanopore Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 11766–11775
124 Ide, T. *et al.* (2002) Development of an experimental apparatus for simultaneous observation of optical and electrical signals from single ion channels. *Single Mol.* 3, 33–42
125 Rajapaksha, S.P. *et al.* (2013) Suspended Lipid Bilayer for Optical and Electrical Measurements of Single Ion Channel Proteins. *Anal. Chem.* 85, 8951–8955
126 Honigmann, A. *et al.* (2010) Characterization of Horizontal Lipid Bilayers as a Model System to Study Lipid Phase Separation. *Biophys. J.* 98, 2886–2894
127 Weatherill, E.E. and Wallace, M.I. (2015) Combining Single-Molecule Imaging and Single-Channel Electrophysiology. *J. Mol. Biol.* 427, 146–157
128 Suzuki, H. *et al.* (2004) Planar lipid bilayer reconstitution with a micro-fluidic system. *Lab. Chip* 4, 502
129 Suzuki, H. *et al.* (2007) Electrophysiological recordings of single ion channels in planar lipid bilayers using a polymethyl methacrylate microfluidic chip. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1111–1115
130 Le Pioufle, B. *et al.* (2008) Lipid bilayer microarray for parallel recording of transmembrane ion currents. *Anal. Chem.* 80, 328–332
131 Wang, W. *et al.* (2012) Activity monitoring of functional OprM using a biomimetic microfluidic device. *Analyst* 137, 847–852
132 Suzuki, H. *et al.* (2006) Highly reproducible method of planar lipid bilayer reconstitution in polymethyl methacrylate microfluidic chip. *Langmuir* 22, 1937–1942
133 Saha, S.C. *et al.* (2015) Screening ion-channel ligand interactions with passive pumping in a microfluidic bilayer lipid membrane chip. *Biomicrofluidics* 9, 14103
134 Funakoshi, K. *et al.* (2006) Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Anal. Chem.* 78, 8169–8174
135 Portonovo, S.A. *et al.* (2013) hERG drug response measured in droplet bilayers. *Biomed. Microdevices* 15, 255–259
136 Portonovo, S.A. and Schmidt, J. (2012) Masking apertures enabling automation and solution exchange in sessile droplet lipid bilayers. *Biomed. Microdevices* 14, 187–191
137 Vijayvergiya, V. *et al.* (2015) Measurement of Ensemble TRPV1 Ion Channel Currents Using Droplet Bilayers. *Plos One* 10, e0141366
138 Kresák, S. *et al.* (2009) Giga-seal solvent-free bilayer lipid membranes: from single nanopores to nanopore arrays. *Soft Matter* 5, 4021–4032
139 Schmidt, C. *et al.* (2000) A chip-based biosensor for the functional analysis of single ion channels. *Angew. Chem.* 112, 3267–3270

140 Dezi, M. *et al.* (2013) Detergent-mediated incorporation of transmembrane proteins in giant unilamellar vesicles with controlled physiological contents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 7276–7281
141 Varnier, A. *et al.* (2010) A Simple Method for the Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles. *J. Membr. Biol.* 233, 85–92
142 Girard, P. *et al.* (2004) A New Method for the Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* 87, 419–429
143 Briand, E. *et al.* (2010) Combined QCM-D and EIS study of supported lipid bilayer formation and interaction with pore-forming peptides. *The Analyst* 135, 343–350
144 Reimhult, E. *et al.* (2006) A Multitechnique Study of Liposome Adsorption on Au and Lipid Bilayer Formation on SiO2. *Langmuir* 22, 3313–3319
145 Pace, S. *et al.* (2012) Characterization of phospholipid bilayer formation on a thin film of porous SiO2 by reflective interferometric Fourier transform spectroscopy (RIFTS). *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 28, 6960–6969
146 Steltenkamp, S. *et al.* (2006) Mechanical properties of pore-spanning lipid bilayers probed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 91, 217–226
147 Kumar, K. *et al.* (2011) Formation of nanopore-spanning lipid bilayers through liposome fusion. *Langmuir* 27, 10920–10928
148 Kleefen, A. *et al.* (2010) Multiplexed parallel single transport recordings on nanopore arrays. *Nano Lett.* 10, 5080–5087
149 Urban, M. *et al.* (2014) Highly Parallel Transport Recordings on a Membrane-on-Nanopore Chip at Single Molecule Resolution. *Nano Lett.* 14, 1674–1680
150 Schmitt, E.K. *et al.* (2009) Impedance analysis of gramicidin D in pore-suspending membranes. *Soft Matter* 5, 3347–3353
151 Schmitt, E.K. *et al.* (2008) Electrically insulating pore-suspending membranes on highly ordered porous alumina obtained from vesicle spreading. *Soft Matter* 4, 250–253
152 Korman, C.E. *et al.* (2013) Nanopore-spanning lipid bilayers on silicon nitride membranes that seal and selectively transport ions. *Langmuir* 29, 4421–4425
153 Quist, A.P. *et al.* (2007) Atomic force microscopy imaging and electrical recording of lipid bilayers supported over microfabricated silicon chip nanopores: lab-on-a-chip system for lipid membranes and ion channels. *Langmuir* 23, 1375–1380
154 Buchholz, K. *et al.* (2008) Silicon-on-insulator based nanopore cavity arrays for lipid membrane investigation. *Nanotechnology* 19, 445305
155 Jönsson, P. *et al.* (2010) Sealing of Submicrometer Wells by a Shear-Driven Lipid Bilayer. *Nano Lett.* 10, 1900–1906
156 Cremer, P.S. and Boxer, S.G. (1999) Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports. *J. Phys. Chem. B* 103, 2554–2559
157 Furukawa, K. *et al.* (2006) Supported Lipid Bilayer Self-Spreading on a Nanostructured Silicon Surface. *Langmuir* 23, 367–371
158 Nanion Technologies - Products - Port-a-Patch. . [Online]. Available: http://www.nanion.de/products/port-a-patch.html. [Accessed: 26-Apr-2016]

Chapitre 2 : Fabrication et caractérisation morphologique des dispositifs

1. Introduction :

La Figure 1 montre un schéma du dispositif final, avec les dimensions des différents éléments qui le constituent. Les nanopores et le nanocanal enfoui sont élaborés sur la face avant d'un substrat SOI en utilisant des procédés de micro et nanofabrication conventionnels. Les nanopores forment une ligne de longueur 1 mm (Figure 1 a). Le nanocanal enfoui est gravé par attaque chimique via les nanopores, il a donc pour longueur 1 mm. Cette longueur permet d'aligner manuellement la cellule fluidique sur la puce de silicium. Les microcanaux de la cellule fluidique ont une largeur de 50 µm. En fonction du pas entre les nanopores (1 à 10 µm), il en résulte un nombre n_0 de nanopores placés dans chaque compartiment. Un oxyde thermique de 100 nm d'épaisseur est réalisé sur le silicium pour isoler électriquement (hors conduction via les nanopores) les deux compartiments.

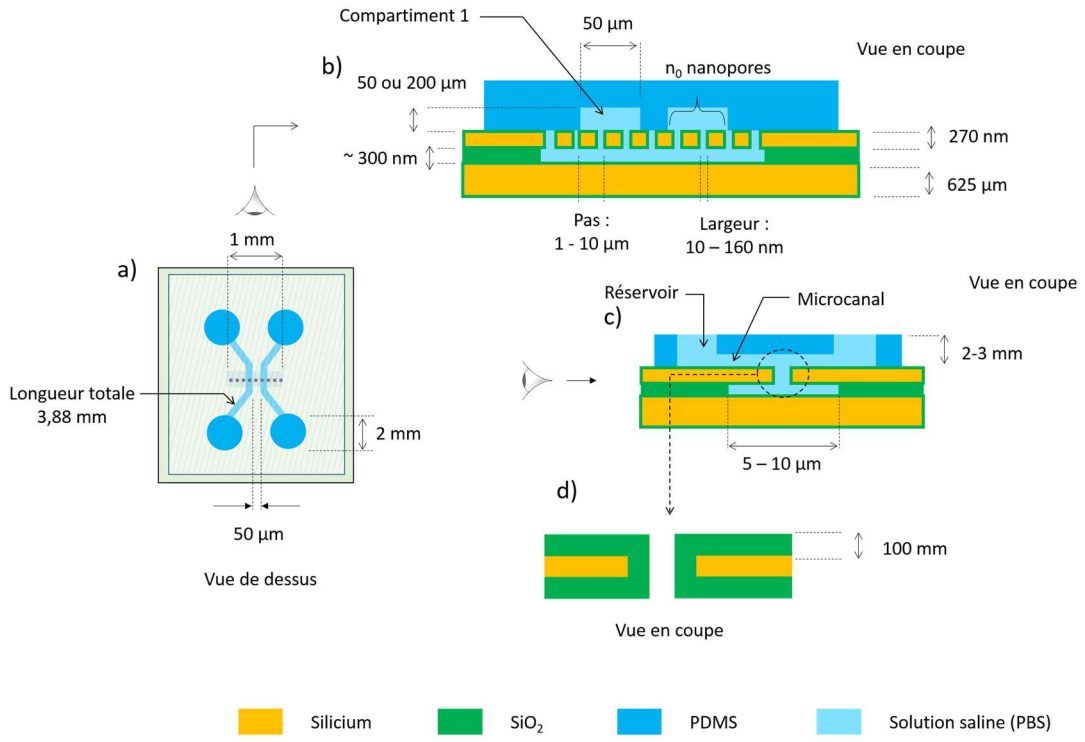


Figure 1 : schéma du dispositif, montrant les dimensions des différents éléments. a) vue d'ensemble par le dessus. b) et c) vues en coupe. d) vue en coupe agrandie au niveau d'un nanopore.

Nous allons maintenant décrire et caractériser séquentiellement la fabrication des nanopores et du nanocanal enfoui sur le substrat SOI, puis la fabrication des cellules fluidiques de PDMS et enfin l'assemblage de ces deux parties. Des informations complémentaires sont consignées dans l'annexe décrivant les protocoles expérimentaux (annexe n°1).

2. Fabrication et caractérisation des nanopores et du nanocanal enfoui

Le procédé de fabrication se déroule en 4 étapes, que nous avons décrites dans un article [1] et résumées dans la Figure 2 :

- Une lithographie électronique pour définir les motifs des nanopores dans une résine électrosensible positive : le Poly(MethylMethAcrylate) (PMMA).
- Une gravure ionique réactive (RIE) pour transférer les motifs dans la couche supérieure de silicium en utilisant les motifs de résine comme masque.
- Une gravure humide de l'oxyde enfoui (BOX) à l'acide fluorhydrique pour créer le nanocanal enfoui.
- Une oxydation thermique pour rendre les surfaces isolantes.

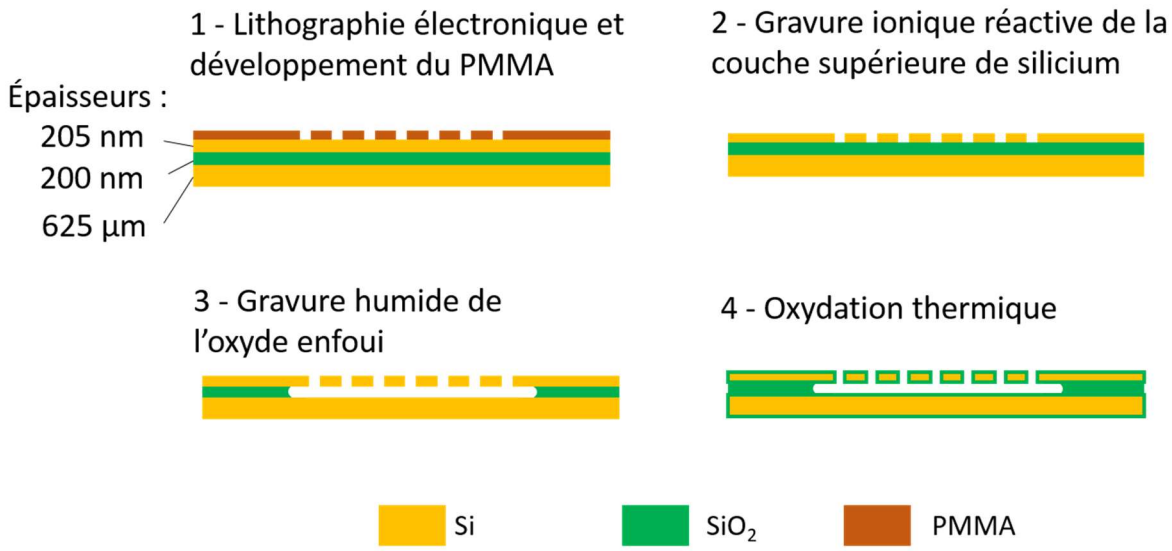


Figure 2 : schéma du procédé de fabrication des nanopores et du nanocanal enfoui à partir d'un substrat SOI.

Les substrats SOI 6 pouces utilisés (Soitec, France) sont de type (100). La couche supérieure est en silicium de type P de résistivité comprise entre 13,5 à 22,5 Ω.cm et présente une épaisseur de 205 nm. L'oxyde enfoui a pour épaisseur 200 nm. Enfin, le substrat de silicium est de type N, de résistivité comprise entre 1 et 2 Ω.cm, et a pour épaisseur 625 µm.

Comme nous allons le voir, les « effets de proximité » inhérents à la lithographie électronique, ainsi qu'un effet d'ARDE (Aspect Ratio Dependant Etching) ne nous permettent pas de fabriquer directement des nanopores de diamètre inférieur à 75 nm et débouchant sur l'oxyde enfoui. Cependant, nous verrons que l'étape d'oxydation thermique entraine une déformation des nanopores et une réduction de leur dimension latérale (Figure 3). Nous avons donc utilisé cette étape pour réduire la dimension des nanopores. Ainsi, grâce à cette méthode, nous avons pu obtenir des nanopores de dimension latérale atteignant 10 nm. NB : nous parlerons de **diamètre** pour les nanopores avant

oxydation car ceux-ci sont circulaires en vue de dessus. Après oxydation, ils acquièrent une forme légèrement carrée, nous utiliserons donc le terme de **dimension latérale**.

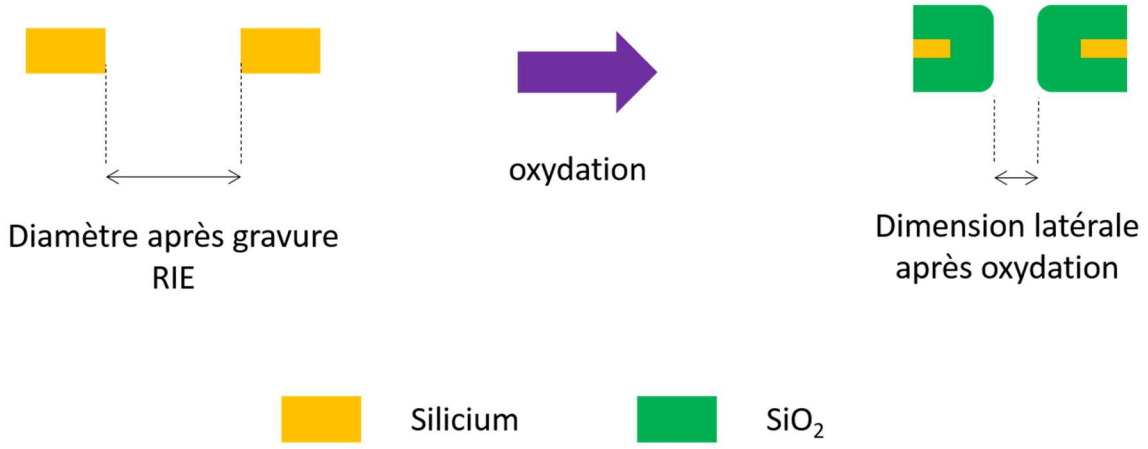


Figure 3 : schéma en coupe montrant l'oxydation des nanopores, phénomène que nous avons utilisé pour réduire la dimension finale des nanopores.

2.1 Lithographie électronique des nanopores

Il est important pour l'application visée de contrôler le diamètre des nanopores de manière reproductible. Nous nous attendons en effet à ce que ce paramètre ait une influence significative sur le scellement ou non des nanopores, pour une taille moyenne donnée de vésicules. Le contrôle du diamètre des nanopores permettra donc d'étudier cette influence. Par ailleurs, le pas entre les nanopores doit être contrôlé à une échelle micrométrique, d'une part pour pouvoir contrôler le nombre de nanopores n_0 se trouvant au sein d'un compartiment, d'autre part, pour que la gravure humide du nanocanal enfoui permette d'obtenir un canal continu. Pour ces différentes raisons, nous avons utilisé la lithographie électronique, qui permet de répondre à ce cahier des charges.

La Figure 4 montre le principe de la lithographie électronique : un microscope électronique à balayage est utilisé pour insoler une résine électrosensible déposée sur le substrat. Le mécanisme de balayage est montré sur la Figure 4 a) : des bobines de déflexion permettent de dessiner les motifs avec le faisceau d'électron, et un effaceur électrostatique permet de dévier le faisceau hors de l'échantillon pour passer d'une structure à une autre. Nous utilisons comme résine électrosensible une couche de PMMA de 410 nm d'épaisseur (mesurée au profilomètre mécanique) déposée par « spin-coating ». Comme il le sera vu par la suite, cette épaisseur est nécessaire pour supporter la durée de la gravure ionique réactive permettant de transférer les nanopores les plus petits dans la couche supérieure de silicium du substrat. Le PMMA est une résine positive : lorsqu'elle est insolée par le faisceau d'électrons, certaines liaisons des chaînes de polymère de la résine sont détruites, ce qui augmente leur solubilité dans le solvant utilisé pour développer la résine (dans notre cas, un mélange MIBK/IPA, 1:3 vol.) Les parties insolées seront donc évacuées par l'étape de développement (Figure 4 b).

Nous avons représenté sur la Figure 4 b) des électrons qui sont rétrodiffusés par le substrat à cause de l'interaction inélastique entre le faisceau incident d'électrons et les noyaux des atomes du substrat. Ces électrons rétrodiffusés, ainsi que les électrons secondaires qu'ils créent lors de leur interaction avec le substrat, insolent la résine qui se trouve à proximité du faisceau incident, jusqu'à une distance

de quelques micromètres. Ceci résulte en des phénomènes dits « de proximité » : comme le montre la figure, la zone insolée dans la résine est plus large que la zone balayée par le faisceau incident d'électrons. Notons que l'élargissement n'est généralement pas de quelques micromètres : la résine sera retirée par l'étape de développement lorsque la quantité d'électrons absorbés localement dépasse une certaine valeur seuil. Si une structure nanométrique isolée est insolée, l'élargissement sera de l'ordre de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres en fonction de la quantité d'électrons envoyée. Cependant, lorsque plusieurs structures proches les unes des autres sont insolées, les effets de proximité s'additionnent, leur « portée » étant de quelques micromètres, de sorte qu'il y aura un élargissement des structures plus importantes que dans le cas d'une structure isolée. Une première insolation « test », permettant de calibrer la dose (quantité d'électrons envoyés par unité de surface du motif) à utiliser est donc réalisée pour chaque nouveau motif.

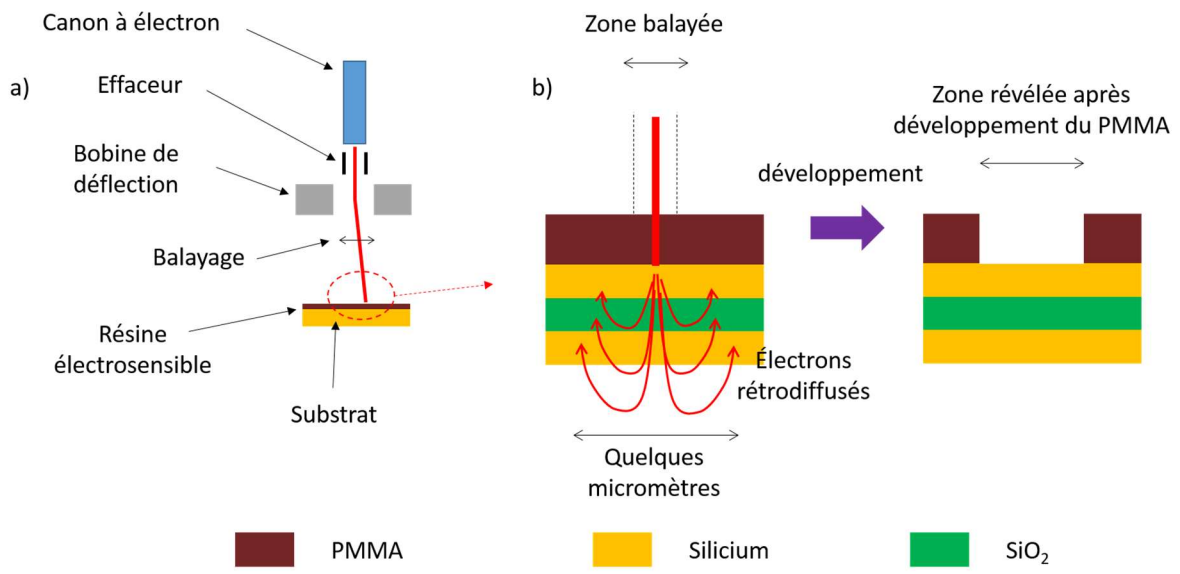


Figure 4 : a) schéma montrant le principe de l'insolation d'une résine électrosensible par lithographie électronique. b) schéma en coupe montrant la rétrodiffusion des électrons par le substrat, et l'influence sur la taille des motifs (pour le cas d'une résine positive telle que le PMMA).

Les phénomènes de proximité limitent ainsi la résolution maximale pouvant être atteinte. Par exemple, dans le cas où un point est insolé (pas de balayage), le résultat après révélation est un nanopore, dont le diamètre dépend de la dose utilisée. Plus la dose est petite, plus le diamètre du nanopore obtenu est petit. En dessous d'une dose seuil, aucun nanopore n'est obtenu. La résolution maximale dépend aussi de la résine utilisée et de l'épaisseur. Dans notre cas, cette résolution est d'environ 10 nm.

Comme le montre la Figure 5, pour insoler une surface, le masqueur[1] convertit la surface en un réseau de lignes dont l'écart est fixé, *via* le pas entre les points, par l'utilisateur à une valeur inférieure à la résolution de la résine, soit 10 nm dans notre cas. Le courant associé au faisceau d'électrons étant constant lors d'une insolation, c'est la vitesse de balayage du faisceau qui est ajustée en fonction de la dose à appliquer au motif. Selon que la structure à insoler soit une ligne, une surface, ou un point, la dose est exprimée en µC/cm², en pC/cm, ou en pC/pt (par point). Pour le cas d'une surface, par exemple un rectangle (Figure 5), l'utilisateur dessine un rectangle sur le fichier pilotant l'insolation. Il

[1] Le microscope électronique utilisé pour insoler et le logiciel qui permet de le piloter

lui attribue une dose en µC/cm², et un pas inférieur à la résolution de la résine utilisée. Le logiciel calcule le balayage à effectuer et la vitesse du faisceau pour la surface de la structure reçoive une quantité d'électrons ramenée à sa surface égale à celle spécifiée par la dose.

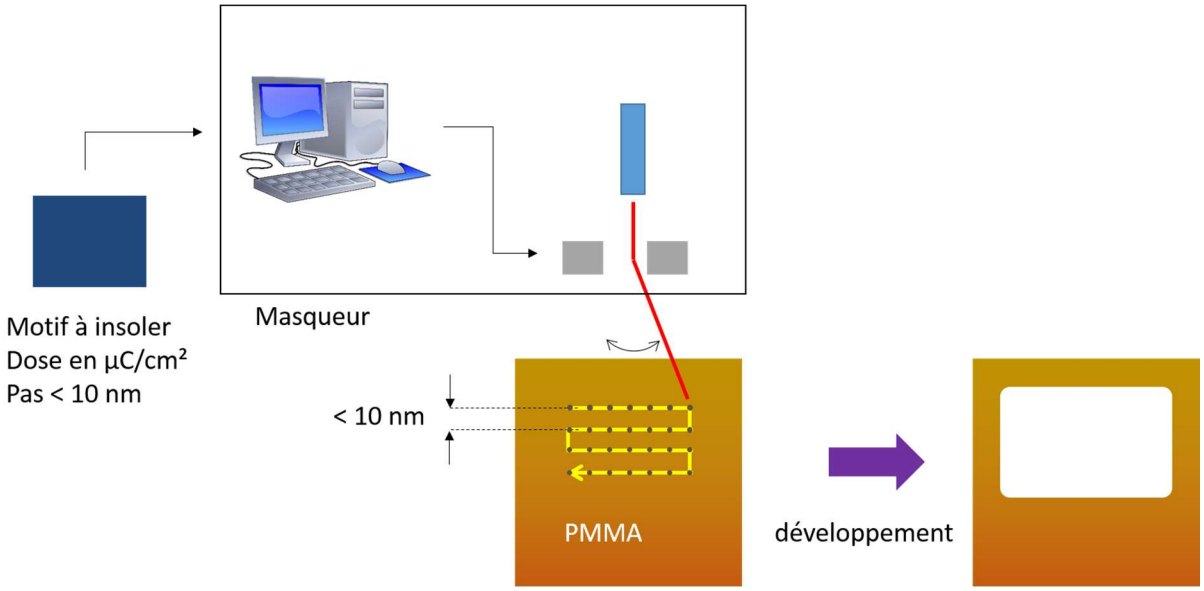


Figure 5 : schéma montrant le procédé couramment utilisé pour insoler une surface. La dose surfacique est convertie par l'ordinateur en un réseau de lignes à insoler.

Nous n'avons pas utilisé le « mode point » pour définir les nanopores dans la résine, car dans ce cas, la forme du nanopore obtenu est dépendante du réglage de l'astigmatisme du faisceau. Si le faisceau est légèrement astigmate, les nanopores obtenus ne sont pas circulaires mais elliptiques. Nous n'avons pas non plus utilisé des disques pour définir les nanopores, car notre masqueur (Raith 150) ne gère pas bien dans ce cas la conversion en lignes balayées, de sorte que des défauts de circularité sont observés [2]. Nous avons donc défini nous-même le balayage du faisceau, en utilisant des motifs en étoiles issus de précédents travaux de notre équipe [2]. Ces motifs sont représentés sur la Figure 6 a) et b). Le nombre de branches des étoiles est ajusté en fonction de la largeur des étoiles afin que la distance entre les pointes des branches soit toujours inférieure à la résolution de l'insolation après développement, soit environ 10 nm. Comme le montre la Figure 6 c), ces motifs permettent, en cas d'astigmatisme résiduel du faisceau, d'obtenir quand même une répartition radiale de la quantité d'électrons envoyés, et donc une forme circulaire à l'issue du développement : cette répartition radiale résulte des balayages multiples du faisceau lorsqu'il dessine les étoiles. Nous identifions les nanopores par leur **diamètre nominal**, que l'on définit comme le diamètre de l'étoile utilisé pour coder les nanopores. Nous verrons par la suite qu'à cause des effets de proximité, ce diamètre est beaucoup plus petit que le diamètre réel des nanopores obtenus après développement et gravure RIE. Nous avons utilisé comme valeur de diamètres nominaux : 10 nm, 18 nm, 36 nm, 90 nm, 107 nm et 142 nm.

Les étoiles utilisées pour définir les nanopores étant formées de lignes, une dose linéique en pC/cm est utilisée comme paramètre d'insolation. Chaque étoile recevra une quantité d'électrons proportionnelle à cette dose, au nombre de branches, et au diamètre de l'étoile. Les différentes doses utilisées sont indiquées en annexe. Notons que, par exemple, pour un nanopore de diamètre nominal 10 nm, le nombre théorique d'électrons envoyés sur la résine est de 20.10^3 alors qu'il atteint une valeur de 25.10^4 pour un nanopore de diamètre nominal 90 nm (36 branches). Cette différence explique clairement que les nanopores codés à 90 nm seront de diamètre bien supérieur à ceux codés à 10 nm.

Nous reviendrons sur ce point dans la discussion sur la caractérisation des nanopores à l'issue de la gravure RIE. Notons également que le nombre moyen d'électrons envoyé par nanopore N est de plusieurs dizaines de milliers ce qui limite les fluctuations statistiques « en $\sqrt{N}$ » et permet donc d'obtenir une très bonne reproductibilité sur le diamètre des nanopores le long d'une ligne.

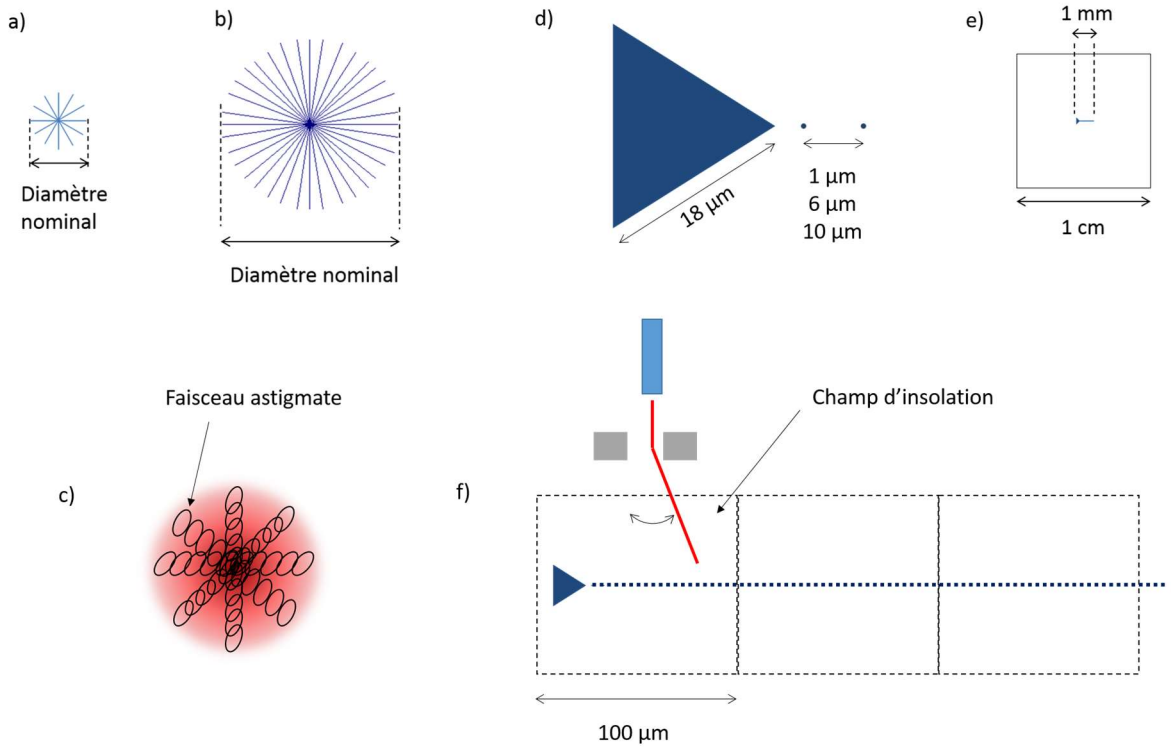


Figure 6 : a) motif utilisé pour un nanopore de diamètre nominal 10 nm. b) motif utilisé pour un nanopore de diamètre nominal 90 nm. c) schéma montrant la répartition radiale de la quantité d'électrons envoyés sur l'échantillon même dans le cas d'un faisceau légèrement astigmate. d) triangle utilisé pour les triangles d'alimentation. Une des pointes indique la direction de la ligne de nanopores. e) représentation schématique d'un échantillon comprenant une ligne de nanopores et le triangle d'alimentation. f) schéma montrant le découpage de la ligne en champs d'insolation.

Les nanopores sont placés en ligne et sont régulièrement espacés avec un pas de 1 µm, 6 µm ou 10 µm, et de longueur 1 mm. Cette géométrie est nécessaire pour pouvoir former le nanocanal enfoui, comme il le sera vu par la suite. Afin de pouvoir repérer l'emplacement des nanopores facilement au MEB à faible grossissement lors de leur caractérisation ultérieure, un triangle micrométrique de 18 µm de côté, visible sur la Figure 6 d) est réalisé au bout de la ligne de nanopores, une des pointes indiquant la position du premier nanopore de la ligne. Comme nous le verrons plus loin, ces triangles, qui seront gravés dans la couche supérieure de silicium, communiqueront avec le nanocanal enfoui et permettent d'en faciliter le remplissage. C'est pourquoi nous appelons ces triangles les triangles d'alimentation. Lorsqu'un échantillon est insolé, le logiciel pilotant l'insolation découpe le dessin en champs de 100 µm de côté (Figure 6 f). Le faisceau balaye d'abord un premier champ grâce aux bobines de déflexion. Le pas minimum entre deux point pouvant être atteints par le faisceau est fixé par le rapport de la largeur du champ sur la résolution du convertisseur numérique-analogique pilotant les bobines de déflexion du faisceau. Il vaut dans notre cas 2 nm. Une fois le champ insolé, la platine sur lequel est posé l'échantillon se déplace pour que le deuxième champ soit placé sous le faisceau. L'erreur sur la position de la platine est mesurée à l'échelle nanométrique grâce à un interféromètre optique. Une

correction est appliquée sur le balayage pour prendre en compte cette erreur, pour chaque champ. La hauteur de l'échantillon est aussi asservie pour que le faisceau d'électrons soit toujours focalisé sur la surface de l'échantillon. Dans notre cas, la distance entre la surface de l'échantillon et la lentille objectif (ou distance de travail) est fixée à 7,5 mm.

Afin de ne pas passer trop de temps en de multiples réglages du système de lithographie électronique avant insolation, nous insolons des substrats de grande surface, généralement des quarts de substrat de 6 pouces. Sur ces substrats sont définis quarante échantillons carrés de 1 cm de côté. Les échantillons seront ensuite clivés en groupes de 6 à 8 échantillons pour mener les autres étapes du procédé de fabrication, puis clivés individuellement avant l'assemblage avec la cellule fluidique. Le temps nécessaire pour insoler un échantillon est d'environ 3 min, ce qui permet d'insoler les quarante échantillons d'un même substrat en deux heures. Ce temps est proportionnel à la quantité totale d'électrons envoyée par échantillon, et donc à la surface totale de motifs présent au sein d'un échantillon. Nous pouvons donc remarquer l'intérêt d'insoler des triangles le plus petit possible répondant à nos besoins, et un nombre restreint de nanopores. C'est pour cela que nous avons conçu notre dispositif avec une seule ligne de nanopores, que nous avons fixé sa longueur à une valeur minimale permettant un alignement manuel entre la cellule fluidique de PDMS et la puce de silicium. Par ailleurs, la largeur des triangles a été fixée à la valeur minimale permettant de repérer le triangle lors de la caractérisation des nanopores par microscopie électronique à balayage.

L'insolation est réalisée avec une tension d'accélération de 20 kV. Le faisceau d'électrons correspond à un courant compris entre 90 et 110 pA. La résine est développée en immergeant les échantillons pendant 2 min dans un mélange MIBK / IPA (1 / 3 vol.), à température ambiante (20°C) sans agitation et sans utiliser d'ultra-sons. Les échantillons sont ensuite rincés à l'isopropanol et séchés sous un flux de diazote.

2.2 Gravure ionique réactive des nanopores

Les motifs sont ensuite transférés dans la couche supérieure de silicium au moyen d'une gravure ionique réactive (gravure RIE) de type fluorée au sein d'un bâti de gravure plasma à couplage inductif (Alcatel Multiplex AMS4200). Les paramètres de gravure sont les suivants : 3 min 35 s, SF_6 (30 sccm), C_4F_8 (45 sccm), O_2 (3 sccm), Pression : 8.10^{-3} mBar, Puissance ICP : 450 W, Puissance bias : 30 W. A l'issue de la gravure, il reste une couche de PMMA résiduelle de 20 à 30 nanomètres d'épaisseur (à comparer aux 410 nm de départ) qui est retirée avec une gravure plasma oxygène dans le même bâti : 1 min, O_2 (200 sccm), Pression : 8.10^{-2} mBar, Puissance ICP : 600W, Puissance bias : 0 W.

La vitesse de la gravure fluorée a pu être caractérisée indirectement en fonction du diamètre nominal du nanopore à l'aide de la suite du procédé technologique. En effet, l'étape ultérieure de gravure humide de l'oxyde enfoui n'est opérante que si les nanopores sont débouchants sur la couche d'oxyde enfoui c'est à dire lorsque la couche supérieure de silicium de 205 nm a été gravée en totalité. Nous avons pu ainsi observer qu'une durée de gravure RIE de 1 min 10 s permettait d'obtenir des nanopores débouchant pour les diamètres nominaux supérieurs ou égaux à 107 nm, alors qu'une durée de 3 min 35 est nécessaire pour rendre débouchants les nanopores de diamètre nominaux de 10 nm. Nous pouvons donc estimer à 176 nm/min la vitesse de gravure pour les nanopores de diamètre nominal 107 nm, et 57 nm/min pour les nanopores de diamètre nominal 10 nm. La gravure plus lente pour les

nanopores les plus petits est attribuée à un effet d'ARDE (Aspect Ratio Dependant Etching), effet couramment observé dans les gravures ioniques réactives.

Nous avons caractérisé les nanopores obtenus à l'issue de la gravure RIE par microscopie électronique à balayage (microscope FEI Helios 600 i). La Figure 7 montre les images typiquement obtenues. Le fond gris sur les pourtours des images correspond à la surface de la couche supérieure de silicium. Les cercles blancs correspondent à la zone anguleuse (angle de 90°) entre le flanc du nanopore et cette surface. A l'intérieur de cette ligne est présente à certains endroits une zone grise d'une rugosité de quelques nanomètres qui correspond aux flancs du nanopore. Enfin le disque noir correspond au nanopore, le fond étant constitué de l'oxyde enfoui. On peut constater que la forme des nanopores est bien circulaire, avec une légère ellipticité visible sur les diamètres nominaux de 10 nm et 18 nm (Figure 7 c et d).

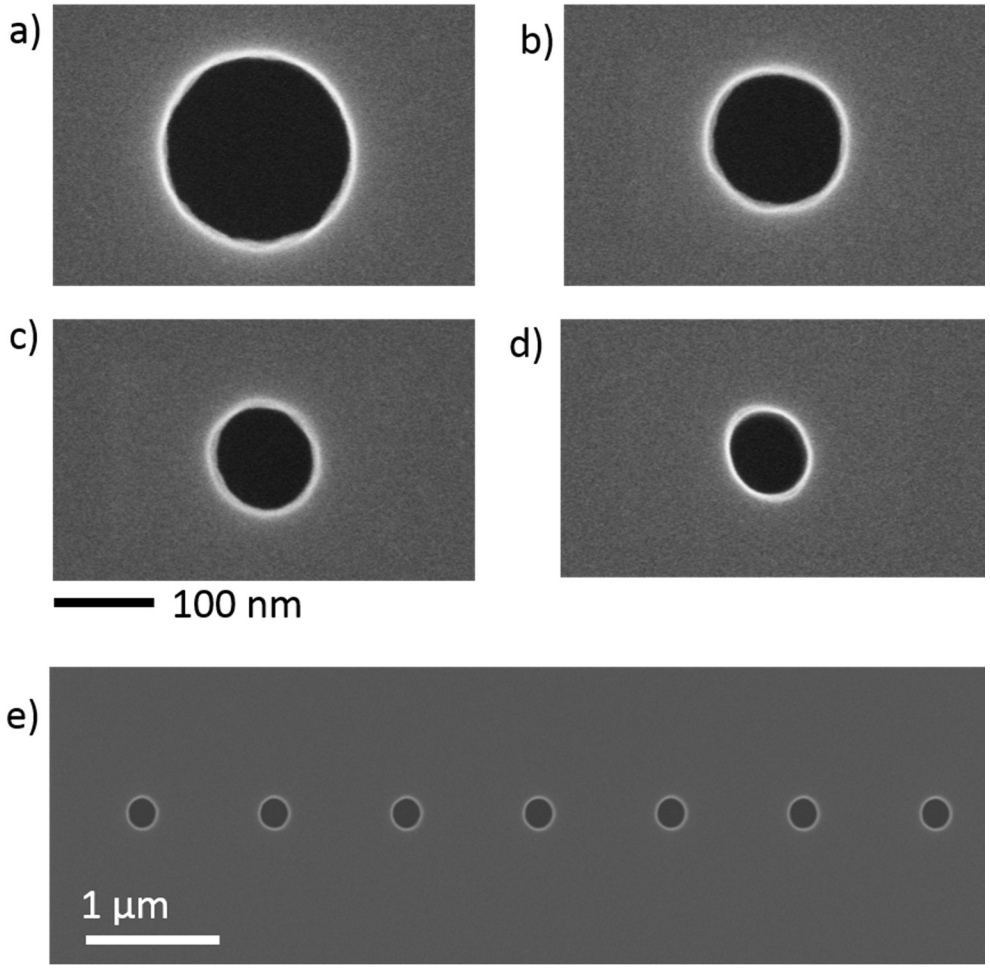


Figure 7 : Images en microscopie électronique à balayage de nanopores obtenus à l'issue de la gravure RIE. a) diamètre nominal 90 nm. b) diamètre nominal 36 nm. c) diamètre nominal 18 nm. d) diamètre nominal 10 nm. e) ligne de nanopores de pas 1 µm et de diamètre nominal 107 nm.

La déformation elliptique des nanopores de diamètre nominaux 10 nm et 18 nm étant toujours constatée dans la même direction par rapport aux dessins, nous pensons qu'elle n'est pas due à un astigmatisme résiduel du faisceau d'électrons lors de l'insolation. En effet si c'était le cas, cet astigmatisme évoluerait lors des différentes insolations, le réglage de l'astigmatisme de faisceau étant fait avant chaque insolation. Nous attribuons cette déformation à un arrondi opéré toujours dans le

même sens lors de la conversion des lignes du motif en un réseau de points insolés. En effet, le pas d'insolation de 2 nm est assez proche du diamètre nominal dans le cas des motifs de 10 nm et 18 nm alors qu'il devient petit devant le diamètre des étoiles nominalement plus larges. Nous n'avons pas cherché à corriger cet effet, dans la mesure où il est léger et ne devrait pas avoir d'impact à priori sur la formation de bicouche suspendues. Nous verrons par ailleurs que l'oxydation thermique ultérieure déforme les nanopores d'une manière bien plus importante que la déformation observée ici.

Nous avons mesuré le diamètre des nanopores à l'issue de la gravure RIE sur deux échantillons conçus pour la caractérisation : chaque échantillon présente plusieurs lignes de nanopores, associée chacune à un diamètre nominal de nanopore. Les deux échantillons appartenaient à un même substrat insolé lors de la lithographie électronique. Ils ont donc été insolés avec un même réglage du faisceau, mais ont été développés et gravés séparément après clivage. Pour chaque échantillon et pour les différents diamètres nominaux, nous avons réalisé une mesure sur N nanopores, appartenant à différents champs d'insolation (voir Figure 6 f). Comme le montre la Figure 8, la mesure a été faite avec le logiciel imageJ de la manière suivante : un trait horizontal est tracé au milieu (par rapport à la verticale) du nanopore. Dans le cas des nanopores elliptique, cette méthode de mesure correspond à une valeur intermédiaire entre le grand diamètre et le petit diamètre de l'ellipse. Par ailleurs, nous avons pris comme limite du nanopore, l'intérieur de la courbe blanche associée à l'angle entre les flancs du nanopore et la surface du substrat. Nous avons considéré que la matière visible à l'intérieur de cette ligne (par exemple dans le cas de la Figure 8 a, extrémité gauche de la ligne de mesure) correspond à la vue de dessus du flanc du nanopore lorsqu'il est légèrement incliné par rapport à la verticale, et ne se trouve donc pas dans le même plan que la ligne blanche.

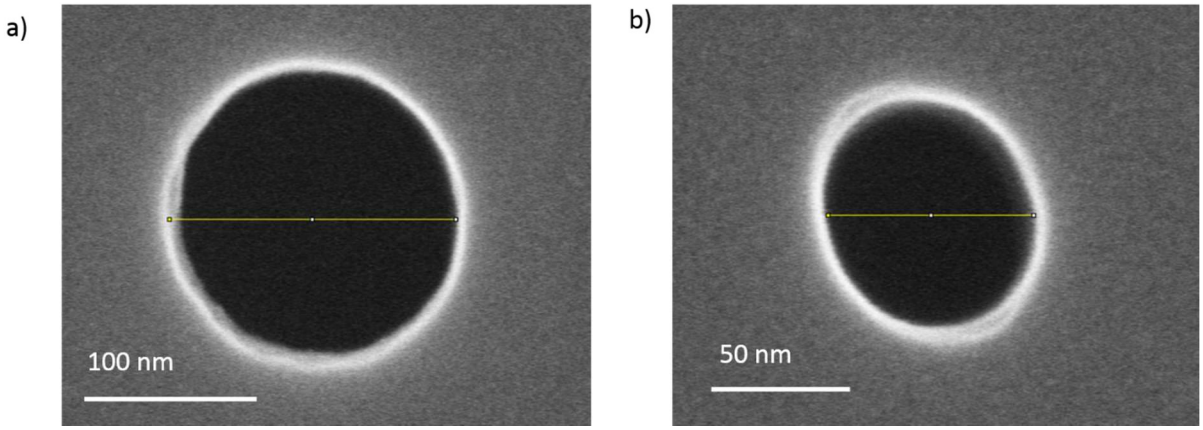


Figure 8 : imprimés écran du logiciel ImageJ monrant de quelle manière ont été réalisées les mesures du diamètre des nanopores. a) nanopore de diamètre nominal 90 nm. b) nanopore de diamètre nominal 10 nm.

Les résultats sont consignés dans le Tableau 1. Nous pouvons noter, comme nous l'avons mentionné, l'écart important entre le diamètre nominal des nanopores et le diamètre réel à l'issue de la gravure RIE, essentiellement dû aux effets de proximité. Pour les nanopores de diamètre nominal 142 nm, le rapport entre le diamètre réel (moyenne sur les deux échantillons) et le diamètre nominal est de 1,6. Pour le diamètre nominal 10 nm, il est de 7,6. Nous avons une incertitude de lecture de ± 3 nm sur chaque mesure. Celle-ci correspond à 2 fois la largeur des graduations définissant la barre d'échelle donnée par le logiciel pilotant le MEB. Pour l'échantillon ou N = 3, les valeurs plus grandes d'incertitudes correspondent à ± 3 σ, σ étant l'écart-type de la série de mesure. Notons qu'une

dispersion plus importante est *a priori* observée, le nombre de mesures que nous avons fait étant restreint.

Diamètre nominal	Echantillon 1 (N = 3)	Echantillon 2 (N = 2)
10 nm	74 ± 4 nm	78 ± 3 nm
18 nm	102 ± 6 nm	106 ± 3 nm
36 nm	132 ± 3 nm	139 ± 3 nm
90 nm	186 nm ± 6 nm	192 ± 3 nm
107 nm	199 nm ± 5 nm	207 ± 3 nm
142 nm	227 ± 3 nm	236 ± 3 nm

Tableau 1 : mesure du diamètre réel de N nanopores par échantillon à l'issue de la gravure RIE, en fonction de leur diamètre nominal, pour 2 échantillons insolés simultanément, mais développés et gravés séparément.

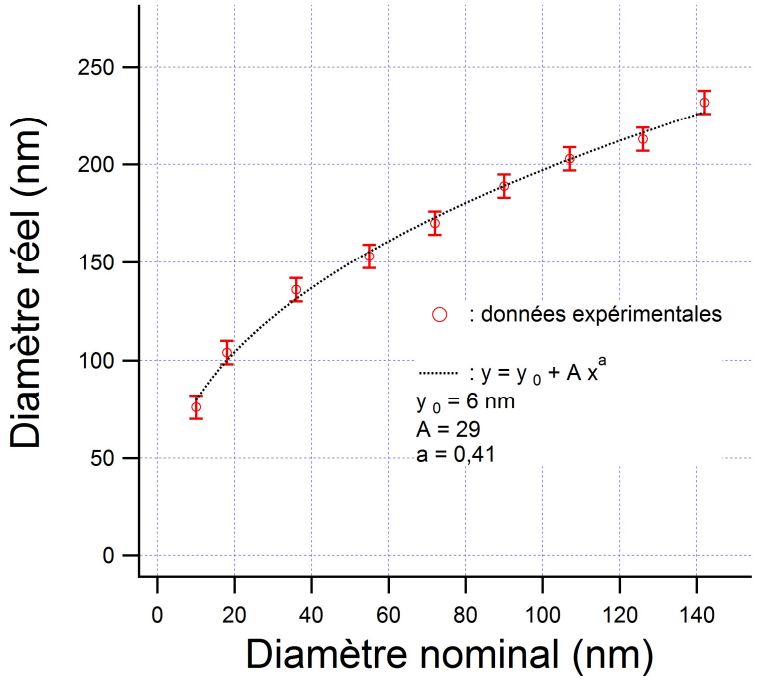


Figure 9 : Diamètre réel des nanopores (moyennes des valeurs mesurées sur l'échantillon 1 et 2) à l'issue de la gravure RIE en fonction du diamètre nominal des nanopores. Les barres d'erreur correspondent à un intervalle de confiance englobant les valeurs des échantillons 1 et 2.

La Figure 9 montre le diamètre réel des nanopores obtenu à l'issue de la gravure RIE en fonction du diamètre nominal. Les valeurs des diamètres réels ont été obtenues en prenant la moyenne entre l'échantillon 1 et l'échantillon 2 (colonne 2 et 3 du Tableau 1). Nous avons aussi mesuré le diamètre réel correspondant à des diamètres nominaux intermédiaires, non utilisés pour les dispositifs mais présent sur ces échantillons dédiés à la caractérisation. Nous pouvons constater que la dépendance du diamètre réel par rapport au diamètre nominal suit une loi de type $y = y_0 + A\,x^a$, avec y_0 = 6 nm, A = 29 et a = 0,40 (y étant le diamètre réel et x le diamètre nominal). Nous expliquons la non linéarité de cette dépendance par les motifs en étoile que nous utilisons. En effet, pour insoler une certaine surface de résine, il faut envoyer un nombre d'électron proportionnel à cette surface. Or, avec les motifs en étoile que nous utilisons, le nombre d'électrons envoyés est proportionnel au diamètre nominal du nanopore, et donc, à la racine carrée de l'aire du disque balayé par le faisceau. Nous pouvons alors nous attendre à une dépendance avec a = 0,5. Une analyse plus poussée s'avère difficile :

les motifs sont tels que la répartition des électrons n'est pas homogène. Du fait des effets de proximité, il est difficile de prévoir la tendance exacte que l'on devrait obtenir.

La valeur de diamètre réel obtenue à l'issue de la gravure RIE pour le diamètre nominal 10 nm est proche de la limite que nous pouvons réaliser avec ce procédé de gravure et cette épaisseur de résine. En effet, le temps de gravure de 3 min 35 permettant que ce nanopore débouche sur l'oxyde enfoui conduit à la disparition de la quasi-totalité de du PMMA lors de la gravure, puisque sur les 410 nm initialement présent, il reste à l'issue de la gravure RIE une couche de 20 à 30 nm d'épaisseur. Pour avoir des nanopores plus petits débouchant sur l'oxyde enfoui, il faudrait un temps de gravure plus long à cause de l'effet d'ARDE, ce qui conduirait à la disparition totale du masque de résine.

2.3 Gravure humide de l'oxyde enfoui

L'élément clef de notre technologie « face avant » réside dans la présence d'un nanocanal enfoui dans le substrat SOI, permettant d'adresser électriquement le dessous des nanopores. Celui-ci est gravé dans l'oxyde enfoui du substrat, par une gravure humide avec une solution d'acide fluorhydrique. La réaction chimique est la suivante :

$$SiO_{2\,(s)} + 6\,HF_{(aq)} = H_2SiF_{6\,(aq)} + H_2O$$

Les échantillons sont immergés dans une solution d'acide fluorhydrique à 50 % pendant une durée comprise entre 1 min 30s et 5 min (à 20 °C, sans agitation), puis rincés à l'eau déionisée et séchés sous un flux de diazote.

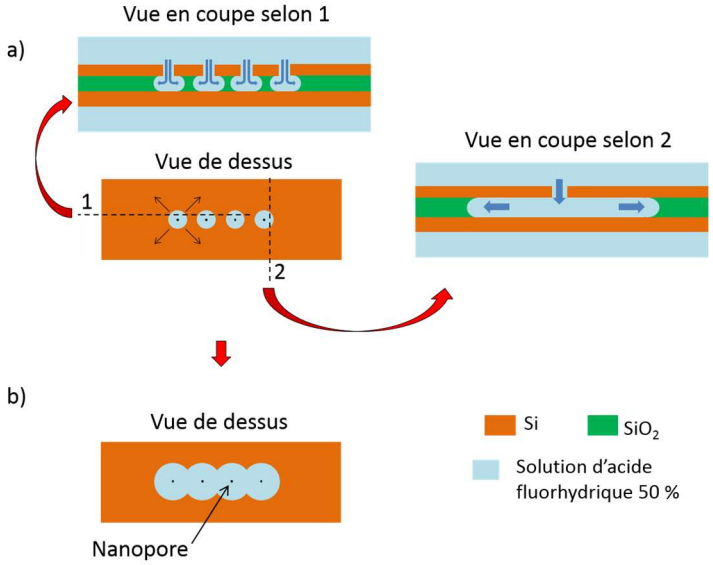


Figure 10 : Schéma explicatif de la gravure du nanocanal enfoui : a) vue de dessus et vue en coupe selon deux direction de l'échantillon à un instant où les domaines de sous-gravure ne communiquent pas encore. Les flèches indiquent la direction de la gravure. b) vue de dessus à un instant où les domaines de sous-gravure communiquent et forment un nanocanal enfoui.

Comme le montre la Figure 10, lorsque les échantillons sont immergés dans le bain de solution d'acide fluorhydrique, la solution entre par les nanopores, et grave l'oxyde se trouvant en dessous, de manière isotrope. La gravure s'arrête au niveau de la couche de silicium, ce qui résulte en une propagation

horizontale du front de gravure, et radiale en vue de dessus. Le temps de gravure est ajusté de manière à ce que les différents domaines de sous-gravure communiquent entre eux et forment un nanocanal enfoui connectant sans interruption toute la rangée de nanopores. Cette méthode de formation d'un nanocanal enfoui avait été développée lors de précédents travaux de notre équipe [3]. Buchholz et al. [4] ont rapporté simultanément une méthode similaire pour graver via des nanopores des cavités circulaires dans l'oxyde enfoui d'un substrat SOI.

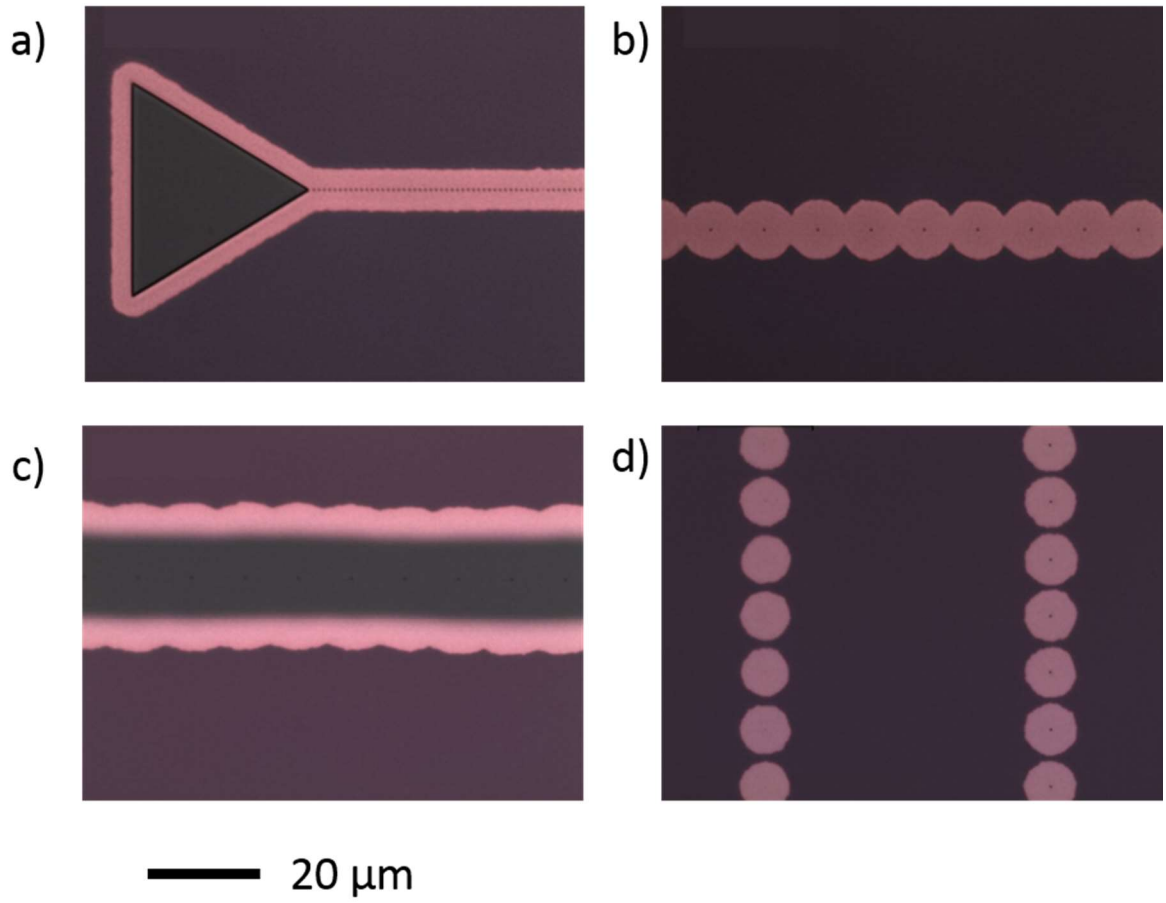


Figure 11 : images en microscopie optique de différents échantillons à la suite de l'étape de gravure humide a) Diamètre nominal des nanopores : 107 nm, pas 1 µm, gravure humide de 1 min 30s. b) Diamètre nominal des nanopores : 107 nm, pas 10 µm, gravure humide de 2 min. c) Diamètre nominal des nanopores : 107 nm, pas 10 µm, gravure humide de 5 min. d) Diamètre nominal des nanopores : 10 nm (à gauche) et 142 nm (à droite), pas 10 µm gravure humide de 1 min 40s.

La Figure 11 a) montre au microscope optique un échantillon vue de dessus après une gravure humide de 1 min 30 s. L'échantillon présente des nanopores de diamètre nominal 107 nm avec un pas de 1 µm. Le triangle d'alimentation apparait en vert sombre, et correspond à une zone où la couche supérieure de silicium et l'oxyde enfoui ont été gravé totalement par la succession de la gravure RIE et de la gravure humide, laissant apparent le substrat de silicium. La couleur rose claire est associée à une zone où l'oxyde enfoui a été gravé sous la couche supérieure de silicium qui reste suspendue au-dessus du substrat de silicium. Sur les zones violettes, la couche d'oxyde enfoui et la couche supérieure de silicium sont intactes. On peut constater que pour cet échantillon la gravure humide a été suffisamment longue pour qu'il y ait formation d'un nanocanal enfoui continu. Par ailleurs, le triangle d'alimentation communique avec ce nanocanal enfoui, comme le montre la continuité de la sous-

gravure entre le triangle d'alimentation et la ligne de nanopores. Nous avons évalué la largeur moyenne du canal en traçant sur l'image deux traits sur les bords du canal et en mesurant la distance entre ces traits. L'irrégularité du front de gravure est de l'ordre de 0,7 µm crête-à-crête. En prenant comme incertitude sur la largeur deux fois cette valeur, nous obtenons une largeur de 8,2 ± 1,4 µm.

Lorsque la distance entre les nanopores est de 10 µm, un temps de gravure humide de 2 min est nécessaire pour faire communiquer les domaines de gravure (Figure 11 b). Le nanocanal présente alors une forme de juxtaposition de disques, et sa largeur est comprise entre 5 µm et 11 µm. A partir d'une durée de gravure humide de 2 min, nous avons observé sur certains échantillons que la couche supérieure de silicium est effondrée et collée au substrat de silicium en dessous. Nous attribuons ce « collage » à un phénomène de capillarité lors du séchage de l'échantillon. La Figure 11 c) montre un échantillon à la suite d'une gravure humide de 5 min. L'effet y est bien visible : la ligne de couleur verte sombre est attribuée à la zone où la couche supérieure de silicium est en contact avec le silicium du substrat. Cet effondrement de la couche supérieure de silicium s'explique par le fait que lorsque le temps de gravure est trop long, la partie de la couche supérieure de silicium qui est suspendue se déforme et se colle avec la surface du substrat de silicium sous-jacent, lors du séchage. Nous avons constaté qu'un temps de gravure humide de 1 min 45 s était une valeur limite permettant d'avoir très peu de nanocanaux effondrés. Nous avons donc dû restreindre notre étude à des échantillons présentant une distance entre les nanopores de 1 µm et 6 µm, afin qu'une gravure humide de 1 min 45 s soit suffisante pour faire communiquer les domaines de sous-gravure en un nanocanal enfoui.

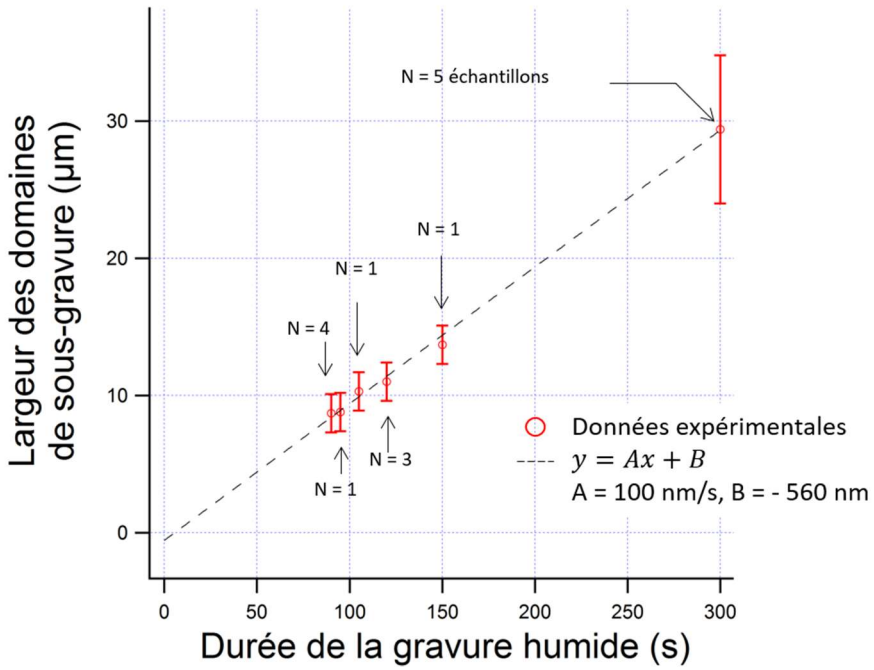


Figure 12 **: Evolution de la largeur du domaine de sous-gravure en fonction de la durée de la gravure humide. Les mesures ont été faites sur des échantillons de pas 1 µm, 6 µm, 10 µm, et pour des nanopores de diamètre nominal 107 nm. Chaque point correspond à une valeur moyenne portant sur N échantillons. Pour N = 1 et N = 3, les barres d'erreurs correspondent à 2 fois l'amplitude crête-à-crête de l'irrégularité du front de gravure. Pour N = 4 et N = 5, elles correspondent à ± 3 σ.**

La Figure **12** montre l'évolution de la largeur des domaines de sous-gravure en fonction de la durée de la gravure humide, pour différents échantillons dont le pas est de 1 µm, 6 µm et 10 µm, et le diamètre nominal des nanopores 107 nm. Pour les échantillons de pas 6 µm et 10 µm, la mesure a été réalisée en mesurant le diamètre des cercles de sous-gravure, et pour les échantillons de pas 1 µm en mesurant la largeur du nanocanal enfoui comme mentionné ci-dessus. Pour chaque échantillon, nous avons une incertitude de ± 1,4 µm provenant de l'irrégularité du front de gravure (voir ci-dessus) et qui est indépendante de la durée de la gravure. Lorsque la mesure est effectuée sur 4 (premier point) ou 5 (dernier point) échantillons, nous constatons une dispersion (± 3 σ) sur la valeur mesurée qui est du même ordre pour une gravure de 90 secondes, et qui est 4 fois plus grande pour une gravure de 5 minutes.

