



**HAL**  
open science

# Lithographie de surfaces isolantes par microscopie électrochimique pour l'immobilisation d'objets micro et nanométriques

Nadia Nadia.Ktari@espci.Fr Ktari

## ► To cite this version:

Nadia Nadia.Ktari@espci.Fr Ktari. Lithographie de surfaces isolantes par microscopie électrochimique pour l'immobilisation d'objets micro et nanométriques. Chimie analytique. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2011. Français. NNT : . pastel-00623048

**HAL Id: pastel-00623048**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00623048>**

Submitted on 13 Sep 2011

**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.

# THESE DE DOCTORAT

*Pour l'obtention du grade de*

**DOCTEUR DE**

**L'UNIVERSITE PARIS DIDEROT- PARIS 7**

Spécialité : Electrochimie

Ecole Doctorale : Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre (ED 388)

*Présentée par :*

**Nadia KTARI**

---

Lithographie de surfaces isolantes par microscopie électrochimique  
pour l'immobilisation d'objets micro et nanométriques

---

*Laboratoire Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation*



*Soutenue le 20 mai 2011, devant le jury composé de :*

Michel DELAMAR	Président
Julienne CHARLIER	Rapporteur
Fethi BADIOUI	Rapporteur
Zineb MEKHALIF	Examineur
Catherine COMBELLAS	Directrice de thèse
Frédéric KANOUI	Codirecteur de thèse

## LA VÉRITÉ

*Idéalisme et réalisme, je vous aime,  
Comme l'eau et la pierre vous êtes  
parties du monde,  
lumière et racine de l'arbre de la vie.*

.....

*La beauté, laissons-la danser  
avec ses courtisans les plus inacceptables,  
entre le plein jour et la nuit;  
ne la contraignons pas à avaler  
comme un médicament la pilule de vérité.*

*(Et le réel ? Il nous le faut, sans aucun doute,  
mais que ce soit pour nous grandir,  
pour nous rendre plus vastes, pour nous faire frémir,  
pour rédiger ce qui pour nous doit être  
l'ordre du pain tout autant que l'ordre de l'âme.)*

*Sussurez ! tel est mon ordre  
aux forêts pures,  
qu'elles disent en secret ce qui est leur secret,  
et à la vérité: Cesse donc de stagner,  
tu te durcis jusqu'au mensonge.  
Je ne suis pas recteur, je ne dirige rien,  
et voilà pourquoi j'accumule  
les erreurs de mon chant.*

*Poème de Pablo Neruda (1904-1973)*



*A ma mère,  
A la mémoire de mon père,*

*A la mémoire de mon grand père,*

*A Mohamed et  
A Rania.*



## Remerciements

*L'aboutissement de ces travaux de thèse n'a pu s'accomplir qu'à travers la participation et l'implication de nombreuses personnes. Je tiens à les remercier très sincèrement.*

*Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation (LSABM, ancien LECA) de l'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de la Ville de Paris (ESPCI). Je remercie Mme Marie-Claire Hennion de m'avoir accueillie dans son laboratoire.*

*Tout d'abord, je remercie sincèrement et profondément Catherine Combellas qui m'a accueillie dans son équipe depuis mon arrivée en France (en septembre 2005), qui m'a fait confiance et qui a su encadrer et diriger ce travail avec beaucoup de disponibilité et de rigueur. Je lui suis extrêmement reconnaissante pour son soutien scientifique et moral qui fut indéfectible durant toutes ces années passées ensemble!*

*Ce travail n'aurait pas pu avoir lieu sans Frédéric Kanoufi à qui j'adresse mes remerciements les plus respectueux. Sous sa codirection, j'ai pu apprécier sa grande compétence, la qualité de ses conseils et sa persévérance.*

*Je tiens à remercier Mme. Julienne Chalier et M. Fethi Bedioui de l'intérêt qu'ils ont apporté à mon travail en acceptant d'en être les rapporteurs.*

*Mes remerciements s'adressent également à M. Michel Delamar qui m'a fait l'honneur d'avoir présidé mon jury de thèse. Je le remercie aussi, par cette occasion, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire (ITODYS) comme ATER pour l'année 2010-2011. Je remercie également Mme Zineb Mekhalif d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je suis particulièrement reconnaissante envers Stéphanie Descroix pour son soutien incessant, mais aussi pour sa motivation sans faille sur mes travaux.*

*J'exprime aussi ma gratitude envers Pascal Poncet et Hélène Sénéchal, pour leur apport indispensable dans la réalisation et l'interprétation des expériences de*

*culture de cellules biologiques sur mes supports de polystyrène modifiés. Merci pour la grande disponibilité, la gentillesse et les judicieux conseils. Ce fut une belle collaboration !*

*Je remercie également Matthieu Piel et Ammar Azioune pour les applications biologiques sur les verres fluorés, Jean Michel Siaugue et Bruno Teste pour les nanoparticules, de nouveau, Julienne Charlier et Pascale Jégou pour les mesures XPS ainsi que Christian Frétigny et Bruno Bresson pour les mesures AFM.*

*Je tiens à remercier sans réserve tous les membres du laboratoire. Je remercie en particulier Jean Pinson que j'ai eu le privilège de connaître et côtoyer ainsi que Fetha Podvorica que je remercie de m'avoir accompagné durant de longues nuits à l'ESPCI. Je voudrai rendre hommage aux immenses qualités scientifiques et humaines de ces deux personnes qui font que de simples discussions deviennent de passionnants échanges.*

*Un grand merci à Sandra Nunige pour son amitié, sa bonne humeur et gentillesse. Merci surtout de m'avoir formé sur le SECM et pour ta grande contribution sur les verres fluorés.*

*Toutes mes amitiés vont aux anciens thésards et post-docs de l'équipe : Cyrine, Fanny, Tarek et Hassan. Une pensée particulière à mes amis, les prochains docteurs Avni et Sorin. Je n'oublie pas de remercier Jonathan le stagiaire que j'ai eu le plaisir d'encadrer.*

*Je remercie à présent, toute l'équipe nanoélectrochimie de l'ITODYS. Merci à M. Jean Christophe Lacroix pour son accueil et son précieux soutien. Mes pensées vont à Yacinte, Jallal, Pascal mais aussi à Laure et Louis. Merci à vous tous pour votre grand cœur et ouverture d'esprit. Merci pour cette dernière année passée en votre compagnie et surtout, merci d'avoir supporté un thésard en rédaction !*

*Marion et Sarra, vous êtes tombées dans ma vie tout simplement au bon moment. Je ne sais comment exprimer ma gratitude pour l'amitié, le soutien, l'aide et les conseils que vous m'avez prodigués et qui m'étaient indispensables pour trouver les derniers souffles.*



*Pour la gentillesse et le soutien témoigné par chacun au quotidien, j'adresse à tous toute ma reconnaissance et mon amitié et je leur souhaite une très bonne continuation.*

*Je voudrais à la fin remercier ma chère maman d'avoir accepté de prendre l'avion pour assister à ma soutenance et préparer par ses propres mains tous les délices de mon pot de thèse. Merci à toute ma famille et ma belle famille pour leur soutien affectueux. Merci à Aminatou pour son aide, sa compréhension et sa patience.*

*Enfin, merci à Mohamed, mon cher mari, qui depuis le début m'encourage et me soutient. Merci pour ta présence, merci pour ton amour ! Rania, mon ange, merci d'être mon rayon d'espoir quand je traverse des moments de doute. Un sourire de toi et ma vie prend sens.*



## TABLE DES MATIERES

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Etudes bibliographiques</b> .....	<b>4</b>
<b>I. La microscopie électrochimique à balayage (SECM)</b> .....	<b>4</b>
I.1. Principe .....	4
I.2. Les ultramicroélectrodes .....	5
I.3. Modes de fonctionnement du SECM .....	9
I.4. Fonctionnement du SECM en mode régénération ou « feedback » .....	11
I.4.1. Principe .....	11
I.4.2. Théorie .....	14
I.4.3. Importance du rayon adimensionnel RG .....	14
I.4.4. Cinétique hétérogène irréversible au substrat .....	16
I.4.5. Cinétique de réactions homogènes .....	19
I.5. Fonctionnalisation de surfaces par SECM .....	21
I.5.1. Génération localisée de réactifs à l'UME .....	23
I.5.2. Couplage de réactions homogènes et hétérogènes .....	27
I.5.3. Mode direct.....	29
I.6. La SECM : un bon outil de micro-fabrication de surfaces ? .....	30
<b>II. Fonctionnalisation de surface du polystyrène par oxydation</b> .....	<b>33</b>
II.1. Présentation.....	33
II.2. Traitement par plasma .....	34
II.2.1. Principe.....	34
II.2.2. Effets du traitement de surface par plasma .....	36
II.2.3. Oxydation de la surface du polystyrène par plasma .....	37
II.3. Photo-oxydation .....	40
II.4. Autres traitements d'irradiation .....	41
II.5. Impression .....	42
II.6. Traitement chimique par $O^{\bullet-}$ solvaté .....	43
II.7. Traitements électrochimiques.....	43
II.8. Comparaison des traitements de surface de polystyrène .....	45
<b>III. Fonctionnalisation de surface de monocouches auto-assemblées fluorées par réduction</b> .....	<b>48</b>
III.1. Présentation .....	48

III.2. Electrons solvatés .....	49
III.3. Solution de radicaux anions .....	50
III.4. Traitements par plasma .....	51
III.5. Autres traitements d'irradiation .....	51
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>52</b>

**Chapitre 2 : Fonctionnalisation localisée de couches auto-assemblées fluorées destinées à immobiliser sélectivement des entités chimiques ou biologiques .....70**

1. Introduction .....	70
2. Article .....	71
3. Supporting information .....	88
4. Analyse .....	89

**Chapitre 3 : Fonctionnalisation localisée de surfaces de polymères hydrogénés destinées à immobiliser sélectivement des entités biologiques ..... 92**

1. Introduction .....	92
2. Article .....	92
3. Supporting information .....	116
4. Analyse .....	119

**Chapitre 4 : Oxydation localisée du polystyrène par microscopie électrochimique .... 120**

1. Introduction .....	120
2. Article .....	120
3. Supporting information .....	138
4. Analyse .....	138

**Chapitre 5 : Immobilisation de nanoparticules sur des supports modifiés .....140**

1. Introduction bibliographique .....	140
2. Les nanoparticules fonctionnalisées cœur-coquille $\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ .....	141
3. Immobilisation de nanoparticules sur une surface « modèle » .....	143
3.1. Principe et intérêt .....	143
3.2. Préparation de la surface modifiée par électrogreffage des groupements carboxyliques .....	143
3.2.1. Choix du substrat .....	145
3.2.2. Greffage par voltamétrie cyclique .....	145
3.2.3. Greffage par chronoampérométrie .....	146
3.3. Caractérisation électrochimique de la surface modifiée .....	147

---

3.3.1. Sur électrode de carbone vitreux (CV).....	150
3.3.2. Sur électrode d'or .....	151
3.4. Autres caractérisations d'une surface d'or modifiée .....	152
3.4.1. Ellipsométrie .....	152
3.4.2. IRRAS (Infra Red Reflexion Absorption Spectroscopy) .....	153
3.4.3. Angles de contact - Etude de la réversibilité COOH/COO- sur une surface d'or greffée par l'acide benzoïque .....	154
3.5. Etude de l'immobilisation des nanoparticules .....	155
3.5.1. Caractérisation électrochimique de la surface modifiée .....	156
3.5.2. Autres caractérisations de la surface .....	157
3.6. Fonctionnalisation des nanoparticules .....	161
3.6.1. Introduction et principe .....	161
3.6.2. Fonctionnalisation par la fluorescéine .....	162
3.6.3. Fonctionnalisation par des nanoparticules .....	163
3.7. Rupture des interactions nanoparticules/substrat ?.....	169
4. Immobilisation de nanoparticules sur une surface de polystyrène modifiée .....	171
5. Conclusions et perspectives.....	172
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>178</b>
<b>Annexe 1 : Angles de contact et condensation .....</b>	<b>180</b>
<b>Annexe 2 : Ellipsométrie .....</b>	<b>183</b>
<b>Annexe 3 : Mode opératoire pour l'immobilisation de nanoparticules sur des supports modifiés .....</b>	<b>189</b>



## Introduction générale

---

Le contrôle des propriétés physico-chimiques de surface d'un matériau est d'une importance capitale tant sur le plan fondamental que pratique (cf prix Nobel Chimie 2007). L'étude des propriétés de surface et des traitements de surface permet, par exemple, d'améliorer les performances d'adhésion d'une surface tout en gardant les propriétés du volume. L'objet du traitement est souvent de fonctionnaliser chimiquement la surface du support pour permettre des interactions, telles que les liaisons électrostatiques, acide-base ou covalentes.

Le développement et la diversification des méthodes de traitement des surfaces de matériaux sont associés aux progrès des techniques d'analyse et d'imagerie de surface et d'extrême surface, qui permettent de comprendre les phénomènes induits par les traitements. D'une manière générale, les modifications de surface peuvent être réalisées par le biais d'une espèce réactive mise en contact avec le support, d'une irradiation par une source hautement énergétique ou d'une simple impression d'un autre matériau.

Dans de nombreuses applications, il est nécessaire de disposer de surfaces bigarrées qui contiennent des fonctionnalités chimiques variées sur des zones différentes de la surface. Dans ce domaine, les développements récents des technologies de la microélectronique ont permis de fabriquer des micro ou nano interfaces, bien définies et stables. La fabrication de circuits et de composants électroniques miniatures a été détournée dans de nombreux domaines de la physique, chimie ou biologie afin de produire des canaux, des chambres de réaction, des capteurs, et même des manipulateurs d'objets biologiques tels que des cellules ou de structures nanométriques telles que des nanoparticules. Beaucoup d'attention a été donnée à l'immobilisation de biomolécules sur des substrats polymères ou sur verre.

A côté de la photolithographie qui est la méthode la plus utilisée, d'autres techniques, comme la lithographie par faisceau d'ions ou d'électrons permettent de diminuer la taille des motifs (jusqu'à quelques dizaines de nanomètres). Ces techniques plus sophistiquées nécessitent un vide poussé et sont plus lentes que la photolithographie. Signalons d'autres méthodes plus récentes, d'usage déjà établi ou émergent, telles que les lithographies par micro- ou nano-impulsion, interférences, rayons X, ultraviolet lointain, magnétisme. L'inconvénient majeur de ces techniques est qu'elles nécessitent plusieurs étapes.

Les techniques de microscopie par sondes locales sont une alternative plus souple, dont l'inconvénient principal est la lenteur d'écriture. Pour une fabrication à grande échelle, on peut s'affranchir de ce défaut en utilisant des sondes tampons. Parmi les techniques par sondes locales, la microscopie électrochimique à balayage (SECM), a connu depuis ces deux dernières décennies un développement rapide. La SECM permet à la fois l'analyse et la modification de surface à l'échelle micrométrique. Le principe consiste à balayer une surface immergée dans un milieu électrolytique par une ultramicroélectrode (UME) maintenue à distance constante de la surface. L'UME est polarisée de façon à déclencher des réactions faradiques avec des espèces rédox présentes dans le milieu pour générer des espèces susceptibles de réagir avec la surface. La SECM est ainsi une méthode de gravure ou d'électrodéposition localisée. Elle permet également de caractériser la réactivité à l'échelle microscopique.

Dans cette thèse, nous envisagerons différentes stratégies de modifications locales de surfaces par SECM, pour introduire des groupements fonctionnels destinés à ancrer différentes entités telles que des cellules biologiques, des protéines ou des nanoparticules. Nous nous intéresserons, en particulier, au tracé de micromotifs sur des substrats de verre fluoré ou d'un polymère hydrogéné comme le polystyrène. Ces deux matériaux sont particulièrement intéressants pour la fabrication de microsystèmes dédiés aux applications biologiques, d'une part, du fait de leur biocompatibilité et de leur transparence optique et d'autre part, en raison de leur faible adhésion et de la possibilité de les modifier électrochimiquement. L'objectif est alors de les modifier localement de façon à générer un fort contraste de propriétés physico-chimiques (par exemple d'adhésion) entre le support vierge et le support modifié.

Le premier chapitre présente plusieurs études bibliographiques. Nous commencerons par un rappel théorique sur la microscopie électrochimique. Une attention particulière sera donnée à la description de cette technique comme un outil de microfabrication. Ensuite, nous rappellerons les propriétés physico-chimiques des deux matériaux principalement utilisés (le polystyrène et les monocouches auto-assemblées fluorées) ainsi que les différentes méthodes décrites pour fonctionnaliser ces surfaces.

Le deuxième chapitre concerne la fonctionnalisation localisée par SECM de couches auto-assemblées fluorées. C'est le sujet que nous avons abordé en premier, en continuité avec les travaux déjà entamés par l'équipe. L'ensemble des résultats fait l'objet d'un article publié en



2010 que nous présenterons dans ce chapitre. Après l'étape de la réduction du verre fluoré par des électrons solvatés générés à la microélectrode du SECM et de la caractérisation physico-chimique des motifs formés, la surface de ces motifs sera fonctionnalisée afin d'y immobiliser sélectivement des entités chimiques (fluorescéine et particules d'or) ou biologiques (des cellules humaines vivantes).

Le troisième chapitre présente un deuxième article récemment publié sur nos travaux de fonctionnalisation localisée de surfaces de polymères hydrogénés destinées à immobiliser sélectivement des entités biologiques. Notre objectif étant de fabriquer des supports discriminants vis-à-vis de l'adhésion cellulaire, nous choisirons le polystyrène comme support. Nous le modifierons localement par SECM par divers traitements oxydants visant à augmenter ses propriétés d'adhésion. L'efficacité du traitement sera contrôlée par des méthodes physiques de caractérisation de surface (XPS, FTIRRAS et mouillage). L'adhésion de protéines et de diverses cellules sera testée sur les supports lithographiés.

Dans le quatrième chapitre, nous nous pencherons sur la compréhension des étapes qui interviennent dans la cinétique d'oxydation du polystyrène, afin de proposer un mécanisme plausible au vu des données expérimentales. Pour cela, nous essayerons principalement de tirer parti des courbes d'approche par SECM d'une surface de polystyrène en utilisant des modèles décrits dans la littérature. Ces travaux font l'objet d'un article en cours de rédaction. Nous reproduisons dans ce chapitre la version courante.

Le cinquième chapitre traite de l'immobilisation de nanoparticules fonctionnalisées sur des surfaces modifiées. Notre objectif est d'appliquer cette immobilisation sur les surfaces de polystyrène que nous avons préalablement modifiées par SECM. Pour ce faire, nous nous intéresserons, dans un premier temps, à des surfaces conductrices que nous prendrons comme surfaces modèles. Ces surfaces seront modifiées par électrogreffage d'un sel de diazonium. Après caractérisation électrochimique et physique du film organique formé, les fonctions greffées seront mises à profit pour assembler une couche de nanoparticules. L'éventualité d'y assembler une deuxième couche sera rapidement testée.



# Chapitre 1 : Etudes bibliographiques : Microscopie électrochimique, Fonctionnalisation de surfaces du polystyrène et de monocouches auto-assemblées fluorées

---

## **I. La microscopie électrochimique à balayage (SECM)**

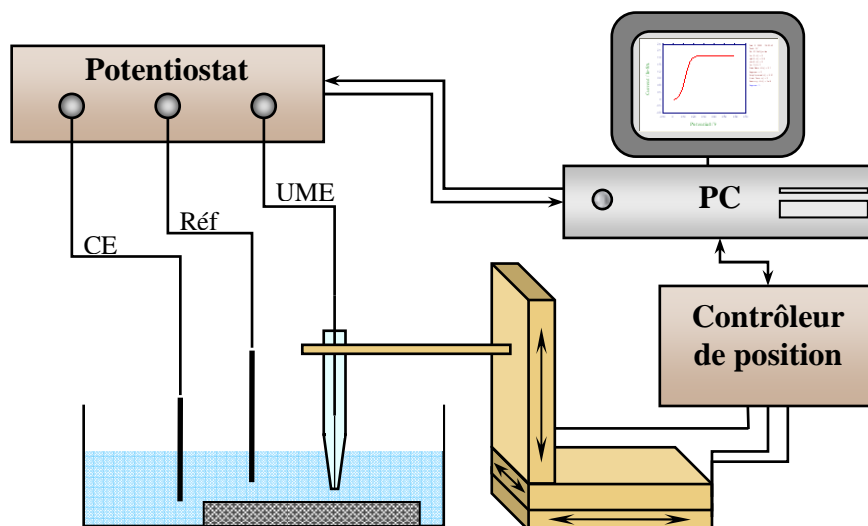
La microscopie électrochimique à balayage, SECM pour «Scanning Electrochemical Microscopy », est une technique de microscopie à sonde locale (SPM) comme les microscopies à force atomique et à effet tunnel.

Deux principales études sont à l'origine de cette technique qui remonte à la fin des années 80. La première, parue en 1986, est celle d'Engstrom et al. [1] qui sont parvenus à approcher une ultramicroélectrode de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre d'une microélectrode classique de 1 mm de diamètre à une distance de 5  $\mu\text{m}$ . Ainsi, ils ont pu sonder des réponses ampérométriques dans la couche de diffusion de la microélectrode millimétrique. Parallèlement, la même année, Bard et al. [2] ont développé une technique similaire afin d'étudier la réponse électrochimique d'un couple rédox réversible. Ce n'est qu'en 1989 que Bard [3, 4] propose la dénomination de Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) en publiant plusieurs travaux décrivant la technique et sa théorie. Depuis, le nombre de travaux mettant en œuvre cette technique ne cesse d'augmenter et un ouvrage de référence [5] et plusieurs revues [6-8] et chapitres de livres [9-13] lui sont consacrés.

Pendant les dix dernières années, la recherche a été en partie consacrée à améliorer la résolution globale de la SECM pour, d'une part, examiner des phénomènes de surface à une échelle nanométrique (sur des cellules vivantes ou à travers différentes interfaces) et d'autre part, micro-fonctionnaliser différentes surfaces.

### **I.1. Principe**

le principe de fonctionnement [5] du SECM consiste à approcher une ultramicroélectrode (UME) [14] d'une surface, dite substrat, l'ensemble étant immergé dans une solution contenant une espèce rédox (couple Red/Ox) responsable d'un courant faradique. La présence de ce substrat perturbe la réponse électrochimique à la sonde, fournissant ainsi des informations sur la nature et les propriétés du substrat.



**Figure 1 :** Schéma de principe d'un SECM

Le dispositif de microscopie électrochimique est schématisé sur la figure 1. Il est constitué de :

- un système à 2 ou 3 électrodes : une électrode de travail (UME), une contre-électrode et éventuellement une électrode de référence.
- un système de positionnement (platines micrométriques motorisées symbolisées par les flèches sur le schéma) permettant le déplacement relatif de la microélectrode par rapport au substrat dans les trois directions de l'espace.
- un potentiostat ou bipotentiostat afin de contrôler ou mesurer le potentiel et le courant à la sonde et/ou au substrat.

Les sondes locales du SECM étant constituées d'UME, nous allons en présenter les principales caractéristiques.

## **I.2. Les ultramicroélectrodes**

Inventées par Christian Amatore et Mark Wightman au cours des années 70-80 [14, 15] , les microélectrodes appelées aussi ultramicroélectrodes (UME) continuent à être développées et optimisées [9, 16-28]. Leur développement s'associe, entre autres, à celui des techniques de mesure de courants très faibles.

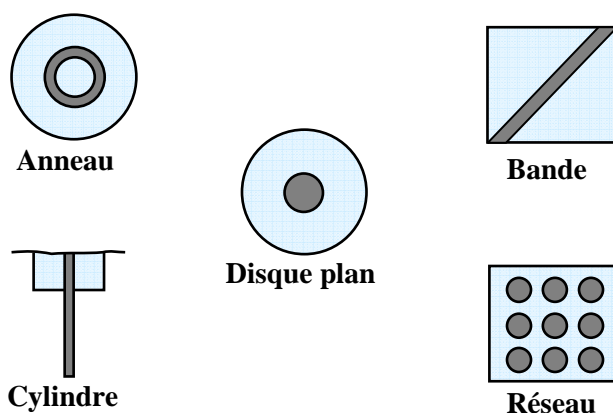
On appelle ultramicroélectrode une électrode dont au moins une des dimensions caractéristiques est suffisamment faible (typiquement inférieure à quelques dizaines de micromètres) pour permettre l'établissement d'un régime de diffusion stationnaire à

l'électrode. Les UME ont permis d'effectuer des mesures électrochimiques qui se seraient révélées difficiles, voire impossibles, avec des électrodes millimétriques classiques. Leurs faibles dimensions permettent de réaliser des mesures électrochimiques dans des petits volumes (dans une goutte de quelques microlitres ou de dizaines de microlitres [29] ou dans des canaux microfluidiques [30]) ou de sonder des zones localisées [31].

En outre, les UME ont permis de grands progrès dans le domaine de la microbiologie et des microdispositifs médicaux. Elles sont capables de mesurer de très faibles concentrations de molécules dans et hors de la cellule [31, 32]. Des électrodes, d'environ un micron de diamètre ont permis de mettre au point la méthode dite de la « synapse artificielle » [33], qui est utilisée pour quantifier les petites molécules libérées, par exemple, au niveau d'une jonction, ou synapse, entre deux neurones du système nerveux.

### Différentes formes de microélectrodes

Les UME sont de différentes natures et formes. Selon Forester [34], on peut en définir cinq principaux types illustrés sur la figure 2.



**Figure 2 :** Schémas des formes les plus connues des UME.

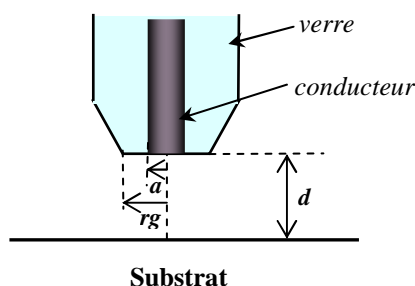
Parmi ces différentes formes, le disque plan reste le type d'électrode le plus utilisé [35]. Ces dernières années, les UME réseaux [9, 20-23, 25-27, 36] (UMEA, pour ultramicroélectrodes arrays) ont connu un réel essor et sont de plus en plus utilisées. Lorsque les électrodes comprenant le réseau sont suffisamment espacées, la réponse électrochimique d'une UMEA est celle d'une UME simple multipliée par le nombre total d'électrodes [26, 36, 37]. Leur principale caractéristique est l'alliance de tous les avantages des UME avec un rapport signal sur bruit beaucoup plus important et donc une amplification de la réponse électrochimique. En effet, les UME de très faibles dimensions produisent un signal trop faible

(de l'ordre du nanoampère à picoampère) et facilement bruité pour que l'espèce active ne soit pas toujours correctement détectée.

Afin de profiter de leurs avantages uniques, plusieurs études ont mis en œuvre des électrodes nanométriques [38]. Ces électrodes peuvent être de différentes formes. Toutefois, leur fabrication et leur manipulation sont délicates et nécessitent des équipements et une maîtrise spécifiques.

Les microélectrodes utilisées en SECM peuvent être ampérométriques ou potentiométriques. Dans le premier cas, ce sont les UME disque plan qui sont utilisées en grande majorité. Afin d'augmenter leur surface active, certaines études originales ont impliqué des UME disque plan modifiées par des nanoparticules métalliques [19]. Dans le deuxième cas, aux UME disque plan qu'on modifie pour former une sonde sélective (exemple : sonde de pH [39]), s'ajoutent les micro-pipettes. La plus utilisée parmi ces dernières est la microélectrode sélective ionique (ou ISME, « Ion-Selective Micro-Electrode ») à membrane liquide [40].

Dans le cadre de ce mémoire, seules des UME disque plan ont été utilisées. Celles-ci sont constituées d'un disque plan conducteur, obtenu par polissage de la section d'un conducteur de rayon  $a$  (fil de platine de  $25\mu\text{m}$  de diamètre, par exemple) scellé dans un capillaire de verre de rayon  $r_g$  (cf. figure 3)

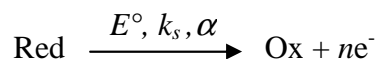


**Figure 3 :** *Shéma d'une UME disque plan*

### Un régime de diffusion stationnaire

L'épaisseur de la couche de diffusion d'une UME ne dépend que de la géométrie de cette dernière. Elle atteint rapidement des valeurs supérieures au rayon de l'électrode en raison de la diffusion latérale (effet de bord, négligeable pour une électrode millimétrique). On observe ainsi une forme hémisphérique des processus de diffusion à une microélectrode, d'où l'établissement d'un régime stationnaire sans contribution de la convection (un sel de fond dans l'électrolyte permet de s'affranchir du transport par migration).

Intéressons-nous maintenant au cas d'une UME immergée dans une solution contenant un électrolyte support et un médiateur rédox sous sa forme réduite *Red* à une concentration  $C^{\circ}_{Red}$ . Dans la solution sont immergées également une contre-électrode et une électrode de référence permettant, grâce à un potentiostat, d'appliquer à l'UME un potentiel suffisant pour que l'espèce rédox soit oxydée. La réaction d'échange d'électron qui se produit à l'électrode est alors :



avec  $E^{\circ}$ , le potentiel standard du couple rédox,  $k_s$ , la constante de vitesse de transfert électronique hétérogène et  $\alpha$ , le coefficient de transfert pris égal à 0,5.

Le balayage en potentiel de l'UME, pour des vitesses de balayage suffisamment faibles, permet la mesure, que le transfert d'électron soit Nernstien ou non, d'un courant dont la valeur limite est totalement contrôlée par la vitesse de transfert de masse par diffusion de l'espèce *Red* depuis le cœur de la solution jusqu'à la surface de la microélectrode. Ce courant de plateau, dit courant stationnaire à l'infini ( $i_{T,inf}$ ) dépend de la géométrie de l'UME et est obtenu lorsque la microélectrode est loin de toute surface. Il est donné, dans le cas d'une électrode disque plan, par la formule suivante :

$$i_{T,inf} = 4nFDaC^{\circ}_{Red} \quad \text{éq. 1}$$

L'indice T représente « tip », sonde.

avec :  $n$  le nombre d'électrons échangés lors de la réaction redox,

$F$  la constante de Faraday,

$D$  le coefficient de diffusion de l'espèce *Red*,

$C^{\circ}_{Red}$  la concentration de l'espèce *Red* présente en solution,

$a$  le rayon de l'ultramicroélectrode.

Pour une UME de faible dimension, ce courant est atteint en un temps très court ( $\sim a^2/D$ ). Par exemple, en travaillant dans une solution aqueuse de ferrocyanure ( $D \sim 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ), un temps de 0.3 s est suffisant pour qu'une électrode de 25  $\mu\text{m}$  de diamètre atteigne le régime stationnaire. L'expression du courant stationnaire à une UME (éq.1) ouvre une nouvelle application aux méthodes d'analyse électrochimique en raison de plusieurs avantages :

### Une grande sensibilité

Comme le courant est proportionnel au rayon de l'UME et non à sa surface, tandis que le bruit est proportionnel à la surface de l'UME, la densité de courant et le rapport signal sur bruit sont inversement proportionnels au rayon de l'électrode. La sensibilité est donc d'autant plus

élevée que le rayon de l'électrode est plus petit. Du fait de la forte sensibilité de l'UME, on peut étudier des espèces de faible concentration, par exemple inférieure à  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (détection limite pour des électrodes millimétriques [41]).

#### Une faible chute ohmique

La chute ohmique est le produit de la résistance de la solution par le courant faradique qui est proportionnel au rayon de l'UME. Le transport des molécules se produisant dans la couche de diffusion, les variations de concentrations sont limitées à des distances de l'ordre du rayon de l'électrode. Ainsi, la chute ohmique a une valeur très faible. Ceci permet des mesures de bonne qualité dans des milieux très concentrés, voire non dilués, ou des milieux très résistifs tels que les solvants visqueux (gels, polymères [42]) ou de constante diélectrique faible (toluène [43], huiles et lubrifiants [44]), ou encore dans des solutions électrolytiques non miscibles [45]. De plus, un montage à trois électrodes n'est souvent plus nécessaire.

#### Une faible constante de temps

La constante de temps ( $t$ ) s'exprime par :

$$t = RC \quad \text{éq. 2}$$

avec :  $R$  la résistance de la solution et  $C$  la capacité de double couche.

La microélectrode, utilisée en tant qu'électrode de travail, a une petite taille en comparaison avec la contre-électrode. La résistance ( $R$ ) est proportionnelle à la résistivité de la solution et inversement proportionnelle au rayon de l'UME :

$$R \propto \rho/a \quad \text{éq.3}$$

avec :  $\rho$  la résistivité de l'électrolyte et  $a$  le rayon de l'UME [46].

D'autre part, la capacité de la double couche  $C$  est proportionnelle à la surface de l'UME donc au carré du rayon de la microélectrode.

En conséquence, la constante de temps de charge de la double couche est proportionnelle au rayon  $a$  de la microélectrode et reste relativement faible. Les courants de charge de la double couche sont donc rapidement négligeables par rapport au courant faradique.

La faible constante de temps permet d'étudier des cinétiques rapides en utilisant la voltamétrie cyclique avec des vitesses de balayage élevées (quelques mégavolts par seconde) [47].

### **I.3. Modes de fonctionnement du SECM**

Le microscope électrochimique à balayage (SECM) permet de manipuler une UME afin de caractériser des surfaces par imagerie de zones électroactives ou non [48, 49], et également



d'obtenir des informations concernant la nature chimique et électrochimique des espèces liées au substrat en investiguant les réactions se produisant à la surface de l'échantillon [50]. Elle permet aussi la modification au niveau local des échantillons via l'électrodissolution [51] ou l'électrodéposition [52-54]. Ainsi, les progrès dans la miniaturisation et dans la diversification des microélectrodes offrent un champ d'application de plus en plus vaste dans de nombreux domaines tels que la corrosion [55-57], la biologie [58, 59] ou encore la science des matériaux [60, 61].

Ces différentes applications reposent sur différents modes du SECM. Pour tous ces modes, le contrôle de la distance substrat-UME ( $d$ ), la taille et la forme de la microélectrode est primordial. Les principaux modes du SECM sont :

- le mode régénération ou « feedback » :

C'est le mode le plus utilisé en microscopie électrochimique depuis sa description en 1989 [4] ; il est à l'origine d'un grand nombre d'applications. Il sera étudié en détail dans la partie 4 car c'est le seul mode que nous avons utilisé.

- le mode générateur/collecteur :

Pour ce mode, le substrat et l'UME sont connectés à un bipotentiostat qui enregistre aussi bien la réponse électrochimique à l'UME que celle au substrat. Ce mode existe sous deux formes de fonctionnement: TG/SC (« Tip Generation/Substrate Collection ») et SG/TC (« Substrate Generation/Tip Collection »).

Dans le premier cas, l'UME génère des espèces redox qui diffusent vers le substrat où elles sont collectées et/ou détectées. Généralement, les dimensions du substrat sont beaucoup plus grandes que celles de la sonde, de façon à ce que l'efficacité de la collecte (rapport entre le courant au substrat et le courant à la sonde) soit proche de 1 en l'absence de réaction chimique couplée au transfert de charge. Si l'espèce produite réagit dans la zone entre la sonde et le substrat, le rapport des deux courants diminue quand la distance substrat-UME,  $d$ , devient plus faible. Sa variation en fonction de la distance entre la sonde et le substrat permet ainsi de déterminer la constante de vitesse de la réaction homogène.

Ce mode a été utilisé par A.J. Bard et al. pour déterminer les constantes de vitesse de la réduction irréversible de l'oxygène sur platine en milieu acide [62] et plus récemment par LeSuer et al. pour étudier la cinétique du transfert électronique de l'oxydation du di-*tert*-butyl nitroxyde dans l'acétonitrile [63].

Pour le mode SG/TC, les rôles des deux électrodes sont inversés : le substrat joue le rôle de générateur d'espèces électroactives et l'UME celui de collecteur de ce qui est généré au substrat. L'UME peut être une sonde ampérométrique pour cartographier, par exemple, les

sites électroactifs d'une surface (étude d'une corrosion localisée [56]). L'UME peut être aussi une sonde potentiométrique qui permet l'étude de profils de concentration d'une espèce cible déterminant le potentiel (à la manière d'une macro-pipette).

- le mode pénétration :

Comme le nom l'indique, une UME fonctionnant sous ce mode pénètre dans une microstructure de matière molle, par exemple un film mince de polymère contenant une espèce rédox (comme des cellules biologiques ou des liposomes). Ainsi, tout au long de son trajet, l'UME collecte des informations sur la variation de la réponse électrochimique. Ceci permet de tracer des profils de concentration, de cinétique et de paramètres de transport de matière à l'intérieur du film, de réactivité chimique en fonction de l'épaisseur ou de la profondeur.

- le mode direct :

Le mode direct de la SECM consiste à approcher une UME jouant le rôle de contre-électrode d'un substrat conducteur opérant en tant qu'électrode de travail. Utiliser une contre électrode de taille réduite permet de localiser et focaliser les lignes de champ électrique entre l'UME et le substrat. Ceci implique de minimiser la distance UME/substrat et de choisir une UME de petite dimension si l'on souhaite créer des motifs microstructurés avec la meilleure résolution possible. La réaction électrochimique est alors focalisée sur un domaine micro- voire nanométrique. La durée de la réaction est également un paramètre très important à contrôler pour obtenir une bonne résolution et éviter l'expansion latérale de la modification.

Ce mode, réservé aux échantillons conducteurs, est utilisé pour fonctionnaliser des surfaces par électroreffage localisé ou par modification locale de la surface comme c'est décrit plus loin.

## **I.4. Fonctionnement du SECM en mode régénération ou « feedback »**

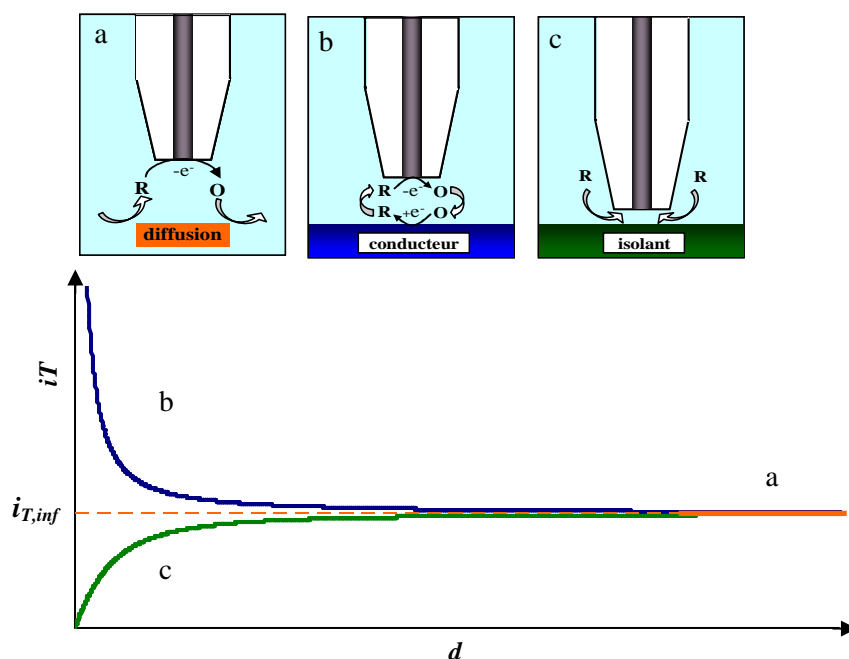
### **I.4.1. Principe**

En mode régénération, une UME est placée au-dessus du substrat dans une solution contenant l'une des formes, oxydée ou réduite, d'une espèce électroactive, ayant le rôle de médiateur. Le couple redox du médiateur doit présenter une réversibilité électrochimique afin d'être régénéré à la microélectrode et éventuellement au substrat. Le choix du couple redox utilisé dépend des propriétés thermodynamiques et cinétiques du processus électrochimique à la surface.

Lorsque la distance  $d$  séparant l'UME du substrat est supérieure à l'épaisseur de la couche de diffusion (au moins 10 fois le rayon de l'UME), le courant de plateau stationnaire circulant à travers l'UME n'est pas affecté et vaut  $i_{T,inf}$  (Figure 4a). En revanche, lorsque l'UME s'approche du substrat et que la distance séparant l'UME de la surface devient inférieure à l'épaisseur de la couche de diffusion, celle-ci est alors perturbée par la présence de la surface. L'influence de cette perturbation sur l'intensité du courant dépend de la nature du substrat selon que le substrat peut interagir ou non avec l'espèce électrogénérée à l'UME. Ainsi, la mesure de la variation de courant à l'UME ( $i_T$ ) en fonction de  $d$  permet l'étude de la réactivité du substrat.

D'une manière générale, deux cas limites correspondent à cette variation du courant stationnaire :

- soit le courant augmente ( $i_T > i_{T,inf}$ ) lorsque  $d$  décroît, c'est le cas pour une surface conductrice (Figure 4b),
- soit le courant diminue ( $i_T < i_{T,inf}$ ) lorsque  $d$  décroît, c'est le cas pour une surface isolante (Figure 4c).



**Figure 4** : Courbes d'approche représentant le courant mesuré à l'UME en fonction de la distance entre l'UME et la surface du substrat pour différentes surfaces. a) Le courant à l'infini. b) Cas d'une surface conductrice, régénération positive. c) Cas d'une surface isolante, régénération négative.

Dans le premier cas limite présenté en Figure 4b, la surface conductrice régénère l'espèce *Red*, à partir de l'espèce *Ox* produite à l'UME, de manière infiniment rapide devant la vitesse de diffusion du médiateur en solution. Les espèces *Red* nouvellement régénérées à la surface

retournent ensuite s'oxyder en  $Ox$  à l'UME. Le cycle effectué par les espèces rédox amplifie donc le courant qui circule dans l'UME. En outre, plus la distance UME-surface diminue, plus la boucle du cycle à parcourir par le médiateur rédox est courte, et plus le courant est intense. Ce phénomène d'amplification du courant collecté à l'UME est appelé la régénération positive (« *positive feedback* »).

Dans le second cas limite présenté en Figure 4c, la surface est isolante ou chimiquement inerte et ne permet pas la régénération de l'espèce  $Red$  oxydée à l'UME. La diffusion des espèces rédox vers la microélectrode est d'autant plus gênée par le corps isolant de l'UME et la surface isolante que la distance d'approche se réduit, engendrant une diminution du courant collecté à l'UME. Ce phénomène est appelé la régénération négative, « *negative feedback* ».

Les courbes b et c ont été établies en considérant que 1) le processus n'est limité que par la vitesse de diffusion des espèces dans l'espace compris entre l'UME et le substrat, 2) le substrat présente une réactivité uniforme avec des dimensions bien plus grandes que celle du rayon de l'UME et 3) les coefficients de diffusion du médiateur redox sous ses deux formes ( $Ox$  et  $Red$ ) sont identiques.

Dans le cas d'une réduction à l'UME, on observe les mêmes phénomènes avec l'espèce  $Red$  qui est produite à l'électrode et l'espèce  $Ox$  qui est régénérée à la surface conductrice.

Le fonctionnement du SECM repose donc, soit sur un phénomène de régénération des espèces rédox transformées à l'UME, amplifiant le courant mesuré, soit sur un blocage des espèces diffusant à l'UME, diminuant alors le courant mesuré. Dans chacun des cas, le mode de fonctionnement du SECM est désigné par la régénération ampérométrique (« *amperometric feedback* »).

Lorsque le processus chimique n'est plus limité par uniquement le phénomène de diffusion, mais aussi par la cinétique de transfert de charge entre le médiateur et la surface du substrat, on observe un cas intermédiaire qui se traduit par une réponse d'allure intermédiaire entre les deux cas limites d'isolant et conducteur purs. C'est ce qui se produit lorsqu'un substrat présente une réactivité finie vis à vis du médiateur, dont il régénère la forme initiale ( $Red$  quand il s'agit d'une oxydation comme c'est le cas sur la figure 4 ou  $Ox$  dans le cas contraire) à une vitesse finie  $V_{b,s}$  (en  $s^{-1}$ ). Cette vitesse est reliée à une constante de vitesse de transfert d'électron hétérogène  $k_{b,s}$  (en  $cm/s$ ), par :

$$V_{b,s} = k_{b,s} / a \quad \text{éq. 4}$$

Les deux cas limites précédemment décrits correspondent à  $k_{b,s} \longrightarrow \infty$  pour une surface conductrice idéale et  $k_{b,s} \longrightarrow 0$  pour une surface isolante idéale. Plus la valeur de  $k_{b,s}$  est élevée, plus l'allure de la réponse tend vers celle du conducteur (régénération de  $Red$  rapide).

Inversement, plus  $k_{p,s}$  est faible, plus l'allure ressemble au feedback négatif observé sur isolant pur.

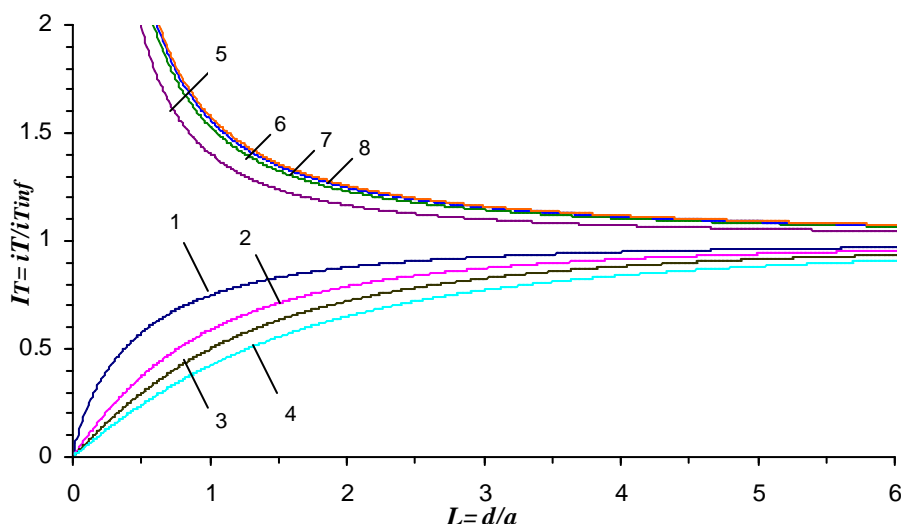
#### I.4.2. Théorie

Le premier traitement théorique du mode régénération ampérométrique, réalisé par Kwak et Bard [4] à la fin des années 90, porte sur la simulation par éléments finis d'un processus électrochimique contrôlé par la diffusion. Cette théorie a été reprise largement pour interpréter quantitativement de nombreuses études électrochimiques utilisant le SECM [5].

La complexité de la théorie du SECM provient de la forme hémisphérique de la couche de diffusion de l'UME. La théorie rigoureuse consiste à résoudre numériquement les équations de diffusion (en termes d'équations partielles ou intégrales multidimensionnelles). Des approximations analytiques, permettant de reproduire le plus fidèlement possible la résolution théorique de ces équations, continuent à être développées et optimisées [6].

#### I.4.3. Importance du rayon adimensionnel RG

Pendant l'approche perpendiculaire (direction  $z$ ) d'un substrat par une UME en mode régénération, une courbe d'approche est tracée. Elle traduit l'évolution du courant récolté par l'UME en fonction de la distance  $d$  séparant l'UME du substrat. Ces courbes sont généralement représentées sous forme adimensionnelle, c'est-à-dire sous forme du courant normalisé  $I_T = i_T / i_{T,inf}$  en fonction de la distance normalisée  $L = d / a$ . Ainsi, les courbes d'approche sont indépendantes du diamètre de l'électrode, du coefficient de diffusion, de la concentration du médiateur et de la vitesse d'approche (tant que celle-ci n'induit pas de transport convectif de matière ( $v < 5 \mu\text{m/s}$ )). Elles restent néanmoins sensibles [4, 10, 11], notamment dans le cas de substrats isolants, au rayon adimensionnel de l'UME (noté RG),  $RG = \frac{rg}{a}$  où  $rg$  est le rayon total de l'électrode (partie conductrice + partie isolante, cf. figure 3).



**Figure 5 :** Courbes d'approche théoriques pour une régénération négative (courbes 1–4) et une régénération positive (courbes 5–8) du médiateur à la surface du substrat pour des valeurs de RG de 1 (courbes 1 et 5), 5 (2 et 6), 10 (3 et 7) et 20 (4 et 8). Ces courbes sont tracées selon les équations approximatives mentionnées ci-dessous.

En effet, lorsque l'UME s'approche de l'échantillon, le corps isolant de l'UME et la surface de l'échantillon forment une cellule en couche mince ouverte. Lorsque la taille du corps isolant augmente, la diffusion du médiateur du sein de la solution vers l'UME est plus gênée, ce qui induit une diminution du courant à l'électrode,  $i_T$ . En conséquence et comme c'est décrit sur la figure 6, dans le cas d'un échantillon isolant et pour une distance normalisée  $L$  fixée, à un RG plus élevé correspond un courant normalisé  $I_T$  plus faible. L'effet est moins important sur un échantillon conducteur.

De plus il a été démontré depuis 1984 [64] que pour des faibles valeurs de RG, le courant limite de diffusion à une UME ( $i_{T,inf}$ ) devient plus important que la valeur donnée par l'équation 1, à cause de la rétrodiffusion du médiateur. Plus tard, des expressions approximatives corrigées ont été proposées puis comparées [6, 65-67]. Le courant dans l'équation 1 est multiplié par un facteur de correction dépendant de RG.

Plusieurs solutions approchées de courbes d'approche ont été publiées (pour les deux modes de régénération) prenant la distance substrat-UME comme unique variable [5, 68-70]. Ces expressions analytiques sont obtenues par des simulations mathématiques de 4 à 7 paramètres à ajuster selon une valeur de RG donnée.

Récemment, Lefrou [66] a proposé pour chaque mode de régénération une expression analytique unifiée à deux variables (RG et  $L$ ).

Pour un conducteur pur :

$$I_T^{\text{cond}}(L, RG) \approx \alpha(RG) + \frac{1}{\beta(RG)} \frac{\pi}{4 \text{ArcTan} L} + \left(1 - \alpha(RG) - \frac{1}{2\beta(RG)}\right) \frac{2}{\pi} \text{ArcTan} L \quad \text{éq. 5}$$

Avec :

$$\alpha(RG) = \ln 2 \left(1 - \frac{2}{\pi} \text{ArcCos} \frac{1}{RG}\right) - \ln 2 \left[1 - \left(\frac{2}{\pi} \text{ArcCos} \frac{1}{RG}\right)^2\right] \quad \text{éq. 6}$$

$$\beta(RG) = 1 + 0.639 \left(1 - \frac{2}{\pi} \text{ArcCos} \frac{1}{RG}\right) - 0.186 \left[1 - \left(\frac{2}{\pi} \text{ArcCos} \frac{1}{RG}\right)^2\right] \quad \text{éq. 7}$$

valable (avec un pourcentages d'erreur inférieur à 2%) pour toute distance substrat-électrode et pour tout RG.

Pour un  $RG > 10$ , l'équation 5 peut être écrite plus simplement :

$$I_T^{\text{cond}}(L, RG) \approx \ln 2 + \frac{\pi}{4 \text{ArcTan} L} + \left(\frac{1}{2} - \ln 2\right) \frac{2}{\pi} \text{ArcTan} L \quad \text{éq. 8}$$

Dans le cas de la régénération négative

$$I_T^{\text{ins}}(L, RG) \approx \frac{\frac{2.08}{RG^{0.358}} \left(L - \frac{0.145}{RG}\right) + 1.585}{\left(\frac{2.08}{RG^{0.358}} (L + 0.0023 RG) + 1.57 + \frac{\ln RG}{L} + \frac{2}{\pi RG} \ln\left(1 + \frac{\pi RG}{2L}\right)\right)} \quad \text{éq. 9}$$

valable (avec un pourcentages d'erreur inférieur à 1%) pour toute distance substrat-électrode et pour  $RG < 200$ .

Quelques courbes d'approche, illustrées sur la figure 5, sont tracées pour chaque cas à partir de ces dernières équations en faisant varier le rayon adimensionnel, RG.

Ces courbes d'approche théoriques sont utiles en pratique. En ajustant, par exemple, une courbe expérimentale courant-distance à une courbe théorique correspondant au même RG, on peut déterminer correctement le point du contact réel entre l'UME (souvent par la partie isolante) et le substrat, et surtout estimer dans les mesures quantitatives ultérieures la distance  $d$  séparant l'UME du substrat. Ceci n'est en revanche réalisable qu'en se plaçant dans le cas de régénération négative ou positive pure.

#### I.4.4. Cinétique hétérogène irréversible au substrat

Dans le cas où la vitesse de transfert de charge hétérogène au substrat ( $V_{b,s}$ ) n'est pas négligeable et intervient dans la cinétique du processus, la résolution des équations de diffusion a permis l'établissement des courbes d'approche théoriques pour différentes valeurs de  $k_{b,s}$ .

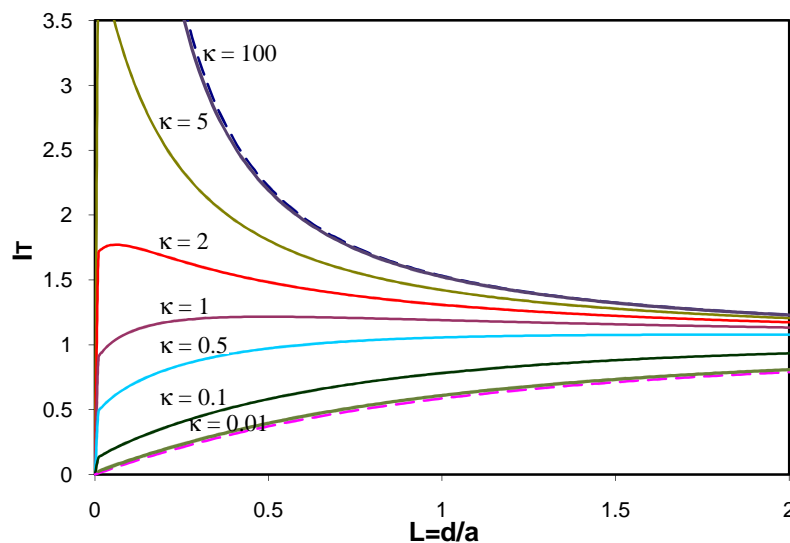
En 2008 [6, 71], Lefrou a également publié une approximation analytique générale valable pour tous les cas intermédiaires faisant intervenir un transfert de charge hétérogène de premier ordre entre le médiateur et la surface du substrat.

$$I_T(L, RG, \kappa) \approx I_T^{\text{cond}}\left(L + \frac{1}{\kappa}, RG\right) + \frac{I_T^{\text{ins}}(L, RG) - 1}{(1 + 2.47 RG^{0.31} L \kappa)(1 + L^{0.006RG+0.113} \kappa^{-0.0236RG+0.91})} \quad \text{éq. 10}$$

On constate que cette équation fait intervenir, en plus de  $L$  et  $RG$ , un paramètre adimensionnel  $\kappa$  qui reflète la vitesse de régénération du médiateur par le substrat. Plus quantitativement,  $\kappa$  est défini comme le rapport entre la vitesse de transfert électronique hétérogène à la surface du substrat ( $V_{b,s}$ ) et la vitesse de diffusion du médiateur ( $V_{diff}$ ), définie par  $V_{diff} = D / a^2$  ; compte tenu de l'équation 4, on a donc :

$$\kappa = \frac{k_{b,s} a}{D} \quad \text{éq. 11}$$

Un faisceau de courbes d'approche, pour différentes valeurs de  $\kappa$ , est donné dans la figure 6.



**Figure 6 :** Courbes d'approche théoriques d'une UME (disque plan) approchant une surface. Ces courbes sont calculées pour  $RG = 5$  et pour différentes valeurs de  $\kappa$  (indiquées au-dessus de chaque courbe). Les deux courbes en pointillés situées au-dessus et en dessous des courbes en trait plein sont les cas limites, où le substrat est respectivement à régénération purement positive et purement négative.

L'aspect des courbes d'approche dépend de la valeur exacte de  $\kappa$ . On constate que selon cette valeur, et donc suivant les valeurs respectives de  $k_{b,s}$ ,  $a$  et  $D$ , on peut passer d'un phénomène de régénération purement positive à un phénomène de régénération purement négative. L'ajustement d'une courbe d'approche expérimentale à une courbe théorique et l'analyse fine



de ce type de courbe permettent la détermination de  $k_{b,s}$  pour  $a$  et  $D$  donnés et donc la quantification de la réactivité du substrat. Cependant, et comme on peut le voir sur la figure 6, les deux cas limites décrits précédemment (ici en pointillé), surface isolante ou conductrice à régénération rapide, sont quasi-identiques à  $\kappa = 10^{-2}$  et  $\kappa = 10^2$  respectivement. Le domaine de réactivité d'un substrat que l'on peut estimer par cette méthode est alors limité entre  $\kappa = 10^{-2}$  et  $\kappa = 10^2$ .

Une nouvelle voie a été proposée en 2007 [72] pour analyser aisément des cinétiques de réactions rapides et irréversibles au substrat. Le paramètre de cinétique adimensionnel  $\kappa$  est dans ce cas déterminé par simple mesure de la variation entre la courbe d'approche obtenue et la courbe de régénération purement positive. Cette méthode paraît prometteuse car elle permettrait, grâce à l'équation 12, d'analyser la cinétique en ne tenant pratiquement pas compte du rayon adimensionnel  $RG$ , ce qui n'était pas le cas pour les analyses précédemment proposées :

$$I_T(L, \kappa) \approx I_T^{\text{cond}} \left( L + \frac{1}{\kappa} \right) \quad \text{éq. 12}$$

Cette équation permet la détermination précise de  $\kappa$  pour des valeurs comprises entre 2 et 100, pourvu que les valeurs de  $L$  choisies soient entre 0.2 et 1, qui est une gamme expérimentale habituelle en SECM. D'ailleurs, comme le montre la Figure 6, même en utilisant l'équation 10, une constante de transfert de charge rapide ne peut pas être mesurée quand l'UME est loin du substrat. Elle peut, en revanche, être déterminée à une distance  $d$  suffisamment faible (typiquement pour  $L < 1$ ).

Ainsi, le SECM avec une UME de taille micrométrique a permis de mesurer plusieurs constantes de transfert rapides ( $k_{b,s} > 1$  cm/s). [73-75] Plus récemment, des électrodes nanométriques ont été utilisées de la même façon pour mesurer la cinétique de réactions encore plus rapides. [76]

Par SECM, il est également possible de cartographier la cinétique locale de réaction avec une surface dans une image à deux dimensions, si on maintient constante la distance de travail  $d$ . Cependant, cette condition n'est pas facile à réaliser par SECM, surtout pour un substrat présentant des hétérogénéités de réactivité. On peut alors positionner l'UME sur des régions précises de l'échantillon, établir des courbes d'approche expérimentales et en extraire les valeurs de la constante cinétique par ajustement à une courbe du modèle théorique.

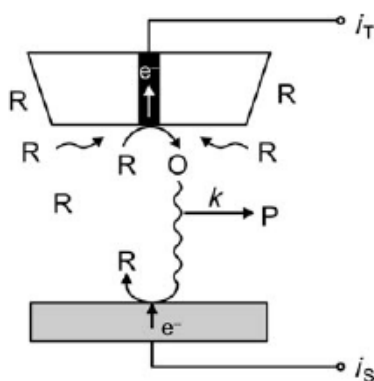
La cinétique de réactions hétérogènes a été surtout étudiée par le mode régénération en utilisant les équations de Bard et Mirkin [5]. La réaction à l'échantillon, qui est du premier

ordre par rapport au médiateur, peut aussi être remplacée par des modèles plus compliqués. Dans ces cas, les courbes d'approche sont enregistrées pour différentes concentrations du médiateur. Pour étudier des réactions électrochimiques à l'échantillon, différents potentiels sont souvent appliqués aussi bien à l'électrode qu'au substrat.

La combinaison des différentes équations et méthodes permet de rendre compte du transfert de charge fini sur de nombreux types de substrat. Plus particulièrement, ce traitement a permis d'estimer la constante de transfert de charge à diverses interfaces telles que l'interface liquide-solide (notamment métal) [73-76], liquide-polymère conducteur [77, 78], liquide-liquide (non miscibles) [79-81], liquide-gaz [82, 83] et même à travers des cellules biologiques vivantes.[84-87]

#### I.4.5. Cinétique de réactions homogènes

Il est possible d'étudier par SECM des cinétiques de réactions chimiques homogènes lorsque la réaction est couplée à un ou plusieurs transferts électroniques. On utilise pour ce faire le SECM en mode TG/SC (Figure 7). En effet, comme nous l'avons précédemment mentionné, pour une espèce stable générée par l'UME par simple processus de transfert de charge, l'efficacité de collection ( $i_S/i_T$ ) est proche de 1. En revanche, lorsque, par exemple, l'espèce produite à l'UME réagit dans l'espace compris entre l'UME et le substrat en générant une espèce électro-inactive, la quantité de matière détectée par le substrat est moindre et le rapport  $i_S/i_T$  diminue. Cette variation permet alors d'accéder à la cinétique de la réaction chimique couplée au transfert électronique, qui est de plus en plus rapide quand  $i_S/i_T$  tend vers 0. On parle dans ce cas de « la durée de vie » ou du « temps de survol » de l'espèce réactive.



**Figure 7** : Schéma de principe de la mesure de la cinétique de réaction homogène couplée à un transfert d'électrons par mode TG/SC

C'est en 1994 [62] qu'on a montré pour la première fois qu'il était possible d'étudier la cinétique de réactions chimiques homogènes par le mode régénération du SECM.

En mode régénération, la constante de vitesse peut être déterminée à partir de la dépendance entre  $i_T$  et  $d$  ou  $L$  (courbe d'approche). Dans une approche simplifiée, le courant mesuré à l'UME,  $i_T$ , est relié à celui détecté à la surface du substrat  $i_S$ . Afin de comprendre et d'établir cette approche, la méthode consiste à écrire le courant à l'électrode et au substrat en une somme de deux contributions :

$$i_T = i_T^{\text{ins}} + i_r \quad \text{éq. 13}$$

$$i_S = i_r + i_d \quad \text{éq. 14}$$

$i_T^{\text{ins}}$  correspond au processus de régénération négative, c'est-à-dire à la diffusion des espèces électroactives de la solution vers l'électrode,  $i_r$  aux espèces ayant été régénérées à la surface du substrat et  $i_d$  au processus de diffusion des espèces électroactives de la solution vers le substrat.

A partir de ces deux équations, on peut écrire:

$$i_T = i_S - i_d + i_T^{\text{ins}} \quad \text{éq. 15}$$

Dans le cas d'un substrat purement conducteur, il a été montré que pour des distances substrat-UME petites ( $d < 2a$  ou  $L < 2$ ), la collection a un rendement de 100%, c'est à dire que toute espèce oxydée, par exemple au substrat, est réduite à l'UME, ce qui se traduit en terme de courant par  $i_T^{\text{cond}} = i_S$ . On déduit que dans le cas d'un conducteur  $i_d = i_T^{\text{ins}}$  et donc que :

$$i_d/i_S = i_T^{\text{ins}} / i_T^{\text{cond}} = f(L) \quad \text{éq. 16}$$

Dans le cas d'une cinétique finie au substrat, on peut encore considérer que toute espèce créée à l'UME est convertie au substrat avec un rendement proche de 100% tant que  $L < 2$ . La relation 16 est donc toujours vérifiée.

L'ensemble de toutes ces équation nous permet d'établir que:

$$i_T = i_S (1 - i_T^{\text{ins}} / i_T^{\text{cond}}) + i_T^{\text{ins}} = i_S(1-f(L)) + i_T^{\text{ins}} \quad \text{éq. 17}$$

Cette expression reliant les deux courants à l'UME et au substrat est intéressante car elle permet de déduire le courant au substrat à partir de la simple mesure du courant à l'UME ce qui permet de réaliser cette étude par mode régénération. De plus, cette expression est valable pour toute étude cinétique de réaction homogène qu'elle soit de premier ou de deuxième ordre (respectivement EC ou EC2 [62]). Il devient alors possible de décrire par simulation

numérique la totalité des courbes comme une fonction analytique de la distance normalisée  $L = d/a$  et d'un paramètre cinétique unique  $K_c$ .

Dans le cas le plus simple d'une réaction homogène du premier ordre EC (R ou O  $\xrightarrow{k_c}$  produits), ce paramètre est défini par :

$$K_c = k_c d^2 / D \quad \text{éq. 18}$$

$k_c$  étant la constante de vitesse de la réaction chimique.

On obtient une approximation numérique qui relie le rapport  $x = i_S/i_T$  à  $K_c$  :

$$K_c = 5.608 + 9.347 \exp(-7.527 x) - 7.616 \exp(-0.307/x) \quad \text{éq. 19}$$

En pratique, il s'agit d'ajuster la courbe  $i_T = f(L)$  expérimentale obtenue sur un substrat purement conducteur aux courbes théoriques calculées pour différentes valeurs de  $K_c$  à partir des équations 17 et 19.

Dans le cas d'une réaction du premier ordre, une constante de réaction homogène maximale de  $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  pourrait ainsi être mesurée par mode régénération [5].

Parmi les composés et les réactions étudiés, on peut citer la réduction de composés organiques sur des métaux avec une décomposition homogène ultérieure [88], l'oxydation des oxalates par Ru(III) à l'interface benzonitrile-eau [89], les intermédiaires des oxydations électrochimiques de  $\text{BH}_4^-$  [90] et la dimérisation réductrice du diméthylfumarate et du fumaronitrile.[91] En outre, la cinétique de la stabilité de radicaux électrochimiquement produits a aussi été étudiée (radical anion de l'acrylonitrile [92],  $\text{NAD}^\bullet$  [1],  $\text{O}_2^\bullet$  [93],  $\text{RNO}_2^\bullet$ [94]).

## 1.5. Fonctionnalisation de surfaces par SECM

La fonctionnalisation de surfaces peut être réalisée suivant différentes approches utilisant la photochimie, la chimisorption, la physisorption, la chimie covalente, des méthodes mécaniques ou encore des méthodes électrochimiques. Diverses techniques de micro-modification de surfaces utilisent ces approches comme la photolithographie [95-101], la lithographie électronique [102-106], les traitements plasma [107, 108], l'impression par microcontact [109-119], l'impression nanométrique [120, 121], l'impression par jet d'encre [122], la lithographie Langmuir-Blodgett, la lithographie dip-pen [123] et la microscopie électrochimique.

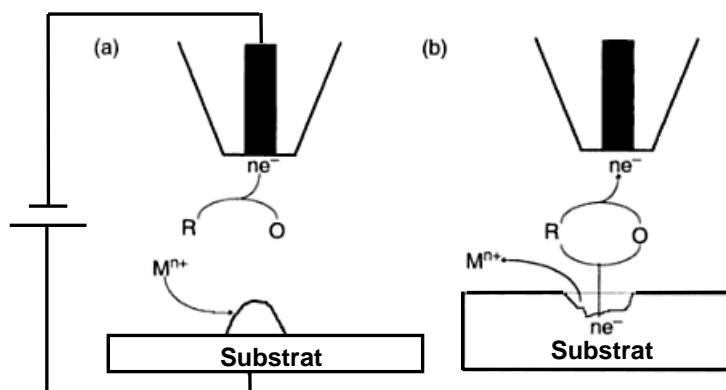
Les microscopes à sondes locales (SPM) tels que le microscope à effet tunnel (STM, « Scanning Tunneling Microscope ») [124, 125] ou le microscope à force atomique (AFM, « Atomic Force Microscope ») [126, 127] sont utilisés comme outils de microfabrication. Le point fort qu'apportent les SPM dans ce domaine est lié à leur plus forte résolution spatiale comparée aux autres méthodes optiques telles que la photolithographie ou la photoimmobilisation [128-130] qui sont principalement limitées par la diffraction de la lumière. Réaliser des motifs avec une forte résolution est un enjeu technologique important, notamment dans la fabrication de microsystèmes en microélectronique. La résolution spatiale des SPM n'étant limitée que par la taille de la pointe, l'utilisation d'un SECM avec une électrode de taille micrométrique ou nanométrique permettrait d'atteindre une bonne résolution par rapport aux méthodes standards de microfabrication.

De plus, bien qu'étant la méthode de structuration de surfaces la plus couramment utilisée, la photolithographie nécessite plusieurs étapes et des conditions lourdes (vide, solvants organiques, acides forts et bases fortes), parfois trop agressives pour être compatibles avec certaines applications (substances biologiques, certains matériaux...).

La micro-modification de surface par SECM peut surmonter ces problèmes en contrôlant les processus chimiques à la surface du substrat, ce qui n'est pas accessible par les autres méthodes. Par ailleurs, le SECM peut être utilisé pour non seulement la génération de structures, mais aussi pour leur caractérisation fonctionnelle.

En SECM, le confinement des réactions chimiques permet la modification localisée de la structure chimique et/ou physique de la surface. Le SECM a, en effet, l'avantage de pouvoir être utilisé sur une gamme très large de matériaux aussi bien isolants que conducteurs ou semi-conducteurs, aussi bien organiques et biologiques qu'inorganiques. Ainsi, il permet de réaliser diverses microstructurations allant de l'électrodépôt microscopique de métaux et de polymères, à la microgravure par dissolution électrochimique de métaux, en passant par la modification de fonctions chimiques greffées en surface. La microfabrication par SECM ne nécessite ni masques, ni moules, c'est le déplacement latéral de la sonde pendant la modification de surface qui permet de créer des motifs à la surface du substrat.

L'utilisation de l'UME d'un SECM pour modifier localement des surfaces a été décrite depuis le début du développement du SECM. [131-136] et des mises au point sont régulièrement publiées [7, 8, 137-139].



**Figure 8 :** Représentation schématique des deux modes possibles de modification localisée de surface par SECM. R et O sont respectivement la forme réduite et oxydée du médiateur. (a) mode direct (ex. électrodépôt d'un métal); (b) mode de régénération (ex. électrogravure d'un métal)

Dans la littérature [5, 13], on classe principalement ces microstructurations ou fonctionnalisations spécifiques de surface sous deux principaux modes de fonctionnement du SECM, illustrés sur la figure 8. Il s'agit du mode direct (figure 8a) et du mode régénération (figure 8b). Néanmoins, une revue récente de G.Wittstock [7] propose un autre classement basé sur les principes de l'utilisation du SECM comme un outil de microfabrication. En plus des deux configurations décrites sur la figure 6, il met en évidence d'autres configurations possibles qui dérivent du mode régénération, notamment le couplage de réactions homogènes et hétérogènes.

### I.5.1. Génération localisée de réactifs à l'UME

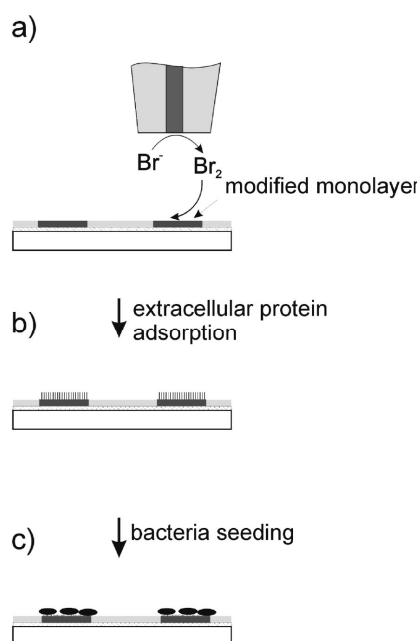
Un des avantages du mode régénération est qu'il permet la modification de substrats aussi bien isolants que conducteurs. L'UME est alors utilisée pour produire, à partir d'un médiateur rédox, une espèce réactive qui mène à une oxydation/réduction locale engendrant une dissolution partielle du substrat ou une oxydation/réduction chimique locale du substrat. Lorsque le réactif réagit avec la surface, le médiateur est régénéré à la surface du substrat pour réagir de nouveau à l'UME, ce qui permet un contrôle continu du processus de modification par enregistrement du courant à l'UME,  $i_T$ . Quelques exemples de la méthode sont cités ci-dessous, en particulier pour des applications biologiques.

Des motifs ont été gravés par SECM sur Cu [140], GaAs [131, 132], et Si [141, 142]. Dans le cas de l'oxyde de tungstène, l'injection de charge est suivie par un changement de couleur localisé [143].

Matsue et *al* ont désactivé des films d'enzymes par  $\text{Br}_2$  ou  $\text{HBrO}$  localement généré [144]. Shiku, a produit des radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton localisée (réduction de  $\text{Fe}^{3+}$  dans une solution contenant  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), qu'il a utilisés pour modifier des couches d'alkylsilanes déposées sur verre [145]. Les micro-motifs obtenus ont ensuite servi pour faire adhérer, par adsorption ou greffage covalent, des couches de protéines.

L'adsorption de protéines et l'adhésion de cellules biologiques peuvent être localement contrôlées par SECM sur différents substrats. Kaji, a découvert qu'un traitement oxydant par les ions bromures dans une solution de tampon physiologique permet d'annuler localement les propriétés résistantes et anti-adhésives de protéines sur des couches d'albumine physisorbées sur un substrat de verre [146-148]. Cette procédure a été utilisée pour "tracer" des lignes de cellules adhérentes et fixer de multiple populations de cellules sur différentes surfaces.

Des études plus récentes impliquent une surface modèle structurée constituée d'un polymère anti-adhésif et de fibronectine [149]. Les couches fibronectine sont ensuite activées microélectrochimiquement pour l'adhésion de cellules, les limites des zones activées étant prédéfinies par le modèle utilisé.

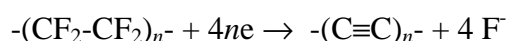


**Figure 9** : Utilisation du SECM pour former des micro-motifs de bactéries marines. (a) modification localisée de la monocouche éthylenglycol en utilisant  $\text{Br}_2$  électrochimiquement généré. (b) adsorption sélective de protéines extracellulaire sur les régions modifiées. (c) la protéine permet l'adhésion des bactéries. **réf. 151.**

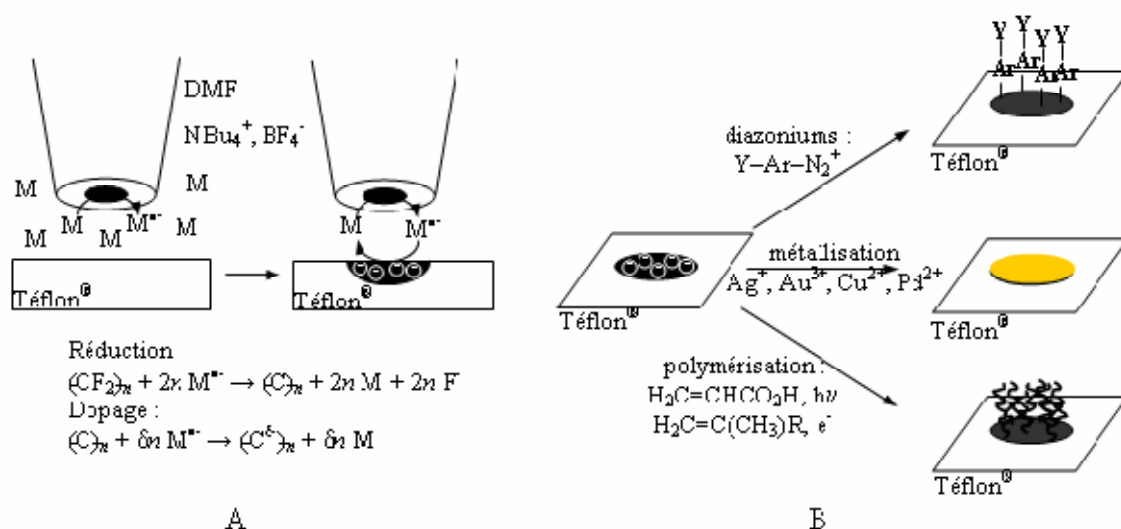
Zhao. Et *al* ont montré qu'en oxydant les ions bromures, on pouvait moduler localement les propriétés anti-adhésives d'une monocouche auto-assemblée (SAMs) comportant une terminaison oligo (éthylenglycol). Ceux-ci sont, en effet, plus résistants à l'adhésion de

cellules que les SAMs micro-modifiées [150]. Récemment, ces motifs ont été utilisés pour immobiliser des protéines et des bactéries marines [151].(figure 9)

Une étude de notre équipe a porté sur la réduction locale de surfaces de polymères fluorés (Téflon<sup>®</sup> ou couches auto-assemblées fluorées) réputés très hydrophobes et chimiquement inertes (figure 10). Sur Téflon<sup>®</sup>, cette réduction nécessite des réducteurs très puissants comme les anions radicaux organiques (type naphthalène) électrochimiquement générés à des potentiels très bas (< -2 V/ ESC). Le processus conduit à la formation d'un matériau carboné :



Ce matériau carboné est dopé négativement, ce qui permet à la carbonisation de se propager : La réduction locale du Téflon<sup>®</sup> engendre des zones modifiées plus hydrophiles que le matériau de départ [152].



**Figure 10:** **A.** Processus de formation de couches carbonées dopées par réduction localisée du Téflon<sup>®</sup> par le radical anion d'un médiateur rédox M, électrogénéré à une microélectrode plongeant dans une solution de M dans le diméthylformamide + 0,1 M NBU<sub>4</sub> BF<sub>4</sub>. **B.** Fonctionnalisations sélectives, par des synthons organiques, des métaux et des polymères, des couches carbonées obtenues par réduction localisée du Téflon<sup>®</sup>. La réaction a lieu par mise en contact de la couche carbonée dopée avec une goutte d'une solution du précurseur *ad-hoc*.

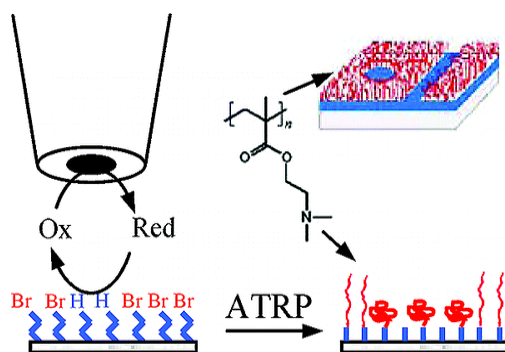
Le dopage négatif des motifs réduits a été mis à profit pour faire réagir les motifs avec différents réactifs réductibles et obtenir ainsi diverses fonctionnalités chimiques sur la surface du Téflon<sup>®</sup> : greffage local de groupes organiques par réduction de sels de diazonium en radicaux aryles (nitro ou bromo-phényles par exemple) qui se greffent sur le motif par une



liaison covalente ; métallisation locale avec l'or, l'argent et le cuivre ; copolymérisation locale des insaturations obtenues par désactivation de la surface réduite [153].

Des réactifs localement électrogénérés permettent de modifier, outre des matériaux massifs, des couches minces organiques déposées à la surface de substrats. Quelques exemples sont mentionnés ci-dessous.

A partir d'un film organique substitué par un précurseur de polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atomes de brome (ATRP), on peut graver des brosses de polymères [39, 154]. Pour cela, on génère à l'UME du SECM un réducteur permettant la débromation locale du précurseur bromé. Cette stratégie empêche la croissance locale ultérieure de brosses de polymères (figure 11).



**Figure 11** : Utilisation du SECM pour la débromation locale du précurseur greffé sur un substrat d'or et la préparation de brosses de polymère gravées.

Des films de polyvinylpyridine chargés de  $\text{PdCl}_4^{2-}$  et  $\text{AuCl}_4^-$  sont modifiés localement par  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$  électrogénéré au voisinage de l'UME, donnant lieu à des microdépôts de Pd et d' Au [136].

Une molécule d'hydroquinone électrochimiquement générée réduit localement un film d'AgCl (obtenu par évaporation) en Ag élémentaire [155]. Après dissolution d'AgCl, une ligne d'argent se forme sur le substrat isolé.

Des microstructures de polymères sont obtenues à partir d'un film de monomère déposé sur un substrat, puis polymérisé par un oxydant généré à l'UME [53, 156, 157]. Cette procédure a été utilisée pour électropolymériser des films de [2,5-bis (1-éthylpyrrol-2-yl) thiophène] et de 4,4'-diméthoxy-2,2'-bithiophène.

Inversement, une variation locale de pH induite par une UME permet d'activer un film oxydant immobilisé ( $\text{MnO}_2$ ), puis de polymériser localement un monomère initialement présent dans la solution (thiophène) [54]. La polyaniline a ainsi été déposée sur différents

substrats en utilisant une UME pour changer localement le pH, ce qui amorce l'électropolymérisation spécifiquement dans la zone située au voisinage de l'UME [158]

Shohat et Mandler ont utilisé une augmentation locale de pH pour déposer irréversiblement  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  [159]. Le méthylviologène est réduit à une UME de mercure. En présence de proton, il se régénère à la surface du substrat en platine, produisant ainsi une déprotonation locale.

La sonde du SECM peut être utilisée de différentes façons pour acheminer localement des ions métalliques qui seront réduits au niveau du substrat après diffusion dans la solution. Par exemple, on dissout une UME d'or en présence d'un agent complexant, puis on dépose des nanoparticules d'or sur un substrat conducteur ou semi-conducteur par réduction [160, 161]. Les agents complexants libérés bloquent la régénération électrochimique et deviennent le facteur limitant de la réaction globale.

Schindler et al. ont formé des nanoclusters individuels à partir de cobalt par déposition galvanique de cobalt avec une pointe d'Or montée sur un ECSTM (pour « electrochemical scanning tunneling microscopy ») [162-165]. Les ions cobalt sont générés à la pointe par une impulsion anodique courte puis déposés sur un échantillon conducteur polarisé à un potentiel proche mais pas inférieur au potentiel Nernstien de  $\text{Co}^{2+}$  dans la solution. Une faible augmentation locale de la concentration de  $\text{Co}^{2+}$  engendre le déclenchement de la déposition galvanique locale du cobalt. Des microstructures de cobalt plus grandes ont été obtenues par dissolution d'une UME de Cobalt [166].

Des interfaces liquides-liquides au niveau de la pointe de micropipettes sont utilisées pour contrôler le potentiel de transfert d'ions métalliques et produire des structures métalliques hybrides [167, 168]. Sauter et Wittstock ont déposé catalytiquement du fer à partir d'hexacyanoferrate par dissolution d'UME de Co et de Ni et précipitation avec  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , électrochimiquement généré à la surface du substrat [169, 170].

### **I.5.2. Couplage de réactions homogènes et hétérogènes**

La résolution latérale du SECM est limitée par l'extension de la couche de diffusion, aussi bien pour la modification locale de surfaces que pour imager des processus électrochimiques. Plusieurs protocoles expérimentaux limitent l'extension de la couche de diffusion en mettant en jeu des réactions homogènes dans l'espace compris entre l'électrode et le substrat ; l'objectif est de limiter la durée de vie (et donc la diffusion) de l'espèce générée à l'interface. Pour cela, la réaction homogène doit être suffisamment rapide et les réactifs de la réaction homogène ne doivent pas interagir avec la réaction électrochimique à l'UME.

Wittstock et Schuhmann ont utilisé l'enzyme catalase pour la décomposition catalytique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et raccourcir ainsi la durée de vie du  $\text{H}_2\text{O}_2$  formé à la surface de l'échantillon lors de l'immobilisation de la glucose oxydase [171]. Ces travaux permettent d'améliorer la résolution et la qualité d'image, et également de discerner certains produits dans des processus interfaciaux complexes (par exemple, réactions de corrosion).

Heinze et *al.* ont développé le concept de "lentille chimique" pour des expériences en mode régénération [155]. Un réactif, ajouté à la solution, réagit en solution avec le composé produit à l'UME, limitant ainsi l'extension de la couche de diffusion autour de l'UME. La taille de la zone modifiée du substrat devient alors indépendante de la cinétique de la réaction au substrat.

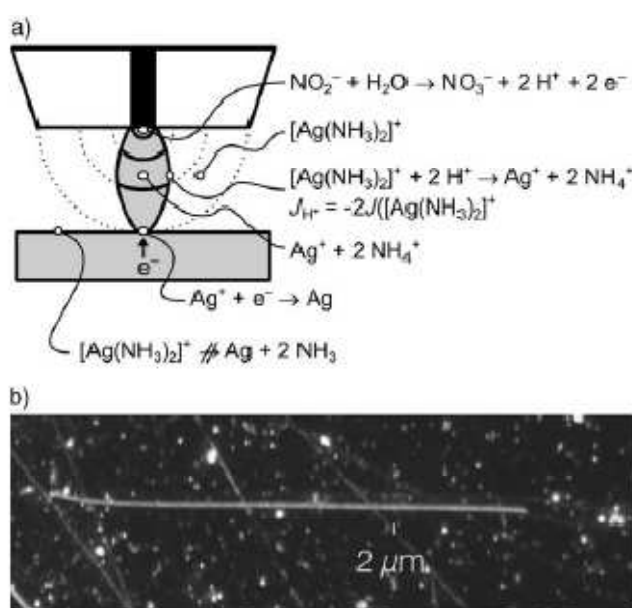


Figure 12 : Concept de "lentille chimique" en mode régénération : a) schéma réactionnel à l'UME ; b) déposition d'une ligne d'Ag de 1  $\mu\text{m}$  de large sur un substrat d'or. **réf. 172.**

Des réactions homogènes appropriées ont été développées pour limiter spatialement des dépôts de métaux [157, 172, 173], ou de polymères [139], et réaliser des gravures [174].

Un exemple de dépôt local d'Ag est représenté sur la figure 12. La solution contient l'espèce  $\text{NO}_2^-$  et le complexe  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ . Le substrat est maintenu à un potentiel tel que  $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{O})_6]^+$  soit réductible, mais pas  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ .

L'oxydation électrochimique du nitrite à l'UME mène à la libération d'ions  $\text{H}^+$  et à la dissolution du complexe aminé (figure 12a). L'argent se dépose sur le substrat par réduction des ions  $\text{Ag}^+$  (figure 12b). Quand la solution contient un excès de  $\text{NH}_3$ , ce dernier réagit avec les  $\text{H}^+$  libérés, ce qui limite la variation du pH au voisinage immédiat de l'électrode.

Lorsque la réaction homogène est rapide, la métallisation de l'argent a lieu sur une zone réduite, là où le flux de  $H^+$  partant de l'UME et le flux de  $NH_3$  de la solution vers l'UME sont comparables. Dans cette zone,  $Ag^+$  est l'espèce dominante de l'argent, tandis que  $[Ag(NH_3)_2]^+$  domine à l'extérieur de cette région. Le dépôt d'argent ne peut avoir lieu que sur la surface du substrat comprise dans la zone de réaction. Le motif formé à la surface du substrat peut être plus petit que la taille de l'UME.

### **I.5.3. Mode direct**

Dans le mode direct, une différence de potentiel est appliquée entre un substrat conducteur et l'UME qui opère en tant que contre électrode [13]. Contrairement au mode régénération, les réactions à l'UME et au substrat ne font pas forcément intervenir le même couple redox en réduction et oxydation. La distance UME/substrat est un paramètre primordial à contrôler dans cette configuration puisque la résolution des motifs est fixée par les lignes de champ focalisées entre l'UME et le substrat. La réaction électrochimique est alors focalisée sur un domaine micro- voire nanométrique. D'où l'importance de minimiser la distance UME/substrat et de choisir une UME de petite dimension si l'on souhaite créer des microstructures avec la meilleure résolution possible. La durée de la réaction est également un paramètre à contrôler pour obtenir une bonne résolution et éviter l'expansion latérale de la modification.

La principale difficulté dans ce mode est de positionner l'UME à une distance la plus faible possible du substrat conducteur. Une première solution développée par Bard et *al.* [134, 175] est de déposer un film fin ionique et conducteur (Nafion<sup>®</sup>) sur le substrat. Lorsque l'électrode pénètre dans le film, un courant passe entre l'électrode et le substrat. Ce courant sert, d'une part, à contrôler la distance électrode-substrat et, d'autre part à réduire des ions d'argent présents à la surface de l'UME. Pendant la translation horizontale, une ligne d'Ag est formée et incorporée dans le film de Nafion<sup>®</sup>. Une méthode similaire [175] a été utilisée pour déposer des particules d'argent sur du Mica en remplaçant le Nafion<sup>®</sup> par une atmosphère humide (un film d'eau d'environ 10 à 15 Å d'épaisseur).

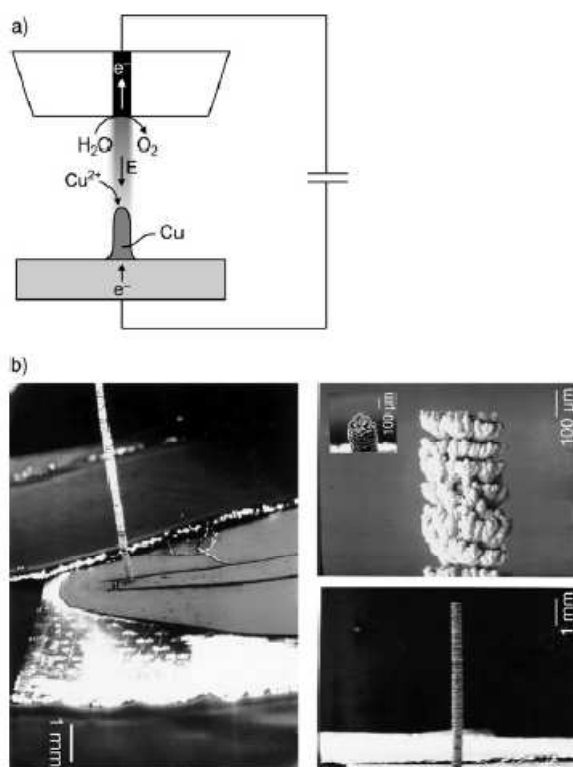
Le confinement de la réaction peut aussi être réalisé par une série d'impulsions appliquées au substrat en association avec une électropolymérisation [176].

Le dépôt de polymères conducteurs par électropolymérisation anodique nécessite des réactions homogènes contrôlées jusqu'à ce que les oligomères insolubles se déposent sur la surface du conducteur. En travaillant en mode potentiométrique, l'espace entre l'UME et le

substrat s'épuise en monomères et la polymérisation prend fin. Schuhmann et al. utilisent des séquences d'impulsion appropriées pour laisser le temps au monomère de rediffuser vers l'espace entre l'UME et le substrat après une première impulsion d'oxydation [50, 176]. Des structures tridimensionnelles de polymères sont formées en balayant verticalement l'UME durant l'électropolymérisation. [177]. L'utilisation de monomères fonctionnalisés ouvre des perspectives pour des applications dans les domaines biologiques [49].

En appliquant le même concept, l'équipe de W. Schuhmann a déposé des lignes de poly-N-( $\omega$ -amino-alkyl)pyrrole. Le processus d'électropolymérisation et la croissance du film sont limités par la faible conductivité du film de polypyrrole fonctionnalisé. Une enzyme modifiée, la glucose oxydase, a ensuite été greffée de manière covalente à ces motifs. Après cette fonctionnalisation, le microscope électrochimique a été utilisé pour contrôler la présence des motifs en étudiant l'activité enzymatique.

El Giar a formé des aiguilles de Cu de 2 mm de long et 25  $\mu\text{m}$  de diamètre par déposition galvanique de Cu sur un substrat de Cu par mode direct à partir d'une solution d'ions cuivriques (figure 13) [178].



**Figure 13 :** Formation d'aiguilles de Cu par mode direct. a) L'oxydation d'eau à l'UME engendre la réduction des ions cuivriques sur le substrat ; b) Images des aiguilles formées. **réf. 178**

Un autre mécanisme de confinement de la diffusion a été développé pour la désorption locale de monocouches auto-assemblées (SAM) de thiols [179-181]. L'UME est placée au-dessus du substrat d'or couvert de SAM à une distance de l'ordre de son rayon. On applique une tension alternative (2-10 kHz,  $\pm 1$  V) entre le substrat et l'UME. Des alcanes thiolates se résorbent à un potentiel négatif pour être décomposés par oxydation aux potentiels positifs [182].

Enfin, un autre principe de modification en mode direct du SECM a été développé par notre équipe pour déposer localement et analyser des couches organiques minces passivées sur une surface d'or. Le dépôt est assuré par électrogreffage local de chaînes organiques obtenues par la réduction à la surface d'un sel d'aryliodonium [183]. Bien que les sels de diazonium soient les générateurs de "radicaux" les plus souvent utilisés pour l'électrogreffage des surfaces, les sels d'iodonium ont l'avantage de limiter le greffage spontané. La résolution du processus de greffage a été contrôlée par la charge générée.

Une méthode alternative permettant de greffer localement par SECM des sels de diazonium a été développée par Bélanger [184]. La procédure est basée sur la génération *in situ* du sel de diazonium au voisinage d'une surface d'or à partir de l'amine obtenue par réduction à la microélectrode du composé nitré correspondant.

Citons enfin les travaux de Charlier et al [185] qui, en combinant la SECM avec l'AFM, ont réalisé l'électrogreffage localisé de l'acide polyacrylique sur de l'or en présence d'un sel d'aryldiazonium avec une résolution submicrométrique.

## **I.6. La SECM : un bon outil de micro-fabrication de surfaces ?**

Comme dans toute technique de microscopie à sonde locale, la vitesse de microfabrication est limitée par le mouvement de la sonde le long du substrat et par la cinétique de la réaction au substrat. Lorsque cette cinétique est rapide (contrôle diffusionnel au substrat), la microélectrode peut se déplacer (écrire) à des vitesses de l'ordre de quelques centaines de micromètres par seconde. Toutefois, les vitesses de transformation de surfaces sont souvent lentes et limitent la vitesse d'écriture à quelques micromètres par seconde, ce qui est très lent. Actuellement, les modes utilisés en SECM (direct et régénération) ne peuvent rivaliser avec les méthodes conventionnelles à production massive telles que la photolithographie. Certains développements du microscope électrochimique, comme par exemple la configuration multi-sondes [186] ou bande [187] (pouvant servir comme tampon) tentent d'améliorer ses capacités en terme de vitesse de modification de surfaces.

La résolution des motifs obtenus par SECM dépend de la taille et de la géométrie de la microélectrode et de la distance à laquelle est placée la sonde au-dessus du substrat. En mode direct, la résolution est fonction principalement de la distribution du champ électrique, ce qui impose que la sonde soit très proche de la surface du substrat. Quelques études portent sur le développement et la caractérisation des nanoélectrodes utilisables en SECM [185]. Cependant, cette voie est délicate, vue la complexité de la fabrication et de la manipulation de ce type d'électrodes.

Le principal avantage de la SECM en tant qu'outil de micro-modification de surfaces est sa capacité à induire une vaste gamme de réactions chimiques et électrochimiques sur des matériaux très variés. De plus, les conditions expérimentales relativement douces et la stabilité des modifications générées font du SECM un outil de choix par rapport à la photolithographie et à l'impression par micro-contact. Par ailleurs, en mode régénération, le substrat n'est pas nécessairement conducteur, ce qui élargit nettement le champ d'applications de la micro-fabrication par SECM.

L'avantage majeur de la microscopie électrochimique est de permettre à la fois la fonctionnalisation et l'imagerie des surfaces. La miniaturisation des sondes devrait élargir son champ d'applications.

L'idée initiale de ce travail est d'utiliser la microscopie électrochimique comme outil de fabrication de substrats biomimétiques permettant de contrôler finement le positionnement et l'adhérence de cellules biologiques. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à la modification de deux types de substrats: des polymères hydrogénés tels que le polystyrène, matière de base des boîtes de Pétri et matériau de choix des biologistes et des matériaux fluorés obtenus par immobilisation d'une monocouche auto-assemblée d'un silane perfluoré sur des supports de verres.

Dans les deux paragraphes suivants, nous rappelons les principales caractéristiques de ces matériaux ainsi que les différentes méthodes de leur modification de surfaces décrites dans la littérature.

Nous commençons par le polystyrène, le substrat le plus utilisé et étudié durant ce travail.

## II. Fonctionnalisation de surface du polystyrène par oxydation

### II.1. Présentation

Le polystyrène est un polymère thermoplastique linéaire à squelette aliphatique sur lequel sont branchés des groupes phényles. Il est obtenu par polymérisation du motif styrène (figure 14). On distingue principalement trois types de polystyrènes : le polystyrène "cristal" (non cristallin mais portant ce nom à cause de sa transparence), le polystyrène "choc" et le polystyrène expansé.