Les données expérimentales sont ajustées avec une droite d'équation $y = Ax + B$. L'ordonnée à l'origine de - 560 nm peut être considérée comme nulle compte tenu des barres d'erreur. Le coefficient directeur de 100 nm/s correspond à une vitesse de déplacement du front de gravure de 50 nm/s. Le comportement linéaire observé montre que la cinétique de la gravure est limitée par la vitesse de la réaction chimique, et non par la diffusion des réactifs ou produits dans le nanopore ou dans la cavité formée par la gravure. Si la diffusion des espèces dans la cavité était limitante, on devrait observer un ralentissement de la vitesse de gravure lorsque la taille de la cavité augmente car la distance à parcourir par les espèces est alors plus importante. De plus, si la diffusion des espèces dans le nanopore était limitante, on devrait aussi obtenir un ralentissement lorsque la cavité s'élargit, car la quantité d'espèces consommées/produites par la réaction augmente avec la circonférence de la cavité.

La vitesse de sous-gravure observée est quasiment indépendante du diamètre des nanopores pour les différents diamètres nominaux utilisés : la Figure 11 d) montre un échantillon présentant des nanopores diamètre nominal 10 nm (ligne de gauche sur l'image) et 142 nm (ligne de droite sur l'image) et pour lequel la durée de la gravure humide a été de 1 min 40 s. Le diamètre moyen des cercles de sous-gravure obtenus est de 8,8 ± 1,4 µm (mesures faites sur les 7 cercles de la Figure 11 d) pour les nanopores de diamètre nominal 10 nm et de 9,3 ± 1,4 µm (IDEM) pour les nanopores de diamètre nominal 142 nm. Ces valeurs se traduisent en une vitesse de déplacement du front de gravure de 44 ± 7 nm/s pour les nanopores de diamètre nominal 10 nm et de 47 ± 7 nm/s pour les nanopores de diamètre nominal 142 nm. Ce résultat confirme le fait que la gravure humide n'est pas limitée par la diffusion des espèces dans les nanopore. Notons que les nanopores de diamètre nominal 142 nm apparaissent sur ces images optiques comme un point noir, et que pour les nanopores de diamètre nominal 10 nm, ce point noir est à peine visible.

Les dispositifs utilisés dans cette thèse ont été gravé avec une durée de 1 min 30 pour les dispositifs de pas 1 µm et 1 min 45 pour les dispositifs de pas 6 µm. Pour les dispositifs de pas 1 µm, cette gravure aboutit à un nanocanal de largeur 8,4 ± 1,8 µm et pour les dispositifs de pas 6 µm, elle aboutit à un nanocanal présentant une forme similaire à celui de la Figure 11 b, dont la largeur au niveau des zones resserrées vaut 6,7 µm et la largeur aux zones élargies vaut 9,1 µm. Nous déduisons dans ce cas une largeur moyenne de 7,8 ± 1,8 µm. Nous nous baserons sur ces valeurs lorsque nous calculerons la résistance associée au nanocanal enfoui, dans le chapitre 3.

2.4 Oxydation thermique

Afin de limiter le courant de fuites au travers du silicium, nous avons rendu la surface de silicium isolante par la croissance d'une couche d'oxyde thermique sec de 100 nm d'épaisseur. L'oxyde a été obtenu en réalisant un recuit à 1000°C pendant 155 minutes sous un flux de dioxygène de 10 sccm. L'oxydation thermique du silicium s'opère par le mouvement vers l'intérieur du substrat des molécules de dioxygène, comme le montre la Figure 13 a) pour le cas d'un substrat non structuré. Les molécules de dioxygène diffusent au travers de la couche d'oxyde déjà formée, ce qui entraîne sa croissance, par la réaction suivante, ayant lieu à l'interface oxyde – silicium :

$$Si_{(s)} + O_{2\,(g)} \rightarrow SiO_{2\,(s)}$$

Notons que le volume molaire du SiO_2 est supérieur à celui du silicium. Il s'ensuit une augmentation du volume totale de l'échantillon lors de l'oxydation. Comme l'indique la Figure 13 a), à l'issue de l'oxydation, 55 % de l'oxyde formé se trouve au-dessus de la surface initiale de l'échantillon, et 45 % se trouve au-dessous. Nous nous attendons à ce que le dioxygène pénètre dans les nanopores et dans le nanocanal enfoui, et oxyde les parois de manière identique (Figure 13 b). Au niveau des nanopores, ceci devrait résulter en un rétrécissement des nanopores si 55 % de l'oxyde formé est au-delà de la surface initiale de l'échantillon. Comme nous allons le voir, nous avons bien constaté cet effet, ainsi qu'une déformation de la couche de silicium supérieure au niveau du nanocanal enfoui.

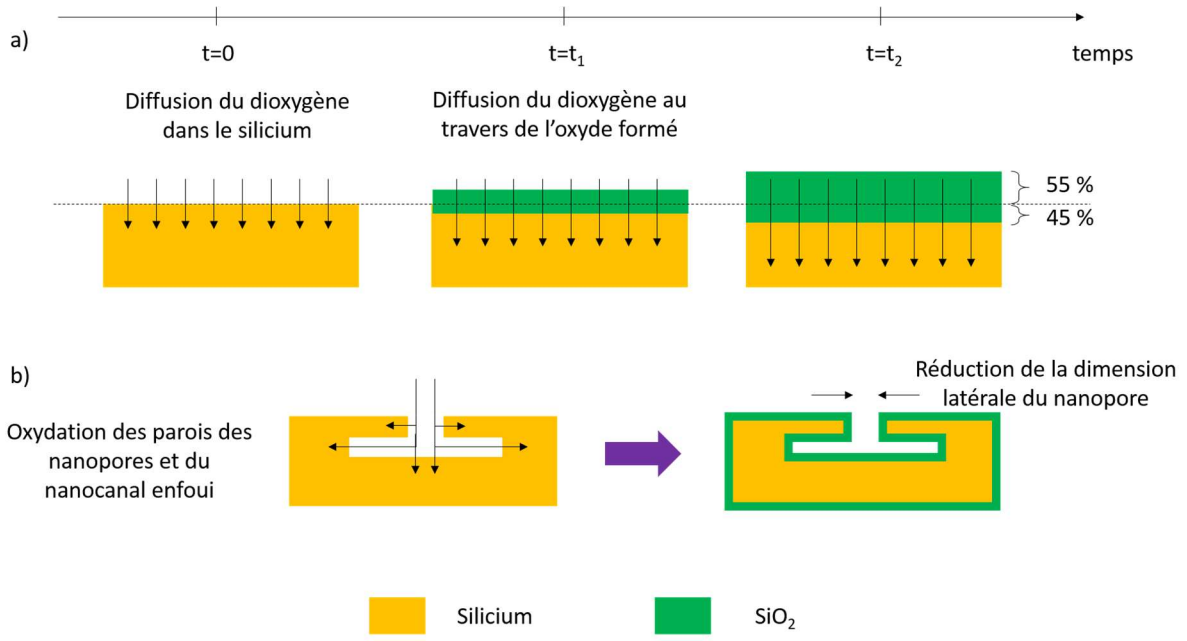


Figure 13 : Schéma en coupe montrant la croissance d'une couche d'oxyde lors de l'oxydation thermique du silicium a) au niveau d'une zone ne présentant pas de nanostructure, b) au niveau d'un nanopore et du nanocanal enfoui (la coupe est réalisée perpendiculairement au nanocanal enfoui).

Les nanopores ont été caractérisés par microscopie électronique à balayage (FEI Helios 600 i) à l'issue de l'oxydation thermique. Les Figure 14 montre une vue de dessus de nanopores de différent diamètres nominaux. Ces images ont été faites sur un seul échantillon, différent de ceux qui ont été caractérisés à l'issue de la gravure RIE, mais appartenant au même lot, c'est-à-dire ayant été insolé en

lithographie électronique avec le même réglage du faisceau d'électrons. En effet, l'observation au MEB contamine l'échantillon, ce qui nous empêche de mener une oxydation par la suite sans contaminer les fours. Nous pouvons constater que le pourtour du nanopore est constitué d'une couronne gris clair. Nous pouvons ainsi définir deux dimensions latérales, une dimension latérale intérieure (A sur la Figure 14 e), une dimension latérale extérieure (B sur la Figure 14 e), et une largeur de la couronne (C sur la Figure 14 e). Par ailleurs, nous pouvons remarquer qu'à l'issue de l'oxydation thermique les nanopores présentent une forme légèrement carrée, et que cette déformation est toujours observée dans le même sens.

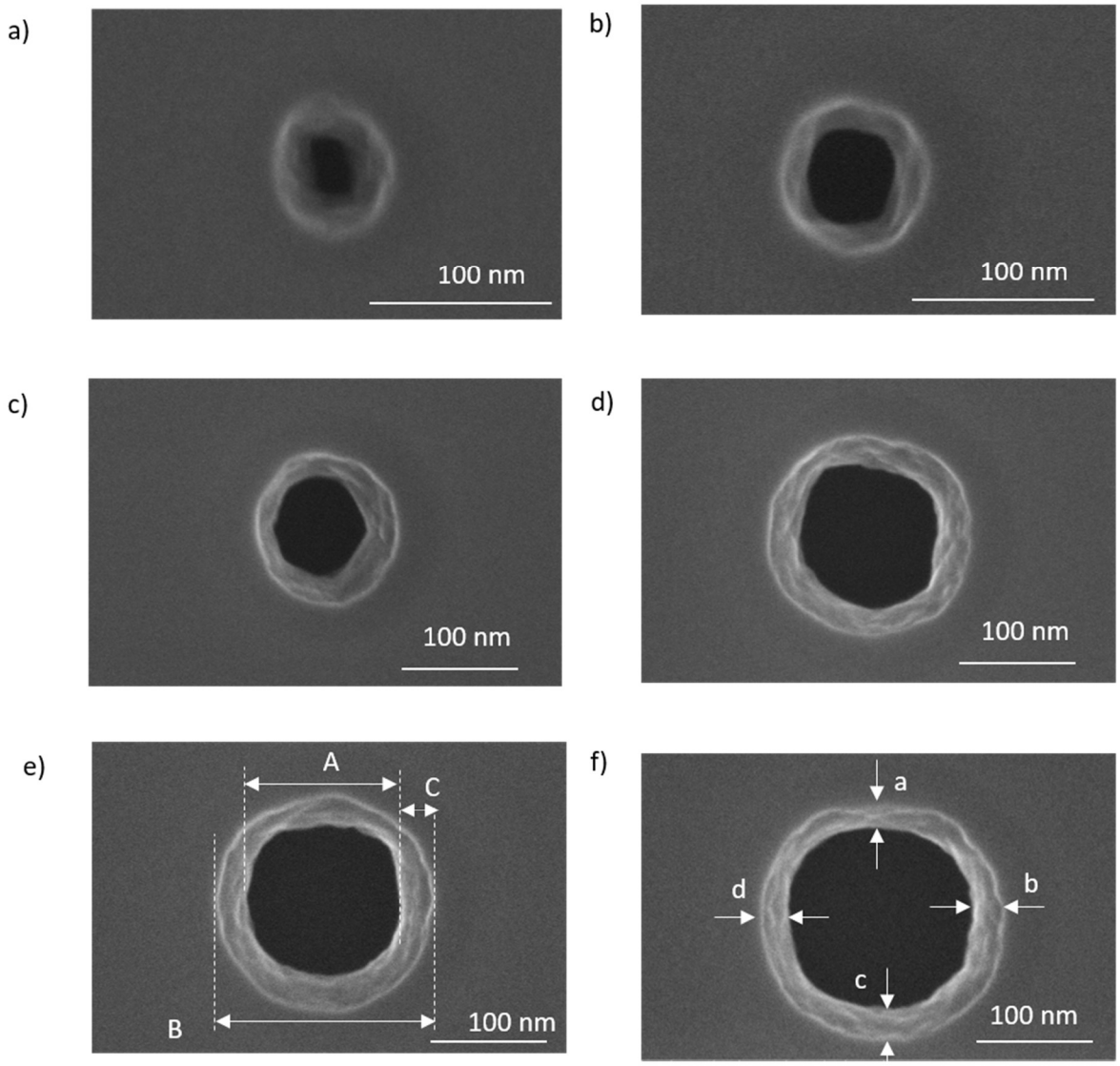


Figure 14 : images par microscopie électronique à balayage de nanopores après oxydation. Diamètres nominaux : a) 10 nm. b) 18 nm. c) 36 nm. d) 90 nm. e) 107 nm. f) 142 nm.

Pour comprendre à quoi correspond la couronne observée sur les images en vue de dessus, nous avons réalisé une coupe par faisceau d'ions focalisés (FIB) sur un nanopore de diamètre nominal 10 nm, appartenant au même échantillon. La Figure 15 montre le résultat obtenu. Nous pouvons voir la couche supérieure de silicium, partiellement oxydée, en gris foncé. Celle-ci est entourée d'oxyde qui apparaît en gris clair, et est suspendue au-dessus du nanocanal enfoui. Afin de protéger la structure lors de la découpe FIB, nous avons réalisé localement un dépôt de platine au préalable, dans le bâti du

microscope utilisé pour réaliser la découpe. Nous avons constaté que le platine se dépose sur l'échantillon, mais aussi de manière conforme sur les parois du nanocanal enfoui. Nous interprétons ce résultat par le fait que le gaz utilisé pour le dépôt diffuse dans le nanocanal enfoui, par les nanopores ou par le triangle d'alimentation, et que les électrons envoyés pour déclencher la réaction de dépôt traversent la couche supérieure de silicium et l'oxyde thermique, et déclenchent la réaction de dépôt sur les parois du nanocanal enfoui. Sur l'image, la couche de platine au-dessus de l'échantillon apparaît gris foncé avec une granulosité. Celle qui est sur le dessus du nanocanal enfoui apparait gris clair sans granulosité. Ces aspects différents sont attribués à des paramètres physiques différents lors du dépôt entre le haut et le bas (concentration des espèces, quantité d'électrons). Enfin, la partie grise foncée granuleuse au-dessous de l'image correspond au fond du nanocanal enfoui sur lequel est déposé le platine, vu en perspective, la coupe de cette structure étant en dehors de l'image.

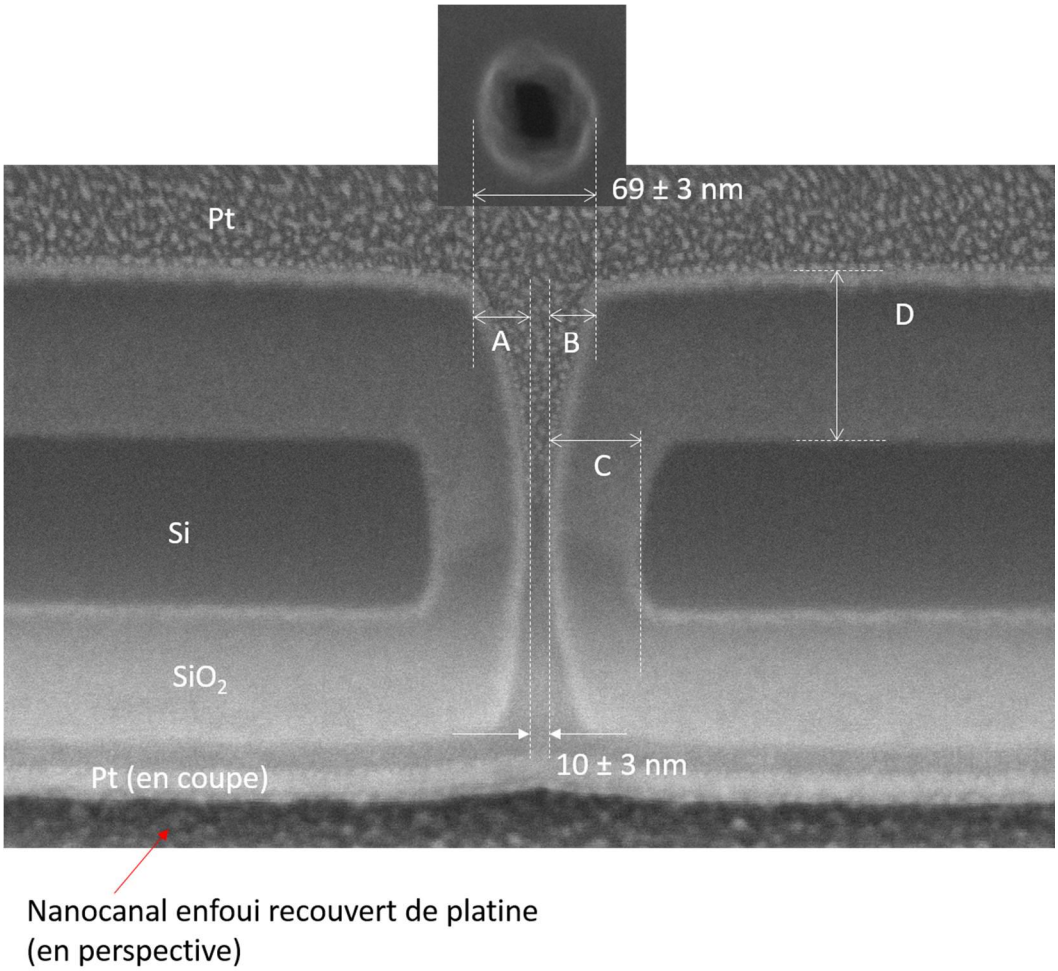


Figure 15 : coupe réalisée par FIB d'un nanopore de diamètre nominal 10 nm. encart : image de la Figure 14 a) ajustée à la même échelle.

Cette image montre que le nanopore n'est pas de forme cylindrique, mais est entouré de parois convexes. La ligne gris clair de 10 nm d'épaisseur qui entoure l'oxyde est attribuée à l'oxyde et non au platine, car elle ne présente pas de granulosité. Nous pouvons mesurer ainsi une largeur de 10 ± 3 nm au niveau de la zone la plus resserrée du nanopore, et 69 nm ± 3 nm au niveau de l'entrée. (L'incertitude de ± 3 nm correspond à l'incertitude de lecture, évaluée de la même manière que pour la caractérisation à l'issue de la gravure RIE, Tableau 1, p. 96) Cette dernière valeur correspond à la dimension latérale extérieure mesurée en vue de dessus pour des nanopores de même diamètre

nominal (nous avons mesuré une valeur moyenne de 69 ± 6 nm sur 4 nanopores appartenant au même échantillon). Nous avons indiqué cette correspondance avec l'encart de la figure. Nous avons constaté cependant pour ce diamètre nominal que la dimension latérale intérieure mesurée sur l'image en vue de dessus est plus grande (22 ± 6 nm, mesure sur 4 nanopores appartenant au même échantillon) que la valeur de 10 nm mesurée sur la vue en coupe. Nous pensons que cet écart serait dû au fait qu'en vue de dessus, l'intérieur du nanopore n'est pas totalement visible. En effet lorsque le nanopore est étroit, les électrons du MEB interagissant avec les parois internes du nanopore ne sont pas bien collectés par le détecteur en raison de l'ombrage dû aux parois. Ainsi, la couronne observée sur les images de la Figure 14 correspondraient à la convexité des parois des nanopores, vue de dessus.

Nous avons mesuré sur les images en vue de dessus la largeur de la couronne dans les directions verticales et horizontales (voir a, b, c et d sur la voir Figure 14 f). Les résultats sont indiqués dans le Tableau 2. La largeur obtenue dépend peu du diamètre nominal, et semble être de l'ordre de 30 nm, valeur qui correspond aux dimensions A (32 ± 3 nm) et B (32 ± 3 nm) sur la Figure 15. Il semblerait donc que cette dimension est indépendante du diamètre nominal, mais apparaît plus petite en vue de dessus dans le cas des nanopores de diamètre nominal 10 et 18 nm à cause du phénomène d'ombrage évoqué ci-dessus. Ces mesures ayant été réalisées sur peu de nanopores, il serait souhaitable de réitérer la caractérisation afin de voir si la tendance observée est confirmée sur un nombre d'échantillons statistiquement plus significatif.

Diamètre nominal	10 nm	18 nm	36 nm	90 nm	107 nm	142 nm
Largeur de la couronne	24 ± 11 nm	22 ± 11 nm	22 ± 15 nm	29 ± 5 nm	29 ± 5 nm	34 ± 23 nm
Mesure a, b c d (voir Figure 14 f) sur n nanopores,	b sur 4 nanopores	b sur 4 nanopores	a, b, c, d, sur 1 nanopore	a, b, c, d, sur 1 nanopore	a, b, c, d, sur 1 nanopore	a, b, c, d, sur 1 nanopore

Tableau 2 : mesure de la largeur de la couronne dans les directions horizontales et verticales sur les images en vue de dessus (voir Figure 14 f).

La Figure 16 montre le diamètre avant oxydation (même courbe que la Figure 9, p. 96) et la dimension latérale intérieure du nanopore après oxydation. Pour le diamètre nominal 10 nm, nous avons utilisé la valeur donnée par la vue en coupe. Pour les autres diamètres nominaaux, nous avons fait la mesure sur les vues de dessus. Nous avons utilisé comme incertitude la valeur ± 6 nm (correspondant à ± 3 σ), obtenue sur une mesure de la dimension latérale intérieure de 6 nanopores de diamètre nominal 107 nm au sein d'un même échantillon. Cette dispersion correspond à un écart relatif de ± 5 %. Nous avons ajusté les courbes avec un modèle de type $y = y_0 + x^{\alpha}$, les paramètres étant indiqués sur la courbe. La réduction de la dimension latérale des nanopores est ainsi, selon ce modèle empirique, de 75 nm pour un nanopore de diamètre nominal 140 nm et de 65 nm pour un nanopore de diamètre nominal 10 nm. Nous pouvons ainsi constater une légère augmentation de la réduction de la dimension latérale du nanopore avec le diamètre nominal.

Nous attribuons la réduction des dimensions latérales des nanopores au fait que, comme mentionné plus haut, une certaine proportion de l'oxyde formé se trouve au-delà de la surface initiale de l'échantillon. Pour le nanopore de diamètre nominal 10 nm, en mesurant l'épaisseur d'oxyde sur les flancs du nanopore (mesure C sur la Figure 15 : 51 ± 3 nm) nous avons calculé que la réduction de 66 nm observée, correspondant à 33 nm de réduction de part et d'autre du nanopore, correspond au

cas où 65 % de l'oxyde formé est formé à l'intérieur du nanopore, soit une valeur plus importante que les 55 % généralement mesuré pour un échantillon plan.

Notons enfin sur la Figure 15 que l'épaisseur d'oxyde entourant le nanopore (C = 51 ± 3 nm) est plus petite d'un facteur 2 environ par rapport à l'épaisseur d'oxyde à la surface de l'échantillon (D = 98 ± 3 nm). Nous interprétons cette différence de la manière suivante : pour le cas d'une géométrie plane (Figure 17 a) la cinétique d'oxydation est habituellement décrite par un modèle de diffusion des atomes d'oxygène au sein de l'oxyde déjà formé (modèle de Deal et Grove [5]). Par rapport à une géométrie plane, la géométrie cylindrique (Figure 17 b) implique une surface de l'interface SiO_2/Si plus grande à mesure que le processus d'oxydation a lieu, et donc un volume de silicium à oxyder $dS_2 dl$ plus important par unité d'interface O_2/SiO_2. Il n'est donc pas surprenant que nous ayons une cinétique d'oxydation plus lente que dans le cas d'une surface plane.

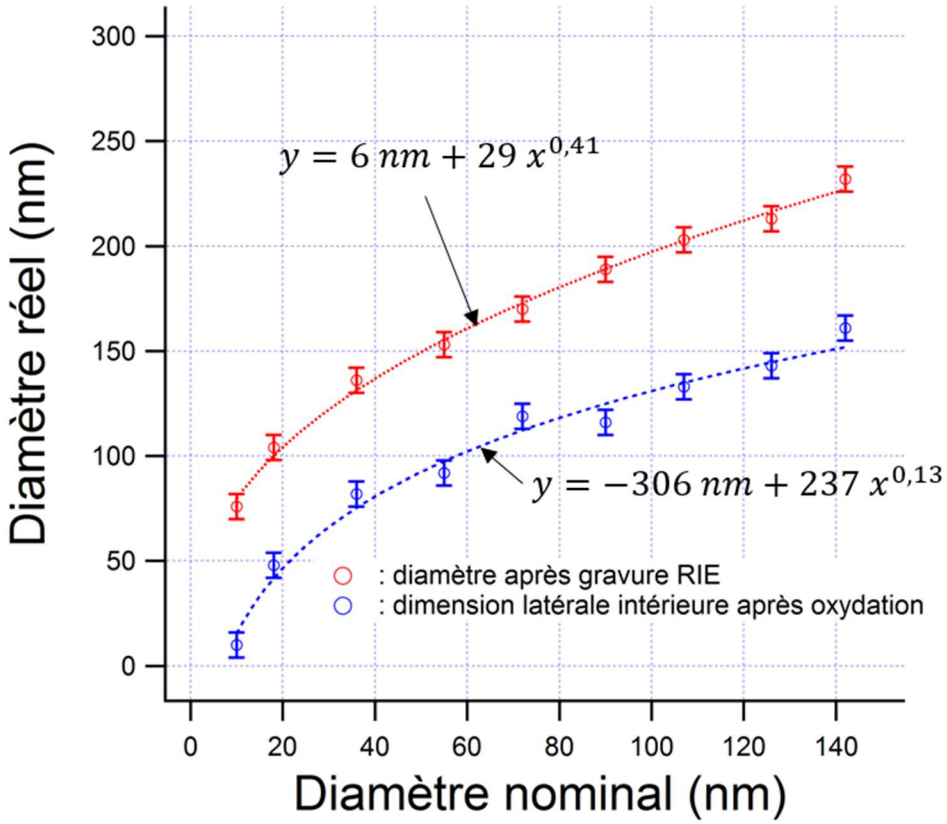


Figure 16 : évolution de la dimension latérale des nanopores à l'issue de l'oxydation thermique. Les valeurs avant oxydation correspondent à la courbe de la Figure 9, p. 96. Les valeurs après oxydation correspondent à la dimension latérale intérieure (zone où le nanopore est le plus étroit) des nanopores. La mesure est une moyenne faite sur 2 nanopores par diamètre nominal, au sein d'un échantillon. Pour le diamètre nominal 107 nm, nous avons réalisé 6 mesures et avons obtenu une dispersion de ± 6 nm (± 3 σ), valeur que nous avons utilisée pour les barres d'erreur.

Le deuxième effet observé à l'issue de l'oxydation thermique est une déformation de la couche supérieure de silicium au-dessus du nanocanal enfoui. Cette déformation est visible sur les images en microscopie optique de la Figure 18 a) et b). Le nanocanal enfoui y présente en effet des irisations qui n'étaient pas présentes avant oxydation (voir le paragraphe sur la gravure humide). La déformation du

nanocanal enfoui n'est pas visible lors de la réalisation d'une coupe par FIB car le dépôt de platine utilisé pour protéger la structure lors de la coupe aplatit la couche supérieure de silicium, ce qui masque la déformation. Nous avons donc clivé des échantillons perpendiculairement au nanocanal enfoui pour voir s'il était possible d'observer le profil réel du nanocanal enfoui.

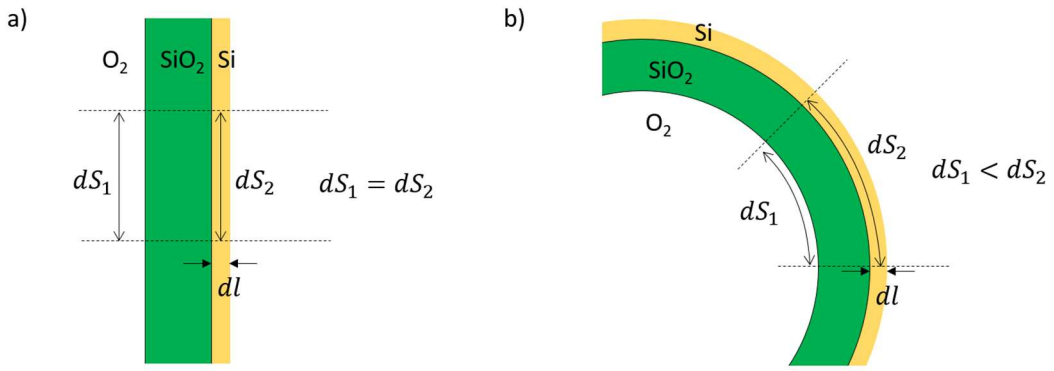


Figure 17 : schéma illustrant le cas a) d'une géométrie plane. b) cylindrique.

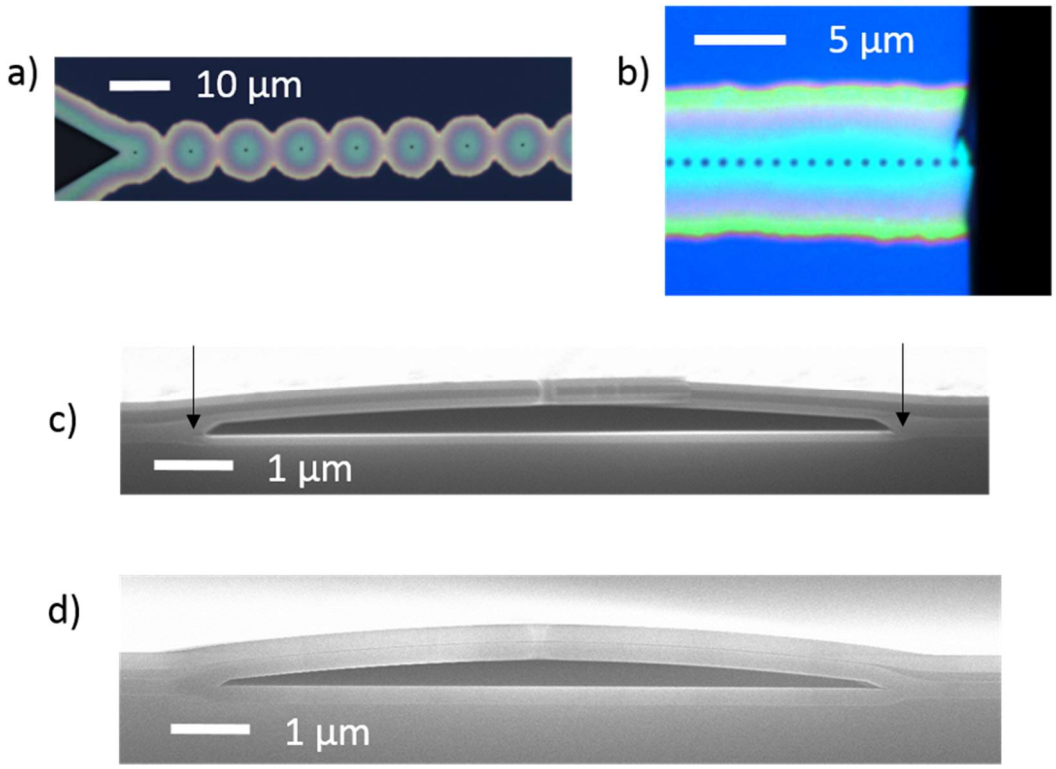


Figure 18 : a) image en microscopie optique d'un échantillon (Diamètre nominal des nanopores 90 nm, pas 10 µm) après oxydation thermique. b) image en microscopie optique d'un échantillon (diamètre nominal des nanopores 107 nm, pas 1 µm) après oxydation thermique et clivage pour observation au MEB. c) image MEB montrant la coupe correspondante. d) image MEB montrant la tranche d'un échantillon clivé ayant été oxydé avec 200 nm d'oxyde.

La Figure 18 c) montre le résultat. Cette vue en coupe correspond à l'image de la Figure 18 b). On y reconnait la cassure sur la droite par rapport au nanopore, et le nanopore qui est traversé par la ligne de clivage. La configuration des irisations sur l'image b) nous permet d'affirmer que le profil observé sur l'image c) est le profil réel : s'il y avait un effet de bord, les irisations de l'image b) seraient modifiées

à l'approche de la ligne de clivage. L'image c) montre qu'à l'issue de l'oxydation, la couche supérieure de silicium est déformée vers le haut. Cette déformation peut avoir plusieurs origines : soit la différence de volumes molaires entre le silicium et l'oxyde de silicium, qui entrainerait ici des contraintes mécaniques au niveau des deux zones marquées d'une flèche noire sur la figure, et donc une déformation au cours de l'oxydation, soit une différence de coefficients de dilatation entre les deux matériaux, entrainant une déformation lors du retour à la température ambiante. Nous avons réalisé un échantillon avec une oxydation de 200 nm pour voir si le profil du nanocanal enfoui est modifié. La largeur du nanocanal enfoui est identique. Nous avons pu constater que le profil est le même que pour une oxydation de 100 nm (Figure 18 d).

Pour l'oxydation d'épaisseur 100 nm, la hauteur du nanocanal enfoui à l'endroit où il est le plus haut est de 330 ± 8 nm, mesuré sur une image en coupe. La déformation du nanocanal enfoui est positive pour notre objectif : en effet elle entraine une augmentation de la section du nanocanal enfoui et donc une diminution de la résistance électrique en série avec les nanopores ce qui est préférable pour la sensibilité électrique du dispositif, comme nous le verrons dans le chapitre 3.

2.5 Conclusion

Nous avons décrit le procédé de fabrication des puces de silicium. Celui-ci comprend quatre étapes, une étape de lithographie électronique, une étape de gravure RIE pour graver des nanopores dans la couche supérieure de silicium, une étape de gravure humide pour graver le nanocanal enfoui sous les nanopores, et une étape d'oxydation thermique pour rendre les parois de la puce isolantes. Nous avons défini le diamètre nominal des nanopores comme le diamètre de l'étoile utilisée pour coder les nanopores en lithographie électronique. A cause des effets de proximité, nous avons vu que les nanopores obtenus à l'issue de la gravure RIE ont un diamètre 1,6 à 7,6 fois plus grand que le diamètre nominal. Par ailleurs, l'étape de lithographie électronique et de gravure RIE ne nous permettent pas d'obtenir des nanopores de moins de 75 nm de diamètre, à cause d'un effet d'ARDE qui nécessiterait un temps de gravure plus long pour graver des nanopores de diamètre plus petit, un tel temps de gravure étant incompatible avec l'épaisseur de PMMA utilisée. Nous utilisons donc l'étape d'oxydation thermique pour réduire la dimension latérale des nanopores. A l'issue de cette étape, nous obtenons des nanopores aux parois convexes, présentant une zone resserrée comprise entre 10 nm et 160 nm en fonction du diamètre nominal. Nous retrouvons ainsi à l'issue de l'étape d'oxydation des dimensions latérales proches du diamètre nominal des nanopores. L'oxydation entraine un deuxième effet, celui de déformer le nanocanal enfoui en augmentant sa section, effet attribué soit à la différence de volume molaire entre le silicium et le SiO_2, soit à la différence de dilatation thermique des deux matériaux lors du retour à la température ambiante. Comme nous le verrons par la suite, cet effet est positif pour notre application car il augmente la section du nanocanal enfoui, et donc diminue sa résistance. Nous allons maintenant décrire le procédé de fabrication des cellules fluidiques.

3. Fabrication des cellules microfluidiques

Afin d'adresser physiquement et électriquement les nanopores, des cellules fluidiques de Poly(DiMéthylSiloxane) (PDMS) ont été réalisées, comprenant des microcanaux fluidiques, ainsi que des réservoirs traversant la cellule fluidique permettant d'adresser ces microcanaux (Figure 19). Nous avons choisi d'utiliser le PDMS car c'est un matériau facile à mettre en forme et dont le collage sur une

surface de SiO_2 se fait par liaisons covalentes : il est important en effet que la liaison entre la cellule fluidique et la puce de silicium soit forte, afin qu'il n'y ait pas de fuites et de court-circuit entre les deux compartiments de mesures (nous définissons un compartiment comme un microcanal et les deux réservoirs qui lui sont connectés). Enfin, le PDMS est un matériau transparent, ce qui nous permettra de mener une caractérisation par fluorescence simultanément à la caractérisation électrique.

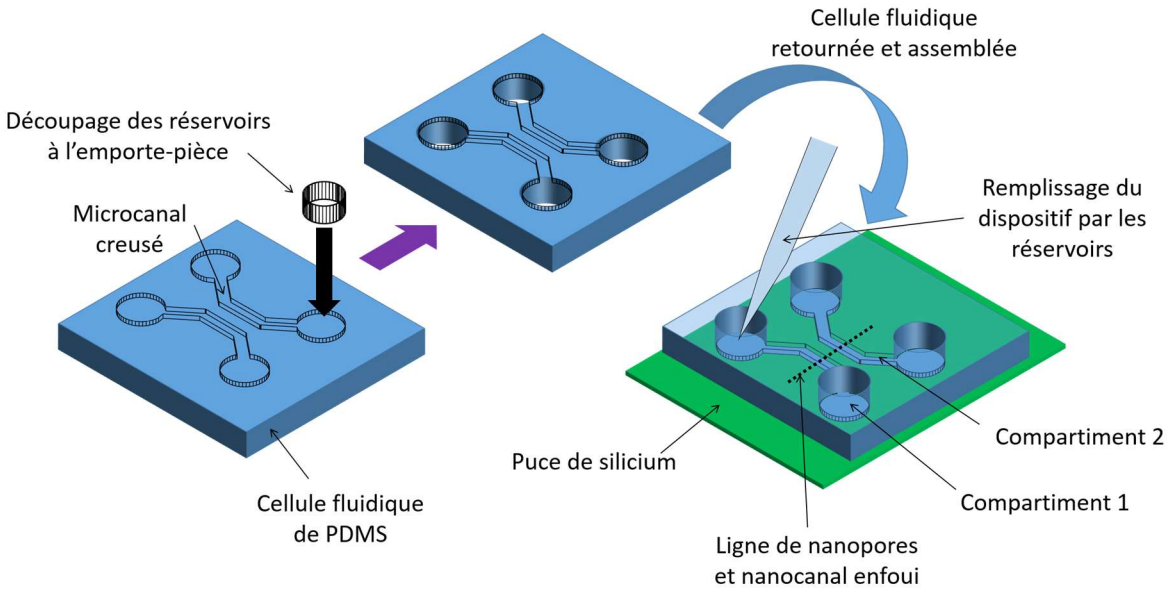


Figure 19 : schéma en trois dimensions montrant une cellule fluidique, le découpage des réservoirs traversant, et comment ces réservoirs permettent d'accéder aux microcanaux fluidiques lorsque le dispositif est assemblé.

Les microcanaux ont une largeur nominale de 50 µm, et une hauteur nominale de 50 µm pour un premier type de cellule fluidique. Un deuxième type de cellule fluidique a été réalisé avec des canaux de hauteur nominale 200 µm. La distance nominale séparant les microcanaux à l'endroit où ils sont le plus rapprochés est de 50 µm. Nous avons choisi de fixer cette distance à une valeur la plus petite possible car elle définit la longueur de nanocanal enfoui nécessaire à la communication entre les deux compartiments de mesure. En effet, cette portion de circuit introduit une résistance en série qu'il est préférable de minimiser afin d'augmenter la sensibilité du dispositif, comme il le sera vu dans le chapitre suivant.

La mise en forme du PDMS est réalisée par moulage : le PDMS est coulé sur des moules, puis réticulé (avec un agent réticulant) par un traitement thermique. Ces moules ont été fabriqués en utilisant un procédé standard de dépôt de SU-8 et de photolithographie sur un substrat de silicium (Figure 20 a). Deux dépôts de SU-8 (épaisseur nominale 200 µm et 50 µm, voir plus loin pour la caractérisation) ont été réalisés sur deux substrats de 4 pouces standards (silicium intrinsèque de type p). Un masque souple réalisé par impression jet d'encre sur une feuille transparente a été utilisé pour la photolithographie. La Figure 21 montre le motif utilisé. La partie blanche correspond aux endroits où la lumière passe, de sorte qu'à ces endroits la SU-8 reste sur le substrat de silicium après développement (la SU-8 étant une résine négative), constituant la saillie par rapport au substrat de silicium. Nous avons matérialisé l'emplacement des futurs réservoirs pour avoir un repère lors du découpage à l'emporte-pièce des réservoirs. A l'issue de la photolithographie et du développement,

un dépôt de SiO2 puis de FDTS (perfluorodécyltrichlorosilane) est réalisé sur les substrats par CVD afin de rendre la surface des moules hydrophobe pour faciliter le démoulage du PDMS après réticulation.

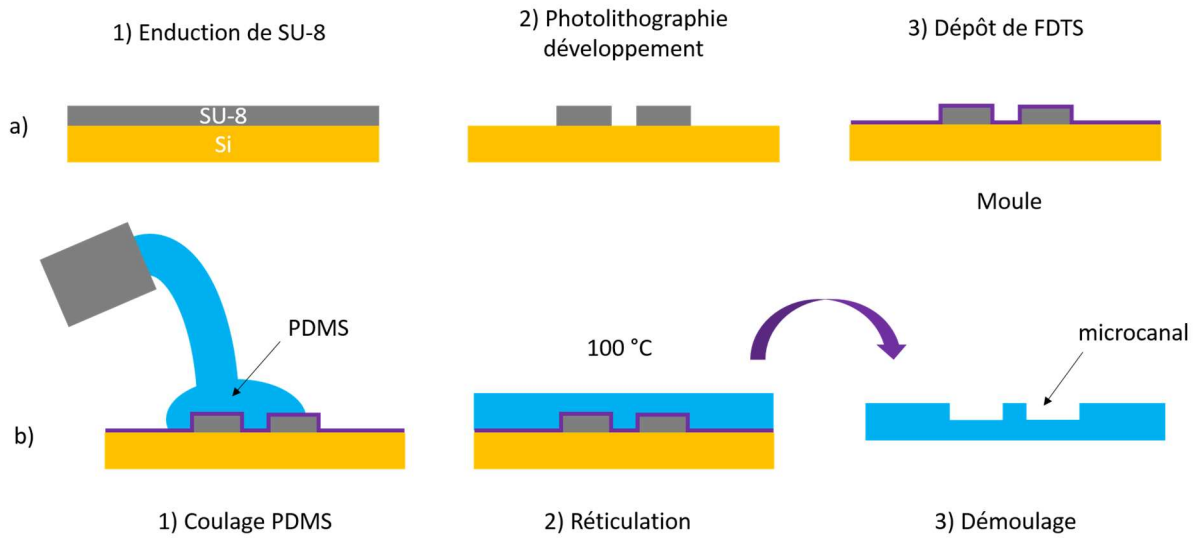


Figure 20 : a) schéma en coupe montrant le procédé de fabrication des moules. b) schéma en coupe montrant le procédé de fabrication des cellules fluidiques de PDMS.

Dans toute cette thèse, nous avons utilisé 6 emplacements sur les moules : 3 sur le moule où la SU-8 a une épaisseur nominale de 200 µm et 3 sur le moule où elle a une épaisseur nominale de 50 µm. Ces 3 motifs étant adjacents sur les moules, la dispersion sur la hauteur des motifs, résultant de la dispersion sur l'épaisseur de SU-8 déposée, est relativement faible. Nous avons mesuré ainsi une hauteur de 54 ± 0,7 µm (9 mesures réparties sur les 3 motifs) et 205 ± 4 µm (IDEM).

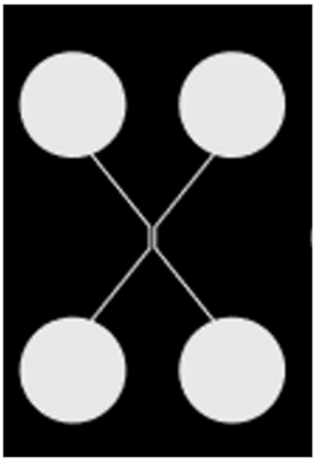


Figure 21 : Motif utilisé pour fabriquer le masque de photolithographie. La partie blanche correspond aux endroits où le masque est transparent.

Les moules sont ensuite disposés horizontalement dans des boîtes prévues à cet effet. Du PDMS (Sylgard 184) est mélangé avec son agent réticulant dans des proportions 10 pour 1 en masse puis mis à dégazer sous vide primaire pendant 30 min. Le PDMS est ensuite coulé sur les moules (Figure 20 b), à raison de 20 g pour chaque moule, ce qui correspond à une épaisseur des cellules fluidiques d'environ 2,5 mm. Les boîtes contenant les moules sont ensuite mis à l'étuve à 100 °C pendant 1 h.

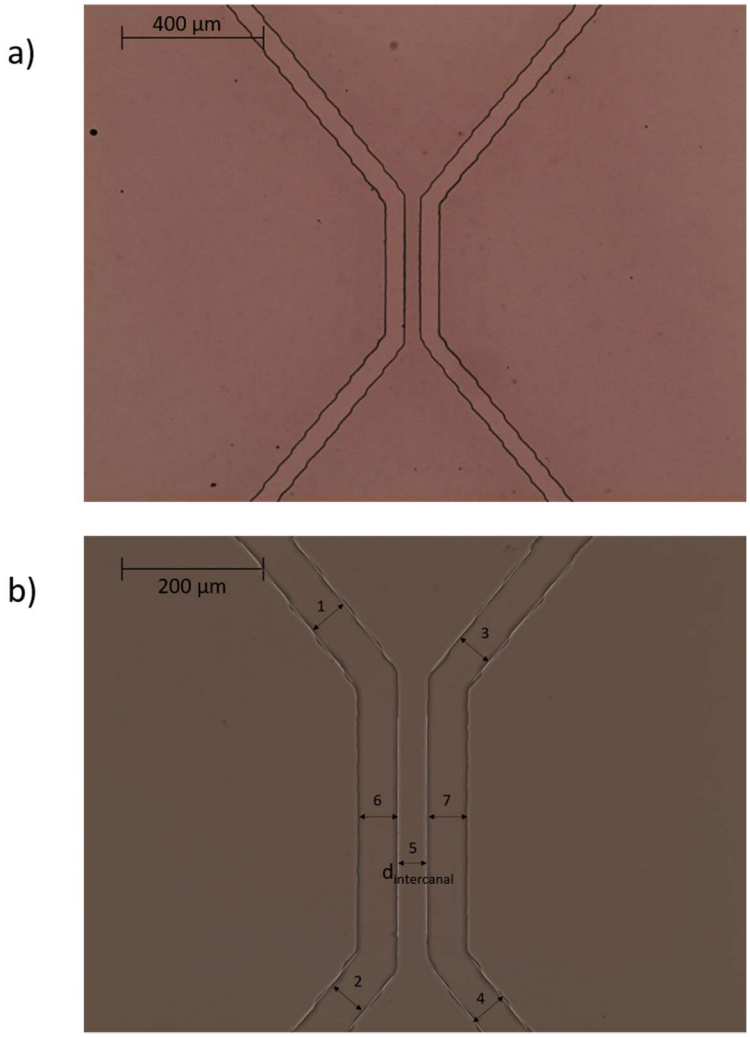


Figure 22 : a) image en microscopie optique d'une cellule fluidique présentant des microcanaux de hauteur nominale 50 µm. b) image de la même cellule avec un grandissement plus grand.

Hauteur nominale	Largeur du microcanal de gauche (moyenne mesure 1 et 2 sur la Figure 22 b)	Largeur du microcanal de droite (moyenne mesure 3 et 5 sur la Figure 22 b)	Distance entre les deux microcanaux $d_{intercanal}$ (5 sur la Figure 22 b)	Largeur des microcanaux au milieu (6 et 7 sur la Figure 22 b
50 µm	61 ± 6 µm	54 ± 6 µm	41± 4 µm	58 ± 4 µm
200 µm	61 ± 6 µm	57 ± 6 µm	43 ± 4 µm	58 ± 4 µm

Tableau 3 : mesure de la largeur des microcanaux et de la distance entre les deux microcanaux à l'endroit où ils sont le plus rapprochés, pour deux cellules fluidiques dont les canaux sont de hauteur nominale 50 µm et 200 µm.

La Figure 22 a) montre une image en microscopie optique d'une cellule fluidique posée sur une lame de verre, les microcanaux étant en contact avec la lame. On peut constater que les côtés des microcanaux présentent des ondulations d'environ 7 µm crête-à-crête. Ces ondulations sont dues à la méthode de fabrication des masques souples. Par ailleurs, nous pouvons constater que la largeur des microcanaux est légèrement différente entre le microcanal de gauche et le microcanal de droite. Cette différence est aussi attribuée à la méthode de fabrication des masques souples. Pour mesurer la largeur des microcanaux, nous avons tracé des traits (Figure 22 b) et fait une moyenne sur des mesures

1 et 2 pour le microcanal de gauche, et 3 et 4 pour le microcanal de droite. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 3. Nous avons aussi mesuré l'écart entre les microcanaux au niveau de la zone où ils sont parallèles, distance que nous appelons $d_{intercanal}$, ainsi que la largeur des microcanaux à cet endroit. L'incertitude de ± 4 µm provient de l'irrégularité des bords des canaux, ainsi que de l'épaisseur de la ligne délimitant les canaux sur l'image. Notons que, même si les ondulations des microcanaux mentionnées plus haut ont une amplitude crête-à-crête de l'ordre de 7 µm, elles entraînent une incertitude sur la largeur de seulement ± 4 µm car les ondulations des deux bords sont presque parallèles. Le cumul des deux sources d'incertitudes (ondulations d'une part et irrégularité et épaisseur de la ligne d'autre part) résulte en une incertitude totale de ± 6 µm obtenu en faisant la moyenne quadratique des deux incertitudes.

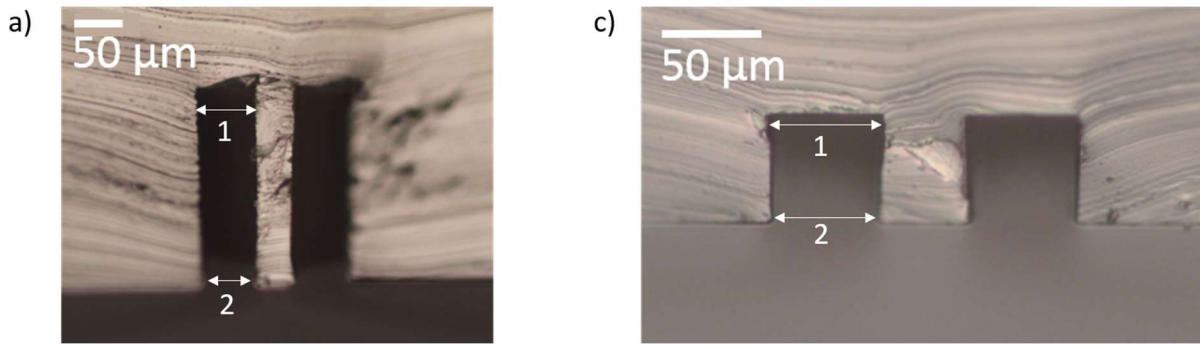


Figure 23 : image en microscopie optique de la coupe d'une cellule fluidique présentant des microcanaux de hauteur nominale a) 200 µm b) 50 µm.

Nous avons réalisé une coupe de deux cellules fluidiques, avec une lame de scalpel, afin de voir si la largeur des canaux est homogène selon la direction verticale. La Figure 23 montre les images obtenues. La coupe a été réalisée perpendiculairement aux microcanaux, à l'endroit où ils sont le plus rapprochés. La mesure des largeurs en haut (1) et en bas (2) sont indiquées dans le Tableau 4. L'incertitude de lecture indiquée est dominée par le flou sur les bords des canaux, qui est dû au fait que la coupe n'a pas été faite dans un plan bien défini. Notons qu'une variation de 10 % est observée. Cette variation est du même ordre que les variations dues à l'ondulation des bords des canaux, observe sur les images des canaux en vue de dessus. Nous verrons dans le chapitre suivant que les variations dans la largeur des microcanaux n'ont pas d'impact sur les propriétés électroniques du dispositif, dans la mesure où la résistance associée aux microcanaux est négligeable devant les autres résistances en série.

	Canaux de hauteur nominale 50 µm	Canaux de hauteur nominale 200 µm
Haut (1)	56 ± 4 µm	58 ± 4 µm
Bas (2)	50 ± 4 µm	52 ± 4 µm

Tableau 4 : mesures des largeurs des microcanaux sur les coupes de à différentes hauteurs. Les mesures ont été réalisées sur un seul échantillon. Les incertitudes font référence à l'incertitude de lecture.

Cependant, comme nous pouvons le voir sur les images en coupe, la distance $d_{intercanal}$ entre les deux microcanaux, que l'on a identifiée par la grandeur 5 sur l'image de la Figure 22 b), n'est pas définie précisément du fait de l'arrondi que présente le profil des microcanaux. Cet arrondi entraîne une incertitude de ± 6 µm sur $d_{intercanal}$. Nous verrons dans le chapitre suivant que cette incertitude résulte en une incertitude relativement grande sur la résistance du nanocanal enfoui, et sur la résistance totale du dispositif.

4. Assemblage du dispositif

Après réticulation du PDMS, les différentes cellules fluidiques sont découpées avec une lame de scalpel directement sur le moule. Des réservoirs (traversant verticalement la cellule de PDMS) de diamètre 2 mm sont ensuite découpés à l'emporte-pièce en se repérant avec les disques aux extrémités des microcanaux (voir Figure 19, p. 108). Les débris dus au découpage des réservoirs sont retirés au moyen d'un ruban adhésif, afin qu'ils ne créent pas de défaut entre la cellule de PDMS et le substrat SOI, ce qui pourrait diminuer la qualité du scellement des deux parties.

Afin de réaliser le scellement du PDMS sur le substrat de silicium et de faciliter le remplissage du nanocanal enfoui, le substrat de silicium est rendu hydrophile avec un traitement par plasma (Diener, pico, 15 min, gaz injecté : air, P = 0,5 mBar, puissance : 50 W). Le PDMS est ensuite ajouté dans la chambre de plasma, et un deuxième traitement est effectué (20 s, gaz injecté : air, P = 0,5 mBar, puissance : 30 W). La cellule fluidique est ensuite rapportée sur le substrat de silicium en plaçant les microcanaux de la cellule fluidique perpendiculairement au nanocanal enfoui du substrat de silicium. L'alignement est réalisé à l'œil, les motifs de la puce de silicium et de la cellule fluidique étant visibles à l'œil nu (dans le cas de la puce de silicim, c'est le nanocanal enfoui, dont la largeur est de 5 à 10 µm, qui est visible). Le dispositif assemblé est ensuite mis à l'étuve à 80°C pendant 5 min pour terminer le scellement.

A la suite de l'assemblage, chaque réservoir est rempli avec 6 µL de PBS 1X, électrolyte que l'on a utilisé pour la suite, dont la composition est indiquée dans le Tableau 5. Lorsque qu'un réservoir est rempli, un flux s'installe immédiatement dans le microcanal auquel elle est reliée, le liquide s'écoulant en direction du deuxième réservoir se trouvant à l'autre bout du microcanal. Pour les dispositifs dont les nanopores sont de diamètre nominal 107 nm, nous avons généralement constaté qu'à ce stade, le nanocanal enfoui est aussi rempli dans sa totalité : en effet, avant d'introduire le PBS dans le dispositif, il présente au microscope optique une couleur rose-jaune pâle, qui se transforme en jaune vif (Figure 24) après remplissage du dispositif. Le changement de couleur est quelquefois difficile à voir, il est cependant très visible lorsqu'une partie du nanocanal enfoui n'est pas remplie, ce qui entraine que les deux couleurs sont présentes l'une à côté de l'autre.

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na_2HPO_4	10 mM
KH_2PO_4	1,7 mM

Tableau 5 : concentration en différents sels du PBS 1X.

Pour les dispositifs présentant des nanopores de diamètre nominal 10 nm, 18 nm, 36 nm et 90 nm, le remplissage du nancanal enfoui ne se fait pas lorsqu'on utilise cette méthode. Dans ce cas-là, nous avons dû utiliser des cellules fluidiques dans lesquelles un cinquième réservoir (diamètre 1 mm) est percé à côté d'un des deux microcanaux. La cellule fluidique est collée de manière à ce que ce réservoir se trouve au niveau du triangle d'alimentation au bout de la ligne de nanopores. L'insertion de PBS dans ce réservoir à l'issue du collage permet de faciliter le remplissage du nanocanal enfoui. Lorsque le nanocanal enfoui n'est pas rempli en utilisant cette méthode, nous appliquons un traitement aux ultra-sons (voir protocole détaillé, annexe n°1, paragraphe 2.5). Notons que le remplissage du

nanocanal ne se fait pas avec un taux de réussite de 100 %, de sorte que certains dispositifs ne sont pas utilisables.

Sur la Figure 24, nous voyons la structure que forme l'assemblage de la cellule fluidique sur le substrat SOI. La bande jaune horizontale correspond au nanocanal enfoui remplis de PBS. Les deux bandes grises verticales correspondent au microcanal du compartiment 1 (bande de gauche) et au microcanal du compartiment 2 (bande de droite) remplis de PBS. A l'intersection entre le nanocanal enfoui et un microcanal (1 ou 2) se trouve n_o nanopores placés en parallèle. Ce nombre n_0 dépend de la largeur des microcanaux et du pas de la ligne de nanopores. Nous verrons dans le chapitre suivant que pour un dispositif de pas 1 µm, n_0 vaut 58 et pour un dispositif de pas 6 µm, n_0 vaut 9. Sur l'image, les ondulations visibles sur les bords du nanocanal enfoui correspondent aux cercles de gravure humide du nanocanal, les nanopores étant espacés de 6 µm pour l'échantillon de cette image, ces cercles n'ont pas totalement fusionné et sont bien visibles.

Ainsi, lorsqu'une électrode sera placée dans un des réservoirs de chaque compartiment, et qu'une différence de potentiel sera appliquée entre les deux électrodes, les ions passeront d'une électrode à l'autre en empruntant le microcanal du compartiment 1 puis un premier réseau de $n_0 = 458$ ou $n_0 = 9$ nanopores se trouvant entre ce microcanal et le nanocanal enfoui, puis le nanocanal enfoui, puis un second réseau de $n_0 = 58$ ou $n_0 = 9$ nanopores communiquant avec le microcanal du compartiment 2, puis enfin ce microcanal jusqu'à la deuxième électrode. Nous montrerons dans le chapitre 4 qu'il est possible de sceller les nanopores du compartiment 2 avec des nanoparticules ou en incubant une suspension de LUV/SUV.

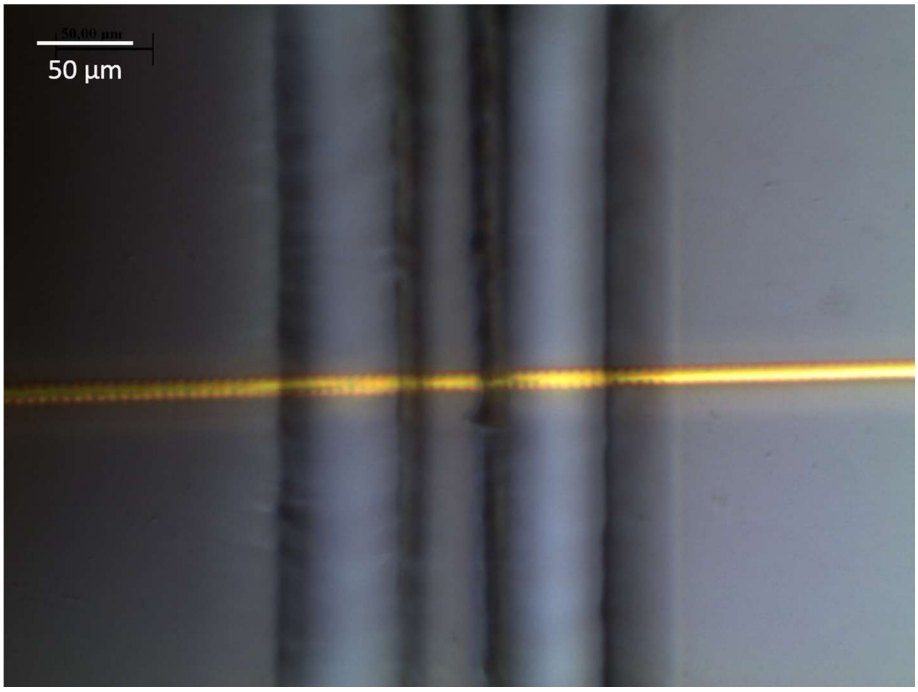


Figure 24 : image en microscopie optique montrant un dispositif assemblé et rempli de PBS 1X (pas 6 µm, diamètre nominal 90 nm).

5. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons vu comment sont fabriqués et assemblés nos dispositifs destinés à l'enregistrement de l'activité de canaux ioniques membranaires. Ces dispositifs sont constitués de deux parties, un substrat SOI et une cellule fluidique. Les substrats SOI comprennent une ligne de nanopores qui ont pour diamètre nominal 10 nm, 18 nm, 36 nm, 90 nm 107 nm ou 142 nm. La longueur de la ligne est 1 mm et son pas est de 1 µm ou 6 µm. Les nanopores sont réalisés par lithographie électronique et gravure RIE de la couche supérieure de silicium. Un nanocanal de largeur comprise entre 5 et 10 µm est ensuite gravé dans l'oxyde enfoui par les nanopores, au moyen d'une gravure humide. Enfin, une oxydation thermique permet d'isoler le substrat SOI afin d'éviter les fuites de courant lors des mesures électriques en milieu liquide. Nous utilisons également cette oxydation thermique comme stratégie pour réduire la dimension latérale des nanopores et diminuer ainsi la contrainte sur l'étape de lithographie électronique et de gravure RIE. La dispersion observée sur le diamètre final des nanopores a été caractérisée sur un échantillon (diamètre nominal 107 nm) et est de l'ordre de 5 %.

Les cellules fluidiques sont obtenues par réticulation de PDMS coulé sur des moules faits à partir de substrats de silicium et comprenant des motifs saillants de SU-8. Ces cellules comprennent deux microcanaux, de longueur 3,88 mm et de largeur nominale 50 µm. Deux hauteurs nominales différentes ont été utilisées : 200 µm pour un premier type de cellule fluidique et 50 µm pour un deuxième type de cellule fluidique. Les microcanaux sont rendus accessibles pour leur remplissage et les mesures électriques par des réservoirs percés à l'emporte-pièce dans la cellule fluidique. L'utilisation de masques souples pour la photolitographie intervenant dans la fabrication des moules conduit à d'importantes fluctuations dans la largeur des microcanaux. Nous verrons dans le chapitre suivant que ces fluctuations ne seront pas gênantes pour la modélisation électrique du dispositif. En revanche, nous verrons que le profil arrondi des « coins » des microcanaux entraine une incertitude sur la longueur du nanocanal enfoui qui entrainera une incertitude importante sur la résistance totale calculée du dispositif.

Suite à l'assemblage de la cellule fluidique sur le substrat SOI, les microcanaux de la cellule fluidique sont remplis de PBS par les réservoirs, ce qui a pour effet de remplir les nanopores et le nanocanal enfoui. Afin de mener les enregistrements électriques, une électrode sera ensuite placée dans un des réservoirs du compartiment 1, et une autre électrode sera placée dans un réservoir du compartiment 2. Le courant ionique s'établira d'une électrode à une autre en empruntant le chemin suivant : le microcanal du compartiment 1 jusqu'aux $n_0 = 58$ ou $n_0 = 9$ nanopores en parallèle faisant le lien avec le nanocanal enfoui. Puis, après avoir traversé ces nanopores, il passera dans le nanocanal enfoui, jusqu'aux $n_0 = 58$ ou $n_0 = 9$ nanopores faisant le lien avec le compartiment 2. Il passera ensuite par ces nanopores, que l'on souhaite sceller par une bicouche lipidique comportant des canaux ioniques fonctionnels. Enfin, il passera par le microcanal du compartiment 2 jusqu'au réservoir où se trouve la deuxième électrode.

Nous avons mentionné à la fin du chapitre 1 les différents avantages du mode d'intégration que nous utilisons. Nous pouvons noter qu'il présente aussi des limites : le pas de la ligne de nanopores doit être inférieur ou égal à 6 µm, à cause du problème d'effondrement du nanocanal enfoui pour une durée de gravure humide supérieure à 2 min. Il n'est donc pas possible avec la dimension choisie de nos canaux fluidique d'avoir moins de $n_0 = 9$ nanopores en parallèle dans chaque microcanal. Enfin, comme

nous l'avons vu, le remplissage du nanocanal enfoui n'est pas toujours possible. Ce problème pourrait être corrigé en utilisant des substrats avec une épaisseur d'oxyde enfoui plus grande afin d'avoir un nanocanal enfoui avec un volume plus grand.

6. Références

1 Marchand, R. *et al.* (2015) Controlled sealing of nanopores using an easily fabricated silicon platform combining in situ optical and electrical monitoring. *Microelectron. Eng.* 144, 57–60

2 Guerfi, Y. *et al.* (2013) High resolution HSQ nanopillar arrays with low energy electron beam lithography. *Microelectron. Eng.* 110, 173–176

3 Thibault, C. *et al.* (2009) Porous silicon membrane, with an integrated aqueous supply, for two chamber AFM. *Microelectron. Eng.* 86, 1393–1395

4 Buchholz, K. *et al.* (2008) Silicon-on-insulator based nanopore cavity arrays for lipid membrane investigation. *Nanotechnology* 19, 445305

5 Deal, B.E. and Grove, A.S. (1965) General relationship for the thermal oxidation of silicon. *J. Appl. Phys.* 36, 3770–3778

Chapitre 3 : Caractérisation électrique des dispositifs en milieu liquide

Nous allons maintenant caractériser les propriétés électriques en milieu liquide de nos dispositifs, afin d'en déduire un schéma électrique équivalent. Ce schéma permettra de prédire l'ordre de grandeur des variations de courant attendues lors du scellement des nanopores par des nanoparticules ou par une bicouche suspendue, expériences qui seront réalisées dans le chapitre 4. Le schéma électrique nous permettra aussi de comparer notre dispositif avec les dispositifs présentés dans le chapitre 1 en termes de niveau de bruit attendu.

1. Modèle électrique

La Figure 1 montre un schéma en vue de dessus du dispositif. Nous avons numéroté les réservoirs et les compartiments. Ainsi, le compartiment 1 est défini comme le réservoir 1, le microcanal 1 et le réservoir 3. Le compartiment 2 est défini comme le réservoir 2, le microcanal 2 et le réservoir 4. Les compartiments sont reliés au nanocanal enfoui par les nanopores. Nous avons indiqué les différents éléments utilisés pour le modèle électrique : la résistance des microcanaux fluidique $R_{microcanal}$, les impédances de couplage capacitif Z_{12} et Z_{34} entre les réservoirs 1 et 2 d'une part, et 3 et 4 d'autre part, la résistance de fuite R_{fuite} entre les compartiments 1 et 2, et $R_{réseau}$, la résistance associée au réseau que constitue les nanopores et le nanocanal enfoui. Nous allons dans ce paragraphe présenter ces différents éléments les uns après les autres, et calculer leur valeur à partir des dimensions géométriques et de données concernant les matériaux utilisés.

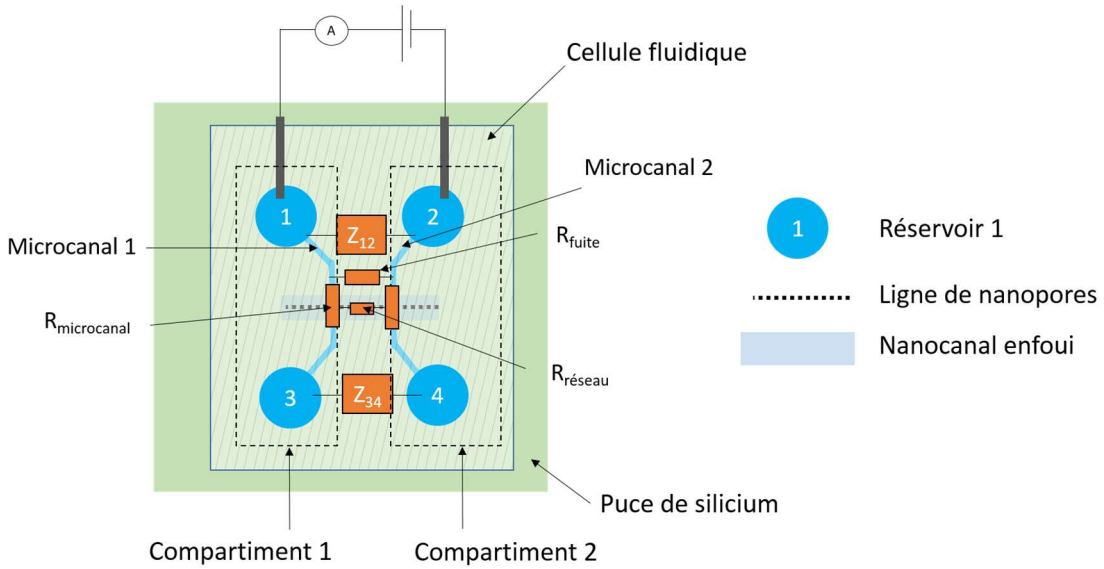


Figure 1 : schéma du dispositif en vue de dessus, où sont indiqués les différents éléments du circuit électrique équivalent que nous utilisons pour le modèle électrique.

1.1. Résistance des microcanaux

La Figure 2 a) montre une vue de dessus de l'interface fluidique de notre dispositif. Nous avons représenté une vue de côté sur la Figure 2 b), où la cellule est scellée par un substrat quelconque. Nous appelons R_a (résistance d'accès) la résistance associée au volume d'électrolyte se trouvant dans les deux réservoirs en série, et $R_{microcanal}$ la résistance associée à un microcanal. Nous calculerons la valeur des résistances avec l'équation (1), qui donne la résistance R d'un tronçon rempli d'électrolyte de résistivité ρ, de longueur L et de section S. La valeur de la résistivité du PBS est de **0,63 Ωm** à température ambiante [1,2].

$$(1) \quad R = \rho \frac{L}{S}$$

La résistance R_a a ainsi été évaluée à 1 kΩ, en prenant comme hauteur des réservoirs 2,5 mm et 2 mm comme section. NB : du fait de l'hydrophobicité de la surface supérieure de la cellule de PDMS, une goutte se forme lorsque le volume de PBS inséré est supérieur au volume du réservoir.

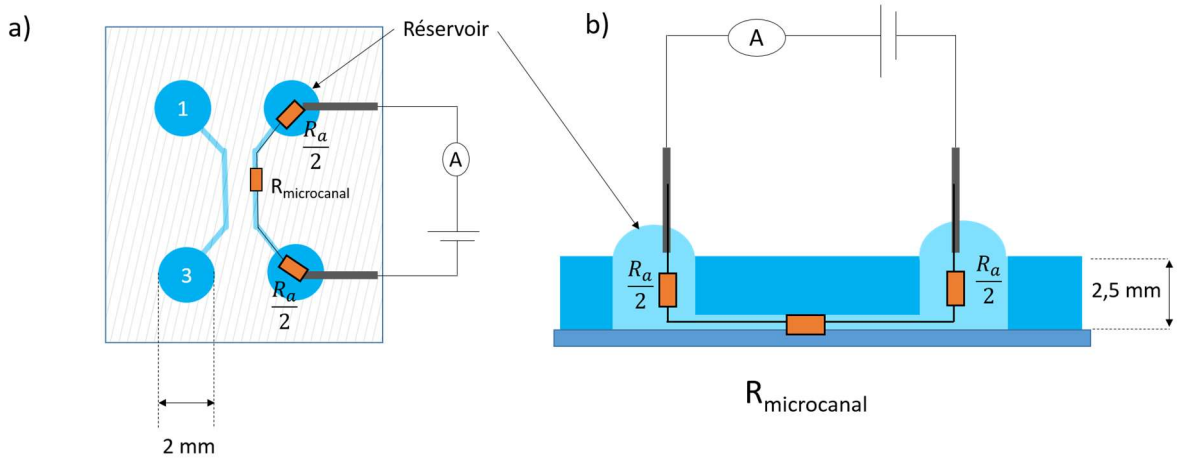


Figure 2 : schéma équivalent de la cellule fluidique, a) vue de dessus. b) vue de côté.

Pour les microcanaux, nous nous somme basés sur leur caractérisation géométrique réalisée dans le chapitre précédent (Tableau 3, paragraphe 3, chapitre 2). Rappelons que nous avions constaté qu'un canal est légèrement plus large que l'autre. Nous appelons ce canal le canal 1. Nous avons estimé la résistance théorique pour les canaux de hauteur nominale 200 µm et pour les canaux de hauteur nominale 50 µm. La longueur L a été estimée à 3,88 mm. Notons que le découpage des réservoirs à l'emporte-pièce entraîne des variations de cette longueur, de sorte que l'on a L = 3,88 ± 0,5 mm. La mesure de la largeur l et de la hauteur h des microcanaux a été réalisée sur deux cellules fluidiques dans le chapitre précédent. Les valeurs de résistance obtenues sont indiquées dans le Tableau 1.

Hauteur nominale	Dimensions L : longueur l : largeur h : hauteur	Résistances théoriques
50 µm	L = 3,9 ± 0,5 mm l = 61 ± 4 µm (canal 1) l = 54 ± 4 µm (canal 2) h = 54 ± 0,7 µm	740 ± 100 kΩ (canal 1) 830 ± 110 kΩ (canal 2)
200 µm	L = 3,9 ± 0,5 mm l = 61 ± 4 µm (canal 1) l = 57 ± 4 µm (canal 2) h = 205 ± 4 µm	190 ± 25 kΩ (canal 1) 210 ± 27 kΩ (canal 2)

Tableau 1 : résistances calculées pour les microcanaux de hauteur nominale 50 µm et 200 µm. Les incertitudes proviennent de l'incertitude que nous avons sur les dimensions géométriques des canaux.

1.2. Couplage capacitif entre le compartiment 1 et le compartiment 2

Nous allons à présent étudier le couplage capacitif entre les compartiments 1 et 2. Ce terme correspond à C_S que nous avons introduit dans le chapitre 1. La quantification de cet élément est importante car il impacte directement le niveau de bruit à haute fréquence lors des mesures électriques, à cause du bruit de l'amplificateur e_n combiné avec cette capacité, et à cause du bruit diélectrique si la capacité n'est pas idéale. Par exemple, pour le bruit de l'amplificateur, en supposant que la tension de bruit à l'entrée de l'amplificateur est de 2,5 $nV/\sqrt{Hz}$, pour une bande passante de 5 kHz, le courant de bruit calculé pour C_S = 10 pF est de 32 fA RMS (correspondant à un seuil de détection de 5 σ = 0,16 pA) et de 3,2 pA RMS (correspondant à un seuil de détection de 16 pA) pour une capacité de 1 nF (données calculées à partir du tableau 4, chapitre 1, paragraphe 2.3.2).

Deux capacités sont *a priori* à prendre en compte : la capacité entre les deux compartiments *via* le PDMS, et la capacité entre les deux compartiments *via* le substrat SOI. Nous utiliserons pour les calculs, l'équation (2) qui donne la valeur d'une capacité pour un condensateur plan d'épaisseur e composé de deux armatures de surface S et d'un milieu diélectrique de permittivité relative ε_r entre les deux armatures. ε_0 = 8,85.10^{-12} F/m représente la permittivité du vide.

$$(2) \quad C = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{S}{e}$$

1.2.1. Couplage capacitif via le PDMS

Un calcul simple d'ordre de grandeur montre que la capacité *via* le PDMS C_{PDMS} est inférieure à 0,2 - 0,3 pF, ce qui, comme nous allons le voir, est négligeable devant la capacité *via* le substrat SOI. Considérons dans un premier temps le tronçon où les canaux sont les plus rapprochés (tronçon n°1 sur la Figure 3. Celui-ci a une longueur de 420 µm, et les canaux sont espacés à cet endroit de $d_{intercanal} \approx$ 40 µm, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent. En prenant $\boldsymbol{\varepsilon_r}$ = 2,5, la capacité correspondante pour un canal de hauteur 200 µm est de 4.10^{-14} F et de 10^{-14} F pour un canal de hauteur

50 µm. La capacité associée aux tronçons n° 3 et 4 est négligeable devant celle du tronçon n°1 car la distance e entre les canaux y est plus grande que 10 $d_{intercanal}$, pour une surface du même ordre. En supposant que la capacité due au tronçon n°2 est égale à la moitié de celle du tronçon n°1, nous pouvons donc estimer la capacité totale associée aux microcanaux de l'ordre de 2 fois la capacité du tronçon n°1, soit 8.10^{-14} F pour un canal de hauteur nominale 200 µm et 2.10^{-14} F pour un canal de hauteur nominale 50 µm. Nous pouvons aussi borner la capacité entre les réservoirs 1 et 2 par la capacité correspondant aux deux armatures fictives en rouge sur la Figure 3 : en prenant une hauteur des réservoirs de 2,5 mm, la capacité correspondante est de 1.10^{-13} F. La capacité réelle entre le réservoir 1 et 2 sera inférieure à cette capacité, car l'espace entre les réservoirs est plus grand que la distance entre les deux armatures rouges. Nous concluons que pour l'ensemble des microcanaux et des deux couples de réservoirs, la capacité totale est inférieure à 0,2 pF pour les canaux de hauteur nominale 50 µm et à 0,3 pF pour les canaux de hauteur nominale 200 µm.

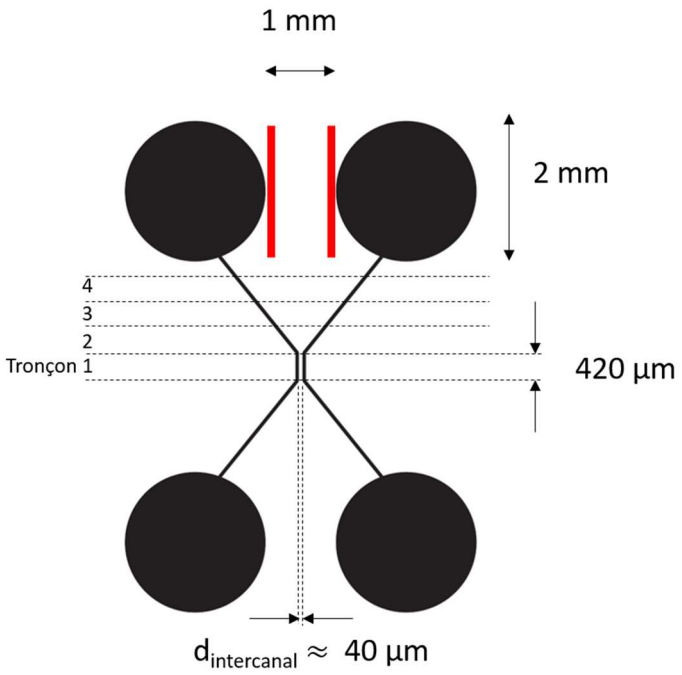


Figure 3 : schéma de la cellule fluidique en vue de dessus, à l'échelle, avec découpage en tronçons pour le calcul de la capacité C_{PDMS}. Les traits rouges correspondent à des armatures fictives correspondant à une capacité plus grande que la capacité réelle entre les réservoirs, ce qui nous permet de définir une valeur maximale pour la capacité entre les réservoirs.

1.2.2. Couplage capacitif via le substrat SOI pour une géométrie simplifiée

Nous allons maintenant calculer le couplage capacitif *via* le substrat SOI. Considérons dans un premier temps le cas d'une géométrie plus simple où la cellule de PDMS ne contient que deux réservoirs et pas de microcanaux (Figure 4 a). Nous considérons que cette cellule est scellée sur un substrat SOI oxydé similaire à celui qui forme les puces de silicium de nos dispositifs. Nous appelons Z_{12} l'impédance correspondant au couplage entre les deux réservoirs *via* le substrat SOI. La Figure 4 b) montre une vue en coupe. Nous détaillerons les calculs pour le cas où le diamètre des réservoirs est de 2 mm et la distance entre les réservoirs est de $d_{réservoirs}$ = 1mm, c'est-à-dire le cas correspondant aux réservoirs des cellules fluidiques utilisées dans les dispositifs. Nous donnons aussi dans le Tableau 2 à la fin du

paragraphe les résultats pour le cas d'un diamètre des réservoirs de 2,8 mm ($d_{réservoirs}$ inchangé), cas que nous avons aussi caractérisé expérimentalement, comme nous allons le voir par la suite.

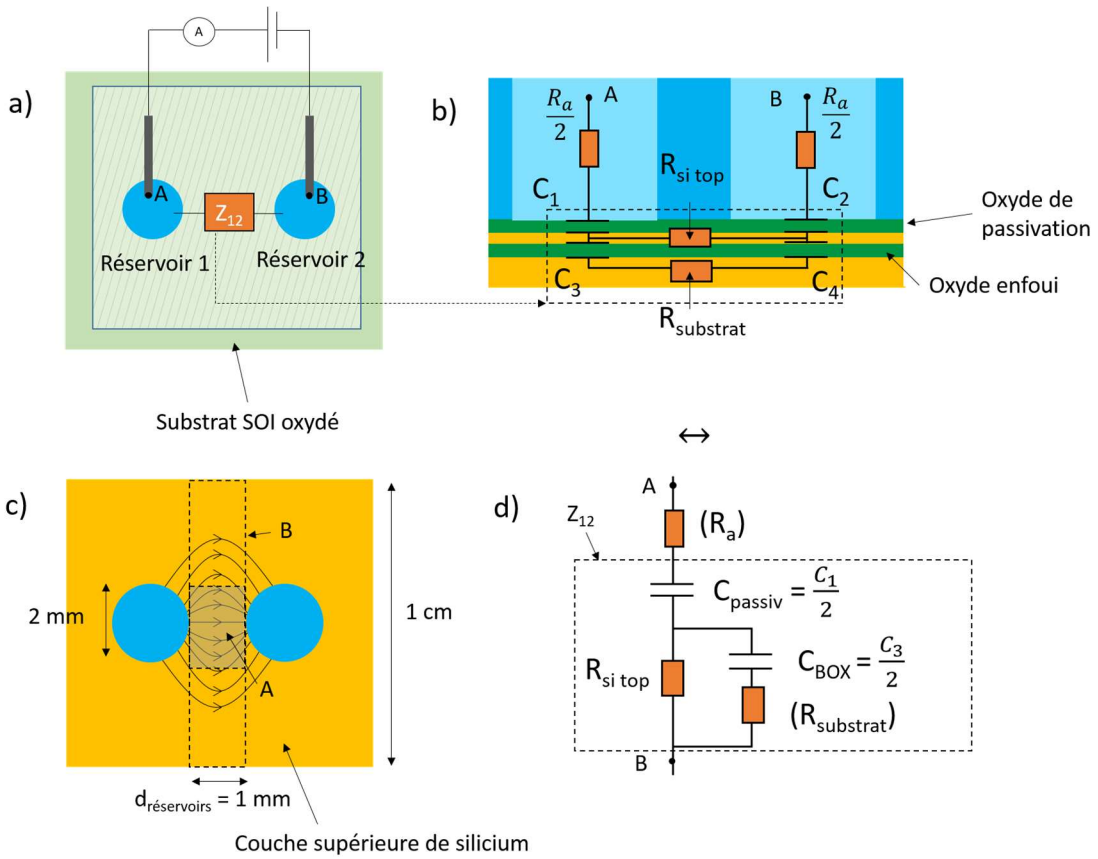


Figure 4 : schéma d'un dispositif constitué d'une cellule de PDMS ne comprenant que deux réservoirs, scellée sur un substrat SOI oxydé sans nanopores ni nanocanal enfoui. a) vue de dessus avec la cellule. b) vue de côté. c) schéma représentant des lignes de courant dans la couche de silicium supérieure en vue de dessus. d) schéma électrique équivalent.

La couche d'oxyde de passivation (celle obtenue par l'oxydation thermique en fin de procédé) représente une capacité C_1 entre l'électrolyte du réservoir 1 et la couche supérieure de silicium, et une capacité C_2 entre l'électrolyte du réservoir 2 et la couche supérieure de silicium. En prenant ε_r =3,9, l'épaisseur d'oxyde de 100 nm, et le diamètre des réservoirs égal à 2 mm, nous avons **$C_1 = C_2 = 1{,}1$ nF**. La couche supérieure de silicium correspond à une résistance que nous appelons $R_{Si\ top}$. L'estimation de cette résistance nécessiterait de considérer la géométrie en trois dimensions avec un logiciel d'éléments finis pour obtenir les lignes de courant et la valeur de la résistance. Nous pouvons cependant estimer un ordre de grandeur : la Figure 4 c) montre une représentation schématique des lignes de courant dans la couche supérieure de silicium. La résistance $R_{Si\ top}$ sera inférieure à la résistance du parallélépipède A (en plaçant des armatures fictives à gauche et à droite de ce parallélépipède) car le courant se répartit sur une zone plus large. Par ailleurs, $R_{Si\ top}$ sera inférieure à la résistance du parallélépipède B d'une largeur égale à celle de l'échantillon, car les lignes de courant doivent traverser ce parallélépipède et, en plus, le chemin allant des réservoirs à ce parallélépipède. En prenant pour A : épaisseur 170 nm (mesurée sur la caractérisation en coupe d'un échantillon, voir chapitre 2, paragraphe 2.4, figure 18 c), longueur 1 mm, largeur 2 mm, la résistivité donnée par le constructeur 18 Ω.cm, et pour B : épaisseur 170 nm, longueur 1 mm, largeur 1 cm, nous avons ainsi, pour un échantillon de 1 cm de côté :

$$100\ k\Omega \leq R_{si\ top} \leq 500\ k\,\Omega$$

Nous devons enfin considérer les capacités associées à l'oxyde enfoui, que nous avons appelé C_3 et C_4 (Figure 4 b). En supposant que l'armature du condensateur fictif a la même surface que le cas de C_1 et C_2 nous obtenons pour des réservoirs de diamètre 2 mm **$C_3 = C_4 = 550$ pF** (épaisseur d'oxyde 200 nm). En appliquant le même raisonnement que pour $R_{si\ top}$ pour le calcul de la résistance du substrat $R_{substrat}$, nous obtenons (résistivité 1,5 Ω.cm, épaisseur du substrat 625 µm) :

$$2{,}5\ \Omega \leq R_{substrat} \leq 12\ \Omega$$

Nous avons regroupé les différents termes et leur valeur sur la Figure 4 d). Pour cela, nous posons $C_{passiv} = C_1C_2/(C_1+C_2)$, et $C_{BOX} = C_3C_4/(C_3+C_4)$. Comme $C_1 = C_2$ et $C_3 = C_4$, nous avons $C_{passiv} = C_1/2$, et $C_{BOX} = C_2/2$. NB : nous caractériserons Z_{12} par spectroscopie d'impédance, avec une fréquence comprise entre 0,3 Hz et 100 kHz. Sur cette gamme de fréquence, l'impédance associée à C_{BOX}, qui vaut $Z_{BOX} = \frac{1}{2\pi C_{BOX} f}$, est comprise entre 0,6 GΩ et 6 kΩ. Nous pouvons donc négliger $R_{substrat}$. De même, R_a, qui est de l'ordre de 1 kΩ, pourra être négligée devant les impédances en série Z_{BOX} et $R_{si\ top}$.

Nous avons regroupé dans le Tableau 2 les résultats numérique pour C_{BOX}, C_{passiv}, $R_{substrat}$, $R_{si\ top}$, pour le cas de réservoirs de 2 mm de diamètre (cas des cellules fluidiques réelles) ainsi que pour le cas de réservoirs plus larges (2,8 mm), qui seront aussi utilisés dans la caractérisation électrique.

Diamètre des réservoirs	C_{passiv}	C_{BOX}	$R_{si\ top}$	$R_{substrat}$
2 mm	550 pF	275 pF	100 kΩ - 500 kΩ	2,5 Ω - 12 Ω
2,8 mm	1,1 nF	540 pF	100 kΩ - 350 kΩ	2,5 Ω - 8 Ω

Tableau 2 : valeurs numériques calculées pour les différents éléments de Z_{12}, pour le cas de réservoirs de diamètre 2 mm et 2,8 mm, espacés d'une distance $d_{réservoirs}$ de 1 mm.

1.2.3. Couplage capacitif via le substrat SOI pour la géométrie réelle des microcanaux

Considérons à présent le cas d'une cellule fluidique complète scellée sur un substrat SOI oxydé (sans nanopores et sans nanocanal enfoui). Une modélisation complète du couplage capacitif entre le compartiment 1 et le compartiment 2 devrait faire intervenir une intégrale double de couplages élémentaires d'un élément de surface électrolyte/substrat SOI du compartiment 1 avec un élément de surface électrolyte/substrat SOI du compartiment 2. En effet, en prenant par exemple un élément de surface dS_1 dans le réservoir 1, celui-ci est physiquement relié par une capacité à l'ensemble des éléments de surfaces dS_2 du compartiment 2 (réservoir 2, microcanal, réservoir 3). La résistance $R_{si\ top}$ et $R_{substrat}$ étant fonction de la position de l'élément de surface dS_2. Par ailleurs, il faudrait considérer la résistance des microcanaux en série pour les éléments de surface se trouvant dans les réservoirs 2 et 3.

Plutôt que de mener une telle modélisation, nous avons considéré deux modèles relativement simples. Le premier modèle est représenté sur la Figure 5 a) et b) : nous ne considérons que le couplage du réservoir 1 avec le réservoir 2 (Nous appelons Z_{12} l'impédance correspondante), et le couplage du réservoir 3 avec le réservoir 4 (Z_{34}). Nous considérons par ailleurs que Z_{12} est séparé de Z_{34} par les résistances des deux microcanaux mises en série. Nous négligerons le couplage du compartiment 4

avec le compartiment 1, et celui du compartiment 3 avec celui du compartiment 2. De même, le couplage au niveau des microcanaux sera négligé : la surface de contact entre l'électrolyte d'un microcanal et le substrat SOI est de l'ordre de 0,2 mm², ce qui est négligeable devant celle des réservoirs, de l'ordre de 3 mm² pour un réservoir. Enfin, nous considérerons que $Z_{12} = Z_{34}$, et prendrons les valeurs des différents éléments C_{BOX}, C_{passiv}, et $R_{si\ top}$ qui ont été calculées dans le Tableau 2 pour le cas de réservoirs de 2 mm de diamètre.

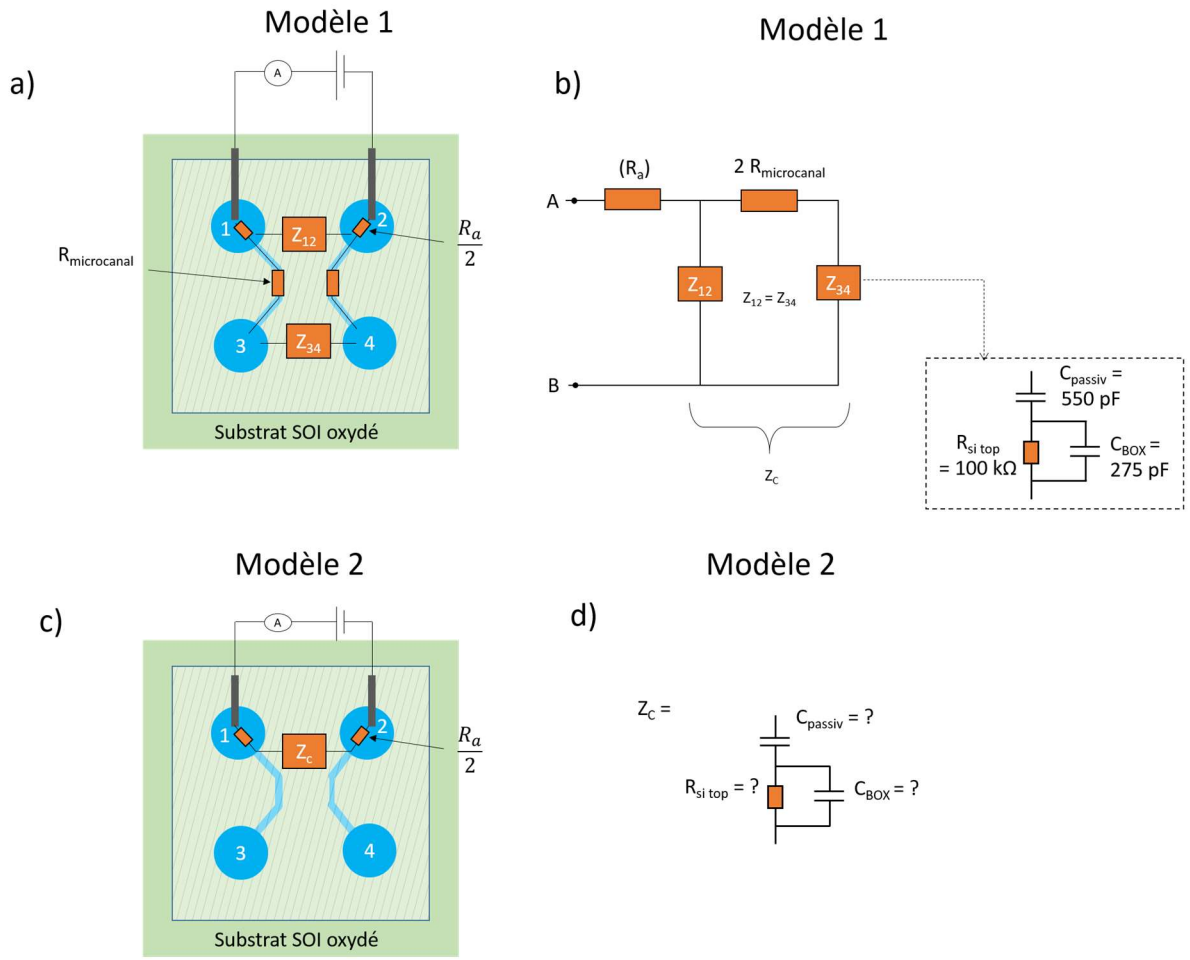


Figure 5 : a) et b) schéma du modèle 1. a) vue de dessus. b) schéma équivalent après simplification. c) et d) schéma du modèle 2. c) vue de dessus. d) schéma équivalent après simplification.

Le deuxième modèle est représenté sur la Figure 5 c) et d). Ce modèle est empirique : nous verrons qu'il permet d'approcher les courbes expérimentales d'impédance. Dans ce cas, les valeurs de C_{passiv}, $R_{si\ top}$, et C_{BOX} sont *a priori* différentes des valeurs utilisées pour le modèle 1, et seront déterminées expérimentalement.

1.2.4. Perspectives d'amélioration

La capacité C_{passiv} pourrait être supprimée en oxydant totalement la couche supérieure de silicium, de sorte que l'oxyde de passivation touche l'oxyde enfoui. Par ailleurs, si l'épaisseur de l'oxyde enfoui est augmentée, la capacité finale résultante sera diminuée. Ainsi, avec un oxyde enfoui de 6 µm, nous obtiendrions sans changer la géométrie de la cellule fluidique une capacité C_{BOX} de 18 pF, ce qui est comparable par exemple aux dispositifs intégrés comprenant une cloison de polymère, présentés dans le paragraphe 2.3.6.1 du chapitre 1. Une telle valeur de capacité permettrait d'obtenir un niveau de bruit de l'amplificateur combiné avec la capacité relativement bas.

1.3. Résistance de fuite

Nous avons vu dans le chapitre 1 (paragraphe 1.1.6) qu'un élément important pour avoir un niveau de bruit suffisamment bas pour réaliser des mesures à l'échelle du canal unique est que la résistance de scellement de la bicouche R_b soit supérieure à 1 GΩ. Par exemple, dans le cas d'une bande passante de 5 kHz, le bruit thermique produit par une résistance de 1 GΩ est de 0,3 pA RMS (correspondant à un seuil de détection 5σ = 1,5 pA), alors qu'une résistance R_b de 100 MΩ produit un bruit thermique de 0,9 pA RMS (5σ = 4,5 pA) (données calculées à partir du tableau 4, chapitre 1, paragraphe 2.3.2). Dans les dispositifs qui ont été présentés dans le chapitre 1, les fuites de courant à travers la cloison utilisée pour séparer les deux compartiments sont négligeables devant la résistance de scellement de la bicouche R_b, de sorte que c'est R_b qui conditionne le niveau de bruit thermique de la mesure.

Dans la configuration « face avant » de notre dispositif, l'isolation électrique entre les compartiments 1 et 2 est obtenue par l'assemblage de la cellule fluidique sur le substrat SOI. Ce mode d'intégration n'ayant pas encore été utilisé pour des mesures sur les canaux ioniques, il convient de caractériser dans un premier temps la résistance de fuite entre les deux compartiments R_{fuite}, provenant du scellement imparfait entre la cellule fluidique et la puce de silicium, ou de la résistivité finie des matériaux diélectriques (PDMS, oxyde) utilisés comme cloison.

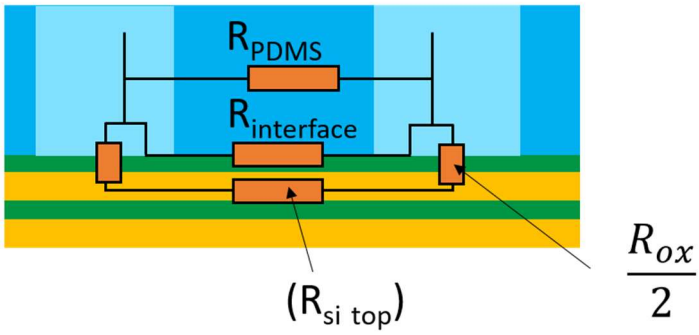


Figure 6 : diagramme en coupe et schéma équivalent de la résistance de fuite R_{fuite}. La coupe est un diagramme qui représente simultanément les réservoirs et l'endroit où les microcanaux sont les plus rapprochés.

Nous avons représenté la résistance de fuite sur le diagramme de la Figure 6. R_{ox} représente la résistance de fuite au travers de la couche d'oxyde de passivation. R_{PDMS} représente la résistance de fuite via le PDMS, et $R_{interface}$ représente la résistance de fuite *via* le scellement non parfait de la cellule de PDMS sur la puce de silicium. En supposant que les résistances sont données par l'équation (1), p.

118, nous attendons à ce que R_{PDMS} et $R_{interface}$ soient fixés par la zone où les microcanaux sont les plus rapprochés (car L est petit à cet endroit), et R_{ox} par la surface de contact entre les réservoirs et le substrat SOI (car S est grand à cet endroit). En supposant une résistivité de 10^{13} Ω.m pour l'oxyde de passivation (l'oxyde utilisé étant de qualité CMOS), nous déduisons une résistance R_{ox} de 320 GΩ avec les dimensions géométrique des réservoirs[1]. En supposant une résistivité de 10^{11} Ω.m pour le PDMS, nous obtenons[2] pour le tronçon où les microcanaux sont les plus rapprochés (tronçon 1 sur la Figure 3, p. 120) une résistance de 50 GΩ pour des canaux de hauteur nominale 200 µm et 200 GΩ pour des canaux de hauteur nominale 50 µm. Ces données sont regroupées dans le Tableau **3**. Nous n'avons pas de modèle pour calculer la résistance de l'interface $R_{interface}$.

R_{ox}	320 GΩ
R_{PDMS} (hauteur nominale 200µm)	50 GΩ
R_{PDMS} (hauteur nominale 50 µm)	200 GΩ

Tableau 3 **: ordre de grandeur calculé pour la résistance R_{ox} et R_{PDMS}.**

1.4. Résistance des nanopores et du nanocanal enfoui

Nous allons maintenant modéliser le réseau de résistances $R_{réseau}$ associé aux nanopores et au nanocanal enfoui. Cette modélisation permettra de prédire l'amplitude de sauts de courant au scellement des nanopores, discussion que nous réaliserons dans le paragraphe 1.5. La Figure 7 a) rappelle une vue de dessus du dispositif, et la Figure 7 b) montre une vue en coupe des nanopores et du nanocanal enfoui. Nous appelons $R_{nanopore}$ la résistance associée à un nanopore. $R_{interpore}$ est la résistance de la portion de nanocanal enfoui se trouvant entre deux nanopores débouchant sur un microcanal. $R_{nanocanal}$ est la résistance de la portion de nanocanal se trouvant entre les microcanaux 1 et 2. Nous appelons R_1 la résistance associée au réseau de nanopores débouchant sur le compartiment 1. Nous modéliserons par la suite le scellement des nanopores par un interrupteur ouvert placé en série avec le nanopore. Nous allons maintenant estimer la valeur des différentes résistances en utilisant la caractérisation morphologique du dispositif de silicium, réalisée dans le chapitre précédent.

[1] En prenant la résistance des réservoirs 1 et 2 en parallèle pour $R_{ox}/2$, mise en série avec la résistance associée aux réservoirs 3 et 4 en parallèle. NB : comme dans le cas du couplage capacitif, la surface de contact entre les microcanaux et le substrat SOI est négligeable devant celle des réservoirs.

[2] Nous avons utilisé l'équation (1), paragraphe 1.1, sans tenir compte de la répartition des lignes de courant dans le PDMS. Par ailleurs, nous avons considéré que la résistance est fixée par le tronçon où les microcanaux sont les plus rapprochés. Nous pouvons en effet utiliser la discussion sur le calcul de la capacité *via* le PDMS C_{PDMS} réalisée dans le paragraphe 1.2.1 du fait de l'analogie mathématique entre la conductance et la capacité en fonction de la surface des « armatures » en regard et de l'épaisseur de PDMS entre les « armatures ». Nous en concluons que lorsque les microcanaux sont éloignés la conductance devient négligeable par rapport à celle du tronçon où les microcanaux sont les plus rapprochés.

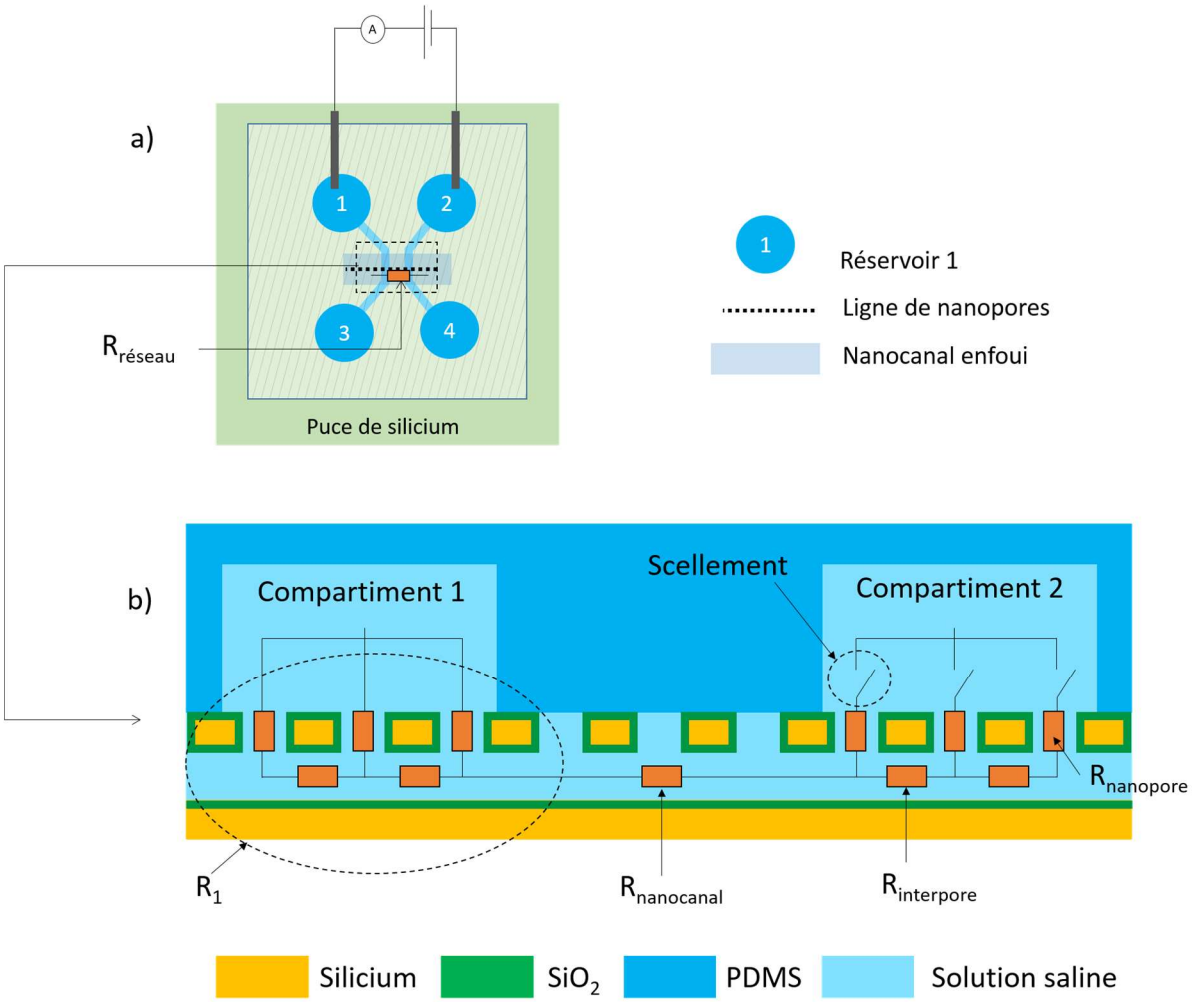
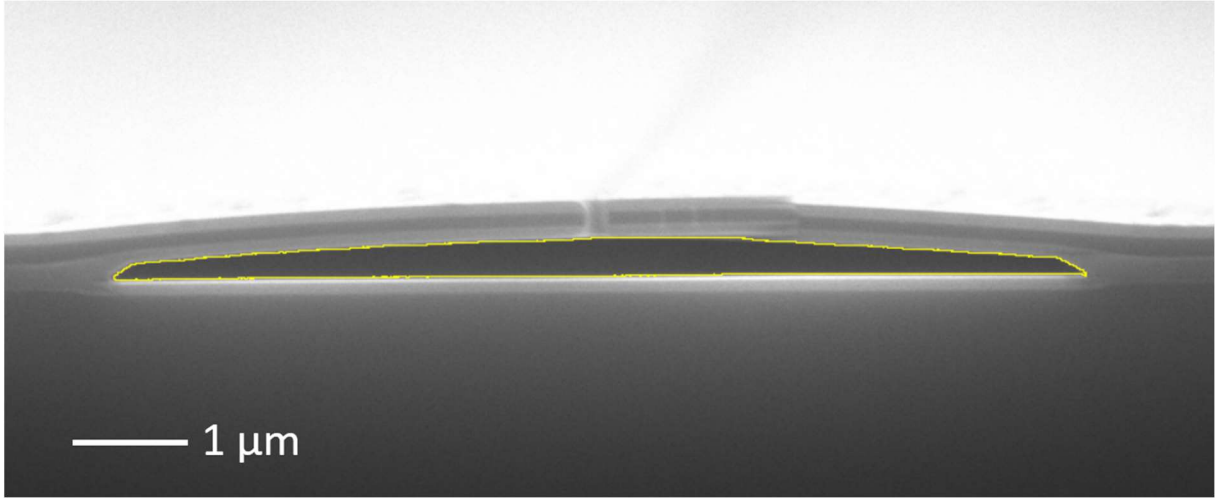


Figure 7 : schéma équivalent de notre dispositif. R_{PDMS} représente la résistance de fuite entre les deux compartiments due au scellement non idéal le la cellule fluidique sur la puce de silicium. a) vue de dessus. b) vue de côté. c) réseau de résistances associées aux nanopores et au nanocanal enfoui. Les interrupteurs représentent le scellement des nanopores par une bicouche suspendue ou une nanoparticule.

1.4.1. Résistance associée au nanocanal $R_{nanocanal}$ et $R_{interpore}$

Nous avons estimé la valeur de $R_{nanocanal}$ et $R_{interpore}$ en utilisant l'équation (1), p. 118, avec la valeur de la résistivité du PBS de 0,63 Ω.m [1,2]. Nous avons évalué la section des nanocanaux enfoui au moyen de l'image MEB en coupe, en mesurant l'aire associée à une sélection automatique réalisée avec le logiciel Image J ((Figure 8). La section mesurée sur l'image est de 2,0 ± 0,5 µm². La largeur du canal caractérisé (8,4 µm) étant légèrement différente de la largeur moyenne des canaux des dispositifs utilisés (8,7 ± 1,8 µm pour les dispositifs de pas 1 µm et 7,8 ± 1,8 µm pour les dispositifs de pas 6 µm, voir chapitre 2, fin du paragraphe 2.3), nous avons multiplié la section mesurée par un facteur correctif égal au rapport de la largeur du canal considéré sur celle du canal dont la section a été mesurée. Pour le calcul d'incertitude, nous avons considéré que la section du canal était donnée par $S = l \times h$ (largeur multiplié par une hauteur h effective) et que $\left(\frac{\Delta S}{S}\right)^2 = \left(\frac{\Delta l}{l}\right)^2 + \left(\frac{\Delta h}{h}\right)^2$. Nous avons évalué $\frac{\Delta h}{h}$ avec l'incertitude de lecture sur la mesure de la hauteur maximale du nanocanal sur l'image en coupe,

et $\frac{\Delta l}{l}$ donnée par l'incertitude de ± 1,8 µm sur la largeur des microcanaux caractérisée sur les images en microscopie optique pour un ensemble d'échantillon (voir chapitre 2, paragraphe 2.3).



(Figure 8 : caractérisation de la section d'un nanocanal enfoui sur une puce de silicium présentant des nanopores espacés de 1 µm. L'image MEB est la même que celle de la figure 18 c) du chapitre 2).

Pour la longueur du nanocanal enfoui, nous avons utilisé les mesures de $d_{intercanal}$ résalisées dans le chapitre 2 (voir tableau 3, paragraphe 3, chapitre 2). Nous avons pris la valeur moyenne des mesures sur les deux cellules. Par ailleurs, nous avons vu sur les images en coupe (voir figure 23, chapitre 2, paragraphe 3) que le profil des microcanaux est arrondi au niveau des coins, ce qui se traduit par une incertitude de ± 6 µm sur $d_{intercanal}$. Nous avons donc une longueur du nanocanal enfoui de 42 ± 6 µm. Sur la base de ces caractérisations, la résistance obtenue pour $R_{naocanal}$ et $R_{interpore}$ est donnée dans le Tableau 4. Pour le calcul d'incertitude, nous avons utilisé la formule $\left(\frac{\Delta R}{R}\right)^2 = \left(\frac{\Delta L}{L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta S}{S}\right)^2$, déduite de l'équation (1), p. 118.

	Longueur du nanocanal	Largeur	Section	$R_{nanocanal}$	$R_{interpore}$
Cas 1 : pas 6 µm	42 ± 6 µm	7,8 ± 1,8 µm	1,9 ± 0,5 µm²	14 ± 4 MΩ	(Longueur du tronçon 6 µm) 2,0 MΩ
Cas 2 : pas 1 µm		8,7 ± 1,8 µm	2,1 ± 0,5 µm²	13 ± 4 MΩ	(Longueur du tronçon 1 µm) 300 kΩ

Tableau 4 : résistance calculée pour $R_{nanocanal}$ et $R_{interpore}$, pour le cas des dispositifs de pas 6 µm et 1 µm.

1.4.2. Résistance associée aux nanopores

Deux termes sont a priori à considérer dans le calcul de la résistance des nanopores, d'une manière similaire à ce qui a été vu pour les pores micrométriques dans le chapitre 1 (voir équations (4) et (5), fin du paragraphe 2.3.2) : la résistance intérieure R_{int} et la résistance de convergence R_{conv}. Nous avons ainsi :

$$(3)\quad R_{nanopore} = R_{int} + R_{conv}$$

Pour le calcul de la résistance intérieure des nanopores, il n'est pas possible d'assimiler les nanopores à un cylindre : comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, les nanopores ont en effet des parois convexes à l'issue de l'oxydation, ce qui se traduit par l'existence d'une dimension latérale intérieure et une dimension latérale extérieure sur les images MEB en vue de dessus (Figure 9 a). Nous avons donc utilisé la caractérisation en coupe par FIB du nanopore de diamètre nominal 10 nm pour extraire un profil analytique empirique des parois. Nous avons supposés que pour les nanopores de plus grand diamètre nominal, le profil des parois était identique avec une translation vers l'extérieur. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les couronnes visibles sur les images MEB des nanopores en vue de dessus, et que l'on a attribuées à la convexité des parois vue par le dessus, ont une largeur relativement constante (de 24 à 34 nm, cf. tableau 2, paragraphe 2.4, chapitre 2) en fonction du diamètre nominal.

Nous avons ainsi considéré que les nanopores ont un profil à symétrie de révolution de rayon $r(x) = A\,x^2 + B$, où x représente l'abscisse en nm dans le sens de la hauteur du nanopore. Le paramètre variant en fonction du diamètre nominal est B, qui représente le rayon du nanopore à l'endroit le plus resserré. Nous avons obtenu r(x) en ajustant sur l'image en coupe, un graphe représentant r(x) et – r(x) (Figure 9 b) pour faire correspondre le profil analytique avec la ligne blanche délimitant le nanopore. Les échelles ont été rendues égales sur les deux images en ajustant la taille des images lors de la superposition. Nous avons obtenu A = 1,6 10^{-3} nm^{-1} et B = 5 nm. Pour les autres diamètres nominaux, nous avons pris comme valeur de B la moitié de la dimension latérale intérieure des nanopores. Nous avons pris une incertitude sur B de ± 3 nm, correspondant à l'incertitude observée de ± 6 nm sur la dimension latérale des nanopores après oxydation pour l'échantillon caractérisé (voir figure 16, paragraphe 2.4, chapitre 2).

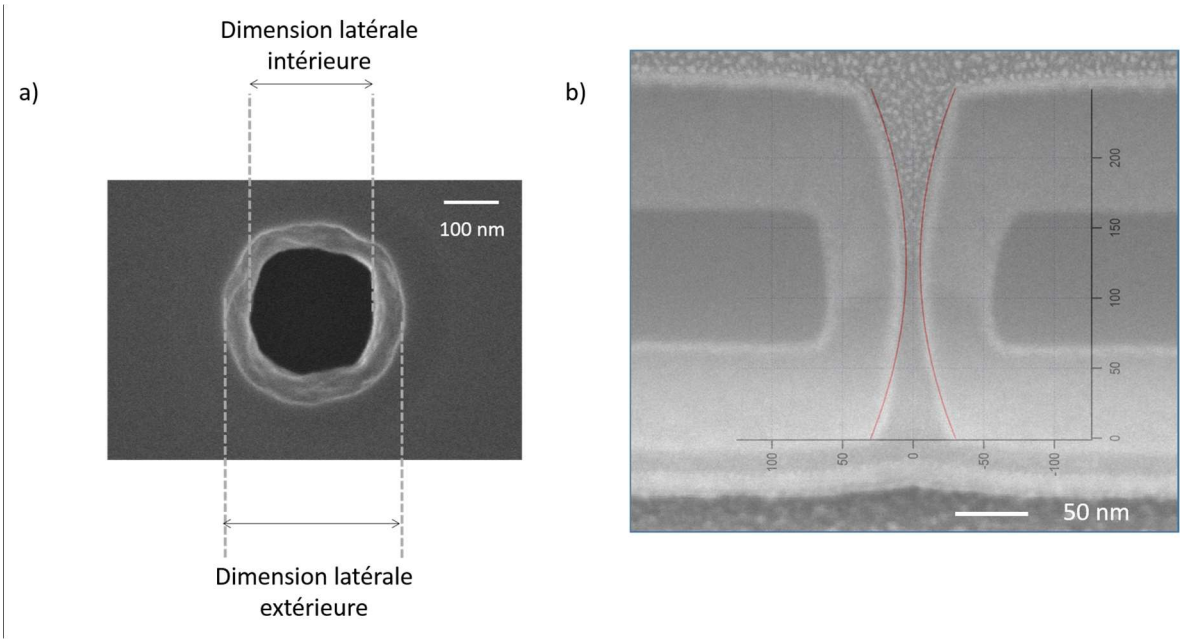


Figure 9 : a) image MEB en vue de dessus montrant la largeur intérieure et la largeur extérieure d'un nanopore de diamètre nominal 90 nm. b) vue en coupe d'un nanopore de diamètre nominal 10 nm, superposé avec un modèle empirique du profil du nanopore.

Nous avons ensuite calculé numériquement la résistance avec la formule suivante, h = 250 ± 3 nm désignant la hauteur du nanopore, mesurée sur l'image en coupe et ρ la résistivité de l'électrolyte :

$$(4)\quad R_{int} = \int_0^h \frac{\rho.dx}{\pi\, r^{\,2}(x)}$$

Pour la résistance d'accès, nous avons utilisé la formule suivante [6] (où r est le rayon du nanopore à l'entrée ou à la sortie du pore (c'est-à-dire dans notre cas, la dimension latérale extérieure sur les images MEB en vue de dessus) et ρ la résistivité de l'électrolyte :

$$(5)\quad R_{conv} = \frac{\rho}{2r}$$

La Figure **10** montre le résultat obtenu pour le calcul de la résistance intérieure et de la résistance de convergence des nanopores en fonction de leur diamètre nominal. Les barres d'erreur correspondent à l'incertitude sur B de ± 3 nm comme nous l'avons expliqué plus haut. Nous pouvons constater que la résistance de convergence est presque négligeable devant la résistance intérieure. Pour un nanopore cylindrique, le rapport R_{int}/R_{conv} est proportionnel au rapport longueur sur rayon du nanopore. Dans notre configuration, les nanopores ont une longueur de l'ordre de 250 nm, plus grande que leur dimension latérale. Les nanopores ne sont pas cylindriques dans notre cas, mais cela permet d'expliquer qualitativement le fait que la résistance intérieure soit prépondérante devant la résistance de convergence.

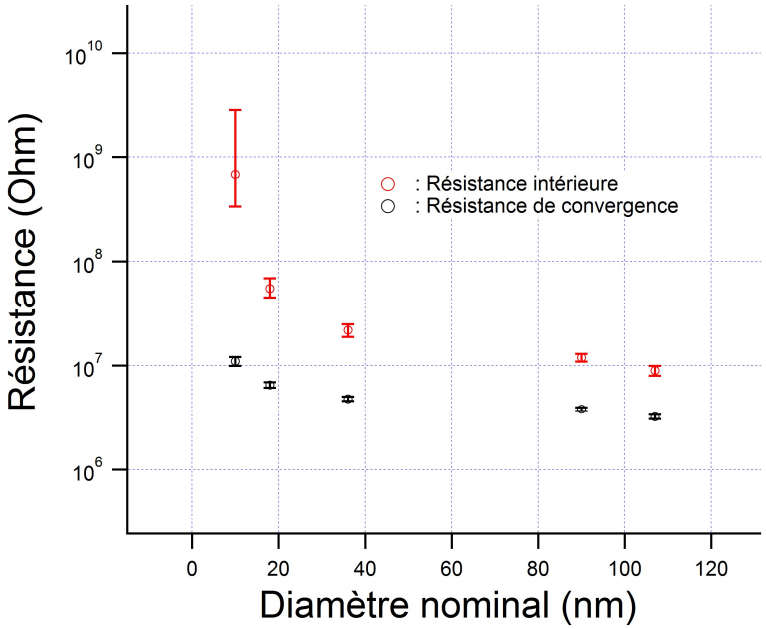


Figure 10 **: résistance d'accès et intérieure calculée en fonction du diamètre nominal des nanopores. Les barres d'erreur correspondent à l'incertitude sur B de ± 3 nm déduite des variations dans les dimensions latérales des nanopores après oxydation observée sur un échantillon.**

Nous pouvons aussi constater que la résistance intérieure varie de presque deux ordres de grandeur entre les nanopores de diamètre nominal 107 nm et les nanopores de diamètres nominal 10 nm. Notons enfin que l'incertitude relative est importante pour le diamètre nominal 10 nm. En effet, au niveau de la zone où le nanopore est le plus étroit, l'incertitude sur B de ± 3 nm représente une

variation relative du rayon de 60 %. Or, cette zone représente une part significative de la résistance totale du nanopore. Cet effet s'estompe pour les diamètres plus grands car l'incertitude relative est plus faible. Les variations relatives importantes pour le diamètre nominal 10 nm impliquent que la résistance d'un nanopore est susceptible de varier de manière significative d'un nanopore à l'autre ou d'un échantillon à l'autre.

Nous avons indiqué dans le Tableau 5 la résistance totale des nanopores, en additionnant la résistance de convergence et la résistance intérieure.

	Diamètre nominal 10 nm	Diamètre nominal 18 nm	Diamètre nominal 36 nm	Diamètre nominal 90 nm	Diamètre nominal 107 nm
Résistance totale $R_{nanopore}$	690 MΩ (340 MΩ - 2,8 GΩ)	62 MΩ (50 MΩ - 76 MΩ)	27 ± 3 MΩ	16 ± 1 MΩ	12,3 ± 0,7 MΩ

Tableau 5 : calcul de la résistance des nanopore en fonction du diamètre nominal $R_{nanopore}$, obtenue en additionnant la résistance de convergence et la résistance intérieure. Les incertitudes correspondent à l'incertitude sur B de ± 3 nm déduite des variations dans les dimensions latérales des nanopores après oxydation observées sur un échantillon.

1.4.3. Calcul de la résistance totale $R_{réseau}$

La validation de notre modèle théorique de la résistance des nanopores et du nanocanal enfoui se fera *via* une mesure de la résistance totale $R_{réseau}$ associée au réseau que constituent les n_0 nanopores débouchant sur le compartiment 1, le nanocanal enfoui, et les n_0 nanopores débouchant sur le compartiment 2. La Figure 11 montre le schéma électrique équivalent. La largeur des microcanaux a été mesurée sur les cellules fluidiques caractérisées dans le chapitre 2. Au niveau du tronçon où les canaux sont les plus rapprochés, cette largeur est égale à 58 ± 4 µm pour tous les canaux caractérisés (voir tableau 3, paragraphe 3, chapitre 2). Ceci nous permet de définir le nombre de nanopores n_0. Deux cas de figure sont à envisager :

- Cas 1 : l'écart entre les nanopores est de 6 µm, de sorte que $n_0 = 9$
- Cas 2 : l'écart entre les nanopores est de 1 µm, de sorte que $n_0 = 58$

La résistance $R_{réseau}$ est définie comme $R_1 + R_{nanocanal} + R_2$. Nous avons déjà calculé $R_{nanocanal}$ plus haut, il ne reste donc plus qu'à calculer R_1 et R_2. Le nombre de nanopores n_0 étant identique dans les deux compartiments, nous avons $R_1 = R_2$. Nous avons tout d'abord calculé R_1 en négligeant $R_{interpore}$, de sorte que l'on a $R_1 = R_{nanopore} / n_0$. Les valeurs obtenues sont notées en gris clair dans le Tableau 6.

En réalité, $R_{interpore}$ ne peut pas être négligé : pour les nanopores situés aux extrémités des microcanaux, l'addition de tous les $R_{interpore}$ en série résulte en une résistance qui n'est plus négligeable devant la résistance du nanopore. Nous avons pu calculer la résitance R_1 en prenant en compte $R_{interpore}$ en remarquant que l'on peut définir une suite mathématique permettant de calculer R_1 (la démonstration est donnée dans l'annexe 2, paragraphe 1).