Dans cette étude, seul le polystyrène type « cristal » est utilisé. Son principal mode de synthèse est la polymérisation radicalaire qui conduit à un polymère atactique amorphe.

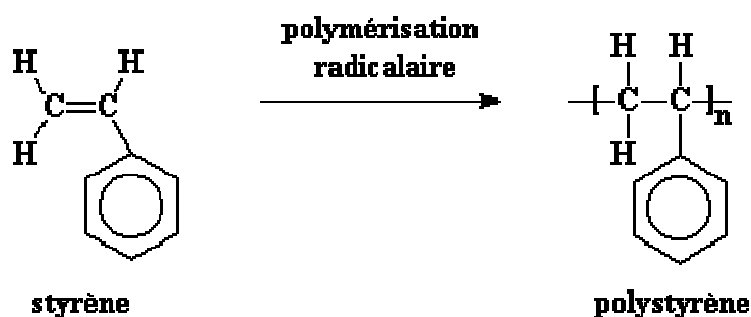


Figure 14 : Structure chimique et schéma d'obtention du polystyrène.

C'est un matériau très facile à transformer, par injection ou extrusion par exemple. Il se caractérise par sa transparence, mais aussi par son côté fragile et cassant avec un blanchiment sur les zones de contraintes. Ses propriétés mécaniques et thermiques peuvent être modifiées par l'ajout de plastifiants ou de butadiène (caoutchouc) pour en faire le polystyrène "choc". Outre son côté cassant, le polystyrène souffre d'une faible résistance chimique et d'une faible résistance à la fissuration sous contrainte. D'une densité voisine de 1, il est soluble dans l'acétone, les hydrocarbures chlorés et aromatiques et il est rapidement attaqué par les solvants organiques.

Le polystyrène est un support de choix pour une grande variété d'applications dans les secteurs de haute technologie comme la microélectronique [188], les dispositifs "laboratoire sur puce" (Lab-on-a-Chip), les membranes et la culture cellulaire [189-195]. Ses propriétés présentant un intérêt particulier pour ces applications sont sa dureté, sa rigidité, sa facilité de fabrication à chaud, sa stabilité thermique, sa faible densité (1.03 à 1.05), sa transparence, son coût faible et d'excellentes propriétés thermiques et électriques pour des fins d'isolation [196].



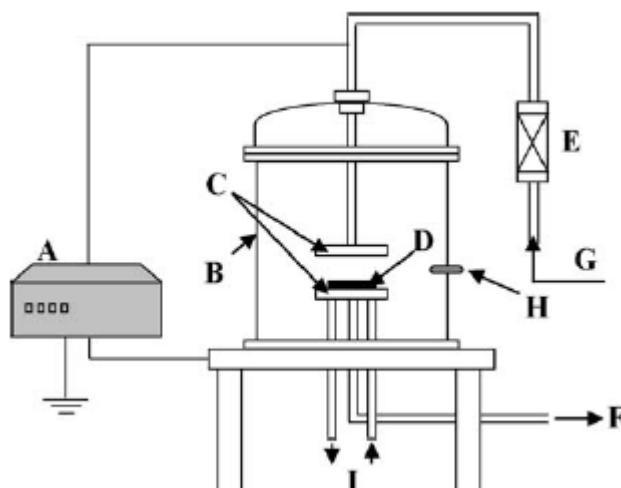
En revanche, sa faible énergie de surface, son hydrophobicité et sa réactivité insuffisante affectent fortement ses qualités fonctionnelles. Afin de réduire ces inconvénients, c'est-à-dire d'améliorer ses propriétés d'adhésion, diverses méthodes sont utilisées pour modifier ou fonctionnaliser la couche superficielle de ce polymère.

## **II.2. Traitement par plasma**

### **II.2.1. Principe**

Le terme de plasma a été pour la première fois introduit en 1928 par le physicien américain Irving Langmuir (1881-1957) pour désigner, dans les tubes à décharge, certaines régions équipotentielles contenant un gaz ionisé électriquement neutre [197]. Le plasma est un gaz partiellement ou totalement ionisé composé d'électrons, de particules ioniques chargées positivement et négativement, d'espèces neutres, de radicaux et de rayonnement ultraviolet [en particulier le rayonnement VUV, qui correspond à une longueur d'onde  $\lambda < 175$  nm]. L'ensemble est électriquement neutre. En raison de leurs propriétés uniques par rapport aux fluides classiques, les plasmas sont un quatrième état de la matière après le solide, le liquide et le gaz.

L'énergie requise pour générer un plasma peut provenir de différentes sources, les plus utilisées sont les faisceaux d'électrons, les ondes électromagnétiques et les décharges électriques. Un plasma est caractérisé par plusieurs paramètres tels que son degré d'ionisation (proportion des espèces ionisées par rapport au nombre total des particules), l'énergie des espèces diverses qu'il contient, la pression, la source et le mode de génération ou la densité du plasma (souvent exprimée en électrons par  $\text{cm}^3$ ). Les plasmas sont généralement classés selon leur degré d'ionisation et l'énergie thermique moyenne des électrons.



**Figure 15.** Principe du procédé plasma : (A) précurseur ou source plasma; (B) réacteur plasma sous vide; (C) électrodes; (D) substrat; (E) débitmètre; (F) système de pompage; (G) gaz; (H) Jauge de pression; (I) système de réfrigération.

Pour les traitements et la modification de surfaces de polymères, les plasmas hors-équilibre, communément appelés plasmas froids (voir figure 15), sont les plus utilisés [198]. Ce sont les seuls que je mentionnerai. Leur degré d'ionisation est faible (entre  $10^{-7}$  et  $10^{-4}$ ) et on opère généralement sous pression atmosphérique ou sous un vide primaire. La source d'énergie est généralement une décharge électrique établie entre deux électrodes par application d'une tension (continue, alternative ou pulsée).

A la pression atmosphérique, la décharge électrique possède généralement une structure filamentaire (filaments lumineux de quelques dizaines de micromètres de diamètre); le plasma est donc spatialement inhomogène tout en étant dans un régime transitoire de courte durée (quelques dizaines de nanosecondes). À la pression atmosphérique et selon la configuration des électrodes, les décharges électriques sont de type couronne (lorsque l'électrode portée à la haute tension a une structure incurvée) ou DBD pour Décharge à Barrière Diélectrique (lorsqu'une ou les deux électrodes sont recouvertes d'un diélectrique). Les fréquences les plus utilisées sont soit du type radiofréquence de 13,56 MHz, soit du type micro-onde de 2,45 GHz. Les électrons de forte énergie sont créés lors de leur accélération par le champ électrique au sein même du milieu gazeux alors que dans les procédés à faisceaux d'électrons, ils sont injectés dans le milieu à partir d'une source externe. Ainsi, les électrons dans un plasma froid ne sont pas en équilibre thermodynamique avec les ions et les espèces neutres et peuvent atteindre des énergies cinétiques élevées qui dépassent rarement les 25 eV, leur distribution en énergie étant généralement centrée sur quelques eV. Ces énergies sont suffisantes pour qu'ils entrent en collisions inélastiques avec les atomes et les molécules de la

phase gazeuse. La température moyenne des plasmas froids est généralement à peine au dessus de la température ambiante. Les chocs inélastiques provoquent l'ionisation des molécules de gaz. Le gaz passe alors d'un état d'isolant électrique à un état de conducteur par production d'espèces libres chargées. L'apparition d'espèces ionisées et excitées initie un grand nombre de phénomènes réactionnels complexes (ionisation, dissociation, émission, recombinaison, neutralisation, désexcitation, attachement, ...).

### **II.2.2. Effets du traitement de surface par plasma**

Le bombardement de la surface des polymères par les espèces énergétiques créées au sein du plasma conduit à la coupure des chaînes macromoléculaires et à la formation de radicaux libres. Les ions et les VUV, ayant une énergie de quelques dizaines d'électronvolts, peuvent casser les liaisons covalentes (C—C : 3,47 eV ; C—H : 4,16 eV ; C—N : 2,19 eV...). Ces radicaux réagissent ensuite avec les espèces actives du plasma pour donner de nouveaux groupements chimiques, qui dépendent de la nature de la phase gazeuse.

Les applications des procédés plasma sur les surfaces de polymères se sont développées depuis la fin des années 1960, principalement pour répondre aux besoins de l'industrie de la microélectronique pour:

- nettoyage de la surface, par le retrait des contaminants organiques et des produits de basse masse molaire (comme les additifs de surface) ;
- ablation ou attaque du polymère pour créer une forte rugosité de surface ;
- réticulation des couches de surface ;
- polymérisation ou greffage sur le substrat, quand un monomère (polymérisable ou réactif) est introduit dans le réacteur ;
- modification de la composition chimique de la surface.

Dans la suite, nous nous sommes intéressés uniquement à la modification de surface par plasma. Celle-ci s'accompagne généralement de l'ablation du polymère. La modification et l'ablation ont lieu en même temps et leur importance relative dépend des conditions expérimentales. On essaie généralement de minimiser l'ablation du polymère tout en augmentant le taux de la fonctionnalisation de la surface. Contrairement aux procédés qui modifient en profondeur le polymère, le plasma n'attaque que l'extrême surface ; la composition et la structure de seulement quelques couches moléculaires de la surface sont modifiées.

Le traitement plasma est aujourd'hui la voie la plus utilisée pour modifier chimiquement et physiquement les surfaces de matériaux de polymères. Pour l'industrie, il s'agit d'une technologie rapide, reproductible, peu polluante et qui se prête bien à la formation de motifs (modification localisée).

### **II.2.3. Oxydation de la surface du polystyrène par plasma**

Les traitements plasmas du polystyrène sont intensivement utilisés, essentiellement pour améliorer ses propriétés d'adhésion ou fabriquer des matériaux dédiés à la biologie cellulaire [192, 193, 199-201]. Les modifications chimiques de la surface qui en résultent ont été examinées principalement par spectroscopie de photoélectrons X (XPS), technique la plus utilisée pour l'étude des modifications de surfaces de polymères [198], la spectroscopie de masse des ions secondaires par temps de vol (ToF-SIMS) et des mesures d'angle de contact.

Les analyses XPS et ToF-SIMS montrent que le traitement plasma du polystyrène se traduit par l'introduction de fonctions oxygénées diverses (carboxyles, carbonyles, hydroxyles...) [193, 200, 202-208] et par une augmentation de la mouillabilité de la surface. Les noyaux aromatiques ont été identifiés comme des sites réactifs [200, 204, 206, 207] par ouverture ou par substitution.

L'XPS permet également d'analyser le profil de la modification en fonction de la profondeur en faisant varier l'angle entre la surface et l'entrée de l'analyseur. Quand l'angle de photoémission est de  $0^\circ$ , la profondeur de l'échantillonnage est maximale ; elle est, par contre, minimale quand l'angle est de  $90^\circ$ . Cette technique montre que l'oxygénation d'une surface de polystyrène traitée par plasma est concentrée sur les premières couches superficielles [198].

En outre, les analyses ToF-SIMS montrent que les traitements plasma causent majoritairement une rupture des chaînes en formant des fragments de faibles masses moléculaires (Mw). En raison de l'existence de ces fragments, les analyses MEB, AFM et ellipsométrie (dans le cas d'une couche fine de polystyrène déposée sur or) montrent une dégradation de la surface avec augmentation de sa rugosité, modification de la topographie et fragilisation des couches supérieures du polymère.

La mouillabilité diminue en fonction du temps et, au bout de quelques jours, [198, 200, 201] voire parfois quelques heures [209], la surface redevient presque aussi hydrophobe que celle du polystyrène non traité. En effet, les fonctions oxygénées obtenues par traitement plasma d'une surface de polystyrène ne sont pas stables dans le temps. Certains auteurs proposent que

cette courte durée de vie résulte du dépôt d'une couche de contamination sur la surface de haute énergie produite par le traitement plasma [210]. Cependant, la contamination a été exclue dans beaucoup d'études, qui ont attribué le comportement de vieillissement plutôt aux phénomènes de réorganisation de la surface [210-218]. Il s'agit alors, soit d'une réorientation de groupes fonctionnels, soit d'une diffusion des macromolécules fonctionnalisées. La surface du polymère se réorganise selon l'environnement [219-221].

La reconstruction de la surface résulte de l'excès d'énergie libre associé à l'interface entre le matériau massif et la couche modifiée en contact [216, 219, 220]. Comme la mobilité des chaînes macromoléculaires augmente avec la température, la réorganisation superficielle est fortement accélérée avec le chauffage [211, 214, 217, 218, 220]. Les fragments de faible masse moléculaire ( $M_w$ ) facilitent la réorganisation de la surface [204, 217, 222] et expliquent le rétablissement de son caractère hydrophobe. En effet, pour un fort  $M_w$ , seule la réorientation des groupements polaires a lieu, tandis qu'à faible  $M_w$ , on observe aussi la diffusion de macromolécules à l'intérieur du polymère [214, 216].

Les fragments de faible  $M_w$  peuvent être éliminés par des solvants [216, 217]. En revanche, du fait que les nouvelles fonctions oxygénées sont concentrées sur ces fragments, leur élimination fait diminuer considérablement l'énergie de la surface oxydée et donc sa mouillabilité. Par exemple, l'angle de contact d'une surface de polystyrène oxydée par un plasma d'oxygène passe de  $6.9^\circ$  à  $63.9^\circ$  après un simple rinçage au méthanol [216].

Plusieurs études ont porté sur la comparaison de la composition chimique de la surface oxydée en utilisant différents gaz de plasma, simples ou mélangés. Les plasma d'oxygène permettent d'obtenir les effets les plus importants (taux d'oxygénation, mouillabilité et rugosité) [200, 204-207, 223]; (voir tableau 1).

Malgré ces limitations, les traitements de surface du polystyrène par plasma sont couramment utilisés. Ils servent, par exemple, à faire adhérer ultérieurement un autre polymère. Ainsi, le dépôt sur polystyrène traité d'un dérivé du polyacrylamide rend la surface hydrophile, ce qui permet de contrôler ensuite l'adhésion et la croissance de cellules biologiques en fonction de la température : à  $37^\circ\text{C}$ , les cellules adhèrent, puis, une baisse de température de  $5^\circ\text{C}$  modifie la configuration de la chaîne du polymère et rend la surface hydrophobe. On assiste alors à un détachement des cellules.

Les traitements plasma permettent aussi de fonctionnaliser la surface du polymère par un groupement chimique spécifique. On utilise alors un plasma d'un gaz non inerte (dioxyde de carbone, azote, ammoniac, etc.) pour greffer un groupement chimique dérivé du gaz. Celui-ci peut être modifié ultérieurement pour obtenir une fonctionnalité désirée. Par exemple, pour

rendre une surface de polystyrène plus hydrophobe et moins adhérente, le plasma est réalisé en présence d'un gaz fluoré (perfluorocarbones  $CF_4$ ,  $C_2F_6$  ou hexafluorure de soufre,  $SF_6$ ). Ceci permet d'introduire des fonctions fluorées sur la surface du polymère [200, 220]. Buchmeiser *et al.* [193] ont utilisé un plasma d'azote pour former une surface de polystyrène contenant des fonctions amines, puis modifié ces dernières par un glutaraldéhyde substitué par plusieurs fonctions amines. Ils obtiennent une structure hyperbranchée de fonctions amines à la surface du polystyrène capable d'immobiliser des composés biologiques (BSA et trypsine).

Dans une autre étude [209] visant à fonctionnaliser spécifiquement la surface du polystyrène pour des perspectives biologiques, une grande quantité de groupements carboxyliques peut être introduite sur une surface de polystyrène grâce à un traitement plasma. La méthode consiste à immobiliser un copolymère de poly (méthyl vinyl ether/anhydride maléique) sur la surface du polystyrène par une réaction covalente induite par plasma. Ce traitement est suivi par une hydrolyse de la fonction anhydride maléique pour produire des groupements carboxyles. Il permet d'augmenter la mouillabilité de la surface, mais il ne tient pas plus que 24 h.

Contrairement à la plupart des travaux cités ci-dessus mettant en œuvre une décharge électrique comme source de plasma, une étude récente sur le polystyrène [200] montre que l'utilisation d'un faisceau d'électrons comme source de plasma permet de réduire l'ablation du polymère. La surface du polystyrène ainsi obtenue est aussi bien oxydée qu'avec un plasma à décharge électrique. La topographie et la rugosité de la surface sont, par contre, beaucoup moins altérées. Ce résultat devient très intéressant lorsqu'il s'agit de films de polymères très légers et/ou très fins et quand on recherche une résolution nanométrique.

En utilisant un masque de résine photorésistante, on peut créer par plasma d'oxygène des motifs hydrophiles sur la surface hydrophobe du polystyrène [224]. Un traitement ultérieur par du pluronic (copolymère anti-adhésif type polyéthylène glycol) et de la fibronectine (macromolécule permettant l'adhésion de cellules à une matrice extracellulaire) permet de discriminer des molécules adhésives et antiadhésives qui s'adsorbent respectivement sur la surface traitée et non traitée. Cette stratégie sert à diriger spécifiquement la croissance de cellules nerveuses [225].

Mauzeroll *et al.* [201] ont utilisé un canal de microfluidique sur un support de polystyrène préalablement traité par un plasma d'oxygène pour aligner des cellules biologiques suivant des lignes parallèles.

Notons enfin que, pour améliorer la qualité et la reproductibilité des traitements plasma, divers paramètres doivent être contrôlés, comme la pression, la vitesse du flux de gaz, la composition du mélange, la densité du plasma, la température de surface du matériau, le potentiel électrique de la pièce....En dépit de nombreuses applications du traitement plasma aux surfaces de polymères, le mécanisme du traitement n'est pas complètement élucidé, en raison principalement de la complexité inhérente au plasma.

### **II.3. Photo-oxydation**

Les réactions chimiques induites pendant la photo-irradiation des surfaces de polymères ont été décrites dans plusieurs revues [190, 226-232] et sont largement appliquées [189, 233-242]. Elles génèrent des radicaux qui coupent la chaîne de polymère et sont à l'origine de nouvelles liaisons et fonctionnalités. La photo-oxydation de la surface de polystyrène s'accompagne majoritairement d'une dégradation (ablation) [237, 240] de la chaîne de polymère, et aussi de la formation d'une structure réticulée [233, 238, 239].

Après une irradiation UV, les analyses de surfaces de polystyrène donnent des résultats qualitativement similaires à ceux obtenus par traitement plasma : des modifications de propriétés chimiques, physiques et biologiques de la surface (oxydation, mouillabilité et biocompatibilité) [189, 195, 236, 238, 243, 244]. Comme pour un traitement plasma, le processus de photooxydation touche essentiellement les couches superficielles du polystyrène. Ceci est attribué à l'atténuation de la lumière UV et à la diffusion limitée d'oxygène dans les couches profondes [234].

Cependant, le taux d'oxydation d'une surface de polystyrène traitée aux UV est moins important que celui obtenu par plasma [234]. En particulier, des analyses XPS et Infra Rouge montrent que les surfaces traitées aux UV contiennent moins de fonctions carbonyles et carboxyles que celles traitées par plasma. Par contre, un traitement UV en présence d'ozone [245] permet d'obtenir un taux d'oxygénation très élevé de la surface ( $\approx 27\%$ ).

Récemment, des chercheurs [195] ont utilisé simultanément les processus d'oxydation, ablation, et réticulation pour réaliser à l'aide d'une irradiation UV à travers un masque de cuivre des microstructures de polystyrène en forme de puits. La chimie et la topographie de ces structures ont permis d'immobiliser des cellules biologiques.

Toujours dans l'objectif de créer des surfaces structurées, utiliser un laser UV [236, 237, 241-248] permet de focaliser l'irradiation sans avoir recours à un masque. Comparée à une simple exposition UV, une courte (nanoseconde) irradiation laser de haute énergie engendre une

densité de radicaux significativement plus importante. La réaction prépondérante est alors la combinaison des radicaux et non leur réaction avec l'oxygène [246].

Les lasers permettent de modifier avec précision des zones micrométriques de formes complexes. L'irradiation laser UV peut changer la structure géométrique de la surface et amorcer des réactions chimiques qui causent la formation de nouveaux groupements fonctionnels polaires dans la couche superficielle du matériau.

L'irradiation laser permet de modifier et de graver des surfaces de polystyrène pour des applications dans le domaine des cultures cellulaires dans des systèmes micro-fluidiques [236, 241-244]. Les effets de différents paramètres de traitements laser (nature du laser, longueur d'onde, temps et nombre d'impulsions...) ont été étudiés [236, 243, 247]. Ils montrent que l'oxydation de la surface reste très faible par rapport à celle obtenue avec une irradiation de même dose<sup>1</sup> par une lampe UV [244]. Dans certains cas, un traitement à plusieurs pulses laser fait diminuer l'énergie de surface du polystyrène (augmentation de l'angle de contact d'une goutte d'eau) [244, 248]. En fait, le processus le plus important engendré par un traitement laser UV sur polystyrène est l'ablation de la chaîne de polymère. Il s'accompagne d'une importante modification de la rugosité [246]. Lorsque celle-ci devient régulière avec des poches d'air insérées dans la structure [248], la surface devient plus hydrophobe que le polymère non traité.

Une amélioration des propriétés d'adhésion résulte souvent de l'incorporation de nouvelles fonctions oxygénées qui modifie la polarité et la mouillabilité de la surface. Toutefois, en plus de la chimie, la topographie (ou la rugosité) de la surface peut également influencer l'adhésion des cellules et leurs configurations, même avec une faible énergie de surface [248]. Ainsi, une surface micro structurée par un traitement laser UV permet, selon l'épaisseur des microgravures et leur espacement, de faire adhérer des cellules biologiques, contrôler et diriger leur croissance selon un axe défini [241, 243].

Comme pour le traitement plasma, les phénomènes physicochimiques associés aux modifications induites par laser ne sont pas entièrement compris et restent un sujet d'études intensives [241, 243, 244, 246].

#### **II.4. Autres traitements d'irradiation**

La surface de polystyrène peut également être modifiée par des faisceaux d'électrons [249-253] ou de rayonnements gamma [252-255]. Les mécanismes d'oxydation par ces deux

---

<sup>1</sup> Dose d'irradiation = quantité d'énergie absorbée par la surface par quantité de matière



techniques sont similaires [249, 250]. Les modifications engendrées dépendent de la dose absorbée et peuvent s'étendre sur des épaisseurs beaucoup plus élevées que celles produites par irradiations plasma et UV. Elles peuvent atteindre, dans certaines conditions, quelques microns [250]. A faibles doses, ces rayonnements permettent de stériliser les surfaces de polystyrène [249, 253].

## II.5. Impression

Les techniques d'impression par micro contact au moyen de tampons ou de jets d'encre sont essentiellement appliquées pour greffer des monocouches auto-assemblées ou faire adhérer des protéines sur des surfaces.

Si l'utilisation de tampons de polydiméthylsiloxane (PDMS) est couramment appliquée sur des substrats d'or [256] ou de verre [257-259], la technique est plus délicate sur des matériaux plastiques (comme le polystyrène). En effet, bien que l'impression de protéines via un tampon de PDMS sur une surface de polystyrène soit précédemment rapportée [260], d'autres équipes ont décrit plusieurs difficultés [261] ou n'ont pas réussi à l'appliquer d'une façon satisfaisante [258]. En effet, le transfert de protéines du tampon de PDMS vers la surface du substrat dépend d'un certain nombre de paramètres [189, 259] : les propriétés de mouillabilité du tampon et du substrat, la composition de la solution d'impression, la pression appliquée, le temps de contact. Dans le cas de certaines géométries complexes du tampon, des flexions et d'autres déformations possibles du tampon élastomère sont, de plus, à prendre en compte [261].

En outre, ces techniques présentent quelques limitations: (1) la fabrication du tampon doit être réalisée en salle blanche, (2) la technique d'écriture n'est pas flexible et (3) elle ne permet pas d'évaluer localement et quantitativement la modification de la surface.

Récemment, la technique d'impression par jet d'encre de copolymères qui favorisent l'adhésion de cellules biologiques (acides lactique et glycolique) sur une surface de polystyrène a permis d'immobiliser des cellules souches [194]. La surface localement modifiée comporte alors des zones plus favorables (imprimées) ou moins favorables (polystyrène nu) à l'adhésion de cellules souches adipeuses humaines. Bien que cette technique offre une grande flexibilité d'écriture sans avoir recours ni à un masque ni à un tampon, elle exige un équipement approprié et la résolution spatiale est relativement limitée (approximativement 30  $\mu\text{m}$ ) [262].

## II.6. Traitement chimique par $O^{\bullet-}$ solvaté

Il est bien connu que les espèces oxygénées comme le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), le radical peroxyde ( $OOH^{\bullet}$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le radical anion de l'atome d'oxygène ( $O^{\bullet-}$ ) ont une forte réactivité chimique. Ces espèces sont majoritairement impliquées lors des traitements par irradiation, elles sont produites lors de l'ionisation de la phase gazeuse (en particulier  $O^{\bullet-}$ ).

Récemment, une nouvelle approche de synthèse de l'espèce ( $O^{\bullet-}$ ) par voie chimique [263-265] a été développée pour oxyder une surface de polystyrène [266]. La méthode consiste à générer un flux de  $O^{\bullet-}$  par émission anionique lors du stockage de  $[Ca_{24}Al_{28}O_{64}]^{4+}$ ,  $4 O^{\bullet-}$ . Ce minéral est synthétisé par réaction chimique en phase solide de  $CaCO_3$  et  $\gamma-Al_2O_3$  sous atmosphère anhydre d'oxygène. Des radicaux anions  $O^{\bullet-}$  solvatés sont ensuite obtenus par barbotage du flux gazeux dans une solution d'eau déminéralisée.

Le traitement de la surface du polystyrène par  $O^{\bullet-}$  solvaté engendre une augmentation de la rugosité, mouillabilité et énergie de la surface ainsi qu'une altération de la composition chimique de celle-ci. Le taux d'oxygène total sur la surface du polystyrène, estimé par XPS, passe de  $\sim 5$  (avant traitement) à 13% (après un traitement d'oxydation de 48 heures).

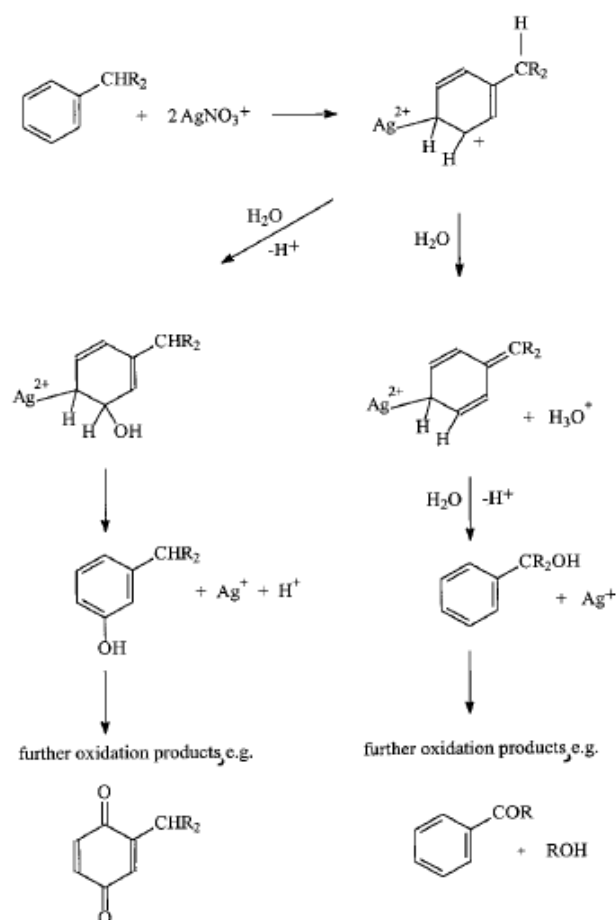
## II.7. Traitements électrochimiques

Etant donné que le traitement de surface du polystyrène procède par oxydation, la génération électrochimique en solution d'une espèce fortement oxydante permet de modifier les propriétés physicochimiques de la surface.

Plusieurs auteurs ont comparé l'oxydation des produits organiques par différents sels métalliques de cobalt (II), manganèse (III), cérium (IV), thallium (III) et argent (II). Ils ont montré que  $Ag(II)$  en milieu acide est le meilleur oxydant, à la fois puissant et spécifique pour dégrader les composés organiques [267-271].

En 1997, Brewis *et al.* ont proposé une méthode de prétraitement de polymères par voie électrochimique [272]. Elle consiste à générer le complexe  $AgNO_3^+$  par oxydation du nitrate d'argent en milieu acide nitrique dilué dans une cellule classique à deux compartiments dans laquelle est plongée une plaque de polymère. Ce complexe oxyde partiellement la surface du polymère. Il en résulte une amélioration des propriétés d'adhésion de divers polymères (polypropylène, polyfluorure de vinyle, polychlorure de vinyle, élastomère styrène butadiène, élastomère thermoplastique).

Lorsque le même traitement est réalisé sur polystyrène, des analyses ToF-SIMS et XPS montrent que l'attaque de ce polymère a lieu aussi bien au niveau de la chaîne principale - avec introduction de groupements hydroxyles, carbonyles et carboxyles-, qu'au niveau du noyau benzénique - avec introduction de phénols et éventuellement de quinones- [273] (cf mécanisme réactionnel, schéma 1). Des résultats similaires sont obtenus par électrolyse d'une solution d'acide nitrique en absence d'argent en portant l'anode à un potentiel supérieur. Le taux maximal d'oxygène introduit sur une surface de polystyrène oxydée, estimé par XPS, est de l'ordre de 10 % en présence d'argent. Il ne dépasse pas 5.5 % en l'absence d'argent, même après des temps de réaction très longs.



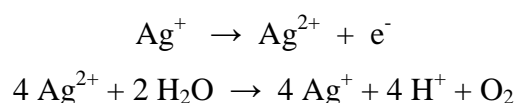
**Schéma 1.** Mécanisme d'oxydation des arènes par Ag(II). (ref [273])

Fleischmann et al. [269] ont étudié la cinétique du couple Ag(II)/Ag(I) en milieu acide nitrique 3 M. Ils ont montré que pour une concentration de Ag(I) de 10<sup>-2</sup> M, Ag(II) se forme sur électrode de platine selon une réaction rapide et réversible avec une constante de transfert de charge de 1.5x10<sup>-2</sup> cm s<sup>-1</sup>. La cinétique dépend de l'état de la surface de l'électrode qui varie au cours du temps. En effet, à potentiel élevé, une phase solide se forme à la surface de

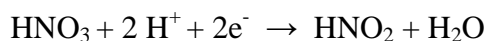
l'électrode (oxyde d'argent (II)). Ce processus agit sur la cinétique de formation d'Ag(II), les réactions deviennent plus lentes quand la couche d'oxyde devient plus épaisse. En chronoampérométrie, ce phénomène se caractérise par une augmentation brutale du courant d'oxydation de l'eau et par conséquent, la production de l'argent (II) est moins efficace.

L'argent (II) s'obtient à partir de 1.91 V/NHE. Ce potentiel est supérieur à celui d'oxydation de l'eau ( $E^\circ = 1.23$  V/NHE à pH 0) [270], Ag(II) est donc instable en milieu aqueux. Il oxyde l'eau selon un mécanisme décrit par Po *et al* [274], qui ont montré qu'en milieu acide nitrique 2-6 M, la réaction est du second ordre pour une concentration d'Ag (II)  $> 10^{-4}$  M avec une constante de  $1.78 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

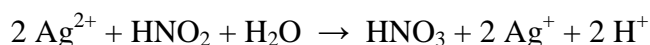
Ainsi, en travaillant dans une cellule compartimentée,  $\text{Ag}^{2+}$  se forme à l'anode:



Dans le compartiment cathodique, l'acide nitrique se réduit en acide nitreux selon :



L'acide nitreux produit à la cathode peut migrer vers le compartiment anodique à travers le séparateur et réduire l'argent (II) produit à l'anode. Cette réaction diminue l'efficacité de la production d'Ag(II) [270].



## II.8. Comparaison des traitements de surface de polystyrène

Pour comparer les différents traitements oxydant le polystyrène, nous avons extrait à partir de différentes sources de la littérature les résultats de modifications induites par ces différents traitements (cf Tableau 1). L'oxydation de la surface du polystyrène correspond à l'introduction de groupements oxygénés. Elle est essentiellement caractérisée par l'évaluation, par XPS, de la concentration atomique de l'oxygène, et aussi par le contraste de mouillabilité entre le polymère initialement hydrophobe et celui modifié plus hydrophile. A une surface mieux oxydée correspondent donc une concentration en oxygène et un contraste de mouillabilité plus élevés. La mouillabilité des surfaces a été estimée par l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée sur les différentes surfaces traitées. Cette mesure est délicate car elle nécessite le contrôle de divers paramètres, parmi lesquels on peut citer la méthode de mesure de l'angle (angle avançant, reculant...), l'environnement (température, humidité, pression en  $\text{CO}_2$ ...) et l'épaisseur du film lorsqu'il s'agit d'un film fin déposé sur un support [275]. C'est pourquoi la compilation des mesures donne des valeurs dispersées, en particulier

pour le polymère avant traitement (témoin). Citons les travaux de Wu [276] qui donne pour le polystyrène massif et pour des températures comprises entre 20 et 70°C des angles de contact de  $\theta_a = 91^\circ$  et  $\theta_r = 84^\circ$  ( $\theta_a$  et  $\theta_r$  étant les angles avançant et reculant, respectivement). Nous constatons dans le Tableau 1 un manque de données concernant les traitements en solution, notamment le traitement électrochimique.

La comparaison des résultats obtenus pour un même type de traitement montre l'importance des conditions opératoires sur la modification de la surface et ce des points de vue qualitatif et quantitatif. L'oxydation de la surface est la plus importante quand on utilise une source d'irradiation plus énergétique en présence d'un gaz oxygéné.

Par ailleurs, la majorité des mesures présentées pour les traitements par irradiation ont été réalisées sans rinçage de la surface avant analyse. Or, comme le montre le Tableau 1, ce paramètre a une grande influence. Il est donc difficile de comparer les traitements en phase gaz (en général pas de rinçage) et en solution (en général rinçage).

Ce tableau indique qu'après rinçage des surfaces traitées, la concentration en oxygène ne dépasse pas 15% pour l'ensemble des traitements oxydants du polystyrène, sauf pour le traitement UV/ozone pour lequel la valeur est nettement supérieure (27%). La mouillabilité des surfaces traitées après rinçage reste relativement faible pour tous les modes de traitement, en particulier pour le traitement laser (pas d'informations pour le traitement électrochimique). Ceci montre que (1) la plupart des traitements oxydants entraînent une importante dégradation du polymère avec une augmentation de la rugosité de la surface et (2) on ne peut pas se limiter à une simple mesure d'angle de contact pour avoir une réelle estimation d'un état d'oxydation d'une surface.

Compte tenu du temps de traitement nécessaire et du taux d'oxygénation obtenu, le traitement électrochimique par Ag(II) est d'une efficacité comparable au traitement plasma en présence d'oxygène. Ces deux traitements sont les plus intéressants pour oxyder la surface de polystyrène.

Traitement de surface	Conditions opératoires			Concentration en oxygène (%)	Mouillabilité (°)	Références
	gaz	Source et Puissance	Temps (s)			
<b>Témoin</b>				0-5	80-95	[193, 200, 201, 216, 224, 234, 248, 276]
<b>Plasma</b>	Ar/O <sub>2</sub>	F.E.	60	15.8*	24*	[200]
	Ar/N <sub>2</sub>	F.E.	60	13.1*	42*	[200]
	Ar/SF <sub>6</sub>	F.E.	60	5.1*	103*	[200]
	Ar	D.E/ r.f 50 W	300-1800		45-37*	[248]
	O <sub>2</sub>	D.E/ r.f 0.5-100 W 100 W 20 W 10 W	240 300 120-720 60	17.6-28.3* 19.4* 19.3*/14.4**	52.8** <10 – 14* 30-28* 6.9*/63.9**	[224] [201] [193] [248] [216]
	N <sub>2</sub>	D.E/ r.f 100 W	300	18.3*	-	[193]
<b>Lampe UV</b>	air	0.9 mW/cm <sup>2</sup> 40 mW/cm <sup>2</sup>	240 60-1200	17-18* 5-35*	45*	[234, 244] [195]
	O <sub>3</sub>		90	35*/27**	60	[245]
		190 mJ/cm <sup>2</sup> 0.6 mJ/cm <sup>2</sup>		12*	69-96* 95*	[248] [244]
<b>F.E</b>		50-600 (kGy)		-	60-35	[250]
<b>O<sup>•-</sup></b>			48h	13**	79**	[266]
<b>(Ag/HNO<sub>3</sub>)</b>			5-60	10**		[277]
<b>(HNO<sub>3</sub>)</b>			Très long	5.5**		[277]

**Tableau1** : Comparaison des différents traitements de surface de polystyrène

\* : surface fraîchement oxydée et sans contact préalable avec une quelconque solution.

\*\* : après un rinçage (méthanol, éthanol...)

F.E : Faisceau d'électrons

D.E : Décharge électrique

r.f : radio fréquence

### **III. Fonctionnalisation de surface de monocouches auto-assemblées fluorées par réduction**

#### **III.1. Présentation**

Les monocouches auto-assemblées (SAMs) sont utilisées dans diverses d'applications, comme la microfluidique [278], la nanolubrification [279, 280], la prévention contre la corrosion [281] et les capteurs moléculaires [282]. Les SAMs fluorées sont principalement utilisées comme couches anti-adhésives lors des procédés de lithographie par nanoimpression [283]. Greffée à la surface du moule, une monocouche fluorée permet de réduire l'énergie de surface de ce dernier, ce qui facilite l'étape de la séparation de la résine.

Etant donné que le fluor est l'élément le plus électronégatif de la classification périodique (électronégativité de 3.98 sur l'échelle de Pauling [284]), la chimie des composés fluorés diffère considérablement de celle des autres composés halogénés. La liaison fluor carbone est la liaison la plus forte impliquant l'atome de carbone (466 kJ/mol) [285], ce qui explique que le fluor soit un moins bon groupe partant que les autres halogènes dans beaucoup de réactions organiques. La liaison C-F est donc extrêmement stable dans les couches organiques fluorées, qui sont bien connues pour leurs propriétés particulières : forte inertie chimique, stabilité thermique, forte hydrophobie, faible solvatation par les solvants usuels, faible constante diélectrique et biocompatibilité. Ces performances font des surfaces fluorées des supports de choix pour la fabrication de microsystèmes tels que des dispositifs microfluidiques [286, 287], des surfaces superhydrophobes [288] ou des surfaces à micro-motifs pour la manipulation et la croissance de cellules [289-291].

Au laboratoire, de nombreuses études ont été menées sur des supports fluorés, en particulier le polytétrafluoroéthylène (PTFE), Teflon® [292, 293]. Le PTFE est le polymère fluoré le plus utilisé industriellement grâce à ses propriétés particulières. En effet, il offre une grande stabilité à haute température (jusqu'à 250°C) et des propriétés anti-adhésives, diélectriques et mécaniques intéressantes. Il est utilisable en biologie car il est biocompatible et n'est pas cytotoxique. Cependant, sa grande inertie chimique fait qu'il est difficile de l'assembler ou de le coller avec d'autres matériaux. De ce fait, il reste peu utilisé dans les applications biologiques telles les biopuces.

Comparées au PTFE, les SAMs de molécules organiques perfluorées greffées sur, par exemple, de l'or, du verre ou du silicium, ont l'avantage d'être bien organisées et de présenter un meilleur état de surface. Sur des supports transparents tel que le verre, elles offrent de plus

la possibilité d'être combinées à des techniques optiques. Le verre est en effet un matériau de choix pour les applications biologiques du fait de sa biocompatibilité et de sa transparence optique.

Les silanes perfluorés permettent de former facilement des couches chimiquement inertes, hydrophobes et lipophobes. Ces couches fluorées devraient être de bons candidats comme supports de motifs de mouillabilité contrôlée, à condition de savoir les modifier localement. Cependant, à cause de la forte liaison C-F, la modification localisée de surfaces de SAMs perfluorées est délicate. La faible énergie de surface défavorise l'adhésion d'autres couches, ce qui rend difficile l'utilisation de films photorésistants. De plus, la réduction de chaînes fluorées courtes est plus difficile que celle des chaînes polymériques. Ceci est dû au phénomène de dislocation de charges qui est plus favorable sur une chaîne plus longue.

Malgré la difficulté de la réduction des SAMs perfluorées, quelques procédures de traitement de ces surfaces, pour augmenter leur énergie de surface et les rendre adhérentes et mouillables, ont été décrites dans la littérature. Nous exposons ici celles qui sont en rapport avec notre travail ainsi que les plus communément utilisées. Nous décrivons également des méthodes reportées dans la littérature dans le cas du PTFE et qui pourraient s'appliquer aux couches perfluorées. Dans tous les cas, ces méthodes utilisent des procédés fortement énergétiques.

### III.2. Electrons solvatés

La modification de surfaces fluorées par des électrons solvatés a été décrite depuis la fin des années 50 dans un travail breveté par Purvis et Beck [294]. C'est le traitement le plus puissant, efficace, et économique des traitements des surfaces fluorées.

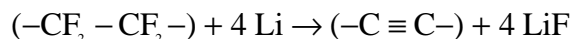
La méthode consiste à introduire des métaux alcalins comme le lithium, le sodium ou le potassium dans une solution d'ammoniac liquide. Le métal se dissout alors sous forme d'un cation associé à un électron solvaté. La solution fortement réductrice obtenue est d'usage courant en chimie et électrochimie organiques [267, 295-298].

L'efficacité de ce traitement est due au potentiel électrochimique très élevé des électrons solvatés en présence de métaux alcalins (si  $M=Li, Na, K, E_{M/NH_3} \approx -3$  V/ECS [299, 300]).

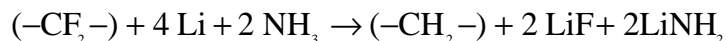
Quel que soit le métal, les solutions d'électrons solvatés réagissent fortement avec les chaînes fluorées. Dans le cas d'un polymère massif comme le PTFE, l'effet de la réaction se visualise par le noircissement rapide de la surface lié à sa carbonisation. La défluoration est généralement incomplète et elle conduit majoritairement à des liaisons C-H, C=C et à des carbones oxygénés. Le polymère est attaqué en profondeur et devient poreux [301].



La réaction du PTFE avec des solutions de lithium métallique conduit à un produit de réaction noir lorsque le rapport  $\text{Li}/\text{CF}_2 \leq 2$  (polyacétylène) :



ou à un polyéthylène de haute densité quand  $\text{Li}/\text{CF}_2 = 4$  [302] :



Outre les polymères fluorés, les solutions d'électrons solvatés également avec les surfaces greffées par des chaînes fluorées. Une étude récente du laboratoire [303] a ainsi montré qu'il était possible de réduire par une solution d'électrons solvatés des monocouches de silane perfluoré. Cette réduction, plus difficile que sur les polymères, est également plus complexe à observer car elle reste invisible à l'œil nu. Des expériences de condensation d'eau permettent néanmoins de la mettre en évidence. Des mesures d'angles de contact sur des surfaces ayant subi le traitement de réduction pendant des durées différentes montrent que le temps minimum de réaction est de l'ordre de 30 s. L'angle de contact d'une goutte d'eau sur une surface de verre fluoré passe alors de  $108 \pm 3^\circ$  à  $77 \pm 3^\circ$ , respectivement avant et après traitement.

La réduction a été réalisée sur une surface de quelques centimètres carrés trempée dans la solution réactive. Cependant, pour des applications dans des microsystèmes, il serait nécessaire de réduire la taille de la zone modifiée en utilisant un outil approprié tel que le microscope électrochimique à balayage.

### III.3. Solution de radicaux anions

Les radicaux anions des composés aromatiques sont également utilisés comme donneurs d'électrons dans des solvants aprotiques pour réduire les surfaces fluorées. La réduction des monocouches de silanes perfluorés étant plus difficile que celle des polymères, elle nécessite l'utilisation des radicaux les plus puissants.

Dans le cas des polymères fluorés, le radical anion du naphthalène, obtenu par action du sodium métallique sur le naphthalène dans du tétrahydrofurane (THF), est souvent utilisé pour carboniser la surface du polymère [304]. Ce réactif est commercialisé par de nombreuses sociétés pour le conditionnement des surfaces de PTFE avant collage [305, 306]. Des méthodes similaires faisant intervenir d'autres radicaux-anions, métaux alcalins et solvants aprotiques sont aussi décrites [307]. L'inconvénient majeur de ce procédé est lié au danger de manipulation du métal alcalin lorsque le milieu n'est pas anhydre.

Une variante de cette méthode consiste à générer électrochimiquement le radical anion [308]. Ainsi, l'électrolyse à potentiel contrôlé (entre -2,45 et -2,6 V vs ECS) d'une solution de naphthalène dans le diméthylformamide (DMF) en présence de tétrafluoroborate de

tétrabutylammonium ( $\text{NBu}_4\text{BF}_4$ ) donne une solution vert foncé correspondant au radical anion du naphthalène. Au contact de cette solution, le polymère noircit en quelques minutes.

La réduction électrochimique indirecte de nombreux polymères fluorés a été étudiée au laboratoire, en particulier dans le cas du PTFE. Comme reporté dans le paragraphe I.5.1, la microscopie électrochimique a été alors utilisée pour générer à l'électrode le radical anion (de la 2,2'-bipyridine ( $E^\circ = -2,10 \text{ V/ECS/DMF}$ ) ou du naphthalène ( $E^\circ = -2,47 \text{ V/ECS/DMF}$ )) et réaliser des modifications locales sur la surface de ces polymères.

Notre équipe a tiré profit de ce savoir faire pour modifier des monocouches greffées par un silane perfluoré. On génère alors à l'électrode le radical anion de la tri-p-tolylphosphine dont le potentiel est très négatif ( $E^\circ = -2,67\text{V/ECS/DMF}$ ). Cette technique a permis la création de motifs de quelques centaines de microns avec une faible énergie de surface sur un support fluoré initialement très hydrophobe [303].

Nous avons poursuivi cette étude par (1) des caractérisations des surfaces par des méthodes physiques et (2) des essais d'immobilisation sélective de polymères, métaux et cellules biologiques sur les motifs. Ce travail fera l'objet du chapitre 2.

#### **III.4. Traitements par plasma**

Les traitements plasma ont été intensivement étudiés et utilisés sur des polymères fluorés, notamment le PTFE. Ces traitements provoquent alors la réticulation des chaînes résultant de la réaction entre radicaux libres, la formation de carbones insaturés  $\text{C}=\text{C}$  et l'oxygénation de la surface traitée par exposition du matériau à l'air.

Dans le cas des SAMs fluorées, un traitement plasma hautement énergétique en présence d'oxygène avec un temps d'exposition relativement lent a été récemment utilisé pour dégreffer localement une monocouche fluorée assemblée sur une surface de silicium [289]. Ce traitement permet de fabriquer une surface microstructurée avec des bandes de mouillabilité contrastée favorisant ou pas, selon la taille de ces bandes, une adhésion spécifique de cellules biologiques. Par contre, des analyses de surface n'ont pas été faites sur les surfaces traitées.

#### **III.5. Autres traitements d'irradiation**

Les effets d'une irradiation électronique ou de rayons X sur des surfaces de SAMs fluorées ont déjà été prouvés [309]. Des études par XPS montrent que les chaînes sont principalement modifiées par les photoélectrons et les électrons secondaires, tandis que l'effet causé par les rayons X primaires est très minime, voire absent [310, 311]. La possibilité de concentrer le faisceau sur une zone très étroite, fait de ces techniques d'irradiation par faisceaux, des

méthodes bien appropriées à la modification locale des monocouches fluorées et à la création de motifs.

Dans une autre étude, Frey et al. ont examiné les effets d'une irradiation d'électrons de faible énergie (10 eV) sur une série de SAMs partiellement fluorées greffées sur or :  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_9(\text{CH}_2)_n\text{SH}$  ( $n = 2, 11, 17$ ) [312]. Dans tous les cas, les électrons induisent une modification des monocouches. Les auteurs observent une considérable diminution des groupements fluorés et une dégradation totale des groupements  $\text{CF}_3$  terminaux. Ils montrent que les fragments carbonés désorbés proviennent exclusivement des régions fluorocarbonées et non hydrocarbonées.

Finalement, un faisceau d'ions de forte énergie modifie également localement des monocouches auto-assemblées de silanes perfluorés [313].

D'un autre côté, des surfaces structurées en bandes hydrophobes et hydrophiles ont été obtenues à partir de SAMs fluorées déposées sur une surface de  $\text{TiO}_2$  [314, 315]. Une irradiation UV permet de décomposer la couche fluorée, ce qui rend la surface de  $\text{TiO}_2$  superhydrophile. La structuration de la surface peut être assurée en amont par utilisation d'une surface préalablement structurée en  $\text{TiO}_2$  [314] ou en aval par une irradiation UV à travers un masque photorésistant [315].

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la microscopie électrochimique à balayage permet également de modifier localement les surfaces de polymères fluorés et de monocouches fluorées greffées sur du verre.

## Références bibliographiques du chapitre 1

1. Engstrom, R.C., et al., *Measurements within the Diffusion Layer Using a Microelectrode Probe*. Analytical Chemistry, 1986. **58**(4): p. 844-848.
2. Bard, A.J., et al., *Digital-Simulation of the Measured Electrochemical Response of Reversible Redox Couples at Microelectrode Arrays - Consequences Arising from Closely Spaced Ultramicroelectrodes*. Analytical Chemistry, 1986. **58**(11): p. 2321-2331.
3. Bard, A.J., et al., *Scanning Electrochemical Microscopy - Introduction and Principles*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(2): p. 132-138.
4. Kwak, J. and A.J. Bard, *Scanning Electrochemical Microscopy - Theory of the Feedback Mode*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(11): p. 1221-1227.
5. Bard, A.J. and M.V. Mirkin, *Scanning Electrochemical Microscopy*. Marcel Dekker, Inc ed. 2001, New York.
6. Lefrou, C. and R. Cornut, *Analytical Expressions for Quantitative Scanning Electrochemical Microscopy (SECM)*. Chemphyschem, 2010. **11**(3): p. 547-556.
7. Wittstock, G., et al., *Scanning electrochemical microscopy for direct imaging of reaction rates*. Angewandte Chemie-International Edition, 2007. **46**(10): p. 1584-1617.
8. Sun, P., F.O. Laforge, and M.V. Mirkin, *Scanning electrochemical microscopy in the 21st century*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2007. **9**(7): p. 802-823.
9. Zrenner, E., et al., *Subretinal Microelectrode Arrays Allow Blind Retinitis Pigmentosa Patients to Recognize Letters and Combine them to Words*, in *Proceedings of the 2009 2nd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics, Vols 1-4*, R. Shi, et al., Editors. 2009. p. 1049-1052.
10. Bard, A.J., F.R.F. Fan, and M.V. Mirkin, in *Physical electrochemistry. Principles, Methods and Applications*. 1995, Rubinstein, I.: Marcel Dekker: New York. p. 209-242.
11. Bard, A.J., F.R.F. Fan, and M.V. Mirkin, in *Electroanalytical Chemistry*. 1994, Rubinstein, I.: Marcel Dekker: New York. p. 243.
12. Laforge, F.O., P. Sun, and M.V. Mirkin, *Physicochemical applications of scanning electrochemical microscopy*, in *Advances in Chemical Physics, Vol 139*. 2008, John Wiley & Sons Inc: New York. p. 177-244.
13. Mirkin, M.V. and B.R. Horrocks, *Fundamentals of scanning electrochemical microscopy*, in *Electrochemical microsystem technologies* J.W. Schultze, T. Osaka, and M. datta, Editors. 2002: New Fetter Lan, London. p. 209-242.
14. Amatore, C., *electrochemistry at ultramicroelectrodes*, in *Physical electrochemistry*. 1995, Rubinstein, I.: Marcel Dekker: New York. p. 131-208.
15. Wightman, R.M. and D.O. Wipf, *Voltammetry at Ultramicroelectrodes*. Electroanalytical Chemistry, 1989. **15**: p. 267-353.
16. Comstock, D.J., et al., *Integrated Ultramicroelectrode-Nanopipet Probe for Concurrent Scanning Electrochemical Microscopy and Scanning Ion Conductance Microscopy*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(4): p. 1270-1276.
17. Xu, X., et al., *A simple and inexpensive method for fabrication of ultramicroelectrode array and its application for the detection of dissolved oxygen*. Electroanalysis, 2008. **20**(7): p. 797-802.
18. Orozco, J., C. Fernandez-Sanchez, and C. Jimenez-Jorquera, *Underpotential deposition-anodic stripping voltammetric detection of copper at gold nanoparticle-modified ultramicroelectrode arrays*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**(13): p. 4877-4882.

19. Orozco, J., C. Jimenez-Jorquera, and C. Fernandez-Sanchez, *Gold nanoparticle-modified ultramicroelectrode arrays for biosensing: A comparative assessment*. *Bioelectrochemistry*, 2009. **75**(2): p. 176-181.
20. Lupu, S., F.J. del Campo, and F.X. Munoz, *Development of microelectrode arrays modified with inorganic-organic composite materials for dopamine electroanalysis*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2010. **639**(1-2): p. 147-153.
21. Hayden, C.J. and C. Dalton, *Direct patterning of microelectrode arrays using femtosecond laser micromachining*. *Applied Surface Science*, 2010. **256**(12): p. 3761-3766.
22. Gornall, D.D., S.D. Collyer, and S.P.J. Higson, *Evaluation of Poly (o-phenylenediamine) Films for Application as Insulating Layers upon Carbon Substrates for Use within Sonochemically Fabricated Microelectrode Arrays*. *Electroanalysis*, 2010. **22**(4): p. 384-392.
23. Anderson, E.C., M.C. Weston, and I. Fritsch, *Investigations of Redox Magnetohydrodynamic Fluid Flow At Microelectrode Arrays Using Microbeads*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(7): p. 2643-2651.
24. Paixao, T. and M. Bertotti, *Methods for Fabrication of Microelectrodes Towards Detection in Microenvironments*. *Quimica Nova*, 2009. **32**(5): p. 1306-1314.
25. Kang, G., et al., *Agarose microwell based neuronal micro-circuit arrays on microelectrode arrays for high throughput drug testing*. *Lab on a Chip*, 2009. **9**(22): p. 3236-3242.
26. Hood, S.J., et al., *Why 'the bigger the better' is not always the case when utilising microelectrode arrays: high density vs. low density arrays for the electroanalytical sensing of chromium(VI)*. *Analyst*, 2009. **134**(11): p. 2301-2305.
27. Xiao, L., et al., *Fabricating random arrays of boron doped diamond nano-disc electrodes: Towards achieving maximum Faradaic current with minimum capacitive charging*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2008. **133**(1): p. 118-127.
28. Xiao, X.Y. and A.J. Bard, *Observing single nanoparticle collisions at an ultramicroelectrode by electrocatalytic amplification*. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**(31): p. 9610-+.
29. Combellas, C., et al., *Electrochemical and Spectroscopic Investigation of Counterions Exchange in Polyelectrolyte Brushes*. *Langmuir*, 2009. **25**(9): p. 5360-5370.
30. Amatore, C., et al., *Electrochemical Determination of Flow Velocity Profile in a Microfluidic Channel from Steady-State Currents: Numerical Approach and Optimization of Electrode Layout*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(18): p. 7667-7676.
31. Amatore, C., S. Arbault, and A.C.W. Koh, *Simultaneous Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Released by a Single Macrophage by Triple Potential-Step Chronoamperometry*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(4): p. 1411-1419.
32. Myllymaa, S., et al., *Fabrication and testing of polyimide-based microelectrode arrays for cortical mapping of evoked potentials*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **24**(10): p. 3067-3072.
33. Amatore, C., et al., *Analysis of individual biochemical events based on artificial synapses using ultramicroelectrodes: cellular oxidative burst*. *Faraday Discussions*, 2000. **116**: p. 319-333.
34. Forster, R.J., *Microelectrodes - New Dimensions in Electrochemistry*. *Chemical Society Reviews*, 1994. **23**(4): p. 289-297.
35. Portail, N., *Thèse de doctorat*, in *Electrochimie - Corrosion*. 2007, université Paris VI.
36. Arrigan, D.W.M., *Nanoelectrodes, nanoelectrode arrays and their applications*. *Analyst*, 2004. **129**(12): p. 1157-1165.

37. Fletcher, S. and M.D. Horne, *Random assemblies of microelectrodes (RAM (TM) electrodes) for electrochemical studies*. Electrochemistry Communications, 1999. **1**(10): p. 502-512.
38. Sun, P., et al., *Fabrication of nanometer-sized electrodes and tips for scanning electrochemical microscopy*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(21): p. 5346-5351.
39. Slim, C., et al., *Polyaniline films based ultramicroelectrodes sensitive to pH*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2008. **612**(1): p. 53-62.
40. Wei, C., et al., Analytical Chemistry 1995. **67**: p. 1346-1356.
41. Fuchs, A., *Thèse de doctorat*, in *Electrochimie*. 2006, université Paris VI.
42. Parcher, J.F., C.J. Barbour, and R.W. Murray, *Solid-State Voltammetry and Polymer Electrolyte Plasticization as a Basis for an Electrochemical Gas-Chromatographic Detector*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(6): p. 584-589.
43. Amatore, C. and F. Pfluger, *Mechanism of Oxidative Addition of Palladium(0) with Aromatic Iodides in Toluene, Monitored at Ultramicroelectrodes*. Organometallics, 1990. **9**(8): p. 2276-2282.
44. Wang, S.S., *Microelectrode Arrays for Lubricant Studies*. Journal of the Electrochemical Society, 1989. **136**(3): p. 713-715.
45. Samec, Z., E. Samcova, and H.H. Girault, *Ion amperometry at the interface between two immiscible electrolyte solutions in view of realizing the amperometric ion-selective electrode*. Talanta, 2004. **63**(1): p. 21-32.
46. Wightman, R.M. and D.O. Wipf, in *Electroanalytical Chemistry*, A.J. Bard, Editor. 1989: Marcel Dekker: New York. p. 309.
47. Amatore, C., et al., *Direct Monitoring of Ultrafast Redox Commutation at the Nanosecond and Nanometer Scales by Ultrafast Voltammetry: From Molecular Wires to Cation Releasing Systems*. Israel Journal of Chemistry, 2008. **48**(3-4): p. 203-214.
48. Yamashita, K., et al., *Visualization of DNA microarrays by scanning electrochemical microscopy (SECM)*. Analyst, 2001. **126**(8): p. 1210-1211.
49. Kranz, C., et al., *Imaging of microstructured biochemically active surfaces by means of scanning electrochemical microscopy*. Electrochimica Acta, 1997. **42**(20-22): p. 3105-3111.
50. Schuhmann, W., et al., *Pulse technique for the electrochemical deposition of polymer films on electrode surfaces*. Biosensors & Bioelectronics, 1997. **12**(12): p. 1157-1167.
51. Macpherson, J.V. and P.R. Unwin, *Scanning electrochemical microscope-induced dissolution: Theory and experiment for silver chloride dissolution kinetics in aqueous solution without supporting electrolyte*. Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(50): p. 19475-19483.
52. Wu, Y.M., F.R.F. Fan, and A.J. Bard, *High-resolution deposition of polyaniline on pt with the scanning electrochemical microscope*. Journal of the Electrochemical Society, 1989. **136**(3): p. 885-886.
53. Marck, C., K. Borgwarth, and J. Heinze, *Micropatterns of poly(4,4'-dimethoxy-2,2'-bithiophene) generated by the scanning electrochemical microscope*. Advanced Materials, 2001. **13**(1): p. 47-+.
54. Marck, C., K. Borgwarth, and J. Heinze, *Generation of polythiophene micropatterns by scanning electrochemical microscopy*. Chemistry of Materials, 2001. **13**(3): p. 747-752.
55. Niu, L., et al., *Application of scanning electrochemical microscope in the study of corrosion of metals*. Journal of Materials Science, 2009. **44**(17): p. 4511-4521.
56. Gonzalez-Garcia, Y., et al., *Imaging metastable pits on austenitic stainless steel in situ at the open-circuit corrosion potential*. Electrochemistry Communications, 2004. **6**(7): p. 637-642.

57. Casillas, N., et al., *Pitting corrosion of titanium*. Journal of the Electrochemical Society, 1994. **141**(3): p. 636-642.
58. Gyurcsanyi, R.E., et al., *Chemical imaging of biological systems with the scanning electrochemical microscope*. Bioelectrochemistry, 2004. **63**(1-2): p. 207-215.
59. Li, X. and A.J. Bard, *Scanning electrochemical microscopy of HeLa cells - Effects of ferrocene methanol and silver ion*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2009. **628**(1-2): p. 35-42.
60. Williams, C.G., et al., *Scanning Micropipet Contact Method for High-Resolution Imaging of Electrode Surface Redox Activity*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(7): p. 2486-2495.
61. Basame, S.B. and H.S. White, *Scanning electrochemical microscopy of metal/metal oxide electrodes. Analysis of spatially localized electron-transfer reactions during oxide growth*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(15): p. 3166-3170.
62. Treichel, D.A., M.V. Mirkin, and A.J. Bard, *Scanning Electrochemical Microscopy .27. Application of a Simplified Treatment of an Irreversible Homogeneous Reaction Following Electron-Transfer to the Oxidative Dimerization of 4-Nitrophenolate in Acetonitrile*. Journal of Physical Chemistry, 1994. **98**(22): p. 5751-5757.
63. McKay, L. and R.J. LeSuer, *A mechanistic investigation of di-tert-butyl nitroxide using scanning electrochemical microscopy (SECM)*. Electrochimica Acta, 2008. **53**(28): p. 8305-8309.
64. Shoup, D. and A. Szabo, *Influence of Insulation Geometry on the Current at Microdisk Electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1984. **160**(1-2): p. 27-31.
65. Galceran, J., et al., *Analytical expressions for feedback currents at the scanning electrochemical microscope*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(33): p. 7993-8000.
66. Lefrou, C., *A unified new analytical-approximation for positive feedback currents with a microdisk SECM tip*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2006. **592**(1): p. 103-112.
67. Daniele, S., I. Ciani, and D. Battistel, *Effect of the insulating shield thickness on the steady-state diffusion-limiting current of sphere cap microelectrodes*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(1): p. 253-259.
68. Mirkin, M.V., F.R.F. Fan, and A.J. Bard, *Scanning Electrochemical Microscopy .13. Evaluation of the Tip Shapes of Nanometer Size Microelectrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1992. **328**(1-2): p. 47-62.
69. Amphlett, J.L. and G. Denuault, *Scanning electrochemical microscopy (SECM): An investigation of the effects of tip geometry on amperometric tip response*. Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(49): p. 9946-9951.
70. Shao, Y.H. and M.V. Mirkin, *Probing ion transfer at the liquid/liquid interface by scanning electrochemical microscopy (SECM)*. Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(49): p. 9915-9921.
71. Cornut, R. and C. Lefrou, *New analytical approximation of feedback approach curves with a microdisk SECM tip and irreversible kinetic reaction at the substrate*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2008. **621**(2): p. 178-184.
72. Lefrou, C., *Very easy kinetics determination for feedback curves with a microdisk SECM tip and rather rapid substrate reaction*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2007. **601**(1-2): p. 94-100.
73. Miao, W.J., Z.F. Ding, and A.J. Bard, *Solution viscosity effects on the heterogeneous electron transfer kinetics of ferrocenemethanol in dimethyl sulfoxide-water mixtures*. Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**(6): p. 1392-1398.

74. Mirkin, M.V., L.O.S. Bulhoes, and A.J. Bard, *Determination of the Kinetic-Parameters for the Electroreduction of C-60 by Scanning Electrochemical Microscopy and Fast Scan Cyclic Voltammetry*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(1): p. 201-204.
75. Mirkin, M.V., T.C. Richards, and A.J. Bard, *Scanning Electrochemical Microscopy .20. Steady-State Measurements of the Fast Heterogeneous Kinetics in the Ferrocene/Acetonitrile System*. Journal of Physical Chemistry, 1993. **97**(29): p. 7672-7677.
76. Sun, P. and M.V. Mirkin, *Kinetics of electron-transfer reactions at nanoelectrodes*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(18): p. 6526-6534.
77. Parthasarathy, M. and V.K. Pillai, *Imaging hydrogen oxidation activity of catalyst-coated perfluoro sulfonic acid-polymer electrolyte membranes using Scanning Electrochemical Microscopy*. Journal of Chemical Sciences, 2009. **121**(5): p. 719-725.
78. Jeon, I.C. and F.C. Anson, *Application of scanning electrochemical microscopy to studies of charge propagation within polyelectrolyte coatings on electrodes*. Analytical Chemistry, 1992. **64**(18): p. 2021-2028.
79. Tsionsky, M., A.J. Bard, and M.V. Mirkin, *Long-range electron transfer through a lipid monolayer at the liquid/liquid interface*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(44): p. 10785-10792.
80. Tsionsky, M., A.J. Bard, and M.V. Mirkin, *Scanning electrochemical microscopy .34. Potential dependence of the electron-transfer rate and film formation at the liquid/liquid interface*. Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(45): p. 17881-17888.
81. Wei, C., A.J. Bard, and M.V. Mirkin, *Scanning electrochemical microscopy .31. application of secm to the study of charge-transfer processes at the liquid-liquid interface*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**(43): p. 16033-16042.
82. Ciani, I., et al., *Effect of surface pressure on oxygen transfer across molecular monolayers at the air/water interface: Scanning electrochemical microscopy investigations using a mercury hemispherical microelectrode probe*. Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(12): p. 3801-3809.
83. Zhang, J. and P.R. Unwin, *Effect of fatty alcohol monolayers on the rate of bromine transfer across the water/air interface: Assessment of candidate models using scanning electrochemical microscopy*. Langmuir, 2002. **18**(4): p. 1218-1224.
84. Feng, W.J., S.A. Rotenberg, and M.V. Mirkin, *Scanning electrochemical microscopy of living cells. 5. Imaging of fields of normal and metastatic human breast cells*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(16): p. 4148-4154.
85. Liu, B., S.A. Rogenberg, and M.V. Mirkin, *Scanning electrochemical microscopy of living cells. 4. Mechanistic study of charge transfer reactions in human breast cells*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(24): p. 6340-6348.
86. Cai, C.X., et al., *Scanning electrochemical microscopy of living cells. 3. Rhodobacter sphaeroides*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(1): p. 114-119.
87. Liu, B., S.A. Rotenberg, and M.V. Mirkin, *Scanning electrochemical microscopy of living cells: Different redox activities of nonmetastatic and metastatic human breast cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(18): p. 9855-9860.
88. Richards, T.C., et al., *Investigation of the electrochemical reduction of Cp-Asterisk-Re(CO)<sub>2</sub>(P-N<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OMe) BF<sub>4</sub> by scanning electrochemical microscopy*. Organometallics, 1994. **13**(3): p. 757-759.
89. Kanoufi, F., et al., *Scanning electrochemical microscopy. 43. Investigation of oxalate oxidation and electrogenerated chemiluminescence across the liquid-liquid interface*. Journal of Physical Chemistry B, 2001. **105**(37): p. 8951-8962.



90. Mirkin, M.V., H.J. Yang, and A.J. Bard, *Borohydride oxidation at a gold electrode*. Journal of the Electrochemical Society, 1992. **139**(8): p. 2212-2217.
91. Zhou, F.M., P.R. Unwin, and A.J. Bard, *Scanning electrochemical microscopy .16. study of 2nd-order homogeneous chemical-reactions via the feedback and generation collection modes*. Journal of Physical Chemistry, 1992. **96**(12): p. 4917-4924.
92. Zhou, F.M. and A.J. Bard, *Detection of the electrohydrodimerization intermediate acrylonitrile radical-anion by scanning electrochemical microscopy*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(1): p. 393-394.
93. Bollo, S., et al., *Scanning electrochemical microscopy (SECM) study of superoxide generation and its reactivity with 1,4-dihydropyridines*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2005. **577**(2): p. 235-242.
94. Bollo, S., L. Nunez-Vergara, and J.A. Squella, *Electrogenerated nitro radical anions - A comparative kinetic study using scanning electrochemical microscopy*. Journal of the Electrochemical Society, 2004. **151**(10): p. E322-E325.
95. Andruzzi, L., et al., *Oligo(ethylene glycol) containing polymer brushes as bioselective surfaces*. Langmuir, 2005. **21**(6): p. 2495-2504.
96. Dong, R., et al., *Patterned bifunctional poly(acrylic acid) brushes on silicon surfaces*. Biomacromolecules, 2007. **8**(10): p. 3082-3092.
97. Khire, V.S., et al., *Ultrathin patterned polymer films on surfaces using thiol-ene polymerizations*. Macromolecules, 2006. **39**(15): p. 5081-5086.
98. Konradi, R. and J. Ruhe, *Fabrication of chemically microstructured polymer brushes*. Langmuir, 2006. **22**(20): p. 8571-8575.
99. Xu, F.J., et al., *Controlled micropatterning of a Si(100) surface by combined nitroxide-mediated and atom transfer radical polymerizations*. Macromolecules, 2005. **38**(15): p. 6254-6258.
100. Zhou, F., et al., *Fabrication of chemically tethered binary polymer-brush pattern through two-step surface-initiated atomic-transfer radical polymerization*. Macromolecular Rapid Communications, 2004. **25**(23): p. 1979-1983.
101. Husemann, M., et al., *Manipulation of surface properties by patterning of covalently bound polymer brushes*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(8): p. 1844-1845.
102. Ahn, S.J., et al., *Surface-initiated polymerization on nanopatterns fabricated by electron-beam lithography*. Advanced Materials, 2004. **16**(23-24): p. 2141-+.
103. He, Q., et al., *Fabrication of thermosensitive polymer nanopatterns through chemical lithography and atom transfer radical polymerization*. Langmuir, 2007. **23**(7): p. 3981-3987.
104. Maeng, I.S. and J.W. Park, *Patterning on self-assembled monolayers by low-energy electron-beam irradiation and its vertical amplification with atom transfer radical polymerization*. Langmuir, 2003. **19**(10): p. 4519-4522.
105. Schmelmer, U., et al., *Surface-initiated polymerization on self-assembled monolayers: Amplification of patterns on the micrometer and nanometer scale*. Angewandte Chemie-International Edition, 2003. **42**(5): p. 559-+.
106. Tsujii, Y., et al., *Fabrication of patterned high-density polymer graft surfaces. II. Amplification of EB-patterned initiator monolayer by surface-initiated atom transfer radical polymerization*. Polymer, 2002. **43**(13): p. 3837-3841.
107. Dewez, J.L., et al., *Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns*. Biomaterials, 1998. **19**(16): p. 1441-1445.
108. Svorcik, V., et al., *Au-nanoparticles grafted on plasma treated PE*. Radiation Physics and Chemistry, 2010. **79**(3): p. 315-317.

109. Azzaroni, O., et al., *Synthesis of gold nanoparticles inside polyelectrolyte brushes*. Journal of Materials Chemistry, 2007. **17**(32): p. 3433-3439.
110. Choi, H.G., et al., *Directed growth of poly(isobenzofuran) films by chemical vapor deposition on patterned self-assembled monolayers as templates*. Langmuir, 2007. **23**(5): p. 2483-2491.
111. Edmondson, S. and W.T.S. Huck, *Quasi-2D polymer objects from patterned, crosslinked polymer brushes*. Advanced Materials, 2004. **16**(15): p. 1327.
112. Edmondson, S., et al., *Surface polymerization from planar surfaces by atom transfer radical polymerization using polyelectrolytic macroinitiators*. Macromolecules, 2007. **40**(15): p. 5271-5278.
113. Husemann, M., et al., *Surface-initiated polymerization for amplification of self-assembled monolayers patterned by microcontact printing*. Angewandte Chemie-International Edition, 1999. **38**(5): p. 647-649.
114. Jones, D.M., et al., *Variable adhesion of micropatterned thermoresponsive polymer brushes: AFM investigations of poly (N-isopropylacrylamide) brushes prepared by surface-initiated polymerizations*. Advanced Materials, 2002. **14**(16): p. 1130-1134.
115. Ma, H.W., et al., *Protein-resistant polymer coatings on silicon oxide by surface-initiated atom transfer radical polymerization*. Langmuir, 2006. **22**(8): p. 3751-3756.
116. Shah, R.R., et al., *Using atom transfer radical polymerization to amplify monolayers of initiators patterned by microcontact printing into polymer brushes for pattern transfer*. Macromolecules, 2000. **33**(2): p. 597-605.
117. Tu, H., C.E. Heitzman, and P.V. Braun, *Patterned poly(N-isopropylacrylamide) brushes on silica surfaces by microcontact printing followed by surface-initiated polymerization*. Langmuir, 2004. **20**(19): p. 8313-8320.
118. von Werne, T.A., et al., *A versatile method for tuning the chemistry and size of nanoscopic features by living free radical polymerization*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(13): p. 3831-3838.
119. Azioune, A., et al., *Simple and rapid process for single cell micro-patterning*. Lab on a Chip, 2009. **9**(11): p. 1640-1642.
120. Beinhoff, M., et al., *Patterned polyfluorene surfaces by functionalization of nanoimprinted polymeric features*. Langmuir, 2006. **22**(6): p. 2411-2414.
121. Genua, A., et al., *Functional patterns obtained by nanoimprinting lithography and subsequent growth of polymer brushes*. Nanotechnology, 2007. **18**(21).
122. Sankhe, A.Y., et al., *Inkjet-printed monolayers as platforms for tethered polymers*. Langmuir, 2005. **21**(12): p. 5332-5336.
123. Zhou, H.L., et al., *Direct patterning of rhodamine 6G molecules on mica by dip-pen nanolithography*. Applied Surface Science, 2004. **236**(1-4): p. 18-24.
124. Mol, J.A., S.P.C. Beentjes, and S. Rogge, *A low temperature surface preparation method for STM nano-lithography on Si(100)*. Applied Surface Science, 2010. **256**(16): p. 5042-5045.
125. Schouteden, K., P. Lievens, and C. Van Haesendonck, *Low-temperature STM/STS investigation of nanostructures created by an STM tip on Au(111) surfaces*. Applied Physics a-Materials Science & Processing, 2009. **96**(2): p. 409-413.
126. Jang, J.W., et al., *Electrically biased nanolithography with KOH-coated AFM tips*. Nano Letters, 2008. **8**(5): p. 1451-1455.
127. Akhavan, O. and M. Abdollahad, *Mechano-chemical AFM nanolithography of metallic thin films: A statistical analysis*. Current Applied Physics, 2010. **10**(4): p. 1203-1210.
128. To, Y., et al., *Surface modification of plastic, glass and titanium by photoimmobilization of polyethylene glycol for antibiofouling*. Acta Biomaterialia, 2007. **3**: p. 1024-1032.

129. Sharma, P., S.F. Basir, and P. Nahar, *Photoimmobilization of unmodified carbohydrates on activated surface*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **342**(1): p. 202-204.
130. Weinrich, D., et al., *Preparation of Biomolecule Microstructures and Microarrays by Thiol-ene Photoimmobilization*. Chembiochem, 2010. **11**(2): p. 235-247.
131. Mandler, D. and A.J. Bard, *Hole injection and etching studies of gaas using the scanning electrochemical microscope*. langmuir, 1990. **6**(9): p. 1489-1494.
132. Mandler, D. and A.J. Bard, *High-resolution etching of semiconductors by the feedback mode of the scanning electrochemical microscope*. Journal of the Electrochemical Society, 1990. **137**(8): p. 2468-2472.
133. Bard, A.J., et al., *Scanning electrochemical microscopy - a new technique for the characterization and modification of surfaces*. Accounts of Chemical Research, 1990. **23**(11): p. 357-363.
134. Craston, D.H., C.W. Lin, and A.J. Bard, *High-resolution deposition of silver in nafion films with the scanning tunneling microscope*. Journal of the Electrochemical Society, 1988. **135**(3): p. 785-786.
135. Lin, C.W., F.R.F. Fan, and A.J. Bard, *High-resolution photoelectrochemical etching of normal-gaas with the scanning electrochemical and tunneling microscope*. Journal of the Electrochemical Society, 1987. **134**(4): p. 1038-1039.
136. Mandler, D. and A.J. Bard, *A new approach to the high-resolution electrodeposition of metals via the feedback mode of the scanning electrochemical microscope*. Journal of the Electrochemical Society, 1990. **137**(4): p. 1079-1086.
137. Kramer, S., R.R. Furer, and C.B. Gorman, *Scanning probe lithography using self-assembled monolayers*. Chemical Reviews, 2003. **103**(11): p. 4367-4418.
138. Mandler, D., S. Meltzer, and I. Shohat, *Microelectrochemistry on surfaces with the scanning electrochemical microscope (SECM)*. Israel Journal of Chemistry, 1996. **36**(1): p. 73-80.
139. Radtke, V. and J. Heinze, *Scanning electrochemical microscopy as a versatile tool for modifying surfaces*. Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics, 2004. **218**(1): p. 103-121.
140. Mandler, D. and A.J. Bard, *Scanning electrochemical microscopy - the application of the feedback mode for high-resolution copper etching*. Journal of the Electrochemical Society, 1989. **136**(10): p. 3143-3144.
141. Meltzer, S. and D. Mandler, *Study of silicon etching in hbr solutions using a scanning electrochemical microscope*. journal of the Chemical Society-Faraday Transactions, 1995. **91**(6): p. 1019-1024.
142. Zu, Y.B., et al., *Studies on silicon etching using the confined etchant layer technique*. Electrochimica Acta, 1998. **43**(12-13): p. 1683-1690.
143. Turyan, I., et al., *"Writing-reading-erasing" on tungsten oxide films using the scanning electrochemical microscope*. Advanced Materials, 2000. **12**(5): p. 330.
144. Shiku, H., et al., *Microfabrication and characterization of diaphorase-patterned surfaces by scanning electrochemical microscopy*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(2): p. 312-317.
145. Shiku, H., I. Uchida, and T. Matsue, *Microfabrication of alkylsilanized glass substrate by electrogenerated hydroxyl radical using scanning electrochemical microscopy*. Langmuir, 1997. **13**(26): p. 7239-7244.
146. Kaji, H., et al., *In situ control of cellular growth and migration on substrates using microelectrodes*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(46): p. 15026-15027.

147. Kaji, H., et al., *Patterning the surface cytophobicity of an albumin-physisorbed substrate by electrochemical means*. Langmuir, 2005. **21**(15): p. 6966-6969.
148. Kaji, H., et al., *Microelectrochemical approach to induce local cell adhesion and growth on substrates*. Langmuir, 2004. **20**(1): p. 16-19.
149. Kaji, H., T. Kawashima, and M. Nishizawa, *Patterning cellular motility using an electrochemical technique and a geometrically confined environment*. Langmuir, 2006. **22**(25): p. 10784-10787.
150. Zhao, C., I. Witte, and G. Wittstock, *Switching on cell adhesion with microelectrodes*. Angewandte Chemie-International Edition, 2006. **45**(33): p. 5469-5471.
151. Zhao, C., et al., *Microfabrication of Patterns of Adherent Marine Bacterium *Phaeobacter inhibens* Using Soft Lithography and Scanning Probe Lithography*. Langmuir, 2010. **26**(11): p. 8641-8647.
152. Kanoufi, F., C. Combellas, and M.E.R. Shanahan, *Wetting line behavior on a locally surface treated poly(tetrafluoroethylene)*. Langmuir, 2003. **19**(17): p. 6711-6716.
153. Combellas, C., et al., *Surface modification of halogenated polymers. 6. Graft copolymerization of poly(tetrafluoroethylene) surfaces by polyacrylic acid*. Polymer, 2004. **45**(14): p. 4669-4675.
154. Hauquier, F., et al., *Local direct and indirect reduction of electrografted aryldiazonium/gold surfaces for polymer brushes patterning*. Electrochimica Acta, 2009. **54**(22): p. 5127-5136.
155. Hess, C., et al., *Scanning electrochemical microscopy: Study of silver deposition on non-conducting substrates*. Electrochimica Acta, 1997. **42**(20-22): p. 3065-3073.
156. Borgwarth, K., et al., *Electroless deposition of conducting polymers using the scanning electrochemical microscope*. Advanced Materials, 1999. **11**(14): p. 1221-1226.
157. Borgwarth, K., et al., *Surface characterization and modification by the scanning electrochemical microscope (secm)*. Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics, 1995. **99**(11): p. 1421-1426.
158. Zhou, J.F. and D.O. Wipf, *Deposition of conducting polyaniline patterns with the scanning electrochemical microscope*. Journal of the Electrochemical Society, 1997. **144**(4): p. 1202-1207.
159. Shohat, I. and D. Mandler, *Deposition of nickel-hydroxide structures using the scanning electrochemical microscope*. Journal of the Electrochemical Society, 1994. **141**(4): p. 995-999.
160. Meltzer, S. and D. Mandler, *Microwriting of gold patterns with the scanning electrochemical microscope*. Journal of the Electrochemical Society, 1995. **142**(6): p. L82-L84.
161. Ammann, E. and D. Mandler, *Local deposition of gold on silicon by the scanning electrochemical microscope*. Journal of the Electrochemical Society, 2001. **148**(8): p. C533-C539.
162. Hofmann, D., W. Schindler, and J. Kirschner, *Electrodeposition of nanoscale magnetic structures*. Applied Physics Letters, 1998. **73**(22): p. 3279-3281.
163. Hugelmann, M., et al., *Nanoelectrochemistry and nanophysics at electrochemical interfaces*. Surface Science, 2005. **597**(1-3): p. 156-172.
164. Schindler, W., D. Hofmann, and J. Kirschner, *Nanoscale electrodeposition: A new route to magnetic nanostructures?* Journal of Applied Physics, 2000. **87**(9): p. 7007-7009.
165. Schindler, W., D. Hofmann, and J. Kirschner, *Localized electrodeposition using a scanning tunneling microscope tip as a nanoelectrode*. Journal of the Electrochemical Society, 2001. **148**(2): p. C124-C130.

166. de Abril, O., D. Mandler, and P.R. Unwin, *Local cobalt electrodeposition using the scanning electrochemical microscope*. *Electrochemical and Solid State Letters*, 2004. **7**(6): p. C71-C74.
167. Turyan, I., et al., *Improved resolution of local metal deposition by means of constant distance mode scanning electrochemical microscopy*. *Electroanalysis*, 2005. **17**(5-6): p. 538-542.
168. Yatziv, Y., I. Turyan, and D. Mandler, *A new approach to micropatterning: Application of potential-assisted ion transfer at the liquid-liquid interface for the local metal deposition*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(20): p. 5618-5619.
169. Sauter, S. and G. Wittstock, *Local deposition and characterisation of K<sub>2</sub>CoFe(CN)<sub>6</sub> and K<sub>2</sub>NiFe(CN)<sub>6</sub> by scanning electrochemical microscopy*. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2001. **5**(3): p. 205-211.
170. Sauter, S., G. Wittstock, and R. Szargan, *Localisation of electrochemical oxidation processes in nickel and cobalt hexacyanoferrates investigated by analysis of the multiplet patterns in X-ray photoelectron spectra*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2001. **3**(4): p. 562-569.
171. Wittstock, G. and W. Schuhmann, *Formation and imaging of microscopic enzymatically active spots on an alkanethiolate-covered gold electrode by scanning electrochemical microscopy*. *Analytical Chemistry*, 1997. **69**(24): p. 5059-5066.
172. Ufheil, J., et al., *Nanostructuring and nanoanalysis by scanning electrochemical microscopy (SECM)*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2005. **7**(17): p. 3185-3190.
173. Borgwarth, K. and J. Heinze, *Increasing the resolution of the scanning electrochemical microscope using a chemical lens: Application to silver deposition*. *Journal of the Electrochemical Society*, 1999. **146**(9): p. 3285-3289.
174. Ufheil, J., et al., *Microstructuring of solid-supported lipid layers using SAM pattern generation by scanning electrochemical microscopy and the chemical lens*. *Bioelectrochemistry*, 2000. **52**(1): p. 103-110.
175. Husser, O.E., D.H. Craston, and A.J. Bard, *Scanning electrochemical microscopy - high-resolution deposition and etching of metals*. *Journal of the Electrochemical Society*, 1989. **136**(11): p. 3222-3229.
176. Kranz, C., et al., *Lateral deposition of polypyrrole lines by means of the scanning electrochemical microscope*. *Advanced Materials*, 1995. **7**(1): p. 38-40.
177. Kranz, C., H.E. Gaub, and W. Schuhmann, *Polypyrrole towers grown with the scanning electrochemical microscope*. *Advanced Materials*, 1996. **8**(8): p. 634-&.
178. El-Giar, E.M., et al., *Localized electrochemical deposition of copper microstructures*. *Journal of the Electrochemical Society*, 2000. **147**(2): p. 586-591.
179. Wilhelm, T. and G. Wittstock, *Localised electrochemical desorption of gold alkanethiolate monolayers by means of scanning electrochemical microscopy (SECM)*. *Mikrochimica Acta*, 2000. **133**(1-4): p. 1-9.
180. Wilhelm, T. and G. Wittstock, *Patterns of functional proteins formed by local electrochemical desorption of self-assembled monolayers*. *Electrochimica Acta*, 2001. **47**(1-2): p. 275-281.
181. Wittstock, G., R. Hesse, and W. Schuhmann, *Patterned self-assembled alkanethiolate monolayers on gold. Patterning and imaging by means of scanning electrochemical microscopy*. *Electroanalysis*, 1997. **9**(10): p. 746-750.
182. Widrig, C.A., C. Chung, and M.D. Porter, *The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline au and ag electrodes*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1991. **310**(1-2): p. 335-359.

183. Matrab, T., C. Combellas, and F. Kanoufi, *Scanning electrochemical microscopy for the direct patterning of a gold surface with organic moieties derived from iodonium salt*. *Electrochemistry Communications*, 2008. **10**(9): p. 1230-1234.
184. Cougnon, C., et al., *In Situ Formation of Diazonium Salts from Nitro Precursors for Scanning Electrochemical Microscopy Patterning of Surfaces*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2009. **48**(22): p. 4006-4008.
185. Ghorbal, A., et al., *Localized Electrografting of Vinylic Monomers on a Conducting Substrate by Means of an Integrated Electrochemical AFM Probe*. *Chemphyschem*, 2009. **10**(7): p. 1053-1057.
186. Deiss, F., et al., *Lithography by Scanning Electrochemical Microscopy with a Multiscaled Electrode*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(12): p. 5169-5175.
187. Combellas, C., A. Fuchs, and F. Kanoufi, *Scanning electrochemical microscopy with a band microelectrode: theory and application*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(13): p. 3612-3618.
188. Prime, D., S. Paul, and P.W. Josephs-Franks, *Electrical properties of nanometre thin film polystyrene for organic electronic applications*. *Ieee Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 2008. **15**(4): p. 905-909.
189. Welle, A., et al., *Photo-chemically patterned polymer surfaces for controlled PC-12 adhesion and neurite guidance*. *Journal of Neuroscience Methods*, 2005. **142**(2): p. 243-250.
190. Blattler, T., et al., *Nanopatterns with biological functions*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2006. **6**(8): p. 2237-2264.
191. Goddard, J.M. and J.H. Hotchkiss, *Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds*. *Progress in Polymer Science*, 2007. **32**(7): p. 698-725.
192. Sasai, Y., et al., *Surface engineering of polystyrene dish for improvement of cell adhesion using plasma techniques*. *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 2008. **21**(2): p. 277-280.
193. Boulares-Pender, A., et al., *Surface-Functionalization of Plasma-Treated Polystyrene by Hyperbranched Polymers and Use in Biological Applications*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2009. **112**(5): p. 2701-2709.
194. Kim, J.D., et al., *Piezoelectric inkjet printing of polymers: Stem cell patterning on polymer substrates*. *Polymer*, 2010. **51**(10): p. 2147-2154.
195. Montero-Pancera, S., et al., *Design of Chemically Activated Polymer Microwells by One-Step UV-Lithography for Stem Cell Adhesion*. *Langmuir*, 2010. **26**(3): p. 2050-2056.
196. Brostow, W., H.E.H. Lobland, and M. Narkis, *Sliding wear, viscoelasticity, and brittleness of polymers*. *Journal of Materials Research*, 2006. **21**(9): p. 2422-2428.
197. Langmuir, I., *Oscillations in ionized gases*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1928. **14**: p. 627-637.
198. Vandencastele, N. and F. Reniers, *Plasma-modified polymer surfaces: Characterization using XPS*. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2010. **178**: p. 394-408.
199. Okano, T., et al., *A novel recovery-system for cultured-cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(n-isopropylacrylamide)*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1993. **27**(10): p. 1243-1251.
200. Lock, E.H., et al., *Surface Composition, Chemistry, and Structure of Polystyrene Modified by Electron-Beam-Generated Plasma*. *Langmuir*, 2010. **26**(11): p. 8857-8868.

201. Beaulleu, I., M. Geissler, and J. Mauzeroll, *Oxygen Plasma Treatment of Polystyrene and Zeonor: Substrates for Adhesion of Patterned Cells*. Langmuir, 2009. **25**(12): p. 7169-7176.
202. Lee, D.Y., et al., *Low-Temperature Plasma-Assisted Nanotransfer Printing between Thermoplastic Polymers*. Advanced Materials, 2009. **21**(24): p. 2524-+.
203. France, R.M. and R.D. Short, *Plasma treatment of polymers: The effects of energy transfer from an argon plasma on the surface chemistry of polystyrene, and polypropylene. A high-energy resolution X-ray Photoelectron Spectroscopy study*. Langmuir, 1998. **14**(17): p. 4827-4835.
204. Dupont-Gillain, C.C., et al., *Plasma-oxidized polystyrene: Wetting properties and surface reconstruction*. Langmuir, 2000. **16**(21): p. 8194-8200.
205. Grace, J.M. and L.J. Gerenser, *Plasma treatment of polymers*. Journal of Dispersion Science and Technology, 2003. **24**(3-4): p. 305-341.
206. Lianos, L., et al., *Secondary-Ion Mass-Spectrometry Time-Of-Flight and in-situ X-ray Photoelectron-Spectroscopy studies of polymer surface modifications by a remote oxygen plasma treatment*. Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films, 1994. **12**(4): p. 2491-2498.
207. Petrat, F.M., et al., *Comparative in-situ TOF-SIMS/XPS study of polystyrene modified by argon, oxygen and nitrogen plasmas*. Surface and Interface Analysis, 1994. **21**(6-7): p. 402-406.
208. Hopkins, J., S.H. Wheale, and J.P.S. Badyal, *Synergistic oxidation at the plasma/polymer interface*. Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(33): p. 14062-14066.
209. Sasai, Y., et al., *Introduction of carboxyl group onto polystyrene surface using plasma techniques*. Surface & Coatings Technology, 2008. **202**(22-23): p. 5724-5727.
210. Paynter, R.W., *Angle-resolved X-ray photoelectron spectroscopy studies of the evolution of plasma-treated surfaces with time*. Surface and Interface Analysis, 1999. **27**(2): p. 103-113.
211. Briggs, D., et al., *Surface modification of poly(ethylene-terephthalate) by electrical-discharge treatment*. Polymer, 1980. **21**(8): p. 895-900.
212. Morra, M., E. Occhiello, and F. Garbassi, *Contact-angle hysteresis on oxygen plasma treated polypropylene surfaces*. Journal of Colloid and Interface Science, 1989. **132**(2): p. 504-508.
213. Morra, M., et al., *Surface dynamics vs adhesion in oxygen plasma treated polyolefins*. Journal of Adhesion, 1990. **33**(1-2): p. 77-88.
214. Occhiello, E., et al., *SSIMS studies of hydrophobic recovery - oxygen plasma treated PS*. Applied Surface Science, 1991. **47**(3): p. 235-242.
215. Strobel, M., et al., *Analysis of air-corona-treated polypropylene and poly(ethylene-terephthalate) films by contact-angle measurements and X-ray Photoelectron-Spectroscopy*. Journal of Adhesion Science and Technology, 1992. **6**(4): p. 429-443.
216. Murakami, T., S. Kuroda, and Z. Osawa, *Dynamics of polymeric solid surfaces treated with oxygen plasma: Effect of aging media after plasma treatment*. Journal of Colloid and Interface Science, 1998. **202**(1): p. 37-44.
217. Murakami, T., S. Kuroda, and Z. Osawa, *Dynamics of polymeric solid surfaces treated by oxygen plasma: Plasma-induced increases in surface molecular mobility of polystyrene*. Journal of Colloid and Interface Science, 1998. **200**(1): p. 192-194.
218. Terlingen, J.G.A., et al., *Introduction of functional-groups on polyethylene surfaces by a carbon-dioxide plasma treatment*. Journal of Applied Polymer Science, 1995. **57**(8): p. 969-982.

219. Holly, F.J., *Wettability of hydrogels .1. poly(2-hydroxyethyl methacrylate)*. Journal of Biomedical Materials Research, 1975. **9**(3): p. 315-326.
220. Yasuda, T., et al., *A study of surface dynamics of polymers .2. investigation by plasma surface implantation of fluorine containing moieties*. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, 1988. **26**(8): p. 1781-1794.
221. Morra, M., E. Occhiello, and F. Garbassi, *On the wettability of poly(2-hydroxyethylmethacrylate)*. Journal of Colloid and Interface Science, 1992. **149**(1): p. 84-91.
222. Gerenser, L.J., *XPS studies of in-situ plasma-modified polymer surfaces*. Journal of Adhesion Science and Technology, 1993. **7**(10): p. 1019-1040.
223. Guruvenket, S., et al., *Plasma surface modification of polystyrene and polyethylene*. Applied Surface Science, 2004. **236**(1-4): p. 278-284.
224. Detrait, E., et al., *Orientation of cell adhesion and growth on patterned heterogeneous polystyrene surface*. Journal of Neuroscience Methods, 1998. **84**(1-2): p. 193-204.
225. Detrait, E., et al., *Fibronectin-pluronic coadsorption on a polystyrene surface with increasing hydrophobicity: Relationship to cell adhesion*. Journal of Biomedical Materials Research, 1999. **45**(4): p. 404-413.
226. Nalamasu, O., F.A. Baiocchi, and G.N. Taylor, *Photooxidation of polymers - application to dry-developed single-layer deep-UV resists*. Acs Symposium Series, 1989. **412**: p. 189-209.
227. Pospisil, J., *Photooxidative degradation of polymers - causes, consequences and protection*. Chemické Listy, 1991. **85**(9): p. 904-923.
228. Zaikov, G.E., *Aging and stabilization of polymers*. uspekhi Khimii, 1991. **60**(10): p. 2220-2249.
229. Andreopoulos, A.G. and T. Theophanides, *Degradable plastics - a smart approach to various applications*. journal of Elastomers and Plastics, 1994. **26**(4): p. 308-326.
230. Audouin, L., et al., *Role of oxygen diffusion in polymer aging - kinetic and mechanical aspects*. journal of Materials Science, 1994. **29**(3): p. 569-583.
231. So, Y.H., *Photodegradation mechanism and stabilization of polyphenylene oxide and rigid-rod polymers*. Polymer International, 2006. **55**(2): p. 127-138.
232. White, J.R. and A. Turnbull, *Weathering of polymers - mechanisms of degradation and stabilization, testing strategies and modeling*. Journal of Materials Science, 1994. **29**(3): p. 584-613.
233. Shyichuk, A.V. and J.R. White, *Analysis of chain-scission and crosslinking rates in the photo-oxidation of polystyrene*. Journal of Applied Polymer Science, 2000. **77**(13): p. 3015-3023.
234. Zhang, D., S.M. Dougal, and M.S. Yeganeh, *Effects of UV irradiation and plasma treatment on a polystyrene surface studied by IR-visible sum frequency generation spectroscopy*. Langmuir, 2000. **16**(10): p. 4528-4532.
235. Welle, A. and E. Gottwald, *UV-based patterning of polymeric substrates for cell culture applications*. Biomedical Microdevices, 2002. **4**(1): p. 33-41.
236. Zhu, B.S., et al., *Effects of laser-modified polystyrene substrate on CHO cell growth and alignment*. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 2004. **70B**(1): p. 43-48.
237. Lopez-Gejo, J., et al., *Vacuum-ultraviolet photochemically initiated modification of polystyrene surfaces: Chemical changes*. Photochemistry and Photobiology, 2005. **81**(4): p. 777-782.
238. Gejo, J.L., et al., *Vacuum-ultraviolet photochemically initiated modification of polystyrene surfaces: morphological changes and mechanistic investigations*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2006. **5**(10): p. 948-954.