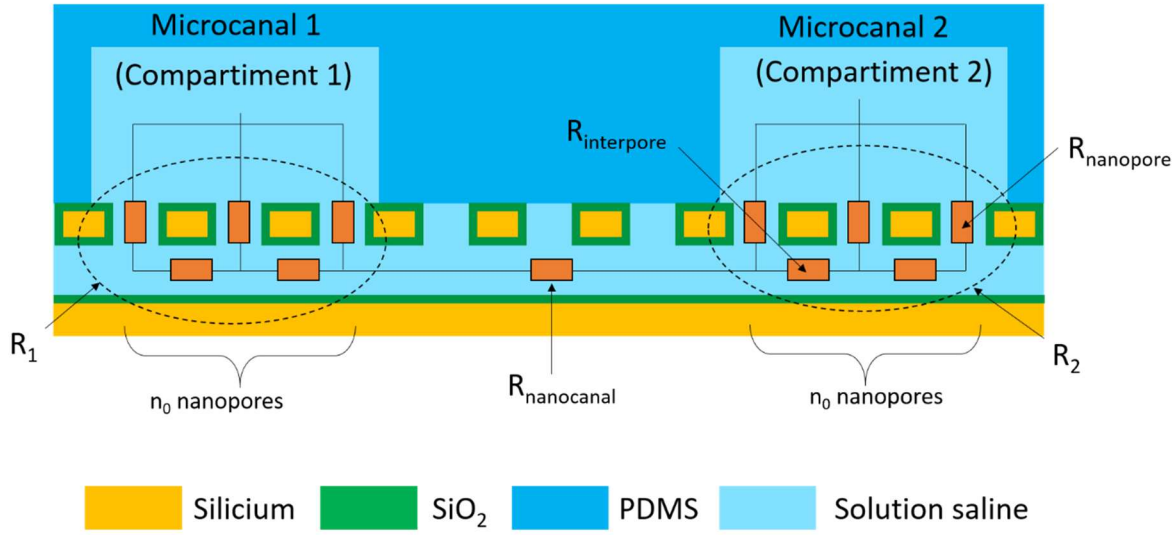


Figure 11 : vue en coupe du réseau constitué par les nanopores et le nanocanal enfoui, et schéma électrique équivalent.

		Diamètre nominal 10 nm	Diamètre nominal 18 nm	Diamètre nominal 36 nm	Diamètre nominal 90 nm	Diamètre nominal 107 nm
Cas 1 : pas 6 µm, $n_0 = 9$ $R_{interpore} = 2{,}0$ MΩ	R_1	82 MΩ (44,6 - 318 MΩ)	11 ± 2 MΩ	6,5 ± 0,5 MΩ	4,8 ± 0,3 MΩ	4,1 ± 0,2 MΩ
	$R_{réseau}$	**180 MΩ (103 – 650 MΩ)**	**36 ± 4 MΩ**	**27 ± 4 MΩ**	**24 ± 4 MΩ**	**22 ± 4 MΩ**
	R_1 en négligeant $R_{interpore}$	76 MΩ	6,1 MΩ	2,4 MΩ	1,3 MΩ	1,4 MΩ
	$R_{réseau}$ en négligeant $R_{interpore}$	166 MΩ	26 MΩ	19 MΩ	17 MΩ	17 MΩ
Cas 2 : pas 1 µm, $n_0 = 58$ $R_{interpore} = 300$ kΩ	R_1	17 MΩ (11 – 54 MΩ)	4,2 ± 0,5 MΩ	2,7 ± 0,2 MΩ	2,0 ± 0,1 MΩ	1,8 ± 0,1 MΩ
	$R_{réseau}$	**47 MΩ (35 – 121 MΩ)**	**22 ± 4 MΩ**	**19 ± 4 MΩ**	**18 ± 4 MΩ**	**17 ± 4 MΩ**
	R_1 en négligeant $R_{interpore}$	12 MΩ	950 kΩ	380 kΩ	210 kΩ	210 kΩ
	$R_{réseau}$ en négligeant $R_{interpore}$	37 MΩ	14,9 MΩ	13,6 MΩ	13,4 MΩ	13,4 MΩ

Tableau 6 : Résultats numérique pour le calcul de R_1 et de $R_{réseau}$ pour le cas 1 et pour le cas 2, en tenant compte de $R_{interpore}$ et sans tenir compte de $R_{interpore}$.

Nous définissons ainsi la suite :

$$u \rightarrow Res_u = R_{interpore} + \frac{Res_{u-1} R_{nanopore}}{Res_{u-1} + R_{nanopore}}, u \in \mathbb{N}, u \geq 2$$

Avec

$$Re_{\ 1} = R_{interpore} + R_{nanopore}$$

R_1 est ainsi donné par les valeurs $Res_{n_0} - R_{interpore}$ soit $Res_9 - R_{interpore}$ pour le cas 1 et $Res_{58} - R_{interpore}$ pour le cas 2. NB : la soustraction de $R_{interpore}$ permet de ne pas compter deux fois cette résistance aux deux extrémités du nanocanal enfoui.

Nous avons calculé les valeurs de R_1 avec un programme réalisé avec le logiciel Igor Pro, valeurs qui sont indiquées dans le Tableau 6. Les incertitudes sont dues à l'incertitude sur la résistance des nanopores, que nous avons vue dans le paragraphe précédent. Nous avons ensuite calculé la résistance totale $R_{réseau} = 2R_1+R_{nanocanal}$. Dans ce cas, l'incertitude sur R_1 s'additionne à celle sur $R_{nanocanal}$. L'incertitude sur $R_{nanocanal}$ est dominante pour les nanopores de diamètre nominal 18 nm, 36 nm, 90 nm et 107 nm. Notons que la contribution de la résistance $R_{interpore}$ sur R_1 et sur $R_{réseau}$ est effectivement non négligeable.

1.5. Calcul du saut de courant attendu lors du scellement des nanopores par des nanoparticules ou une bicouche suspendue

Afin de pouvoir interpréter les mesures électriques lors des expériences de capture de nanoparticules et de l'incubation de suspensions de liposomes (chapitre 4), nous avons essayé de prédire l'amplitude des sauts de courant que l'on devrait mesurer lors du scellement des nanopores. La Figure 12 montre l'expérience modélisée : nous considérons la situation où une différence de potentiel constante V_0 est appliquée aux bornes des électrodes, et où le courant I est mesuré en fonction du temps. Au début de l'expérience, aucun nanopore n'est scellé. Le courant I est donc égal à $V_0/R_{réseau}$. Nous supposons que les nanopores sont ensuite scellés les uns après les autres par des nanoparticules ou une bicouche suspendue. Lorsqu'un nanopore supplémentaire est scellé, nous devons mesurer un saut de courant ΔI dû à l'augmentation de la résistance totale du dispositif, le nombre de nanopores ouverts en parallèle diminuant. Nous supposons que le scellement est idéal, nous le modélisons par un interrupteur ouvert. Nous appellons n le nombre de nanopores scellés.

Dans un premier temps, nous négligeons $R_{interpore}$ pour les nanopores du compartiment 2. Nous gardons la valeur de R_1 qui comprend $R_{interpore}$, que nous avons calculée dans le Tableau 6. Notons par ailleurs que nous avons négligé la résistance des microcanaux et la résistance d'accès R_a des réservoirs, leur valeur étant négligeable devant la résistance totale du réseau nanopores - nanocanal enfoui. Le courant en fonction du nombre de nanopores scellés I(n) sera donné par la relation :

$$(6) \quad I(n) = \frac{V_0}{R_1 + R_{nanocanal} + \frac{1}{n_0 - n} R_{nanopore}}$$

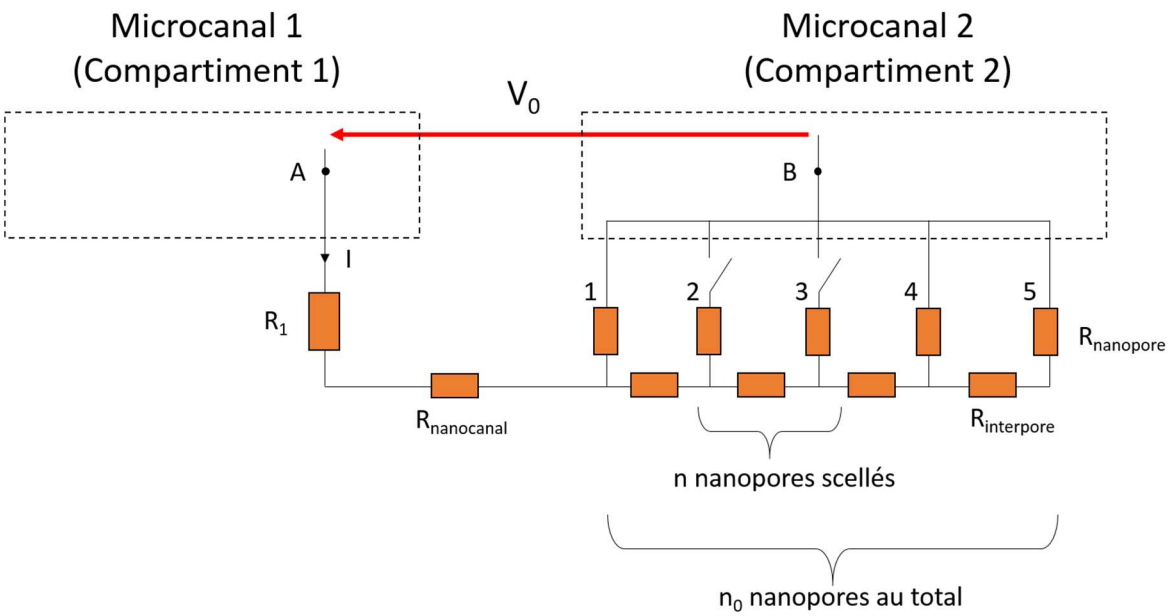


Figure 12 : schéma électrique de l'expérience de scellement des nanopores avec des nanoparticules ou une bicouche suspendue.

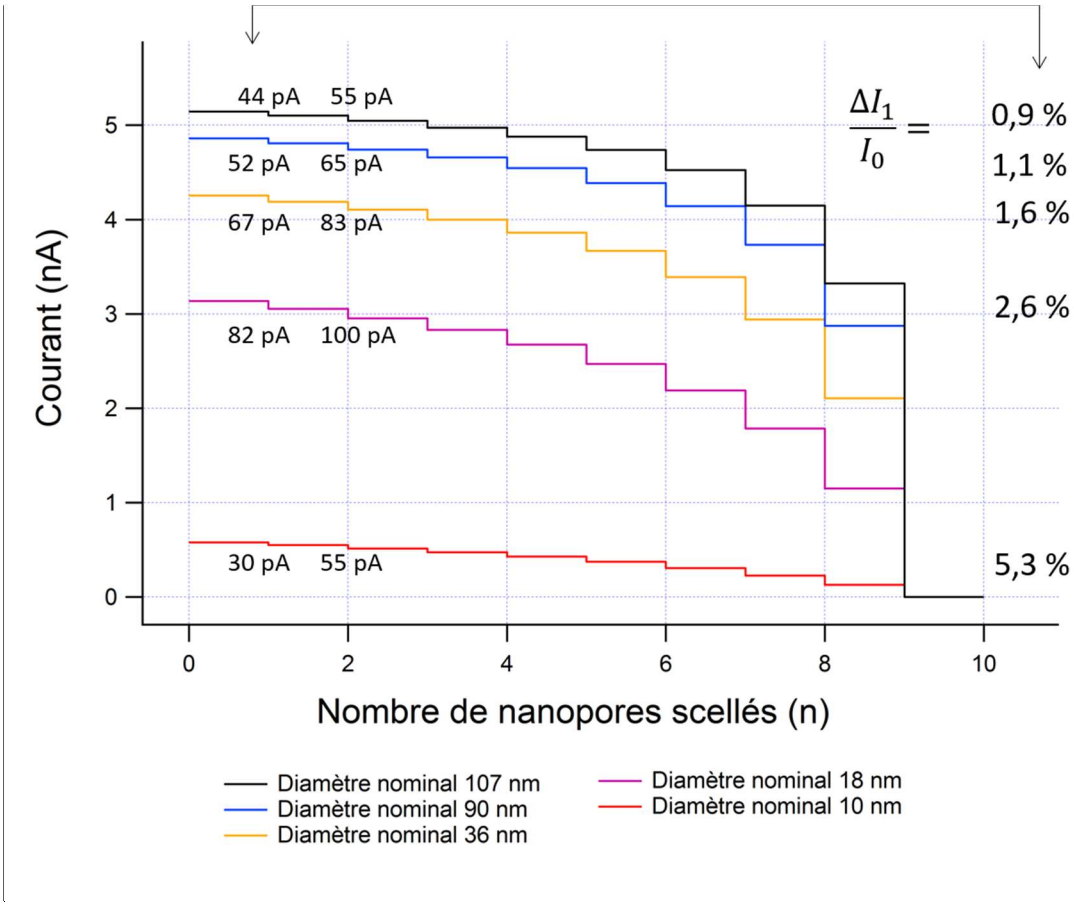


Figure 13 : courant calculé en fonction du nombre de nanopores scellés pour le cas n_0 = 9, pour des dispositifs présentant des nanopores de diamètre nominal 107 nm, 90 nm, 36 nm, 18 nm et 10 nm, en négligeant $R_{interpore}$. V_0 = 100 mV. Les valeurs des 2 premiers sauts sont indiquées pour chaque dispositif, et la valeur relative pour le premier saut $\frac{\Delta I_1}{I_0}$.

Nous avons calculé I(n) pour le cas $n_0 = 9$, et pour les différents diamètres nominaux de nanopores (Figure 9). Nous pouvons constater que le courant mesuré augmente lorsque le diamètre nominal augmente. Ceci est dû au fait que la résistance R_1 et $R_{nanopore}$ diminue lorsque le diamètre nominal augmente. Par ailleurs, nous pouvons constater que les sauts de courant augmentent à mesures que le nombre de pores scellés augmente. Ceci est prévisible dans la mesure où plus il y a de nanopores non scellés en parallèle, moins le scellement d'un nanopore modifie le courant de manière significative. Nous avons indiqué la valeur des deux premiers sauts à côté de chaque courbe. Nous pouvons constater un écart relatif de l'ordre de 20 % entre le premier et le deuxième saut pour le diamètre nominal 107 nm, et de 60% pour le diamètre nominal 10 nm.

Nous appelons ΔI_1 la valeur du premier saut. Nous avons indiqué la valeur relative $\frac{\Delta I_1}{I_0}$ à droite de la figure pour les différents diamètres nominaux (I_0 étant la valeur initiale du courant). Nous pouvons constater que ce rapport augmente à mesure que le diamètre des nanopores diminue. Nous pouvons démontrer (voir la démonstration dans l'annexe 2, paragraphe 2) que l'on a :

$$(7) \quad \frac{\Delta I_1}{I_0} = \frac{R_{nanopore}\left(\frac{1}{n_0} - \frac{1}{n_0 - 1}\right)}{R_1 + R_{nanocanal} + \frac{R_{nanopore}}{n_0 - 1}}$$

La valeur de cette grandeur diminue lorsque le nombre de nanopores n_0 en parallèle et la résistance du nanocanal augmentent. Ceci implique que si l'on veut maximiser la sensibilité du dispositif vis-à-vis des évènements de scellement, il faudra que la longueur du nanocanal et le nombre de nanopores n_0 en parallèle soient le plus petits possible. Ceci justifie pourquoi nous avons cherché à rapprocher au maximum les microcanaux, et à écarter au maximum les nanopores, dans les limites que nous le permettait le procédé de fabrication (voir le problème de l'effondrement du nanocanal enfoui pour les longues durées de gravure humide, paragraphe 2.3, chapitre 2). La dépendance en fonction de $R_{nanopore}$ (et donc du diamètre nominal) est plus difficile à mettre en évidence car $R_{nanopore}$ intervient dans R_1, mais nous n'avons pas l'expression analytique de R_1, que nous avons calculé en définissant une suite. Cependant, nous avons calculé la valeur numérique de $\frac{\Delta I_1}{I_0}$ pour différents diamètres nominaux, pour le cas 1 et pour le cas 2. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 7.

		Diamètre nominal 10 nm	Diamètre nominal 18 nm	Diamètre nominal 36 nm	Diamètre nominal 90 nm	Diamètre nominal 107 nm
$\frac{\Delta I_1}{I_0}$	Cas 1 : pas 6 µm, $n_0 = 9$ $R_{interpore} = 2{,}0$ MΩ	$5{,}3\ 10^{-2}$	$2{,}6\ 10^{-2}$	$1{,}6\ 10^{-2}$	$1{,}1\ 10^{-2}$	$8{,}7\ 10^{-3}$
	Cas 2 : pas 1 µm, $n_0 = 58$ $R_{interpore} = 300$ kΩ	$5{,}0\ 10^{-3}$	$1{,}0\ 10^{-3}$	$5{,}0\ 10^{-4}$	$3{,}2\ 10^{-4}$	$2{,}5\ 10^{-4}$

Tableau 7 : calcul de la valeur du premier saut de courant $\Delta I_1/I$ en fonction du diamètre nominal, pour le cas 1 et le cas 2, dans le cas où l'on néglige $R_{interpore}$ pour les nanopores débouchant sur le microcanal 2.

En réalité, la présence de $R_{interpore}$ entre les nanopores entraîne une valeur de saut différent selon la position du nanopore scellé. En effet, considérons par exemple le cas où aucun nanopore n'est scellé. Nous appliquons une différence de potentiel V_0. Le courant passant dans le nanopore n°5 (Figure 12) sera plus petit que le courant passant dans le nanopore n°1 à cause de la présence des résistances $R_{interpore}$ en série qui créent une chute de potentiel dans le nanocanal. Il en résulte que le saut de courant sera plus petit dans le cas où le nanopore 5 est scellé en premier, par rapport au cas où le nanpore 1 est scellé en premier. Nous avons montré dans l'annexe 2, paragraphe 3 comment calculer la valeur théorique du premier saut de courant ΔI_1 associé au scellement de nanopores situés aux deux bords du microcanal 2. Nous appelons ces deux valeurs ΔI_{1min} et ΔI_{1max}. Les résultats numériques, obtenus avec un programme réalisé avec le logiciel Igor Pro, sont regroupées dans le Tableau 8.

		Diamètre nominal 10 nm	Diamètre nominal 18 nm	Diamètre nominal 36 nm	Diamètre nominal 90 nm	Diamètre nominal 107 nm
Cas 1 : pas 6 µm, n_0 = 9 $R_{interpore}$ = 2,0 MΩ	$\frac{\Delta I_{1max}}{I_0}$	$5{,}8.10^{-2}$	$6{,}3.10^{-2}$	$7{,}2.10^{-2}$	$7{,}9.10^{-2}$	$8{,}3.10^{-2}$
	$\frac{\Delta I_{1min}}{I_0}$	$4{,}8.10^{-2}$	$1{,}2.10^{-2}$	$3{,}0.10^{-3}$	$8{,}9.10^{-4}$	$4{,}2.10^{-4}$
Cas 2 : pas 1 µm, n_0 = 58 $R_{interpore}$ = 300 kΩ	$\frac{\Delta I_{1max}}{I_0}$	$9{,}1.10^{-3}$	$1{,}4.10^{-2}$	$1{,}6.10^{-2}$	$1{,}7.10^{-2}$	$1{,}8.10^{-2}$
	$\frac{\Delta I_{1min}}{I_0}$	$2{,}8.10^{-3}$	$1{,}9.10^{-5}$	$3{,}6.10^{-7}$	$1{,}0.10^{-8}$	$1{,}2.10^{-9}$

Tableau 8 : valeurs relatives calculées du premier saut de courant lorsque $R_{interpore}$ est pris en compte pour les nanopores débouchant sur le compartiment 2, en fonction du diamètre nominal, et pour les différents cas de figure envisagés dans cette thèse. NB : ΔI_{1max} est associé au scellement du nanopore le plus à gauche du microcanal 2 sur la Figure 12, et ΔI_{1min} est associé au scellement du nanopore le plus à droite du microcanal 2.

Nous pouvons noter que dans tous les cas, les valeurs $\Delta I_{1min}/I_0$ et $\Delta I_{1max}/I_0$ encadrent bien la valeur $\Delta I_1/I_0$ que l'on avait calculée en négligeant $R_{interpore}$. Par ailleurs, pour chaque cas (n_0 = 9 ou n_0 = 58), l'écart entre $\Delta I_{1min}/I_0$ et $\Delta I_{1max}/I_0$ est d'autant plus grand que le diamètre nominal est petit. Ceci s'explique par le fait que plus le diamètre nominal est petit, plus $R_{nanopore}$ est grand devant $R_{interpore}$ et plus $R_{interpore}$ peut être négligé. Enfin, nous pouvons constater l'écart entre $\Delta I_{1min}/I_0$ et $\Delta I_{1max}/I_0$ est plus important lorsque n_0 augmente, effet bien visible pour le cas du diamètre nominal 107 nm.

En conclusion nous avons pu simuler une expérience de scellement séquentiel des nanopores par une bicouche suspendue ou des nanoparticules, dans le cas où l'on néglige $R_{interpore}$, résistance associée à la portion de nanocanal enfoui se trouvant entre deux nanopores. Dans ce cas, l'amplitude des sauts augmente à mesure que le nombre de nanopores scellés augmente. Par ailleurs, nous avons dans ce cas calculé l'expression analytique de la valeur du premier saut ΔI_1. L'expression obtenue montre que l'amplitude relative de ce premier saut est accrue lorsque le nombre de nanopores en parallèle n_0 ainsi que la résistance du nanocanal enfoui $R_{nanocanal}$ sont le plus petits possible. Dans le cas où l'on prend en compte $R_{interpore}$, nous avons pu estimer la valeur du premier saut de courant pour les deux cas extrêmes correspondant au scellement de nanopores situés en chaque bord du microcanal 2. Les valeurs ΔI_{1min} et ΔI_{1max} obtenues encadrent la valeur ΔI_1 que l'on avait calculée en négligeant $R_{interpore}$, un écart de plusieurs ordres de grandeurs étant constaté entre ΔI_{1min} et ΔI_{1max}.

2. Validation du modèle

2.1. Matériel utilisé et montages

Toutes les mesures ont été réalisées en utilisant comme électrolyte un tampon phosphate salin (PBS) afin d'utiliser des conditions similaires à celles qui seront utilisées lors de la réalisation des bicouches suspendues. La composition du PBS a été indiquée dans le chapitre précédent (Tableau 5, paragraphe 4, chapitre 2).

Nous avons utilisé deux électrodes d'Ag/AgCl commerciales. La partie AgCl a pour diamètre 0,4 mm et pour longueur 6 mm. Les électrodes ont été maintenues avec des pinces métalliques après avoir été enroulées dans du papier adhésif pour les isoler. Elles ont ensuite été reliées aux appareils de mesures avec des pinces crocodiles. Les électrodes sont plongées dans les réservoirs des dispositifs, remplis de PBS.

Les courbes I(V) (voltamétrie) et I(t) (chronoampérométrie) ont été réalisées avec un potentiostat Parstat MC (Ametek) comprenant une interface bas courant. Les courbes d'impédance ont été réalisées avec un potentiostat VMP3 (Biologic). Toutes les mesures ont été réalisées dans une cage de Faraday reliée à la masse. Les données ont été traitées et les graphs réalisés avec le logiciel IgorPro. Des informations complémentaires sur les protocoles expérimentaux sont données dans l'annexe 1.

2.2. Mesure de la résistance des microcanaux fluidiques

La résistance associée au PBS dans les microcanaux a été caractérisée au moyen de courbes I(V) afin de vérifier son caractère ohmique. Nous avons réalisé ces mesures sur deux cellules fluidiques : l'une comprenant des microcanaux de 50 µm de hauteur nominale et l'autre comprenant des canaux de 200 µm de hauteur nominale. Les cellules fluidiques ont été assemblées sur une lame de verre en utilisant le même protocole que celui utilisé pour les dispositifs (voir chapitre 2, paragraphe 4). Nous avons utilisé des substrats de verre afin de ne pas avoir d'artefact lié à la présence des substrats SOI et du couplage capacitif qu'il introduirait entre les différentes portions du microcanal caractérisé.

Pour chaque cellule fluidique, nous avons réalisé une mesure pour le microcanal de gauche et une mesure pour le microcanal de droite. Le montage utilisé est celui de la Figure 2. Une électrode a été insérée dans le réservoir se trouvant à chaque extrémité du microcanal. Nous avons ensuite appliqué entre les deux électrodes une différence de potentiel V variant de - 40 mV à + 40 mV avec une vitesse de balayage de 5 mV/s. Le courant circulant entre les deux électrodes a été mesuré toutes les 0,1 s. Lorsque les électrodes sont insérées dans les réservoirs et connectées à l'appareil de mesure, celui-ci applique automatiquement une certaine différence de potentiel entre les deux électrodes pour que le courant circulant entre elles soit nul. Cette différence de potentiel, que nous noterons V_{OC}, correspond à la tension de circuit ouvert entre les deux électrodes, d'une valeur typique de quelques millivolts, et qui présente des fluctuations que l'on ne discutera pas ici. V_{OC} n'étant pas significative pour la mesure

de la résistance des microcanaux, nous l'avons soustrait manuellement sur chaque courbe pour clarifier les résultats présentés ici.

La Figure 14 montre deux courbes typiques obtenues pour des microcanaux de hauteur nominale 200 µm et 50 µm. On constate que les courbes sont linéaires, ce qui montre le caractère ohmique de la portion de circuit caractérisée. La valeur de la résistance pour chaque microcanal a été extraite en réalisant une régression linéaire de la courbe avec le logiciel IgorPro. La précision de l'appareil est de ± 2 mV sur la valeur du potentiel appliqué. Les valeurs mesurées pour les deux canaux de chaque cellule fluidique sont regroupées dans le Tableau 9. Nous avons rappelé les valeurs calculées dans notre modèle théorique. Nous constatons que les valeurs expérimentales sont bien comprises dans la fourchette des valeurs théoriques.

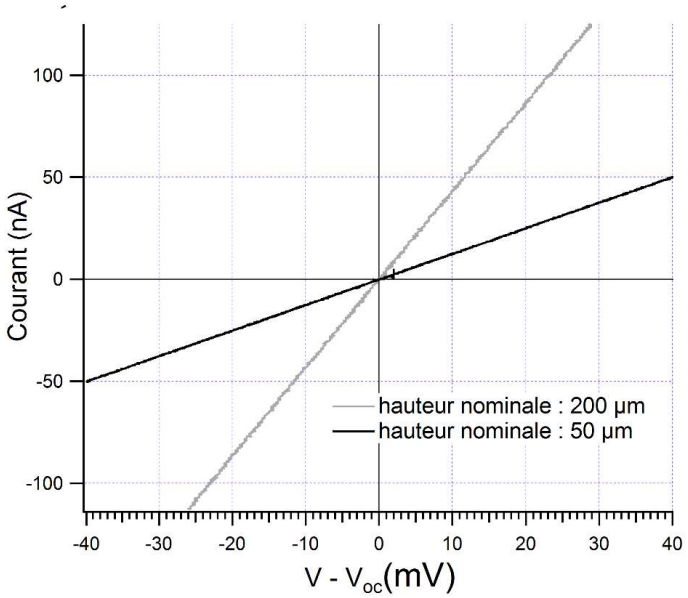


Figure 14 **: Courant circulant entre les deux électrodes en fonction de la différence de potentiel appliquée entre les deux électrodes, pour des canaux de hauteur nominale 50 µm et 200 µm remplis de PBS.**

Hauteur nominale	Dimensions L : longueur l : largeur, h : hauteur	Résistances théoriques	Résistances mesurées (± incertitude appareil)
50 µm	L = 3,9 ± 0,5 mm l = 61 ± 4 µm (canal 1) l = 54 ± 4 µm (canal 2) h = 54 ± 0,7 µm	740 ± 100 kΩ (canal 1) 830 ± 110 kΩ (canal 2)	800 ± 50 kΩ 810 ± 50 kΩ
200 µm	L = 3,9 ± 0,5 mm l = 61 ± 4 µm (canal 1) l = 57 ± 4 µm (canal 2) h = 205 ± 4 µm	190 ± 25 kΩ (canal 1) 210 ± 27 kΩ (canal 2)	220 ± 15 kΩ 230 ± 15 kΩ

Tableau 9 : comparaison des valeurs théoriques et expérimentales de la résistance des microcanaux pour les deux hauteurs nominales. Les résistances théoriques sont issues du Tableau 1, p. 119.

Lorsque nous mesurons plusieurs fois successivement la résistance d'un canal, nous constatons que la résistance mesurée diminue au cours du temps. Pour une cellule fluidique (canaux de hauteur nominale 50 µm), nous avons mesuré la résistance à plusieurs reprises, et avons tracé l'évolution de cette résistance en fonction du temps écoulé à partir de la première mesure. La courbe obtenue est représentée sur la Figure 15. Nous attribuons cet effet à l'évaporation ayant lieu au niveau de l'interface liquide/air des réservoirs, qui a pour effet d'augmenter la concentration en ions de la solution se trouvant dans les réservoirs et dans les microcanaux. L'ensemble des valeurs expérimentales a été approché par une fonction affine avec le logiciel IgorPro. La variation de résistance observée correspond à une variation de résistivité de $3{,}54.10^{-3}$ Ωm/min, ce qui correspond en ordre de grandeur à une augmentation de la concentration en chlorure de sodium d'environ 1 mM/min. Nous avons obtenu cet ordre de grandeur en ne considérant que le chlorure de sodium, qui est présent à une concentration de 137 mM, et est donc prépondérant devant le chlorure de potassium (concentration 2,7 mM), l'hydrogénophosphate de sodium (concentration 10 mM) et le phosphate de potassium monobasique (concentration 1,7 mM).

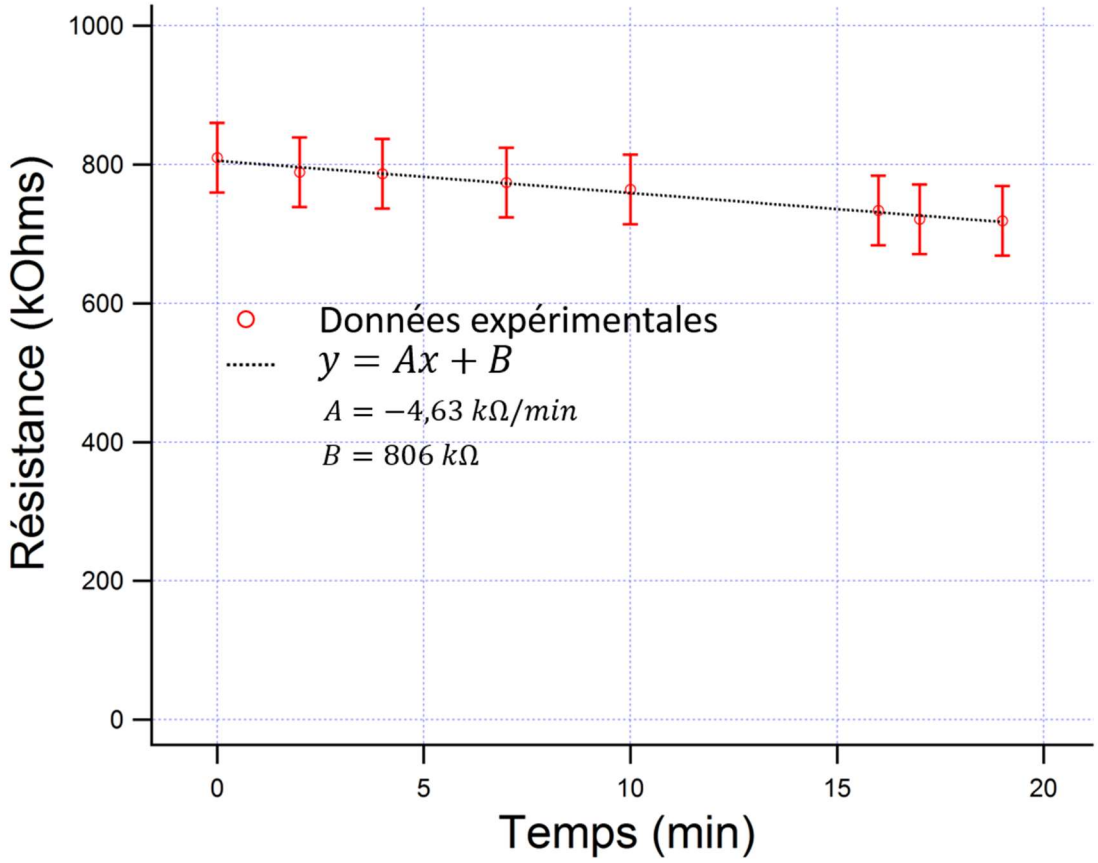


Figure 15 : variation de la résistance d'un microcanal de hauteur nominale 50 µm rempli de PBS en fonction du temps écoulé à partir de la première mesure. Les barres d'erreur correspondent à la précision de l'appareil de mesure utilisé.

En conclusion, nous avons caractérisé la résistance associée aux microcanaux remplis de PBS au moyen de courbes I(V). Pour des canaux de hauteur nominale 200 µm nous avons obtenu des valeurs de résistance de l'ordre de 810 kΩ, et pour des canaux de hauteur nominale 50 µm nous avons obtenu des valuers de résistance de l'ordre de 230 kΩ. Ces valeurs correspondent aux valeurs attendues en se basant sur la conductivité du PBS à température ambiante. L'évaporation de l'eau au cours des

mesures entraine une variation de résistance de 4,6 kΩ/min pour un canal de hauteur nominale 50µm, que l'on ramène à une variation de concentration en chlorure de sodium d'environ 1 mM/min. Cette donnée est importante car elle indique qu'en l'état actuel, le dispositif ne permet pas de contrôler la concentration sur une échelle de temps de quelques minutes. Une enceinte à humidité contrôlée, une utilisation de plus grands volumes de solution ou l'encapsulation des réservoirs par une lame de verre ou un morceau de PDMS permettrait de limiter cet effet.

2.3. Mesure du couplage capacitif entre les compartiments 1 et 2

Nous avons modélisé dans le paragraphe 1.2 le couplage capacitif entre les deux compartiments par un réseau de résistances et de capacités. Afin de quantifier simultanément ces différents éléments, nous avons utilisé pour la caractérisation la spectroscopie d'impédance, technique qui permet de déduire un circuit équivalent des spectres obtenus. Nous avons d'abord utilisé la configuration de la Figure 4 a) p. 121, dans laquelle une cellule de PDMS ne comprenant que deux réservoirs est scellée sur un substrat SOI oxydé. Nous avons réalisé cette première caractérisation afin de valider dans un premier temps notre modèle de Z_{12} dans le cas de cette géométrie relativement simple. Nous avons ensuite caractérisé des dispositifs complets.

2.3.1. Caractérisation de substrats SOI oxydés sans nanopores avec une cellule de PDMS à deux réservoirs et sans microcanaux

Nous avons commencé par mesurer le couplage capacitif entre les réservoirs, pour un échantillon, en utilisant le montage de la Figure 4 a) p. 121. La géométrie relativement simple de cette configuration nous permettra ainsi de valider notre modèle de Z_{12}. Une cellule de PDMS comprenant deux réservoirs (diamètre 2,8 ± 0,1 mm, distance entre les deux réservoirs $d_{réservoirs}$ = 1,0 ± 0,1) est scellée sur un substrat SOI oxydé (épaisseur d'oxyde de passivation 100 nm) en utilisant le même protocole d'assemblage que dans le cas de dispositifs réels. La tension alternative appliquée entre les deux électrodes est de 500 mV.

La Figure 16 a) montre le spectre d'impédance obtenu pour l'intervalle de fréquences (0,6 Hz – 100 kHz). Nous avons ajouté sur le graphe la courbe théorique obtenue avec le modèle présenté dans le paragraphe 1.2. La valeur exacte des éléments est indiquée sur le circuit représenté sur la Figure 16 b). Ces valeurs ont été obtenues grâce à la routine Zfit du logiciel Eclab, utilisé pour obtenir les spectres. NB : nous n'avons pas inclus la résistance R_a car nous avons vu qu'elle est négligeable (de l'ordre 1 kΩ) devant l'impédance totale du dispositif mesurée pour cet intervalle de fréquences. De même nous n'avons pas représenté $R_{substrat}$ (< 8 Ω) car elle est négligeable devant l'impédance associée à C_{BOX} (> 2,7 kΩ pour l'intervalle de fréquence considéré). Nous pouvons constater que les valeurs obtenues par l'ajustement correspondent aux valeurs que l'on a calculées pour le diamètre de chambre 2,8 mm, voir Tableau 2, p. 122, avec un écart relatif de l'ordre de 10 % pour la valeur des capacités. La résistance mesurée se trouve donc dans la fourchette que l'on avait calculée.

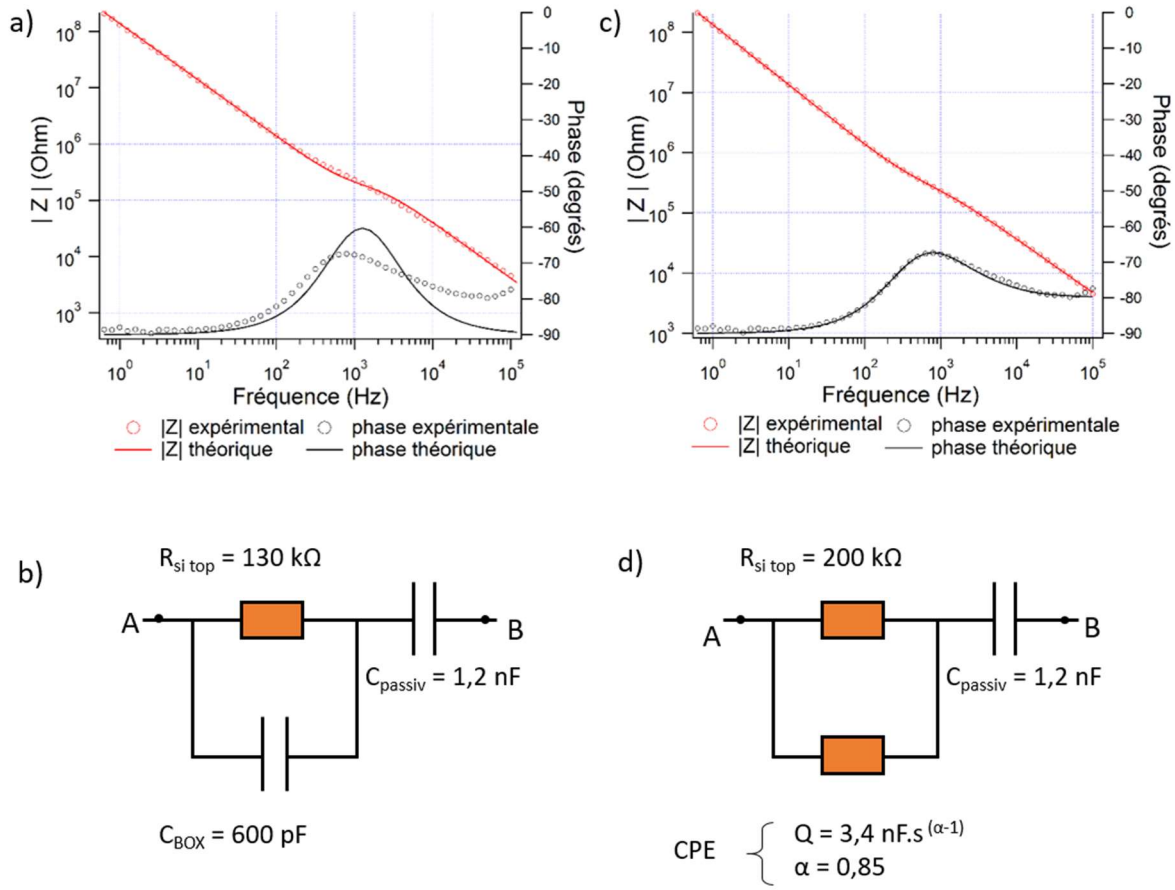


Figure 16 : a) spectre d'impédance obtenu pour un dispositif constitué d'une cellule de PDMS comprenant deux réservoirs de diamètre 2,8 mm et scellée sur un substrat SOI oxydé (épaisseur d'oxyde 100 nm). La courbe expérimentale est ajustée avec la courbe théorique correspondant au circuit représenté en b). c) même courbe expérimentale ajustée avec le circuit représenté en d).

Notons cependant que la phase à haute fréquence n'est pas exactement de - 90°, cas d'une capacité, mais d'environ – 80°. Nous avons ajusté la courbe (Figure 16 c) avec un deuxième modèle (Figure 16 d), où la capacité C_{BOX} est remplacée par un élément à phase constante (CPE, constant phase element), dont l'impédance est donnée par :

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j2\pi f)^{\alpha}}$$

Où j désigne le nombre complexe tel que $j^2 = -1$, α est un coefficient sans unité, Q est un coefficient donné en $F.s^{(\alpha-1)}$, et f est la fréquence en Hz. Nous pouvons constater que l'ajustement avec la routine Zfit entre les données expérimentales et le modèle résulte en une courbe théorique qui s'approche plus des données expérimentales que dans le cas où l'oxyde enfoui est représenté par C_{BOX}. Les valeurs obtenues par la routine Zfit sont indiquées sur la Figure 15 d). Nous constatons que la valeur de $R_{si\ top}$ représentant les données dans ce cas n'est plus de 130 kΩ mais de 200 kΩ.

Des mesures réalisées en utilisant un substrat de silicium oxydé thermiquement (épaisseur d'oxyde de 100 nm) à la place d'un substrat SOI révèlent aussi la présence de deux capacités (ou d'une capacité et d'un élément à phase constante) malgré le fait qu'il n'y a qu'une seule couche d'oxyde sur ces substrats. Ceci montre que l'interprétation que nous avons faite des deux capacités pour le cas des

substrats SOI est peut-être erronée. La présence des deux capacités pourrait être due à d'autres phénomènes, comme la présence de zones de charges d'espace dans le silicium, ou bien de double couche dans l'électrolyte au voisinage de la surface de SiO_2. Une étude plus approfondie en faisant varier l'épaisseur des couches d'oxyde, ou en réalisant un dépôt de deux disques métalliques de diamètre 2,8 mm espacés de 1 mm (i. e. même configuration géométrique que le cas caractérisé ici) pour obtenir deux capacités sans avoir les effets de double couche dans l'électrolyte, pourrait lever le doute sur la présence de ces deux capacités.

2.3.2. Caractérisation de dispositifs complets

Nous avons ensuite réalisé des mesures sur des dispositifs complets (schéma électrique de la Figure 1, p. 117. Nous avons utilisé des cellules fluidiques présentant des microcanaux de hauteur nominale 200 µm, et des puces de silicium comprenant des nanopores de pas 6 µm, et de diamètre nominal 18 nm, 36 nm, et 90 nm. Les cellules fluidiques ont été assemblées sur les puces de silicium, et les dispositifs remplis comme décrit dans le chapitre 2. Une tension alternative de 500 mV d'amplitude a été appliquée pour les mesures. La Figure 17 montre les courbes d'impédance obtenues pour l'intervalle de fréquences (0,4 Hz – 100 kHz).

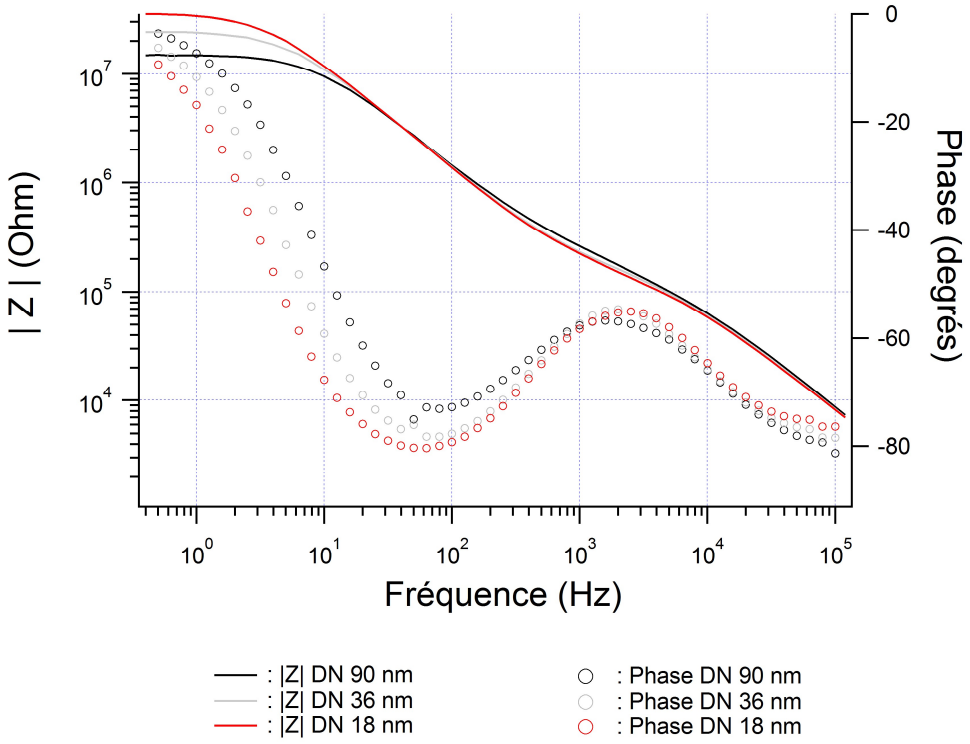


Figure 17 : spectres d'impédance de dispositifs complets, présentant des nanopores de diamètre nominal 90 nm, 36 nm, et 18 nm, de pas 6 µm, et scellés avec des cellules fluidiques dont les canaux sont de hauteur nominale 200 µm.

Nous pouvons constater que pour des fréquences supérieures à 40 Hz, l'allure des spectres est identique pour les trois diamètres nominaux de nanopores, et est comparable au spectre obtenu pour un substrat SOI oxydé sans nanopores (Figure 16 a). Ce domaine de la courbe est attribué à Z_{12} et Z_{34}, couplage capacitif qui « diminue » l'impédance totale du dispositif par rapport aux basses fréquences

(< 40 Hz). Pour les basses fréquences, nous constatons que le module de l'impédance augmente lorsque le diamètre nominal diminue. Ce domaine est attribué à la résistance $R_{réseau}$ en parallèle avec Z_{12} et Z_{34} : pour ces fréquences, l'impédance associée à Z_{12} et Z_{34} est plus grande que celle associée à $R_{réseau}$, de sorte que le courant passe majoritairement par $R_{réseau}$. Nous discuterons des valeurs de résistance $R_{réseau}$ obtenues dans le paragraphe 2.5, ou cette résistance sera mesurée par une mesure I(V).

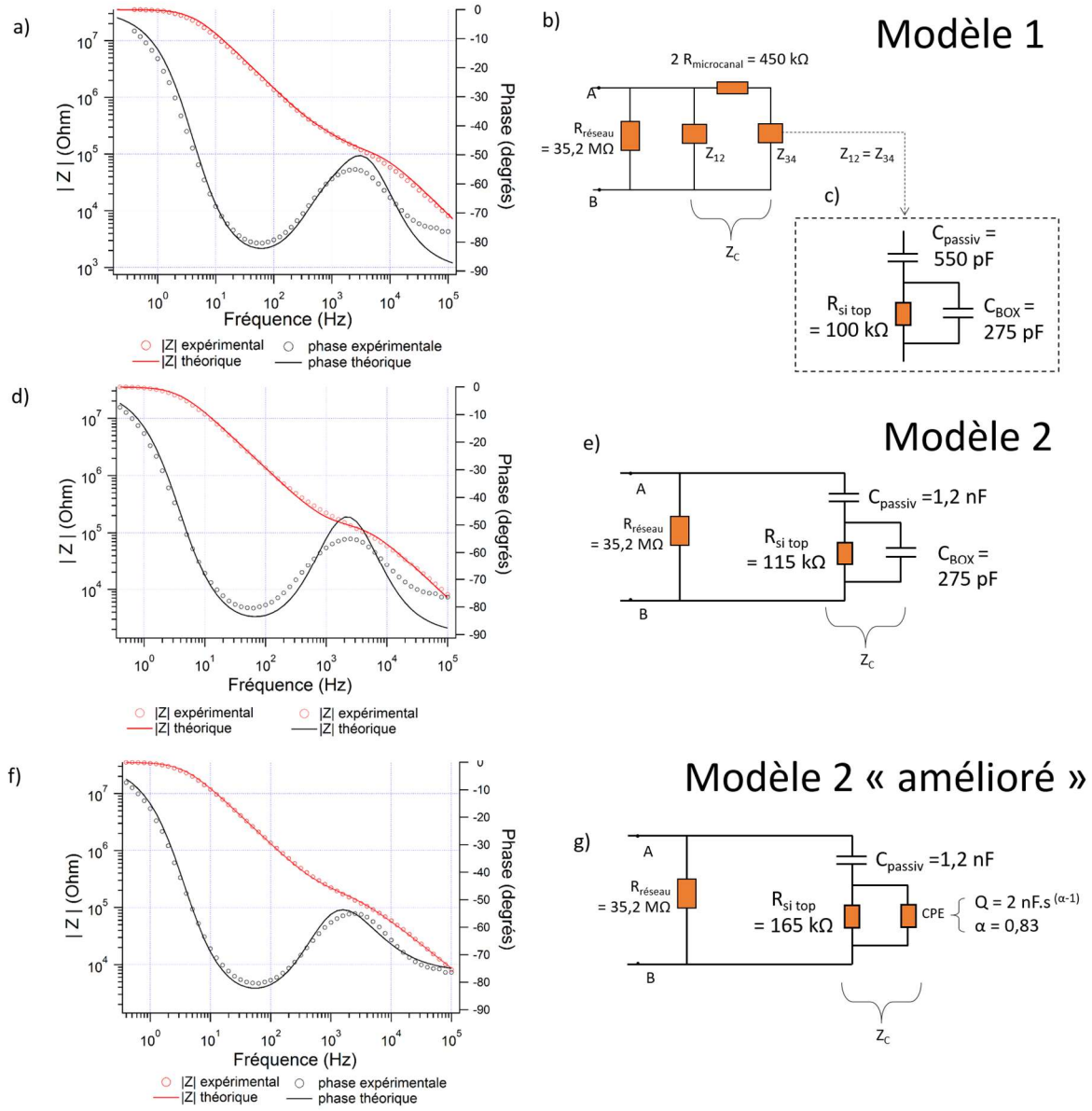


Figure 18 a) courbe d'impédance expérimentale de la Figure 17 (diamètre nominal 18 nm), superposé avec le modèle théorique représenté en b) et c). d) même courbe superposée avec le modèle représenté en e). f) même courbe superposée avec le modèle représenté en g).

La Figure 18 a) montre une superposition d'une courbe expérimentale (diamètre nominal 18 nm) avec le modèle théorique développé dans le paragraphe 1.2. Nous avons rappelé le circuit utilisé dans la Figure 18 b et c). Nous n'avons pas inclus la résistance R_a, dont l'impédance (de l'ordre de 1 kΩ) est négligeable devant l'impédance totale mesurée pour l'intervalle de fréquences considéré. Et Nous avons considéré que $R_{réseau}$ est en parallèle avec l'impédance de couplage Z_C. Nous avons fixé les valeurs de C_{passiv} et C_{BOX} aux valeurs calculées dans le paragraphe 1.2 pour les réservoirs de diamètre 2 mm

(Tableau 2, p. 122). $R_{réseau}$ a été fixée à la valeur de 35,2 MΩ lue sur la courbe expérimentale à basse fréquence. Enfin, $R_{si\ top}$ a été ajusté avec la routine Zfit du logiciel Eclab pour que la courbe théorique approche le mieux la courbe expérimentale, les autres paramètres étant fixés. La valeur obtenue de $R_{si\ top}$ correspond à la fourchette inférieure que l'on avait calculée (voir Tableau 2, p. 122), et la valeur de $R_{réseau}$ correspond à la valeur calculée (Tableau 6, p. 131).

Notons cependant que la courbe expérimentale peut aussi être approchée par un circuit plus simple où Z_C est réduit au seul élément Z_{12} (Figure 18 d, e). La valeur de tous les éléments, indiquée sur la Figure 18 e), a été obtenue par la routine Zfit du logiciel Eclab. La capacité C_{passiv} obtenue est égale à la somme des capacités C_{passiv} obtenues pour le schéma c). Cependant, la capacité C_{BOX} est identique. La valeur de $R_{si\ top}$ est légèrement supérieure à la valeur obtenue pour le circuit c). Cette approche constitue une simplification de notre modèle physique, dans la mesure où le nombre d'éléments à considérer est plus restreint. Ceci facilite l'ajustement entre le modèle théorique et expérimental : en effet, dans modèle b) et c), le grand nombre d'éléments permet d'ajuster la courbe avec différent jeux de valeurs de chaque élément. L'inconvénient cependant de cette approche est qu'elle est empirique : C_{BOX} ne correspond plus à la valeur calculée selon une modélisation physique du système, mais correspond à une valeur effective empirique.

Nous avons aussi ajusté la courbe expérimentale avec un circuit où la capacité C_{BOX} est remplacée par un élément à phase constante (Figure 18 f et g). La valeur de tous les éléments, indiquée sur la Figure 18 g), a été obtenue par la routine Zfit du logiciel Eclab. Ceci permet de mieux approcher la courbe expérimentale à haute fréquence. Notons que la résistance $R_{si\ top}$ obtenue dans ce cas est supérieure au cas du circuit e).

En conclusion, nous avons pu mesurer par spectroscopie d'impédance le couplage capacitif entre les deux compartiments de mesure, pour le cas d'une configuration géométrique simple où la cellule de PDMS ne contient que deux réservoirs, et pour le cas de dispositifs réels. Les courbes d'impédances obtenues correspondent bien au modèle théorique que nous avons développé plus haut. Cependant, des mesures réalisées pour des substrats de silicium oxydé, sans oxyde enfoui, révèlent aussi la présence de deux capacités mesurables. Ceci montre que le domaine de la courbe attribué à C_{BOX} pourrait être dû à un autre phénomène. La capacité C_{BOX} est par ailleurs mieux approchée par un élément à phase constante égale à – 80°. Enfin, pour les dispositifs complets, nous avons pu simplifier le modèle théorique en utilisant un modèle semi-empirique où le nombre d'éléments est réduit, et où leur valeur est une valeur effective lue sur le spectre d'impédance, mais qui ne peut pas être prédite théoriquement.

2.4. Mesure de la résistance de fuite entre les compartiments 1 et 2

Nous avons caractérisé la résistance de fuite entre les compartiments 1 et 2 en utilisant des substrats SOI ne présentant pas de nanopores ni de nanocanal enfoui, mais oxydés en utilisant le même procédé d'oxydation que nos dispositifs. Nous avons caractérisé deux échantillons de cette manière. Une cellule fluidique (canaux de hauteur nominale 200 µm) a été scellée sur chaque substrat en utilisant le même protocole d'assemblage que celui décrit dans le chapitre 2. Les microcanaux des cellules fluidiques ont

ensuite été remplis de PBS, et les électrodes insérées dans les réservoirs 1 et 2 (même montage que la Figure 5 c, p. 123).

Nous n'avons pas pu caractériser la résistance de fuite au moyen de courbes I(V) comme pour la mesure de la résistance des microcanaux dans le paragraphe précédent. En effet nous avons constaté que de telles courbes sont ici non linéaires car elles présentent une hystérésis importante. Nous attribuons cette hystérésis à un phénomène transitoire lié au couplage capacitif Z_c entre les deux compartiments. Nous avons donc réalisé des courbes I(t) en appliquant pour $t > t_0$ une différence de potentiel constante entre les deux électrodes. Ces courbes présentent en effet l'avantage de mettre en évidence le régime transitoire. On peut donc savoir lorsque celui-ci est terminé et mesurer la valeur « limite » de courant correspondante I_{lim}. Nous avons représenté sur la Figure 19 a) et b) le schéma électrique équivalent en utilisant le modèle simplifié déduit des courbes d'impédance (Figure 18 e). I représente le courant circulant dans la branche A-B, et I_1 le courant circulant dans l'impédance Z_C.

Lorsque nous appliquons V_0 entre les deux électrodes à t = 0, nous nous attendons à ce que la courbe I(t) ait une allure telle que celle représentée sur la Figure 19 c) : à $t = 0^+$, les capacités C_{passiv} et C_{BOX} ont une impédance nulle (comportement à haute fréquence), elles sont équivalentes à un court-circuit, si bien que le courant I_1 est égal à $\frac{V_0}{R_a}$, et $I = \frac{V_0}{R_a} + \frac{V_0}{R_{fuite}}$. Lorsque $t \to \infty$, les capacités sont équivalentes à des résistances infinies, et le courant I_{lim} est égal à $\frac{V_0}{R_a + R_{fuite}}$. Comme nous allons le voir, R_{fuite} est de l'ordre de 10 GΩ, ce qui est très grand devant R_a, qui est de l'ordre de 1 kΩ comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1. On peut donc négliger R_a, de sorte que l'on a $I_{lim} = \frac{V_0}{R_{fuite}}$. NB : nous avons représenté sur la courbe une décroissance exponentielle, c'est-à-dire pour le cas où Z_C est une capacité. En réalité, la présence de deux capacités dans Z_C devrait entraîner une allure plus complexe du régime transitoire.

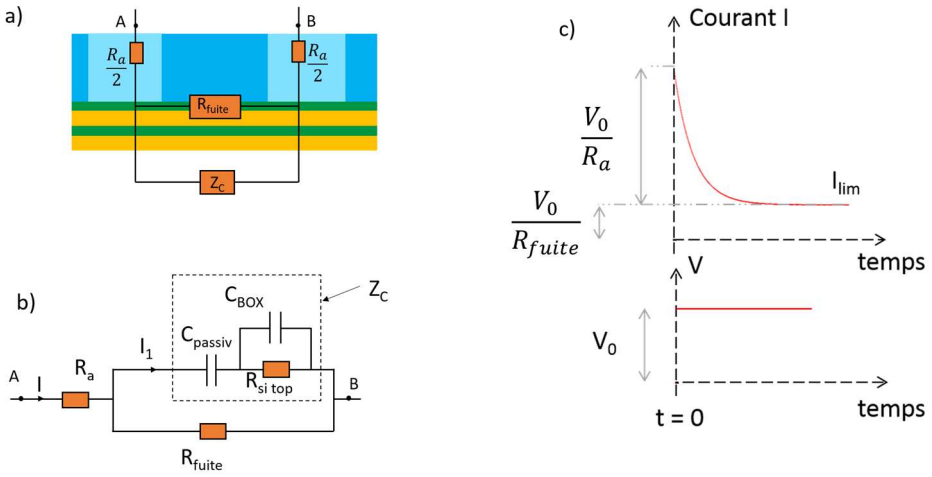


Figure 19 : a) schéma en coupe montrant les différents éléments à considérer dans cette section. b) schéma électrique équivalent. c) allure d'une courbe i(t) attendue dans le cas où Z_c est égale à une capacité pure.

La Figure 20 montre la courbe obtenue pour un échantillon. A t = 0 s, nous avons appliqué une différence de potentiel de 100 mV entre les deux électrodes, jusqu'à t = 5 s. Le temps par point est de 50 µs. La première partie de la courbe, jusqu'à t = 130 ms, est constante à cause de la saturation de

l'appareil qui est réglé sur un calibre de mesure de courant permettant de mesurer au maximum 200 pA. L'utilisation de ce calibre est nécessaire pour faire une mesure de I_{lim} avec précision : un bruit crête-à-crête de l'ordre de 60 pA est en effet obtenu pour le calibre supérieur, permettant de mesurer un courant jusqu'à 2 nA. Nous avons obtenu des valeurs de résistance de fuite de 13 ± 1 GΩ (1er échantillon) et de 12 ± 1 GΩ (deuxième échantillon). Ces valeurs sont acceptables pour l'application du dispositif : elles sont au-dessus de la limite de 1 GΩ nécessaire pour que le niveau de bruit soit suffisamment bas pour mener des enregistrements à l'échelle du canal unique. Cependant, elles impliquent que même si une résistance de scellement R_b des nanopores supérieure est obtenue, le niveau de bruit thermique sera fixé par cette résistance de fuite R_{fuite} entre les deux compartiments. Il serait donc préférable de l'augmenter. Nous avons vu dans la modélisation théorique du paragraphe 1.3 que R_{PDMS} est a priori de l'ordre de 50 GΩ, et R_{ox} de l'ordre de 320 GΩ. Nous pensons donc que la résistance de fuite plus faible obtenue provient du scellement non optimisé entre la cellule fluidique et la puce de silicium. Le protocole d'assemblage pourrait éventuellement être amélioré de manière à augmenter cette résistance de scellement.

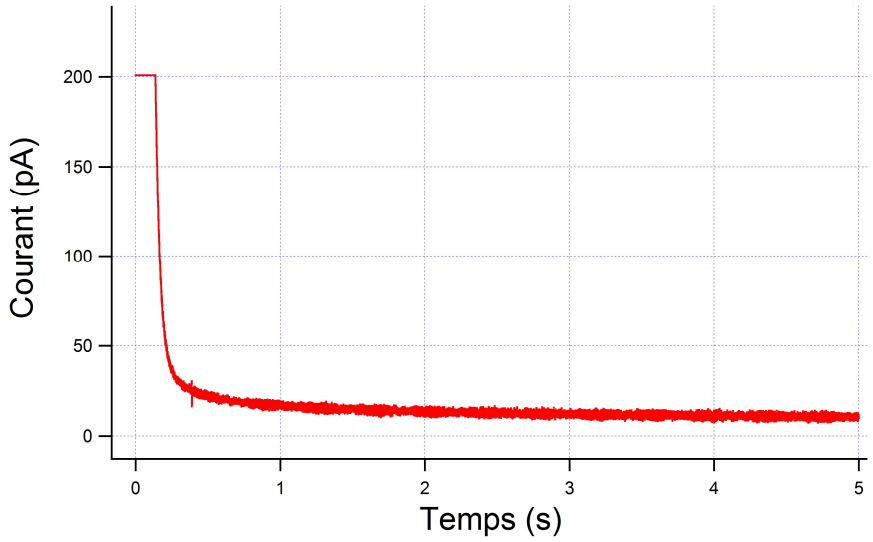


Figure 20 : mesure I(t) du courant de fuite entre les deux microcanaux d'une cellule fluidique assemblée sur un substrat SOI oxydé thermiquement et ne présentant pas de nanopores. Le potentiel appliqué entre les deux électrodes est de 100 mV à partir de t = 0 s jusqu'à t = 5 s.

NB : le nombre d'échantillons caractérisés dans ces conditions est trop faible pour pouvoir conclure sur la reproductibilité de la valeur de R_{fuite}. Cependant, nous avons pu caractériser quatre dispositifs qui présentaient cette fois des nanopores et le nanocanal enfoui, de la manière suivante : dans les cas où le nanocanal n'était pas rempli à l'issue du remplissage des microcanaux, nous avons mesuré la résistance de fuite entre les deux compartiments d'une manière similaire, avant de remplir le triangle d'alimentation aboutissant au remplissage du nanocanal enfoui. Nous avons obtenu de manière générale des valeurs comprises entre 1,5 GΩ et 25 GΩ (mesure sur 4 échantillons, diamètre nominal 18 nm, 36 nm, et 90 nm, pas 6 µm). Cette caractérisation montre qu'une résistance de fuite supérieure à environ 1 GΩ peut être obtenue de manière reproductible.

Nous allons maintenant discuter du régime transitoire observé sur la courbe de la Figure 20. Nous avons réitéré la mesure pour le même échantillon en utilisant un calibre permettant de mesurer un courant de 20 nA (que l'on appelle calibre « 20 nA »). Nous n'avons pas obtenu de saturation dans ces

conditions. La Figure **21** montre la courbe obtenue. Nous pouvons tout d'abord constater que le régime transitoire, qui s'étalait sur environ 1 seconde lorsque le calibre de mesure « 200 pA » était utilisé, est maintenant d'une durée inférieure à 20 ms.