239. Li, L., et al., *Thermally stable and solvent resistant honeycomb structured polystyrene films via photochemical cross-linking*. Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**(39): p. 7222-7227.
240. Remili, C., et al., *Photo-oxidation of Polystyrene/Clay Nanocomposites Under Accelerated UV Exposure: Effect on the Structure and Molecular Weight*. Journal of Applied Polymer Science, 2009. **112**(5): p. 2868-2875.
241. Duncan, A.C., et al., *Effect of laser modified surface microtopochemistry on endothelial cell growth*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2007. **54**(2): p. 150-159.
242. Jäger, M., et al., *Surface Modification of Polymers by using Excimer Laser for Biomedical Applications*. Plasma Processes and Polymers, 2007. **4**(S1): p. S416-S418.
243. Rebollar, E., et al., *Proliferation of aligned mammalian cells on laser-nanostructured polystyrene*. Biomaterials, 2008. **29**(12): p. 1796-1806.
244. Pflöging, W., et al., *Laser- and UV-assisted modification of polystyrene surfaces for control of protein adsorption and cell adhesion*. Applied Surface Science, 2009. **255**(10): p. 5453-5457.
245. Mitchell, S.A., et al., *Cellular attachment and spatial control of cells using micro-patterned ultra-violet/ozone treatment in serum enriched media*. Biomaterials, 2004. **25**(18): p. 4079-4086.
246. Rytlewski, P. and M. Zenkiewicz, *Laser-induced surface modification of polystyrene*. Applied Surface Science, 2009. **256**(3): p. 857-861.
247. Lee, J.S., et al., *Micropatterning of cultured-cells on polystyrene surface by using an excimer-laser*. Applied Physics Letters, 1994. **65**(4): p. 400-402.
248. Mirzadeh, H. and S. Bagheri, *Comparison of the effect of excimer laser irradiation and RF plasma treatment on polystyrene surface*. Radiation Physics and Chemistry, 2007. **76**(8-9): p. 1435-1440.
249. Onyiriuka, E.C., *Electron-beam surface modification of polystyrene used for cell-cultures*. Journal of Adhesion Science and Technology, 1994. **8**(1): p. 1-9.
250. Burkert, S., et al., *Tuning of surface properties of thin polymer films by electron beam treatment*. Applied Surface Science, 2009. **255**(12): p. 6256-6261.
251. Svorcik, V., et al., *Electron beam modification of polyethylene and polystyrene*. Journal of Applied Polymer Science, 1997. **64**(13): p. 2529-2533.
252. Dole, M., *Report of Symposium IV: Chemistry and Physics of Radiation Dosimetry*, ed. A.C. Center. 1950, Maryland.
253. Benson, R.S., *Use of radiation in biomaterials science*. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 2002. **191**: p. 752-757.
254. Onyiriuka, E.C., *The effects of high-energy radiation on the surface-chemistry of polystyrene - A mechanistic study*. Journal of Applied Polymer Science, 1993. **47**(12): p. 2187-2194.
255. Kawamura, Y., *Effects of gamma irradiation on polyethylene, polypropylene, and polystyrene*, in *Irradiation of Food and Packaging: Recent Developments*, V. Komolprasert and K.M. Morehouse, Editors. 2004, Amer Chemical Soc: Washington. p. 262-276.
256. Chen, C.S., et al., *Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function*. Biotechnology Progress, 1998. **14**(3): p. 356-363.
257. Nishizawa, M., K. Takoh, and T. Matsue, *Micropatterning of HeLa cells on glass substrates and evaluation of respiratory activity using microelectrodes*. Langmuir, 2002. **18**(9): p. 3645-3649.

258. Fink, J., et al., *Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques*. Lab on a Chip, 2007. **7**(6): p. 672-680.
259. Chang, J.C., G.J. Brewer, and B.C. Wheeler, *A modified microstamping technique enhances polylysine transfer and neuronal cell patterning*. Biomaterials, 2003. **24**(17): p. 2863-2870.
260. Bernard, A., et al., *Printing patterns of proteins*. Langmuir, 1998. **14**(9): p. 2225-2229.
261. Lauer, L., C. Klein, and A. Offenhäusser, *Spot compliant neuronal networks by structure optimized micro-contact printing*. Biomaterials, 2001. **22**(13): p. 1925-1932.
262. Derby, B., *Bioprinting: inkjet printing proteins and hybrid cell-containing materials and structures*. Journal of Materials Chemistry, 2008. **18**(47): p. 5717-5721.
263. Li, Q.X., et al., *Absolute emission current density of O<sup>-</sup> from 12CaO center dot 7Al(2)O(3) crystal*. Applied Physics Letters, 2002. **80**(22): p. 4259-4261.
264. Li, Q.X., et al., *High-intensity atomic oxygen radical anion emission mechanism from 12CaO center dot 7Al(2)O(3) crystal surface*. Surface Science, 2003. **527**(1-3): p. 100-112.
265. Li, J., et al. 2005, Patent PCT/JP05/009924.
266. Wang, L., et al., *Surface modification of polystyrene with atomic oxygen radical anions-dissolved solution*. Applied Surface Science, 2008. **254**(13): p. 4191-4200.
267. Brewis, D.M. and R.H. Dahm, *A review of electrochemical pretreatments of polymers*. International Journal of Adhesion and Adhesives, 2001. **21**(5): p. 397-409.
268. Bringmann, J., et al., *electrochemical mediators for total oxidation of chlorinated hydrocarbons - formation kinetics of Ag(II), Co(III), and Ce(IV)*. Journal of Applied Electrochemistry, 1995. **25**(9): p. 846-851.
269. Fleischmann, M., D. Pletcher, and A. Rafinski, *The kinetics of the silver (I)/silver (II) couple at a platinum electrode in perchloric and nitric acids*. Journal of Applied Electrochemistry, 1971. **1**(1): p. 1-7.
270. Lehmani, A., P. Turq, and J.P. Simonin, *Oxidation kinetics of water and organic compounds by silver (II) using a potentiometric method*. Journal of the Electrochemical Society, 1996. **143**(6): p. 1860-1866.
271. Syper, L., *Silver (2) as an oxidant for organic compounds*. Tetrahedron Letters, 1967(42): p. 4193-&.
272. Brewis, D.M., R.H. Dahm, and I. Mathieson, *A new general method of pretreating polymers*. Journal of Materials Science Letters, 1997. **16**(2): p. 93-95.
273. Brewis, D.M., et al., *A ToF-SIMS study of electrochemical pretreatments for polymers*. Surface and Interface Analysis, 2000. **29**(9): p. 572-581.
274. Po, H.N., Swinehar.Jh, and T.L. Allen, *Kinetics and mechanism of oxidation of water by silver(2) in concentrated nitric acid solution*. Inorganic Chemistry, 1968. **7**(2): p. 244-&.
275. Li, Y., et al., *Contact angle of water on polystyrene thin films: Effects of CO<sub>2</sub> environment and film thickness*. Langmuir, 2007. **23**(19): p. 9785-9793.
276. Wu, S., *polymer interface and adhesion*. Marcel Dekker, INC ed. Vol. 4. 1982, New York. 621.
277. Brewis, D.M., R.H. Dahm, and I. Mathieson, *Electrochemical pretreatment of polymers with dilute nitric acid either alone or in the presence of silver ions*. Journal of Adhesion, 2000. **72**(3-4): p. 373-386.
278. Hinder, S.J., et al., *Compositional mapping of self-assembled monolayers derivatized within microfluidic networks*. Langmuir, 2002. **18**(8): p. 3151-3158.
279. Green, J.B.D., et al., *Nanometer-scale mapping of chemically distinct domains at well-defined organic interfaces using frictional force microscopy*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**(27): p. 10960-10965.

280. Deng, K., et al., *Performance impact of monolayer coating of polysilicon micromotors*. Journal of the Electrochemical Society, 1995. **142**(4): p. 1278-1285.
281. Jennings, G.K., et al., *Effect of chain length on the protection of copper by n-alkanethiols*. Langmuir, 1998. **14**(21): p. 6130-6139.
282. Flink, S., F. van Veggel, and D.N. Reinhoudt, *Sensor functionalities in self-assembled monolayers*. Advanced Materials, 2000. **12**(18): p. 1315-1328.
283. Bhushan, B., *nanoimprint lithography*, in *Springer handbook of nanotechnology*, Springer, Editor. 2004: Berlin. p. 239:270.
284. Pauling, L., *The nature of the chemical bond IV The energy of single bonds and the relative electronegativity of atoms*. Journal of the American Chemical Society, 1932. **54**: p. 3570-3582.
285. Smart, B.E., *Characteristics of C-F systems*, in *Organofluorine chemistry: principles and commercial applications*, R.E. Banks, B.E. Smart, and J.C. Tatlow, Editors. 1994, Plenum Press: New York. p. 57:88.
286. Rolland, J.P., et al., *Solvent resistant photocurable "liquid teflon" for microfluidic device fabrication (vol 126, pg 2322, 2004)*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(26): p. 8349-8349.
287. Gratton, S.E.A., et al., *The Pursuit of a Scalable Nanofabrication Platform for Use in Material and Life Science Applications*. Accounts of Chemical Research, 2008. **41**(12): p. 1685-1695.
288. Hikita, M., et al., *Super-liquid-repellent surfaces prepared by colloidal silica nanoparticles covered with fluoroalkyl groups*. Langmuir, 2005. **21**(16): p. 7299-7302.
289. Finlay, J.A., et al., *Settlement of Ulva zoospores on patterned fluorinated and PEGylated monolayer surfaces*. Langmuir, 2008. **24**(2): p. 503-510.
290. Krishnan, S., C.J. Weinman, and C.K. Ober, *Advances in polymers for anti-biofouling surfaces*. Journal of Materials Chemistry, 2008. **18**(29): p. 3405-3413.
291. Senaratne, W., L. Andruzzi, and C.K. Ober, *Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: Current applications and future perspectives*. Biomacromolecules, 2005. **6**(5): p. 2427-2448.
292. Combellas, C., et al., *Surface modification of halogenated polymers. 7. Local reduction of poly(tetrafluoroethylene) and poly(chlorotrifluoroethylene) by a scanning electrochemical microscope in the feedback mode*. Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(20): p. 6391-6397.
293. Combellas, C., F. Kanoufi, and S. Nunige, *Surface modification of halogenated polymers. 10. Redox catalysis induction of the polymerization of vinylic monomers. Application to the localized graft copolymerization of poly(tetrafluoroethylene) surfaces by vinylic monomers*. Chemistry of Materials, 2007. **19**(15): p. 3830-3839.
294. Purvis, R.J. and W.R. Beck, *Minnesota Mining and Manufacturing Co.*, in *US Patent 2 789 063*. 1957.
295. Amii, H. and K. Uneyama, *C-F Bond Activation in Organic Synthesis*. Chemical Reviews, 2009. **109**(5): p. 2119-2183.
296. Mathieson, I., et al., *Pretreatments of fluoropolymers*. Journal of Adhesion, 1994. **46**(1-4): p. 49-56.
297. Kang, E.T. and Y. Zhang, *Surface modification of fluoropolymers via molecular design*. Advanced Materials, 2000. **12**(20): p. 1481-1494.
298. Kevan, L., *Solvated electron-structure in glassy matrices*. Accounts of Chemical Research, 1981. **14**(5): p. 138-145.
299. Combellas, C., F. Kanoufi, and D. Mazouzi, *Surface modification of halogenated polymers. 8. Local reduction of poly(tetrafluoroethylene) by the scanning*

- electrochemical microscope - Transient investigation*. Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(50): p. 19260-19268.
300. Brecht, H., F. Mayer, and H. Binder, *ESCA studies on etched polytetrafluoroethylene films*. Angewandte Makromolekulare Chemie, 1973. **33**(OCT): p. 89-100.
301. Brace, K., et al., *Surface modification of halogenated polymers .I. polytetrafluoroethylene*. Polymer, 1997. **38**(13): p. 3295-3305.
302. Chakrabarti, N. and J. Jacobus, *The chemical-reduction of poly(tetrafluoroethylene)*. Macromolecules, 1988. **21**(10): p. 3011-3014.
303. Fuchs, A., et al., *Wetting and surface properties of (modified) fluoro-silanised glass*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2007. **307**(1-3): p. 7-15.
304. Benderly, A.A., *Treatment of teflon to promote bondability*. Journal of Applied Polymer Science, 1962. **6**(20): p. 221-225.
305. Brewis, D.M., et al., *Adhesion studies of fluoropolymers*. journal of Adhesion, 1993. **41**(1-4): p. 113-128.
306. Mathieson, I., et al., *Pretreatments of fluoropolymers*. Journal of Adhesion, 1994. **46**(1-4): p. 49-56.
307. Degott, P., et al., *Sulfuration of ptfе carbon*. Annales De Physique, 1986. **11**(1): p. 93-96.
308. Brewis, D.M., R.H. Dahm, and M.B. Konieczko, *Reactions of polytetrafluoroethylene with electrochemically generated intermediates*. Angewandte Makromolekulare Chemie, 1975. **43**(MAR14): p. 191-194.
309. Barriet, D. and T.R. Lee, *Fluorinated self-assembled monolayers: composition, structure and interfacial properties*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2003. **8**(3): p. 236-242.
310. Laibinis, P.E., et al., *X-ray Damage to trifluoroacetoxy-terminated organic monolayers on silicon/gold: principal effect of electrons*. Science, 1991. **254**(5034): p. 981-983.
311. Zharnikov, M., et al., *Modification of alkanethiolate monolayers on Au-substrate by low energy electron irradiation: Alkyl chains and the S/Au interface*. Physical Chemistry Chemical Physics, 1999. **1**(13): p. 3163-3171.
312. Frey, S., et al., *Modification of semifluorinated alkanethiolate monolayers by low energy electron irradiation*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2000. **2**(9): p. 1979-1987.
313. Luscombe, C.K., et al., *Fluorinated silane self-assembled monolayers as resists for patterning indium tin oxide*. Langmuir, 2003. **19**(13): p. 5273-5278.
314. Zhang, H., et al., *Recyclable hydrophilic-hydrophobic micropatterns on glass for microarray applications*. Langmuir, 2007. **23**(9): p. 4728-4731.
315. Zhang, X., et al., *A transparent and photo-patternable superhydrophobic film*. Chemical Communications, 2007(46): p. 4949-4951.

## Chapitre 2 : Fonctionalisation localisée de couches auto-assemblées fluorées destinées à immobiliser sélectivement des entités chimiques ou biologiques

---

### 1. Introduction

Lorsque j'ai débuté ma thèse, le procédé de lithographie sur verre fluoré par SECM au moyen d'un radical anion très réducteur (radical anion de tri-paratolyphosphine) venait d'être breveté par le laboratoire.[1] Deux méthodes lithographiques avaient été explorées pour réaliser une zone de plus haute énergie de surface sur un support fluoré. La première consiste à utiliser une électrode bande immobile et la seconde à balayer une électrode disque au-dessus de la surface. Des analyses du mouillage de verres fluorés comportant des motifs réduits avaient montré que l'énergie de surface était multipliée par 2 au niveau des motifs.[2]

Mes premiers travaux de thèse entrent dans ce thème. Je me suis familiarisée avec la microscopie électrochimique en essayant de tracer des bandes réduites sur des verres fluorés. Même si la méthode par balayage est plus lente que celle qui procède avec une bande, c'est celle que j'ai utilisée car elle a l'avantage d'une grande souplesse et permet de tracer n'importe quel motif bidimensionnel.

Mon objectif a été d'examiner si après l'étape de réduction du verre fluoré, il était possible de fonctionnaliser la surface réduite afin d'y immobiliser ultérieurement des entités facilement identifiables par fluorescence (fluorescéine), ou microscopie optique (particules d'or) et enfin des cellules humaines vivantes.

Ces travaux ont été publiés en 2010 dans un article qui présente :

- Un autre réactif pour réduire les verres fluorés par SECM. Il s'agit de l'électron solvaté, obtenu dans l'éthylène diamine sec contenant du tétrafluoroborate de lithium.

La lithographie est alors menée dans ce solvant, au lieu du DMF qui est généralement utilisé pour les réductions par les radicaux anions.

- Des analyses XPS et de mouillage pour caractériser la réactivité de l'électron solvaté vis-à-vis de divers supports : verre fluoré, ITO fluoré, verre superhydrophobe, verre alkylé. Les réactions ont été réalisées dans  $\text{NH}_3$  liquide, solvant d'excellence pour l'électron solvaté. Les supports ont été modifiés sur toute leur surface. Le SECM n'a pas été utilisé.
- Des analyses par microscopie XPS et microscopie ToF-SIMS des surfaces à motifs obtenues par SECM sur verre fluoré. Les motifs ont aussi été caractérisés par des expériences de condensation d'eau qui ont été corrélées aux expériences de mouillage.
- Les réactions de fonctionnalisation des verres fluorés après réduction par SECM.
- L'immobilisation d'espèces fluorescentes, de particules d'or et de cellules biologiques.

## 2. Article

Article publié en 2010 dans *Chemistry of Materials*, volume **22**(20): pages 5725-5731

# Managing Micrometric Sources of Solvated electrons: Application to the Local Functionalization of Fluorinated Self Assembled Monolayers

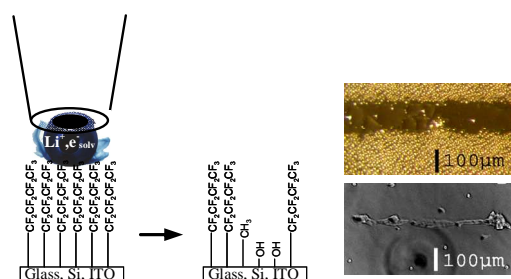
*Nadia Ktari,<sup>1</sup> Sandra Nunige,<sup>1</sup> Ammar Azioune,<sup>2</sup> Matthieu Piel,<sup>2</sup> Carole Connan,<sup>3</sup> Frédéric Kanoufi,<sup>1</sup> and Catherine Combellas<sup>1,1</sup>*

<sup>1</sup> Physico-Chimie des Electrolytes, des Colloïdes et Sciences Analytiques, CNRS UMR 7195, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France

<sup>2</sup> Laboratoire Compartimentation et Dynamique Cellulaire, CNRS UMR 144, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

<sup>3</sup> ITODYS, CNRS UMR 7086, Université Paris Diderot, 15 rue Jean de Baïf, 75013 Paris, France

## Abstract



Microelectrodes allow to easily handle at room temperature micrometric sources of a solvated electron solution. Such strongly reducing sources are the key for a new wet-chemical lithographic procedure. It is used to decorate with fluorescent moieties, or living cells, the highly chemically inert surfaces of fluorosilane self-assembled monolayers grafted onto various inorganic surfaces.

## Introduction

Controlling the surface chemistry of a material is a key issue in cell-biology, miniaturized sensors or chips development, microfluidics.... For routine use, it requires the rapid and inexpensive prototyping of disposable devices, advantaging “soft-lithographic”<sup>2</sup> methods compared to standard clean-room lithographies.

Electrochemistry provides a versatile source of reactive reagents, which has been beneficial to monitor surface chemistry<sup>3</sup> or patterning<sup>4</sup> in a clean and inexpensive way. However, the reactivity of the electrogenerated species, its  $E^0$ , is usually restricted by its chemical stability or by the potential window of the electrolyte. The former drawback may be circumvented with sub-micrometric electrodes or/and homogeneous redox mediated processes. Macro<sup>3b</sup> or micrometric<sup>4</sup> sources of highly oxidizing reagents, as reactive as plasma sources, have been proposed.

Here, we handle micrometric sources of solvated electron,  $e_{\text{solv}}$ , the most powerful reducer known.<sup>5</sup> The high reactivity of  $e_{\text{solv}}$  sources is illustrated to activate the extremely stable C-F bond in fluorinated layers, that are well-known for their exceptional qualities such as hydrophobicity, solvophobicity, chemical inertness, thermal stability, low dielectric constant and biocompatibility. These performances make fluorinated surfaces promising to design microsystems such as microfluidic devices,<sup>6</sup> superhydrophobic surfaces<sup>7</sup> or micropatterned surfaces for the manipulation and growth of cells.<sup>8</sup> Perfluorinated silanes allow the easy formation of chemically inert layers of the most hydrophobic and oleophobic films,<sup>9</sup> which should be good candidates to design surfaces with patterned wettabilities. Indeed, a large wettability contrast is required in various microsystems such as those directed toward cells or particles manipulation and growth.<sup>8b,10,11</sup>

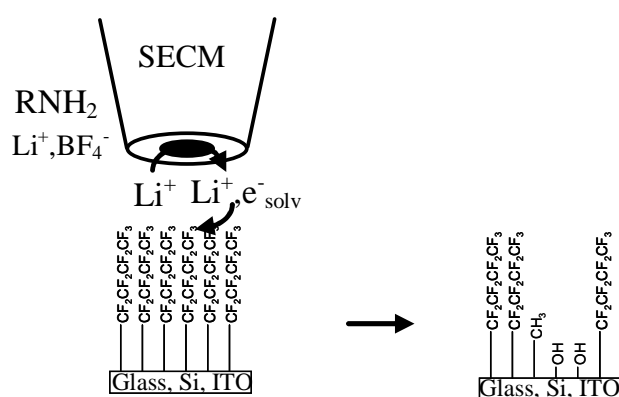
However, owing to the extreme strength of the C-F bond, the patterning of perfluorinated surfaces is often delicate. Their low surface energy limits the adhesion of coating layers, which makes difficult to use photoresists. Harsh activation procedures are often required, such as electron or ion beam techniques,<sup>12</sup> long time exposure to oxygen plasma,<sup>8b</sup> or UV lithography that uses the photocatalytic activity of  $\text{TiO}_x$ .<sup>13</sup> Alternative patterning strategies were also proposed using either the local plasma growth of a perfluorinated layer onto  $\text{Si}$ <sup>14</sup> or the local deposition of a fluorinated surface using specific hydrophobic interactions between fluorinated phases.<sup>15</sup> These techniques are often difficult to transpose to every fluorinated



material or to scale up. Organic chemistry or electrochemistry proposes alternative strategies to activate the C-F bond.<sup>16</sup> Indeed, as confirmed theoretically,<sup>17</sup> perfluoroalkyl chains are sensitive to reducers, in solution<sup>18</sup> or in the gas phase.<sup>19</sup>

Based on our expertise in the electrochemical activation of fluorinated molecules<sup>18d,20</sup> and polymers,<sup>21</sup> we propose to use highly reductive species available to the electrochemist as, for example, the solvated electron,  $e_{\text{solv}}$ , which is stable more than several minutes in few solvents such as liquid ammonia, amines and tetrahydrofuran. The confinement of the electrogenerated etchant is achieved owing to a scanning probe technique. Scanning electrochemical microscopy (SECM)<sup>4</sup> has been successfully used to decorate surfaces with different chemical functionalities or biological entities. This is achieved either by the local desorption,<sup>22</sup> etching<sup>23</sup> or functionalization<sup>24</sup> of self-assembled monolayers (SAMs), the local denaturation of thin protein layers<sup>25</sup> or the local electrografting of thin organic layers on electrodes.<sup>26</sup> The use of nanometer size electrodes or probes (such as in STM or conductive AFM) has ensured the electrochemical nanopatterning of SAMs.<sup>22a,27</sup>

First, we study from wetting and spectroscopic analyses the reactivity of  $e_{\text{solv}}$  in liquid  $\text{NH}_3$  on different SAMs covered surfaces as compared to standard oxidizing treatments (Fenton, piranha). Then, a microelectrode is used to generate, at room temperature, a stable micrometric source of  $e_{\text{solv}}$  in dry ethylenediamine, (Scheme 1) and it is scanned at a micrometer distance above a fluorinated SAM covered surface. The action of this electrogenerated reagent on the fluorinated SAM is demonstrated from the local surface analysis of the patterned surfaces. Fluorescent entities, gold nanoparticles and living cells are finally selectively immobilized onto the patterned fluorinated SAMs.



**Scheme 1.** Local reduction of a fluorinated SAM by  $e_{\text{solv}}$  in ethylenediamine.

In this way, solvated electrons, chemically inert fluorinated silanes SAMs immobilized on different inorganic surfaces<sup>9</sup> and Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) are combined to design functional surfaces devoted to the immobilization of micro- to nanometric objects at a desired location onto the inert fluorinated substrate.

### Experimental Section

**SuperHydrophobicGlass:** The superhydrophobic glass (SHG) was provided by Saint-Gobain Recherche group (France). A glass surface is decorated with a random array of glass nano-pillars (100 nm height, 300 nm diameter, < 1  $\mu\text{m}$  average inter-pillar distance) by a plasma etching process. The superhydrophobicity was conferred by subsequent silanization with a 1H,1H,2H,2H-perfluorodecyl-silane.

**Substrates Preparation:** Substrates were  $\sim 1 \times 1 \text{ cm}^2$  Si (from 2 inch wafers, ACS, France) and glass surfaces (from 1.1 mm thick microscope slides). ITO was provided by Saint-Gobain Recherche (Aubervilliers, France).

Glass and silicon substrates were cleaned with freshly prepared piranha solution (70:30 v/v, concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$  /aqueous  $\text{H}_2\text{O}_2$  (35%)) at  $150^\circ\text{C}$  for 30 min. ITO was cleaned in alkaline piranha solution (1:1 v/v,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) /  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%)) at  $70^\circ\text{C}$  for 1 h. *Caution: these piranha solution may explode in contact with organic solution and must be carefully handled.* The substrates were then rinsed with pure water (Millipore, resistivity  $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ), cleaned by ultrasonication in water for 1 min, and dried under nitrogen.

The fluorosilane SAM surfaces (designated as G-CF, Si-CF, ITO-CF) were obtained by silanization in the gas phase by placing the substrates in a sealed cell in the presence of an open flask of 1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane ( $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{SiCl}_3$ , 97%), heated at  $110^\circ\text{C}$  for 15 h. G-CF, Si-CF could also be obtained from silanization in a 0.5% vol.  $\text{CCl}_4$  solution of the silane, G-Oct was prepared from triethoxy-octylsilane solution as preconized in Ref 9.

Fenton solution was 1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ /0.05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  aqueous solution containing 1 M  $\text{FeCl}_2$ .

**Electrolytic solutions:** Solvated electrons in liquid ammonia were obtained by dissolving 0.1 M of metallic sodium into 80 mL of liquid ammonia in an undivided cell<sup>28</sup> maintained at  $-38^\circ\text{C}$  with a cryocooler. Non-aqueous electrolytic solutions were prepared from dimethylformamide (DMF), ethylene diamine, tri-p-tolylphosphine (TPP),

tetrabutylammonium tetrafluoroborate and lithium tetrafluoroborate of highest purification grade and of lowest water content (Sigma). Ethylene diamine was distilled under vacuum from potassium solutions. Stock solution of  $\text{LiBF}_4$  in ethylene diamine were prepared some minutes before use and a minimum amount of water was maintained by addition of Li granular (Fluka). The low density of Li resulted in the formation of a supernatant layer of Li + solvated electrons (blue coloration) that prevents moisture penetration into the underlying bulk ethylenediamine solution. This stock solution is placed in the SECM protected environment (plastic glove bag) and for SECM patterning aliquots were sampled from the underlying solution. DMF solutions were prepared some minutes before use without further purification. Aqueous solutions of potassium ferrocyanide (from Janssen Chimica) + potassium chloride (from Prolabo) were made up in high purity Millipore water (resistivity  $>18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ).

**Electrochemical Cell:** A three-electrode assembly made of a  $25 \mu\text{m}$  Pt wire microelectrode, a  $250 \mu\text{m}$  diameter Pt counter-electrode and a  $250 \mu\text{m}$  diameter Ag/AgCl reference electrode is used, as described previously.<sup>23c</sup> The electrochemical cell is connected to a CH660C potentiostat (CH Instruments). Such three-electrode assembly allows to perform SECM experiments in droplets of solution ( $< 10 \mu\text{L}$ ).

### SECM Procedures:

*a. Microelectrode positioning.* The homemade SECM set-up was described previously.<sup>29</sup> The microelectrode is held above the substrate in a  $10 \mu\text{L}$  drop of a solution containing a redox probe (either  $3 \text{ mM Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  in water +  $0.1 \text{ M KCl}$ , or  $0.1 \text{ M tri-}p\text{-tolylphosphine, TPP}$ , in DMF +  $0.1 \text{ M NBu}_4\text{BF}_4$ ). The microelectrode is biased at a potential such that the redox probe is consumed under mass-transfer control ( $E > 0.5 \text{ V vs Ag/AgCl}$  for  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  or  $E = -3 \text{ V vs Ag/AgCl}$  for TPP). When a steady current is attained, the microelectrode is approached along the z direction at  $1 \mu\text{m/s}$  toward the substrate while the current is recorded. The substrate behaves as an insulator and hinders the diffusion of the redox probe to the microelectrode; as a result, the current decreases as the tip-substrate distance decreases. This approach curve is fitted with the theoretical approach curve for an insulating substrate and allows to place the microelectrode at a given tip-substrate distance. The same strategy is used to settle the substrate plane parallel to the x,y displacement of the microelectrode.

*b. Substrate patterning.* The appropriate handling of micrometric sources of highly reducing reagents requires water and oxygen free environments. As proposed earlier,<sup>29</sup> the SECM was

operated under a controlled atmosphere, the whole device was kept under argon in a polyethylene bag (glovebag, Aldrich) during the experiment. The humidity in the plastic bag was maintained as low as possible,  $RH < 0.2$  with molecular sieves; this was checked by a hair hygrometer. When the surface is patterned with the  $e_{\text{solv}}$  reagent, an aqueous  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  solution is used for the tip positioning, it is then withdrawn with cotton wipe, the region contacted with the solution is rinsed with water droplets and dried with  $\text{N}_2$ . Then, 100  $\mu\text{L}$  of a 0.1 M  $\text{LiBF}_4$  solution of ethylene diamine is poured onto the substrate. The microelectrode is biased at the solvent discharge potential of -3.5 V (Ag/AgCl) and the tip is moved along the x or y direction at speed  $v$  for the patterning.

When the surface is patterned with the TPP anion radical in DMF, the aqueous solution is used to adjust the substrate planarity. Then, the aqueous solution is withdrawn, the substrate cleaned and dried and the DMF solution is added so that the tip positioning and substrate patterning are performed with TPP as the redox probe. Once patterned the surfaces are cleaned in copious amounts of acetone and water under ultrasonic activation.

**XPS Analysis:** XPS spectra were recorded using a Thermo VG Scientific ESCALAB 250 system fitted with a micro-focused, monochromatic Al  $K\alpha$  X-ray source (1486.68 eV) and a magnetic lens that increases the electron acceptance angle and hence the sensitivity. An X-ray beam of 320  $\mu\text{m}$  size was used at voltage of 15 kV and a power of 75 W for the image and for the line scans respectively. The spectra were acquired in the constant analyzer energy mode, with a pass energy of 150 and 20 eV for the survey and the narrow regions, respectively. The images were recorded in the constant retard ratio (CRR) mode with a  $\Delta E/E = 4$ . The Advantage software (version 3.51) was used for data processing. Spectral calibration was determined by setting the aliphatic C-C/C-H C1s peak at 285 eV. The C1s image was recorded over an area of 375 x 500  $\mu\text{m}^2$  in the constant retard ratio; it is obtained at the peak of the  $\text{CF}_2$  fragment (energy 291.6 eV) and the background subtracted by considering the output signal at 282 eV.

**ToF-SIMS Analysis:** ToF-SIMS analyses were carried out with an ION-TOF ToF-SIMS IV spectrometer. Surface analysis was performed in the static mode. A 0.8 pA  $\text{Ga}^+$  ion beam was used, that was rastered on a 350 x 500  $\mu\text{m}^2$  surface area. The ionic density, which reaches the surface was  $\sim 5 \times 10^{10}$  ions  $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$ . Mass peaks resolution was  $\sim 0.007$  amu. The images were obtained at the mass peak for different characteristic negative or positive ion fragments.

**Water Condensation figures:** Condensation was performed in a plexiglass cell. The sample was positioned on an electrolytic copper block covered by a water layer that insured a thermal

contact. The sample cooling was carried out by a Peltier element contacting the copper block; the Peltier element itself was cooled by water. The temperature was controlled by a K type thermocouple. The cell was filled with nitrogen that was saturated with water owing to bubbling in ultra-pure water (milli-Q grade from the laboratory). Experiments were observed with a stereo microscope (Olympus) and a digital camera. The images were analyzed by ImageJ software (Scion Corporation). The whole set-up is represented in Figure SI-1.

**Cells Culture:** RPE-1 (Retinal Pigment Epithelial human) cells were cultured at 37°C in Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM-F12) supplemented with 10% of Fetal Calf Serum (FCS), 2 mM glutamine and antibiotics in a humidified atmosphere containing 50% CO<sub>2</sub>. Prior to adding cells, the patterned fluorinated glass substrates were incubated with pluronic F-127 (Sigma) at 0.2% in Phosphate Buffered Saline (PBS) for 1h and room temperature, before incubation with fibronectin. Cells were seeded on fibronectin micropatterned surfaces at 1.5x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>. Floating cells were removed 20 min later by gentle flushing and extensive washing of the surface.<sup>30</sup>

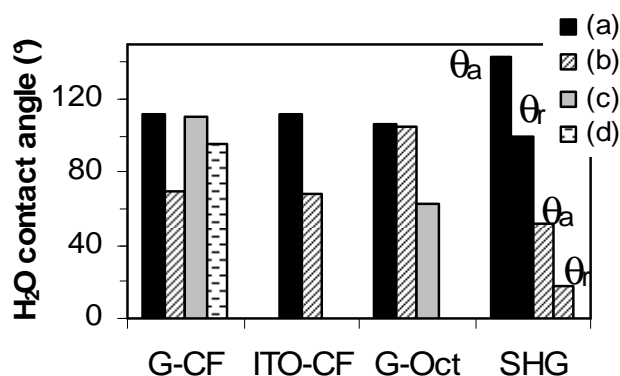
Nikon Eclips TS100 microscope, equipped with DS camera control unit DS-L2 was used to record phase contrast of living cells.

## Results and Discussion

### Etching of Hydrophobic or Superhydrophobic Surfaces. Wetting and XPS Analysis:

We compare the action of e<sub>solv</sub> solution in liquid ammonia at -38° C and of classical oxidizing etchants on different hydrophobic or superhydrophobic surfaces. We inspect how these etchants change the surface wettability (Fig. 1) of i) glass surfaces covered either by SAMs of an octylsilane (G-Oct) or a 1H,1H,2H,2H-perfluorodecyl-silane (G-CF), or ii) Si (Si-CF) or ITO (ITO-CF) or a nanostructured glass (SHG) surfaces covered with the same perfluorinated SAM. The e<sub>solv</sub> efficiently transforms, within less than 1 min, the perfluorinated glass (G-CF), Si (Si-CF, not shown, same as for G-CF) and ITO (ITO-CF) surfaces into more hydrophilic ones as the contact angle,  $\theta$ , of a water sessile drop decreases from 112° to 70° after etching. It is even more spectacular for the superhydrophobic fluorinated glass (SHG of advancing contact angle,  $\theta_a \sim 143^\circ$ ) as it is converted into an almost super-hydrophilic substrate (receding contact angle,  $\theta_r \sim 18^\circ$ ). Conversely, the e<sub>solv</sub> has no action on the alkyl SAM (G-Oct), even

after 10 min. This suggests that the  $e_{\text{solv}}$  reduces the fluorinated SAM and therefore that  $e_{\text{solv}}$  does not significantly decomposed to reduce liquid ammonia to the strong alkali,  $\text{NH}_2^-$ .<sup>28</sup> Indeed, such strong alkali would have etched all silane SAMs, independently of their chemical nature by dissociation of the Si-O-Si bonds. Therefore, the  $e_{\text{solv}}$  solution acts as a reducer and the perfluoroalkyl SAMs are reducible.

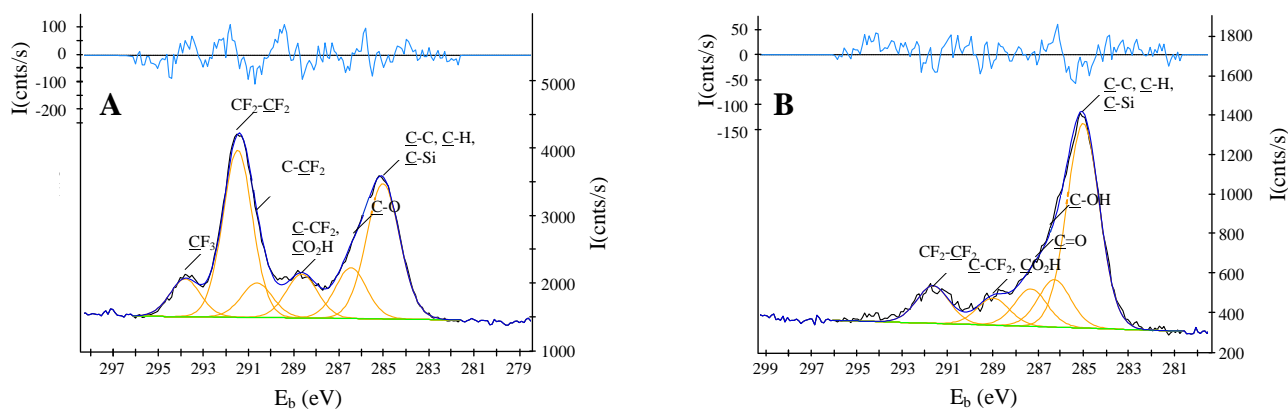


**Figure 1.** Water contact angles on different SAMs. Fluoroalkylsilane SAM on glass: G-CF, or ITO: ITO-CF, or nanostructured glass: SHG; octylsilane SAM on glass: G-Oct; a) Pristine surfaces, action of b)  $e_{\text{solv}}$  solution in  $\text{NH}_3$  at  $-38^\circ\text{C}$ , c) 15 min in Fenton solution, d) 10 min in piranha solution.  $\theta_a$ ,  $\theta_r$ : advancing and receding angles respectively.

If oxidizing reagents, such as  $\text{HO}^\bullet$  generated from Fenton solution, significantly etch the alkyl surface (for G-Oct,  $\theta$  goes from  $107^\circ$  to  $63^\circ$ ), they do not affect the perfluoroalkyl surfaces (even after 15 min). It confirms that alkylsilanes are sensitive to oxidants such as  $\text{HO}^{\bullet 23b}$  (or  $\text{Br}_2^{23a}$ ) and demonstrates that the perfluoroalkyl chains form a chemically inert blocking barrier to the transport of small molecules, such as  $\text{HO}^\bullet$ , as the ethyl chain of the fluorosilane adjacent to the surface was unetched. The fluorosilane layer resists to a lesser extent to harsher oxidizing conditions, as after a 10 min reaction in a piranha solution, the water contact angle decreases by  $\sim 6^\circ$  (G-CF,  $112^\circ$  to  $106^\circ$ ).

XPS analysis of the pristine and etched G-CF surfaces was carried out to evidence structural changes in the composition of the etched surfaces. Figure 2 presents the experimental and deconvoluted XPS spectra of the C1s region of the glass-CF substrate before (Fig. 2A) and after 3 min of immersion into a solvated electron solution (Fig. 2B). The C1s region was deconvoluted into hydrogenated (C-C, C-Si at a binding energy of 285 eV), oxygenated and fluorinated carbons (290.6, 291.5 and 293.8 eV for  $\text{CF}_2\text{-C}$ ,  $\text{CF}_2\text{-CF}_2$  and  $\text{CF}_3$  respectively). The proportion of the different peaks for unreduced G-CF is consistent with the chemical structure of the perfluorinated SAM immobilized onto  $\text{SiO}_2$ . After reduction, both the higher

energy peaks of fluorinated C1s carbons (compare left parts in Figs. 2 A and B) and the F1s/Si2p ratio (not shown) are largely smaller, while the hydrogenated and oxygenated C1s carbon and the O1s/Si2p ratio (not shown) are higher.



**Figure 2.** XPS spectra of the C1s region of (A) a fluorinated glass, G-CF, and (B) a fluorinated glass reduced for 3 min by a solution of solvated electron in liquid ammonia ( $-38^{\circ}\text{C}$ ).

The defluorination and hydrogenation of the SAM are consistent with the general mechanism for electrochemical reductive C-X (X = halogen) bond cleavage according to:



However, taking into account the conversion of C-F into C-H only does not explain the increase in surface wettability (compare  $\theta$  for G-CF and G-Oct). Indeed, the complete hydrogenation of the perfluorinated chain cannot be invoked since a surface of low surface energy (with a water contact angle  $> 100^{\circ}$  close to that of G-Oct) would be expected in disagreement with the observed value of  $\theta_{\text{G-CF-red}} = 70^{\circ}$ .

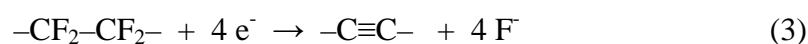
Such low value for the contact angle rather results from the surface oxygenation (30%, estimated by XPS for oxygenated fragments). If the reductive process restored the original hydrophilic glass surface, the reduced surface would be a composite surface made of the restored hydrophilic original glass surface and of unreacted perfluorinated chains (or of hydrogenated chains with similar surface energy). The fractional coverage of the restored glass surface,  $\Theta_1$  of contact angle  $\theta_{\text{glass}} \sim 10^{\circ}$ , or of the unreacted (or hydrogenated) perfluorinated layer,  $1-\Theta_1$ , of contact angle  $\theta_{\text{G-CF}} = 112^{\circ}$ , can be estimated from Cassie's equation<sup>31</sup> (2) and the composite reduced surface contact angle,  $\theta_{\text{G-CF-red}}$ :

$$\cos \theta_{\text{G-CF-red}} = \Theta_1 \cos \theta_{\text{glass}} + (1-\Theta_1) \cos \theta_{\text{G-CF}} \quad (2)$$

yielding  $\Theta_1 = 0.5$ . This value lower than the XPS estimate of 60-70 % surface defluorination implies that the reduction and the oxygenation of the surface are not solely due to the

restoration of the original glass surface. This is also confirmed from the presence of various carbonated fragments of lower binding energies (C-C, C-OH, C=O) in the C1s region and because in the Si2p region, the peak relative to Si-O-C has not disappeared.

Finally, the increase of wettability rather results from a combination of partial glass restoration and formation of C-O fragments within the etched perfluoroalkyl chain since the reduction of perfluorinated substrates yields unsaturated sites reactive towards water and oxygen:<sup>18</sup>



Then, the post-treatment formation of C-O, by exposition to air and water of the reduced surface, is also consistent with a mechanism of reduction of the perfluoroalkyl chain.

### **Patterning of fluorinated SAM surfaces. Micro-XPS, micro-ToF-SIMS and Water Condensation Characterizations:**

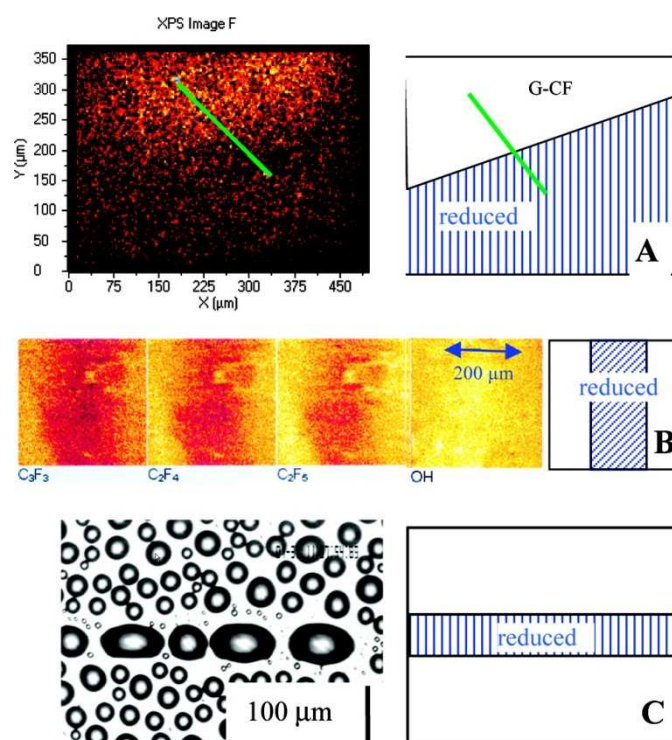
The reductive etching process is transposed at a local scale for the patterning of fluorinated SAM surfaces (Scheme 1). A microelectrode of 12.5  $\mu\text{m}$  radius, is positioned according to SECM principle, at 2-4  $\mu\text{m}$  from the SAM surface. The local micrometric source of solvated electrons is obtained, at room temperature, by reduction at a Pt microelectrode of 0.1 M  $\text{LiBF}_4$  in dry ethylenediamine ( $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), by polarizing the microelectrode at the decomposition potential of the electrolyte (i.e. -3.5 V (Ag/AgCl)); it ensures the generation at the microelectrode of  $e_{\text{solv}}$  with a cathodic current,  $i < -100$  nA. Large cathodic potentials or currents are necessary to ensure a sufficient amount of  $e_{\text{solv}}$  owing to its low stability in the hygroscopic ethylenediamine. From the microelectrode steady-state current, the amount of  $e_{\text{solv}}$  generated at the microelectrode surface is about 20 mM. It is likely less important at the SAM surface owing to possible reaction with the solvent and/or traces of water/oxygen. In most classical organic solvents such as DMF,  $e_{\text{solv}}$  cannot be produced, but the electrogenerated radical anion of tri(p-tolyl)-phosphine ( $E^0 = -2.75\text{V}$  (SCE))<sup>32</sup> is the closest to electrolyte discharge reducer that we found to efficiently pattern the SAM.

The etching of the fluorinated SAM is a slow process as the microelectrode must fly over each substrate point for, at least, 1 s for the formation of visible pattern. This is supported from previous wettability investigation.<sup>33</sup> This slowness of the etching is the limiting factor of the patterning speed,  $v$ , and the microelectrode should not travel faster than  $v < 25$   $\mu\text{m/s}$ . For comparison, the complete reduction of bromo-terminated SAMs is still efficient at much faster writing speeds. It is in agreement with the weakness of C-Br compared to C-F.<sup>23d</sup> It



confirms that perfluoroalkyl chains are highly stable and that even  $e_{\text{solv}}$  is not a sufficiently efficient reducer. However, fast and high throughput patterning (compared to standard lithographic techniques using masks and stamps) are obtained by using “stamp” electrodes.<sup>34</sup> It is particularly demonstrated by the imprint of lines when using band or wire as “stamp” electrodes. The use of microelectrode arrays should be possible too, however the array proposed previously for the patterning of Teflon<sup>34b</sup> cannot be applied here since it used arrays made from thin gold layers which are expected to be readily dissolved under extremely reducing conditions and particularly in solvated electrons solutions.<sup>35</sup>

The reductive patterning of fluorinated SAMs (G-CF) is characterized from micro-XPS and micro-ToF SIMS. Local XPS supports the mechanism observed on wholly reduced surfaces, with a loss of fluorine  $\sim 70\%$  in the reduced region (Fig. 3A). Defluorination is confirmed from ToF-SIMS images of perfluorinated ions abstracted from the patterned surface (Fig. 3B, first 3 images for  $\text{C}_3\text{F}_3^+$ ,  $\text{C}_2\text{F}_4^+$  and  $\text{C}_2\text{F}_5^+$ ). ToF-SIMS also shows that the reduced region is richer in  $\text{OH}^-$  (4<sup>th</sup> image in Fig. 3B) and  $\text{CH}^-$  (not shown) and poorer in  $\text{C}^+$  fragments (not shown), in agreement with the hydroxylation, hydrogenation and possible chain fragmentation, respectively.



**Figure 3.** A) Micro XPS images of the CF<sub>2</sub> contribution of a locally reduced perfluorinated glass. B) Micro ToF-SIMS images of a locally reduced perfluorinated glass (from left to right: positive perfluorinated fragments,  $\text{C}_3\text{F}_3^+$ ,  $\text{C}_2\text{F}_4^+$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5^+$ , and  $\text{OH}^-$ ). C) Water condensation figure on a 75 μm wide stripe patterned on Si-CF.

According to this patterning procedure, a hydrophilic pattern is formed within a surrounding hydrophobic fluorinated SAM. It is evidenced from the preferred condensation of water vapour onto the patterns (Fig. 3C). Breath figures evidence patterns of contrasted wettabilities,<sup>36</sup> they also allow surface contact angle,  $\theta$ , estimate when the condensation process has reached a self-similar regime observed at long condensation time.<sup>37</sup> Typically, this regime was reached in Fig 3C after 300 s of condensation with a 100 mL/min flux of 19 °C N<sub>2</sub> over a patterned surface held at 11 °C. Then, the surface contact angle,  $\theta$ , is correlated to the droplet surface coverage,  $\epsilon^2$ : the lower  $\theta$ , the more the surface is covered by droplets, also, for  $10^\circ < \theta < 90^\circ$ :

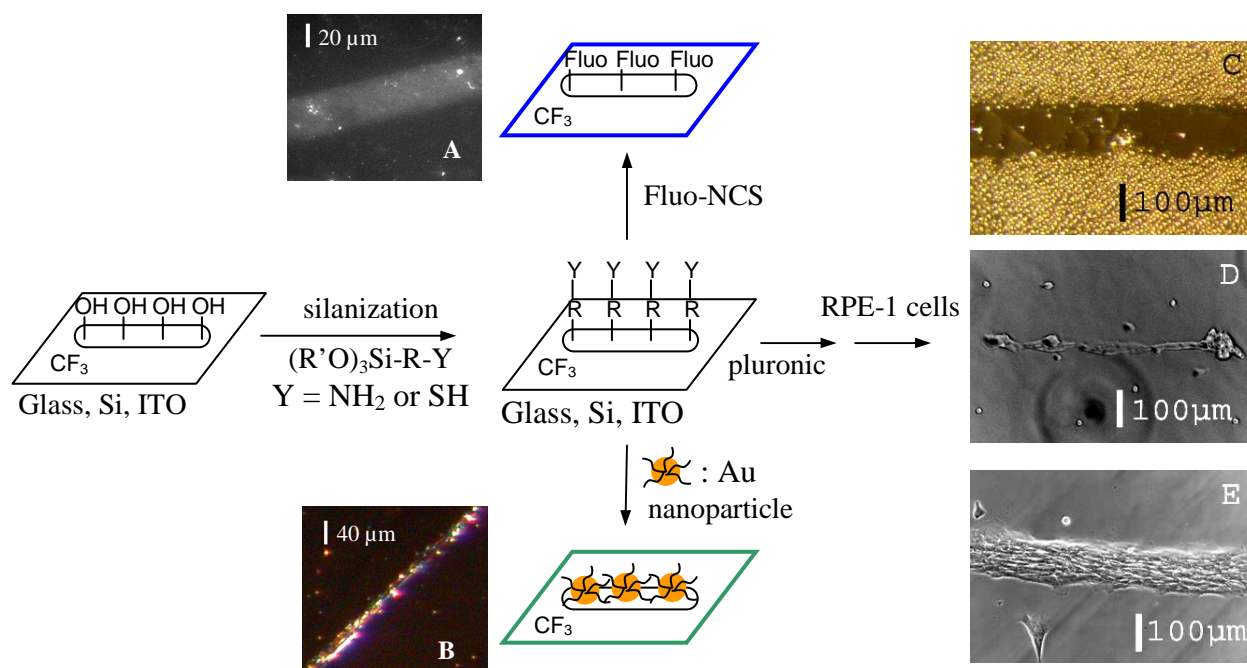
$$\theta \approx \frac{(1 - \epsilon^2) \times 90^\circ}{1 - 0.55} \quad (4)$$

A droplet surface occupation of  $0.67 \pm 0.02$  in the pattern (Fig. 3C) indicates a mean contact angle of  $66 \pm 4^\circ$  within the pattern, in good agreement with the value observed on totally etched surfaces (Fig. 1). Breath figures showed that 30 to 200  $\mu\text{m}$  wide patterns are drawn, depending on the reducer and writing speed. The pattern width was assessed independently from the selective anchoring of a fluorescent tag (see below).

### **Patterns post-functionalization:**

Patterns derivatization was envisioned according to the spectroscopic analyses, which show that the reductive surface treatment (at the local or global levels) introduces  $-\text{OH}$  groups onto the surface. The concentration of these  $-\text{OH}$  groups was enhanced by post-treating the surface with Fenton or piranha solutions, which affect only the patterned region. Indeed, from breath figures,  $\theta$  decreases to  $50^\circ$  within the pattern after 10 min in a Fenton bath. Then, the surface  $-\text{OH}$  groups were engaged into silanization reactions to design hydrophobic perfluorinated surfaces patterned with chosen chemical functionalities.

By reaction with aminopropyltriethoxysilane (APTES),  $\text{NH}_2$  functions were selectively introduced into the patterned region and further derivatized with fluorescein-isothiocyanate to bind fluorescein tags within the pattern (Fig. 4A). The contact angle within the (unreduced) fluorinated surface is unchanged after the successive derivatization steps, confirming that the latter did not take place on the inert G-CF surface.



**Figure 4.** Selective post-functionalization of a locally reduced perfluorinated surface. Coupling of the patterned surface with A) a fluorescent probe, B) gold nanoparticles. Selective adhesion of living RPE-1 cells on the patterned surface (characterized by water condensation (C) after (D) few hours or (E) 3 days of immersion in the culture medium.

The pattern width obtained from fluorescence tagging is  $\sim 1$  tip radius larger than the breath figures estimate. The two determination methods are in acceptable agreement, but also show that the patterns have diffuse borders due to the diffusion of the  $e_{\text{solv}}$  during the etching. The dimension of patterns with diffuse chemical functionalities is difficult to estimate from breath figures as it is difficult to deconvolute properly from local wetting analysis the contribution of both the pattern width and its surface energy distribution.<sup>33</sup>

Thiolates were also introduced by reaction of the patterned surfaces with 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTMS). As a result, gold nanoparticles were selectively assembled into the patterned region (Fig 4B) by dipping a patterned Si-CF surface into a gold colloid solution.<sup>38</sup>

Finally, the patterned surfaces were used for cells culture. A surface reduced on a  $\text{cm}^2$  region by dipping into an  $e_{\text{solv}}$  solution was incubated with RPE-1 cells. Cells adhered preferentially onto the reduced region and not onto the perfluorinated surface (Fig SI-2). On micrometer scale patterns, the same procedure did not allow cells adhesion even after silanization of the surface with APTES. This was due to the adsorption of proteins, present in the cell culture medium and/or secreted by cells, onto perfluorinated regions.<sup>8b</sup> To enhance selective cells

adhesion, patterned surfaces were then incubated with a pluronic solution to prevent proteins adsorption on unreduced regions. Indeed, pluronic is known to adsorb preferentially onto hydrophobic surfaces and to prevent proteins and cells adhesion. This simple surface treatment allowed to selectively assemble a single continuous line of RPE-1 cells on the patterns, as depicted in Figure 4D. For longer incubation times, the cell arrangement (Fig. 4E) neatly reproduces the pattern observed by breath figures (Fig. 4C).

### Conclusion

Micrometric sources of the strongest reducer known,  $e_{\text{solv}}$ , are easily handled at room temperature. Combination of macro and micro spectroscopic and wetting analyses shows that the etching of fluorinated SAMs by  $e_{\text{solv}}$  results in surface defluorination and oxygenation. By standard post-silanization procedures, the patterned surfaces can be selectively decorated with fluorescent probes, gold particles or living cells. This procedure is a promising alternative lithography of fluorinated silanes SAMs on different inorganic surfaces. Such lithographic strategy is easily transposable to the patterning of any fluorinated hydrophobic or superhydrophobic material surface.

ACKNOWLEDGMENTS. Hervé Arribart and Arnaud Huignard (Saint-Gobain Recherche) are gratefully acknowledged for the supply of the hydrophobic glass. Janine Mauzeroll (UQAM, Canada) and Zsolt Lenkei (ESPCI, France), are acknowledged for helpful preliminary discussions on cell-adhesion assays. The “Agence Nationale de la Recherche” is acknowledged for its financial support via the ANR-06-BLAN-0368 projec

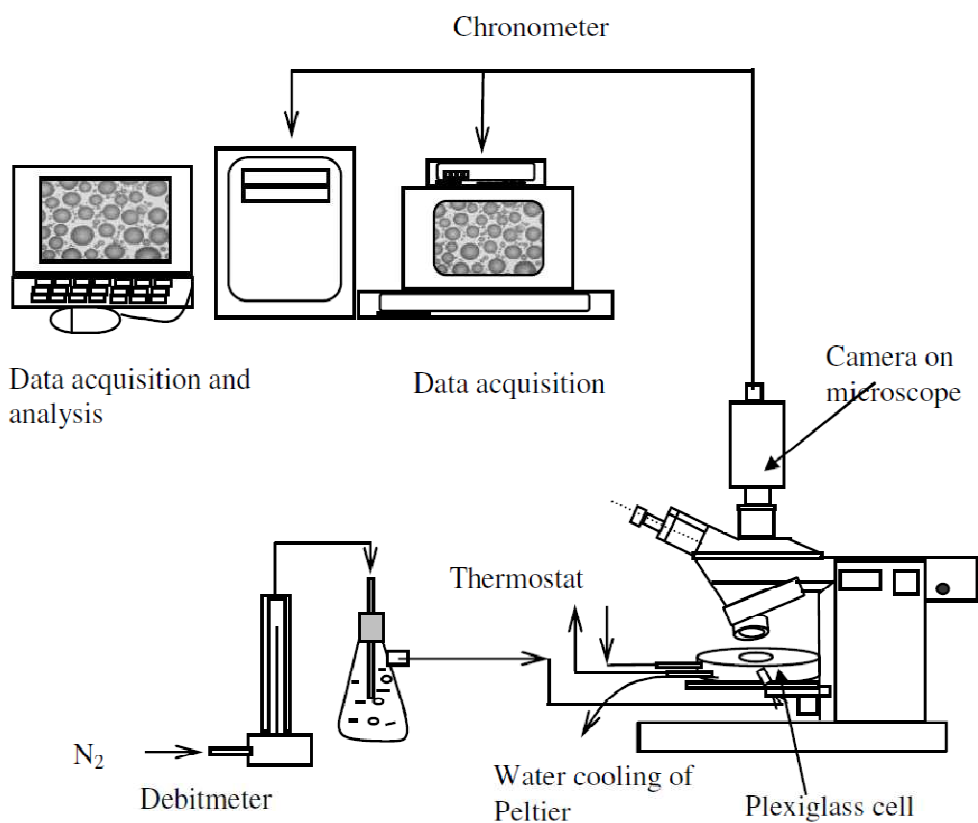
## REFERENCES

- (1) Xia, Y.; Whitesides, G.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 550.
- (2) (a) Pinson, J.; Podvorica F. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 429. (b) McCreery, R. L. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2646.
- (3) (a) Mandler, D. In *Scanning Electrochemical Microscopy*, (Eds.: Bard, A.J.; Mirkin, M.V.), Marcel Dekker, New York, USA, 2001, p 593. (b) Wittstock, G.; Burchardt, M.; Pust, S.E.; Shen, Y.; Zhao, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1584.
- (4) Weyl, W. *Ann. Phys.* **1863**, *197*, 601.
- (5) (a) Rolland, J.P.; Van Dam, R.M.; Schorzman, D.A.; Quake, S.R.; DeSimone, J.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2322. (b) Gratton, S.E.A.; Williams, S.S.; Napier, M.E.; Pohlhaus, P.D.; Zhou, Z.; Wiles, K.B.; Maynor, B.W.; Shen, C.; Olafsen, T.; Samulski, E.T.; DeSimone, J.M. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1685.
- (6) Hikita, M.; Tanaka, K.; Nakamura, T.; Kajiyama, T.; Takahara, A. *Langmuir* **2005**, *21*, 7299.
- (7) (a) Krishnan, S.; Weinman, C.J.; Ober, C.K. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3405. (b) Finlay, J.A.; Krishnan, S.; Callow, M.E.; Callow, J.A.; Dong, R.; Asgill, N.; Wong, K.; Kramer, E.J.; Ober, C.K. *Langmuir* **2008**, *24*, 503. (c) Senaratne, W.; Andruzzi, L.; Ober, C.K. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2427.
- (8) Wasserman, S.R.; Tao, Y.-T.; Whitesides, G.M. *Langmuir* **1989**, *5*, 1074.
- (9) Kumar, A.; Biebuyck, H.A.; Whitesides, G.M. *Langmuir* **1994**, *10*, 1498.
- (10) (a) Stenger, D.A.; Georger, J.H.; Dulcey, C.S.; Hickman, I.J.; Rudolph, A.S.; Nielsen, T.B.; McCort, S.M.; Calvert, J.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8435. (b) Spargo, B.J.; Testoff, M.A.; Nielsen, T.B.; Stenger, D.A.; Hickman, J.J.; Rudolph, A.S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 11070. (c) Acatürk, T.O.; Peel, M.M.; Petrosko, P.; LaFramboise, W.; Johnson, P.C.; DiMilla, P.A. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *44*, 355. (d) Franco, M.; Nealey, P.F.; Campbell, S.; Teixeira, A.I.; Murphy, C.J. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 261.
- (11) Luscombe, C.K.; Li, H.W.; Huck, W.T.S.; Holmes, Q.B. *Langmuir* **2003**, *19*, 5273.
- (12) (a) Zhang, H.; Lee, Y.Y.; Leck, K.J.; Kim, N.Y.; Ying, J.Y. *Langmuir* **2007**, *23*, 4728. (b) Zhang, X.; Kono, H.; Liu, Z.; Nishimoto, S.; Tryk, S.A.; Murakami, T.; Sakai, H.; Abe, M.; Fujishima, A. *Chem. Commun.* **2007**, 4949.
- (13) Ayón, A.A.; Zhang, X.; Khanna, R.A. *Sens. Act. A* **2001**, *91*, 381.
- (14) Tae, G.; Lammertink, R. G.H.; Kornfield, J.A.; Hubbell, J.A. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 66.
- (15) Amii, H.; Uneyama, K. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2119.
- (16) Paul, A.; Wannere, C.S.; Kasalova, V.; Schleyer, P.V.R.; Schaefer III, H.F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15457.
- (17) (a) Kavan, L.; Dousek, F.P. *J. Fluorine. Chem.* **1988**, *41*, 383. (b) Pud, A.A.; Shapoval, G.S.; Kukhar, V.P.; Mikulina, O.E.; Gervits, L.L. *Electrochim. Acta* **1995**, *40*, 1157. (c) Marsella, J.A.; Gilicinski, A.G.; Coughlin, A.M.; Pez, G.P. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2856. (d) Combellas, C.; Kanoufi, F.; Thiébaud, A. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 10894.
- (18) (a) Spyrou, S.M.; Sauers, I.; Christophorou, L.G. *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 7200. (b) Ishii, I.; McLaren, R.; Hitchcock, A.P.; Jordan, K.D.; Choi, Y.; Robin, M.B. *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 2104.
- (19) Andrieux, C. P.; Combellas, C.; Kanoufi, F.; Savéant, J.-M.; Thiébaud, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9527.
- (20) (a) Boittiaux, V.; Boucetta, F.; Combellas, C.; Kanoufi, F.; Thiébaud, A.; Delamar, M.; Shanahan, M.E.R. *Polymer* **1999**, *40*, 2011 and references therein. (b) Combellas, C.; Kanoufi, F.; Nunige, S. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 3830 and references therein.

- (21) (a) Pust, S.E.; Szunerits, S.; Boukherroub, R.; Wittstock, G. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 075302. (b) Wilhelm, T.; Wittstock, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2248. (c) Wittstock, G.; Schuhmann, W. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5059.
- (22) (a) Zhao, C.; Witte, I.; Wittstock, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5469. (b) Shiku, H.; Takeda, T.; Yamada, H.; Matsue, T.; Uchida, I. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 312. (c) Matrab, T.; Hauquier, F.; Combellas, C.; Kanoufi, F. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 670. (d) Slim, C.; Tran, Y.; Chehimi, M.M.; Garraud, N.; Roger, J.-P.; Combellas, C.; Kanoufi, F. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 6677. (e) Zhao, C.; Zawisza, I.; Nullmeier, M.; Burchardt, M.; Trauble, M.; Witte, I.; Wittstock, G. *Langmuir* **2008**, *24*, 7605. (f) Zhao, C.; Burchardt, M.; Brinkhoff, T.; Beardsley, C.; Simon, M.; Wittstock, G. *Langmuir* **2010**, *26*, 8641.
- (23) Ku, S.-Y.; Wong, K.-T.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2392.
- (24) (a) Kaji, H.; Tsukidate, K.; Matsue, T.; Nishizawa, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15026. (b) Kaji, H.; Kanada, M.; Oyamatsu, D.; Matsue, T.; Nishizawa, M. *Langmuir* **2004**, *20*, 16.
- (25) (a) Matrab, T.; Combellas, C.; Kanoufi, F. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 1230. (b) Cougnon, C.; Gohier, F.; Bélanger, D.; Mauzeroll, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4006.
- (26) Wouters, D.; Hoepfener, S.; Schubert, U.S.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1732.
- (27) Combellas, C.; Kanoufi, F.; Thiebault, A. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 499, 144.
- (28) Combellas, C.; Ghilane, J.; Kanoufi, F.; Mazouzi, D. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 6391.
- (29) Azioune, A.; Storch, M.; Bornens, M.; Thery, M.; Piel, M. *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 1640.
- (30) Cassie, A. B. D. *Discuss. Faraday Soc.* **1952**, *75*, 5041.
- (31) Fuchs, A.; Kanoufi, F.; Combellas, C.; Shanahan, M.E.R. *Coll. Surf. A* **2007**, *307*, 7.
- (32) Combellas, C.; Fuchs, A.; Kanoufi, F.; Shanahan, M.E.R. in *Contact Angle, Wettability and Adhesion*, Vol. 4 (Ed.: K.L. Mittal), V.S.P, Utrecht, 2006, pp.43-59.
- (33) (a) Combellas, C.; Fuchs, A.; Kanoufi, F. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3612. (b) Deiss, F.; Combellas, C.; Fretigny, C.; Sojic, N.; Kanoufi, F. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5169.
- (34) Teherani, T. H.; Peer, W. J.; Lagowski, J. J.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 7768.
- (35) (a) López, G.P.; Biebuyck, H.A.; Frisbie, C.D.; Whitesides, G.M. *Science* **1993**, *260*, 647. (b) Kumar, A.; Biebuyck, H.A.; Whitesides, G.M. *Langmuir* **1994**, *10*, 1498.
- (36) Zhao, H.; Beysens, D. *Langmuir* **1995**, *11*, 627.
- (37) Doron, A.; Katz, E.; Willner, I. *Langmuir* **1995**, *11*, 1313.

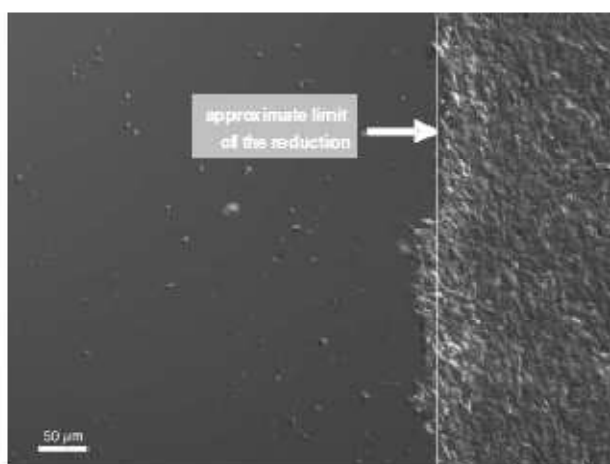
### 3. Supporting information

#### Water condensation onto the patterns



**Figure SI-1.** Experimental set-up for water condensation investigation.

#### Cells culture on $cm^2$ plaques



**Figure SI-2.** Adhesion of living RPE-1 cells onto a large ( $< 1 cm^2$ ) reduced surface.

#### 4. Analyse

Pour réaliser des réductions difficiles, comme celles de verres fluorés, l'électron solvaté (dans une amine primaire comme la diéthylèneamine) est une alternative aux radicaux anions à potentiel standard très négatif (dans un solvant organique comme le DMF). Les motifs obtenus sont identiques à ceux que l'on obtient avec le radical anion de la tri-paratolyphosphine pour des conditions SECM identiques.

Cependant, la stabilité des solutions d'électrons solvatés dans une amine primaire,  $e_{amine}$ , n'est pas meilleure que celle des radicaux anions et la solution doit être utilisée rapidement. Réaliser ces réductions énergiques dans l'ammoniac liquide, dans lequel les solutions d'électrons solvatés,  $e_{NH_3}$ , sont stables pendant plusieurs heures permettrait de travailler dans de meilleures conditions. Pour obtenir une même largeur de motif, la vitesse de balayage serait plus élevée et, par conséquent, le procédé plus rapide. Néanmoins, faire fonctionner le SECM dans ce milieu (pression normale,  $T < -35^\circ C$ ) pose des problèmes techniques et le laboratoire n'a pas prévu, dans un avenir proche, de travailler sur cette question.

L'article montre l'intérêt des solutions  $e_{NH_3}$ , lorsque la localisation n'est pas nécessaire. Ainsi, la réactivité de ces solutions sur divers supports a été étudiée par XPS et mouillage, ce qui permet de comparer ces supports et de conforter le mécanisme de réduction des supports fluorés, établi par ailleurs. Les propriétés particulières du verre texturé (Saint-Gobain) ont été mises en évidence. Par rapport au verre ayant subi une simple silanisation, la texturation permet d'obtenir une hydrophobie exceptionnelle. C'est ce support qui présente le plus fort contraste de mouillage avant et après réduction et qui sera le plus adapté à l'immobilisation localisée d'entités hydrophiles sur les motifs.

Les analyses XPS, aussi bien sur des plaques entières (réduites par  $e_{NH_3}$ ) que sur des motifs (réduction par  $e_{amine}$  et analyse par microscopie XPS) montrent que le traitement réducteur résulte en la défluoration (environ 70%) et l'oxygénation du support fluoré. Les traitements par  $e_{amine}$  et  $e_{NH_3}$  ont donc la même efficacité, elle est comparable à celle des traitements plasmas. La microscopie ToF-SIMS confirme ces résultats.

Les tests d'immobilisation de cellules biologiques ont été réalisés sur du verre silanisé non texturé, car nous ne disposons pas de suffisamment d'échantillons de verre superhydrophobe. La difficulté d'immobilisation sur un motif de petite taille a bien été mise en évidence



puisque, lorsque la réduction est effectuée par  $e_{\text{NH}_3}$  sur un échantillon centimétrique, les cellules adhèrent sur la zone réduite, sans qu'il soit nécessaire de modifier ultérieurement le motif. Par contre, avec une bande de largeur micrométrique, pour que les cellules adhèrent sur la bande, il est nécessaire d'oxyder énergiquement le motif pour restaurer les OH de surface, puis de faire réagir ceux-ci avec un silane aminé (les fonctions  $\text{NH}_2$  sont recommandées dans la littérature pour favoriser l'adhésion cellulaire) et enfin d'empêcher l'adsorption des cellules sur la partie vierge par un réactif adapté.

Ces fonctionnalisations ultérieures par des silanes aminés ou thiolés ont permis également d'immobiliser des espèces ayant une affinité pour ces fonctions chimiques. Le procédé litographique est général. Il fonctionne sur d'autres supports (Si, ITO) fluorés. Vu la variété des silanes disponibles, les fonctionnalités obtenues sur les motifs après silanisation, couvrent une gamme étendue en chimie organique.

## Références bibliographiques du chapitre 2

---

1. Combellas, C., A. Fuchs, and F. Kanoufi. 2005, Brevet Français N° 05 05704, extension internationale du 06/06/2006.
2. Fuchs, A., *Thèse de doctorat*, in *Electrochimie*. 2006, université Paris VI.

# Chapitre 3 : Fonctionalisation localisée de surfaces de polymères hydrogénés destinées à immobiliser sélectivement des entités biologiques

---

## 1. Introduction

Après avoir commencé à me familiariser avec le milieu biologique grâce à des essais d'adhésion cellulaire sur les verres fluorés, supports bien connus au laboratoire, je me suis intéressée, dans un deuxième temps à l'adhésion cellulaire proprement dite. Notre objectif a été de fabriquer des supports discriminants vis-a-vis de l'adhésion cellulaire, c'est-à-dire sur lesquels coexistent des zones qui favorisent l'adhésion cellulaire et d'autres sur lesquelles, elle est défavorisée. Cette question est classiquement abordée dans un contexte de microfabrication. Le support est généralement le polydiméthylsiloxane (PDMS) sur lequel les canaux sont tracés par photolithographie. Les limitations de ce procédé sont principalement liées à la nécessité d'effectuer la microfabrication en salle blanche.

Nous avons choisi comme support le polystyrène qui est le plus utilisé par les biologistes en raison de sa compatibilité avec les milieux biologiques, sa facilité de mise en œuvre et son faible coût. Le polystyrène est le constituant des boîtes de Petri, qui sont souvent traitées par bombardement par un ion lourd comme  $Ar^+$ , pour favoriser l'adhésion cellulaire. Nous utiliserons des boîtes de Petri non traitées que nous chercherons à modifier localement par SECM. Comme la littérature propose d'oxyder le polystyrène pour augmenter ses propriétés d'adhésion, nous tenterons divers traitements oxydants. Nous appliquerons également le traitement à un autre polymère hydrogéné, le COC, dont l'intérêt pour la microfabrication est souligné dans la littérature. Finalement, les supports lithographiés seront testés vis-a-vis de l'adhésion de protéines et de diverses cellules.

## 2. Article

Article publié en 2010 dans le journal *Langmuir*, volume **26**(22): pages 17348-17356

# Patterning of Polystyrene by Scanning Electrochemical Microscopy

## Biological Applications to Cell Adhesion

*N. Ktari*<sup>†</sup>, *P. Poncet*<sup>†‡</sup>, *H. Sénéchal*<sup>†§</sup>, *L. Malaquin*<sup>||</sup>, *F. Kanoufi*<sup>†⊥</sup>, and *C. Combella*<sup>†⊥\*</sup>

<sup>†</sup> Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques, ESPCI ParisTech, CNRS UMR 7195, 10 rue Vauquelin, Paris, F-75231 France

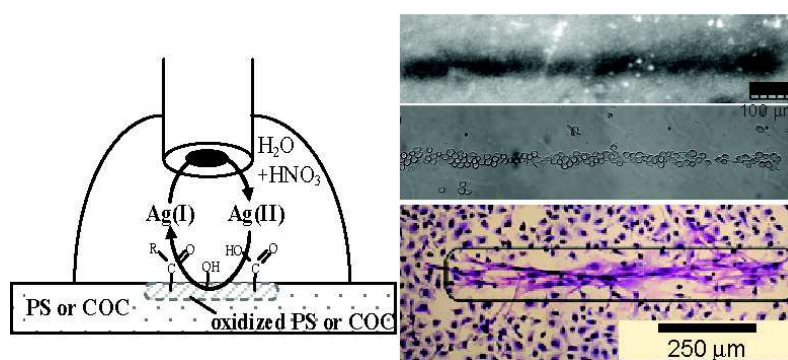
<sup>‡</sup> Pasteur Institute, Department of Infection and Epidemiology, 25-28 rue du Dr Roux, Paris F-75015 France

<sup>§</sup> Inserm, 101 rue de Tolbiac, Paris F-75013 France

<sup>||</sup> Institut Curie, Centre de Recherche, 26 rue d'Ulm, CNRS UMR 168, Paris, F-75248 France

<sup>⊥</sup> CNRS, 10 rue Vauquelin, Paris France

### Abstract



Polystyrene surfaces may be patterned by Ag(II), NO<sub>3</sub><sup>•</sup>, and OH<sup>•</sup> electrogenerated at the tip of a scanning electrochemical microscope. These electrogenerated reagents lead to local surface oxidation of the polymer. The most efficient surface treatment is obtained with Ag(II). The patterns are evidenced by XPS and IR and also by the surface wettability contrast between the hydrophobic virgin surface and the hydrophilic pattern. Such Ag(II) treatment of a polystyrene Petri dish generates discriminative surfaces able to promote or disfavor the adhesion of proteins and also the adhesion and growth of adherent cells. The process is also successfully applied to a cyclo-olefin copolymer and should be suitable to pattern any hydrogenated polymer.

## Introduction

The control of the adhesion of a biological material on a given surface is a key issue to numerous advanced biotechnologies, ranging from the design of prosthetic and antibiofouling materials, biosensors, cellular bioassays for targeted drug delivery or for the understanding of the many biological cellular mechanisms.<sup>1-4</sup> In this respect, different cues have been identified to localize and appropriately tune the interaction of cell-binding ligands with a material surface. This can readily be obtained by engineering the material surface with different topographies<sup>5</sup> or chemical functionalities to promote or limit the cell-adhesion processes.<sup>1</sup> A wide range of materials and model surfaces, with their appropriate surface chemistry and functionalization, have been described in the literature.<sup>6, 7</sup> Different alternatives can be considered regarding surface chemistry according to the finality awaited, whatever the cell processes under study. For example, it is admitted that surfaces terminated with COOH or NH<sub>2</sub> groups usually yield higher cell adhesion than surfaces terminated by CH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, or OH groups.<sup>8</sup> However, this may not be true for all cell types, as hydrophilic and anionic substrates provided the lowest rate of adhesion of macrophages cells.<sup>9</sup>

Focusing the chemical modifications by micropatterning the surface is also relevant to cell biology studies. Besides giving data at high throughput on how cellular responses and behavior of the cells are affected by the chemistry and topography of interfacing surfaces, micropatterned surfaces allowed important biological findings, among others, in the fields of apoptosis,<sup>10</sup> cell–cell organization,<sup>11, 12</sup> and polarization of cell division.<sup>13</sup> This was possible owing to the recent development of cell-based assays<sup>3, 6</sup> or microfluidic bioanalytical platforms,<sup>14, 15</sup> by the development of microfabrication techniques with dedicated surface chemistry or of synthesis of amphiphilic block copolymers with dedicated surface-active branches.<sup>3, 16</sup> Commonly used microfabrication techniques to get patterned biological arrays are based on photolithography or the use of polydimethylsiloxane (PDMS) stamps or stencils via soft lithography such as micro contact printing<sup>17</sup> or stencil patterning.<sup>18</sup> However, such approaches present some limitations: (i) they require clean-room facilities, (ii) they cannot be considered as flexible writing techniques as any layout modification implies to restart the whole fabrication process, (iii) they do not permit to tune locally and quantitatively the extent of surface modification, and (iv) the stamping process is difficult to scale-up.

Several solutions have been proposed to circumvent these limitations. They generally use light or electricity as energy carriers for the chemical activation of surfaces. In this respect, photosensitizers or energetic deep-UV light can be used to photoconvert the surface chemistry of a material.<sup>19</sup> Electrodes can also be used to functionalize materials with original chemistry. Indeed, electrochemistry allows the creation of a great diversity of chemical reactants. It may be nicely used to modify chemical and physical properties of different conductive<sup>20</sup> or insulating<sup>21</sup> surfaces. The transposition of the electrochemical activation of surfaces to surface patterning is made possible by using small electrodes (<50  $\mu\text{m}$  ultramicroelectrodes). A wide variety of microelectrodes have been used with a scanning electrochemical microscope (SECM), including stamps (nanoprobe arrays,<sup>22</sup> bands<sup>23</sup>) or even pens (like the soft-stylus<sup>24</sup> or the fountain pen<sup>25</sup>), to write patterns of chosen chemical functionalities onto a given surface. Then, the SECM microelectrode probe allows to generate a reactive species that is prone to react with the material surface. Different electrochemically induced surface patterning strategies have been proposed using this technique. For example, it was successfully devoted to the local etching<sup>26-29</sup> of polymers and to the local desorption<sup>30-33</sup> or etching<sup>34-41</sup> of self-assembled monolayers surfaces or for the local denaturation of thin protein layers.<sup>42, 43</sup> Such wet-lithography technique is particularly relevant for the fabrication of bioactive surfaces and more particularly for the easy production of cell-adhesion micropatterned surfaces.<sup>30, 34, 40-43</sup>

Among the different types of surfaces for cell-assays, polystyrene (PS) remains the most convenient for biology because of its low cost, its biocompatibility, and its compatibility with usual microscopic techniques. It is then extensively used in cell culture experimentation in the commercially available form of Petri dishes or multiwell plates (PS treated for cell adhesion). A Cyclo Olefin Copolymer substrate (COC) has similar properties but is less frequently used even though it is gaining more and more interest in microfluidic devices.<sup>44, 45</sup> Moreover, these materials are recommended in microfabrication processes of rigid microsystems even though the choice of the appropriate lithographic procedure is still currently under investigation for these materials.<sup>46</sup>

The modification of PS<sup>46-57</sup> and COC<sup>46,58-60</sup> surfaces to enhance their adhesion properties generally consists of their surface oxidation. Efficient PS surface oxidation requires the use of highly energetic sources such as plasma discharges<sup>46-55, 61</sup> or UV irradiation.<sup>55-57</sup> However, generally, the surface hydrophilicity of polystyrene introduced by plasma treatment significantly decays with time after treatment.<sup>53, 61</sup> Plasma treatment was shown to weaken the

polymer backbone by allowing chain scission and thus the formation of low molecular weight fragments, which enable the polymer to recover some hydrophobic character.<sup>62, 63</sup>

Microcontact printing for cell adhesion on PS has been also reported. The stamping process seems difficult to reproduce on pristine PS,<sup>64, 65</sup> but unambiguously it is efficiently performed on oxidized PS surfaces.<sup>65</sup> On COC, UV photopolymerization of acrylic monomers using photomasks is also reported.<sup>66</sup>

As the different surface treatments are based on surface oxidation, we propose to use electrodes to generate sources of oxidants able to induce hydrogenated polymer surface oxidation. We report a versatile, easy, reproducible and low cost method for patterning, at the micrometer scale, PS and COC by the local generation of a highly oxidizing source using scanning electrochemical microscopy (see Figure 1). Three highly oxidizing reagents, Ag(II), NO<sub>3</sub><sup>•</sup>, and OH<sup>•</sup>, are tested as they can be generated at electrodes and are described as efficient reagents for the oxygenation of hydrogenated self-assembled<sup>35, 36</sup> or polymer<sup>21, 67</sup> surfaces. These three oxidants are generated at a microelectrode and their ability to oxidize PS surfaces on micrometric domains is studied. The efficiency of the surface treatment is assigned by local wettability measurements and by Fourier transform infrared reflection absorption spectroscopy (FT-IRRAS) and X-ray photoelectron (XPS) spectroscopies. The potentiality of this electrochemical-based lithographic technique for life science is then illustrated by testing the adhesion of different proteins or cell types on patterned surfaces of PS Petri dishes or selected wells of multiwell PS plates or of a COC material.

## Experimental Section

**Materials:** Silver nitrate (99.5%), nitric acid (70%), potassium dihydrogen phosphate (98%), and potassium chloride (99.5%) were obtained from Prolabo, hydrogen peroxide (35%) and sulfuric acid (95–98%) from Acros, potassium ferrocyanide trihydrate (97%) from Janssen Chimica, sodium hydroxide pellets (97%) from Aldrich, and iron(III) chloride (97%) from Fluka AG. All solutions were made up in high-purity Millipore water of resistivity >18 MΩ cm.

Pluronic F-127 (nonionic copolymer surfactant qualified for use in cell culture application as an antifoaming agent, purity >99.0%) was from Sigma-Biochemicals (St. Louis, MO, U.S.), fibrinogen from human plasma, and Bovine Serum Albumin (BSA) Alexa Fluor 488 conjugate from Invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.). Polystyrene supports were the conventional

35 mm diameter nontreated Petri dishes or 96-well microtitration plates for cell culture (Cloup).

**Electrochemical Procedures:** The saturated calomel electrode (SCE) was used for cyclic voltammetric (CV) investigation; it was dipped into the nitric acid solution and separated from the working medium by a salt bridge containing 3.25 M nitric acid. The CV investigation was performed in a glass electrochemical cell containing 10 mL of a 3.25 M nitric acid solution and silver nitrate.

For SECM procedures, measurements were performed in small volumes (20–30  $\mu\text{L}$ ). Since silver salts may be oxidized in nitric acid, the Ag/AgCl potential reference could not be used. A two-electrode configuration was used instead: a 25  $\mu\text{m}$  diameter UME (the working electrode) and a 100  $\mu\text{m}$  diameter Pt wire. A negative potential shift of about 370 mV was observed between this configuration and a three-electrode one using SCE as reference.

SECM experiments (tip positioning and lithography) were performed on the Petri dish surface with the Pt ultramicroelectrode (UME) tip (ratio of glass to metallic radius,  $R_G \sim 5$ ) moved by a homemade SECM. Parallelism positioning and approach curves were obtained using a 5 mM solution of a redox mediator (ferrocyanide,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ) with 0.1 M KCl in water as reported elsewhere.<sup>39</sup>

For SECM lithography, the UME ( $R_G \sim 5$ ) was positioned at the chosen distance (typically 2.5–13  $\mu\text{m}$ ) from the surface in the presence of ferrocyanide, using the SECM approach curves and then withdrawn 150  $\mu\text{m}$  upward; details for this procedure are given in ref 26. The ferrocyanide solution was then removed, and after water cleaning, the desired electrolytic solution was added. Then, the SECM tip was moved 150  $\mu\text{m}$  downward and biased on the oxidation plateau of the oxidant precursor (Ag(I) or  $\text{HNO}_3$ ); this allowed us to electrogenerate the oxidant. Finally, the surface was patterned by scanning the tip above the substrate at constant height from the PS surface and constant scan rate (from 1 to 20  $\mu\text{m s}^{-1}$ ). Potentials and currents were controlled by a potentiostat (CH600b, IJ Cambria).

**XPS:** XPS spectra were recorded using a Thermo VG Scientific ESCALAB 210 system fitted with a monochromatic Al  $K\alpha$  X-ray source (1486.6 eV). The X-ray beam of 700  $\mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$  size was used at a power of 20 mA  $\times$  15 kV. The spectra were acquired in the constant analyzer energy mode, with a pass energy of 50 and 20 eV for, respectively, the survey and the narrow regions. The Avantage software was used for data processing. Spectral calibration was determined by setting the C1s peak for C–C and C–H at 285 eV.



**FT-IRRAS:** FT-IRRAS spectra were recorded with a JASCO FT/IR-6100 type A spectrometer equipped with a liquid-nitrogen-cooled MCT detector and with a grazing angle reflectance accessory (RAS-PRO410-H) that allows FT-IRRAS measurements with a grazing angle of 85°. Each spectrum results from the accumulation of 500 interferograms with a 4 cm<sup>-1</sup> resolution. The spectrometer is purged with dry and carbon dioxide free air for at least 10 min before recording the spectrum.

**Protein Adsorption:** Patterned PS substrates were incubated at room temperature for either 1.5 h or 2 min in protein solutions containing respectively 250 µg/mL fibrinogen in a pH 7.0 phosphate buffer (0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.1 M NaOH), or 122 µg/mL BSA in PBS (phosphate-buffered saline, 137 mM NaCl, 8.3 mM (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), pH 7.4, Aldrich). The samples were rinsed carefully with Millipore water and dried before further investigation.

**Cell Culture:** Cells were conventionally grown at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in conventional media for cell culture (RPMI or DMEM, Lonza, Belgium) supplemented with penicillin/streptomycin (Gibco), nonessential amino acid (Gibco) and 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) (Biowest).

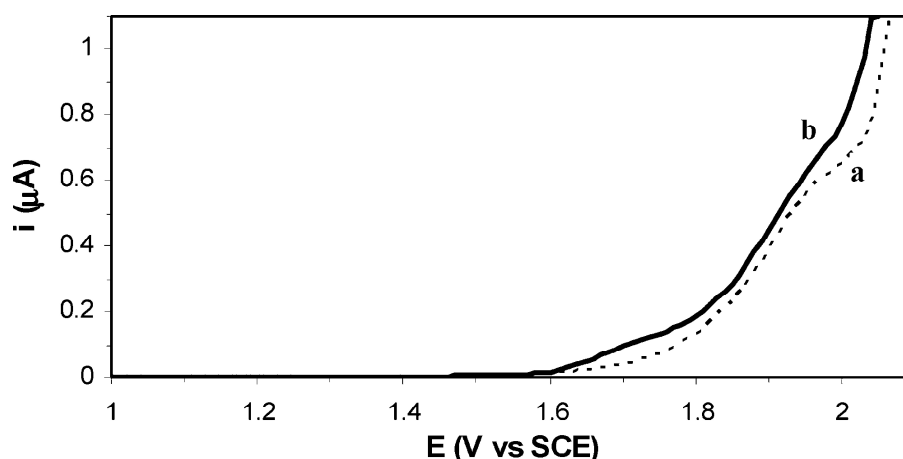
Three adherent cell lines were used: RBL-2H3, a rat basophilic leukemia cell line,<sup>68</sup> MV1.Lu, an epithelial cell line originating from mink's lung<sup>69</sup> and RAW 264.7, a mouse leukemia macrophage cell line.<sup>70</sup> Cells grow in monolayers on classical commercially available tissue culture treated flasks and can be harvested after a brief treatment with trypsin-EDTA (Sigma, St. Louis, MO, U.S.). The adherence of MV1.Lu is stronger than that of RBL. One nonadherent cell line, TAL8.1, a mouse T cell hybridoma,<sup>71</sup> was also assayed.

Mouse primary cells were collected from the peritoneal cavity, spleen, and thymus from two or three 4-week-old C57/Bl6 mice, as described previously.<sup>72, 73</sup> Briefly, peritoneal cells were obtained by injecting into the peritoneal cavity of the mouse 7 mL of RPMI medium supplemented with 2% (v/v) FCS. After a mild massage of the abdomen, the medium containing the cells was recovered. Splenocytes and thymocytes were obtained by gently teasing the collected organs in 3 cm diameter Petri dishes in RPMI containing 2% FCS. All cells were washed twice before use.

## Results and Discussion

### Electrochemistry of the Ag(I)/Ag(II) System in Nitric Acid:

Cyclic voltammetry of silver nitrate in nitric acid solutions was performed between 0.8 and 2.1 V/SCE for  $10^{-2}$  M silver concentration. Figure 1 presents two voltammograms obtained in the absence and presence of silver (respectively curves a and b). In the absence of silver, a single plateau is observed at  $\sim 2$  V/SCE, while an additional plateau at  $\sim 1.72$  V/SCE is observed when silver is present in the solution. These two plateaus may be attributed to the Ag(II)/Ag(I) and  $\text{NO}_3^{\bullet}/\text{NO}_3^-$  systems, in agreement with the literature in which the standard reduction potential of Ag(II)/Ag(I) is reported at 1.67–1.74 V/SCE<sup>67, 74</sup> and that of  $\text{NO}_3^{\bullet}/\text{NO}_3^-$  at potentials  $\geq 2$  V/SCE.<sup>21, 75</sup>

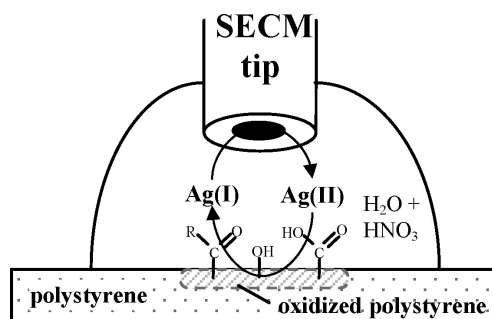


**Figure 1.** Linear voltammetry of a Pt microelectrode (diameter = 25  $\mu\text{m}$ ) in 3.25 M  $\text{HNO}_3$  solution. Potential scan rate =  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ . Lines: (a) without silver; (b)  $[\text{Ag}^+] = 10^{-2} \text{ M}$ .

### Principle of Electrochemical Oxidative Surface Micropatterning:

The principle of the electrochemical wet-lithographic process we propose is schematized in Figure 2. Briefly, a disk UME of radius  $a = 12.5 \mu\text{m}$  is used to generate a micrometric source of a desired oxidant. The UME and a Pt auxiliary-electrode (serving also as a quasi-reference of a 2-electrode system) are held in a 20  $\mu\text{L}$  drop of a 3.25 M  $\text{HNO}_3$  electrolytic solution. To obtain Ag(II), the solution also contains  $10^{-2}$  M  $\text{AgNO}_3$  and Ag(II) is electrogenerated by biasing the UME at 1.35 V vs the Pt auxiliary ( $\sim 1.72$  V vs SCE). The highly reactive radical

species  $\text{NO}_3^\bullet$  is electrogenerated in the 3.25 M  $\text{HNO}_3$  electrolytic solution by applying a potential of 1.6 V vs the Pt auxiliary to the UME.



**Figure 2.** Principle of oxidative patterning of hydrogenated polymers by silver(II) ions electrogenerated at an UME.

Finally, these highly oxidizing species are compared with the hydroxyl radical,  $\text{OH}^\bullet$ , which is produced at a microelectrode from the Fenton reduction of hydrogen peroxide by electrogenerated  $\text{Fe}^{2+}$  (1):



As proposed by Shiku et al.,<sup>36</sup> in a solution of 0.05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  containing 1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 0.1 M  $\text{FeCl}_3$ , the UME held at a reductive potential of 0.0 V vs Ag/AgCl generates a local source of  $\text{Fe}^{2+}$ , which in turns provides a local source of  $\text{HO}^\bullet$  in the vicinity of the UME owing to reaction (1). According to this strategy, an UME was used to generate a source of the highly reactive  $\text{OH}^\bullet$  that was stable enough to diffuse over a few micrometers to locally oxidize silylalkyl chains assembled on a glass surface.<sup>36</sup>

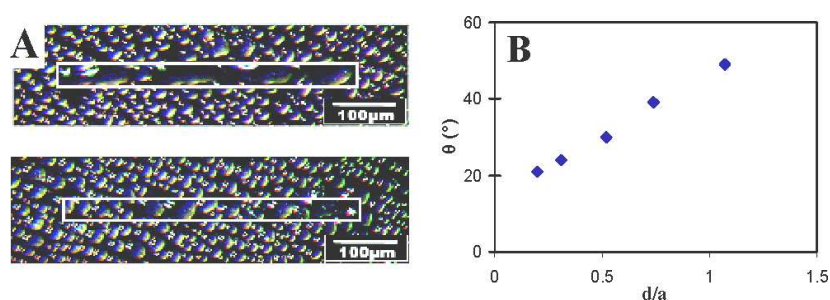
To micropattern PS or COC surfaces, the UME—acting as micrometric source of electrogenerated etchant,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^\bullet$ , or  $\text{OH}^\bullet$ —is brought in the vicinity, typically 2.5–13  $\mu\text{m}$ , of the substrate surface. It is then scanned while generating the etchant over the substrate at this same fixed height and at a constant speed, typically 1–20  $\mu\text{m s}^{-1}$ .

The fastest way to reveal the patterns formed by local surface etching is to detect a wettability contrast. This is evidenced from breath figures (figures of water vapor condensation).<sup>76-78</sup> In a wet atmosphere, condensed water droplets are larger and closer on a hydrophilic surface than on a hydrophobic one. The oxidized zones are then evidenced as they are more hydrophilic than the surrounding hydrophobic polystyrene. Typical condensation figures, such as those presented in Figure 3A, show that water condensation conveniently allows us to estimate the pattern width,  $w$  (10  $\mu\text{m}$  accuracy). Breath figures can also be used to estimate quantitatively the surface energy. The rationalization of condensation dynamics<sup>79</sup> demonstrates that, under

steady-condensation regime, the droplet surface coverage,  $\varepsilon^2$ , varies linearly with the surface contact angle,  $\theta$ : the lower  $\theta$ , the more the surface is wetted and covered by droplets, also, for  $10^\circ < \theta < 90^\circ$ :

$$\theta \approx \frac{(1 - \varepsilon^2) \times 90^\circ}{1 - 0.55} \quad (2)$$

The estimate of the droplet surface coverage,  $\varepsilon^2$  from the breath figure, on the oxidized patterns is used to evaluate the oxidative treatment efficiency. All the selected etchants yield PS oxidation, which results in the formation of hydrophilic patterns surrounded by the hydrophobic PS surface.