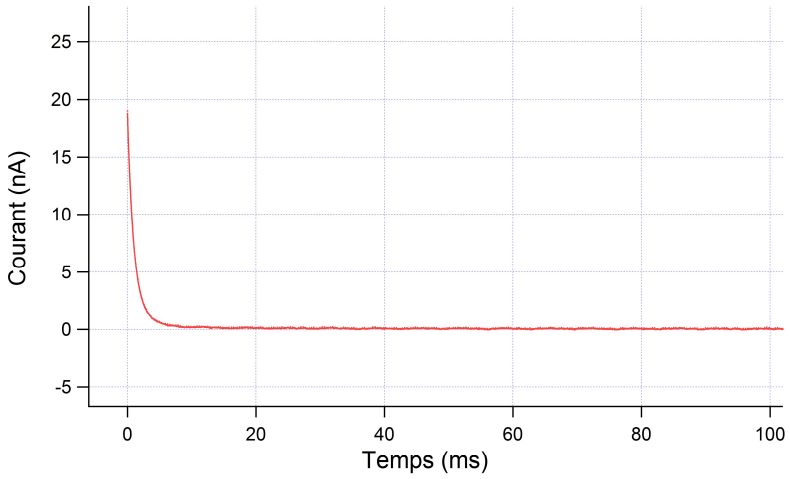


Figure 21 **: courant en fonction du temps pour une différence de potentiel V_0 de 100 mV appliquée aux bornes d'un dispositif constitué d'une cellule fluidique (hauteur nominal des microcanaux 200 µm) scellée sur un substrat SOI oxydé (épaisseur d'oxyde 100 nm) sans nanopores.**

La Figure 22 montre un agrandissement du début de la courbe, correspondant au régime transitoire, tracée en échelle semi-logarithmique. Nous pouvons constater que le début de la courbe est linéaire dans cette échelle. Nous l'avons ajusté avec le logiciel Igor Pro avec un modèle du type :

$$y = y_0 + Ae^{-\frac{t}{\tau}}$$

L'ajustement est superposé sur la courbe (trait noir). Nous avons ainsi obtenu une constante de temps τ de 1,0 ms. Nous avons réalisé une simulation du transitoire associé à l'établissement de V_0 aux bornes du dispositif avec le simulateur en ligne Partsim (voir informations complémentaires dans l'annexe 1, paragraphe 7). Nous avons pour cela utilisé le circuit de la Figure 19 b), avec R_a = 1 kΩ, $R_{si\ top}$ = 115 kΩ, C_{BOX} = 275 pF, C_{passiv} = 1,2 nF (valeurs issue de la caractérisation par spectroscopie d'impédance, voir Figure 18 e) et en considérant R_{fuite} infini. Le résultat de cette simulation est montré sur la Figure 23. La courbe obtenue est approchée par deux courbes exponentielles, avec une constante de temps de τ_0 de 2,4 µs et τ_1 de 180 µs. Il y a donc un écart important entre le comportement que l'on attend et le comportement observé. Par ailleurs, la valeur initiale du courant sur la Figure **21** est de 19,0 nA. Ceci correspond, sachant que la tension appliquée est de 100 mV, à une valeur de résistance R_a de 5,3 MΩ. Or, l'impédance d'entrée de l'appareil est sensée être de l'ordre de quelques ohms. Nous pensons que ces résultats sont un artefact de mesure dus à un temps de montée de l'appareil anormalement long. Il faudrait refaire les mesures sur un autre appareil pour lever le doute.

En conclusion, nous avons mesuré la résistance de fuite entre le compartiment 1 et le compartiment 2 pour deux cellules de PDMS assemblées sur des substrats SOI oxydés mais ne présentant pas de nanopores. Nous avons réalisé ces mesures au moyen de courbes I(t), afin de mesurer la valeur de courant limite lorsque le transitoire lié à la capacité du substrat est fini. Nous avons obtenu des valeurs de l'ordre de 12 GΩ. Des dispositifs complets, mais dont les nanocanaux enfouis n'étaient pas remplis

à l'issue du remplissage des microcanaux ont aussi été caractérisés, les résistances de fuites mesurées étant alors comprises entre 1,5 GΩ et 25 GΩ. Ces valeurs de résistance de fuite sont suffisamment élevées pour pouvoir envisager la caractérisation de l'activité de canaux ioniques à l'échelle du canal unique, dans le cas où la résistance de scellement des pores par la bicouche R_b serait elle aussi supérieure à 1 GΩ. Cependant, nous pensons que la valeur de R_{fuite} pourrait être augmentée en améliorant la qualité du scellement entre la cellule fluidique et la puce de silicium.

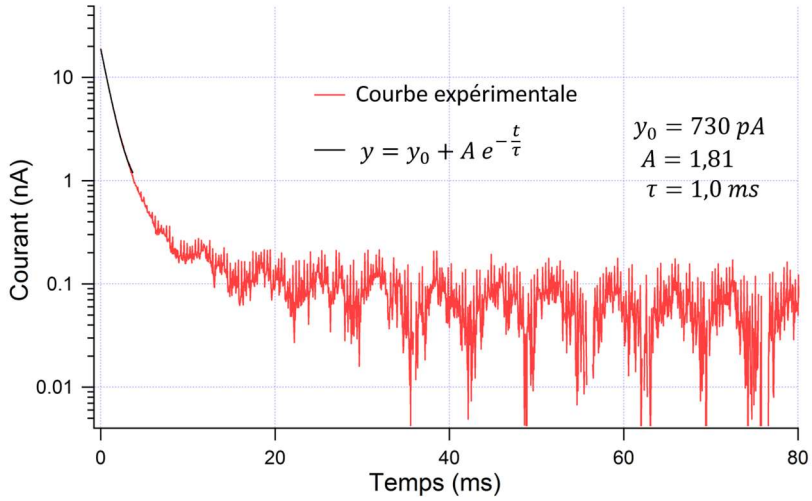


Figure 22 : courbe de la Figure 21, agrandie et en échelle semi-logarithmique. Le trait noir correspond à l'ajustement avec une courbe exponentielle.

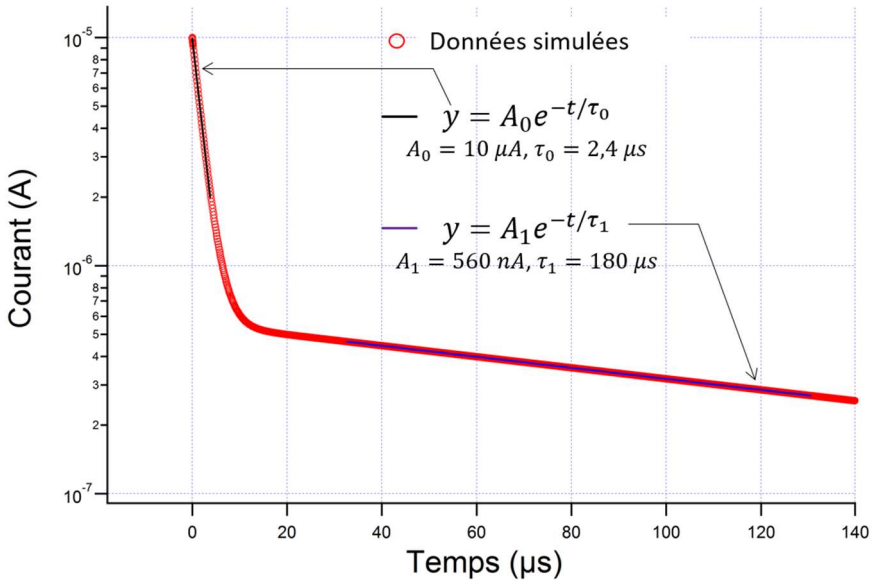


Figure 23 : Courant simulé en fonction du temps lorsqu'à t = 0, une tension V_0 = 100 mV est appliqué aux bornes du circuit de la Figure 19 b), avec $R_{si\ top}$ = 115 kΩ, C_{BOX} = 275 pF, C_{passiv} = 1,2 nF, R_a = 1 kΩ, et R_{fuite} considéré comme infinie. La simulation a été réalisée avec le simulateur en ligne Partsim. Des informations supplémentaires sont données dans l'annexe 1, paragraphe 7.

2.5. Mesure de la résistance $R_{réseau}$ des nanopores et du nanocanal enfoui via une caractérisation I(V)

Nous avons caractérisé la résistance $R_{réseau}$ en utilisant le montage expérimental de la Figure 7, p. 126. Le pas entre les nanopores des dispositifs utilisés est de 6 µm. Le nombre de nanopores en parallèle se trouvant entre un microcanal et le nanocanal enfoui est donc $n_0 = 9$. Les cellules fluidiques (hauteur nominale des microcanaux 200 µm) ont été assemblées sur les différents substrats et remplis de PBS comme mentionné dans le chapitre 2. Une différence de potentiel de - 100 mV à + 100 mV (aller-retour) par rapport à la tension de circuit ouvert (voir paragraphe 2.2 a ensuite été appliquée entre les deux électrodes avec une vitesse de balayage de 5 $mV.s^{-1}$. Le courant a été enregistré toutes les 40 ms. Les mesures ont été réalisées rapidement après remplissage des dispositifs afin que l'évaporation ne modifie pas la concentration du PBS de manière significative (voir paragraphe 2.2).

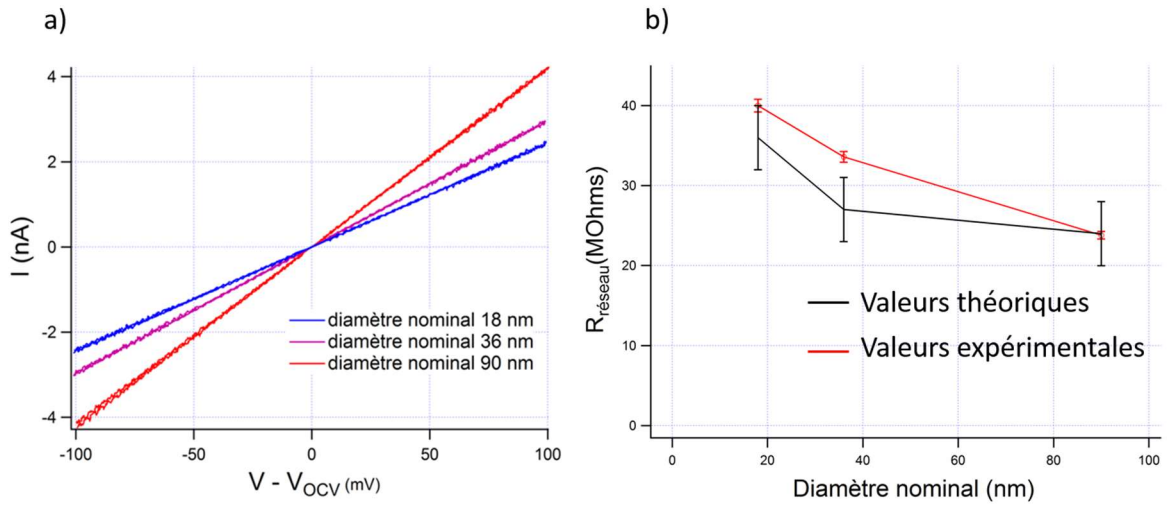


Figure 24 : a) courbes I(V) pour des dispositifs complets présentant des nanopores de diamètre nominal 18, 36, et 90 nm. Les cellules fluidiques présentent des microcanaux de hauteur nominale 200 µm. b) résistance mesurée en fonction du diamètre nominal des nanopores des dispositifs, et comparaison avec le modèle théorique du paragraphe 1.4.3.

La Figure 24 a) montre les courbes obtenues pour trois différents dispositifs présentant des nanopores de différents diamètres nominaux. De même que dans le paragraphe 2.2, la tension de circuit ouvert entre les deux électrodes V_{OC} a été soustraite sur chaque courbe. Nous constatons que les courbes sont bien linéaires, avec une résistance augmentant lorsque le diamètre nominal des nanopores diminue, ce qui est cohérent et indique que les nanopores contribuent à la résistance totale de l'ensemble nanopore – nanocanal enfoui de manière significative. NB : La capacité du substrat n'a pas posé de problème sur ces mesures, contrairement au cas des mesures de la résistance de fuite entre les deux compartiments (voir paragraphe 2.4). En effet, les courants mesurés ici sont beaucoup plus importants que les courants mesurés dans le cas de la résistance de fuite. Ils sont donc maintenant dominants devant le courant de charge de la capacité du substrat SOI.

La Figure 24 b) montre la valeur de la résistance en fonction du diamètre nominal des nanopores. Nous avons utilisé les courbes I(V) pour obtenir la valeur de la résistance. Les barres d'erreur sur la courbe expérimentale correspondent à l'incertitude de ± 2 mV sur la différence de potentiel appliquée. Nous

avons superposé aux résultats expérimentaux la courbe théorique de $R_{réseau}$ en fonction du diamètre nominal, calculée dans le paragraphe 1.4.3. Nous rappelons que les barres d'erreurs matérialisent l'incertitude sur le diamètre mesuré des nanopores, et sur la longueur du microcanal, qui est due à l'incertitude sur la distance mesurée entre les deux microcanaux $d_{intercanal}$. L'accord entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques est relativement bon.

En conclusion, nous avons caractérisé la résistance de dispositifs présentant des nanopores de diamètre nominaux 18 nm, 36 nm et 90 nm et de pas 6 µm, au moyen de courbes I(V). Les courbes obtenues sont bien linéaires, ce qui permet d'extraire la valeur de la résistance $R_{réseau}$. Nous avons par ailleurs caractérisé un échantillon présentant des nanopores de diamètre nominal 10 nm par une courbe I(t). Les valeurs de résistance obtenues sont en accord avec les valeurs théoriques calculées dans le paragraphe 1.4.3 exceptées pour les nanopores de diamètre nominal 10 nm où la résistance mesurée est plus petite que la résistance théorique. Nous attribuons cet effet à une augmentation de la conductivité du nanopore à cause de l'influence des charges de surface se trouvant sur les parois du nanopore.

3. Conclusion

Pour conclure sur ce chapitre, nous avons caractérisé électriquement les différentes parties des dispositifs développés pendant cette thèse. Nous avons pu vérifier le caractère ohmique des microcanaux fluidiques, des nanopores et du nanocanal enfoui. La résistance mesurée de ces différents éléments correspond à la résistance théorique basée sur la caractérisation morphologique des microcanaux, des nanocanaux, et des nanopores. Nous avons une résistance de fuite entre les compartiments 1 et 2 de l'ordre de 10 GΩ. Le couplage capacitif entre les deux compartiments a été mesuré par spectroscopie d'impédance. Celui-ci comprend une capacité C_{passiv} de 1,2 nF et une capacité C_{BOX} de 275 pF. Ces capacités pourraient être réduites à une capacité unique C_{BOX} de 18 pF en utilisant un oxyde enfoui de 6 µm d'épaisseur, et en oxydant totalement la couche de silicium supérieure. Enfin, en se basant sur la caractérisation de la résistance des nanopores et du nanocanal enfoui, nous avons pu prédire un ordre de grandeur des sauts de courants qui devraient être mesurés lors du scellement des nanopores par des nanoparticules ou par une bicouche suspendue. Nous avons pu montrer que la sensibilité des dispositifs vis-à-vis des évènements de scellement est augmentée lorsque le nombre de nanopores n_0 est diminué, et lorsque la longueur du nanocanal enfoui est la plus petite possible. De ce point de vue, les dispositifs présentant un pas de 6 µm sont optimisés dans la mesure où notre procédé de fabrication ne permet pas un pas plus important, qui permettrait de diminuer encore n_0. Nous ne pouvons pas non plus diminuer encore la longueur du nanocanal enfoui car la résistance de fuite entre les deux compartiments serait *a priori* plus faible.

4. Références

1 Song, Y.-A. *et al.* (2013) Microfabricated nerve–electrode interfaces in neural prosthetics and neural engineering. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 29, 113–134

2 Lee, D.W. *et al.* (2006) Particle concentration sensor using control volume between double electrical sensing zones. *Curr. Appl. Phys.* 6, Supplement 1, e232–e236

Chapitre 4 : Etude du scellement des nanopores par des nanoparticules ou par une bicouche suspendue

1. Introduction

Nous allons maintenant nous intéresser à la possibilité de former une bicouche suspendue scellant les nanopores, grâce au mécanisme de fusion et de rupture de SUV ou de LUV décrit dans le chapitre 1. Pour cela, une fois le dispositif rempli de tampon phosphate salin, une suspension de SUV ou de LUV sera incubée pendant une certaine durée dans l'un des compartiments. L'occurrence ou non du scellement des nanopores sera caractérisé par une mesure de la résistance totale $R_{réseau}$ du dispositif, soit avant et après incubation, soit, en fonction du temps, pendant l'incubation. La mesure de la résistance se fera via une mesure I(t) : une différence de potentiel constante V_0 sera appliquée, et le courant I mesuré en fonction du temps. Lorsque la caractérisation est menée avant et après incubation de la suspension de SUV/LUV, le courant mesuré après incubation devrait être plus petit que le courant mesuré avant incubation. Lorsque la caractérisation est menée pendant l'incubation, nous devrions mesurer des sauts de courant associé au scellement séquentiel ou simultané des nanopores par la bicouche suspendue.

Avant de réaliser ces expériences, nous avons voulu vérifier que le dispositif et l'appareillage utilisé permettent bien de détecter de tels sauts. Pour cela, nous avons utilisé des nanoparticules de latex chargées négativement et fluorescentes. La charge négative portée par les particules permet d'entraîner celles-ci vers les nanopores en appliquant un champ électrique. Nous avons choisi un diamètre de particules de 500 nm. Ce diamètre, supérieur à celui des nanopores, a été choisi pour que la particule soit bloquée par le nanopore et en occulte l'entrée, augmentant la résistance de ce nanopore. Ainsi, en mesurant le courant en fonction du temps, nous devrions donc détecter des sauts lorsque les nanopores sont obstrués par les nanoparticules. La fluorescence de la particule permet par ailleurs de mener une caractérisation supplémentaire en microscopie par fluorescence, afin d'observer les particules placées sur les nanopores.

2. Expériences de scellement des nanopores par des nanoparticules

2.1. Description de l'expérience

La Figure 1 montre le principe de l'expérience de scellement des nanopores avec des nanoparticules. Une fois le dispositif assemblé et rempli de PBS, le réservoir 4 est vidé (Figure 1 a), puis rempli avec une suspension de nanoparticules fluorescentes. Le niveau des réservoirs 2 et 4 est ajusté pour qu'un flux se mette en place, entraînant les nanoparticules dans le microcanal 2 vers le réservoir 2. Des électrodes sont introduites dans les réservoirs 1 et 2, et une différence de potentiel V_0 de 4V est appliquée. Cette différence de potentiel se répartit dans le réseau que constitue les nanopores et le nanocanal enfoui (flèches noires sur la Figure 1 b), de sorte qu'une différence de potentiel existe aux bornes des nanopores se trouvant dans le microcanal où sont introduites les particules. Ainsi, lorsqu'une particule passe à proximité d'un nanopore, (Figure 1 b et c) elle peut être capturée si le champ électrique est localement suffisant pour l'attirer vers le nanopore le plus proche. Notons que le flux imposé dans le microcanal 2 permet une arrivée constante de nanoparticules au niveau des nanopores. Deux types de caractérisation seront réalisées : une caractérisation par microscopie de fluorescence des particules scellant les nanopores, et une caractérisation électrique en mesurant le courant I circulant dans les électrodes en fonction du temps.

Ces expériences ont été rapportées dans un article publié au cours de cette thèse [1]. L'article rédigé en langue anglaise est inséré dans les pages qui suivent. L' «histoire » racontée dans cet article s'écarte un peu du contexte général de cette thèse. Nous discutons en effet de la possibilité de réduire le diamètre de nanopores nanofabriqués en les scellant imparfaitement par des nanoparticules, ce qui fait apparaître des interstices très petits en périphérie de la nanoparticule, pouvant jouer le rôle de nanopores solides nanométriques pour d'autres types d'applications. Le lecteur de cette thèse devra donc se concentrer attentivement sur les mesures électriques rapportées dans cet article plus que sur la problématique qui y est décrite. Nous discuterons ensuite des résultats obtenus dans l'article, à la lumière de ce qui a été mentionné dans le chapitre 3, en particulier nous discuterons de la valeur des sauts de courant obtenus. Les vidéos correspondant à ces expériences sont accessibles sur le site suivant : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167931715001458).

NB : dans l'article, le numéro des microcanaux est inversé par rapport à la numérotation que nous avons utilisée dans cette thèse.

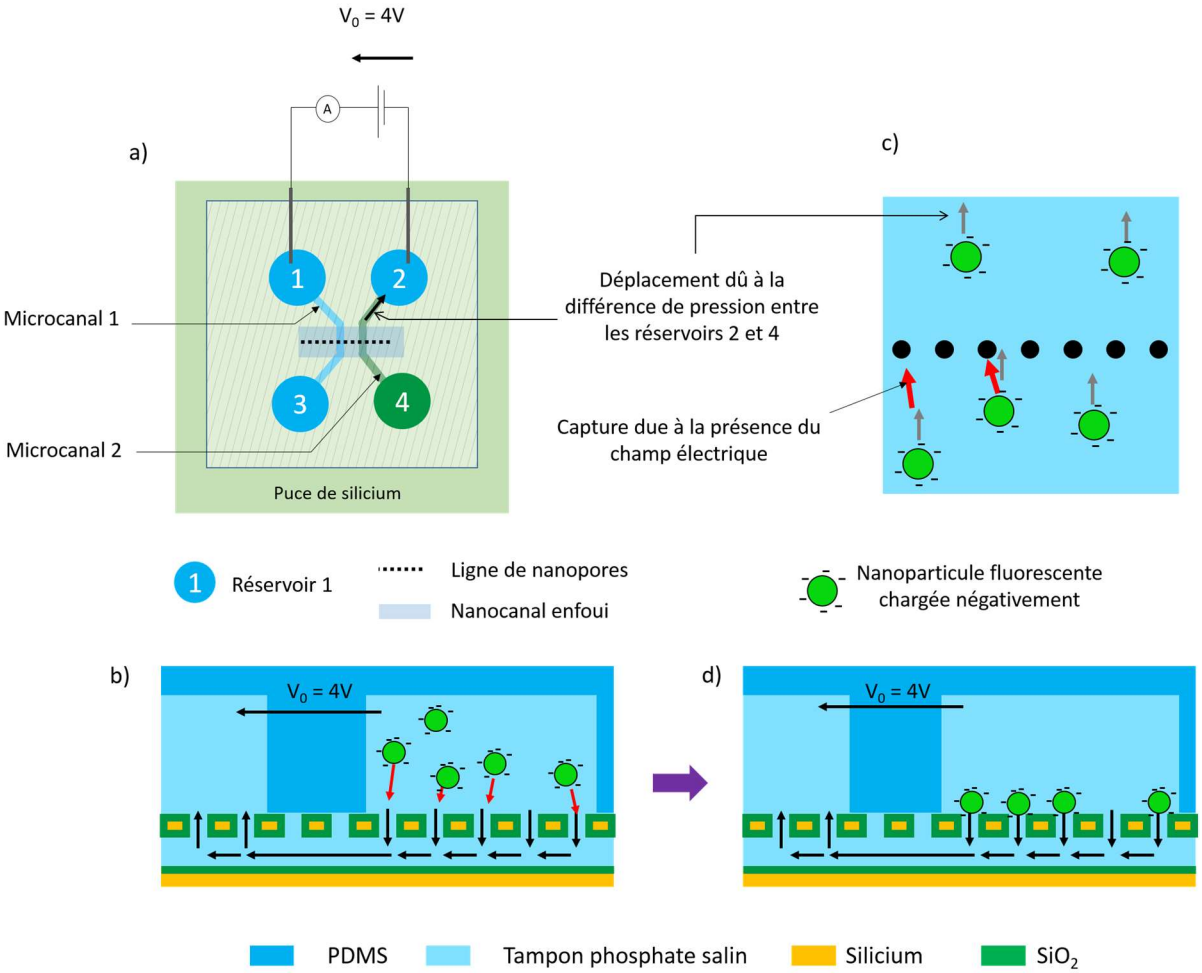


Figure 1 : a) schéma en vue de dessus montrant comment les particules sont introduites au-dessus des nanopores. b) schéma en vue de dessus correspondant à un agrandissement de la zone où se trouvent les nanopores. c) schéma en coupe montrant l'attraction des particules par le champ électrique. d) schéma en coupe montrant des particules capturées par les nanopores.

2.1. Présentation des travaux

Microelectronic Engineering 144 (2015) 57–60

Contents lists available at ScienceDirect

Microelectronic Engineering

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

Controlled sealing of nanopores using an easily fabricated silicon platform combining *in situ* optical and electrical monitoring

Raphaël Marchand [a,b,*], Franck Carcenac [b], Laurent Malaquin [d], Emmanuelle Trévisiol [b], Christophe Vieu [b,c], Christophe Thibault [b,c]

[a] Univ de Toulouse, LAAS, F-31400 Toulouse, France
[b] LAAS-CNRS, F-31400 Toulouse, France
[c] Univ de Toulouse, INSA, LAAS, F-31400 Toulouse, France
[d] Institut Curie, 75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 November 2014
Received in revised form 17 March 2015
Accepted 18 March 2015
Available online 2 April 2015

Keywords:
Nanopores
Biosensors
e-beam lithography
Microfluidics integration
SOI
Particles trapping

ABSTRACT

Nanopores are of great interest for biosensing applications. However, using such sensing platforms requires long and costly fabrication processes and the implementation of simultaneous electrical recording and optical imaging is not straightforward. Here, we present a new approach for silicon nanopore fabrication and integration avoiding backside etching of the substrate and allowing direct microfluidics integration for electrical recording and optical imaging. We demonstrate an electrical and optical live *in situ* detection of the electrophoretic trapping of polystyrene microspheres on silicon nanopores. This trapping procedure could also be used to partially close already made nanopores, in order to increase their sensitivity to small analytes.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Solid-state nanopores are promising tools for molecular biosensing. Recent advances in nanoprocessing enabled the fabrication of nanopores with diameters of a few nanometers, which are comparable in size to biological macromolecules and allow direct detection by measuring the variation of an applied ionic current through the pore [1–4]. Indeed, when filled with an aqueous electrolyte, nanopores behave as a variable resistance that increases when a macromolecule comes in the vicinity or inside the pore. In the literature, many studies have been dedicated to DNA sequencing and single molecule detection, with devices made of two electrolyte-filled chambers separated by a membrane in which one or several nanopores have been fabricated [3].

In order to discriminate different DNA nucleic acid molecules or to achieve a high sensitivity in the detection of macromolecules, it is necessary to control and generally reduce the dimensions of the pore down to few nanometers and very promising solutions have been developed in the last few years [5,6]. However, to date most of these methods are not integrated and directly upscalable.

Among the different accessible technologies to produce nanopores, silicon based platforms have three main advantages: the maturity of silicon industry for upscaling, the ability to precisely control nanopore's shape and position with silicon nanopatterning technologies and finally the wide variety of available silicon oxide chemical functionalizations. However, today's silicon nanopore sensing platforms lack simplicity in their fabrication and implementation. First, nanopores with diameters of less than 10 nm involve critical fabrication step as, for example, focused ion beam. Moreover, a backside etching of the wafer is usually performed, with a necessary alignment of the back and front sides patterns.

Then, since nanopores are fabricated across the substrate, performing simultaneous electrical and optical monitoring requires the development of an appropriate setup. Integration of this setup with polydimethylsiloxane (PDMS) has previously been described for thin polymer nanopore membranes [7,8], but these methods are not relevant to thick substrates such as silicon. In another study, simultaneous electrical and optical recordings have been performed on silicon platform using a mechanically engineered cell made of chlorotrifluoroethylene (CTFE) [9] but, to our knowledge, there is no straightforward integrated system allowing simultaneous optical and electrical monitoring with minimum handling for the user.

* Corresponding author at: LAAS-CNRS, 7 avenue du Colonel Roche, BP 54200, 31031 Toulouse cedex 4, France.
E-mail address: rmarchan@laas.fr (R. Marchand).

http://dx.doi.org/10.1016/j.mee.2015.03.032
0167-9317/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Here, we describe a new approach in silicon nanopore technology, which consists of a line of nanopores positioned above a buried channel and that is easier to implement. The fabrication of the nanoholed substrate does not require a backside etching, advantageously limiting the process fabrication to four steps. The front side of the silicon substrate using an integrated PDMS microfluidic chip enables electrical, chemical and optical access to both sides of the pores. This system (Fig. 1) will allow easy handling of the silicon nanopore platform for biomedical applications requiring simultaneous optical and electrical characterization.

To demonstrate ability to perform electrical recording as well as optical imaging, we used our platform to trap 500 nm carboxylate-modified polystyrene fluorescent microparticles on the nanopore line by applying an electrical field through the pores. The trapping was electrically and optically monitored. This trapping could also be used as a method to reduce the diameter of already made nanopores, in order to increase the detection sensitivity without using critical nanopatterning process such as focused ion beam.

2. Material and methods

2.1. Sample fabrication

The silicon chips were fabricated using a method derived from previous works [10,11]: a line of circular nanopores (200 nm diameter, 1 μm pitch, 8 mm length) was patterned on the top silicon layer of an SOI substrate (Si: 205 nm, SiO_2: 200 nm, Si: 650 μm) (Soitec, France) by electrical lithography (Raith 150, Germany) using conventional ebeam lithography and reactive ion etching. The buried oxide (BOX) below the nanopore line was then etched through the nanopores by a 50% vol/vol hydrofluoric acid solution during 1 min and 30 s. Consequently, a buried channel, linking all the nanopores together under the top silicon membrane was created. In order to make an insulating substrate, an 80 nm thermal oxide was then thermally grown to prevent any leakage current (we measured a leakage current of less than 1 nA) through the silicon membrane. The size of the pores was reduced to 130 nm by the oxidation process and the 200 nm-high buried channel was also reduced to 100 nm (see Supplementary data).

2.2. Microfluidic chip preparation

The molds for polydimethylsiloxane (PDMS) reticulation were fabricated using conventional SU-8 resist on silicon process. The thickness of the SU-8 coating was 50 μm. An anti-adhesive monolayer of perfluorodecyltrichlorosilane (FDTS) was then deposited by plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD) to allow the demolding of PDMS.

PDMS solution (Sylgard 184, Dow Corning), which is a mixture of PDMS oligomers and curing agent (10:1 mass ratio), was degased under vacuum during 30 min, poured on the SU-8 master and finally cured at 100 °C for 1 h. Reticulated microfluidic chip was then removed from the master and through-holes chambers were created at the end of each microchannel with a punch. Finally PDMS microfluidic chip was activated (2 min, 60 W O_2 plasma) and bond to previously activated SOI chips (5 min, 400 W O_2 plasma). The bonding was reinforced by heating the chips at 120 °C for 1 h (Fig. 1).

2.3. Electrodes, electrolyte and particles

Phosphate buffered saline (PBS, 1×, 10 mM Na_2HPO_4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4) was filtered through a 0.2 μm filter. Silver/silver chloride (Ag/AgCl) electrodes (0.8 mm diameter, Phymep, France) were used. Polystyrene yellow-green fluorescent FluoSpheres® beads (500 nm, carboxylate-modified, Molecular Probes, life technologies) were suspended at a concentration of 3. 10^9 beads/mL in PBS 1×.

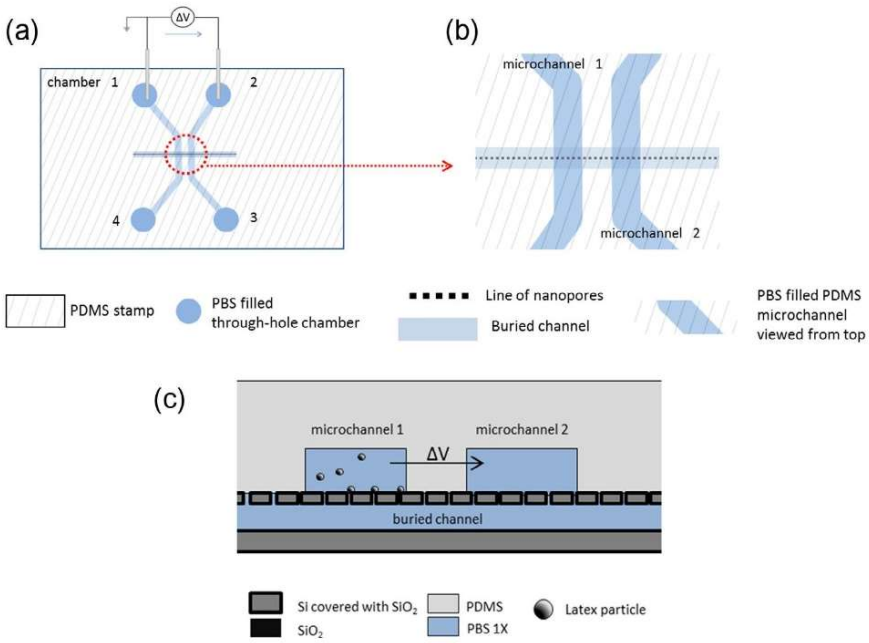


Fig. 1. Schematic illustrations of the platform for simultaneous optical and electrical monitoring of trapping of microparticles. (a) Schematic view of the resulting structure after microfluidic chip PDMS bonding on the SOI chip. (b) Zoom on the schematic view. (c) Schematic cross-section of the device showing the two PDMS microchannels, the line of nanopores and the buried channel.

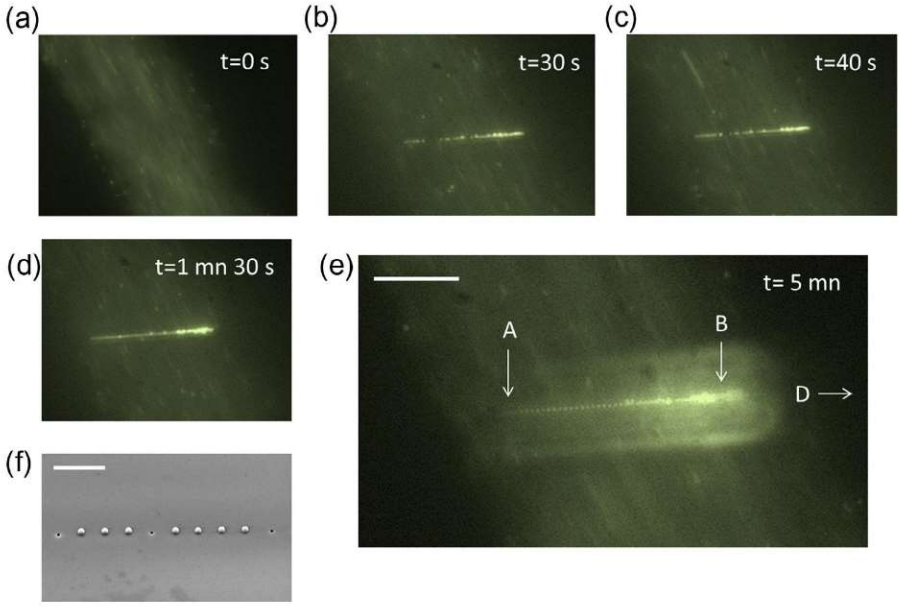


Fig. 2. (a–d) Sequences of fluorescence images (60 × 45 μm) showing the trapping dynamics. The time origin is taken when the 4 V voltage was applied. (e) Fluorescence image after 5 min, scale bar 15 μm, A and B represent the extremity of the nanopore line, D represents the direction of the positive electrode. (f) SEM image of particles on the line of nanopores. Scale bar 2 μm.

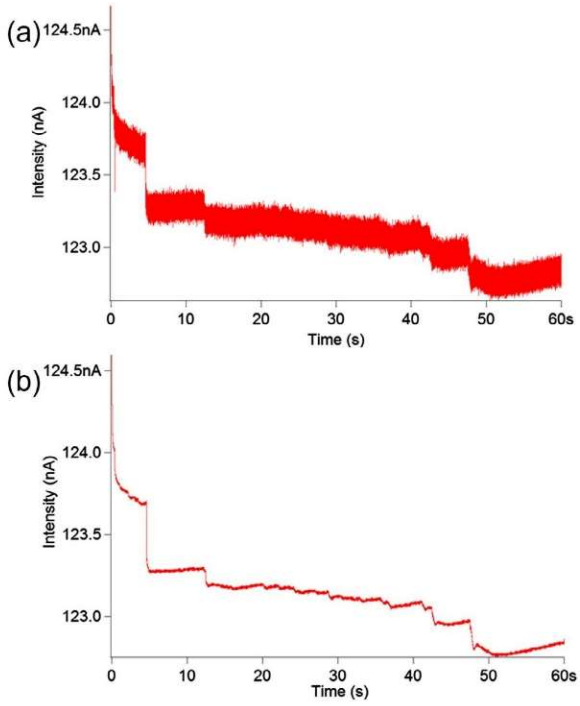


Fig. 3. Electrical recording of trapping events. (a) Electrical recording of the current for a 4 V applied voltage. (b) Same recording after signal processing by IgorPro software.

2.4. Filling the chip with PBS and particle suspension

After bonding, an air plasma treatment (15 min, 35 W) was done on the chip, allowing the two microchannels and the buried channel to be filled by PBS 1×. The buffer was then removed from chamber 4 (Fig. 1a) and replaced by a suspension of particles. Two Ag/AgCl electrodes were then introduced in chamber 1 and 2 (Fig. 1a). The liquid levels were adjusted in such a way that a continuous flow from chambers 4 to 1 drove particles above the nanopore line. Chambers 3 and 4 were filled every 30 min to set off evaporation.

2.5. Electrical recording and optical monitoring

Electrical recording were done in a Farady cage using a potentiostat Ametek Parstat MC with the low current option. Data were acquired at a frequence of 10 kHz and processed by the IgorPro software Signal processing was performed using the smooth function of IgorPro Software with the binomial algorithm. Optical recording was performed using an Olympus 50× long distance objective, an Andor Ixon camera and using Andor Solis software. Images were recorded at a speed of 3 frames per second.

3. Results and discussion

The PDMS microfluidic chip is connected in such a way that the line of nanoholes above the buried channel of the SOI substrate crosses the two PDMS channels perpendicularly with a non-assisted manual alignment (Fig. 1a and b). Since the PDMS channels are 50 μm wide and the line of nanopores has a 1 μm pitch, each of the two intersections defines a 50 μm wide area containing around 50 nanopores. The portion of buried channel between the two PDMS channels was 9 μm wide, 100 nm high, and 50 μm long depending on the alignment of the PDMS chip with respect to the SOI substrate.

Once the two PDMS channels were filled with PBS buffer, a part of buried channel (including the two intersections with the PDMS channels) turned from red to white under an optical microscope, indicating PBS filling. Polystyrene yellow-green fluorescent 500 nm FluoSpheres® beads were then added and electrophoretic trapping was performed. As explained in the material and methods

section, the levels of the chambers were adjusted to obtain a continuous flow from the chamber with particles to the chamber with the electrode. This precaution allowed a constant arrival of particles above the nanopore line.

By applying a DC 4 V voltage at $t = 0$ s (Fig. 2a, negative electrode in the channel with particles), some particles, which were moving slowly close to the SiO_2 surface, were attracted and immobilized on the line of nanopores, on a vacant place (Fig. 2b–e, movie-1-on, Supplementary data). The majority of the nanopore sites were already occupied after 30 s (Fig. 2b). After 5 min, a regular luminous line is observed suggesting that there was a particle trapped on every pore (Fig. 3e). Indeed, negatively charged particles were attracted by the positive electrode.

When the voltage was switched off, most of the particles immediately followed the flow of liquid and left the nanopore line (movie2-off, Supplementary data). Some particles remained on their trapping site, even by applying a negative voltage of 4 V. The asymmetry of the final agglomeration pattern (Fig. 2e) could be attributed to an asymmetry of the electrical field value all along the nanopore line. Ionic current circulating in a pore far away from the electrode in chamber 2 (arrow A on Fig. 2e) has to cross a longer segment of buried channel than in the one positioned closer to the electrode in chamber 2 (arrow B in Fig. 3e). Therefore, since the buried channel is highly resistant compared to the PDMS microchannels, there is a gradient of potential from the pore A to the pore B, with a higher electrical field across pore B.

When the particles were trapped, they did not undergo Brownian motion anymore, suggesting that the particle were captured close to the surface [12]. However, particles gather even at places already occupied by other particles (Fig. 3b–e). At the end of the experiment, a current is still recorded. This suggests that the particles have not totally occulted the pore, or are blocked at a non-zero distance from the nanopore, as reported previously [7,13].

The trapping events could also be recorded electrically as shown in Fig. 3. At $t = 0$ s, a DC 4 V voltage was applied. The curve (Fig. 3a) shows a rapid decrease of the current during the first 5 s then several sharp steps until the end of the recording. These last ones are even more evident after a standard signal processing using the smooth function of IgorPro Software with binomal algorithm (Fig. 3b).

The first rapid decrease of the current is correlated to a capacitive effect and to the first trapping of particles on nanopores as it was observed by fluorescence microscopy (Fig. 2a and b). After 30 s of trapping, most of the nanopores are already occupied by particles. The difference between the values of the sharp steps could be due to different trapping position on the nanopore line or to different ways particles occult the pores: totally or partially, depending on the distance between the particle and the pore.

4. Conclusion

We report a new approach for silicon nanopore fabrication, avoiding the backside etching and allowing simple integration with microfluidics for simultaneous optical and electrical monitoring. We also demonstrate the success of electrical and optical monitoring by trapping nanoparticles on a line of nanopores. This trapping procedure could be useful in molecular biosensing to reduce the effective diameter of nanopores to increase the sensitivity.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.mee.2015.03.032.

References

[1] C. Dekker, Nat. Nanotechnol. 2 (2007) 209–215.
[2] M. Wanunu, Phys. Life Rev. 9 (2012) 125–158.
[3] J.E. Reiner, A. Balijepalli, J.W. Robertson, J. Campbell, J. Suehle, J.J. Kasianowicz, Chem. Rev. 112 (2012) 6431–6451.
[4] X. Hou, W. Guo, L. Jiang, Chem. Soc. Rev. 40 (2011) 2385–2401.
[5] K. Venta, G. Shemer, M. Puster, J.A. Rodriguez-Manzo, A. Balan, J.K. Rosenstein, K. Shepard, M. Drndic, ACS Nano 7 (2013) 4629–4636.
[6] J. Lee, Z. Yang, W. Zhou, S.J. Pennycook, S.T. Pantelides, M.F. Chisholm, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111 (2014) 7522–7526.
[7] M.L. Kovarik, S.C. Jacobson, Anal. Chem. 80 (2008) 657–664.
[8] K. Zhou, M.L. Kovarik, S.C. Jacobson, J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 8614–8616.
[9] G.V. Soni, A. Singer, Z. Yu, Y. Sun, B. McNally, A. Meller, Rev. Sci. Instrum. 81 (2010) 014301.
[10] K. Buchholz, A. Tinazli, A. Kleefen, D. Dorfner, D. Pedone, U. Rant, R. Tampé, G. Abstreiter, M. Tornow, Nanotechnology 19 (2008) 445305.
[11] C. Thibault, F. Carcenac, E. Dague, J. Chalmeau, C. Vieu, Microelectron. Eng. 86 (2009) 1393–1395.
[12] M. Krishnan, N. Mojarad, P. Kukura, V. Sandoghdar, Nature 467 (2010) 692–695.
[13] M. Tsutsui, Y. Maeda, Y.H. He, S. Hongo, S. Ryuzaki, S. Kawano, T. Kawai, M. Taniguchi, Appl. Phys. Lett. 103 (2013) 013108.

2.2. Discussion

Nous allons maintenant mener une discussion sur les résultats de l'article, en prenant en compte les éléments présentés dans le chapitre 3. La discussion portera sur la valeur des sauts de courant, sur la valeur du courant mesurée, ainsi que sur la durée des régimes transitoires observés.

Nous pouvons tout d'abord mentionner que les expériences décrites dans l'article ont pu être réalisées sur 3 échantillons différents, et que la capture des particules a été observée dans chaque cas. Pour chaque échantillon, les particules sont capturées dès qu'une différence de potentiel supérieure à 1 V est appliquée (voir la première vidéo de l'article) et sont immédiatement emportées par le flux imposé dans le microcanal 2 dès que la différence de potentiel est annulée (voir la deuxième vidéo de l'article). Cette expérience a pu être reproduite pour chaque échantillon autant de fois que nous avons appliqué une différence de potentiel, soit une vingtaine de fois en tout.

Nous avons aussi constaté que certaines particules se déplaçaient relativement lentement dans le flux, et qu'elles avaient une probabilité plus grande d'être capturées que celles qui se déplacent rapidement. Nous supposons que ces particules se trouvent relativement proches de la surface de SiO_2 (la vitesse du flux étant plus lente à proximité de la surface à cause des forces de frottement) et qu'elles subissent donc une interaction électrostatique plus importantes en passant au-dessus des nanopores, par rapport aux particules qui se trouve haut dans le microcanal.

Nous allons maintenant discuter de la valeur mesurée du courant et des sauts de courant. La Figure 2 montre les premières secondes de l'enregistrement électrique présenté dans l'article (figure 3 de l'article). Nous avons modifié l'échelle de temps afin de pouvoir identifier les premiers sauts de courant. La courbe rouge représente les données brutes, échantillonnées avec une fréquence de 10 kHz, et la courbe noire représente les données lissées avec l'algorithme du logiciel Igor Pro mentionné dans l'article (lissage binomial sur 1 000 points, voir annexe 1, paragraphe 8). Nous avons décalé la courbe noire de 500 pA vers le haut afin de faciliter la lecture.

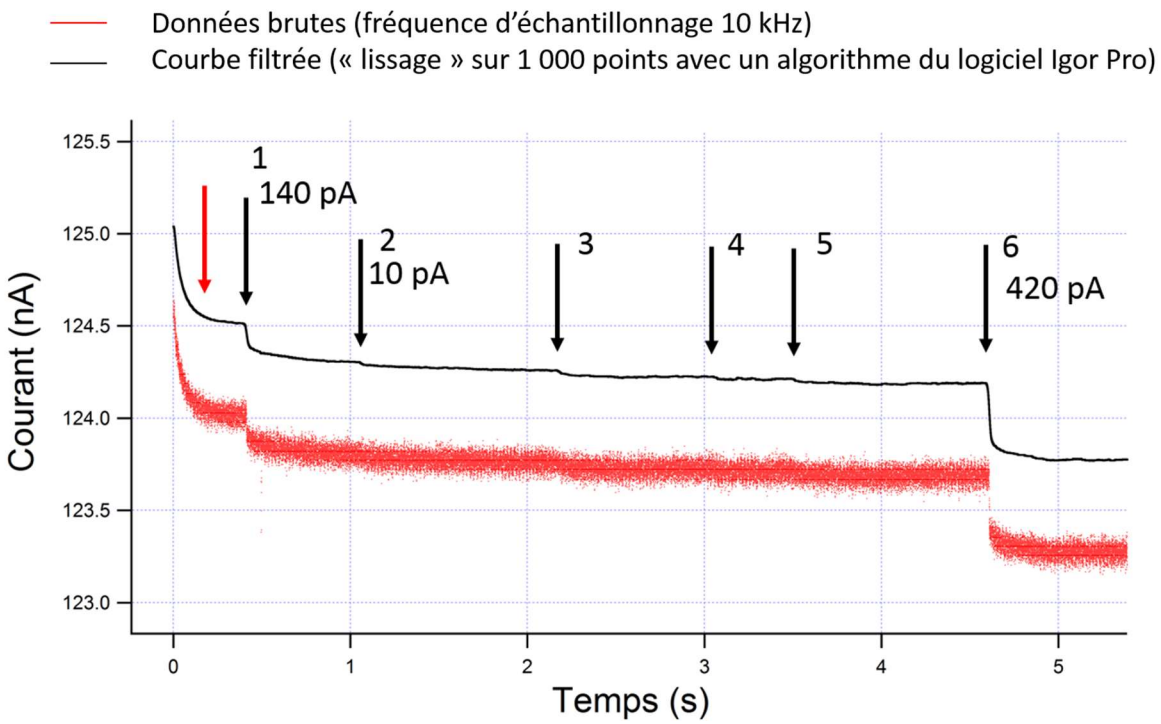


Figure 2 : Courant mesuré en fonction du temps pour une différence de potentiel appliquée de 4V aux bornes d'un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 107 nm, avec un nombre de nanopores n_0 de 58, au sein duquel une suspension de nanoparticules fluorescentes de latex de 500 nm de diamètre a été insérée dans l'un des microcanaux. Pour le filtrage, les paramètres utilisés sont indiqués dans l'annexe 1, paragraphe 8.

Nous pouvons constater que la courbe commence par une décroissance du courant correspondant à un régime transitoire (flèche rouge). La valeur du courant à l'issue du transitoire est de I_0 = 124 nA. Puis nous pouvons observer une succession de sauts d'amplitude comprise entre 10 pA et 420 pA, qui présentent aussi un régime transitoire. La courbe noire filtrée met en évidence ces différents sauts, car le seuil de détection est plus petit ($5\sigma \approx 5\ pA$) que pour la courbe rouge correspondant aux données brutes ($5\sigma \approx 200\ pA$). La différence de potentiel appliquée étant de 4,0 V, la valeur I_0 du courant correspond à une résistance de 32 MΩ. Or, le dispositif utilisé pour réaliser cette courbe est dans la configuration du cas n°2 dans le chapitre 3 : l'écart entre les nanopores est de 1 µm, de sorte

que n_0 = 58 (la largeur des microcanaux étant de 58 µm au niveau de la zone où ils sont parallèles, voir chapitre 3, paragraphe 1.4.3). Dans ces conditions, comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, nous nous attendons à une résistance totale $R_{réseau}$ de 17 ± 4 MΩ, et donc à une valeur de courant de 235 nA. Un tel écart a été observé systématiquement lorsque la différence de potentiel appliquée est supérieure ou égale à quelques volts. Zhou et al. [2] ont déjà observé un tel phénomène lors de la mesure de la résistance d'un nanopore, et l'attribue à un effet de déplétion des ions à proximité du nanopore à cause du champ électrique appliqué. Un tel effet pourrait aussi expliquer ce résultat dans notre cas.

La Figure 3 montre une image tirée d'une des vidéos de l'article. Cette image a été faite 29 secondes après l'application de la différence de potentiel de 4V aux bornes du dispositif, avec le même échantillon que la courbe I(t) de la Figure 2. NB : l'image et la courbe I(t) ne correspondent pas à une caractérisation simultanée : nous avons réalisé la caractérisation optique dans un premier temps, puis l'expérience a été reproduite pour le même échantillon avec une caractérisation électrique. Nous avons indiqué la position des microcanaux 1 et 2 pour illustrer la discussion.

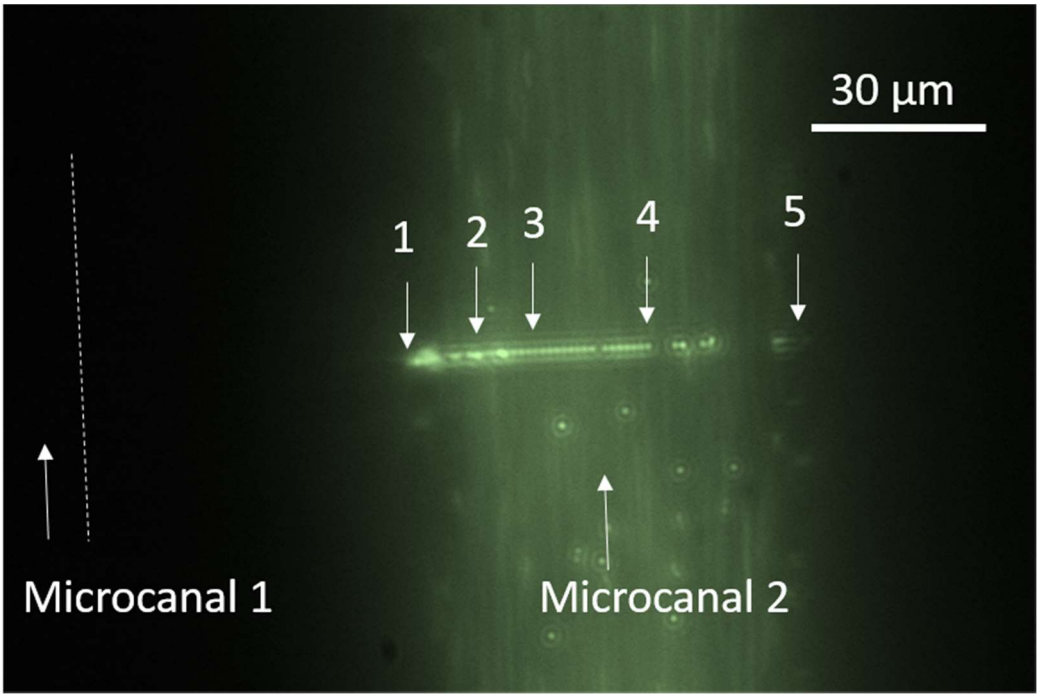


Figure 3 : image en microscopie de fluorescence obtenue 3 min après avoir appliqué une différence de potentiel de 4 V aux bornes d'un dispositif (diamètre nominal des nanopores 107 nm, pas 1 µm) comprenant des nanoparticules fluorescentes de 500 nm de diamètre. L'échantillon utilisé est le même que l'échantillon sur lequel la courbe I(t) et les vidéos de l'article ont été réalisée.

Nous avons calculé dans le chapitre 3 les valeurs théoriques du premier saut de courant ΔI_1, associé au scellement d'un premier nanopore. Nous avons vu qu'à cause de la résitance $R_{interpore}$ de la portion de nanocanal enfoui se trouvant entre deux nanopores, ce premier saut pouvait prendre une valeur maximale ΔI_{1ma} si le premier nanopore scellé se trouve à l'extrémité la plus proche du microcanal 1 (flèche 1 sur la Figure 3), et une valeur minimale ΔI_{1min} si le nanopore scellé est celui qui se trouve à l'autre extrémité (flèche 5 sur la Figure 3). En prenant la valeur de courant initiale I_0 de 124 nA mesurée sur la Figure 2, et en utilisant les valeurs relatives $\Delta I_{1max}/I_0$ et $\Delta I_{1min}/I_0$ calculées dans le chapitre 3 (voir tableau 8, paragraphe 1.5, chapitre 3) la valeur du premier saut de courant devrait ainsi être

comprise entre 2,2 nA et 10^{-4} pA, cette dernière valeur étant largement au-dessous du seuil de détection. La courbe de la Figure 2 correspond au début de l'expérience de scellement, nous pouvons donc supposer qu'à ce stade le nombre de nanopores scellés est relativement faible devant le nombre total de nanopores (n_0 = 58). En supposant que les valeurs extrêmes calculées pour le premier saut ΔI_1 sont encore valables lorsque le nombre de nanopores scellés reste négligeable devant n_0, nous déduisons que la valeur des 6 sauts mis en évidence sur la courbe I(t) sont bien comprises dans la fourchette des valeurs théoriques. Ainsi, le saut d'amplitude 420 pA pourrait correspondre au scellement d'un nanopore situé par exemple au niveau de la flèche 2 sur la Figure 3. Le saut d'amplitude 140 pA pourrait correspondre au scellement d'un nanopore situé au niveau de a flèche 3, et le saut de 10 pA pourrait correspondre au scellement d'un nanopore situé au niveau de la flèche 4.

Cependant, nous avons pu constater sur les images par fluorescence que les nanopores se trouvant le plus proche du microanal 1 (flèche 1 sur la Figure 3) étaient toujours scellés à l'issue de l'expérience. Nous n'avons pourtant jamais pu observer de saut d'une valeur égale à ΔI_{1max}. Les sauts observés étaient toujours inférieur à $\Delta I_{1ma}\ /2$. Ceci est un élément supplémentaire appuyant le fait que, tel que nous l'avons décrit dans l'article, le scellement des nanopores n'est vraisemblablement pas total : ainsi, à l'issue du scellement, les particules seraient à une distance non nulle du nanopore. Cette position correspondrait à un équilibre entre différentes forces s'exerçant sur la particule : la force électrostatique, et une force engendrée par le flux d'ions contournant la nanoparticule [3], [4]. L'hypothèse d'une distance non nulle entre les particules et le nanopore est appuyée par les deux autres observations mentionnées dans l'article : **i)** certaines nanoparticules sont attirées par des nanopores déjà scellés par une nanoparticule, et restent ainsi au voisinage de nanopores déjà scellés (effet visible par exemple au niveau de la flèche B de la figure 2 e de l'article). Ceci indique que le scellement des nanopores n'est pas total, de sorte qu'il subsiste un champ électrique au voisinage des nanopores scellés. **ii)** lorsque la différence de potentiel est annulée, la majorité des particules sont à nouveau emportées par le flux, alors que certaines restent capturées de manière irréversible. Nous attribuons ceci au fait que dans la majorité des cas, la particule capturée se trouve au-dessus du nanopore et interagit faiblement avec la surface. Dans de rares cas, la particule entre en contact avec la surface entourant le pore, et reste ainsi adsorbée sur la surface par des forces de Van der Waals relativement fortes.

Considérons à présent le saut de courant n° 6 sur la Figure 2. Nous pouvons constater que celui-ci est constitué d'un premier saut abrupt (durée inférieure à 1 ms), suivi d'un régime transitoire. Nous avons mesuré la constante de temps de ce régime transitoire en ajustant la courbe I(t) (données brutes) avec un modèle de type $y = y_0 + Ae^{-(t-t_0)/\tau}$ (Figure 4). Nous avons pour cela utilisé une fonction du logiciel Igor Pro. Nous obtenons ainsi une valeur de constante de temps de 119 ms. Afin de savoir si le transitoire observé pouvait être dû à la présence du couplage capacitif entre les deux compartiments de mesures, nous avons simulé une expérience de scellement avec le simulateur en ligne Partsim, en utilisant le circuit équivalent extrait du chapitre précédent. Nous avons rappelé ce circuit dans la Figure 5 a) et b). Les valeurs utilisées dans la simulation pour chaque élément sont regroupées dans le Tableau 1. Pour le couplage capacitif entre les deux compartiments, nous avons utilisé le modèle simplifié semi-empirique de la figure 18 e), paragraphe 2.3.2, chapitre 3. Nous avons utilisé les valeurs de R_1, R_2, $R_{nanocanal}$ calculées pour la configuration 2 (pas 6 µm, n_0 = 58) avec un diamètre nominal des nanopores de 107 nm. Nous avons mis en parallèle de R_2 une résistance correspondant à la résistance d'un nanopore. Un interrupteur est mis en série avec cette résistance, de sorte que la résistance représente un nanopore supplémentaire en parallèle avec le réseau de nanopores R_2, et qui peut être scellée en

ouvrant l'interrupteur. Des informations complémentaires sont données dans l'annexe 1, paragraphe 7.

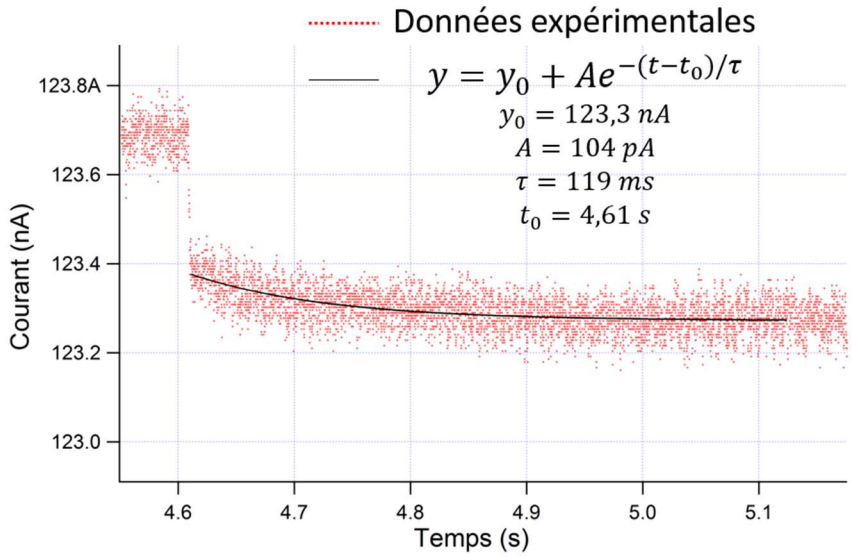


Figure 4 : agrandissement du saut n°6 sur la Figure 2 (données brutes) et ajustement avec une courbe exponentielle.

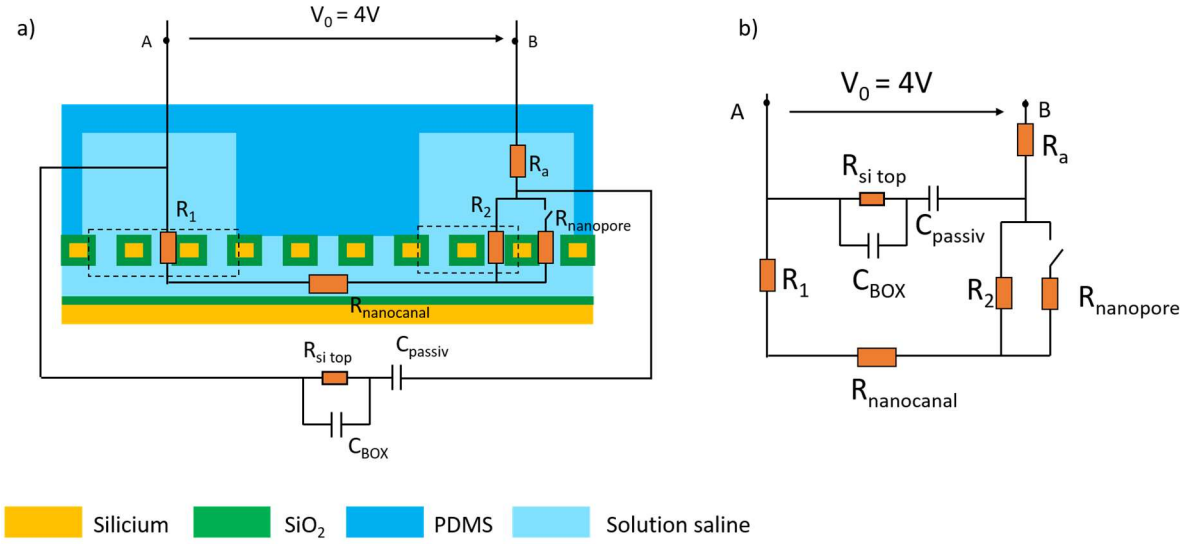


Figure 5 : schéma électrique équivalent du dispositif utilisé pour simuler une expérience de scellement d'un nanopore avec une nanoparticule.