**Figure 3.** Patterning by SECM. (A) Water condensation figures on PS surfaces modified by SECM.  $[\text{Ag}^+] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ , tip scan rate  $v = 2 \mu\text{m s}^{-1}$ : (top)  $d = 2.5 \mu\text{m}$ ; (bottom)  $d = 13 \mu\text{m}$ . (b) Mean contact angle estimated from breath figures in (A) as a function of tip-substrate distance.  $v = 2 \mu\text{m s}^{-1}$ .  $[\text{Ag}^+] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

In the absence of silver, when the tip is polarized at 1.35 V vs Pt (oxidation plateau of Ag(I),  $\sim 1.72 \text{ V vs SCE}$ ), no modification is detected on the polystyrene substrate. Conversely, when it is polarized at the  $\text{NO}_3^\bullet/\text{NO}_3^-$  redox system potential, polystyrene is oxidized, leading to a hydrophilic pattern. It demonstrates that the nitrate radical is formed at the UME and that this radical is stable enough to reach the substrate surface and etch it. However, (i) the electrode potential is close to the electrolyte discharge and is therefore difficult to control and (ii) for the same tip scan speed ( $2 \mu\text{m/s}$ ) and tip-substrate height ( $3 \mu\text{m}$ ), the dimension of the pattern is smaller (width  $40 \mu\text{m}$ , Figure SI.3A, Supporting Information) with a  $\text{NO}_3^\bullet$  source than with a  $10 \text{ mM Ag}^{2+}$  source (width  $70 \mu\text{m}$ , Figure SI.3B, Supporting Information). As the etching process is a slow process that develops over a long time period ( $>1\text{s}$ ), the diffusion inside the solution of both etching species is mass-transfer controlled. Also, as a result of the slow etching process, the reactive species expand broadly (like in the SECM negative feedback), resulting in wide patterns (dimension comparable to RG). Smaller patterns are expected for chemically unstable reagents and such surface etching focusing is known as the chemical-lens effect.<sup>80</sup> A smaller pattern is observed with  $\text{NO}_3^\bullet$  as a lesser amount of this etchant reaches

the PS surface. It suggests that  $\text{NO}_3^\bullet$  is less stable than  $\text{Ag}^{2+}$ . It agrees with the reported stability of the  $\text{NO}_3^\bullet$  radical.<sup>81-83</sup> From photolysis studies, the decay of the  $\text{NO}_3^\bullet$  radical is complex and a pseudo-first-order decay rate on the order of  $10^2$  to  $10^3 \text{ s}^{-1}$  has been proposed.<sup>82, 83</sup> The steady-state concentration of the unstable radical at the PS surface (assuming an insulating behavior process at the PS surface) can be obtained from digital simulation (Comsol, see Supporting Information). According to the  $10^2$  to  $10^3 \text{ s}^{-1}$  decay, the average  $\text{NO}_3^\bullet$  concentration at the PS surface facing the SECM tip is 0.16–0.01 M. It is 30–0.1 mM at a radial distance of 20  $\mu\text{m}$  (the edge of the observed 40  $\mu\text{m}$  large pattern). The range of  $\text{NO}_3^\bullet$  concentration estimated numerically within the pattern area is comparable to the etchant concentration provided by the 10 mM  $\text{Ag}^{2+}$  UME source. With the  $\text{NO}_3^\bullet$  source, the UME must be held at a very close distance from the substrate for the most efficient patterning.

Polystyrene was also oxidized locally by the  $\text{OH}^\bullet$  radicals electrogenerated through the electro-Fenton reaction (1). With a scanning tip, local polystyrene surface oxidation occurs in the same way as for silver treatment. However, this reactant is less stable than  $\text{Ag(II)}$  since  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposes as soon as it is added to the  $\text{Fe(III)}$  solution. Such phenomenon is enhanced in the small electrochemical cell volume (some tens of microliters). The current is unstable ( $\sim 10^{-6}$  A) and higher than that used with  $\text{Ag(II)}$  even in the presence of the  $\text{NO}_3^\bullet/\text{NO}_3^-$  system ( $\sim 10^{-7}$  A). Condensation patterns (Figure SI.3C, Supporting Information) are less contrasted, which shows, according to (2), that the  $\text{OH}^\bullet$  oxidation yields a less oxygenated and less hydrophilic pattern. For the same etching time and tip characteristics (RG, tip size and height from the substrate), this qualitative comparison of condensation figures gives a qualitative comparison of the etchant efficiencies and  $\text{OH}^\bullet$  is a less efficient etchant than  $\text{Ag(II)}$  or  $\text{NO}_3^\bullet$ . As for  $\text{NO}_3^\bullet$ , the hydroxyl radical  $\text{OH}^\bullet$  may also be engaged in follow-up reactions:  $\text{OH}^\bullet$  may react with both  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Fe}^{2+}$ , which limit its concentration at the substrate surface. In the case of alkylsilane etching, the steady-state  $\text{OH}^\bullet$  concentration has been estimated to 50 nM.<sup>36</sup> Such low concentration explains the lesser efficiency of the global PS surface oxidation by  $\text{HO}^\bullet$  radicals.

The  $\text{Ag}^{2+}$  reagent is thus the easiest source to handle and yields the most reproducible patterning conditions. Then, in the following, only the patterns obtained with the  $\text{Ag(II)}$  treatment are considered.

Figure 3B represents the oxidized surface contact angle as a function of  $d$ , the separation distance between the electrode and the PS surface. Water condensation figures show that when the electrode is held closer to the PS surface ( $d$  decreases), the surface occupied by

water droplets is larger, the surface is then more hydrophilic, meaning that the oxidation is more efficient. Under optimized patterning conditions, with  $\text{Ag}^{2+}$  sources brought at a  $2.5\ \mu\text{m}$  distance from the PS surface, in the pattern of oxidized PS, the droplets surface occupation is about 0.90. It corresponds to a mean water contact angle of  $21 \pm 4^\circ$  within the pattern while it is  $\sim 81^\circ \pm 2^\circ$  on pristine PS. The PS surfaces etched by  $\text{Ag}^{2+}$  sources are much more hydrophilic than the surfaces obtained from the etching of alkylsilanized glasses by electrogenerated  $\text{OH}^\bullet$  (contact angles  $>40^\circ$ ).<sup>36</sup> It confirms that  $\text{OH}^\bullet$  oxygenates less efficiently hydrogenated surfaces than  $\text{Ag}^{2+}$  or  $\text{NO}_3^\bullet$ .

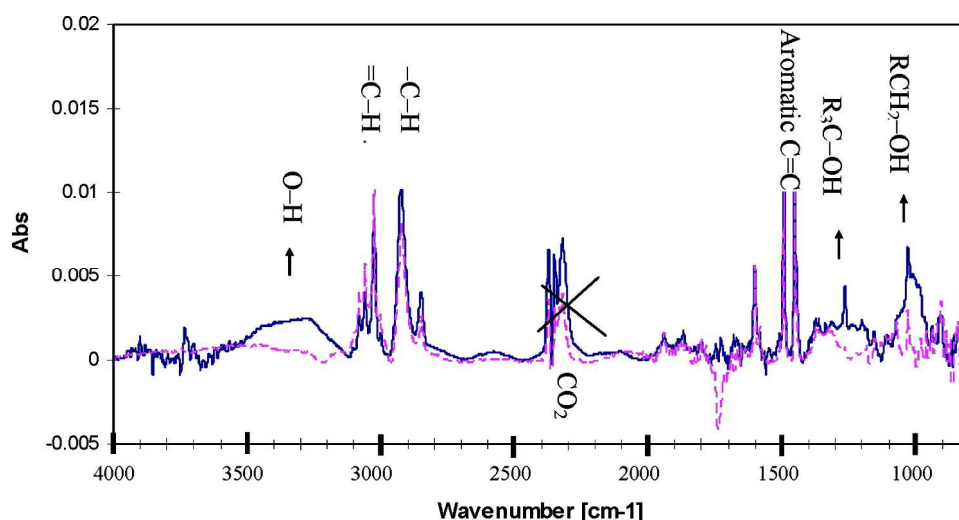
### Spectroscopic Analysis of the Surface Treatment

The oxidative action of electrogenerated  $\text{Ag}^{2+}$  ions for polymer surface treatment was already studied on macroscopic surface areas ( $\text{cm}^2$ ).<sup>67</sup> XPS analysis showed that the maximum amount of oxygen that can be introduced into the PS surface is limited to about 10%, even for prolonged treatment times.

To assess the efficiency of the treatment by electrogenerated sources of  $\text{Ag}^{2+}$  at the local scale, we have patterned  $\text{mm}^2$  PS surfaces with a  $250\ \mu\text{m}$  diameter tip and submitted them to FT-IRRAS and XPS spectroscopic analysis. Indeed, FT-IRRAS is an efficient and easy to operate analytical technique, which allows quantitative chemical inspection of the interaction of surfaces with organic molecules or biomolecules.

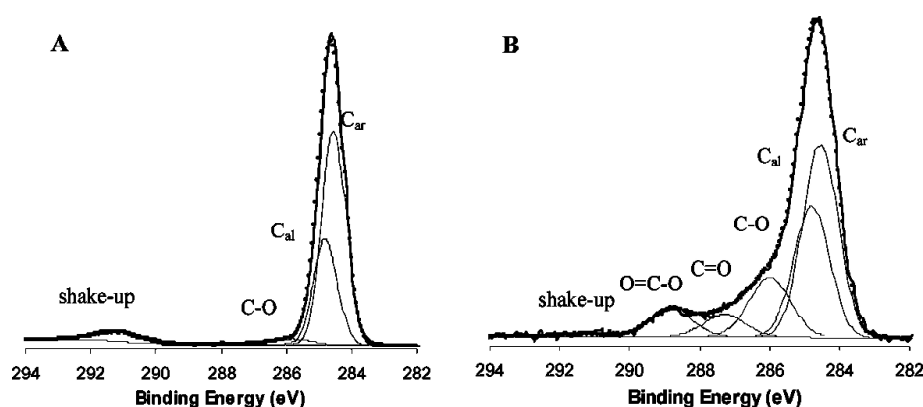
Since the oxidative etching is not expected to penetrate the bulk material but should be confined at the polymer surface, FT-IRRAS analysis requires the use of very thin PS layers. A  $\sim 25\ \text{nm}$  thin PS film was obtained by an already reported procedure based on the controlled growth of a PS chain by atom-transfer radical polymerization (ATRP) from a gold surface.<sup>36</sup><sup>38</sup> A  $2 \times 2.5\ \text{mm}^2$  pattern was then drawn on this substrate by scanning over it a  $250\ \mu\text{m}$  diameter tip generating a source of  $\text{Ag}^{2+}$ .

Figure 4 presents the FT-IRRAS spectra of the Au-PS surface in the patterned and unmodified regions. The  $\text{Ag}^{2+}$  PS surface oxidation results in the decrease of bands between  $2990$  and  $3130\ \text{cm}^{-1}$ , indicating the loss of unsaturated/aromatic C–H bonds. Meanwhile, new features appear at around  $1030$ ,  $1265$ , and  $3400\ \text{cm}^{-1}$  that correspond respectively to the formation of  $\text{RCH}_2\text{--OH}$ ,  $\text{R}_3\text{C--OH}$ , and  $\text{O--H}$ . The band at  $2900\ \text{cm}^{-1}$  increases slightly (aliphatic C–H bonds). From the decrease of unsaturated/aromatic C–H bands, a rough quantitative analysis shows that about  $30(\pm 10)\%$  of the  $25\ \text{nm}$  thick PS layer has been etched.



**Figure 4.** FT-IRRAS spectra of (---) unmodified and (—) patterned PS surfaces.

A thinner (5 nm) PS layer grown on Au by the same ATRP procedure and locally etched by  $\text{Ag}^{2+}$  was submitted to XPS analysis within the patterned or unmodified regions. For pristine PS, Figure 5A shows the deconvolution into the different chemical functionalities contributing to the C1s spectra region. The  $\text{Ag}^{2+}$  surface treatment (Figure 5B) results in the polymer surface oxidation as peaks relative to oxygenated carbons appear at binding energies of 286.0 eV for alcohol or ether groups (C—O), 287.3 eV for aldehyde and ketone groups (C=O) and at 288.8 eV for carboxylic acids (O=C—O). The decrease of aromatic carbons ( $\text{C}_{\text{ar}}$  at 284.5 eV) and the decrease of the shakeup peak at 291.2 eV relative to the  $\pi$ - $\pi^*$  transition in the aromatic rings evidence the chemical transformation of the aromatic ring. These results are consistent with our FT-IRRAS study and with previous XPS findings: attack at the polymer backbone with formation of hydroxyl, carbonyl, and carboxyl groups and attack at the ring with formation of phenol and possibly quinone functions.<sup>21, 53, 55, 61, 84, 85</sup>



**Figure 5.** C1s peaks of the XPS analysis of (A) Au-PS and (B) Au-PS<sub>Ox</sub>. The different chemical functions contributing to the signal are indicated:  $\text{C}_{\text{ar}}$ , aromatic C;  $\text{C}_{\text{al}}$ , aliphatic C. Arbitrary units along the ordinate axis.

However, in plasmas, the mechanism is slightly different.<sup>61, 62</sup> In O<sub>2</sub>, Ar/O<sub>2</sub>, and Ar/N<sub>2</sub> plasmas, incorporation of oxygen and nitrogen functionalities results in chain scission that gives volatile and low molecular weight species. A softer polymer surface is thus produced, which allows the migration of oxygen functionalities<sup>50, 86</sup> and the recovery of the hydrophobicity of the surface over time. The difference between the plasma and electrochemistry mechanisms explains the higher stability of the Ag<sup>2+</sup> PS surface oxidation.

Based on the O/C ratio or on the ratio of oxygenated carbon vs total carbon, the surface oxidation estimated on two different samples is between 10 and 25%. This is higher than (or comparable to) results reported earlier.<sup>21, 53, 55, 61, 84, 85</sup>

High surface oxygenation is due to the choice of films thinner than or comparable to the maximum analysis depth of XPS (emitted electrons mean escape depth of the order of 10 nm). Indeed, angle-resolved XPS measurements at 0 and 30° do not show any significant differences (see the C1s peaks, Figure SI.4, Supporting Information). This confirms that all the 5 nm thick layer has been oxidized. The oxidative treatment is confined to the upper few nanometers of the polymer, in agreement with FT-IRRAS analysis.<sup>53</sup>

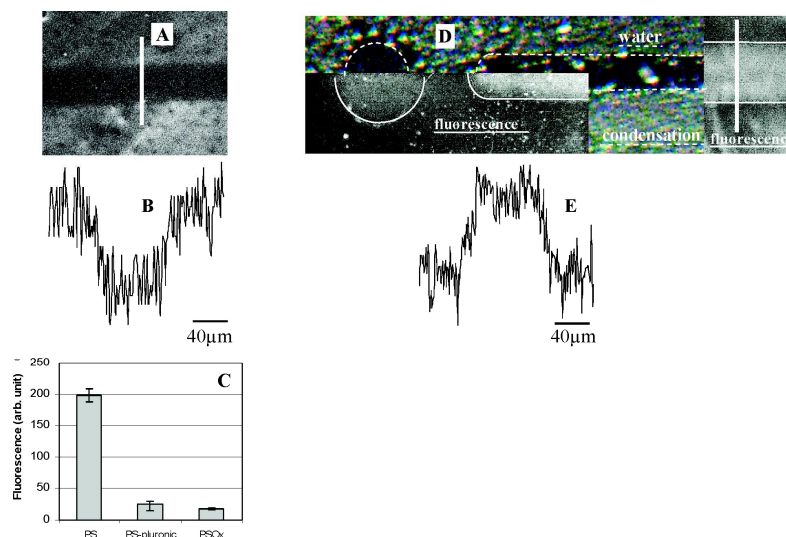
### **Model Protein Adsorption Studies**

The patterned surfaces were tested toward biological material adhesion with different model proteins and biological cells. To corroborate the presence of COOH functions within the pattern, as detected by spectroscopic analysis, and their role on proteins and cells adhesion, we have submitted a patterned surface treated for 1 h with a 0.2% (w/v) pluronic solution to the adsorption of two proteins: BSA and fibrinogen derivatized with fluorescent moieties AlexaFluor. The role of pluronic is to passivate, at least partially, the untreated areas toward protein adsorption.

Parts A and B of Figure 6 show that BSA preferentially binds outside the pattern. Moreover, the amount of adsorbed BSA is much smaller on the pluronic treated PS than on pristine PS (Figure 6C). Conversely, parts D and E of Figure 6 show that fibrinogen preferentially binds to the pattern. These observations show that pluronic covers the untreated PS surface but not the treated region. On one hand, they confirm the poor adhesion of proteins onto the poly(ethylene glycol) chains of the pluronic adsorbed on PS surface. On the other hand, the exclusion of BSA from the pattern is due to the electrostatic repulsion between the surface COOH and BSA. Indeed, according to the 4.7 value for BSA isoelectric point, at pH = 7.4,



both the pattern and BSA are negatively charged. The adsorption of the negatively charged BSA is then preferred on the pluronic covered surface rather than on the negatively charged oxidized PS pattern.



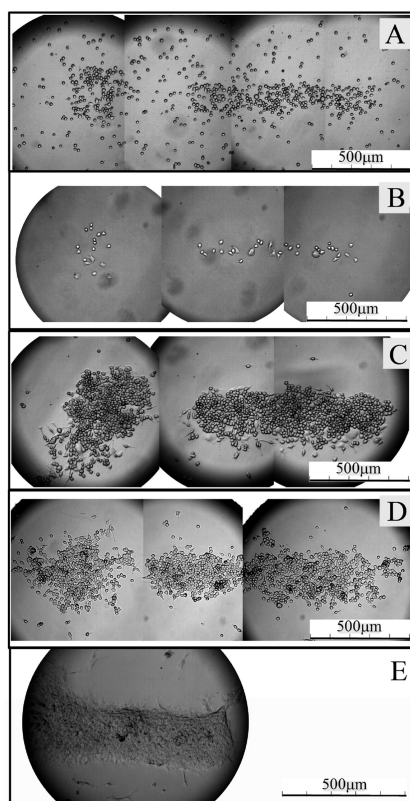
**Figure 6.** Adsorption of (A)–(C) BSA--AlexaFluor-derivatized or (D), (E) fibrinogen-AlexaFluor-derivatized proteins on PS surfaces. (A) Fluorescence image on a patterned PS surface incubated in pluronic solution, then in BSA-AlexaFluor solution. (B) Fluorescence intensity profile along the 200 μm long white line in (A), corresponding condensation width: 50 μm. (C) Fluorescence intensities on PS, PS incubated in pluronic (PS-pluronic) and within an oxidized pattern (PS<sub>Ox</sub>). (D) Fluorescence image on a patterned PS surface incubated in pluronic solution, then in fibrinogen-AlexaFluor solution. The image is superposed on the water condensation figure over the same patterns (spot and line). (E) Fluorescence intensity profile along the white line, parts of which are represented in (D), corresponding condensation width: 65 μm.

Profiles of the relative fluorescence intensity along a line perpendicular to the pattern for both proteins are shown in Figure 6B,E. First, they show that BSA exclusion and fibrinogen adsorption occur within a region 1.4 times wider than the patterns defined from the condensation figure. This demonstrates that the interaction of proteins or water condensation droplets with surfaces respond to different surface chemical composition sensitivity thresholds. Consequently, both characterizations may probe different local chemical structures and thus different local oxidation rates. Moreover, the fluorescence profiles also show that the border of the pattern, measured by the variation of proteins adsorption from its minimal to its maximal value, is not sharp but represents a  $15 \pm 5$  μm diffuse region. This could be explained from the presence of a gradient of chemical functionalities and wettabilities on the PS surface in the periphery of the pattern, which does not define a sharp but rather a diffuse frontier between etched and unetched regions.<sup>39</sup> These micrometric regions of diffuse and contrasted hydrophobicities and chemical structures are expected to yield pluronic coverages and conformations different from those on pristine PS surface.

### Cell Adhesion on Patterned PS and COC Surfaces

To test the properties of the treated areas with regard to cell adhesion, RBL or MV1.Lu cells were seeded at  $10^6$  cells/mL onto a patterned polystyrene plate that was previously sterilized with 70% ethanol and treated, like for protein adsorption studies, with a 0.2% (w/v) solution of pluronic.

As illustrated in Figure 7A–E, RBL and MV1.Lu cells adhere mainly onto the patterns while no adhesion is observed on the untreated regions. A pattern corresponding to a line of  $\sim 900$  or  $500 \mu\text{m}$  length and  $\sim 60 \mu\text{m}$  width was used for RBL or MV1.Lu cells, respectively. Eighteen hours after cell seeding, unadsorbed cells were removed by gently rinsing the plate with the culture medium. As can be seen in Figure 7A, some RBL cells specifically adhere to the patterned area: a discoidal area (left image) corresponding to the pattern is obtained when the tip is positioned and a straight line corresponding to the pattern is obtained when the tip is scanned. The surface covered by the cells was estimated to be  $960 \mu\text{m}$  long and  $175 \mu\text{m}$  wide. On the line, some cells still strongly bind to the treated area despite thorough washes (Figure 7B).



**Figure 7.** Cell adhesion discriminative properties of patterned areas. (A)–(D) For each figure, three or four overlapping microscopical fields (Gx40) are merged. (A) RBL, unwashed plate, day 1 after seeding. (B) Day 1, same as (A) after a thorough wash. (C) RBL, day 30. (D) RBL, day 3 of culture on a plate stored for 50 days under dry conditions. (E) MV1.Lu cells, day 7.

The same result was observed with the adherent MV1.Lu cells (Figure 7E). None of the nonadherent mouse TLA8.1 T cell hybridomas (from lymphocyte origin) bound to the pattern (Table 1).

**Table 1.** Qualitative Assessment of Proteins and Cells Adhesion on Polystyrene and Oxidized Polystyrene<sup>a</sup>

		PS	pluronic treated PS	oxidized PS
BSA	Figure 6A,B	++	-	-
fibrinogen	Figure 6D,E	+	+	++
RBL	Figure 7A-D	++	-	++ <sup>b</sup>
MV1.Lu	Figure 7E	++	-	++
TLA8.1		-	-	-
RAW	Figure 9C	++	+	-
thymocytes		-	-	-
splenocytes	Figure SI.5 (Supporting Information)	±	±	-
peritoneal:				
macrophages	Figure 9A	++	+	-
myofibroblasts	Figure 9B	ND <sup>c</sup>	-	+ (- without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )

a +: adhesion, ++ strong adhesion, - no adhesion.

b Same result on COC.

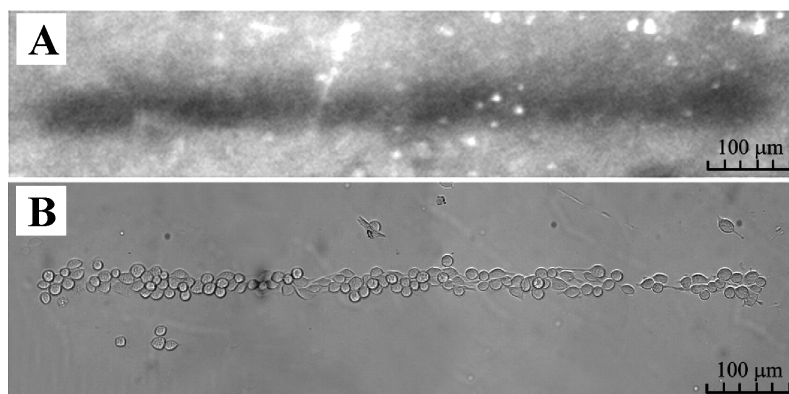
c Not determined.

The patterns obtained through the electro-Fenton reaction are unable to discriminate biological cell adhesion, in agreement with the breath figure inspection, which shows that OH<sup>•</sup> oxidizes less efficiently PS than Ag<sup>2+</sup>.

When the cell monolayer is confluent, RBL cells differentiate and lose adhesion properties to further grow in suspension. The removal of nonadherent RBL cells showed that some cells still adhere to the patterned area for at least 1 month (Figure 7C). When a culture plate was washed until elimination of all cells, reseeded cells still adhere to the patterned area, even after a long period of storage (1 year) under dry conditions (see Figure 7D after 50 days). Since a promoting effect of residual dry secreted extracellular matrix on adhesion of fresh reseeded RBL cells is unlikely, this result suggests that the treatment of PS has been altered neither with storage conditions nor with the previous cell culture. Thus, the patterned plates may be reusable.

Additional experiments were performed on massive and thin films of COC. As for PS, the oxidative Ag<sup>2+</sup> treatment performed by SECM in the same conditions on COC resulted in an

hydrophilic pattern visualized by water condensation (Figure 8A). As well as for PS, RBL cells specifically adhere to the patterned area on COC (Figure 8B). One day after seeding and soft washes, in contrast to PS, the observed width of water condensation area on COC was similar to the width covered by adherent cells.



**Figure 8.** Patterning of COC by SECM,  $[Ag^+] = 5 \times 10^{-3}$  M, tip scan rate  $v = 20 \mu\text{m s}^{-1}$ : (A) water condensation; (B) RBL cells 1 day after seeding.

### Adhesion of Heterogeneous Populations of Cells

Heterogeneous populations of normal primary cells were assayed on 3 cm diameter Petri dishes patterned along a 900  $\mu\text{m}$  long and 60  $\mu\text{m}$  wide band. Thymocytes, splenocytes, and peritoneal cells were seeded at  $2 \times 10^6$  cells/mL in 3 mL of medium containing 10% FCS.

No adhesion to the patterned area was observed with thymocytes and splenocytes, even after several days in culture, suggesting that lymphocytes, the main cellular type of these cell populations, did not bind to the patterned area. Upon May–Grunwald–Giemsa staining, scattered splenocytes, likely to be monocytes/macrophages on a morphological and nucleus : cytoplasm ratio basis, adhered to the whole plate in a very low cell density and no preferential adhesion area was detected (Figure SI.5, Supporting Information).

With regard to peritoneal cells, some macrophage adhesion was also detected on the whole plate (Figure 9A,B), but after 7 days in culture, the high density of adherent macrophages allowed us to observe that these cells were, in contrast to RBL, excluded from the oxidized area (Figure 9A). This zone of exclusion was estimated to be 950  $\mu\text{m}$  long and 160  $\mu\text{m}$  wide. As observed with RBL or MV1.Lu cells, the length is similar to the electrochemically treated zone but the width is larger (here about 3 times) than the measured condensation width. Since the oxidation of the PS surface is probably not uniform but rather corresponds to a gradient from the center of the electrode to the periphery, it is likely that the sensitivity threshold for cell growth is different from the sensitivity threshold for water condensation, it is also higher

than the sensitivity threshold for protein adsorption. The whole set of observations (water condensation, protein adsorption, cell adhesion) gives different analyses of the local surface chemistry and surface specific interactions. A qualitative assessment of protein or cell adhesion on the different surface chemistries studied is given in Table 1.

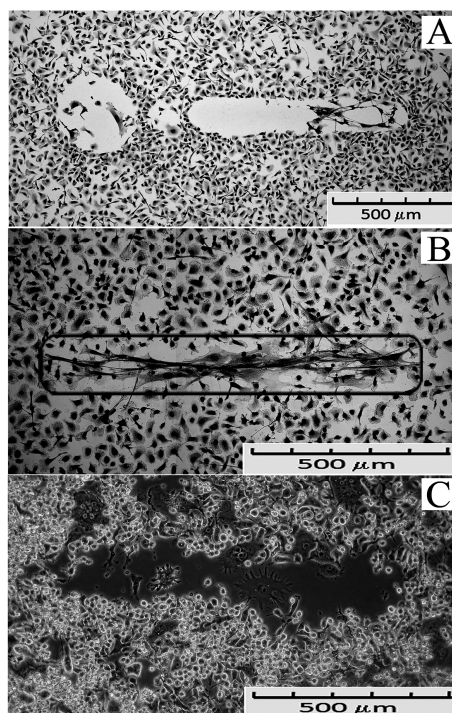


Figure 9. Cell adhesion discriminative properties of patterned areas: (A), (B) mouse peritoneal cells after 7 days in culture on patterned polystyrene plate (two different experiments, May–Grünwald–Giemsa staining); (B) patterned area (rectangle) where only stretchy cells of myofibroblastic type grew; (C) RAW macrophage cell line, day 7.

The exclusion of macrophages from the oxidized area is consistent with the contact angle and the surface chemical analyses (presence of COOH and other hydrophilic oxygenated functionalities). Indeed, macrophages poorly adhere on hydrophilic ( $\theta < 30^\circ$ ) or anionic (such as  $-\text{COO}^-$  terminated) surfaces and show preferential adhesion to slightly hydrophobic (such as polyethylene terephthalate,  $\theta = 48^\circ$  similar to pluronic covered PS) surfaces.<sup>9</sup> Furthermore, the rounded shape of macrophages suggests that the adhesion on pluronic coated PS is lower than on pristine PS where macrophages usually tend to spread. This adhesion is, however, sufficient to allow the precise localization of the patterned area where no adhesion was noted. This feature was also observed with the mouse macrophage cell line RAW 264.7 (Figure 9C), confirming that the adhesion mechanism is not only dependent on the chemical functionality of the surface but also on the surface charge and membrane proteins specific to a given cell

lineage. The spreading of at least two cells in the patterned area reflect the phenotype heterogeneity of the cell line that might be related to activated variant cells.

### **Toward Cell Sorting upon Selective Adhesion**

At day 7 within the same heterogeneous population of peritoneal cells, some cells adhere and grow in the patterned area (Figure 9B). These latter cells morphologically looked like myofibroblastic cells that differentiate and proliferate from rare precursors contained in the peritoneal exudate cells. Rinsing the plate with a medium devoid of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions resulted in the loss of adherence of the myofibroblastic type of cells but had no effect on the adherence of macrophages type of cells, suggesting differences in the mechanism of adherence between these two cell types and demonstrating, for a heterogeneous cell population, the cell-sorting potential of adjacent discriminative areas on the same plate. It has been shown that the modulation of surface chemistry can monitor the proliferation and differentiation of myoblast cells via alteration of the integrin binding with the surface.<sup>85</sup> The observation of COOH functionality within the pattern and the  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  dependent adhesion could indicate an adhesion mechanism implying the interaction of these ions between the patterned surface and the surface receptor of the fibroblastic cells, such as the divalent cation binding-dependent integrins.<sup>51, 87</sup>

### **Conclusion**

Polystyrene and cyclo olefin copolymer surfaces are oxidized locally by scanning electrochemical microscopy. In concentrated nitric acid containing an Ag(I) salt, the tip of a SECM is biased on Ag(I) oxidation plateau to generate micrometric sources of the strongly oxidant  $\text{Ag}^{2+}$  cation. This micrometric source of oxidant is scanned above the substrate surface to pattern it. Patterns are characterized and evidenced by FT-IRRAS and XPS spectroscopies and from the surface wettability contrast between the hydrophobic virgin surface and the more hydrophilic pattern.

Polystyrene can also be oxidized by electrogenerating at the tip either the  $\text{NO}_3^\bullet$  or the  $\text{OH}^\bullet$  radical. The former species requires more constraining experimental conditions, while the latter oxidizes less efficiently the surface. Preliminary experiments reported here in, showed that COC is also a suitable surface for such electrochemical modifications.

This robust, easy, low cost and friendly procedure should be beneficial for the design of permanent and reusable patterned biomaterial surfaces. Owing to the shape and size of the tip

used, we succeeded in patterning individual wells of a 96-well microplate. This generates discriminative surfaces able to promote or disfavor the adhesion and the growth of adherent cells. This property is selective since some adherent cells such as macrophages did not adhere while some others such as myofibroblasts preferentially bound. This process might be of interest for fundamental cellular research to study, for instance, cell to cell interactions as well as for the design of new surfaces and microdevices for biomedical applications.

ACKNOWLEDGMENT XPS spectra were recorded in the Commissariat à l'Energie Atomique (Gif, France) in the "Chimie des Surfaces et Interfaces". J. Charlier and P. Jegou are gratefully acknowledged for the XPS measurements. The "Agence Nationale de la Recherche" is gratefully acknowledged for its financial support via the ANR-06-BLAN-0368 project.

## REFERENCES

- (1) Park, T. H.; Shuler, M. L. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 243.
- (2) Sniadecki, N. J.; Desai, R. A.; Ruiz, S. A.; Chen, C. S. *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, *34*, 59.
- (3) Mrksich, M. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 267.
- (4) Krishnan, S.; Weinman, C.J.; Ober, C.K. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3405.
- (5) Khan, S.; Newaz, G. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *93*, 1209.
- (6) Falconnet, D.; Csucs, G.; Grandin, H. M.; Textor, M. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3044.
- (7) Geissler, M.; Xia, Y. N. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1249.
- (8) Lee, M. H.; Brass, D. A.; Morris, R.; Composto, R. J.; Ducheyne, P. *Biomaterials* **2005** *26* 1721 and references therein
- (9) Brodbeck, W. G.; Patel, J.; Voskerician, G.; Christenson, E.; Shive, M. S.; Nakayama, Y.; Matsuda, T.; Ziats, N. P.; Anderson, J. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10287.
- (10) Chen, C. S.; Mrksich, M.; Huang, S.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E. *Science* **1997**, *276*, 1425.
- (11) Thery, M.; Bornens, M. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 648.
- (12) Thery, M.; Pepin, A.; Dressaire, E.; Chen, Y.; Bornens, M. *Cell Motil. Cytoskeleton* **2006**, *63*, 341.
- (13) Thery, M.; Racine, V.; Pepin, A.; Piel, M.; Chen, Y.; Sibarita, J. B.; Bornens, M. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 947.
- (14) Chiu, D. T.; Jeon, N. L.; Huang, S.; Kane, R.S.; Wargo, C. J.; Choi, I. S.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2408.
- (15) Dauriac, V.; Descroix, S.; Chen, Y.; Peltre, G.; Sénéchal, H. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 2945.
- (16) Weinman, C. J.; Finlay, J. A.; Park, D.; Paik, M. Y.; Krishnan, S.; Sundaram, H. S.; Dimitriou, M.; Sohn, K. E.; Callow, M. E.; Callow, J. A.; Handlin, D. L.; Willis, C. L.; Kramer, E. J.; Ober, C. K. *Langmuir* **2009**, *25*, 12266.
- (17) Whitesides, G. M.; Ostuni, E.; Takayama, S.; Jiang, X.; Ingber, D. E. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2001**, *3*, 335.
- (18) Folch, A.; Jo, B.-H.; Hurtado, O.; Beebe, D. J.; Toner, M. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 346.
- (19) Azioune, A.; Storch, M.; Bornens, M.; Théry, M.; Piel, M. *Lab on Chip* **2009**, *9*, 1640.
- (20) Pinson, J.; Podvorica, F. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 429.
- (21) Brewis, D. M.; Briggs, D.; Dahm, R. H.; Fletcher, I. *Surf. Interface Anal.* **2000**, *29*, 572.
- (22) Deiss, F.; Combellas, C.; Frétygny, C.; Sojic, N.; Kanoufi, F. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5169
- (23) Combellas, C.; Fuchs, A.; Kanoufi, F. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3612
- (24) Cortes-Salazar, F.; Traeuble, M.; Busnel, J.-M.; Gassner, A.-L.; Hojeij, M.; Wittstock, G.; Girault, H. H. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6889
- (25) Cortes-Salazar, F.; Lesch, A.; Momotenko, D.; Busnel, J.-M.; Wittstock, G.; Girault, H. H. *Anal. Methods* **2010**, *2*, 817
- (26) Combellas, C.; Ghilane, J.; Kanoufi, F.; Mazouzi, D. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 6391.
- (27) Combellas, C.; Kanoufi, F.; Nunige, S. *Chem. Mat.* **2007**, *19*, 3830.
- (28) Combellas, C.; Kanoufi, F.; Mazouzi, D.; Thiébault, A. *Polymer* **2003**, *44*, 19.
- (29) Combellas, C.; Kanoufi, F.; Mazouzi, D. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 19260.
- (30) Kaji, H.; Kawashima, T.; Nishizawa, M. *Langmuir* **2006**, *22*, 10784.
- (31) Pust, S. E.; Szunerits, S.; Boukherroub, R.; Wittstock, G. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 75302.
- (32) Wilhelm, T.; Wittstock, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2247.



- (33) Wittstock, G.; Schuhmann, W. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5059.
- (34) Zhao, C.; Witte, I.; Wittstock, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5469.
- (35) Shiku, H.; Takeda, T.; Yamada, H.; Matsue, T.; Uchida, I. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 312.
- (36) Shiku, H.; Uchida, I.; Matsue, T. *Langmuir* **1997**, *13*, 7239.
- (37) Matrab, T.; Hauquier, F.; Combellas, C.; Kanoufi, F. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 670.
- (38) Hauquier, F.; Matrab, T.; Kanoufi, F.; Combellas, C. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 5127.
- (39) Slim, C.; Tran, Y.; Chehimi, M. M.; Garraud, N.; Roger, J. P.; Combellas, C.; Kanoufi, F. *Chem. Mat.* **2008**, *20*, 6677.
- (40) Zhao, C.; Zawisza, I.; Nullmeier, M.; Burchardt, M.; Taeduble, M.; Witte, I.; Wittstock, G. *Langmuir* **2008**, *24*, 7605.
- (41) Zhao, C.; Burchardt, M.; Brinkhoff, T.; Beardsley, C.; Simon, M.; Wittstock, G. *Langmuir* **2010**, *26*, 8641.
- (42) Kaji, H.; Tsukidate, K.; Matsue, T.; Nishizawa, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15026.
- (43) Kaji, H.; Kanada, M.; Oyamatsu, D.; Matsue, T.; Nishizawa, M. *Langmuir* **2004**, *20*, 16.
- (44) Paul, D.; Pallandre, A.; Miserere, S.; Weber, J.; Viovy, J. L. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 1115.
- (45) Nunes, P. S.; Ohlsson, P. D.; Ordeig, O.; Kutter, J. P. *Microfluid Nanofluid*, DOI 10.1007/s10404-010-0605-4.
- (46) Beaulieu, I.; Geissler, M.; Mauzeroll, J. *Langmuir* **2009**, *25*, 7169.
- (47) Detrait, E.; Lhoest, J. B.; Knoop, B.; Bertrand, P.; de Aguilar, P. V. D. *J. Neurosci Methods* **1998**, *84*, 193.
- (48) Dewez, J. L.; Lhoest, J. B.; Detrait, E.; Berger, E.; Dupont-Gillain, C. C.; Vincent, L. M.; Schneider, Y. J.; Bertrand, P.; Rouxhet, P. G. *Biomaterials* **1998**, *19*, 1441.
- (49) Cheng, Q.; Li, S.; Komvopoulos, K. *Biomaterials* **2009**, *30*, 4203.
- (50) Dupont-Gillain, Ch. C.; Adriaensen, Y.; Derclaye, S.; Rouxhet, P. G. *Langmuir* **2000**, *16*, 8194.
- (51) Dewez, J. L.; Doren, A.; Schneider, Y. J.; Rouxhet, P. G. *Biomaterials* **1999**, *20*, 547-59.
- (52) Nakh Wong, R.; Sriksirin, T.; Osotchan, T. *Smart Mat.* **2008**, *55-57*, 753.
- (53) Vandencastele, N.; Reniers, F. J. *Electron Spectroscopy and Rel. Phenomena* **2010**, *178*, 394.
- (54) Grace, J. M.; Gerenser, L. J. *J. Dispersion Sci. Technol.* **2003**, *24*, 305.
- (55) Zhang, D.; Dougal, S. M.; Yeganeh, M. S. *Langmuir* **2000**, *16*, 4528.
- (56) Montero-Pancera, S.; Trouillet, V.; Petershans, A.; Fichtner, D.; Lyapin, A.; Bruns, M.; Schimmel, T.; Wedlich, D.; Reichlmaier, S.; Weidler, P. G.; Gliemann, H. *Langmuir* **2010**, *26*, 2050.
- (57) Pfleging, W.; Torge, M.; Bruns, M.; Trouillet, V.; Welle, A.; Wilson, S. *Appl Surf Sci* **2009**, *255*, 5453.
- (58) Dudek, M. M.; Gandhiraman, R. P.; Volcke, C.; Cafolla, A. A.; Daniels, S.; Killard, A. J. *Langmuir* **2009**, *25*, 11155.
- (59) Sohn, Y.-S.; Kai, J.; Ahn, C. H. *Sensor Let.* **2004**, *2*, 171.
- (60) Niles, W. D.; Coassin, P. J. *Assay and Drug Develop. Tech.* **2008**, *6*, 577.
- (61) Lock, E. H.; Petrovykh, D. Y.; Mack, P.; Carney, T.; White, R. G.; Walton, S. G.; Fernsler, R. F. *Langmuir* **2010**, *26*, 8857.
- (62) Hopkins, J.; Wheale, S. H.; Badyal, J. P. S. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 14062.
- (63) Murakami, T.; Kuroda, S.; Osawa, Z. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *200*, 192.
- (64) Bernard, A.; Delamarche, E.; Schmid, H.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Biebuyck, H. *Langmuir* **1998**, *14*, 2225.
- (65) Fin, J.; Thery, M.; Azioune, A.; Dupont, R.; Chatelain, F.; Bornens, M.; Piel, M. *Lab on Chip* **2007**, *7*, 672.

- (66) Pu, Q.; Oyesanya, O.; Thompson, B.; Liu, S.; Alvarez, J. C. *Langmuir* **2007**, *23*, 1577.
- (67) Brewis, D. M.; Dahm, R. H. *Int. J. Adhesion and Adhesives*. **2001**, *21*, 397.
- (68) Eccleston, E.; Leonard, B. J. *Nat New Biol* **1973**, *244*, 73.
- (69) Henderson, I. C.; Lieber, M. M. *Virology* **1974**, *60*, 282.
- (70) Ralph P.; Nakoinz, I. *J. Immunol.* **1977**, *119*, 950.
- (71) Blank, U.; Boitel, B.; Mege, D.; Ermonval, M.; Acuto, O. *Eur. J. Immunol.* **1993**, *23*, 3057.
- (72) Poncet, P.; Huetz, F.; Marcos, M. A.; Andrade, L. *Eur. J. Immunol.* **1990**, *20*, 1583.
- (73) Tkaczyk, C.; Frandji, P.; Botros, H. G.; Poncet, P.; Lapeyre, J.; Peronet, R.; David, B.; Mecheri, S. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 1720.
- (74) J. Bringmann, K. Ebert, U. Galla, H. Schmieder, *J Appl Electrochem* **1995**, *25*, 846.
- (75) R. Tomat and A. Rigo. *J Appl Electrochem* **1986**, *16*, 8.
- (76) Beysens, D.; Knobler, C.M. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *57*, 1433.
- (77) Briscoe, B. J.; Galvin, K. P. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1990**, *23*, 422.
- (78) López, G. P.; Biebuyck, H. A.; Frisbie, C. D.; Whitesides, G. M. *Science* **1993**, *260*, 647.
- (79) Zhao, H; Beysens, D. *Langmuir* **1995**, *11*, 627.
- (80) Radtke, V.; Hess, C.; Heinze, J. *Electrochim. Acta* **2009**, *55*, 416.
- (81) Katsumaru, Y.; Jiang, P.Y.; Nagaiishi, R.; Oishi, R.; Ishigure, K.; Yoshida, Y. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4435.
- (82) Glass, R. W.; Martin, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5084.
- (83) Wine, P.H.; Mauldin, R.L.; Thorn, R. P. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 1156.
- (84) Riepl, M.; Östblom, M.; Lundström, I.; Svensson, S. C. T.; van der Gon, A. W. D.; Schäferling, M.; Liedberg, B. *Langmuir* **2005**, *21*, 1042.
- (85) Lan, M. A.; Gersbach, C. A.; Michael, K. E.; Keselowsky, B. G.; Garcia, A. J. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4523.
- (86) Paynter, R.W. *Surface and Interface Analysis* **1999**, *27*, 103.
- (87) Loftus, J. C.; Smith, J. W.; Ginsberg, M. H. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25235.

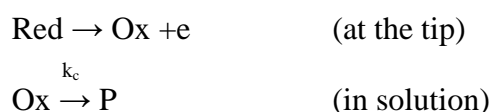
### 3. Supporting Information

#### FEMLAB Simulation

The steady-state profiles of dimensionless concentrations of a species, generated at a microelectrode, and computed at the surface of an insulating substrate were deduced from the resolution of the diffusion equations by the finite elements method (FEMLAB® version 3.1, COMSOL France, Grenoble, France). The simulations were carried out on axisymmetric electrodes and the resulting problem was computed under 2D-axisymmetric geometry. In dimensionless form, the electrode has a radius unity ( $a = 1$ ) and  $RG = 5$  is chosen as the dimensionless radius of the insulating part of the electrode, the substrate is held at the dimensionless distance  $L = 0.2$ . The far-field boundaries are taken as  $R_s = 200$  and  $-Z_s = 200$ .

The simulation consists of the numerical solution of the diffusion equations coupled to chemical reaction of the electrogenerated species under the appropriate boundary conditions.

In a typical case, Red is transformed into Ox at the SECM tip and Ox is engaged in an irreversible first-order reaction to generate an electro-inactive product P at a rate  $k_c$ .



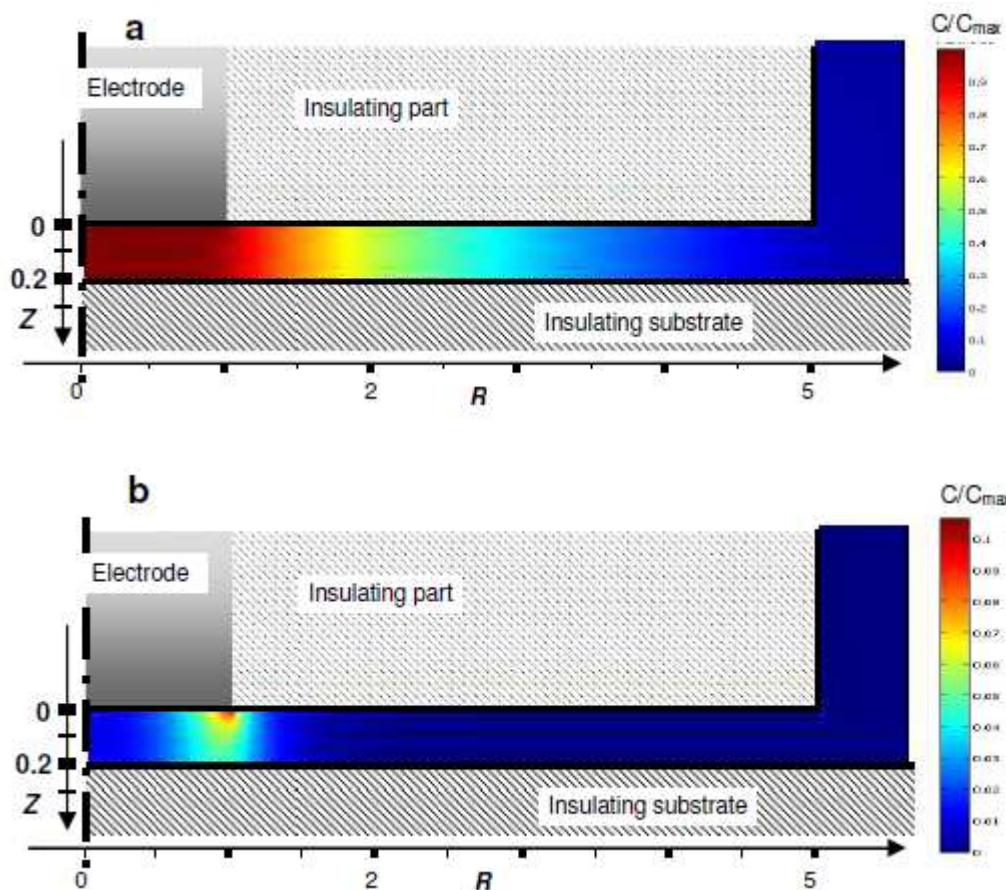
The concentration distribution of Red, Ox and P are related from mass conservation and considering only two components for the simulation of the concentration distribution is selfconsistent.