Elément	$R_1 = R_2$	$R_{nanocanal}$	R_a	$R_{nanopore}$	$R_{si\ top}$	C_{passiv}	C_{BOX}
Valeur	2,1 MΩ	13,0 MΩ	1 kΩ	12,3 MΩ	115 kΩ	1,2 nF	275 pF

Tableau 1 : valeurs des différents éléments du circuit de la Figure 5 b), utilisées pour la simulation du scellement des nanopores.

Une différence de potentiel V_0 de 4 V est appliquée. A t = 10 µs, l'interrupteur est ouvert. Nous avons réalisé la simulation de t = 0 µs à t = 200 µs avec un pas temporel de 100 ns. La Figure 6 a) montre la

courbe I(t) obtenue avec le simulateur. Nous pouvons constater que, comme prévu, le courant diminue à partir de t = 10 µs. Deux décroissances exponentielles sont observées : une décroissance relativement rapide dans un premier temps, puis une décroissance plus lente. Nous avons approché la courbe simulée avec deux courbes de type exponentielles avec le logiciel Igor Pro. Les différents paramètres obtenus pour l'ajustement sont indiqués sur la Figure 6 a). Nous avons ainsi obtenu une constante de temps τ_0 de 2,1 µs pour la première décroissance exponentielle, et une constante de temps τ_1 de 178 µs pour la décroissance plus lente. Nous avons tracé la courbe I(t) en échelle logarithmique après avoir soustrait la valeur y_1 limite du courant donné par l'ajustement de la deuxième décroissance exponentielle. Nous pouvons constater que l'on a bien deux domaines linéaires en échelle logarithmique, typiques d'une décroissance exponentielle.

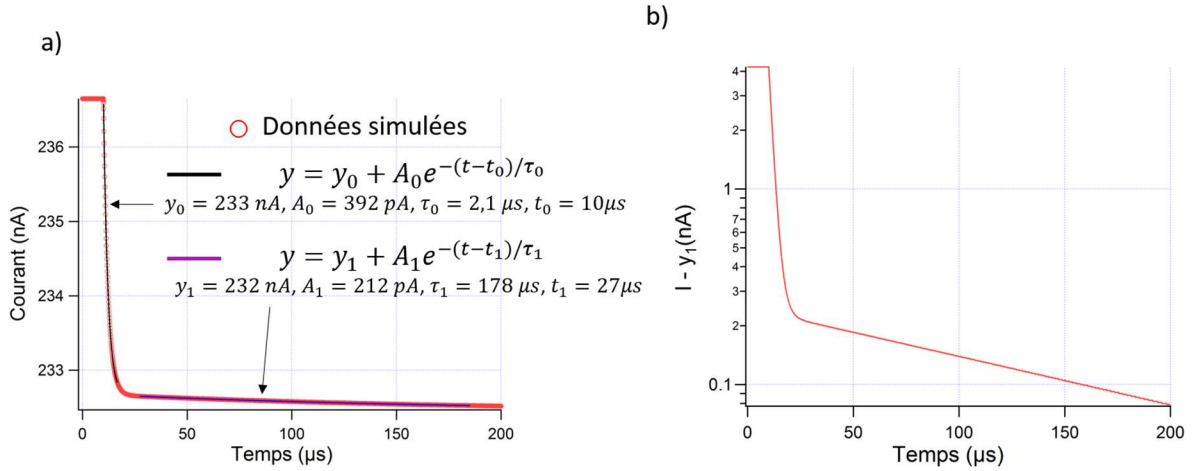


Figure 6 : saut de courant simulé avec le simulateur Partsim, en utilisant le circuit de la Figure 5 b), avec V_0 = 4 V, et ajustement avec deux courbes exponentielles. b) même simulation en échelle logarithmique, après avoir retranché la valeur y_1 donné par le deuxième ajustement du a).

Les résultats de cette simulation montre que les constantes de temps théoriques associées à la charge/décharge des capacités C_{passiv} et C_{BOX} sont largement inférieures (178 µs, 2,1 µs) à la constante de temps de la décroissance exponentielle observée pour le saut n°6 (119 ms). Un autre phénomène doit donc expliquer le régime transitoire observé lors des sauts de courant. Ceci pourrait être dû soit à un artefact introduit par l'appareil de mesure, soit à un phénomène inhérent à la cinétique de la capture : on peut en effet imaginer que lorsque la particule est capturée, celle-ci décrive une trajectoire telle que le l'enregistrement électrique présente ce régime transitoire. Notons enfin que notre modèle s'écarte de la réalité dans la mesure où nous considérons que le scellement des nanopores est total (modélisation par un interrupteur ouvert) et du fait que la résistance totale $R_{réseau}$ donnée par notre modèle est deux fois plus faible que la résistance réelle mesurée.

2.3. Conclusion

Afin de tester la sensibilité électrique de nos dispositifs, nous avons mené des expériences de capture de nanoparticules chargées et fluorescentes. Ces expériences ont été réalisées sur trois dispositifs différents, présentant des nanopores de diamètre nominal 107 nm et de pas 1 µm. La capture a été réalisée en appliquant une différence de potentiel supérieure à 1 V au bornes du dispositif alors que

les particules se trouvent dans le microcanal 2. Un flux imposé dans le microcanal 2 permet une arrivée constante de nanoparticules au-dessus des nanopores. Deux types de caractérisation, non simultanées, ont été réalisées : une caractérisation par microscopie de fluorescence, et une caractérisation avec un enregistrement du courant I circulant entre les électrodes en fonction du temps. La caractérisation par fluorescence a permis de montrer que les particules sont bien capturées par les nanopores lorsque la différence de potentiel est appliquée, et sont immédiatement emportées par le flux imposé dans le microcanal 2 lorsque la différence de potentiel est annulée. Les enregistrements électriques présentent des sauts de courant que l'on attribue au scellement séquentiel et individuel des nanopores.

Nous avons observé des sauts dont l'amplitude varie entre 10 pA et 420 pA. La valeur des sauts est bien comprise dans la fourchette des valeurs théoriques calculées dans le chapitre 3 : selon notre modèle, la dispersion sur la valeur des sauts serait due à la variation de l'emplacement du nanopore scellé sur la ligne de nanopore, et à la présence de la résistance $R_{interpore}$ associée à la portion de nanocanal enfoui se trouvant entre deux nanopores. Les plus grandes valeurs de saut observées étant toujours inférieures à la plus grande valeur théorique, nous avons conclu que le scellement des nanopores est partiel. Ce scellement partiel serait dû au fait que la particule se trouve à l'issue de la capture au-dessus du nanopore, à une distance non-nulle de celui-ci. Deux observations appuient cette interprétation : le fait que les particules capturées soient à nouveau emportées par le flux lorsque la différence de potentiel est annulée, et l'observation de particules attirées par des nanopores déjà scellés. Notons cependant que notre modèle électrique de l'expérience est limité dans la mesure où pour une différence de potentiel appliquée de l'ordre de quelques volts, la résistance totale du dispositif est environ deux fois plus grande que la résistance modélisée et observée dans le chapitre 3 pour une différence de potentiel appliquée inférieure à 100 mV.

Enfin, nous avons observé à l'issue de chaque saut de courant important, un régime transitoire avec une constante de temps plusieurs ordres de grandeur au-dessus de celui estimé à partir du schéma électrique que nous utilisons pour modéliser le système. L'origine de ce régime transitoire reste hypothétique. Serait-il associé au fait que le scellement des nanopores n'est pas total et à la trajectoire de la particule lors du scellement ? Est-il lié à un artefact de mesure ?

3. Formation de bicouches lipidiques supportées et suspendues à partir de vésicules lipidiques

3.1. Introduction

Dans cette section, nous présentons des premiers résultats concernant la formation de bicouches lipidiques supportées et suspendues au sein de nos dispositifs. La Figure 7 décrit le principe de l'expérience : une fois le dispositif assemblé et rempli de tampon phosphate salin, une suspension de SUV ou de LUV est introduite dans le réservoir 4 (Figure 7 a). Le niveau des réservoirs 2 et 4 est ajusté de manière à ce que la suspension passe par le microcanal 2 jusqu'au réservoir 2, sous l'effet du flux

résultant de la différence de niveaux (flèche noire sur la Figure 7 a). Nous laissons ainsi la suspension dans le microcanal 2 pendant un certain temps d'incubation, avant de rincer avec du PBS exempt de vésicules. Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre (voir paragraphe 2.4.2, chapitre 1), nous nous attendons à ce que, lors de l'incubation, des SUV/LUV s'adsorbent sur la surface de SiO_2 du dispositif, fusionnent entre elles et se rompent. Ceci devrait aboutir à la formation d'une bicouche supportée sur la surface de SiO_2 de la puce de silicium (Figure 7 b), et suspendue au-dessus des nanopores (Figure 7 c et d). Nous nous attendons à ce que les vésicules adsorbées à proximité des nanopores fusionnent entre elles et scellent les nanopores.

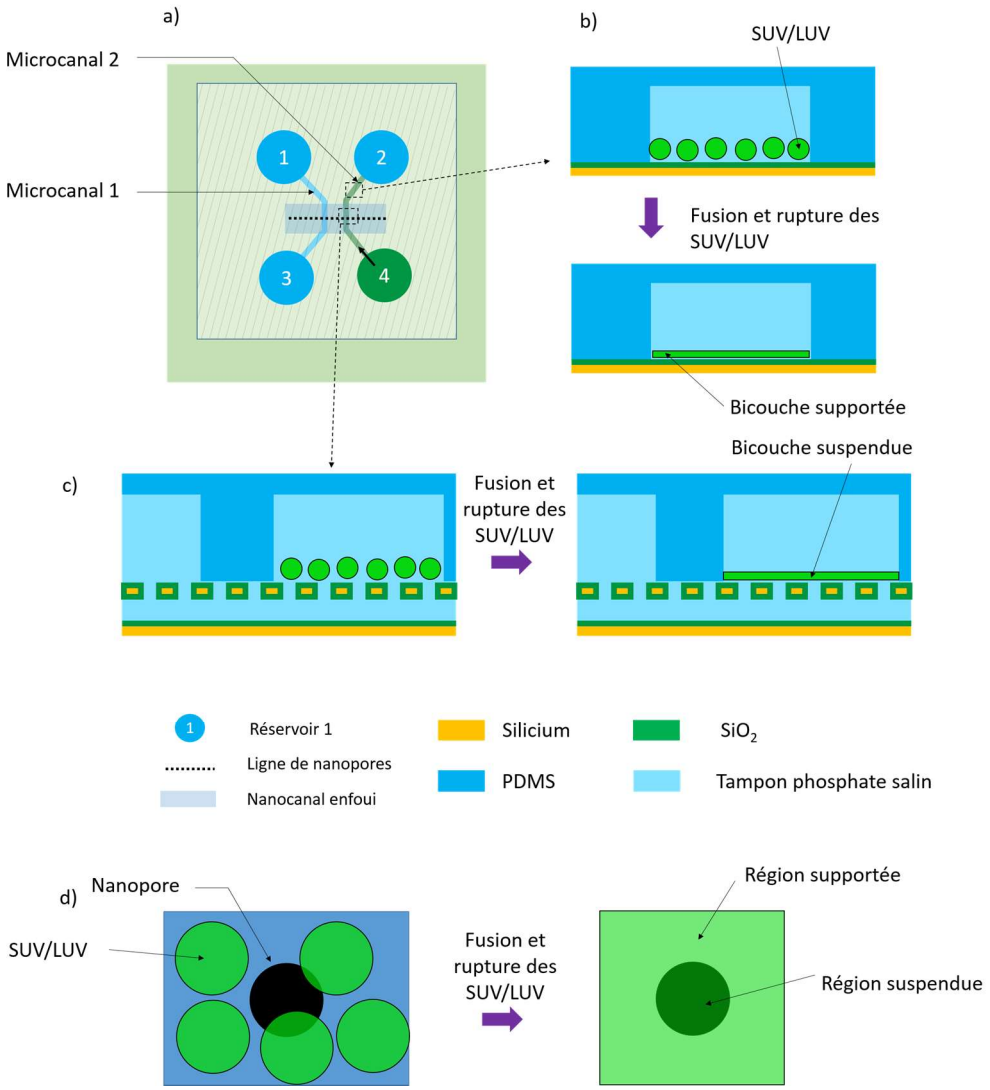


Figure 7 : schéma décrivant le principe des expériences de formation d'une bicouche supportée/suspendue au sein du dispositif. a) vue de dessus. b) vue de côté, au niveau d'une zone sans nanopore, où la bicouche formée est supportée sur la surface de SiO_2. c) vue de côté au niveau de la zone où se trouvent les nanopores. La bicouche est suspendue au dessus des nanopores. d) vue de haut montrant comment un nanopore peut être scellé par la fusion des vésicules se trouvant à proximité de la bicouche présente à l'issue du processus, une région suspendue et une région supportée.

La mesure de la résistance totale du dispositif soit avant et après l'incubation, soit au cours de l'incubation, fournira une première caractérisation pour savoir si la bicouche lipidique formée est bien suspendue au-dessus des nanopores et les scelle. Nous présentons ces expériences dans le paragraphe

3.4. Avant de mener ces expériences, nous avons voulu vérifier que les conditions expérimentales utilisées, en particulier l'état de la surface de SiO_2 de la puce de silicium obtenue à l'issue du procédé de fabrication, entraînent bien le processus de fusion et rupture des vésicules que l'on cherche à exploiter. Pour cela, nous avons réalisé sur certains échantillons une caractérisation par FRAP (recouvrement de fluorescence après photoblanchiment) de la surface de SiO_2 après incubation. Comme nous allons le voir, cette méthode permet de différencier le cas où, à l'issue de l'incubation, les vésicules n'ont pas fusionné et sont intactes sur la surface, du cas où une bicouche supportée est formée. Cette caractérisation se fait *via* une mesure de la vitesse de diffusion de phospholipides marqués par fluorescence, ajoutés en faible quantité (1% mol) aux phospholipides utilisés lors de l'incubation.

3.2. Résumé du protocole de formation des liposomes

Le protocole de formation des liposomes est largement décrit dans la littérature [5], et sera détaillé dans la partie « matériels et méthodes » en annexe (voir annexe 1). Nous utilisons un phospholipide neutre POPC synthétique (Avanti Polar Lipids). Pour la caractérisation par FRAP, et afin de réaliser des observations par fluorescence de la bicouche formée à l'issue de l'incubation, nous mélangeons un phospholipide marqué par fluorescence, le NBD-PC[1] (absorption à 464 nm et émission à 531 nm). Dans toute cette thèse, la composition lipidique des liposomes est POPC / NBD-PC (99%/1%, mol/mol).

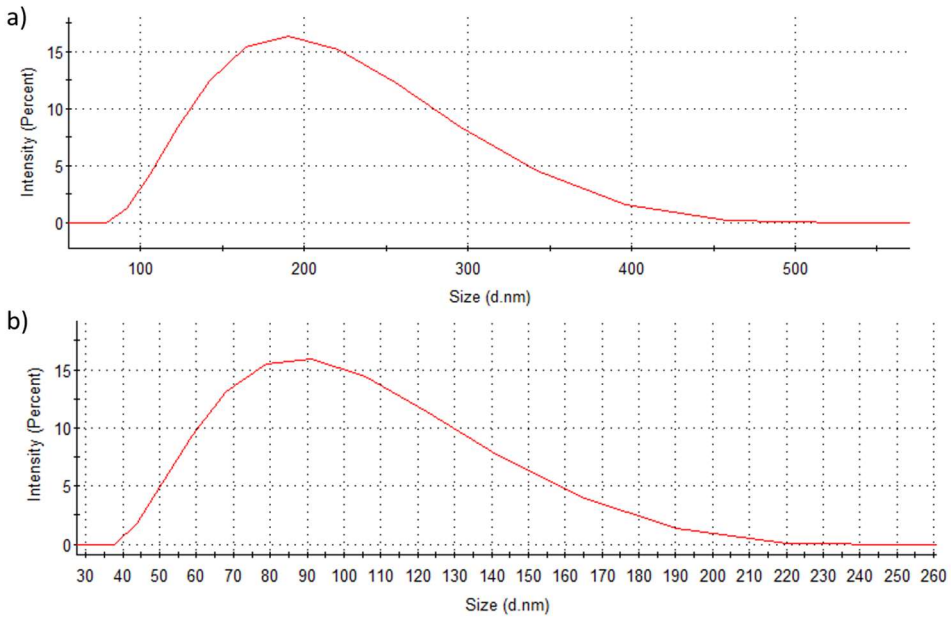


Figure 8 : a) distribution de taille des liposomes mesurée par DLS pour une suspension de liposomes de taille nominale 180 nm à une concentration de 200 µg/mL. b) distribution de taille des liposomes mesurée par DLS pour une suspension de liposomes de taille nominale 80 nm à une concentration de 200 µg/mL.

[1] 1-acyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodécanoyl}-sn-glycéro-3-phosphocholine

Les liposomes sont formés par extrusion au travers des membranes présentant des nanopores de 200 nm, 100 nm, ou 50 nm. La mesure de la taille des liposomes est réalisée par diffusion dynamique de la lumière [6]. Nous obtenons à l'issue de l'extrusion des liposomes dont la valeur moyenne du diamètre est 181 ± 15 nm (mesure sur 10 préparations différentes) que l'on désignera par la taille nominale 180 nm) ou 81 ± 9 nm (mesure sur 3 préparations différentes) que l'on désignera par la taille nominale 80 nm, en suspension dans du PBS. NB : nous avons représenté les liposomes par la valeur moyenne, mais la taille mesurée par DLS suit une distribution, comme le montre la Figure 8. Nous utilisons par la suite les liposomes à une concentration de 40 µg/mL, 200 µg/mL et 700 µg/mL.

3.3. Caractérisation par FRAP de la formation d'une bicouche supportée sur des substrats SOI

3.3.1. Présentation de la méthode de FRAP

Après incubation d'une suspension de liposomes fluorescents dans un des microcanaux de notre dispositif puis rinçage avec du PBS, nous observons que la surface de SiO_2 présente une fluorescence homogène telle que nous l'avons schématisée dans la Figure 9 a). Nous ne pouvons cependant pas savoir à ce stade si le mécanisme de fusion et rupture des liposomes a bien eu lieu, ou si la fluorescence observée est due à des vésicules adsorbées sur la surface de SiO_2. Le diamètre des liposomes est en effet plus petit que la résolution des microscopes optiques, si bien que ces deux cas donneraient un résultat similaire lors d'une observation optique. Il nous a semblé important, avant d'envisager mesurer électriquement le scellement des nanopores par la bicouche, de vérifier que le processus de fusion et rupture des liposomes a bien lieu dans les conditions expérimentales que l'on utilise. En particulier, il nous semblait important de vérifier que le procédé de fabrication des nanopores et du nanocanal enfoui n'aboutit pas à une surface sur laquelle la fusion et rupture des liposomes est perturbée.

La présence d'une bicouche supportée sur une surface peut être mise en évidence par la méthode de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), dont nous avons schématisé le principe sur la Figure 9. Comme le montre la Figure 9 a), on éclaire une zone circulaire (délimitée par un diaphragme) de la surface avec un pulse laser. La forte intensité lumineuse altère les fluorophores se trouvant dans cette zone. On parle de photoblanchiment de la zone. On mesure ensuite le retour de l'intensité de fluorescence de la zone en fonction du temps écoulé à partir du photoblanchiment (Figure 9 b). Si la surface est recouverte d'une bicouche supportée (cas 1 sur la Figure 9 b), la fluorescence revient progressivement à cause de la diffusion des phospholipides entre la zone photoblanchie et le reste de la bicouche. Si la surface est recouverte de liposomes adsorbés, la diffusion des phospholipides ne se faisant pas entre les liposomes, la surface reste sombre (cas 2 sur la Figure 9 b). La surface restera sombre aussi lorsqu'il y a une bicouche supportée organisée en domaines ne communiquant pas entre eux et de largeur moyenne inférieure au diamètre de la zone photoblanchie. Enfin, si le processus de fusion et rupture des liposomes a eu lieu partiellement, il peut y avoir coexistence de zones couvertes d'une bicouche supportée et de zones recouvertes de vésicules adsorbées. Dans ce cas, il y a un retour partiel de la fluorescence (cas 3 sur la Figure 9 b).

Le retour partiel de la fluorescence est chiffré avec la fraction mobile, définie de la manière suivante :

$$F_m = \frac{I_f - I_0}{I_i - I_0}$$

Où I_i (Figure 9 c) est l'intensité de fluorescence (intégrée sur toute la zone photoblanchie) avant photoblanchiment, I_0 est l'intensité de fluorescence juste après le photoblanchiment, et I_f est l'intensité finale à la fin de la courbe de recouvrement de fluorescence.

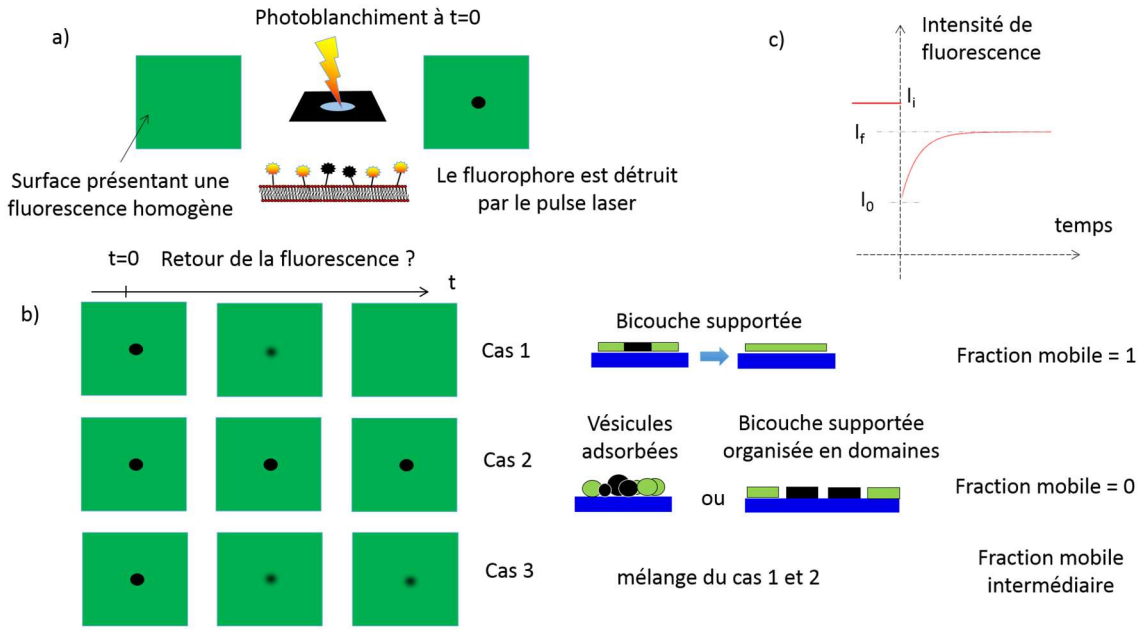


Figure 9 : schéma montrant le principe de la méthode de FRAP pour la caractérisation d'une bicouche supportée. a) photoblanchiment initial. b) après photoblanchiment, pour le cas d'une bicouche supportée (cas 1), pour le cas de vésicules adsorbées ou d'une bicouche supportée organisée en domaines (cas 2) et pour un cas intermédiaire entre les cas 1 et 2 (cas 3). c) schéma montrant une courbe de recouvrement de la fluorescence typique pour le cas 3.

La méthode de FRAP permet aussi une mesure du coefficient de diffusion du phospholipide fluorescent utilisé au sein de la bicouche supportée. Ce coefficient de diffusion permet de quantifier la fluidité de la bicouche : pour un même phospholipide fluorescent utilisé, plus la bicouche sera fluide, plus la diffusion du phospholipide fluorescent dans la bicouche sera rapide. Pour cela, les courbes de recouvrement de fluorescence sont ajustées avec un modèle théorique [7] permettant de déduire la valeur du coefficient de diffusion. Les phospholipides ont généralement une température de transition entre une phase gel où la diffusion est relativement lente, et une phase liquide où elle est plus rapide. Le coefficient de diffusion d'un phospholipide marqué par fluorescence peut alors varier de 10^{-4} µm²/s pour la phase gel à quelques µm²/s pour la phase liquide [8]. Selon les phospholipides, la température de transition varie notamment en fonction du nombre d'atomes de carbone et du nombre d'insaturation des chaines aliphatiques du phospholipide. La température de transition est de - 2°C pour le POPC. Il se trouve donc dans sa phase liquide à température ambiante, température à laquelle sont menées les expériences de cette thèse. Un coefficient de diffusion du lipide marqué par fluorescence de 1 à 4 µm²/s est attendu [5], [9].

Dans ce paragraphe, nous commençons par présenter le montage et les conditions expérimentales que l'on a utilisées pour mener les expériences de FRAP. La taille des liposomes est fixée à 80 nm et la concentration en lipides des suspensions à 700 µg/mL car des observations préliminaires par

microscopie de fluorescence montrent que ces paramètres permettent d'obtenir une fluorescence homogène et sans défaut sur des substrats SOI oxydés. Nous menons ensuite l'expérience de FRAP sur des bicouches supportées formées sur deux substrats différents, un substrat SOI oxydé sans nanopores, et un substrat SOI oxydé sur lequel le procédé de fabrication des nanopores et du nanocanal enfoui a été effectué. Ces deux expériences nous permettront de savoir si la surface de l'oxyde thermique permet de former une bicouche supportée dans les conditions expérimentales utilisées, et si le procédé de fabrication des nanopores ne perturbe pas ce phénomène.

3.3.2. Dispositif expérimental dédié au FRAP

Nous avons réalisé les expériences de FRAP sur un banc de mesure dédié à cette méthode, en collaboration avec l'IPBS (laboratoire de pharmacologie et de biologie structurale). Nous n'avons pas pu mener ces expériences au sein de dispositifs présentant une cellule fluidique : le microscope optique du banc de mesures utilise en effet des objectifs à immersion qui nécessitent une distance entre la surface à caractériser et la lentille du microscope inférieure à 200 µm. L'épaisseur des cellules fluidiques étant d'environ 2,5 mm, leur utilisation est proscrite.

Nous avons donc utilisé un dispositif expérimental adapté (Figure 10). Le substrat à caractériser est posé sur deux espaceurs constitués de parafilm étiré, eux-même posés sur une lamelle de microscope. L'épaisseur des rubans de parafilm étirés est inférieure à 50 µm, ce qui permet que la distance entre la surface à caractériser et la lentille de l'objectif soit inférieure à 200 µm. Afin d'utiliser des conditions expérimentales les plus proches possibles du cas d'un dispositif assemblé avec une cellule fluidique, nous effectuons un traitement par plasma d'air de 15 min des substrats (mêmes paramètres que ceux décrit dans l'assemblage des dispositifs dans le chapitre 2, paragraphe 4) puis les substrats sont placés dans une étuve à 80°C pendant 5 min, de manière à « mimer » le protocole d'assemblage. Les substrats sont ensuite placés sur les espaceurs, et le dispositif pré-rempli de PBS. Dans le cas des dispositifs réels autant que dans le cas de ce dispositif dédié au FRAP, ce pré-remplissage est nécessaire pour éviter la formation de bulles d'air. Le PBS est ensuite remplacé par une suspension de liposomes, en jouant sur le niveau des deux gouttes se trouvant de part et d'autre du substrat. La suspension est incubée pendant 15 min puis rincée plusieurs fois avec du PBS (voir annexe 1, paragraphe 4).

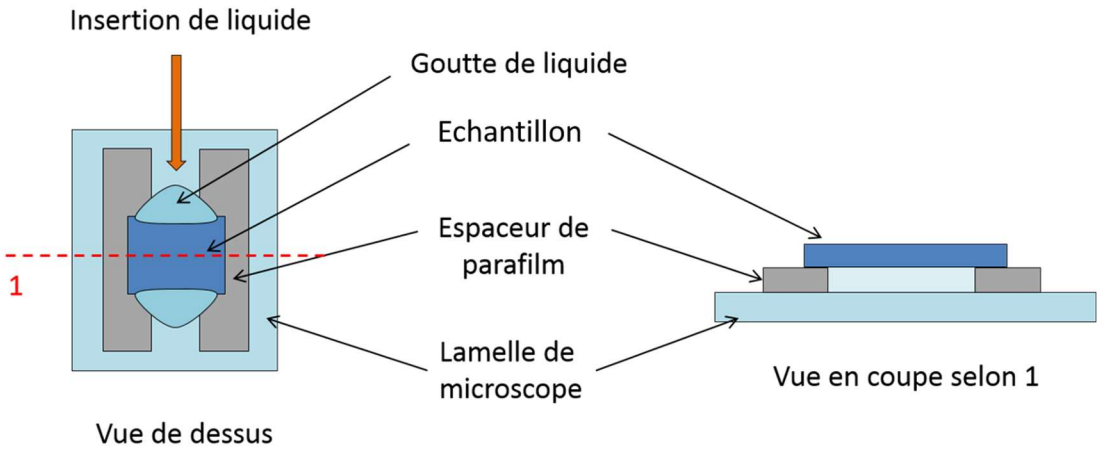


Figure 10 : Schéma du montage expérimental utilisé pour la caractérisation par FRAP.

3.3.3. Observations préliminaires en microscopie par fluorescence, choix des conditions expérimentales

Avant de mener les expériences de FRAP, nous avons réalisé une série de tests d'incubation sur des substrats de silicium oxydé (oxydation thermique de 86 nm, voir protocole d'oxydation dans l'annexe 1, paragraphe 1.6) en menant une caractérisation par microscopie en fluorescence, afin d'ajuster nos paramètres expérimentaux pour obtenir à l'issue de l'incubation une fluorescence homogène sur les surfaces. Nous avons réalisé ces observations pour des suspensions de liposomes de concentration 40 µg/mL, 200 µg/mL et 700 µg/mL, et pour une taille nominale de liposomes de 80 nm et 180 nm. Nous avons utilisé le même montage que celui représenté sur la Figure 10, et le même protocole d'incubation et de rinçage. Les observations ont été réalisées avec un microscope droit muni d'un objectif X 50 longue distance de travail olympus (voir protocole détaillé dans l'annexe 1, paragraphe 4).

Pour les deux diamètres nominaux de liposomes, et pour toutes les concentrations, nous obtenons à l'issue de l'incubation et du rinçage une fluorescence continue sur la surface. Avec un objectif X 50, lorsque l'on observe pendant dix à vingt secondes une zone de diamètre 100 µm définie avec un diaphragme, nous constatons que le centre de la zone devient noir au cours de l'observation, alors que les bords de la zone restent lumineux. L'image présente ainsi à l'issue de l'observation un dégradé radial. Nous interprétons cette observation qualitative par le fait qu'il y a une bicouche supportée sur la surface, et que la lumière envoyée pour l'observation photoblanchit les fluorophores de la bicouche se trouvant dans la zone observée, ce qui conduit à son assombrissement. Sur les bords, la diffusion, au sein de la bicouche, entre les fluorophores non photoblanchis se trouvant à l'extérieur de la zone d'observation et les fluorophores photoblanchis se trouvant à l'intérieur de la zone conduit à une intensité de fluorescence plus importante qu'au centre de la zone d'observation. Nous avons donc conclu que l'incubation des suspensions de liposomes aboutit à la formation d'une bicouche supportée, pour les différents diamètres nominaux de liposomes et concentrations utilisés. Ces résultats sont en accord avec une étude montrant que la formation d'une bicouche supportée sur une surface de verre avec des vésicules de POPC a lieu pour différentes tailles de liposomes comprises entre 25 nm et 200 nm [10]. En ce qui concerne la concentration, nos résultats sont en accord avec de précédentes études, qui montrent que pour une concentration comprise entre 100 µg/mL et 1mg/mL la formation d'une bicouche supportée est observée [11], [12], [13]. La présence d'une bicouche supportée sera confirmée quantitativement par les expériences de FRAP.

Nous avons par ailleurs observé deux éléments importants : premièrement, nous avons constaté que la fluorescence observée sur la surface présente des taches noires lorsque l'on utilise les suspensions de liposomes à une concentration de 40 µg/mL et 200 µg/mL, pour les deux tailles de liposomes utilisées. Nous attribuons ces taches noires à des défauts se trouvant dans la bicouche supportée. Lorsque l'on utilise les suspensions de liposomes à 700 µg/mL, la fluorescence ne présente pas de taches sombres. Pour les expériences de scellement de nanopores, il est important d'avoir une bicouche présentant le moins de défauts possibles de manière à ce que la résistance de fuite soit la plus grande possible (idéalement, supérieure à 1 GΩ). Nous avons donc choisi d'utiliser les suspensions de liposomes à 700 µg/mL pour la suite des travaux.

Le deuxième élément que nous avons observé est le suivant : pour les liposomes de diamètre nominal 180 nm, une multitude de points lumineux est observée au voisinage de la surface du substrat. Ces points sont visibles dans le même plan focal que la surface, ce qui montre qu'ils sont très proches de

la surface, mais sont sujets au mouvement brownien, ce qui montre qu'ils ne sont pas adsorbés sur la surface. Ces points lumineux pourraient être des liposomes se trouvant juste au-dessus de la bicouche supportée, et en interaction avec elle. Ils ne seraient pas évacués par l'étape de rinçage à cause de cette interaction. La présence d'une telle interaction a été mentionnée dans une étude de Kyoung et al. [14], et résulterait de la combinaison de forces de van der Waals, électrostatiques, et d'hydratation.

Nous n'avons pas observé la présence de ces points lumineux lorsque l'on utilise des liposomes de diamètre nominal 80 nm. Nous pouvons expliquer ce résultat de deux manières : premièrement, nous pouvons envisager qu'il y a dans ce cas des vésicules proches de la bicouche et en interaction avec elle, mais qui sont invisibles du fait de leur petite taille. Elles pourraient aussi apparaître comme une fluorescence homogène si le nombre de ces vésicules par unité de surface est important. Une deuxième explication est qu'il n'y a pas dans ce cas de vésicules en interaction avec la surface, hypothèse que l'on peut expliquer avec le modèle théorique proposé par Kyoung et al. [14] : deux phénomènes seraient en compétition : l'interaction entre les vésicules et la bicouche supportée, et la diffusion des vésicules perpendiculairement à la surface. L'énergie d'interaction entre les vésicules et la bicouche supportée est proportionnelle au rayon des vésicules, alors que le coefficient de diffusion des vésicules dans la direction perpendiculaire à la surface est inversement proportionnel à ce rayon. Il est possible que dans le cas des vésicules de diamètre nominal 180 nm, le terme d'interaction entre les vésicules et la bicouche supportée soit prépondérant, alors que dans le cas des vésicules de diamètre nominal 80 nm, le terme de diffusion soit prépondérant.

La présence des vésicules proches de la bicouche supportée est problématique pour les expériences de FRAP car leur apparition ou disparition dans la zone d'observation, sous l'effet de la diffusion latérale, modifie l'intensité mesurée de manière aléatoire, rendant l'exploitation des courbes impossible. C'est pourquoi nous avons mené les expériences de FRAP en utilisant les liposomes de diamètre nominal 80 nm.

3.3.4. Résultats, discussion

Nous avons tout d'abord caractérisé la formation d'une bicouche supportée sur un substrat SOI oxydé (oxyde thermique d'épaisseur 100 nm) ne présentant pas de nanopores. Ce substrat, similaire à celui utilisé dans le chapitre 3, paragraphe 4, constitue un « témoin » par rapport aux substrats SOI présentant des nanopores car il présente à priori la même surface mais le protocole de fabrication des nanopores n'a pas été réalisé. La Figure 11 a) montre une courbe de FRAP typiquement obtenue. Nous pouvons constater qu'il y a un retour partiel de la fluorescence. En ajustant un modèle théorique [7] sur les courbes nous obtenons une valeur de coefficient de diffusion de 4 ± 2 µm²/s (16 mesures réparties sur l'ensemble de la surface du substrat), et avons mesuré une fraction mobile de 0,82 ± 0,15. Le coefficient de diffusion obtenu est en accord avec les valeurs que l'on a mentionné plus haut, 1 à 4 µm²/s pour des bicouches de POPC sur une surface de SiO_2 [5], [9]. La fraction mobile de 0,82 mesurée est aussi en accord avec les valeurs mentionnées dans ces études, qui sont entre 0,80 et 1 pour le POPC sur une surface de SiO_2 [13], [9].

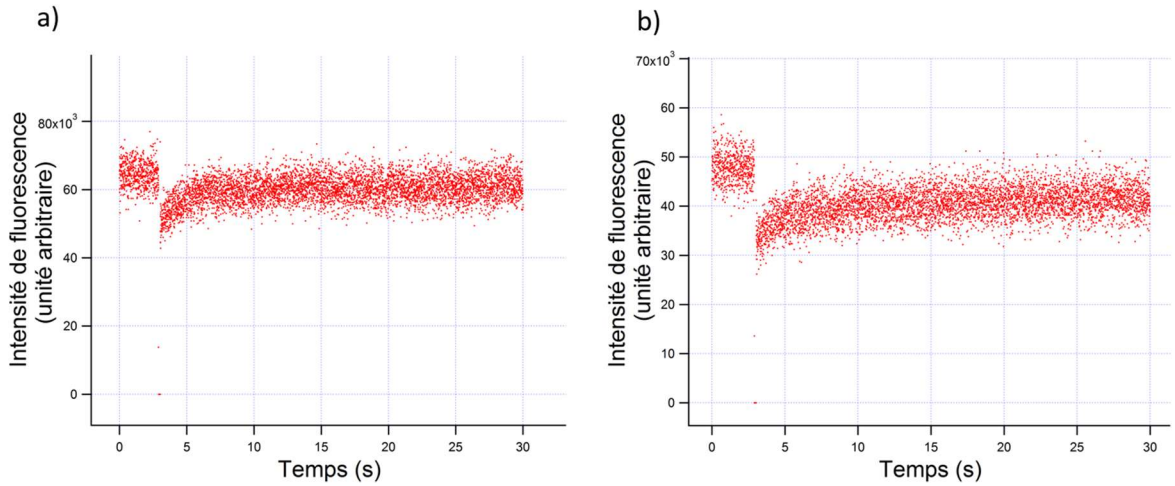


Figure 11 : courbe de recouvrement de fluorescence pour une bicouche supportée formée de POPC / NBD-PC (99%/1% mol/mol) sur la surface a) d'un substrat SOI oxydé ne présentant pas de nanopores. b) d'une puce de silicium sur laquelle le procédé de fabrication des nanopores et du nanocanal enfoui a été réalisé.

Nous avons ensuite mené une expérience de FRAP sur un substrat sur lequel la totalité du procédé de fabrication des nanopores et du nanocanal enfoui a été effectuée. Le substrat présente donc des nanopores (diamètre nominal 10 nm, pas 6 µm, 167 nanopores au total), le triangle d'alimentation, le nanocanal enfoui, et l'oxyde thermique d'épaisseur 100 nm. L'expérience de FRAP sur ce substrat a été menée afin de vérifier que le procédé de fabrication des nanopores aboutit bien à une surface de SiO_2 permettant la formation d'une bicouche supportée ou suspendue à partir des liposomes.

La Figure 11 b) montre une courbe de recouvrement de fluorescence typiquement obtenue. Un coefficient de diffusion de 2 ± 1 µm²/s, et une fraction mobile de 0,72 ± 0,12 ont été mesurés (15 mesures réparties sur l'ensemble du substrat). Ces résultats montrent qu'une bicouche supportée est bien obtenue sur la surface de l'échantillon présentant les nanopores, et donc que le procédé de fabrication des nanopores aboutit bien à une surface permettant d'obtenir une bicouche supportée dans les conditions expérimentales utilisées. Le coefficient de diffusion et la fraction mobile sont toutefois plus faibles que dans le cas du substrat SOI sans nanopores.

La fraction mobile de 0,72 ± 0,12 obtenue pour le substrat SOI présentant les nanopores est plus faible que les valeurs typiques de la littérature, comprises entre 0,80 et 1 [13], [9]. Plusieurs explications sont envisageables, comme nous l'avons vu plus haut dans la présentation de la méthode de FRAP. Ainsi, la faible fraction mobile observée peut être due à la présence de vésicules adsorbées sur la surface de SiO_2 et n'ayant pas participé à la formation de la bicouche supportée. Nous pouvons envisager dans ce cas que la bicouche supportée présente des défauts aux endroits où les vésicules n'ont pas éclaté. Une deuxième explication serait que la bicouche soit organisée en domaines présentant une connexité partielle, de sorte que la diffusion entre ces domaines est ralentie et le retour de la fluorescence n'est pas complet à l'issue de la mesure.

3.3.5. Conclusion

Nous avons mené une caractérisation par FRAP de bicouches supportées formées sur deux substrats différents. Le premier est un substrat SOI avec un oxyde thermique d'épaisseur 100 nm, ne présentant

pas de nanopores. Le deuxième est un substrat SOI sur lequel a été effectué la totalité du procédé de fabrication (nanopores, nanocanal enfoui et oxydation thermique). Nous avons mené ces expériences sur les substrats sans cellule fluidique, celles-ci étant incompatibles avec le banc de mesures de FRAP. Nous avons incubé sur les substrats des suspensions de liposomes fluorescents, dans des conditions les plus proches possibles de celles qui seront utilisées lors des expériences de scellement des nanopores. Seules les suspensions de liposomes à une concentration de 700 µg/mL ont été utilisées car les suspensions de concentration 40 µg/mL et 200 µg/mL ne permettent pas d'obtenir une fluorescence homogène sur les surfaces. Par ailleurs, seuls les liposomes de diamètre nominal 80 nm ont été utilisés car dans le cas des liposomes de diamètre nominal 180 nm, des vésicules restent au voisinage de la bicouche supportée à l'issue du rinçage et empêchent de mener les expériences de FRAP. Les valeurs mesurées du coefficient de diffusion sont de 4 ± 2 $\mu m^2/s$ pour le substrat sans nanopore, et de 2 ± 1 $\mu m^2/s$ pour le substrat avec nanopores. Ces valeurs, compatibles avec les valeurs de la littérature, montrent que l'on a bien une bicouche supportée sur les deux surfaces. Les fractions mobiles sont de 0,82 ± 0,15 pour le substrat sans nanopores et 0,72 ± 0,12 pour le substrat avec nanopores. Pour le substrat avec nanopores, la fraction mobile semble plus faible que les valeurs de la littérature, et ceci pourrait être dû soit à la fusion et rupture incomplète des liposomes, soit à une bicouche supportée organisée en domaines, ou encore à la présence de vésicules au-dessus de la bicouche et en interaction avec elle. Nous concluons que les deux substrats différents permettent bien d'obtenir une bicouche supportée dans les conditions expérimentales que l'on utilise, mais que le substrat présentant des nanopores a des propriétés de surface différentes de celle du substrat ne présentant pas les nanopores.

3.4. Mesure électrique in situ du scellement des nanopores par une bicouche lipidique suspendue

Dans ce paragraphe, nous nous intéressons à la caractérisation électrique de la formation d'une bicouche suspendue sur les nanopores de nos dispositifs. Nous allons présenter trois expériences successivement. Dans la première expérience, nous incubons un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 10 nm avec une suspension de liposomes de taille 80 nm. Nous mesurons la résistance du dispositif avant incubation et après incubation des liposomes. Nous menons ensuite des expériences où la mesure de la résistance est réalisée simultanément à l'incubation des liposomes, afin d'avoir accès à la caractérisation des évènements de scellements à l'échelle du nanopore individuel. Ces expériences sont menées pour des nanopores de diamètre nominal 18 nm, 36 nm, et 90 nm, et pour des liposomes de taille 180 nm. Nous n'avons pas pu mener une expérience similaire sur des dispositifs présentant des nanopores de diamètre nominal 10 nm à cause de difficultés à remplir le nanocanal enfoui. Enfin, nous présentons une expérience d'incubation de liposomes de taille 180 nm sur un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 107 nm, et montrons avec une caractérisation par fluorescence que, pour ce diamètre nominal, la bicouche obtenue semble suivre les parois des nanopores au lieu d'être suspendue sur les nanopores.

NB : comme pour le paragraphe précédent la composition des liposomes est POPC / NBD-PC (99%/1%, mol/mol). Cette composition permet de mener des caractérisations par microscopie de fluorescence.

3.4.1. Caractérisation de la résistance d'un dispositif avant et après incubation de liposomes

Nous avons commencé par mener une expérience d'incubation de liposomes de taille 80 nm, à une concentration de 700 µg/mL dans un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 10 nm et un nombre de nanopores $n_0 = 9$ entre un microcanal et le nanocanal enfoui. Nous avons uniquement mesuré la résistance du dispositif avant incubation et après incubation, afin de perturber le système le moins possible pendant l'incubation. La cellule fluidique a été assemblée sur le substrat SOI tel que nous l'avons décrit dans le chapitre 2.

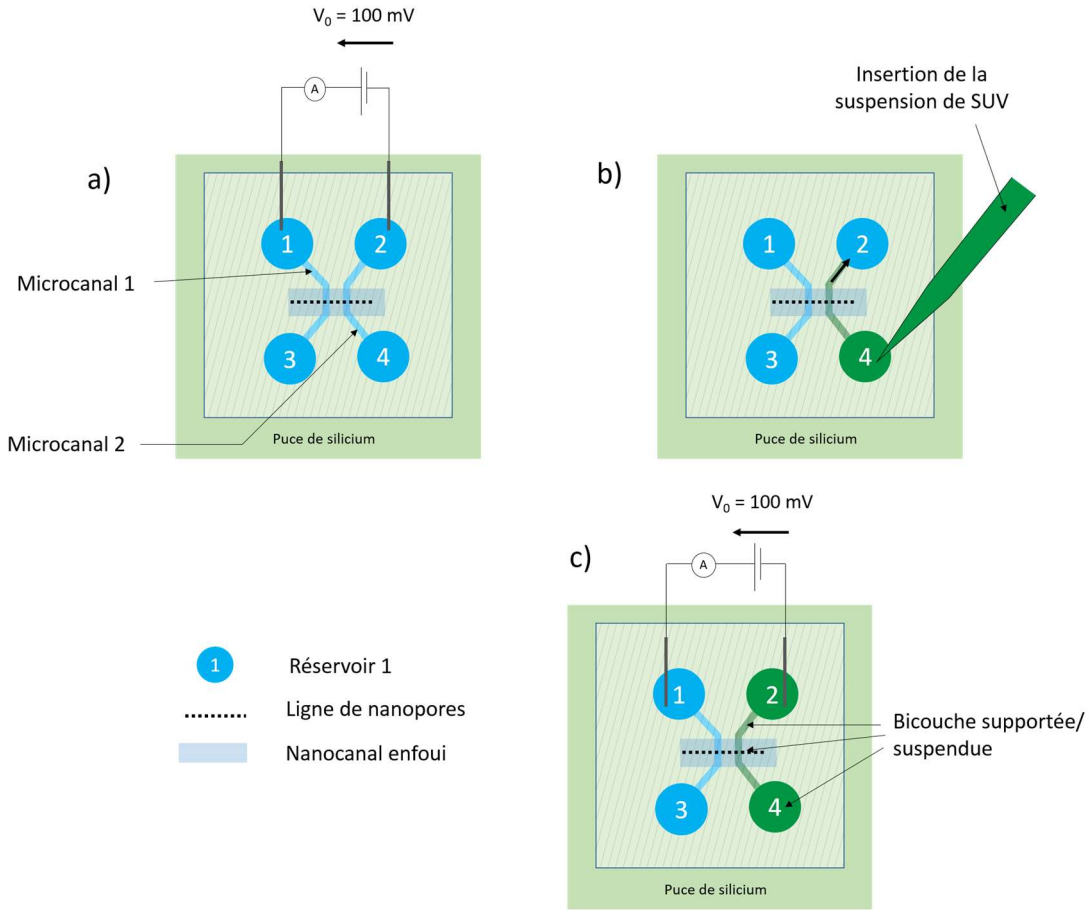


Figure 12 : schéma montrant les différentes étapes de l'expérience a) mesure de la résistance avant incubation. b) incubation puis rinçage de la suspension de liposomes. c) mesure électrique de la résistance après l'incubation et le rinçage.

La Figure 12 montre les différentes étapes de l'expérience : nous avons d'abord mesuré la résistance avant incubation des liposomes (Figure 12 a). Nous avons pour cela appliqué entre les deux électrodes une différence de potentiel constante de 100 mV et mesuré le courant en fonction du temps. Puis, nous avons retiré les électrodes (Figure 12 b) et remplacé le contenu du réservoir 4 par la suspension de liposomes de taille 80 nm et de concentration 700 µg/mL. Le niveau des réservoirs 2 et 4 est ajusté pour qu'un flux se met en place dans le microcanal 2, qui permet de remplir celui-ci avec la suspension de liposomes. La suspension de liposomes a été laissée pendant 20 min dans le dispositif. A l'issue de l'incubation, nous avons mesuré à nouveau la résistance électrique du dispositif, afin d'avoir la valeur avant de perturber le système par le rinçage. Puis, nous avons rincé le microcanal contenant la suspension de liposomes en remplaçant le contenu des réservoirs 2 et 4 successivement par du PBS,

et en réitérant 4 fois cette procédure. A chaque remplissage, le niveau du réservoir est ajusté pour que le flux alimente le microcanal avec le PBS inséré. Nous avons alors à nouveau mesuré la résistance du dispositif, dans les mêmes conditions qu'avant incubation des liposomes (Figure 12 c).

Le Tableau 2 montre les valeurs de résistance obtenues en appliquant 100 mV entre les électrodes. Nous pouvons constater une augmentation importante de la résistance à l'issue de l'incubation. Ce résultat est très intéressant car il montre que les nanopores pourraient être scellés par une bicouche suspendue. Suite à l'étape de rinçage, la résistance est encore plus grande, si bien que la résistance finale est proche de 1 GΩ. Nous pouvons conclure que l'étape de rinçage n'est pas délétère au scellement des nanopores, au contraire elle permet ici d'augmenter la résistance du dispositif.

	Avant incubation	Après incubation avant rinçage	Après rinçage
Valeur de la résistance	39 MΩ	490 MΩ	730 MΩ

Tableau 2 : Valeur de la résistance électrique du dispositif mesurée entre les deux microcanaux, avant incubation de la suspension de liposomes, après incubation, et après rinçage de la suspension par du PBS.

La Figure 13 montre la courbe i(t) avant incubation (Figure 13 a) et après incubation et rinçage (Figure 13 b). Nous pouvons constater que la courbe avant incubation ne présente pas de sauts, et que le courant augmente progressivement en fonction du temps, phénomène que l'on attribue à l'évaporation qui entraine une augmentation de la concentration ionique du PBS. Nous avons déjà observé ce phénomène lors de la caractérisation de la résistance des microcanaux, dans le chapitre 3, paragraphe 3. Sur la Figure 13 b), après incubation et rinçage, la valeur du courant pendant les premières secondes est presque nulle (avant la flèche 1). Cette partie de la courbe correspond au moment où les électrodes ne sont pas encore en contact avec l'électrolyte. En effet, afin d'éviter qu'il y ait un pulse de tension au moment de l'établissement de la différence de potentiel, nous avons appliqué la différence de potentiel au préalable entre les deux électrodes puis avons introduit les électrodes dans les réservoirs. Cette précaution a été prise parce qu'une différence de potentiel importante peut détruire les bicouches suspendues [15]. La mesure de la résistance du dispositif commence donc au niveau de la flèche 1. Le bruit important juste après la flèche 1 correspond à l'insertion des électrodes.

La valeur du courant à l'issue de l'incubation est d'environ 140 pA. En se basant sur la simulation du courant en fonction du nombre de nanopores scellés, réalisée dans le chapitre 3, cette valeur de courant correspond au cas où tous les nanopores sont scellés sauf un. Nous avons rappelé la courbe théorique sur la Figure 14 en mettant en évidence ce cas par une flèche noire. Nous pouvons par ailleurs constater sur la courbe après incubation la présence de sauts de courants, que l'on a indiqués par des flèches sur la courbe agrandie de l'encadré (Figure 13 b, encadré). L'amplitude de ces sauts de courant est de quelques pA, ce qui est environ 10 fois plus petit que la valeur attendue pour l'ouverture d'un pore supplémentaire (100 pA) ou le scellement d'un pore supplémentaire (127 pA). Nous pensons donc qu'il s'agit de défauts apparaissant ou disparaissant dans la bicouche suspendue. Nous reviendrons sur ce point dans le paragraphe suivant.

NB : notons qu'au début de l'expérience, le courant mesuré est de 2,6 nA (Figure 13 a), valeur supérieure à la valeur théorique de 575 pA (Figure 14). Cette différence pourrait être due au fait que pour cet échantillon la cellule de PDMS n'était pas bien « collée » à la puce de silicium. En effet, une

caractérisation par microscopie de fluorescence à l'issue de l'expérience (voir ci-dessous) montre un décollement partiel de la cellule fluidique.

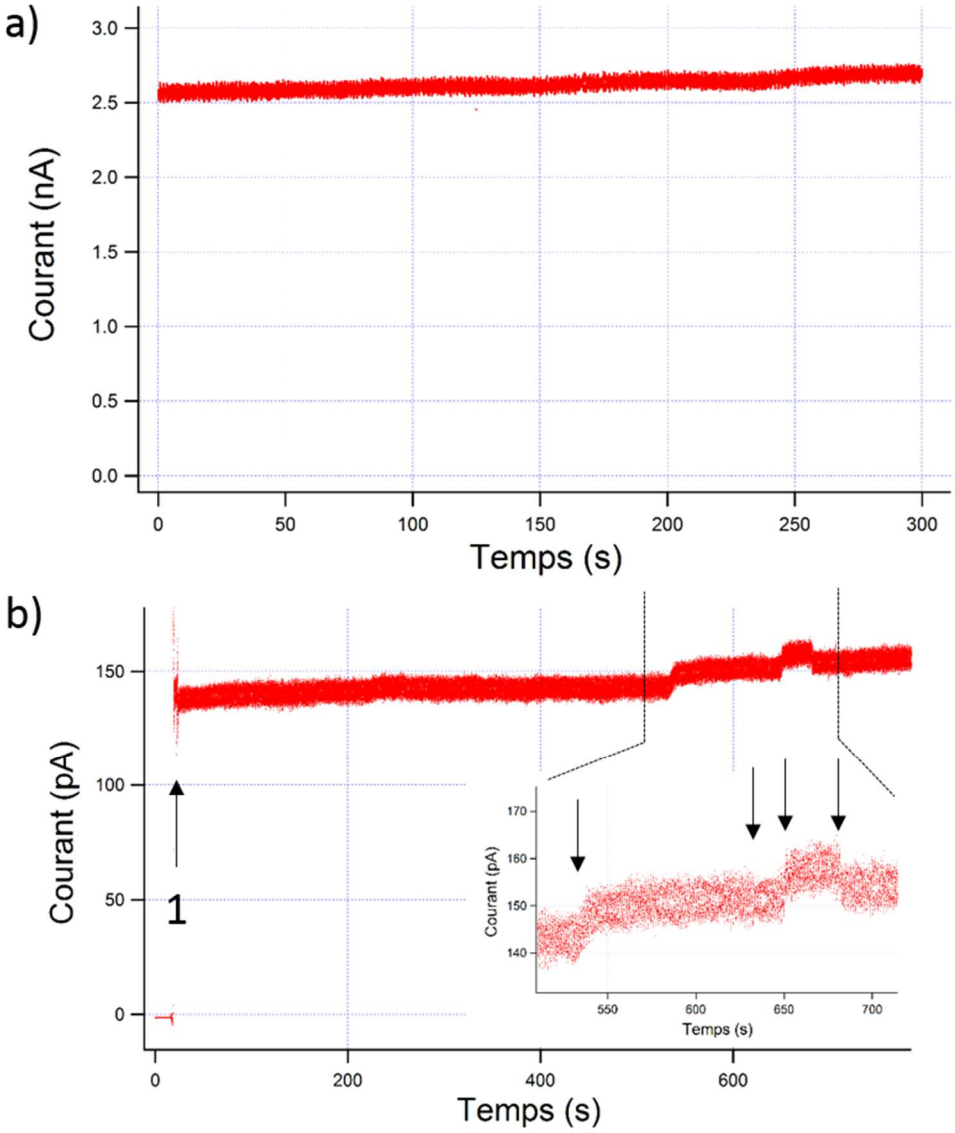


Figure 13 : mesures du courant électrique en fonction du temps pour une différence de potentiel appliquée de 100 mV entre le microcanal 1 et 2. a) avant incubation de la suspension de liposomes (temps par point 10 ms). b) après incubation de la suspension de liposomes pendant 20 min et rinçage avec du PBS (temps par point 5 ms). L'encadré correspond à un agrandissement de la partie de la courbe figurant entre les deux traits en pointillés.

Ces résultats sont donc prometteurs. Cependant, le fait de mesurer la résistance du dispositif uniquement avant et après l'incubation apporte peu d'informations : nous ne pouvons pas exclure que la résistance plus importante à l'issue de l'incubation ne soit pas due à une bulle d'air dans le nanocanal. Il arrive en effet fréquemment que la résistance du dispositif soit différente entre deux mesures : par exemple, lorsque l'on essaye de remplir le nanocanal, celui-ci peut prendre différentes valeurs de résistance avant de prendre sa valeur finale de 38 MΩ. Nous avons aussi constaté qu'après avoir appliqué une légère pression sur la cellule fluidique, la valeur de la résistance du dispositif prend plusieurs valeurs différentes. La valeur de la résistance du dispositif est donc relativement « sensible ». Une mesure de la résistance simultanément à l'incubation permettrait de caractériser les évènements

de scellement des nanopores à l'échelle du nanopore individuel. Si le nombre de saut est bien égal au nombre de nanopores, et si la valeur de ces sauts est comparable à celles calculées dans le chapitre 3, paragraphe 8, cela permettrait de montrer que l'augmentation de la résistance est bien due au scellement des nanopores.

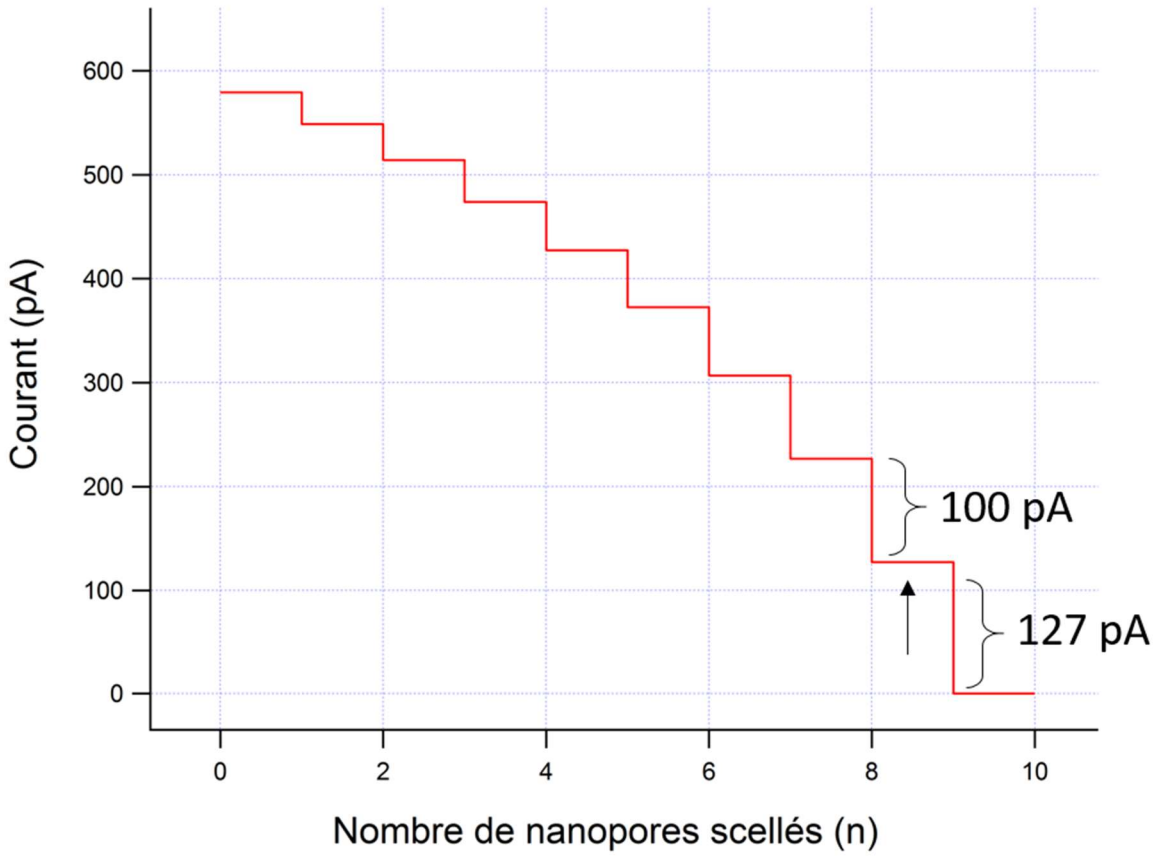


Figure 14 : courant théorique en fonction du nombre de nanopores scellés, pour un dispositif comportant n_0 = 9 nanopores de diamètre nominal 10 nm, pour une différence de potentiel appliquée de 100 mV, et en négligeant $R_{interpore}$. (La courbe est la même que celle de la figure 13, du chapitre 3, paragraphe 1.5, mais l'échelle a été agrandie). La flèche noire correspond au cas où 8 nanopores sont scellés, cas qui correspond au courant mesuré à l'issue de l'incubation et du rinçage.

Nous avons mené, à l'issue de l'expérience, une observation par microscopie de fluorescence du dispositif. La Figure 15 montre l'image obtenue. Nous pouvons constater qu'une fluorescence est présente dans le microcanal où nous avons réalisé l'incubation de la suspension de liposomes. Nous pensons que cette fluorescence est due à la bicouche formée sur la surface de SiO_2 du dispositif. Notons aussi le décollement partiel de la cellule fluidique, mentionné plus haut.

En conclusion, l'incubation d'une suspension de liposomes de taille 80 nm et à une concentration de 700 µg/mL dans un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 10 nm aboutit à une augmentation de la résistance du dispositif, jusqu'à une valeur de 730 MΩ, valeur proche de la valeur de 1 GΩ nécessaire pour pouvoir mener des enregistrements de l'activité d'un canal ionique unique.

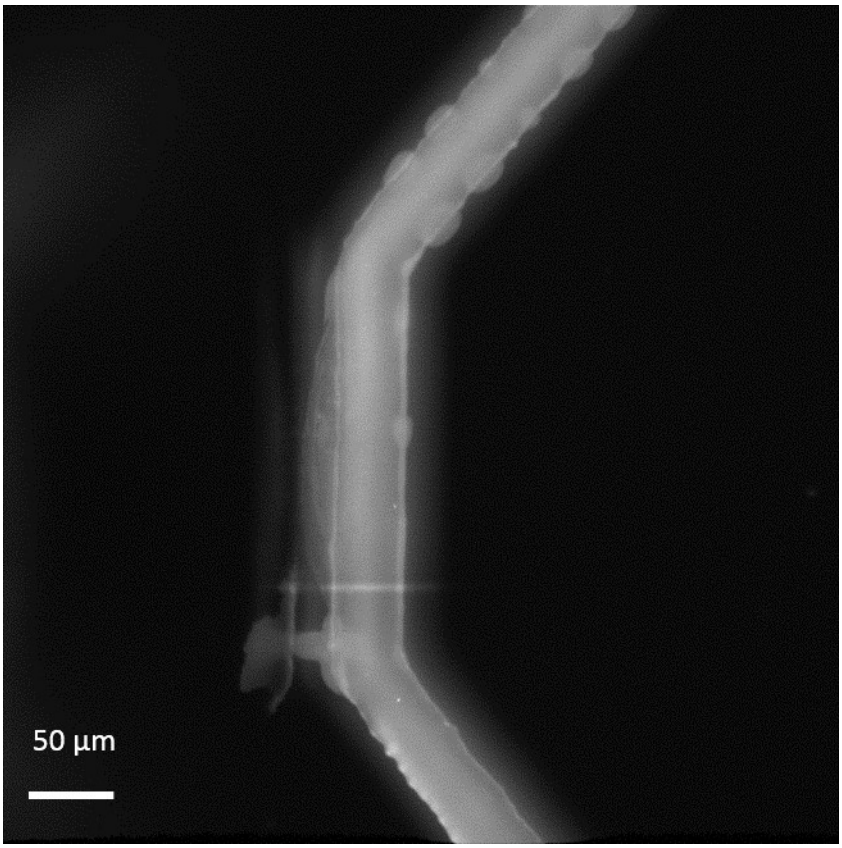


Figure 15 : image en microscopie de fluorescence montrant, à l'issue de l'expérience, le microcanal dans lequel nous avons incubé la suspension de liposomes. Objectif utilisé : 10 X.

3.4.2. Mesure de la résistance de dispositifs simultanément à l'incubation d'une suspension de liposomes

Nous avons ensuite mené des expériences d'incubation d'une suspension de liposomes de taille 200 nm à une concentration de 700 µg/mL sur des dispositifs présentant des nanopores de diamètre nominal 18 nm, 36 nm et 90 nm. Le nombre de nanopores entre un microcanal et le nanocanal enfoui est de $n_0 = 9$. Nous n'avons pas pu mener une expérience similaire pour des nanopores de diamètre nominal 10 nm à cause de l'impossibilité de remplir le nanocanal enfoui, même en utilisant le triangle d'alimentation et un traitement aux ultra-sons. Pour l'enregistrement électrique, nous avons utilisé la même configuration que la Figure 12 a). Les électrodes ont été plongées dans les réservoirs 1 et 2. Une différence de potentiel de 100 mV a été appliquée entre les deux électrodes et le courant mesuré en fonction du temps. Nous avons alors vidé le contenu du réservoir 4 et l'avons remplacé par la suspension de liposomes. Les nanopores sont donc constamment reliés électriquement aux deux électrodes. D'une manière similaire à celle décrite dans le paragraphe précédent (Figure 12 b), nous avons alors introduit un volume de la suspension de liposomes tel que le niveau du réservoir 4 soit plus haut que celui du réservoir 2 à l'issue du remplissage. Les liposomes sont donc entrainés dans le microcanal 2 jusqu'au réservoir 2 où se trouve l'électrode.

La Figure 16 montre le résultat obtenu dans le cas d'un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 36 nm. La partie bruitée au début de l'enregistrement correspond à l'instant où nous avons inséré les liposomes, et est due au contact entre la pipette et le dispositif. Nous constatons qu'il n'y a pas de saut ou de diminution du courant pouvant être reliée au scellement des nanopores. Au

contraire, nous observons une augmentation progressive du courant. Nous attribuons cette augmentation à l'évaporation qui augmente progressivement la concentration des ions dans le dispositif, de la même manière que nous l'avons observé dans le chapitre 3 lors de la mesure de la résistance des microcanaux fluidiques. Un résultat similaire a été obtenu pour un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 90 nm.

La Figure 17 a) montre le courant enregistré en fonction du temps dans le cas de nanopores de diamètre nominal 18 nm. Cette fois, nous observons des sauts de courant qui pourraient être dus au scellement des nanopores par une bicouche lipidique suspendue formée à l'issue de la fusion et rupture des liposomes. Sur la Figure 17 b) nous avons agrandi la partie de la courbe correspondant à la décroissance initiale indiquée par une flèche sur la Figure 17 a). La Figure 17 c) est un deuxième agrandissement, correspondant à la zone entre les deux flèches noires de la Figure 17 b). Un traitement avec le logiciel Igor Pro (algorithme de lissage binomial sur 100 points, voir annexe 1, paragraphe 8) permet, en diminuant la bande passante du signal, de diminuer le bruit de sorte que des sauts de courant apparaissent. Nous avons indiqué certains de ces sauts par des flèches noires, ainsi que la valeur de ces sauts.

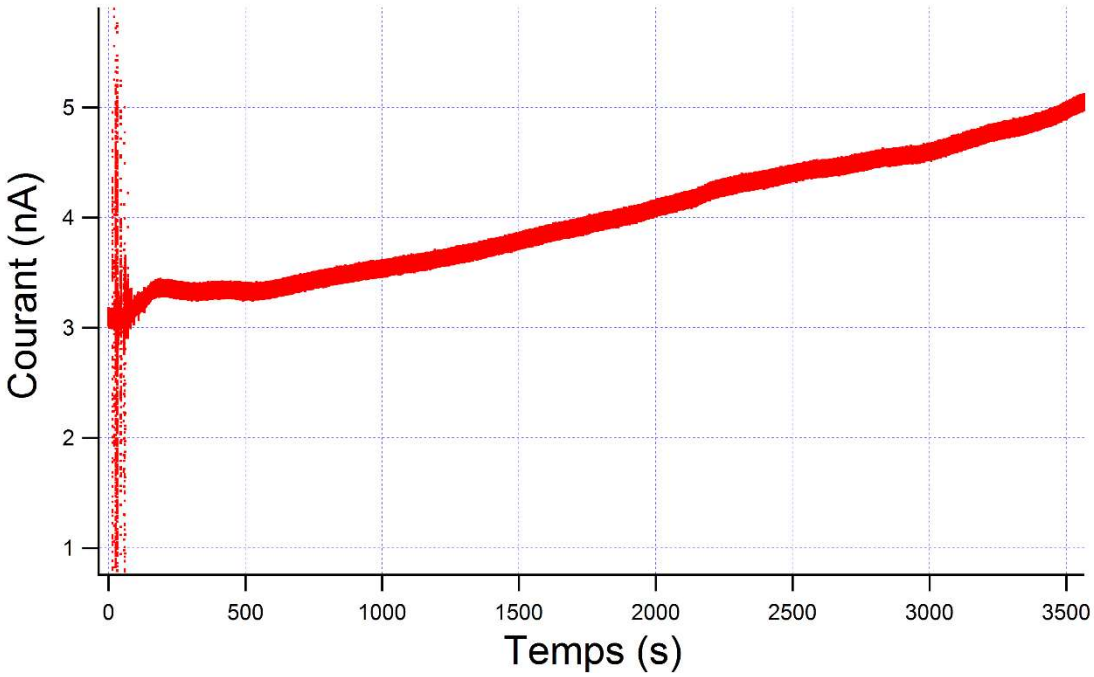


Figure 16 : enregistrement électrique du courant mesuré au sein d'un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 36 nm, lorsqu'une différence de potentiel constante de 100 mV est appliquée aux bornes des électrodes et qu'une suspension de liposomes (99% mol. POPC – 1% mol. NBD PC) de diamètre nominal 180 nm à une concentration lipidique massique de 700 µg/mL est insérée dans le microcanal 2.

Nous avons compté au total une dizaine de sauts dans les 30 premières secondes qui suivent l'insertion des liposomes, puis encore une dizaine de sauts dans les 20 minutes qui suivent (nous n'avons pas considéré comme des sauts les variations se trouvant avant la première flèche de la Figure 17 b), qui sont attribuées contact entre l'échantillon et la pipette lors de l'insertion des liposomes). Un saut de valeur positif est ensuite observé (flèche 2 sur la Figure 17 a), correspondant à une augmentation du

courant, et enfin d'autres sauts associés à des augmentations ou des diminutions du courant. La résistance de fuites associée à la valeur du courant est au maximum de 64 MΩ (juste avant la flèche 2 sur la Figure 17 a) soit bien plus faible que la valeur de 1 GΩ que l'on cherche à atteindre.

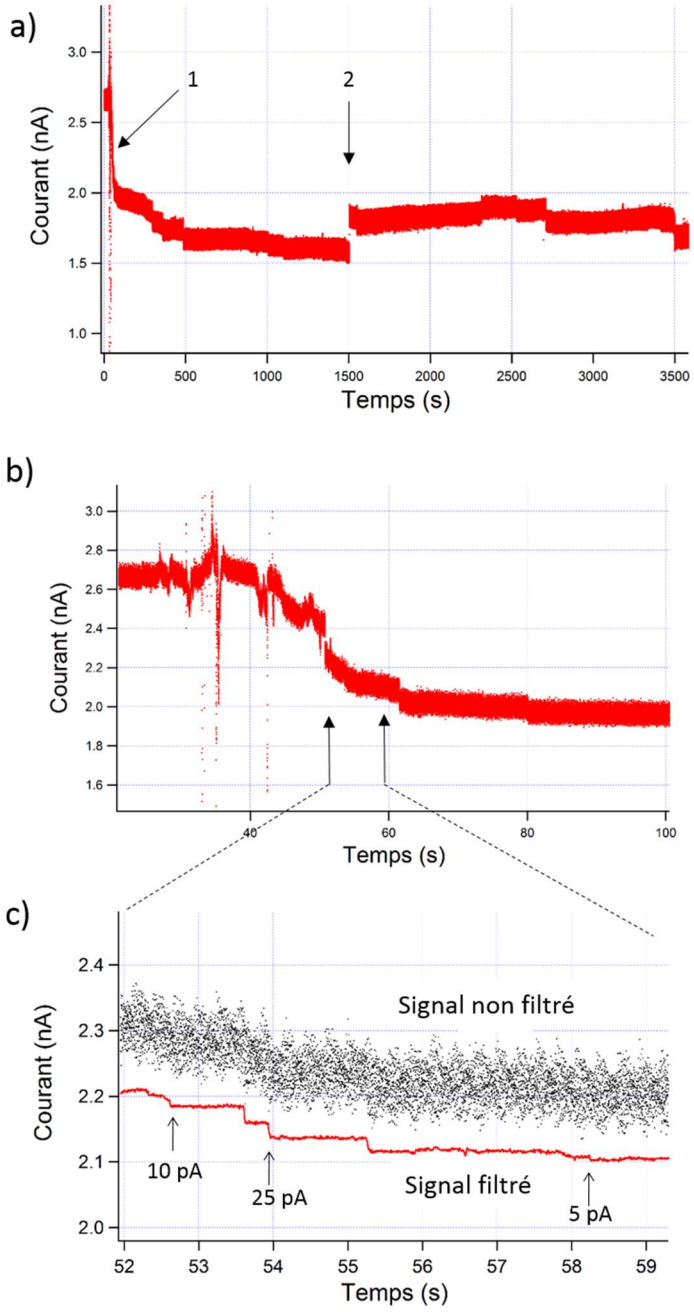


Figure 17 : a) enregistrement électrique du courant mesuré au sein d'un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 18 nm, lorsqu'une différence de potentiel constante de 100 mV est appliquée aux bornes des électrodes et qu'une suspension de liposomes (99% mol. POPC – 1% mol. NBD PC) de diamètre nominal 180 nm à une concentration lipidique massique de 700 µg/mL est insérée dans le microcanal 2. Temps par point : 1 ms. b) agrandissement de la décroissance initiale indiquée par la flèche 1 sur le a). c) agrandissement correspondant à la zone entre les deux flèches indiquées sur le b), pour le signal brut et un signal obtenu après utilisation d'un algorithme (« lissage » sur 100 points, voir annexe 1, paragraphe 8) du logiciel Igor Pro. Le signal non filtré a été décalé vers le haut de 100 pA afin de faciliter la lecture.

Considérons la première partie de la courbe de la Figure 17 a), avant la flèche 2. Le nombre de sauts correspondant observés dans cette partie est supérieur au nombre de nanopores ($n_0 = 9$). Il doit donc y avoir plusieurs sauts qui sont associés au scellement d'un même nanopore. Une manière d'avoir un tel résultat serait que certains sauts observés ne soient pas dus au scellement d'un nanopore individuel, mais à la fermeture de défauts initialement présents dans la bicouche suspendue. De tels défauts ont déjà été mentionné dans des bicouches supportées caractérisées par AFM [16], et sont attribués à un processus de fusion et rupture des liposomes inachevé. Ceci est appuyé par le fait que les sauts mesurés ont une valeur comprise entre 5 pA et 70 pA, alors qu'on s'attendrait à obtenir des sauts d'amplitude supérieure à 80 pA (voir courbe pour le diamètre nominal 18 nm, figure 13, paragraphe 1.5, chapitre 3) pour le scellement total d'un nanopore.

De tels défauts pourraient être localisés soit dans les régions suspendues de la bicouche, soit dans les régions supportées à proximité des nanopores. Dans ce dernier cas, le courant ionique passerait ensuite de ces défauts vers les nanopores par la couche d'eau de 1 nm d'épaisseur se trouvant entre la surface de SiO_2 et la partie supportée de la bicouche. Cette couche d'eau est en effet présente sous les bicouches supportées, sur des surfaces hydrophiles [17].

La présence de défauts dans la bicouche pourrait expliquer la résistance de fuite relativement faible obtenue (64 MΩ). Nous avons vu avec les expériences de FRAP que la fraction mobile de la bicouche supportée formée sur le substrat SOI présentant les nanopores est faible (72 %). Il se peut que des vésicules ne participent pas au processus de formation de la bicouche, créant ainsi des défauts dans la bicouche. Nous pourrions donc chercher à optimiser ce procédé de manière à avoir une résistance de fuites plus grande. Par ailleurs, nous avons un flux relativement fort dans le microcanal au moment de l'insertion des liposomes, flux dont on se sert pour faire passer les liposomes du réservoir 4 vers le microcanal. Bien que ce flux initial s'annule au bout de quelques minutes quand les niveaux des réservoirs 2 et 4 sont égaux, nous avons constaté qu'un flux rémanent est souvent présent dans les microcanaux du fait de la différence de vitesse d'évaporation entre les réservoirs contenant une électrode et ceux n'en contenant pas. Il est possible que ces deux flux perturbent le processus de fusion des liposomes. Nous pourrions nous en affranchir en utilisant un dispositif fluidique permettant de contrôler le flux dans les microcanaux.

La ligne d'intersection entre les bords du microcanal et la surface de SiO_2 est une zone qui pourrait favoriser la présence de défauts, si la bicouche s'interrompt au niveau de cette ligne. Or, du fait de la stratégie de fabrication « face avant » que nous avons choisie, ces bords se trouvent nécessairement à moins de 6 µm du nanopore le plus proche. Cette distance n'est peut-être pas suffisante, et peut entrainer un courant de fuite trop important entre les bords de la bicouche et les premiers nanopores. Malheureusement, ce paramètre ne peut pas être modifié car le procédé de fabrication des dispositifs nécessite que la distance entre les nanopores soit inférieure ou égale à 6 µm à cause du problème de l'effondrement du nanocanal enfoui lors de l'étape de gravure humide (voir chapitre 2, paragraphe 2.3).

Influence de la taille des nanopores

Kumar et al. [18] ont montré que lorsqu'une surface hydrophile présentant des nanopores (non débouchant) est incubée avec une suspension de LUVs ou de SUVs, si le diamètre des vésicules est plus petit que le diamètre des nanopores, la bicouche formée est supportée et suit les parois des nanopores, alors que si le diamètre moyen des liposomes est plus grand que le diamètre des

nanopores, la bicouche obtenue est suspendue au-dessus des nanopores et scelle les nanopores. Kleefen et al. [19] ont montré que même lorsque le diamètre des liposomes est plus grand que le diamètre des nanopores, il y a un pourcentage de nanopores non-scellés, et plus le diamètre des liposomes est grand par rapport au diamètre des nanopores, plus le pourcentage de nanopores non-scellés est petit. Le scellement des nanopores est donc un phénomène statistique dépendant du rapport entre le diamètre des liposomes et le diamètre des nanopores.

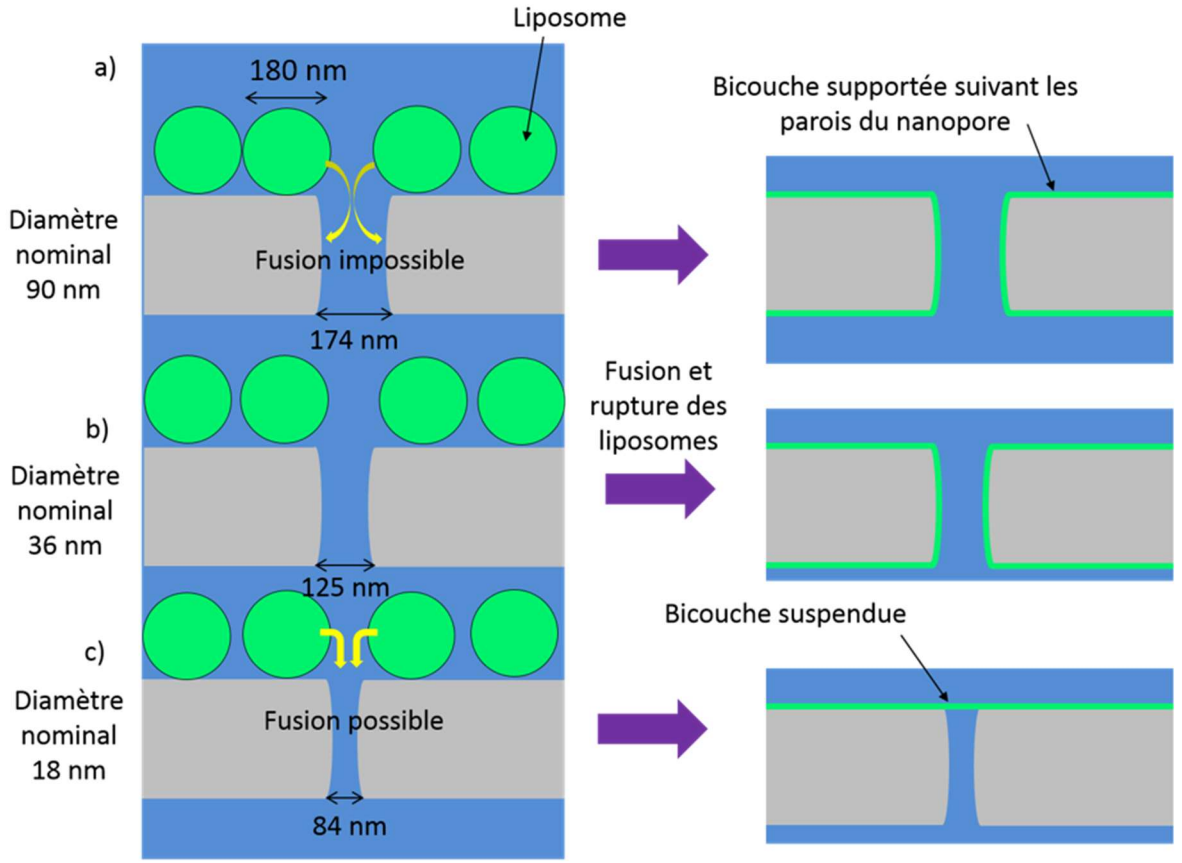


Figure 18 : schéma en coupe montrant la formation a) et b) d'une bicouche supportée suivant les parois des nanopores, si le diamètre des liposomes n'est pas significativement plus grand que le diamètre des nanopores ; c) d'une bicouche suspendue dans le cas où le diamètre des vésicules est significativement plus grand que le diamètre des nanopores.

Nous avons vu dans le chapitre 2 que les nanopores présentent un profil incurvé. Deux dimensions latérales sont ainsi mises en évidence, une dimension latérale « extérieure », correspondant à la largeur du nanopore en haut de celui-ci, et une dimension latérale « intérieure », plus petite, correspondant à la largeur à l'endroit où le nanopore est le plus étroit. En nous basant sur la caractérisation morphologique des nanopores réalisée dans le chapitre 2, nous avons représenté les nanopores et les liposomes sur la Figure 18, en respectant les échelles pour le profil des nanopores, leur diamètre, et le diamètre des liposomes. Nous avons représenté les trois cas qui semblent être obtenus avec nos conditions expérimentales. Pour les nanopores de diamètre nominal 90 nm et 36 nm (cas a et b sur la Figure 18), la fusion entre deux vésicules se trouvant de part et d'autre du nanopore serait impossible car leur distance serait trop grande à cause du diamètre relativement élevé du nanopore. Ces vésicules éclateraient donc sur les parois du nanopore. La bicouche formée à l'issue de la fusion et rupture des liposomes serait donc supportée et suivrait les parois des nanopores. Nous pouvons supposer que dans ce cas, la bicouche se répand dans le nanocanal enfoui en diffusant sur les

parois des nanopores. Nous verrons ce phénomène dans le paragraphe suivant. Au contraire, pour les nanopores de diamètre nominal 18 nm, le diamètre plus petit du nanopore permettrait que deux vésicules se trouvant de part et d'autre fusionnent entre elles au moment de la formation de la bicouche. Ainsi, la bicouche obtenue à l'issue de la fusion et rupture des liposomes serait suspendue sur les nanopores. Le diamètre critique au niveau du haut du nanopore, permettant d'obtenir une bicouche suspendue à partir de liposomes de taille moyenne 180 nm serait donc autour de 100 nm.

Par rapport aux travaux de Kumar et al. [18], où les nanopores sont non débouchant, et aux travaux de Kleefen et al. [19], où les nanopores débouchent sur des cavités micrométriques, les nanopores de notre dispositif « séparent » le compartiment 1 et le compartiment 2, qui sont tous les deux accessibles de manière indépendante. Au moment où l'on introduit les liposomes, il est donc possible qu'il y ait un flux de liquide passant par les nanopores, à cause de la différence de niveaux entre les compartiments 1 et 2. Il est possible que ce flux modifie le processus de fusion et de rupture des liposomes par rapport aux travaux de Kleefen et al. et Kumar et al., de même que le flux qui se met en place dans le microcanal lorsque l'on introduit les liposomes peut éventuellement perturber ce processus. L'étude de ces questions est au-delà de la portée de cette thèse.

En conclusion, nous avons mené des expériences d'incubation de liposomes de taille 180 nm sur des dispositifs présentant des nanopores de diamètre nominal 18 nm, 36 nm et 90 nm, en mesurant la résistance pendant l'incubation. Nous n'avons pas pu mener d'expérience similaire pour des nanopores de diamètre nominal 10 nm à cause du problème de remplissage du nanocanal enfoui. Pour des nanopores de diamètre nominal 36 nm et 90 nm, aucun saut de courant n'est observé et la valeur du courant est stable, mis à part une augmentation régulière sans saut que l'on attribue à l'évaporation qui augmente la concentration ionique de l'électrolyte. Pour les nanopores de diamètre nominal 18 nm, nous pouvons constater des sauts de courants, associés à une diminution du courant, qui montrent que le scellement des nanopores se réalise. Dans le cas des nanopores de diamètre nominal 36 nm et 90 nm, la bicouche obtenue à l'issue de la fusion et rupture des liposomes serait supportée et suivrait les parois des nanopores, alors que dans le cas des nanopores de diamètre nominal 18 nm, la bicouche obtenue serait suspendue.

Pour les nanopores de diamètre nominal 18 nm, la valeur des sauts de courant observés est environ 10 fois plus petite que les valeurs attendues pour le scellement complet d'un nanopore. Ces petites valeurs semblent indiquer que les sauts ne sont pas dus au scellement total de nanopores, mais à la fermeture de petits défauts initialement présents dans la bicouche suspendue. Ces défauts pourraient expliquer la résistance de fuite obtenue (64 MΩ) qui reste faible par rapport à l'objectif d'avoir une résistance de fuite supérieure à 1 GΩ. Nous pensons donc que le procédé de formation de la bicouche suspendue reste à optimiser. En particulier, nous avons présenté dans le paragraphe précédent des résultats plus prometteurs en termes de résistance de fuite, puisqu'une résistance de fuite de 730 MΩ était obtenue à l'issue de l'incubation. S'il s'avère que ce résultat est effectivement dû au scellement des nanopores par la bicouche suspendue, cela montre qu'une marge de progression est possible pour le protocole de formation de la bicouche suspendue.

3.4.3. Mise en évidence d'une bicouche supportée suivant les parois de nanopores de diamètre nominal 107 nm

Nous avons indirectement pu mettre en évidence, pour le cas de nanopores de diamètre nominal 107 nm, le fait que la structure formée à l'issue de l'incubation soit supportée et suive les parois des nanopores au lieu de les sceller. Cette expérience a été réalisée avec des conditions que nous utilisions auparavant dans la thèse : le dispositif utilisé présente des nanopores de diamètre nominal 107 nm, et une distance entre les nanopores de 1 µm, ce qui correspond à un nombre de nanopores entre chaque microcanal et le nanocanal enfoui de $n_0 = 58$. Une différence de potentiel de 5 mV a été appliquée entre les électrodes des compartiments 1 et 2, et le courant enregistré. Une suspension de liposomes de taille 180 nm à une concentration de 200 µg/mL a été introduite dans un des microcanaux.

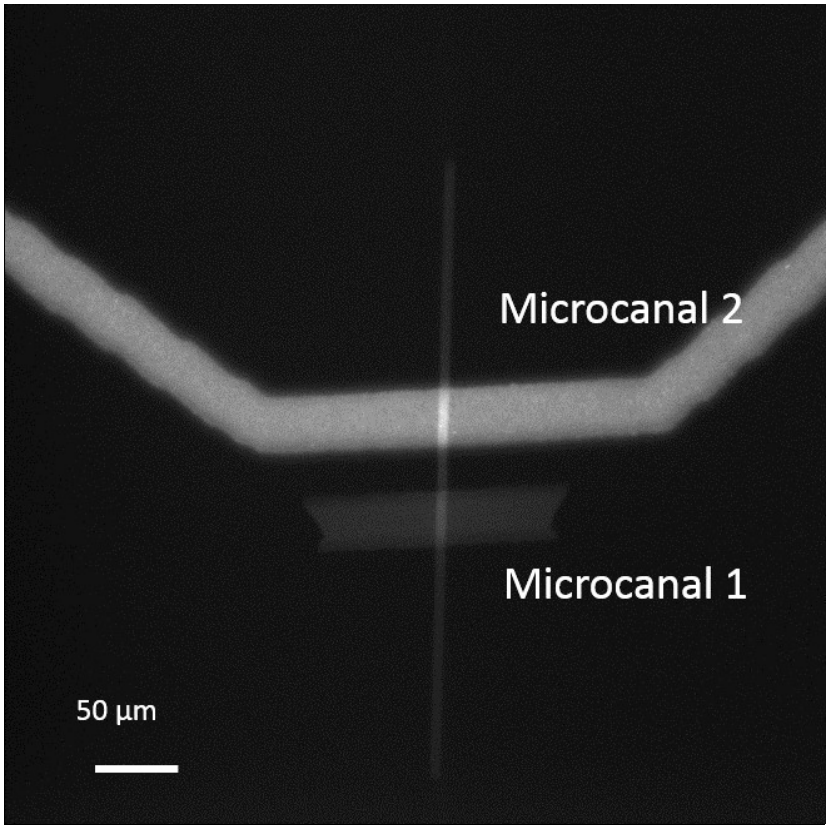


Figure 19 : image en microscopie par fluorescence avec un objectif X 10 obtenue 2 h après l'incubation d'une suspension de liposomes de diamètre nominal 180 nm à une concentration de 200 µg/mL, sous une différence de potentiel appliquée entre les deux microcanaux de 5 mV pendant les 2 h.

Nous avons mené une observation par fluorescence du dispositif, et avons observé qu'après incubation de la suspension dans le microcanal 2, la fluorescence envahit peu à peu le nanocanal enfoui, puis le microcanal 1 : la Figure 19 montre une image obtenue 2 h après l'incubation des liposomes. Nous pouvons constater que le nanocanal enfoui ainsi que le microcanal 1 présentent un signal de fluorescence. Il semble improbable que cette fluorescence soit due à des vésicules en suspension passant dans le nanocanal enfoui puis le microcanal 1 par les nanopores : le diamètre moyen des vésicules est de 180 nm, et le diamètre des nanopores à l'endroit où ils sont le plus étroit est de 130 nm. Nous pensons donc qu'il s'agit d'une bicouche supportée, formée dans le microcanal 2, qui diffuse sur les surfaces de SiO_2 (voir Figure 18 a et b, p. 181), et qui traverse les nanopores en suivant leur paroi. Cette bicouche pénétrerait le microcanal 1 par les nanopores communiquant avec le

microcanal 1. Une bicouche se propageant sur une surface de SiO_2 a déjà été rapportée dans différents articles [20], [21], [22].

Conclusion

En conclusion, nous avons mené une série d'expériences de formation de bicouches supportées et suspendues sur la surface de nos dispositifs. Ces expériences ont été réalisées à partir de suspensions de liposomes de POPC / NBD PC (99%/1%, mol/mol) de diamètre nominal 80 nm ou de 180 nm. Nous avons mené des expériences de FRAP sur la surface de deux substrats SOI sans cellule fluidique, les cellules fluidiques étant inadaptées au banc de mesure de FRAP que nous utilisons. Le premier substrat SOI a simplement été oxydé avec un oxyde thermique d'épaisseur 100 nm. Nous avons effectué sur le deuxième substrat la totalité du procédé de fabrication des nanopores et du nanocanal enfoui. Il présente des nanopores de diamètre nominal 10 nm, le nanocanal enfoui, et un oxyde thermique d'épaisseur 100 nm. Pour les deux substrats, nous avons obtenu le recouvrement de fluorescence attendu pour le cas d'une bicouche supportée. Nous avons mesuré un coefficient de diffusion du NBD-PC dans la bicouche de 4 ± 2 $\mu m^2/s$ pour le substrat sans les nanopores, et de 2 ± 1 $\mu m^2/s$ pour le substrat avec nanopores. Nous avons mesuré une fraction mobile de 0,82 ± 0,15 pour le substrat sans les nanopores, et 72 ± 12 % pour le substrat avec les nanopores. Les deux valeurs du coefficient de diffusion sont en accord avec les valeurs mentionnées par de précédentes études. Concernant la fraction mobile, la valeur obtenue pour le substrat avec les nanopores est plus faible que les valeurs mentionnées dans la littérature.

Nous avons ensuite mené une expérience de formation de bicouche lipidique suspendue au sein d'un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 10 nm. Nous avons utilisé une suspension de liposomes de taille 80 nm à une concentration de 700 µg/mL. La résistance du dispositif a été mesurée avant et après incubation. La résistance était de 39 MΩ avant incubation, et de 730 MΩ après incubation. Nous pensons que l'augmentation de la résistance est due au scellement des nanopores par une bicouche suspendue. La résistance de fuite de 730 MΩ est prometteuse du point de vue de l'objectif que l'on cherche à atteindre qui est d'avoir une résistance de fuite supérieure à 1 GΩ afin de pouvoir mener des enregistrements de l'activité d'un canal ionique unique au sein de nos dispositifs.

Nous avons ensuite mené des expériences de formation de bicouche lipidique suspendue au sein de dispositifs en mesurant la résistance des nanopores *in situ* pendant l'incubation des liposomes. Nous avons réalisé ces mesures sur des dispositifs présentant des nanopores de diamètre nominal 18 nm, 36 nm et 90 nm, avec des suspensions de liposomes de taille 180 nm et de concentration 700 µg/mL. Pour le cas des nanopores de diamètre nominal 18 nm, nous avons observé une série de sauts de courant, alors que de tels sauts n'ont pas été observé pour le cas des nanopores de diamètre nominal 36 nm et 90 nm. Nous pensons que pour les nanopores de diamètre nominal 36 nm et 90 nm, la bicouche formée est supportée et suit les parois des nanopores, alors que pour les nanopores de diamètre nominal 18 nm, la bicouche formée est suspendue et scelle les nanopores. Le diamètre critique permettant l'obtention d'une bicouche suspendue à partir de liposomes de taille moyenne 180 nm serait donc autour de 100 nm.

Dans le cas des nanopores de diamètre nominal 18 nm, le nombre de sauts observé, plus grand que le nombre de nanopores, montre que ces évènements ne sont pas associés au scellement total de nanopores, mais plutôt à la disparition de défauts initialement présents dans la bicouche. Ces défauts

pourraient être dus à un processus de fusion et rupture des liposomes inachevé et pourraient expliquer la faible résistance de fuite mesurée à l'issue de l'incubation. Nous pensons que le protocole d'incubation peut encore être optimisé : le fait que l'on ait obtenu une résistance de fuite de 730 MΩ pour l'expérience sans mesure de la résistance pendant l'incubation montre qu'une marge de progression est possible.

Nous avons aussi observé que les sauts de courant obtenus lors de l'incubation de la suspension de liposomes ne présentent pas de régime transitoire, contrairement au cas de la capture des nanoparticules, présenté dans le chapitre 4. Il semblerait donc que ce régime transitoire est propre au phénomène de capture des nanoparticules.

Nous avons ensuite indirectement confirmé le fait que la bicouche est supportée et suit les nanopores lorsque le diamètre nominal des nanopores est élevé : nous avons réalisé une expérience d'incubation de liposomes de taille 180 nm à une concentration de 200 µg/mL au sein d'un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 107 nm. Nous avons observé par microscopie de fluorescence à l'issue de l'incubation que de la fluorescence envahit le nanocanal et le microcanal ne contenant pas initialement de liposomes. Nous pensons que cette fluorescence est due au fait que la bicouche supportée, formée dans le microcanal où sont présent les liposomes, diffuse dans le nanocanal enfoui en suivant les parois des nanopores, puis ressort dans le deuxième microcanal par les nanopores communiquant avec ce microcanal.

4. Bilan, difficultés expérimentales, perspectives

Les dispositifs développés au cours de cette thèse ont été utilisés pour deux applications différentes : des expériences de capture de nanoparticules, et des expériences de formation d'une bicouche suspendue à partir de SUV ou de LUV.

Concernant la capture des nanoparticules, nous avons montré que des nanoparticules, amenées jusqu'aux nanopores par un flux imposé, sont capturées par les nanopores de manière réversible lorsqu'un champ électrique est appliqué. Ce type d'expérience a déjà été réalisé par d'autres équipes et représente un intérêt sur le plan scientifique pour l'étude des phénomènes électroosmotiques à l'entrée d'un nanopore [3], [4]. Pour cette application, notre dispositif présente un intérêt majeur dans la mesure où il permet une double caractérisation optique et électrique simultanée. En utilisant des dispositifs avec 9 nanopores, il serait ainsi possible d'atteindre la résolution du nanopore individuel dans la caractérisation optique, et de faire correspondre chaque évènement de scellement à un saut électrique. Des premières expériences réalisées au sein de dispositifs comprenant n_0 = 9 nanopores (non mentionnées ici) ont montré que plusieurs (2, 3, 4) nanoparticules sont capturées par nanopore, et se trouvent alors suffisamment proches pour ne plus être discernables. Il serait intéressant d'étudier si la mesure du courant électrique en fonction du temps permet d'obtenir des informations sur la dynamique d'interaction de ces N objets avec le nanopore.

Comme nous le décrivons dans l'article, le scellement des nanoparticules pourraient aussi présenter un intérêt pour le séquençage de l'ADN avec des nanopores. Les brins d'ADN étant chargés négativement, ils peuvent en effet être transportés au travers d'un nanopore en appliquant un champ

électrique [23]. Nous pourrions mener de telles expériences au sein de nos dispositifs, en présence de nanoparticules capturées, afin d'étudier si la présence de particules permet d'améliorer la sensibilité de la détection par rapport à un nanopore exempt de particules.

Notons cependant que ces expériences seraient limitées par le fait que dans l'état actuel, notre procédé de fabrication ne permet pas d'avoir moins de 9 nanopores en parallèle. Ainsi, le courant mesuré est nécessairement une moyenne portant sur le courant traversant 9 nanopores. La sensibilité du nanopore unique serait cependant intéressante pour les expériences sur la dynamique d'interaction entre des particules, le nanopore et les brins d'ADN. Il faudrait pour cela trouver une solution technologique à l'effondrement du nanocanal enfoui pour pouvoir augmenter la durée de la gravure humide et écarter davantage les nanopores, ou alors réduire la largeur des microcanaux au niveau de l'intersection avec la ligne de nanopores. Une deuxième limitation de notre dispositif dans l'état actuel pour cette application est la présence de la résistance $R_{interpore}$ associée à la portion de nanocanal enfoui se trouvant entre deux nanopores, qui complexifie la modélisation du dispositif.

Concernant les expériences de formation d'une bicouche suspendue nous avons pu observer une augmentation de la résistance totale du dispositif après incubation d'une suspension de SUV au sein d'un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 10 nm. Nous avons pu aussi observer des sauts de courant associé à une augmentation de la résistance lors de l'incubation de LUV au sein d'un dispositif présentant des nanopores de diamètre nominal 18 nm. Au contraire, pour les dispositifs de diamètre nominal supérieur, nous n'avons pas obtenu d'augmentation de la résistance totale. Ces résultats sont prometteurs car ils semblent indiquer que l'incubation de SUV ou de LUV au sein de nos dispositifs aboutit bien à la formation d'une bicouche suspendue.

Cependant, le mode d'intégration du dispositif entraîne un certain nombre de limitations :

i) Le bon remplissage des nanopores et du nanocanal enfoui est relativement aléatoire et n'est pas toujours obtenu même en utilisant les triangles d'alimentation et en appliquant un traitement aux ultra-sons. L'utilisation d'un nanocanal enfoui plus haut pourrait peut-être permettre de s'affranchir de ce problème. Pour cela, des substrats SOI avec un oxyde enfoui de plusieurs micromètres d'épaisseur seraient avantageux. Notons que cette nouvelle configuration permettrait aussi, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, de diminuer le niveau de bruit.

ii) Le scellement de la cellule fluidique sur le substrat de silicium impose des contraintes sur la préparation de la surface de la puce de silicium : une mise à l'étuve est nécessaire entre le traitement par plasma de la puce de silicium et le remplissage du dispositif. Par ailleurs, si l'on souhaite étudier l'effet d'une fonctionnalisation de surface sur la formation de la bicouche suspendue, cette fonctionnalisation devra être compatible avec le protocole d'assemblage. Si la fonctionnalisation est réalisée par voie liquide après assemblage, il est fort probable que le problème de remplissage des nanopores et du nanocanal se pose aussi pour cette étape.

iii) La configuration « face-avant » utilisée est une source importante d'artefacts pour la mesure du courant : sur certains échantillons, la valeur du courant mesurée varie de manière imprédictible lors du remplissage. Est-ce dû au fait que le nanocanal est partiellement rempli et que ce remplissage évolue ? Est-ce la relaxation de la pression exercée sur le nanocanal lors de l'assemblage de la cellule fluidique sur la puce de silicium ? Cette pression, nécessaire pour que le « collage » s'opère, est-elle suffisante pour déformer le nanocanal enfoui jusqu'à son effondrement ? Ces questions sont importantes car elles peuvent entrainer une mauvaise interprétation des sauts de courant mesurés.

iv) Une autre source de mauvaise interprétation de sauts de courants est le volume relativement petit des réservoirs, et l'évaporation qui a lieu au cours de l'expérience : lorsque les réservoirs se vident, des sauts peuvent être observés au moment où les électrodes ne sont plus immergées, avec une valeur de courant qui tend vers zéro, soit le résultat que l'on cherche à obtenir lors de la formation d'une bicouche suspendue. Or, le re-remplissage du dispositif au cours de l'expérience n'est pas pratique car il perturbe la mesure, et il y a un risque d'introduire une bulle d'air dans un réservoir, chose qui ne peut pas être détecté lorsque le dispositif se trouve dans la cage de Faraday. Augmenter le volume des chambres n'est pas une solution viable dans la mesure où elle implique une surface de contact entre l'électrolyte et la puce de silicium plus importante, et donc un couplage capacitif plus important.

v) La présence constante d'un flux dans les microcanaux pourrait être nuisible au processus de fusion et rupture des liposomes. Ce flux est dû à la vitesse d'évaporation différente au niveau de chaque réservoir, phénomène qui est amplifié lorsque des électrodes se trouvent présentes dans les réservoirs 1 et 2. Ce problème pourrait être résolu en utilisant un montage fluidique permettant d'alimenter les microcanaux avec la suspension de SUV/LUV tout en annulant le flux lors de l'incubation, ou en intégrant les électrodes dans le dispositif.

vi) Enfin, l'épaisseur millimétrique de la cellule de PDMS limite la résolution atteignable dans la caractérisation par microscopie de fluorescence, et empêche une caractérisation par FRAP au sein de ces dispositifs. Dans cette configuration, il n'est pas possible de mener des observations de la structure de la bicouche, telles que celles qui ont été réalisées pour préparer les expériences de FRAP.

Parmi les perspectives pour la suite, il serait intéressant de mener une expérience d'incubation de liposomes de 180 nm sur des nanopores de diamètre nominal 10 nm, avec caractérisation électrique *in situ* pendant l'incubation, afin de voir si le courant de fuite mesuré est inférieur au cas des nanopores de diamètre nominal 18 nm. Il serait aussi intéressant de reproduire les expériences de FRAP sur d'autres substrats, afin de vérifier que les résultats que l'on a obtenus sur un échantillon sont significatifs. S'il s'avère que la fraction mobile mesurée est constamment plus basse que celle rapportée dans la littérature, il serait utile d'optimiser le procédé de formation de la bicouche lipidique à partir des liposomes, en menant ces expériences de FRAP pour plusieurs paramètres expérimentaux tels que la taille des liposomes, la concentration des suspensions, les temps d'incubation, etc. Nous avons en effet utilisé des valeurs issues de l'expérience de notre équipe et de la littérature, mais il est possible que nos surfaces spécifiques nécessitent d'autres paramètres. Il serait intéressant aussi d'imager les nanopores à l'issue des expériences de FRAP avec un objectif à fort grossissement, afin de voir si un effet d'accumulation de fluorescence peut être mis en évidence sur les parois des nanopores, dans le cas des nanopores les plus grands. Ceci serait un élément supplémentaire appuyant l'hypothèse de la bicouche qui suit les parois des nanopores dans le cas des nanopores les plus grands [24].

5. Références

1 Marchand, R. *et al.* (2015) Controlled sealing of nanopores using an easily fabricated silicon platform combining in situ optical and electrical monitoring. *Microelectron. Eng.* 144, 57–60

2 Zhou, K. *et al.* (2008) Surface-Charge Induced Ion Depletion and Sample Stacking near Single Nanopores in Microfluidic Devices. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 8614–8616
3 Tsutsui, M. *et al.* (2013) Trapping and identifying single-nanoparticles using a low-aspect-ratio nanopore. *Appl. Phys. Lett.* 103, 13108-13108–5
4 Kovarik, M.L. and Jacobson, S.C. (2008) Integrated Nanopore/Microchannel Devices for ac Electrokinetic Trapping of Particles. *Anal. Chem.* 80, 657–664
5 Brian, A.A. and McConnell, H.M. (1984) Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 6159–6163
6 Tscharnuter, W. (2000) Photon correlation spectroscopy in particle sizing. *Encycl. Anal. Chem.* at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470027318.a1512/full>
7 Soumpasis, D.M. (1983) Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* 41, 95–97
8 Tamm, L.K. and McConnell, H.M. (1985) Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 47, 105–113
9 Cho, N.-J. *et al.* (2013) Comparison of Extruded and Sonicated Vesicles for Planar Bilayer Self-Assembly. *Materials* 6, 3294–3308
10 Reimhult, E. *et al.* (2002) Vesicle adsorption on SiO2 and TiO2: Dependence on vesicle size. *J. Chem. Phys.* 117, 7401–7404
11 Cho, N.-J. *et al.* (2010) Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates. *Nat. Protoc.* 5, 1096–1106
12 Cha, T. *et al.* (2006) Formation of Supported Phospholipid Bilayers on Molecular Surfaces: Role of Surface Charge Density and Electrostatic Interaction. *Biophys. J.* 90, 1270–1274
13 Nollert, P. *et al.* (1995) Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers on solid surfaces. *Biophys. J.* 69, 1447
14 Kyoung, M. and Sheets, E.D. (2008) Vesicle Diffusion Close to a Membrane: Intermembrane Interactions Measured with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys. J.* 95, 5789–5797
15 Peterman, M.C. *et al.* (2002) Ion channels and lipid bilayer membranes under high potentials using microfabricated apertures. *Biomed. Microdevices* 4, 231–236
16 Reviakine, I. and Brisson, A. (2000) Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 16, 1806–1815
17 White, R.J. *et al.* (2006) Ionic conductivity of the aqueous layer separating a lipid bilayer membrane and a glass support. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 22, 10777–10783
18 Kumar, K. *et al.* (2011) Formation of nanopore-spanning lipid bilayers through liposome fusion. *Langmuir* 27, 10920–10928
19 Kleefen, A. *et al.* (2010) Multiplexed parallel single transport recordings on nanopore arrays. *Nano Lett.* 10, 5080–5087
20 Cremer, P.S. and Boxer, S.G. (1999) Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports. *J. Phys. Chem. B* 103, 2554–2559
21 Jönsson, P. *et al.* (2010) Sealing of Submicrometer Wells by a Shear-Driven Lipid Bilayer. *Nano Lett.* 10, 1900–1906
22 Furukawa, K. *et al.* (2006) Supported Lipid Bilayer Self-Spreading on a Nanostructured Silicon Surface. *Langmuir* 23, 367–371
23 Wanunu, M. (2012) Nanopores: A journey towards DNA sequencing. *Phys. Life Rev.* 9, 125–158
24 Buchholz, K. *et al.* (2008) Silicon-on-insulator based nanopore cavity arrays for lipid membrane investigation. *Nanotechnology* 19, 445305

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons conçu, fabriqué et caractérisé un dispositif comprenant des nanopores, destiné à l'enregistrement électrique de l'activité de canaux ioniques membranaires. La mesure électrique de l'activité de canaux ioniques au sein d'une bicouche lipidique reconstituée *in vitro* permettrait de mener une caractérisation automatisée, à haut débit, pour des applications telles que le criblage de molécules pharmaceutiques.

L'utilisation de nanopores est une approche originale pour obtenir une bicouche suspendue accessible électriquement par les deux côtés de la bicouche par simple incubation, dans le dispositif, d'une suspension de liposomes de diamètre supérieur au diamètre des nanopores, soit autour de 200 nm. Les canaux ioniques pourraient ainsi être directement insérés dans la bicouche au moment de sa formation en utilisant des protéoliposomes. Par ailleurs, la dimension nanométrique des nanopores permettrait que la bicouche ait une stabilité mécanique plus grande que dans le cas de pores micrométriques autorisant ainsi des enregistrements sur des durées plus longues. Enfin, la bicouche formée par ce procédé serait exempte de résidus de solvant, contrairement aux bicouches obtenues par des techniques alternatives sans liposomes, largement utilisées dans la communauté.

Dans le premier chapitre, nous avons vu les différentes approches développées dans la littérature, permettant d'enregistrer l'activité de canaux ioniques en se focalisant sur celles permettant le suivi temporel d'un canal unique. Nous avons ainsi vu que de nombreux systèmes ont été développés pour former une bicouche biomimétique suspendue au sein de pores micrométriques. Cependant, trois difficultés majeures sont couramment discutées : premièrement, la bicouche suspendue est formée à l'aide d'un solvant organique, ce qui pose un problème de compatibilité entre les canaux ioniques biologiques à caractériser et le solvant utilisé. Deuxièmement, l'insertion des canaux ioniques est réalisée dans une étape ultérieure à la formation de la bicouche. Cette étape additionnelle peut être critique et doit être optimisée à chaque nouvelle expérience. Troisièmement, il existe un compromis à trouver entre l'insertion des canaux ioniques qui est plus efficace lorsque le diamètre de la bicouche est de l'ordre de quelques micromètres et la stabilité mécanique de la bicouche qui est accrue lorsque son diamètre est inférieur à 1 µm. Des études utilisant une approche similaire à la nôtre ont démontré la formation de bicouches sur des nanopores par auto-assemblage à partir de liposomes. Ces études n'ont pas encore permis de mener d'enregistrement électrique de l'activité de canaux ioniques avec la résolution du canal unique, mais montrent que la formation d'une bicouche suspendue par cette méthode est possible.

Dans le deuxième chapitre, nous avons décrit la fabrication et la caractérisation morphologique de nos dispositifs réalisés en technologie Silicium (SOI : Silicon On Insulator). Le dispositif au centre de notre étude est constitué d'un substrat SOI au sein duquel les nanopores sont percés et d'une interface fluidique en Poly(DiMéthylSiloxane) (PDMS). La cellule fluidique est assemblée sur le substrat SOI à la fin du procédé de fabrication et permet l'assemblage en solution des liposomes ainsi que la mesure

électrique en milieu liquide. La technologie que j'ai mise au point dans ce travail de thèse se différencie de l'existant déjà publié, par l'utilisation de la seule face avant du dispositif. Ce choix, décidé *a priori* au démarrage de ma thèse, permet la réalisation d'un dispositif intégré, facile d'utilisation et bien adapté à une application future de criblage automatisé sur puce. Dans la couche superficielle de silicium du substrat SOI, les nanopores sont fabriqués ainsi qu'un nanocanal enfoui qui permet de rendre les deux côtés des nanopores accessibles 'fluidiquement' et électriquement depuis la face avant de l'échantillon. L'interface fluidique est constituée de deux microanaux permettant l'alimentation des différents compartiments du dispositif. Ainsi, à l'issue de l'assemblage et du remplissage du dispositif nous obtenons une structure dans laquelle les ions, pour aller d'une électrode à l'autre, doivent passer par un premier microcanal, puis par un premier réseau d'une dizaine de nanopores en parallèle, puis par le nanocanal enfoui, puis par un deuxième réseau d'une dizaine de nanopores, qui seront scellés par la bicouche suspendue comportant les canaux ioniques, puis, enfin, par un deuxième microcanal avant de rejoindre la deuxième électrode. Cette approche face avant, associée au mode d'assemblage manuel de la cellule fluidique, impose des contraintes sur la configuration de notre dispositif.

Dans le troisième chapitre, nous avons décrit la caractérisation électrique en milieu liquide des dispositifs, afin d'en déduire un schéma électrique équivalent. Cette caractérisation conduit à une prévision de la valeur des sauts de courants que l'on devrait mesurer lors du scellement de chaque nanopore. Nous avons ainsi pu modéliser et confirmer expérimentalement la valeur de la résistance des microcanaux, du nanocanal enfoui, et des nanopores, ainsi que la valeur de la capacité de couplage entre les deux microcanaux par le substrat SOI. Nous avons pu constater que la résistance des microcanaux de la cellule fluidique est négligeable devant la résistance des nanopores et celle du nanocanal enfoui. Nous avons par ailleurs mesuré la résistance de fuite entre les deux microcanaux et avons trouvé des valeurs typiques de 10 GΩ, ce qui est une valeur compatible avec la caractérisation de l'activité des canaux ioniques. Nous avons aussi montré que le substrat SOI introduit un couplage capacitif relativement important (de l'ordre de 1 nF) entre les deux compartiments, ce qui est problématique pour réaliser des enregistrements avec un faible niveau de bruit. Ce couplage pourrait être diminué d'un facteur 10 à 100 en augmentant l'épaisseur de l'oxyde enfoui et en oxydant totalement la couche de silicium supérieure. La valeur attendue des sauts de courant lors de l'obstruction de chaque nanopore, dépend du nombre total de nanopores en parallèle ainsi que de la position du nanopore scellé, mais atteint des valeurs de l'ordre de 100 pA (pour une polarisation de 100mV) pour une dizaine de nanopores. Ainsi nous pensons que ces événements peuvent être détectés à l'échelle du nanopore individuel.

Dans la première partie du quatrième chapitre, nous démontrons expérimentalement la possibilité de capturer des nanoparticules individuelles en solution sur chaque nanopore du dispositif en appliquant un champ électrique aux bornes des nanopores. Notre dispositif permet la visualisation directe en temps réel par microscopie de fluorescence de la capture des particules fluorescentes sur les nanopores. Le dispositif permet également le suivi électrique de ces événements au cours du temps avec une bonne corrélation. Nous montrons ainsi que des sauts de courant sont détectés lorsque la mesure du courant électrique est réalisée pendant l'expérience. La valeur des sauts de courant obtenus expérimentalement est du même ordre que les valeurs calculées avec notre modèle. Aucun saut de la valeur maximale prédite par notre modèle n'a cependant été observé, ce qui semble indiquer un scellement partiel des nanopores.

Dans la deuxième partie du chapitre 4, nous avons présenté des résultats préliminaires de formation d'une bicouche suspendue au-dessus des nanopores à partir de liposomes de POPC[1] / NBD-PC[2] (99% / 1 % mol.) dont nous avons fait varier le diamètre (84 nm ou 180 nm). De nombreuses expériences de FRAP menées sur la surface d'un dispositif ne comportant pas de cellule fluidique ont montré que l'on obtient bien une bicouche supportée sur la surface de SiO_2 entourant les nanopores. Cependant, la fraction mobile de cette bicouche présente une valeur (72 %) inférieure aux valeurs usuelles (> 80 %). Ce résultat semble indiquer que le processus de rupture et de fusion des liposomes n'est pas optimal. Des expériences de formations d'une bicouche suspendue sur les nanopores ont ensuite été réalisées avec une mesure simultanée de la résistance électrique du dispositif en milieu liquide. Nous avons obtenu pour des nanopores de diamètre nominal 18 nm des sauts de courant que l'on interprète comme le scellement des nanopores par une bicouche suspendue. Dans le cas des nanopores de diamètre nominal 36 nm et 90 nm, aucun saut de courant n'a été détecté. Enfin, une caractérisation par fluorescence menée sur des dispositifs comportant des nanopores de diamètre nominal 107 nm montre que la bicouche se propage dans le nanocanal enfoui et ressort par les nanopores « libres » de l'autre microcanal. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que lorsque les nanopores ont un diamètre supérieur à une valeur critique, la bicouche constituée n'est pas suspendue mais épouse les parois des nanopores. Le diamètre critique des nanopores se situe dans nos conditions autour de 100 nm pour des liposomes de 180 nm de diamètre moyen. Dans les expériences montrant la formation d'une bicouche suspendue, la résistance de fuite obtenue après scellement des nanopores est de 0,5 GΩ. Cette valeur est 20 fois inférieure au courant de fuite mesuré entre les microcanaux en l'absence de nanopores et montre que la qualité de la bicouche suspendue peut et doit être améliorée. Ainsi nos résultats préliminaires sont encourageants mais indiquent que les efforts doivent maintenant se concentrer sur l'optimisation de la formation de la bicouche afin d'avoir une résistance de fuites plus grande que 1 GΩ, valeur que nous n'avons pas obtenue pour l'instant, et qui est nécessaire pour la caractérisation de l'activité d'un canal ionique unique.

2. Perspectives d'évolution du dispositif

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 3, paragraphe 1.2.4, le couplage capacitif entre les deux compartiments pourrait être diminué à une valeur de 18 pF en utilisant un substrat SOI comprenant un oxyde enfoui de 6 µm d'épaisseur et en oxydant totalement la couche de silicium supérieure. L'utilisation d'un oxyde enfoui de 10 µm d'épaisseur réduirait encore cette capacité à une valeur de 11 pF. Cette stratégie permettrait d'obtenir un niveau de bruit à haute fréquence comparable aux technologies utilisant une cloison de polymère (chapitre 1, paragraphe 2.3.6.1 et 2.3.6.2) sans avoir à « passiver » le substrat avec une couche de polymère, approche utilisée pour les substrats de silicium standards (voir chapitre 1, figure 24). Ainsi, nous pouvons voir que l'utilisation de substrat SOI est intéressante en comparaison de substrats de silicium standards car l'oxyde enfoui joue alors le rôle de couche de « passivation » enfouie dans le substrat.

Notons que le fait d'augmenter l'épaisseur de l'oxyde enfui permet aussi de diminuer la résistance du nanocanal enfoui. Nous pourrions alors envisager d'augmenter sa longueur sans que cela diminue la

[1] 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
[2] 1-acyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodécanoyl}-sn-glycéro-3-phosphocholine

sensibilité du dispositif (voir chapitre 3, paragraphe 1.5). La configuration décrite dans la Figure 1 ci-dessous pourrait alors être utilisée, où la partie supérieure des nanopores est adressée par un microcanal, et la partie inférieure est adressée par le microcanal enfoui[3], *via* le réservoir 1 et 3 et *via* des ouvertures micrométriques (analogues au triangle d'alimentation utilisé dans cette thèse) définies par lithographie électronique en même temps que la ligne de nanopores. Cette configuration permettrait ainsi de faire circuler des fluides dans le microcanal enfoui, de manière à contrôler et modifier la composition des deux côtés de la bicouche simultanément. Si l'on considère une longueur de 2 mm entre le réservoir 1 et le microcanal, la résistance associée au microcanal enfoui serait de 14 MΩ (largeur 8 µm, hauteur 10 µm, résistivité 0,63 Ωm), soit une valeur identique à la résistance obtenue dans cette thèse.

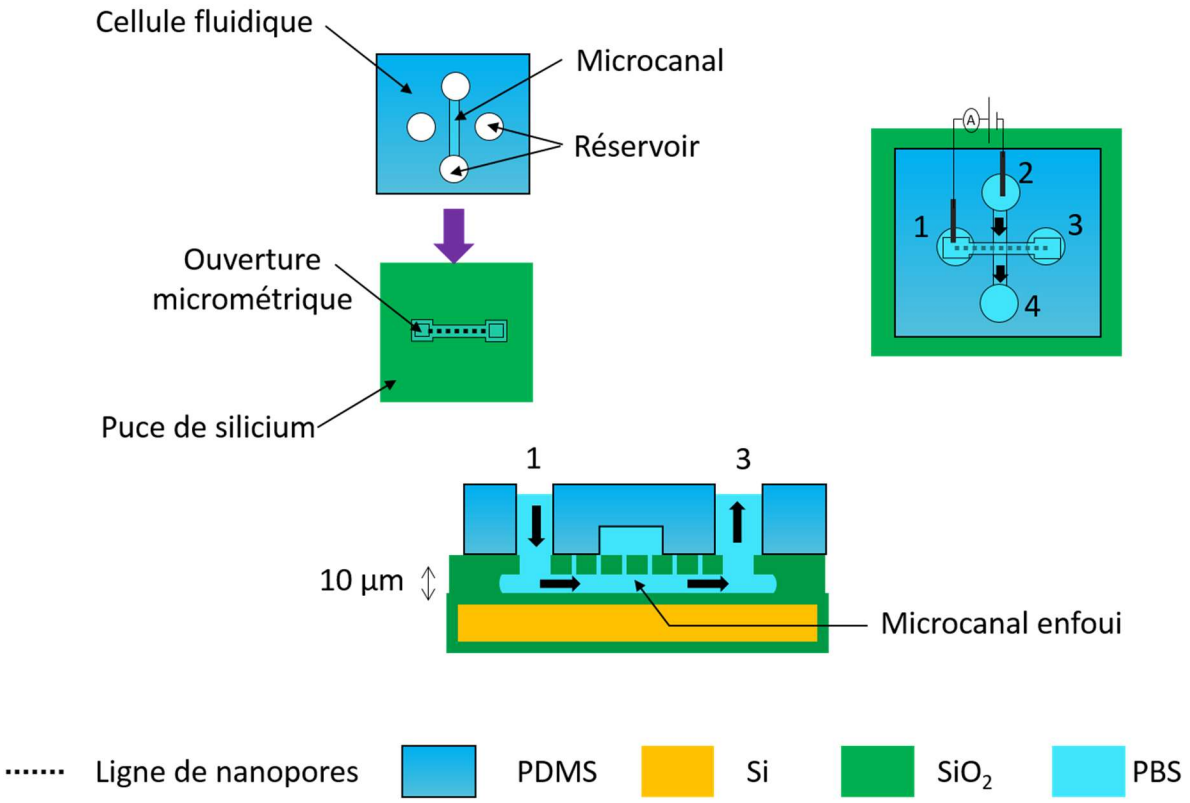


Figure 1 : schéma montrant une perspective d'évolution du dispositif qui permettrait d'une part de diminuer le niveau de bruit et d'autre part d'intégrer un canal fluidique dans le substrat SOI.

[3] En supposant par exemple un oxyde enfoui de 10 µm d'épaisseur, la structure formée après gravure humide de l'oxyde est un microcanal, et non plus un nanocanal comme dans le cas de cette thèse.

Annexe 1 : Protocoles expérimentaux

1. Fabrication des puces de silicium :

1.1 Enduction de PMMA

Le PMMA est enduit par « spin-coating » sur un substrat SOI (001) de 6 pouces de la manière suivante :

- recuit de déshydration du substrat à 170 °C pendant 3 min sur une plaque chauffante.
- enduction :
    - 7 mL de PMMA (Sigma Aldrich) à 70 g/L dans de l'anisole (Chimie Tech Services) est introduit sur l'échantillon avec une pipette. Une fois que le PMMA recouvre les trois quarts de la surface du substrat, le procédé suivant est appliqué :
    - phase 1 : 10 sec, 350 tours/min, accélération : 100 tours/min/s.
    - phase 2 : 60 sec, 3000 tours/min, accélération : 5000 tours/min/s.
- recuit du substrat à 170 °C pendant 3 min sur une plaque chauffante pour faire évaporer le solvant et durcir la résine.
- Pour la caractérisation de l'épaisseur de PMMA, voir paragraphe 1.7.

Le substrat SOI est ensuite clivé manuellement en 4 quarts de 6 pouces :

- Une encoche est réalisée sur la face arrière, sur un bord avec un stylo comportant une pointe en diamant.
- Une pression est exercée sur la face avant au niveau de l'encoche, pour initier et propager le clivage.
- Les débris sont évacués en appliquant un jet de diazote[1] sur la surface de l'échantillon.

1.2 Lithographie électronique

Nous utilisons un masqueur Raith 150. La lithographie électronique est réalisée de la manière suivante :

- Les quarts de 6 pouces sont introduits dans le masqueur de telle sorte que les axes x et y des champs d'insolation soient confondus avec les axes <110> des substrats, comme indiqué sur la Figure 1.
- Les paramètres de la colonne sont les suivants : tension d'accélération : 20 kV, diaphragme de limitation d'ouverture de 20 µm de diamètre (diaphragme permettant de contrôler la valeur du courant associé au faisceau d'électrons).

[1] Les paillasses sont équipées de soufflettes munies d'un filtre comprenant des pores de 200 nm de diamètre

- La valeur du courant électrique associée au faisceau d'électrons est mesurée avant chaque insolation en dirigeant le faisceau vers un détecteur. Cette valeur est comprise entre 90 et 110 pA. La valeur mesurée est utilisée comme paramètre dans une routine du logiciel Raith 150 permettant de calculer la vitesse de balayage du faisceau.

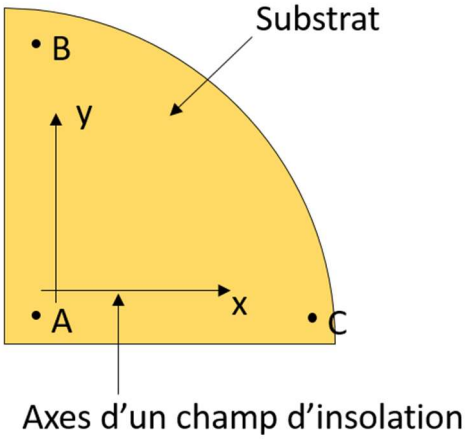


Figure 1 : schéma en vue de dessus montrant la correspondance entre les axes des champs d'insolation et les bords du substrat.

- Nous utilisons un pas de 2 nm (au niveau de l'échantillon) entre deux points insolés. Les triangles d'alimentation sont insolés avec une dose surfacique de 280 pC/cm². Pour les étoiles de 12 branches (utilisées pour les nanopores de diamètre nominal 10 nm), les lignes sont insolées avec une dose linéique de 525 pC/cm. Pour les autres diamètres nominaux, des étoiles de 36 branches sont utilisées avec une dose linéique de 250 pC/cm. Ces paramètres permettent d'obtenir une vitesse de balayage du faisceau an niveau de l'échantillon inférieure à 5 mm/s.
- La surface de l'échantillon est positionnée à 7,5 mm de la lentille objectif du microscope en ajustant la hauteur de la platine sur laquelle est posé l'échantillon. La mesure de la hauteur de la surface est réalisée par un capteur qui mesure la position d'un faisceau laser réfléchi sur la surface de l'échantillon.
- Une correction de la planéité de l'échantillon est réalisée en appliquant une procédure du logiciel Raith 150 appelée « levelling ». La hauteur de la surface de l'échantillon est mesurée en trois points proches des coins (A, B, et C, fixés par l'utilisateur) sur la Figure 1, et le logiciel Raith 150 modifie l'orientation de la platine de manière à ce que ces trois points soient placés à la même hauteur.
- La mise au point du faisceau d'électrons est effectuée sur l'échantillon, d'abord sur une petite rayure réalisée sur le PMMA avec une pince, sur un bord de l'échantillon, puis en insolant un point pendant 5 secondes, et en réalisant une image du cône de contamination formé lors de l'insolation de ce point. La mise au point et les paramètres d'astigmatismes du faisceau sont éventuellement réglés de sorte que le cône paraisse circulaire en vue de dessus.
- Une procédure appelée « writefield alignement » est réalisée, permettant de calibrer l'amplitude du balayage du faisceau, afin que la distance entre deux points sur le fichier utilisé pour piloter l'insolation corresponde à la distance réelle sur la surface de l'échantillon. L'erreur étant maximale sur les bords des champs d'insolation, cette étape permet que la ligne de nanopore, qui s'étale sur plusieurs champs, ne présente pas de discontinuité. NB : le découpage du fichier en champs d'insolation est réalisé de telle sorte qu'aucun motif ne soit coupé par la délimitation des champs.
- Les paramètres d'asservissement de la hauteur de l'échantillon sont réglés de telle sorte que la focalisation du faisceau reste fixe, et que ce soit la hauteur de la platine qui est ajustée en cas de variation (la hauteur de l'échantillon étant mesurée en continue grâce au faisceau laser).

- La largeur des puces est fixée à 1 mm. La position du coin inférieur gauche du champ d'insolation situé sur la gauche de la ligne est en x = 4,5 mm et y = 5,0 mm (avec un décalage de 1 mm pour chaque puce) par rapport à l'origine située sur le coin inférieur gauche du substrat SOI (Figure 1).

1.3 Développement

Avant de réaliser le développement des échantillons, le quart de 6 pouces est clivé (d'une manière similaire à celle décrite dans le paragraphe 1.1) en échantillons comprenant chacun 4 à 12 puces. La procédure de développement est la suivante :

- Développement pendant 2 minutes dans un bécher (capacité 50 mL) rempli d'un mélange MIBK / IPA (1/3, vol/vol, Honeywell/KMG), sans agitation ni ultra-sons. La température de la pièce est contrôlée à 20 °C. Lorsque plusieurs échantillons sont à développer, chaque bain est utilisé pour développer deux échantillons, puis renouvelé.
- 2 Rinçages d'environ 5 secondes chacun sont réalisés sous un jet d'IPA (KMG) obtenu avec une pissette, en changeant la position de la pince entre les deux rinçages.
- Séchage sous jet de diazote (voir note de la p. 193), l'échantillon étant posé sur un papier absorbant.

NB : le développement des échantillons est réalisé le jour même ou la veille de la gravure RIE.

1.4 Gravure RIE

La gravure RIE est réalisée dans un bâti de gravure plasma à couplage inductif (Alcatel Multiplex AMS4200), selon le protocole suivant :

- Afin de limiter l'échauffement des échantillons lors de la gravure, nous les collons sur un substrat de silicium standard de 4 pouces avec une pâte thermique (Nordson EFD). Lors de la gravure, la face arrière de ce substrat est refroidie avec un fluide caloporteur.
- Plasma de gravure : 3 min 35 s, SF_6 (30 sccm), C_4F_8 (45 sccm), O_2 (3 sccm), pression : 8.10^{-3} mBar, puissance « ICP » : 450 W, puissance « bias » : 30 W.
- Plasma pour éliminer le reste de PMMA : 1 min, O_2 (200 sccm), pression : 8.10^{-2} mBar, puissance « ICP » : 600 W, puissance « bias » : 0 W.

La pâte thermique et les résidus de gravure sur la face arrière sont ensuite éliminés de la manière suivante :

- Nettoyage de la face arrière des échantillons avec un papier absorbant imbibé d'eau déionisée
- Nettoyage avec un traitement « piranha » : H_2O_2 / H_2SO_4 (50/50, vol/vol) pendant 5 minutes, dans un bécher en téflon.
- Nettoyage des résidus de la gravure sur la face arrière avec un traitement par plasma : (Bâti Diener Nano) 0_2 (1000 sccm) pression : 1 mBar, puissance : 800 W, 5 min.

1.5 Gravure humide

La gravure humide est réalisée immédiatement après le dernier plasma de nettoyage, de la manière suivante :

- Les échantillons sont immergés dans un bain d'acide fluorhydrique à 50 % en volume (KMG) pendant le temps de gravure spécifié dans le chapitre 2. Le bain est réalisé dans un bécher en téflon (environ 20 mL introduits). Lorsque plusieurs échantillons sont à graver, le même bain est utilisé pour tous les échantillons.
- 2 rinçages d'environ 10 secondes chacun sont réalisés en changeant la position de la pince entre les deux rinçages : le rinçage est effectué en plongeant les échantillons sous un jet abondant d'eau déionisée (la paillasse comprend un évier prévu à cet effet avec un robinet).
- Les échantillons sont ensuite séchés sous un flux de diazote (voir note de la p. 193) sur un papier absorbant.

1.6 Oxydation thermique

Avant l'oxydation, une étape supplémentaire de nettoyage est réalisée :

- Nettoyage avec un traitement « piranha » : mélange 50/50 en volume de H_2O_2 (30%, KMG) et H_2SO_4 (30%, KMG) pendant 5 minutes, dans un bécher en téflon. Rinçage et séchage tel que décrit dans le paragraphe 1.5.
- Attaque chimique de l'oxyde natif formé : immersion pendant 30 secondes dans un bain de solution d'acide fluorhydrique à 5 % en volume (KMG), réalisée dans un bécher en téflon. Rinçage et séchage tel que décrit dans le paragraphe 1.5.

Pour la caractérisation par microscopie de fluorescence des bicouches supportées (chapitre 4, paragraphe 3.3.3), nous avons utilisé un substrat de silicium 4 pouces standard (<100> type P, épaisseur 525 µm, résistivité 8 - 12 ohm.cm). Les substrats ont été nettoyés de la même manière, avec un mélange « piranha » suivi d'une attaque chimique de l'oxyde natif formé. Les substrats SOI utilisés pour les caractérisations électriques du chapitre 3 et pour la caractérisation par FRAP des bicouches supportées sont les mêmes que ceux utilisés pour fabriquer les puces de silicium. Un substrat de 6 pouces a été clivé en 4 comme indiqué dans le paragraphe 1.1 (sans enduction de PMMA), et la même procédure de nettoyage que pour les substrats de silicium a été appliquée.

Les échantillons sont ensuite posés verticalement dans un four d'oxydation (Centrotherm).

<u>Pour former un oxyde de 86 nm d'épaisseur :</u>

- Introduction des échantillons dans le four à 700°C sous atmosphère de N_2 (2 SLM).
- Montée en température (10°C/min) jusqu'à 1000°C sous une atmosphère N_2 (10 SLM) et O_2 (0,5 SLM).
- Stabilisation de la température pendant 10 min sous la même atmosphère.
- Oxydation pendant **<u>112 min à 1000°C</u>** sous atmosphère de 0_2 (10 SLM).
- Recuit pendant 30 min à 1000°C sous atmosphère de N_2 (10 SLM).
- Descente en température (4°C/min), même atmosphère.

<u>Pour former un oxyde de 100 nm d'épaisseur :</u>

La même procédure est appliquée, avec une oxydation de 155 min au lieu de 112 min.

Pour former un oxyde de 200 nm d'épaisseur :

La même procédure est appliquée, avec une oxydation de **210 min à 1070°C**.

Les échantillons sont ensuite clivés comme nous l'avons décrit dans le paragraphe 1.1 (sans déposer de résine de protection) pour obtenir chaque puce de silicium.

1.7 Caractérisation

L'épaisseur de PMMA est mesurée si besoin avant gravure sur un échantillon, en réalisant une petite rayure avec une pince sur un bord de l'échantillon, et en mesurant la profondeur de la rayure au profilomètre mécanique (KLA tencor) : une force de 5 mg est appliquée sur la pointe, et la mesure est réalisée à une vitesse de 20 µm/s.

La caractérisation de l'épaisseur d'oxyde thermique a été réalisée par ellipsométrie (profilomètre Horiba Jobin Yvon Uvisuel à modulation de phase). Les spectres sont acquis sur une plage de 0,7 eV (longueur d'onde 1,8 µm) à 4,7 eV (longueur d'onde 265 nm) avec un pas de 0,05 eV.

La caractérisation par microscopie électronique à balayage est réalisée avec un microscope FEI Helios 600 i, avec une tension d'accélération de 10 kV, 15 kV ou 20 kV, et une distance entre la surface de l'échantillon et la lentille objectif du microscope de 2,5 mm ou de 4,2 mm. Après avoir inséré l'échantillon dans la chambre du microscope et mis celle-ci sous vide, un plasma de nettoyage de 5 minutes est réalisé pour nettoyer la chambre et l'échantillon. Cette précaution permet de limiter la contamination de l'échantillon au niveau de l'impact du faisceau d'électrons lors de l'observation. Nous avons en effet constaté que si nous ne prenons pas cette précaution, les nanopores « rétrécissent » lors de l'observation, effet que l'on a attribué à une réaction de contamination activée par le faisceau d'électrons.

La découpe par FIB est réalisée dans le même microscope électronique à balayage que les observations, et dans les mêmes conditions d'observation. Avant de réaliser la découpe, nous avons déposé localement (sur une surface de quelques micromètres carrés) une couche de platine (épaisseur 1 µm) pour protéger du faisceau d'ion utilisé lors de la coupe, les zones qui ne sont pas encore coupés. Le dépôt est réalisé par IBID (Ion Beam Induced Deposition). Cependant, afin de ne pas endommager les structures à observer, avec le faisceau d'ions utilisé lors du dépôt, un premier dépôt (épaisseur 300 nm) est réalisé par EBID (Electron Beam Induced Deposition). Pour l'EBID, la tension d'accélération est 5 kV et le courant associé au faisceau d'électrons est 22 nA. Pour l'IBID, la tension d'accélération est 30kV, le courant associé au faisceau d'ions 2,5 nA. La coupe a ensuite été réalisée avec une tension d'accélération de 30 kV, et un faisceau correspondant à un courant de 83 pA. Le pas entre deux lignes de coupe est de 5 nm. La profondeur de la coupe est de 3,5 µm.

La caractérisation par microscopie optique des échantillons lors du procédé de fabrication a été réalisée avec un microscope Leica, une caméra Leica DFC 290, et des objectifs Leica X 10, X 20, X 50 ou X 100.

2. Fabrication des cellules fluidiques et assemblage

2.1 Fabrication des moules

Deux substrats de silicium standards (silicium intrinsèque de type p) de 4 pouces sont utilisés comme moule. Le dépôt de SU-8 (SU-8 3050, Microchem) et la photolithographie sont réalisés de la manière suivante :

- Activation de la surface des substrats avec un plasma O_2, réalisé dans un bâti Tepla 300 (source magnétron): 5 minutes, 0_2 1000 sccm, pression : 1,4 mBar, puissance : 800 W.
- Dépôt réalisé avec l'appareil de dépôt automatique EVG 120.

	Pour un dépôt d'épaisseur 100 µm	Dépôt d'épaisseur 50 µm
Volume	8 mL de résine déposé	8 mL de résine déposé
Phase 1	Durée : 30 s Vitesse : 500 tours/min, Accélération : 500 tours/min/s	Durée : 30 s Vitesse : 500 tours/min, Accélération : 500 tours/min/s
Phase 2	Durée : 30 s Vitesse : 1650 tours/min Accélération : 5000 tours/min/s	Durée : 30 s Vitesse : 3200 tours/min Accélération : 5000 tours/min/s
Détourage (acétone)	Durée : 30 s Vitesse : 5000 tours/min Accélération : 5000 tours/min/s	Durée : 30 s Vitesse : 5000 tours/min Accélération : 5000 tours/min/s
Recuit sur plaque chauffante	44 min à 95 °C	27 min à 95 °C
	Ces étapes sont réitérées une deuxième fois pour obtenir un dépôt de 200 µm	

- Photolithographie : aligneur de masque utilisé : MA 150. Puissance : 10 mW/cm², longueur d'onde 365 nm.

Dépôt d'épaisseur 200 µm	Dépôt d'épaisseur 50 µm
Insolation pendant 60 secondes	Insolation pendant 25 secondes

- Recuit post-exposition : pour les deux épaisseurs : 95 °C 3 min, sur plaque chauffante
- Développement : avec le développeur de SU-8 fourni avec la résine, rinçage à l'IPA

Dépôt d'épaisseur 200 µm	Dépôt d'épaisseur 50 µm
Développement pendant 30 min	Développement pendant 15 min

- Recuit : pour les deux épaisseurs : 125 °C, 2 min, sur plaque chauffante.

Afin de rendre la surface (SU-8 et silicium) du moule hydrophobe, ce qui est nécessaire pour faciliter le démoulage du PDMS après réticulation, une monocouche de FDTS (perfluorodécyltrichlorosilane) est déposée en phase vapeur au moyen d'un bâti SPD (Surface Preparation and Deposition, Memsstar). Une couche d'accroche de 30 nm d'épaisseur de SiO_2 est d'abord déposée dans le même bâti (précurseur : $SiCl_4$, H_2O).

2.2 Préparation et réticulation du PDMS

Préparation du PDMS (Sylgard 184) :

- Mélange de l'agent réticulant dans des proportions agent / PDMS 1/10 en masse. Pour chaque moule, 20 g de PDMS sont utilisés et 2 g d'agent réticulant.
- Dégazage sous vide primaire pendant 30 min.

Le PDMS est ensuite coulé sur le(s) moule(s).

La réticulation est effectuée dans une étuve à 100°C pendant 1 h.

Les cellules sont ensuite découpées avec une lame de scalpel sur le moule, puis démoulées individuellement.

2.3 Assemblage

L'assemblage est réalisé de la manière suivante :

- Découpage à l'emporte-pièce de diamètre 2 mm ou 1 mm (Eloïse SARL) des réservoirs.
- Nettoyage des débris résultant du découpage des réservoirs : un ruban adhésif (Scotch Magic standard) est collé sur la cellule fluidique, puis retiré. L'opération est réitérée jusqu'à ce que la surface soit lisse.
- Activation de la puce de silicium par un traitement plasma (Diener Pico) à air filtré (filtre à seringue Whatman diamètre des pores 0,2 µm) : durée : 15 min, puissance : 50 W, pression : 0,5 mBar.
- Activation de la cellule fluidique (la puce de silicium est laissée dans le bâti de plasma) par un traitement plasma : 20 s, puissance : 30 W, autres paramètres identiques que ci-dessus.
- « collage » de la cellule fluidique sur la puce de silicium. Une pression relativement forte est appliquée manuellement pendant environ 3 secondes.
- Recuit pendant 5 min à 80 °C
- Après assemblage, le dispositif est collé sur une lame de verre avec du ruban adhésif double faces afin de faciliter les manipulations.

2.4 Préparation du PBS

Dans toutes les expériences, le PBS (Euromedex) est filtré avec des filtres (filtre à seringue Whatman diamètre des pores 0,2 µm) avant utilisation.

Nous rappelons que la composition du PBS est :

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na_2HPO_4	10 mM
KH_2PO_4	1,7 mM

2.5 Remplissage des dispositifs

Les réservoirs sont immédiatement remplis après activation des surfaces et recuit à l'étuve, afin que l'activation par plasma des surfaces soit encore opérante.

- 6 µL de PBS sont insérés séquentiellement dans les réservoirs 1, 2, 3 et 4.

- 1 µL de PBS est ajouté dans le réservoir accédant au triangle d'alimentation.
- Nous mesurons ensuite la résistance en appliquant une différence de potentiel de 100 mV entre les réservoirs 1 et 2 (voir paragraphe 5 pour les mesures électriques).
- Si le nanocanal enfoui n'est pas rempli (résistance mesurée typique supérieure à 200 MΩ), nous réalisons un traitement aux ultra-sons : le dispositif est inséré dans un bécher (25 mL) rempli de PBS. L'ensemble est recouvert de parafilm et disposé dans un bac à ultra-sons (Fisher Scientific) pendant 5 min.

3. Préparation des SUV/LUV

3.1 Mélange des phospholipides et évaporation du chloroforme

Les phospholipides (POPC et NBD-PC, Avanti Polar Lipids) sont stockés à - 80°C en solution dans du chloroforme (Sigma Aldrich), à une concentration de :

- 10 mg/mL pour le POPC (solution 1)
- 1 mg/mL pour le NBD-PC (solution 2)

Des flacons en verre de 4 mL (Fisher Scientific) sont utilisés pour réaliser le mélange : 100 µL de la solution 1 (prélevée avec une pipette en verre Hamilton) et 10 µL de la solution 2.

- Le chloroforme est évaporé par chauffage du flacon à 55°C (avec un bain à sec, Fischer Scientific) et en appliquant un léger flux de diazote dans le flacon au moyen d'une pipette pasteur reliée à une arrivée de diazote. Un dépôt de phospholipides est alors formé sur le fond du flacon.
- Les flacons sont ensuite mis dans une cloche à vide sous vide primaire pendant une durée supérieure à 2 h 30. La cloche est insérée dans un carton pour que la lumière ne détruise pas les fluorophores.
- Les flacons sont ensuite stockés à 4°C et utilisés dans les 10 jours.

3.2 Mise en suspension et extrusion

- 0,5 mL de PBS (voir paragraphe 2.4) est introduit dans le flacon en verre contenant le dépôt de phospholipides. Le flacon est ensuite agité avec un agitateur de type vortex jusqu'à homogénéisation de la suspension obtenue.

A ce stade, la suspension contient des vésicules multilamellaires. Les SUV et les LUV sont formées par extrusion au travers de filtres comprenant des pores nanométriques. Nous utilisons un kit commercial d'extrusion (« mini extruder kit », Avanti Polar Lipids).

- Pour les SUV (diamètre nominal 80 nm), l'extrusion est réalisée en passant la suspension 31 fois (16 allers et 15 retours) au travers un filtre comprenant des pores de 100 nm de diamètre puis au travers un filtre comprenant des pores de 50 nm de diamètre.
- Pour les LUV (diamètre nominal 180 nm), l'extrusion est réalisée en passant la suspension 15 fois (8 allers et 7 retours) au travers un filtre comprenant des pores de 200 nm de diamètre.

La suspension obtenue (2 mg/mL) est stockée à 4 °C et utilisée dans les trois jours. Les suspensions de concentration mentionnée dans le chapitre 4 sont obtenues par dilution de cette suspension avec du PBS.

3.3 Caractérisation

La caractérisation de la taille des liposomes est réalisée avec un appareil de mesure par diffusion dynamique de la lumière (Zetasizer Nano-ZS, Marlvern). La mesure est réalisée sur 100 µL de suspension de SUV ou de LUV de concentration 200 µg/mL. La température est contrôlée à 25 °C. Pour le traitement des données, les paramètres suivant sont utilisés : Indice de réfraction de l'eau : 1,330. Viscosité de l'eau : 0,8872 cP.

4. Caractérisation d'une bicouche supportée sur une surface de SiO_2 par microscopie de fluorescence et par FRAP

Le dispositif expérimental est obtenu de la manière suivante :

- Des lamelles de microscopes (Fisher, épaisseur 0,13 mm) sont rincées à l'eau purifiée « Milli-Q » (obtenu avec un système de purification Milli-Q, Merck Millipore) puis à l'éthanol (KMG) puis à nouveau à l'eau purifiée « Milli-Q », puis séchées avec un flux de diazote.
- Deux rubans de parafilm sont étirés, découpés et collés sur la lamelle en frottant sur les rubans avec une pince.
- Activation de la surface de l'échantillon par un traitement plasma à air (même paramètres que l'activation des puces de silicium dans le paragraphe 2.3)
- Pour les observations préliminaires en microscopie de fluorescence, les échantillons utilisés sont des substrats de silicium oxydé (épaisseur 86 nm, voir paragraphe 1.6) clivé manuellement en échantillons carrés de côté 1 cm comme décrit dans le paragraphe 1.1 (sans utiliser de résine de protection). Pour la caractérisation par FRAP, des substrats SOI oxydés (épaisseur 100 nm, voir paragraphe 1.6) sont clivés de manière identique.
- L'échantillon est posé sur les deux rubans de parafilm, et un ruban adhésif est utilisé pour maintenir le dispositif en place (Figure 2 a).
- 10 µL de PBS (voir paragraphe 2.4) est introduit à l'entrée du canal formé entre l'échantillon et la lamelle de microscope. Le dispositif est ensuite incliné (environ 30°) pour que le PBS s'écoule dans le dispositif, entre la lamelle de verre et l'échantillon (Figure 2 b).

Pour les expériences de FRAP, nous avons laissé le PBS pendant une demi-heure avant de réaliser l'incubation, afin de « mimer » une situation où le remplissage du nanocanal enfoui est relativement long, ce qui retarde l'insertion des SUV. Pour les observations préliminaires en microscopie de

fluorescentes, les incubations ont été lancées immédiatement après remplissage du dispositif par du PBS :

- Le surplus de PBS est d'abord retiré avec un papier absorbant (Figure 2 c). Puis 10 µL de la suspension utilisée sont introduits comme sur la Figure 2 a). Le dispositif est incliné pour que la suspension s'écoule entre l'échantillon et la lamelle de microscope, et une petite quantité est évacuée avec un papier absorbant comme sur la Figure 2 c) pour évacuer le PBS ne contenant pas de SUV.
- La suspension est laissée à incuber pendant 15 minutes. Le dispositif est maintenu à l'horizontale dans une boîte de pétri contenant un papier absorbant imbibé d'eau purifiée « milli-Q » pour prévenir l'évaporation pendant l'incubation.
- La suspension de SUV est ensuite rincée avec du PBS de la manière suivante : i) évacuation du surplus comme sur la Figure 2 c). ii) insertion de 10 µL de PBS comme sur la Figure 2 a). iii) inclinaison du dispositif (environ 30°) pour que le PBS s'écoule vers le bas du dispositif, et absorption du surplus comme sur la Figure 2 c). En tout, 3 rinçages sont effectués, avec un volume total de 30 µL de PBS.
- Les échantillons sont mis dans des boîtes de pétri comme décrit ci-dessus, et caractérisés 1 h après rinçage.

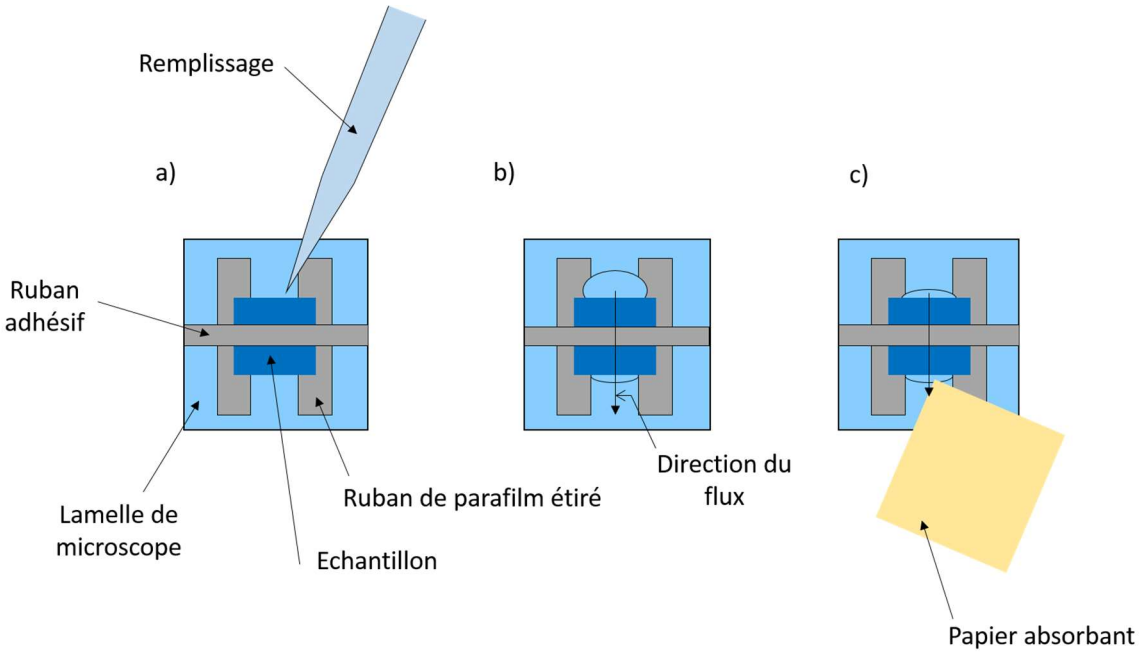


Figure 2 : schéma en vue de dessus montrant a) et b) le remplissage du dispositif utilisé pour la caractérisation par FRAP. c) l'évacuation du liquide avec un papier absorbant.

Pour les observations préliminaires, l'ensemble lamelle + échantillon est retourné et posé sur une lame de verre, lamelle au-dessus pour pouvoir réaliser l'observation sur le microscope droit (Olympus BX 51). Les images sont réalisées avec un objectif X 50 longue distance de travail (olympus) et un cube d'excitation U-MWIB3 (Olympus) (filtre d'excitation 460-495 nm / dichroïque 505 nm / filtre d'émission LP 510 nm). La source de lumière est une lampe à vapeur de mercure.

Pour la caractérisation par FRAP, le montage est posé sur un microscope inversé et un objectif 60 X (Nikon) à immersion huile est utilisé. Le laser (Oxxius) a une longueur d'onde de 473 nm. Le rayon de la zone photoblanchie est de 3,3 µm. L'intensité initiale est mesurée pendant 3 s, puis la zone

d'observation est photoblanchie avec un pulse de 20 ms avec la puissance maximale du laser. Le retour de la fluorescence est observé sur 30 s (fréquence d'échantillonnage 200 Hz), et l'ajustement avec le modèle théorique [1] est réalisé sur les 20 premières secondes.

5. Mesures électriques

Nous utilisons pour les mesures électriques des électrodes commerciales E 255 A (Phymep), dont le diamètre et la longueur de la partie chlorurée sont respectivement de 0,4 mm et 6 mm. Nous avons constaté que l'utilisation d'électrodes E 255 (diamètre / longueur de la partie chlorurée : 0,8 mm/8 mm) entraînait une évaporation du PBS environ 2 à 4 fois plus rapide. Cette différence s'explique par le fait que lorsque la partie chlorurée est longue, un tronçon plus important de l'électrode se trouve en dehors des réservoirs. La surface d'Ag/Cl étant relativement hydrophile, un ménisque se forme autour de l'électrode. Plus le diamètre de l'électrode ainsi que la longueur du tronçon émergé sont importants, plus la surface de contact entre l'air et la solution est importante. Nous avons donc utilisé des électrodes E 255 qui permettent ainsi de limiter l'évaporation, et de laisser le dispositif pendant 1 à 2 h sans renouveler le contenu des réservoirs.

Les électrodes E 255 A se terminent par un fil d'argent dont la longueur est relativement courte (environ 6 mm). Nous utilisons donc un autre fil d'argent (Warner Instrument) que nous torsadons avec le fil d'argent de l'électrode afin de le prolonger. Par ailleurs, un ruban adhésif est enroulé autour d'un tronçon du long fil d'argent afin de pouvoir maintenir les électrodes avec les pinces métalliques de la troisième main utilisée (VWR) sans créer de court-circuit. Avant et après chaque expérience, les électrodes sont nettoyées à l'eau purifiée « milli-Q », puis à l'éthanol (KMG), puis à nouveau à l'eau purifiée « milli-Q », puis séchées avec un flux de diazote. La lame de verre sur laquelle est fixé l'échantillon est posé sur un petit support élévateur, ce qui permet de monter ou baisser l'échantillon pour plonger les électrodes dans les réservoirs.

Les courbes I(V) et I(t) sont réalisées avec un potentiostat Parstat MC avec une interface bas courant. Un montage à deux électrodes est utilisé. La connexion avec les électrodes est faite *via* des câbles se terminant par des petites fiches bananes (2 mm) et des pinces crocodiles. L'interface bas courant, la connectique et le montage expérimental sont disposés dans une cage de Faraday reliée à la masse, tel que le montre la Figure 3.

Les courbes d'impédance sont réalisées avec un potentiostat Biologic VMP3. Le montage est réalisé dans une cage de Faraday reliée à la masse. L'extrémité du câble de l'appareil est introduite dans la cage et la connectique utilisée est identique au cas des mesures I(t) et I(V). Le montage est à deux électrodes.

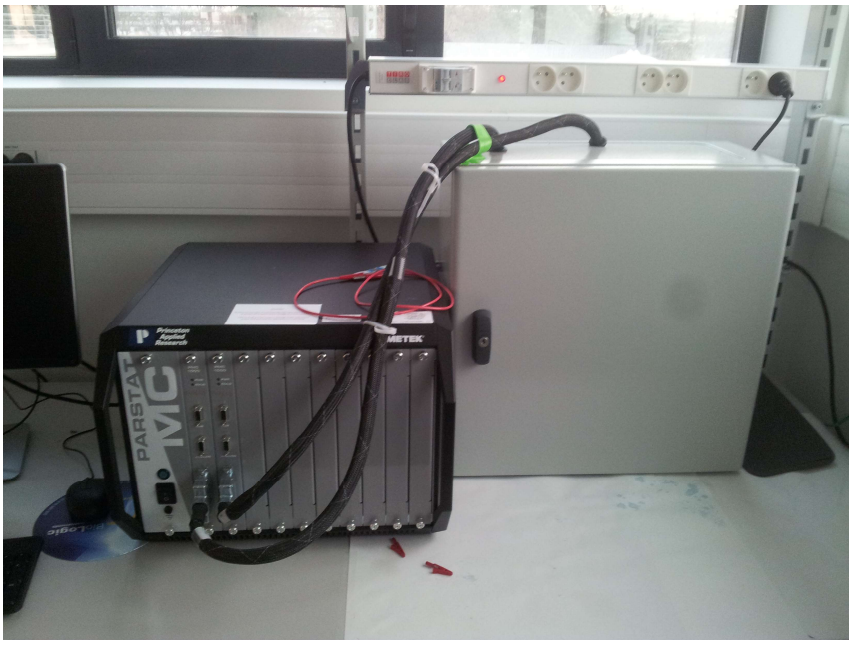


Figure 3 : photographie montrant la disposition de la cage de Faraday par rapport au potentiostat pour le cas des mesures I(t) et I(V).

6. Expériences de capture de nanoparticules

Pour les expériences de capture de nanoparticules, nous utilisons le montage de la Figure 4 : Les électrodes sont insérées dans les réservoirs 1 et 2, et sont fixées avec du ruban adhésif à la lame de verre sur laquelle est fixé l'échantillon. La lame est ensuite fixée sur la platine du microscope (Olympus droit BX51 TF) par du ruban adhésif doubles faces. Les électrodes sont reliées à un générateur de tension Keithley 2450 par des pinces crocodiles et des câbles à fiche banane.

Les nanoparticules (Yellow green fluorescent FluoSpheres®, fonctionnalisation acide carboxylique, 500 nm de diamètre, Molecular probes, Life Technologies) sont utilisées en suspension à une concentration de 3.10^9 part/mL dans du PBS. Avant utilisation, la suspension est soniquée pendant 10 secondes dans un bain à ultra-sons (Ficher Scientific). L'insertion des nanoparticules se fait en introduisant 10 µL de suspension dans le réservoir 4.

Les images sont réalisées avec un objectif X 50 longue distance de travail (olympus) et un cube d'excitation U-MWIB3 (Olympus) (filtre d'excitation 460-495 nm / dichroïque 505 nm / filtre d'émission LP 510 nm). L'acquisition des images est réalisée avec une caméra Andor Ixon pilotée par le logiciel Andor Solis, à une vitesse de 3 images par seconde. La source de lumière est une lampe à vapeur de mercure.

Pour les expériences de capture de nanoparticules avec une caractérisation électrique, la connectique du potentiostat parstat MC est reliée aux électrodes sans retirer celles-ci de la lame de verre : la lame de verre est introduite dans cage de Faraday se trouvant à côté du potentiostat (voir paragraphe 5), et les électrodes sont connectées au potentiostat avec les pinces crocodiles.

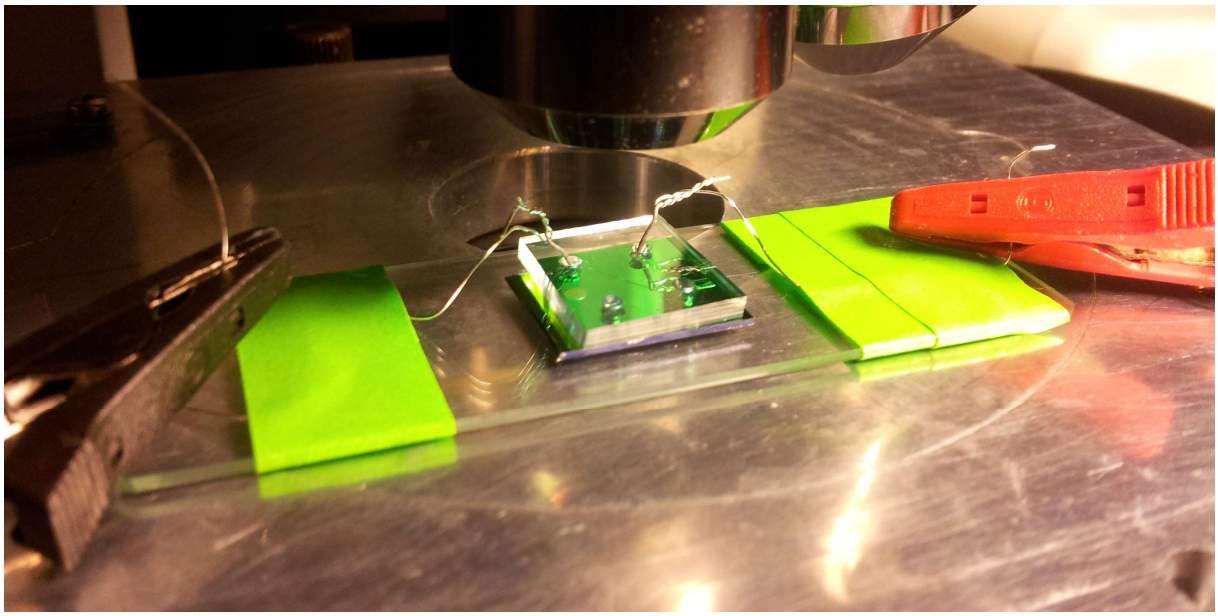


Figure 4 : photographie montrant le montage expérimental utilisé pour la capture des nanoparticules lorsque la caractérisation optique est utilisée.

7. Simulation avec le simulateur en ligne PartSim

Le simulateur se trouve sur le site suivant : http://www.partsim.com. Pour la simulation, mentionnée dans le chapitre 3, du transitoire lors de l'établissement du saut de tension V_0 = 100 mV, nous avons utilisé le circuit de la Figure 5. La résistance R_1 représente $R_{Si\ top}$, la résistance R_2 représente R_a. C_1 représente C_{passiv} et C_2 représente C_{BOX}. La simulation a été réalisée avec le mode « réponse transitoire », en cochant la case « utiliser les conditions initiales des composants ». La simulation a lieu de t = 0 s à t = 2 ms, avec un pas temporel de 0,1 µs (voir Figure 6). Les données ont ensuite été traitées avec le logiciel Igor Pro.

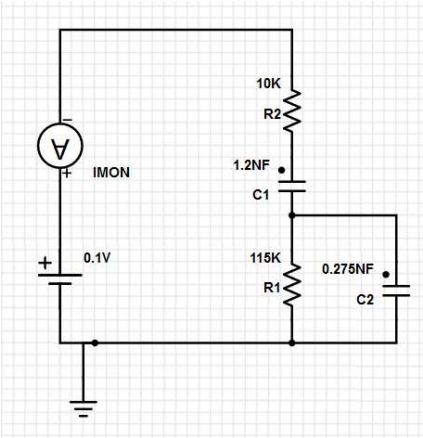


Figure 5 : impression d'écran du circuit utilisé pour la simulation du régime transitoire d'établissement du courant lorsque V_0 = 100 mV est appliqué aux bornes du dispositif.

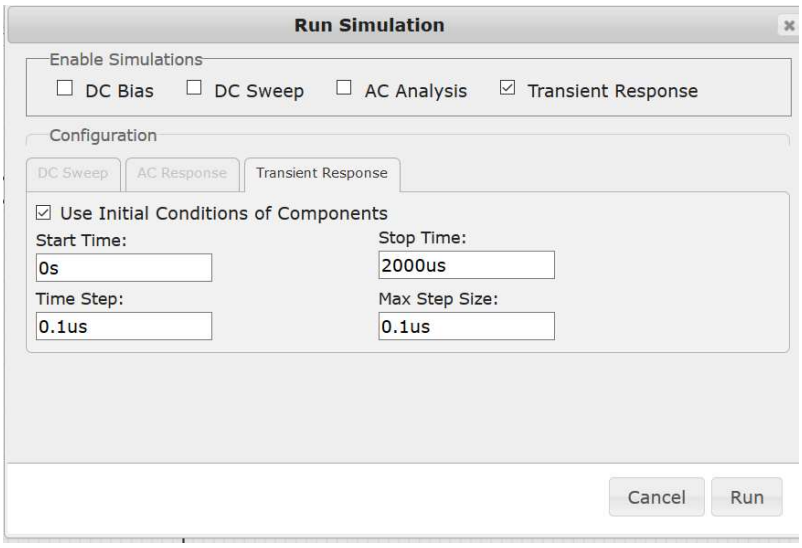


Figure 6 : impression d'écran des paramètres utilisés pour la simulation du régime transitoire d'établissement du courant lorsque V_0 = 100 mV est appliqué aux bornes du dispositif.

Pour la simulation du scellement d'un nanopore, mentionnée dans le chapitre 4, nous avons utilisé le circuit indiqué dans la Figure 7. Par rapport au circuit précédent, nous avons ajouté une résistance R_5 qui représente $R_{nanocanal}$ + R_1 (réseau de nanopore débouchant sur le compartiment 1), une résitance R_3 qui représente R_2 (réseau de nanopore débouchant sur le compartiment 2), et une résistance R_4 qui représente $R_{nanopore}$. R_4 est en série avec un interrupteur S_1 commandé par un générateur de tension alternative (créneau, amplitude 1V, période 200 µs, temps de monté 1 ns, durée de la première phase du créneau 10 µs). L'interrupteur est initialement fermé et s'ouvre lorsque t = 10 µs, jusqu'à t = 200 µs. Les paramètres de la simulation sont les suivants : mode « réponse transitoire », sans cocher la case « utiliser la condition initiale des composants ». La simulation est effectuée de t = 0 µs jusqu'à t = 200 µs, avec un pas de 0,1 µs (voir Figure 8).

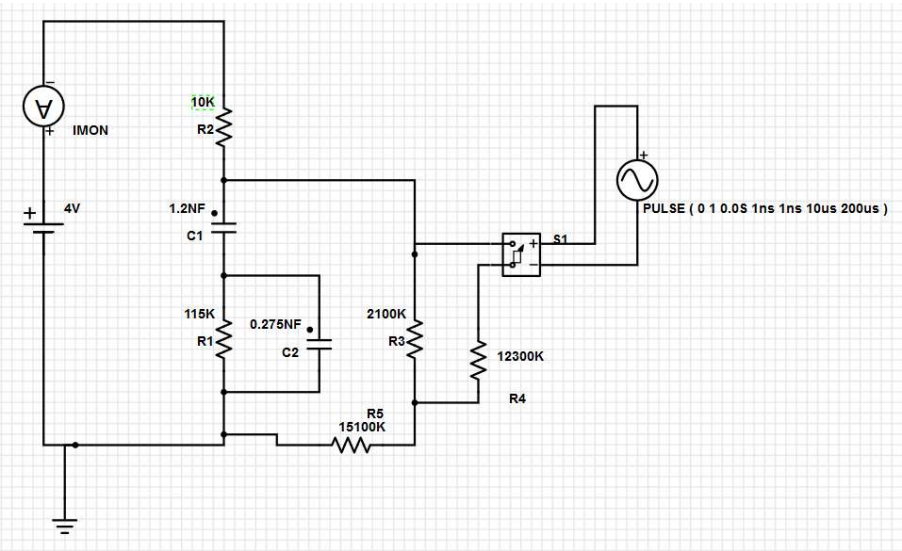


Figure 7 : imprimé écran montrant le circuit utilisé pour la simulation de l'expérience de scellement d'un nanopore (diamètre nominal 107 nm, n_0 = 58).

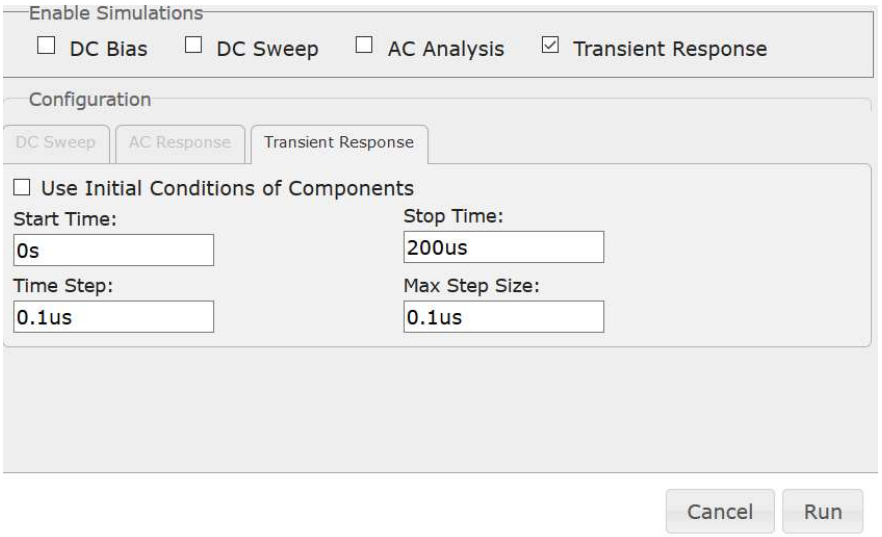


Figure 8 : imprimé écran des paramètres utilisés pour la simulation de l'expérience de scellement d'un nanopore (diamètre nominal 107 nm, $n_0 = 58$).

8. Traitement des données avec le logiciel Igor Pro

Pour le filtrage des courbes du chapitre 3 et 4, nous avons utilisé un algorithme de lissage sur 100 ou 1000 points, disponible dans le menu « analyse » / « lissage ». Nous avons utilisé l'algorithme « binominal ».

9. Références

1 Soumpasis, D.M. (1983) Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* 41, 95–97

Annexe 2 : Démonstration des calculs de résistances et de sauts de courants

1. Calcul de $R_{réseau}$ en prenant en compte $R_{interpore}$

Comme le montre la Figure 1 a), nous posons :

$$Res_1 = R_{interpore} + R_{nanopore}$$

Nous pouvons alors calculer la grandeur Res_2 indiquée sur la Figure 1 b) de la manière suivante :

$$Res_2 = R_{interpore} + \frac{R_{nanopore} Res_1}{R_{nanopore} + Res_1}$$

Ainsi, en généralisant, nous avons :

$$Res_u = R_{interpore} + \frac{R_{nanopore} Res_{u-1}}{R_{nanopore} + Res_{u-1}}$$

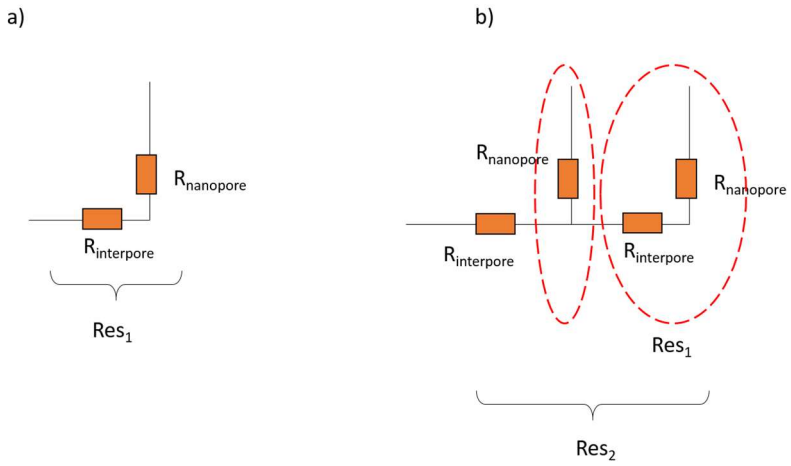


Figure 1 : a) schéma montrant la définition de Res_1. b) schéma montrant comment on calcule Res_2 à partir de Res_1.

Nous pouvons alors calculer la résistance totale des n_0 nanopores débouchant sur le compartiment 1 ou 2 en calculant Res_{n_0}. Comme le montre la Figure 2, nous considérons que la résistance $R_{interpore}$ située à l'extrémité du nanocanal est incluse dans $R_{nanocanal}$. Nous retranchons donc $R_{interpore}$ pour ne pas la compter deux fois. Nous avons donc :

$$R_1 = R_2 = Re_{\ n_0} - R_{interpore}$$

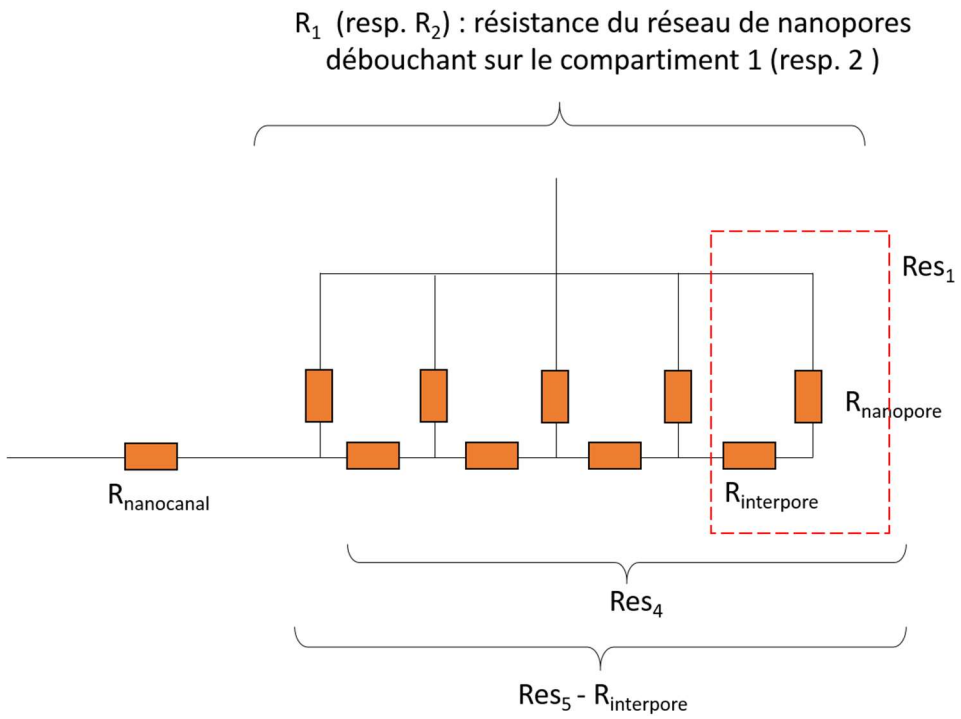


Figure 2 : schéma montrant le calcul de R_1 (ou R_2) à partir de la suite Res.

2. Calcul du premier saut de courant en négligeant $R_{interpore}$

Comme le montre la Figure 3, dans ce paragraphe, nous négligeons $R_{interpore}$ pour les nanopores qui débouchent sur le compartiment 2. Pour R_1, nous prendrons les valeurs numériques données dans le chapitre 3 (voir paragraphe …, p. …) qui découlent du calcul démontré dans le paragraphe 1 de cette annexe, et qui tiennent compte de $R_{interpore}$.

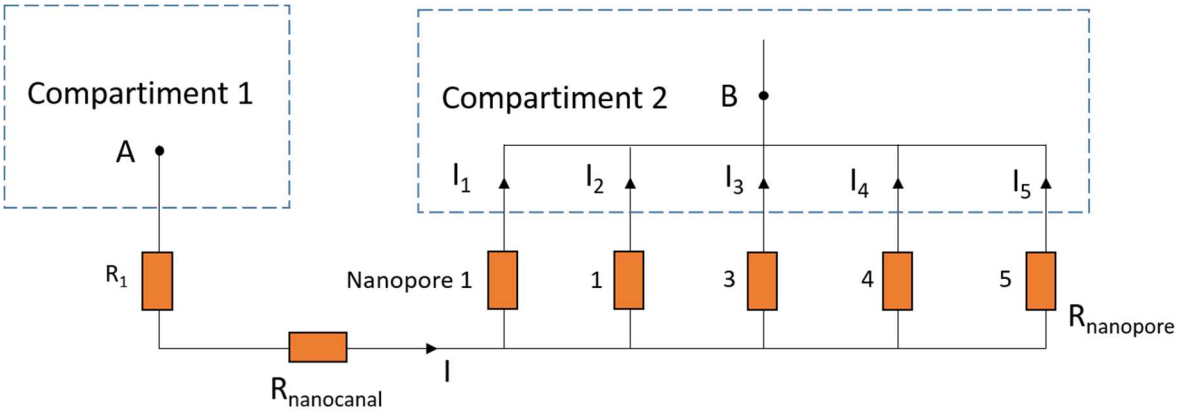


Figure 3 : schéma électrique du cas où l'on néglige $R_{interpore}$ pour les nanopores débouchant sur le compartiment 2.

Considérons le premier saut de courant ΔI_1, associé au scellement d'un premier nanopore. Comme le montre la Figure 3, nous appelons I_1 le courant circulant dans le nanopore 1, I_2 circulant dans le nanopore 2, etc. Comme on néglige $R_{interpore}$, nous avons :

$$I_1 = I_2 = I_3 = I_4 = I_5$$

Ainsi, quel que soit le nanopore scellé, la valeur de ΔI_1 sera identique. Nous appelons R_i la résistance totale entre A et B avant le premier saut, et R_f la résistance totale entre A et B après le premier saut. Nous appelons I_0 la valeur du courant I circulant entre A et B avant le premier saut, et I_f la valeur finale du courant après le premier saut.

Nous pouvons ainsi calculer la variation relative du courant lors du premier saut :

$$\frac{\Delta I_1}{I_0} = \frac{I_f - I_0}{I_0} = \frac{\frac{V_{AB}}{R_f} - \frac{V_{AB}}{R_i}}{\frac{V_{AB}}{R_i}} = \frac{R_i - R_f}{R_f}$$

Par ailleurs, nous avons :

$$R_i = R_1 + R_{nanocanal} + \frac{R_{nanopore}}{n_0}$$

Et :

$$R_f = R_1 + R_{nanocana} + \frac{R_{nanopore}}{n_0 - 1}$$

Ainsi :

$$\frac{\Delta I_1}{I_0} = \frac{R_{nanopore}\left(\frac{1}{n_0} - \frac{1}{n_0 - 1}\right)}{R_1 + R_{nanocanal} + \frac{R_{nanopore}}{n_0 - 1}}$$

3. Calcul des sauts de courant en prenant en compte $R_{interpore}$.

Considérons maintenant que les nanopores débouchant sur le compartiment 2 sont séparés par $R_{interpore}$. Avant tout scellement, comme le montre la Figure 4, le courant I_1 circulant dans le nanopore 1 est plus grand que le courant I_2 circulant dans le nanopore 2, à cause de la résistance $R_{interpore}$ qui créée une chute de potentiel. Le même raisonnement s'applique pour tous les nanopores, de sorte que nous avons :

$$I_1 > I_2 > I_3 > I_4 > I_5$$

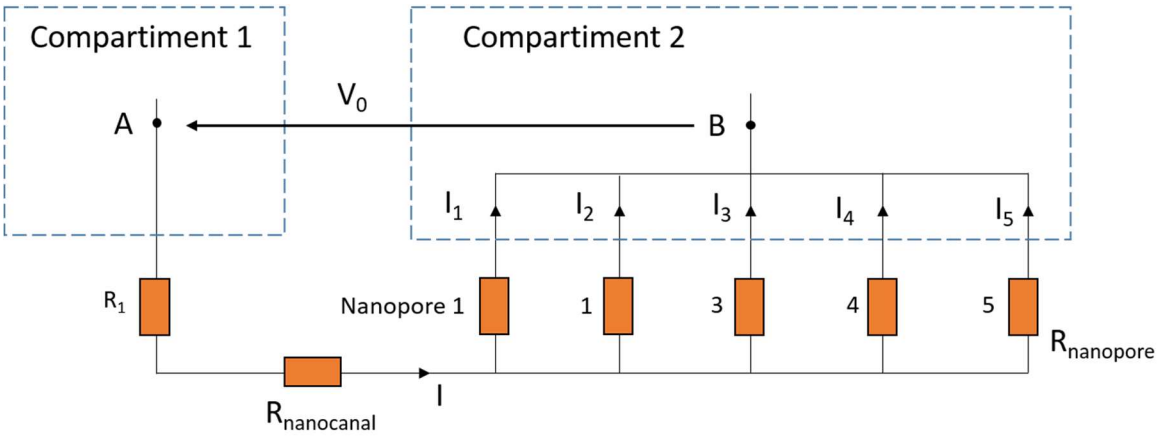


Figure 4 : schéma électrique du cas où $R_{interpore}$ est pris en compte pour les nanopores débouchant sur le compartiment 2.

Lors du premier scellement, si c'est le nanopore 1 qui est scellé, le ΔI_1 sera plus important que si c'est le nanopore 5 qui est scellé. Nous aurons ainsi un ΔI_{1max} pour scellement du nanopore n°1, et un ΔI_{1min} pour le scellement du nanopore n°5.

Comme, pour le paragraphe précédent, nous avons :

$$\frac{\Delta I_1}{I_0} = \frac{R_i - R_f}{R_f}$$

Avec (voir paragraphe 1) :

$$R_i = R_1 + R_{nanocanal} + Res_{n_0} - R_{intepore}$$

Dans le cas où le premier nanopores scellé est le nanopore le plus proche de $R_{nanocanal}$ (n°1 sur la Figure 5), nous avons :

$$R_f = R_1 + R_{nanocanal} + Res_{n_0-1}$$

De même, dans le cas où le premier nanopore scellé est le nanopore le plus éloigné de $R_{nanocanal}$ (n°5 sur la Figure 6), nous avons :

$$R_f = R_1 + R_{nanocanal} + Res_{n_0-1} - R_{intepore}$$

NB : comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1, la soustraction de $R_{interpore}$ est nécessaire car la suite Res inclut la résistance $R_{interpore}$ se trouvant à gauche de chaque nanopore, il faut donc la soustraire car elle est déjà inclue dans $R_{nanocanal}$.

Ainsi, nous en déduisons :

$$\frac{\Delta I_{1max}}{I_0} = \frac{Res_{n_0} - Re\ _{n_0-1} - R_{intepore}}{R_1 + R_{nanocanal} + Res_{n_0-1}}$$

Et :

$$\frac{\Delta I_{1min}}{I_0} = \frac{Res_{n_0} - Re_{\ n_0-1}}{R_1 + R_{nanocanal} + Res_{n_0-1} - R_{intepore}}$$

Les valeurs indiquées dans le tableau 8 du chapitre 3 (paragraphe 1.5) ont été calculées avec un programme réalisé avec le logiciel Igor Pro.

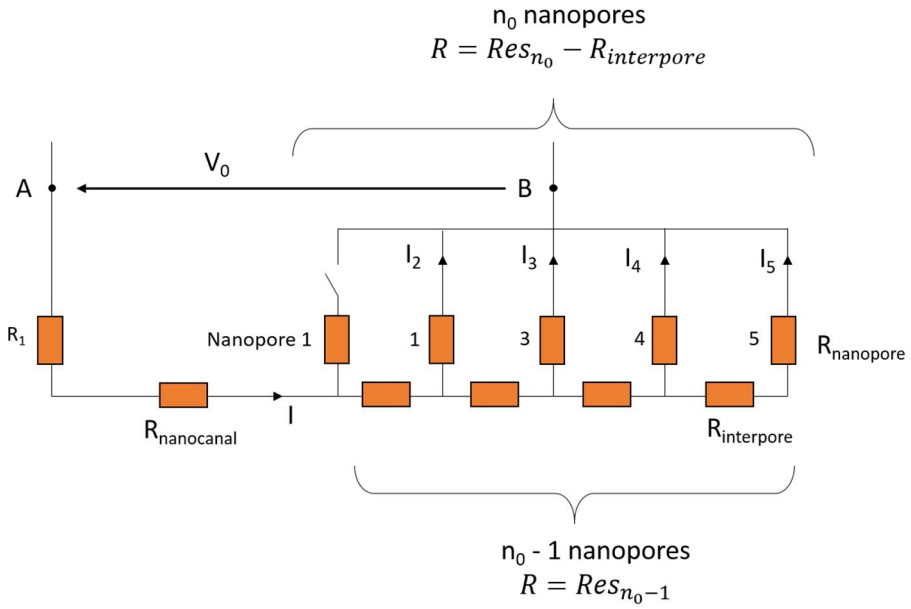


Figure 5 : schéma électrique montrant la configuration où le nanopore n°1 est scellé en premier.

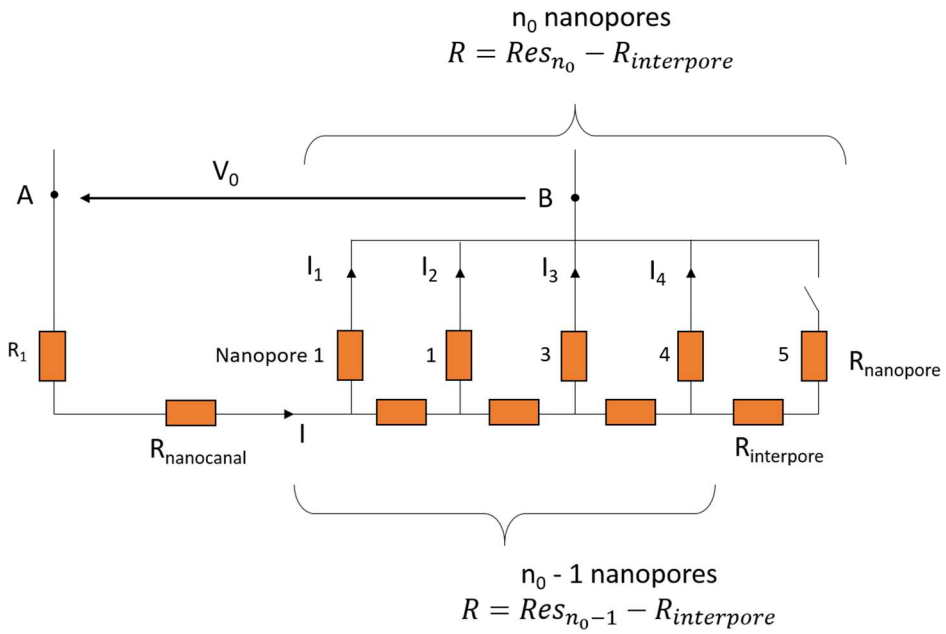


Figure 6 : schéma électrique montrant la configuration où le nanopore n°5 est scellé en premier.

Title:

Design and characterisation of a nanopores based device dedicated to the electrical recording of membrane ion channels activity

Abstract:

Ion channels are membrane proteins responsible for ion transport across biological membranes. Due to their ubiquity, they are promising drug targets but are not yet fully exploited as such due to experimental restrictions in their study.

Electrical measurement of ion channels activity within *in vitro* artificial lipid bilayers would enable to overcome these restrictions. However, there is not yet a system satisfying all the requirements for ion channels studies: stability and purity of the lipid bilayer, low noise level, fast insertion of ion channels, fluidic integration, ability to perform simultaneous optical characterization.

The aim of this phD was to assess in which extent the use of an SOI (Silicon On Insulator) substrate bearing nanopores could satisfy all these requirements. 10 nm to 160 nm diameter nanopores were fabricated in an SOI substrate and characterized. A transparent fluidic cell was used for fluidic addressing. This transparent cell allows combined electrical and optical characterization.

Electrical properties of the device in aqueous environment were studied, allowing to bring out improvement prospects. The combined electrical and optical characterization was demonstrated with fluorescent nanoparticle trapping experiments on the nanopores. Finally, promising results about the formation of a free-standing lipid bilayer are presented.

Keywords: Nanopores, SOI substrate, free-standing lipid bilayer, solid-supported lipid bilayer, nanoparticles, microfluidic integration, combined electrical and optical recording, biological ion channels.