For more details concerning the boundary conditions and the formulation of the problem, the theoretical development of such situation has been already described.<sup>1</sup>

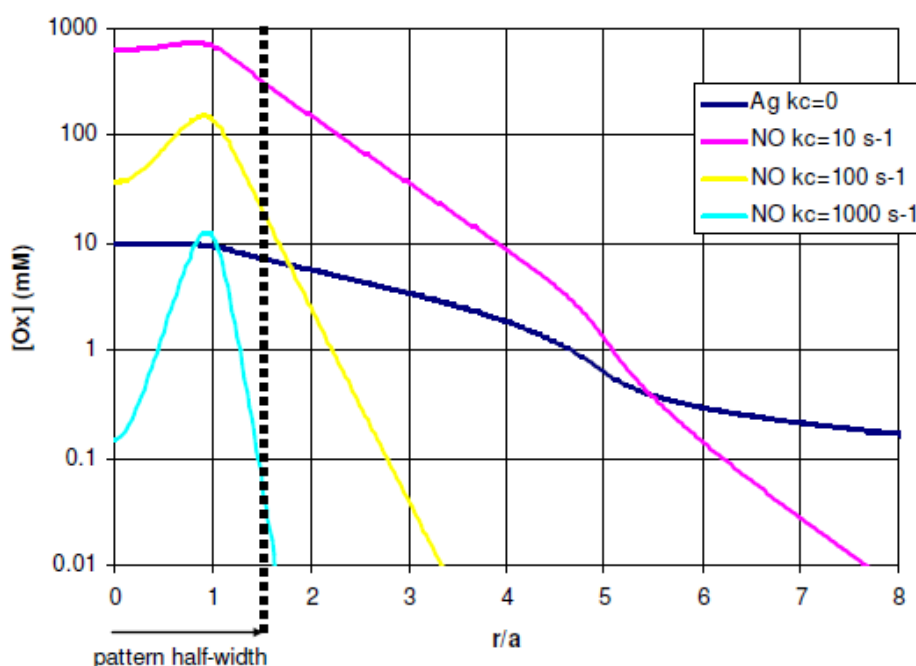
Fig SI.1a and SI.1b present the dimensionless concentration profiles between the tip and the substrate for Ox with decay rate  $k_c = 0$  and  $100 \text{ s}^{-1}$  respectively. Fig SI.2 shows the concentration of different oxidants at the substrate surface as a function of the radial distance from the tip center. For  $\text{Ox} = \text{Ag}^{2+}$ , a value of  $k_c = 0 \text{ s}^{-1}$  with a limiting concentration  $C_{\text{max}}$  of 10 mM were used while 3 values of  $k_c$  were assayed for  $\text{Ox} = \text{NO}_3^*$  ( $k_c = 10, 10^2$  and  $10^3 \text{ s}^{-1}$ ) with a limiting concentration  $C_{\text{max}} = 3.25 \text{ M}$ .

---

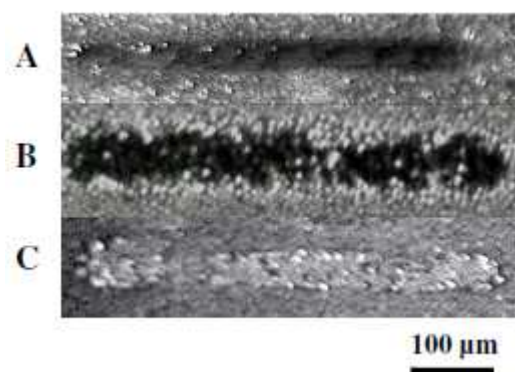
<sup>1</sup> a) Unwin, P. R.; Bard, A. J.; *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 7814. b) Kanoufi, F.; Cannes, C.; Zu, Y.; Bard, A. J. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8951.



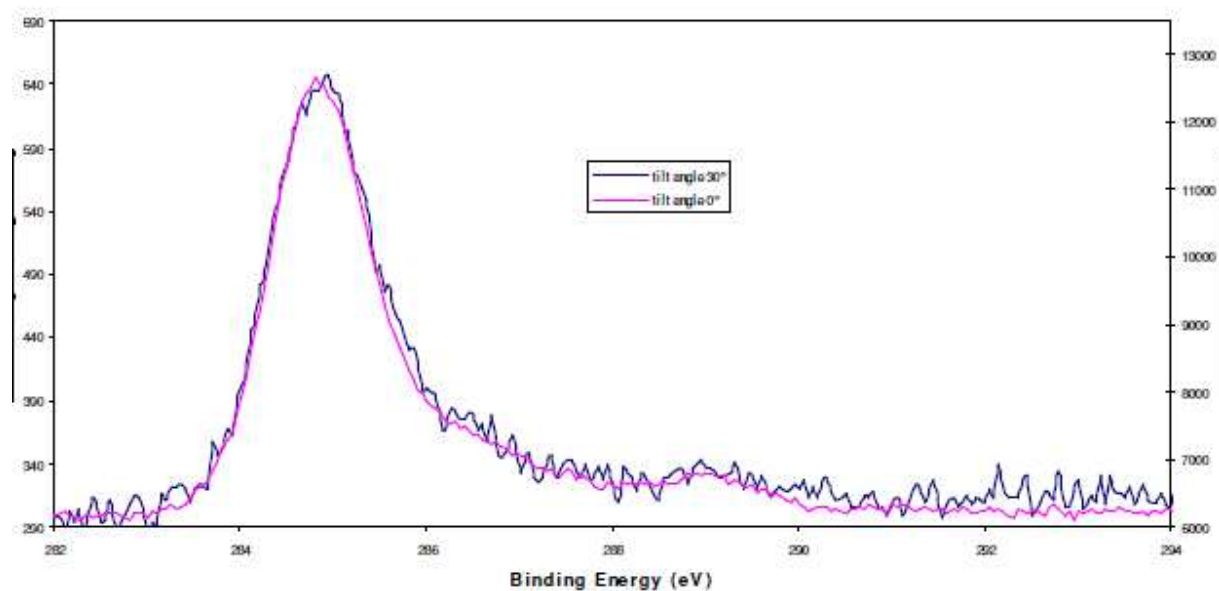
**Figure SI.1.** Concentration distribution of (a) stable or (b) unstable ( $k_c = 100 \text{ s}^{-1}$ ) electrogenerated etchants between the SECM tip and the etched substrate considered as an insulating substrate.



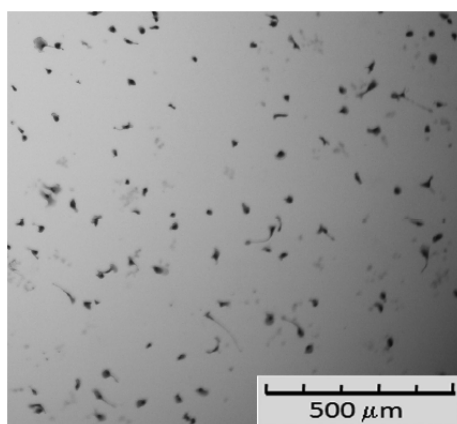
**Figure SI.2.** Concentration profiles of  $\text{Ag}^{2+}$  or  $\text{NO}_3^\bullet$  oxidants with different chemical stabilities along the radial axis at the substrate surface. Comparison with the pattern halfwidth formed with electrogenerated  $\text{NO}_3^\bullet$ .



**Figure SI.3.** Water condensation figures on PS surfaces modified by SECM. Tip scan rate :  $2 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $d \sim 3 \mu\text{m}$ . Electrogenerated reagents: **A:**  $\text{NO}_3^\bullet$ , **B:**  $\text{Ag}^{2+}$ , and **C:**  $\text{OH}^\bullet$ .



**Figure SI.4.** Angle-resolved XPS analysis of a PS oxidized surface. High resolution C1s peak. pink:  $0^\circ$ , blue:  $30^\circ$ .



**Figure SI.5.** Mouse spleen cells after 7 days in culture on patterned PS Petri dish. May Grünwald Giemsa staining

#### 4. Analyse

L'article précédent est dévolu aux applications biologiques de l'oxydation localisée du polystyrène par SECM. Ce procédé électrochimique a fait l'objet d'une étude détaillée qui n'est pas reportée dans l'article. Elle sera décrite dans le chapitre suivant.

L'article montre que l'on peut générer divers cations ( $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{NO}_3^\bullet$ ) à la pointe du SECM, de façon à oxyder localement le polystyrène ou le COC. Les meilleurs résultats sont obtenus avec  $\text{Ag}^{2+}$ . Par balayage de la pointe au-dessus de la surface, on obtient des motifs oxydés qui ont été caractérisés par des méthodes physiques (XPS, FTIRRAS et mouillage). Le traitement oxydant a pour effet de générer des fonctions oxygénées, ce qui augmente l'hydrophilie de la surface. Ces supports à motifs sont capables de discriminer l'adhésion de protéines ou de cellules. Nous avons montré qu'ils étaient robustes et qu'un an après fabrication, ils avaient conservé leurs propriétés ; en outre, ils sont réutilisables.

Notre travail est préliminaire, quelques hypothèses ont été formulées pour comprendre les raisons de l'adhésion de certaines cellules que nous avons testées. Néanmoins, nos connaissances en biologie sont très limitées et pour aller plus loin, il nous semble que le sujet devrait être pris en main par des biologistes. Comprendre les relations entre structure cellulaire et adhésion sur divers supports est certainement trop ambitieux, vu la complexité des objets biologiques. Un programme plus raisonnable pourrait être de s'attaquer à une problématique biologique réelle, comme par exemple la transmission de signaux cellulaires sur des motifs simples (propagation de mort cellulaire...), la croissance contrôlée de cellules sur des motifs (neurones sur des lignes à partir de points d'ancrage...). L'intérêt de notre procédé est de pouvoir s'appliquer à tout type de support, pourvu qu'il ait des propriétés redox.

# Chapitre 4 : Oxydation localisée du polystyrène par microscopie électrochimique

---

## 1. Introduction

Dans le cas des verres fluorés comme du polystyrène, nous nous sommes d'abord focalisés sur le tracé de motifs par microscopie électrochimique, comme cela avait déjà été pratiqué au laboratoire, par exemple dans le cas du PTFE. Ensuite, nous avons essayé de post-fonctionnaliser les motifs pour y immobiliser des entités chimiques ou biologiques. C'est l'objet des deux chapitres précédents.

Finally, une approche électrochimique du mécanisme de réduction des verres fluorés ou d'oxydation du polystyrène a été abordée. Sur verre fluoré, je n'ai pas été associée à ce travail, qui avait débuté avant mon arrivée au laboratoire. Par contre, je me suis investie dans la compréhension des étapes qui interviennent dans la cinétique d'oxydation du polystyrène, afin de proposer un mécanisme plausible au vu des données expérimentales. Pour cela, nous avons principalement essayé de tirer parti des courbes d'approche par SECM d'une surface de polystyrène en utilisant des modèles décrits dans la littérature. Ces travaux font l'objet d'un article en cours de rédaction dont nous reproduisons ci-dessous la version du 20 Mars 2011. Cet article présente également une étude des paramètres expérimentaux qui conditionnent la taille des motifs obtenus par oxydation SECM sur polystyrène.

## 2. Article

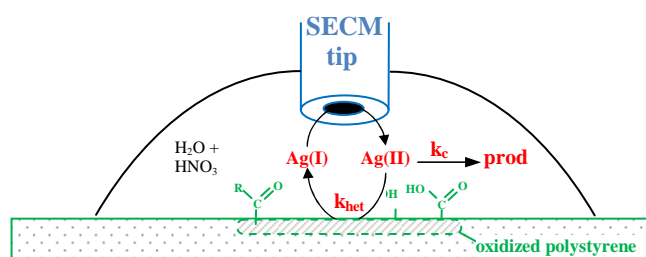
Article prochainement soumis dans *The Journal of Physical Chemistry C*.

# Local Oxidation of Polystyrene by Scanning Electrochemical Microscopy

N. Ktari, C. Combellas, F. Kanoufi\*

*Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques, ESPCI ParisTech, CNRS UMR 7195, 10 rue Vauquelin, Paris, F-75231 (France)*

## Abstract



Polystyrene (PS) surfaces are modified locally by an electrochemically generated oxidant such as Ag(II) in concentrated nitric acid. The oxidant is generated at the probe of a Scanning Electrochemical Microscope (SECM), which allows to investigate the kinetic of the etching by the SECM. The etching kinetics is deduced from approach curves and transient current-time response with the probe held in the vicinity of i) massive PS or ii) thin PS films obtained by controlled radical polymerization (atom-transfer radical polymerization, ATRP) on a gold surface. It is interpreted by combining the homogeneous chemical instability of Ag(II) with finite heterogeneous kinetics at the substrate. The polystyrene oxidation is established by a limited number of active sites and the effective rate constant corresponds to the permeation of the mediator within the oxidized polystyrene structure. With ATRP grown PS brushes, the completion of the PS etching is manifested by direct electron transfer to the Au surface. The kinetic study is then used to interpret the extent of PS patterning surface as a function of the silver concentration, the ultramicroelectrode scanning rate and the tip/substrate distance.



## Introduction

The treatment of polymer surfaces to increase their adhesion properties has been studied since the fifties.<sup>1</sup> Different methods are proposed in the literature, such as Corona discharge,<sup>2,3</sup> plasma treatment,<sup>4-7</sup> and different electrochemical treatments that proceed by reduction, or oxidation.<sup>8-11</sup> Regarding the oxidation frame, different authors have compared the oxidation of organic compounds by various metal salts such as Co(II), Mn(III), Ce(IV), Th(III) and Ag(II).<sup>12</sup> Ag(II) in an acidic medium was shown to be the strongest reagent to degrade such compounds.<sup>13,14</sup> The interest of  $\text{NO}_3^\bullet$  was also evidenced.<sup>15</sup>

A convenient way to synthesize Ag(II) proceeds by the electrochemical oxidation of silver nitrate in dilute nitric acid. Nitric acid is especially interesting because of its poorly complexing properties, that enable to keep the high oxidative power of Ag(II).<sup>16</sup> Ag(II) oxidizes partially the polymer surface, which results in an enhancement of the adhesion properties of various polymers such as polypropylene, polyvinylfluoride, polyvinylchloride, styrene-butadiene-styrene block copolymers, fully-formulated vulcanized rubber and also polystyrene (PS).<sup>16,17</sup> In the latter case, ToF-SIMS and XPS analyses demonstrate that the polymer oxidation may be achieved on the polymer backbone, which introduces hydroxyl, carbonyl and carboxylic functions or on the aromatic rings, which results in phenols or quinones functions.

In a recent paper, we have shown that PS surfaces may be oxidized locally by scanning electrochemical microscopy (SECM).<sup>18</sup> Indeed, this technique allows to pattern different surfaces, using a wide variety of microelectrodes.<sup>19-22</sup> It consists of generating a reactive species at the tip that is prone to react with the material surface. For PS, the patterning was performed in concentrated nitric acid containing an Ag(I) salt and the tip of the SECM was biased on the Ag(I) oxidation plateau to generate the local micrometric source of Ag(II). This micrometric source of oxidant was scanned above the substrate surface to pattern it. PS could also be oxidized by electrogenerating at the tip either the  $\text{NO}_3^\bullet$  or the  $\text{OH}^\bullet$  radical.<sup>18,23</sup> We have shown that the former species requires more constraining experimental conditions, while the latter oxidizes less efficiently the surface. XPS and FT-IRRAS showed that the oxidative treatment is confined to the upper few nm of the polymer and represents 10-25% of surface oxygenation.

Here, we will investigate the mechanism for the oxidation of PS by electrogenerated Ag(II) by SECM and we will study the patterns as a function of the different electrochemical parameters.

## Experimental Section

**Materials.** Silver nitrate (99.5%), nitric acid (70%), potassium dihydrogen phosphate (98%) and potassium chloride (99.5%) were obtained from Prolabo, hydrogen peroxide (35%) and sulfuric acid (95-98%) from Acros, potassium ferrocyanide trihydrate (97%) from Janssen Chimica, sodium hydroxide pellets (97%) from Aldrich and iron (III) chloride (97%) from Fluka AG. All solutions were made up in high-purity Millipore water of resistivity >18 MΩ cm.

Polystyrene supports were the conventional 35 mm diameter non-treated Petri dishes. Gold wafers covered by a thin 5 or 25 nm layer of PS were obtained in two steps: i) the electrografting of  $^+N_2-C_6H_4-CH(CH_3)-Br$  onto the gold surface followed by ii) the surface-initiated ATRP of styrene.

**Electrografting of gold wafers.** The synthesis of the starting diazonium salt,  $^+N_2-C_6H_4-CH(CH_3)-Br$  (**1**), was previously described.<sup>24</sup> Gold plaques were 1-2 cm<sup>2</sup> pieces of a 4 inch diameter x 500 μm thickness silicon wafer coated by a 1000 Å gold layer (Aldrich).

Electrochemical grafting of the diazonium salt onto the surface was achieved by chronoamperometry for 300 s, at a potential 300 mV more negative than the diazonium salt peak potential (measured on carbon). At this potential, the gold surface should not be covered by an oxide layer. The gold wafers were then thoroughly rinsed under sonication in deaerated acetone.

**Surface-initiated ATRP of styrene.** CuBr (390 mg, 2.7 mmol) and a piece of the initiator grafted gold or silicon wafer were placed into a 100 mL Schlenk flask equipped with a magnetic stirring bar and sealed with a rubber septum and deoxygenated by a nitrogen flow. 2,2'-dipyridyl (1.17 g, 7.5 mmol) was placed into the two-neck round-bottom flask, and the flask was evacuated and backfilled with nitrogen. To this flask, 10 mL of toluene was added and this solution was stirred for 20 min under nitrogen. The resulting solution was transferred through a cannula to the Schlenk flask. In a second two-neck round-bottom flask, styrene (24

mL, 210 mmol) was deoxygenated by a nitrogen flow. The monomer solution was transferred through a cannula, and the flask was held at 110 °C. After several hours, the substrate was removed from the flask, washed with dichloromethane, and sonicated in toluene and dichloromethane.

**Electrochemical procedures.** The saturated calomel electrode (SCE) was used for cyclic voltammetric (CV) investigation; it was dipped into the nitric acid solution and separated from the working medium by a salt bridge containing a 3.25 M nitric acid. The CV investigation was performed in a glass electrochemical cell containing 10 mL of a 3.25 M silver nitrate solution in nitric acid.

For SECM procedures, measurements were performed in small volumes (20 - 30  $\mu\text{L}$ ). Since silver salts may be oxidized in nitric acid, the Ag/AgCl potential reference could not be used. A two-electrode configuration was used instead: a 25  $\mu\text{m}$  diameter ultramicroelectrode (working electrode) and a 100  $\mu\text{m}$  diameter Pt wire. A negative potential shift of about 370 mV was observed between this configuration and a three-electrode one using SCE as reference.

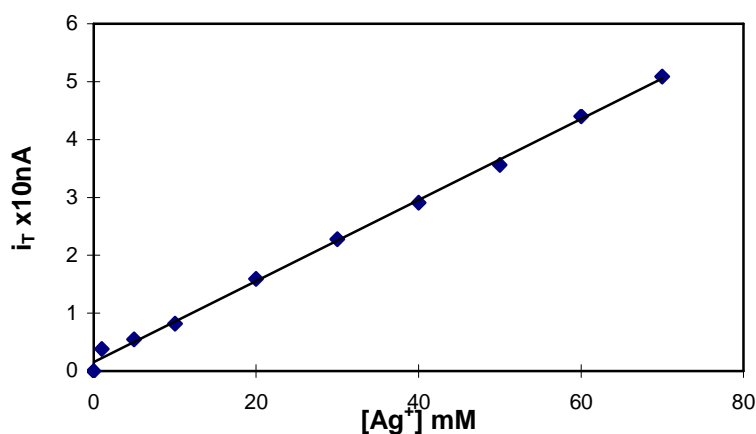
SECM experiments (approach curves, tip positioning and lithography) were performed on glass slides or PS surfaces (Petri dishes for massive PS, or thin PS layers grown by ATRP from gold coated Si wafers) with the Pt ultramicroelectrode (UME) tip (ratio of glass to metallic radius,  $RG \sim 5$ ) moved by a home-made SECM. Parallelism positioning and approach curves were obtained using a  $5 \times 10^{-3} \text{M}$  solution of a redox mediator (ferrocyanide,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ) with 0.1 M KCl in water as reported elsewhere.<sup>25</sup>

For SECM lithography, the UME ( $RG \sim 5$ ) was positioned at the chosen distance (typically 2.5-13  $\mu\text{m}$ ) from the surface in the presence of ferrocyanide, using the SECM approach curves and then withdrawn 150  $\mu\text{m}$  upwards; details for this procedure are given in reference<sup>26</sup>. The ferrocyanide solution was then removed and after water cleaning, the desired electrolytic solution was added. Then, the SECM tip was moved 150  $\mu\text{m}$  downwards and biased on the oxidation plateau of the oxidant precursor (Ag(I) or  $\text{HNO}_3$ ); this allowed to electrogenerate the oxidant. Finally, the surface was patterned by scanning the tip above the substrate at constant height from the PS surface and constant scan rate (from 1 to 20  $\mu\text{m s}^{-1}$ ). Potentials and currents were controlled by a potentiostat (CH600b, IJ Cambria).

## Results and Discussion

### Mechanistic investigation of PS oxidation.

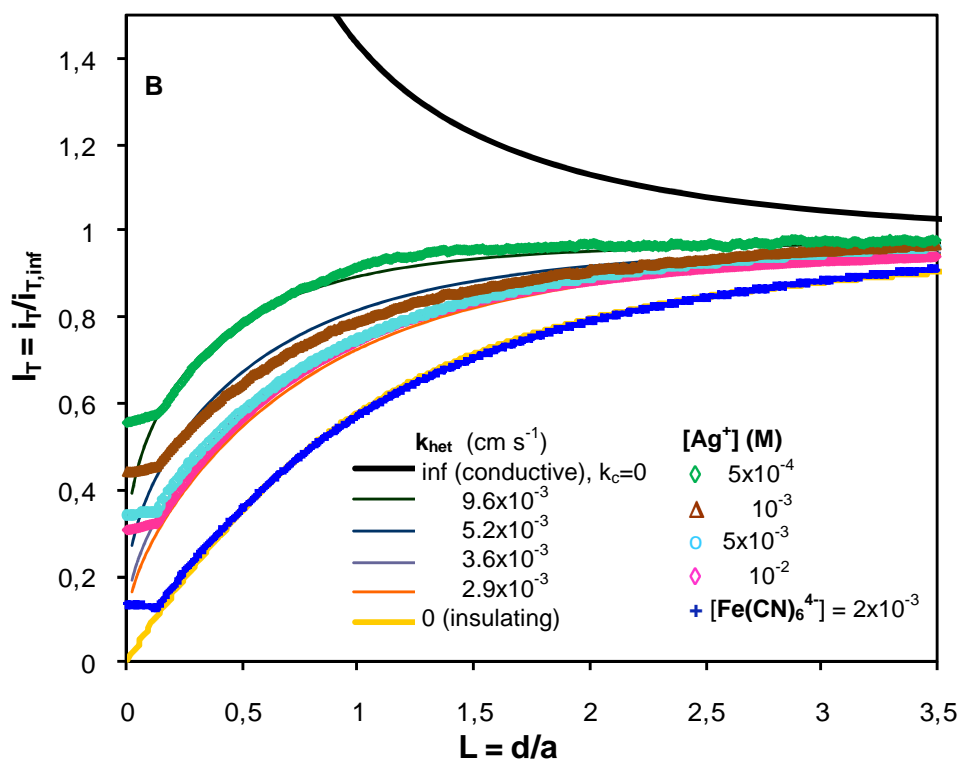
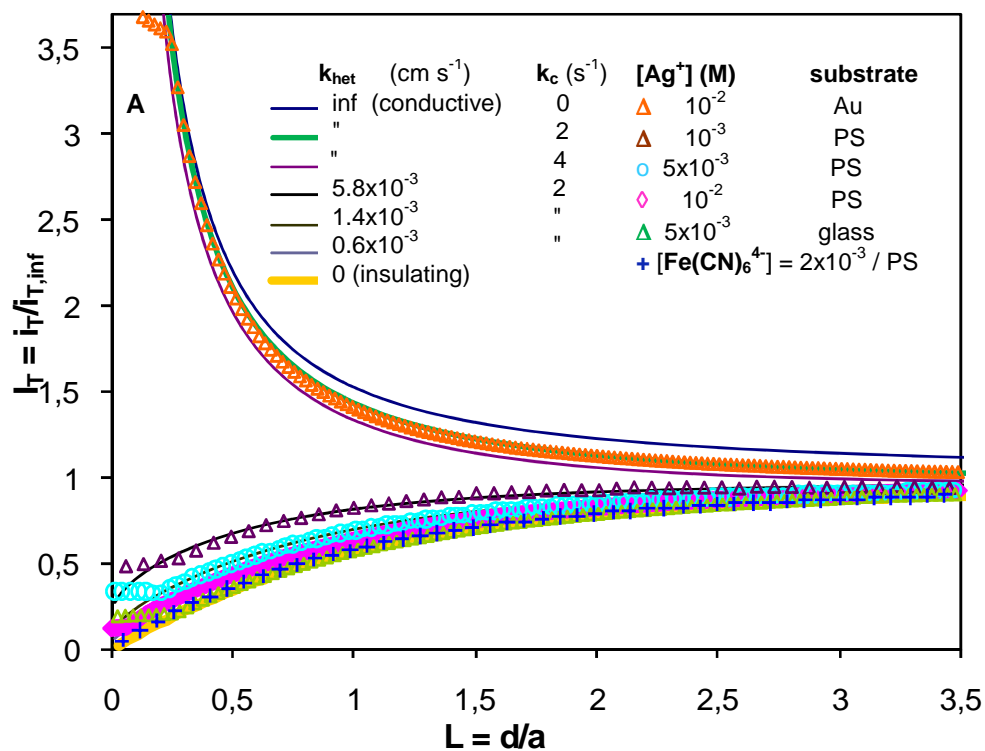
The kinetic of etching of PS by electrogenerated  $\text{Ag}^{2+}$  oxidant has been investigated by SECM approach curves. As proposed earlier, the approach curves with electrogenerated  $\text{Ag}^{2+}$  are obtained by holding the SECM tip at potentials corresponding to mass-transfer limited currents ( $E = 1.72 \text{ V/SCE}$ ). For  $\text{Ag}^+$  solutions between  $10^{-3}$  and  $7 \times 10^{-2} \text{ M}$ , the plateau current is linearly dependent on  $\text{Ag}^+$  concentration, as depicted in Figure 1.

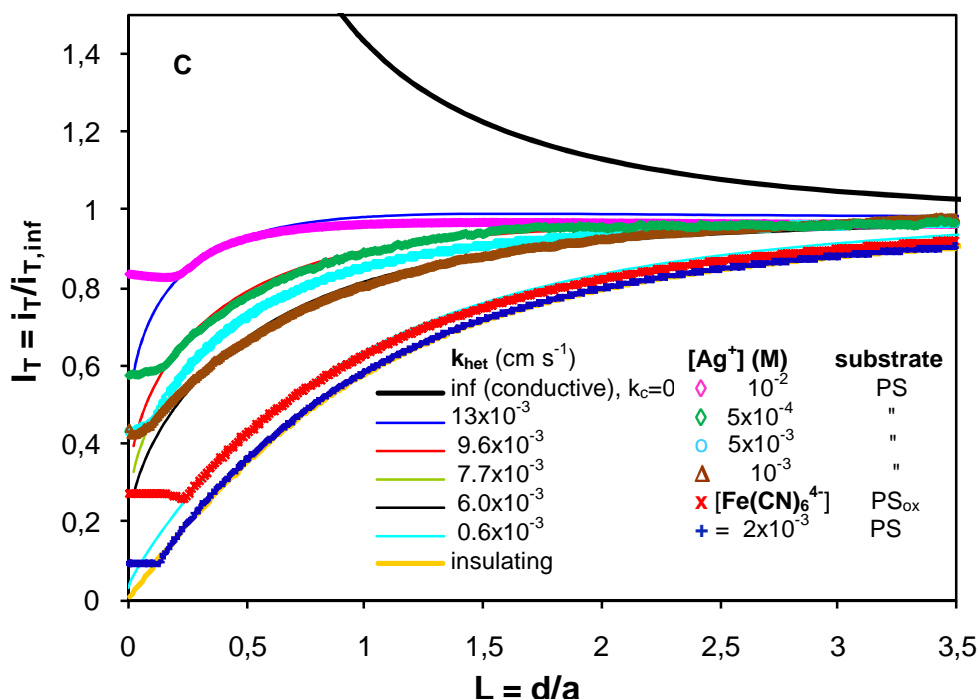


**Fig. 1.** Linear voltammetry of a Pt UME ( $a = 12.5 \mu\text{m}$ ) in  $3.25 \text{ M HNO}_3$  solution. Potential scan rate =  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ . Dependence of the limiting plateau current,  $i_T$ , at the plateau potential  $E = 1.72 \text{ V/SCE}$  as a function of silver concentration.

The diffusion coefficient of  $\text{Ag}^+$ ,  $D$ , is deduced from the slope of the straight line in Figure 1, using the relationship for ultramicroelectrodes mass-transfer limited currents ( $I = 4 n F D C a$ , with  $C$  the concentration of the species submitted to oxidation and  $a$  the UME radius). It is found to be  $D = 1.60 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , in agreement with the literature value for  $\text{Ag}^+$  transport ( $D = 1.64 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ).<sup>27</sup> This confirms that the first plateau corresponds to  $\text{Ag}^+$  oxidation.

Figure 2A presents different approach curves toward Au, PS or glass surfaces, drawn with either  $\text{Ag}^+$  or  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  as the redox probe. The approach curve of a PS surface in a  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  solution (+) fits the purely negative feedback curve typical of an insulating surface, showing that there is no redox process at the PS surface in the presence of the poorly oxidizing  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  generated at the tip ( $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ). Moreover, when the SECM tip is held at the plateau of  $\text{Ag}^+$  oxidation and approached to a glass surface ( $\Delta$ ), the tip current also decreases according to the negative feedback curve.





**Figure 2.** SECM approach curves to PS, gold or glass surfaces with  $\text{Ag}^+$  at different concentrations or  $2 \times 10^{-3} \text{ M Fe(CN)}_6^{4-}$  as redox probes. (A) massive PS, Au or glass substrates, (B) 25 and (C) 5 nm thin PS polymer brushes layers grown from Au surfaces. The approach curves with  $\text{Ag}^+$  as the redox probe have been fitted by finite heterogeneous kinetics at the substrate of dimensionless rate  $\lambda_{\text{het}} = k_{\text{het}}a/D$  (values given in the legend) and a chemical homogeneous decay rate constant  $k_c = 2 \text{ s}^{-1}$ .

Conversely, when the PS surface is approached by the same electrogenerated  $\text{Ag}^{2+}$  ion, the tip shows a higher current for  $\text{Ag}^+$  oxidation than that observed in the two former cases. This indicates that  $\text{Ag}^{2+}$  is reduced back to  $\text{Ag}^+$  at the PS substrate, the regenerated  $\text{Ag}^+$  diffuses back to the tip where its oxidation induces a measurable feedback current. At the substrate, the  $\text{Ag}^{2+}$  reduction is accompanied by the PS polymer oxidation into  $\text{PS}_{\text{ox}}$  as schematized by (eq 1):



In order to confirm the reversibility of  $\text{Ag}^+/\text{Ag}^{2+}$  redox couple, we have also drawn an approach curve to a conductive Au substrate with the tip electrogenerated  $\text{Ag}^{2+}$  ion ( $\Delta$ ). A much higher feedback is observed, however the curve does not fit the pure diffusion-limited control for a conductive substrate, nor any of the theoretical curves for finite electron transfer at the Au substrate.<sup>28</sup> This may point to the chemical instability of  $\text{Ag}^{2+}$  that can be engaged into a homogeneous oxidation in solution before reaching the substrate and being regenerated. In a first approximation, it is assumed that  $\text{Ag}^{2+}$  is engaged into a first order homogeneous reaction. The theoretical situation corresponding to the use of an instable electrogenerated

mediator in SECM experiments has been treated<sup>29,30</sup> and analytical expressions for the approach curves toward a conducting substrate have been proposed.<sup>31</sup> This situation fits quite well the approach curve of Au with the unstable tip electrogenerated  $\text{Ag}^{2+}$  when a first order chemical decay of rate,  $k_c = 2 \text{ s}^{-1}$ , is used.

The combination of the homogeneous chemical instability of a redox probe with finite heterogeneous kinetics at the substrate has also been treated theoretically.<sup>32</sup> The experimental approach curves drawn with  $\text{Ag}^{2+}$  as the tip generated oxidant were then compared to simulated approach curves with  $k_c = 2 \text{ s}^{-1}$  and variable values of the heterogeneous ET rate constant at the substrate,  $k_{\text{het}}$ . These simulated curves (continuous line in Figure 2A) nicely fit the experimental ones and were used to extract the kinetic rate for the PS oxidation. For  $[\text{Ag}^+]^0 = 10^{-3} \text{ M}$  ( $\Delta$ ), the PS oxidation occurs at  $2.0 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ . It means that under these experimental conditions, PS is oxidized at a steady-rate of  $k_{\text{het}}[\text{Ag}^+]^0 = 2.1 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . For a PS density of  $\rho = 1.05 \text{ g cm}^{-3}$  and a monomer molecular weight,  $M = 104 \text{ g mol}^{-1}$ , if an average of 2 electrons per monomer is assumed for the oxidation process (with 100% oxidation efficiency), then a maximum value for the etching rate is obtained from:

$$v = \frac{k_{\text{het}}[\text{Ag}^+]^0 M}{2\rho} \quad (2)$$

For a 100% oxidation efficiency, the PS surface is etched at a maximum rate of  $1 \text{ nm s}^{-1}$ . This means that during the approach (less than 20 s), less than 20 nm of the PS has been etched. This agrees with the spectroscopic analyses (XPS and FT-IRRAS) of the etched surfaces, which show that the etching was limited to few tens of nm, the photoelectron mean free path.<sup>18</sup>

When the  $\text{Ag}^+$  content is increased from  $10^{-3} \text{ M}$  ( $\Delta$ ) to  $10^{-2} \text{ M}$  ( $\diamond$ ), the normalized tip current decreases and the apparent heterogeneous rate constant,  $k_{\text{het}}$ , estimated from the approach curves decreases accordingly (Figure 3A). Such concentration effects on heterogeneous kinetics are usually observed when the number of accessible reactive sites is lower than the mediator concentration,<sup>33</sup> typically in the detection of cell redox activity<sup>34,35</sup> or during electron transfers at monolayer-attached redox centers.<sup>36</sup> In the context of PS etching, the observed concentration effect indicates that the PS oxidation is established by a limited number of active sites. This is actually compatible with the chemical structure of the oxidized PS, which consists of a hydrophilic oxygenated material presenting  $\sim 10\%$  COOH terminations.<sup>18</sup> The hydrophilic etched structure may support the transport of  $\text{Ag}^{2+}$  and  $\text{Ag}^+$  ions, while the COOH terminations provide binding sites for  $\text{Ag}^{+/2+}$ . At the interface between etched and unetched

PS, the surface bound  $\text{Ag}^{2+}$  ions serve as a relay for hole injection into unetched PS and for the etching process propagation, as a redox center attached to an interface would do. This electron transfer might occur by electron tunnelling through the interface. The whole etching process is described by a succession of several steps: (i) partition of the  $\text{Ag}^{2+/+}$  species at the interface between the electrolyte and the etched material,  $\text{PS}_{\text{Ox}}$  (eq 3) and diffusion into  $\text{PS}_{\text{Ox}}$ , (ii) electron transfer at the relays bound to the etched interface between  $\text{PS}_{\text{Ox}}$  and PS,  $\text{Ag}^{2+}_{\text{PS}}$  (eq. 4), (iii) electron transfer between the oxidant relays  $\text{Ag}^{2+}_{\text{PS}}$  and the virgin PS which propagates the etched interface within the bulk PS (eq. 5).



The rate of each irreversible step is given by its respective current:

$$i_3 = nFAD_p([\text{Ag}^{2+}]_{\text{PS}_{\text{Ox}}} - [\text{Ag}^{2+}]_{\text{PS}})/2e \quad (6)$$

$$i_4 = nFA k_{\text{ox}}[\text{Ag}^{2+}]_{\text{PS}}(\Gamma^* - \Gamma_{\text{Ag}^{2+}}) \quad (7)$$

$$i_5 = nFAk_{\text{etch}}\Gamma_{\text{Ag}^{2+}} \quad (8)$$

where  $[\text{Ag}^{2+}]_{\text{PS}_{\text{Ox}}}$  and  $[\text{Ag}^{2+}]_{\text{PS}}$  represent the concentration of the species at the electrolyte/ $\text{PS}_{\text{Ox}}$  interface and at the  $\text{PS}_{\text{Ox}}$ /PS interface respectively,  $D_p$  is the diffusion coefficient of the redox probe within the  $\text{PS}_{\text{Ox}}$  layer of thickness  $e$ ,  $\Gamma^*$  and  $\Gamma_{\text{Ag}^{2+}}$  represent respectively the surface concentration of active sites at the  $\text{PS}_{\text{Ox}}$ /PS interface and the amount of oxidant bound to these sites.

Then, similarly to the strategy already proposed by Mirkin,<sup>36,37</sup> the overall SECM proceeds under steady-state with an effective heterogeneous rate constant,  $k_{\text{app}}$ , which is given as the reciprocal sum of terms characteristic of each of the individual processes described.

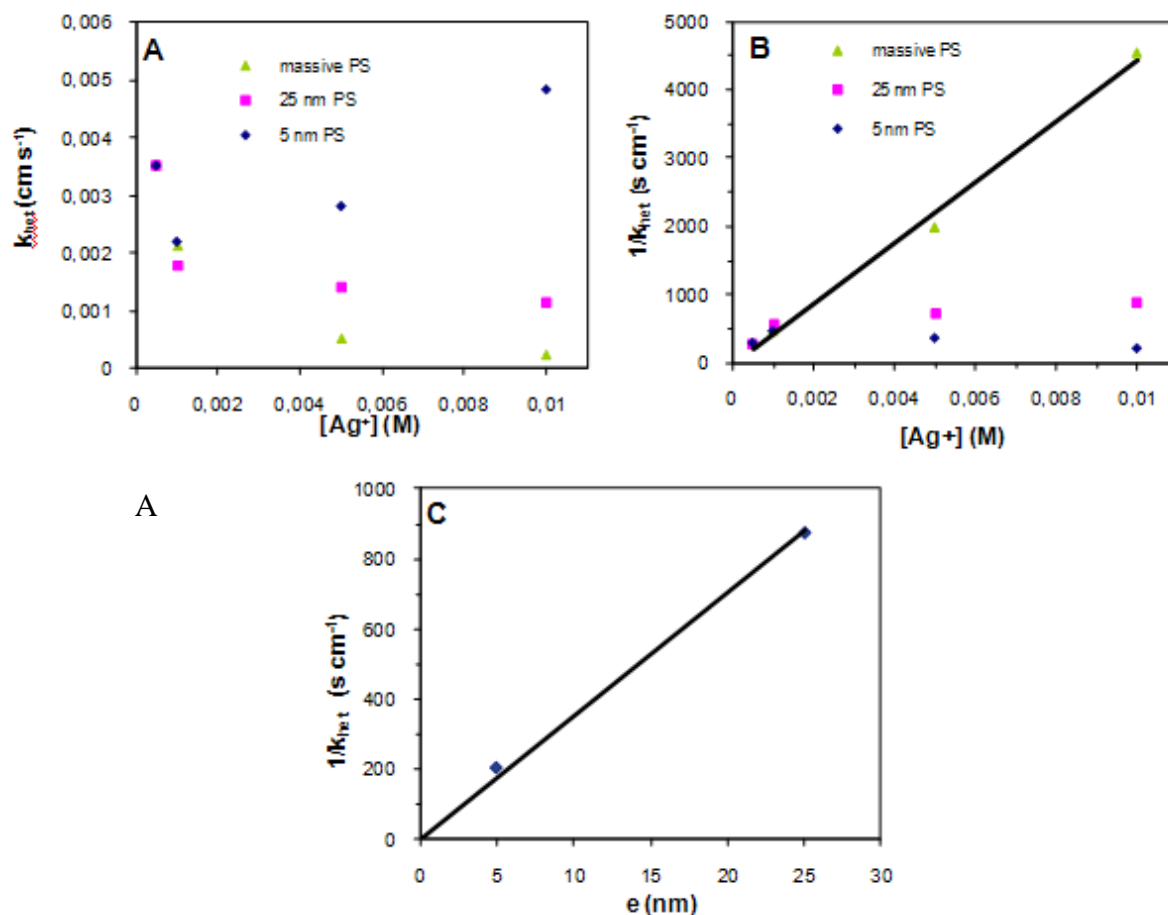
$$1/k_{\text{app}} = 2/P + 1/k_{\text{ox}}\Gamma^* + [\text{Ag}^{+}]^0/k_{\text{etch}}\Gamma^* \quad (9)$$

with  $2/P=2e/KD_p$  and  $K$  the equilibrium constant for the partition of  $\text{Ag}^{2+/+}$  ions between the solution and  $\text{PS}_{\text{Ox}}$  phases.

It is then predicted that the reciprocal of the apparent rate constant,  $k_{\text{het}}$ , extracted from the approach curve should increase linearly with the  $[\text{Ag}^{+}]^0$  solution content. This nicely fits the observed apparent heterogeneous rate constant obtained for PS oxidation as shown in Figure 3B. From the slope of this linear variation, the rate of PS transformation,  $k_{\text{etch}}\Gamma_{\text{rel}}$ , is about  $2.2 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . If 1 relay is assumed to be present per monomer unit, which is



consistent with the amount of COOH groups per carbon atom estimated by XPS,<sup>18</sup> the maximum rate for PS etching is about  $1.1 \text{ nm s}^{-1}$ .



**Figure 3.** Variation of the heterogeneous rate constant,  $k_{\text{het}}$ , extracted from the approach curves with (A,B) the  $\text{Ag}^+$  concentration for all PS substrates and (C) the PS thickness for thin layer of PS brushes on Au for  $[\text{Ag}^+]^0 = 0.01 \text{ M}$ .

However, in this analysis, permeation was considered as negligible. This is likely true for low etchant concentrations and thin  $\text{PS}_{\text{ox}}$  layers. In order to test such hypothesis, we have investigated the oxidative etching of nanometer-thin layers of PS. These layers were obtained from the controlled radical polymerization growth of PS from Au surfaces, as reported previously.<sup>38</sup>

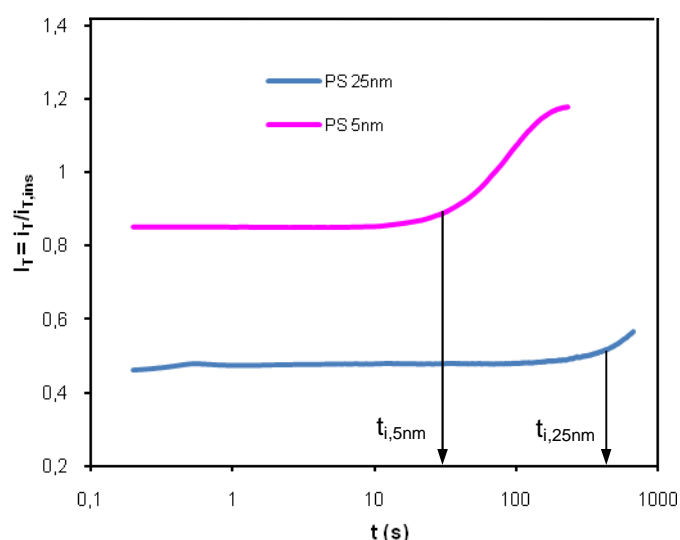
The approach curves to 25 and 5 nm thick PS films on Au are presented in Figures 2B and C, respectively. As reported previously, these surfaces behave as insulating substrates for  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  (+) as this hydrophilic anion cannot permeate the hydrophobic polymeric structure and reach the Au electrode.<sup>38</sup> Conversely, the approach curves with the electrogenerated  $\text{Ag}^{2+}$  mediator show significant feedback currents (Figures 2B,C), as for the massive PS substrate (Fig. 2A). The approach curves are again fitted with the theoretical curves taking into account

both finite heterogeneous kinetics at the substrate and homogeneous instability of the mediator ( $k_c = 2 \text{ s}^{-1}$ ). The variation of the effective heterogeneous rate constant with the  $\text{Ag}^+$  content is presented in Figures 3A and B for both thin films. At low  $\text{Ag}^+$  content ( $< 10^{-3} \text{ M}$ ), the approach curves resemble that of massive PS, indicating that the etching proceeds similarly for all PS substrates. This is consistent with eq. 9, which predicts that at low concentration, the thickness of the etched material is small and the permeation term is negligible; it ensures that, at these concentrations, the etching process is mainly governed by the electron transfer step (5). When the concentration is increased, the rate constant is higher than for massive PS and the thinner the PS layer, the higher the  $k_{\text{het}}$  value for a given  $[\text{Ag}^+]^0$ . A possible explanation for these results is related to the completion of the etching of the PS layer and possible direct ET to the Au underlying substrate. Then, the effective rate constant corresponds to the permeation-controlled transport of the mediator in the  $\text{PS}_{\text{ox}}$  layer and to direct electron transfer to the Au surface. This permeation is now possible as the oxidized PS structure is rendered more hydrophilic and should allow the partitioning and transport of aqueous species. Indeed, if redox mediators are transported within polyglycidylmethacrylate (PGMA),<sup>38</sup> more favoured transport is expected within the oxidized polymer,  $\text{PS}_{\text{ox}}$ , which presents a higher hydrophilicity (contact angle,  $\theta = 20^\circ$  compared to  $50^\circ$  for PGMA and  $90^\circ$  for pristine PS).<sup>18,38</sup> In this high concentration regime, the electron transfer to the Au substrate is expected to be fast and the process will be governed by mediator permeation. This is also sound as at the highest  $10^{-2} \text{ M Ag}^+$  concentration, the effective heterogeneous ET rate for the 5 nm thick PS layer (Figure 3C,  $\diamond$ ) is inversely proportional to the polymer film thickness according to eq. 10:

$$1/k_{\text{het}} = 2e/KD_p \quad (10)$$

An approximate permeation rate,  $KD_p \approx 2.9 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , is found in agreement with the hydrophilicity of  $\text{PS}_{\text{ox}}$ , which is higher than that of PGMA and comparable to that of cation exchange Nafion membranes containing cationic redox mediators.<sup>39</sup> The facilitated transport within  $\text{PS}_{\text{ox}}$  is also validated from the observation of  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  transport. Indeed, for the approach curve of the 5 nm thick oxidized PS layer ( $\times$ ), the tip current is higher than on the same unetched PS layer ( $+$ ) (same for the 25 nm thick oxidized (not shown) or unetched ( $+$ , Fig. 2B) layers). A rough estimate of the  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  species permeation-controlled transport is obtained from this single approach curve. It is about  $8 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ , that is much less efficient than for  $\text{Ag}^{2+/+}$ , in agreement with the possible charge repulsion between the negatively charged ferrocyanide and carboxylate terminations of  $\text{PS}_{\text{ox}}$ .

To corroborate the effect of ion transport within the etched polymer layer and direct ET to the Au surface, the transient etching of both thin PS layers was tracked. Once the tip has been positioned at a given close distance from the PS surface, its current is monitored as a function of the time elapsed for the electrogeneration of  $\text{Ag}^{2+}$ . We assume that the approach curves used for the tip positioning did not etch to a too great extent the thin PS layers, and the starting of the tip current recording ( $t=0$  in Figure 4) corresponds to the end of the positioning procedure. The transient variations of the tip current for the 25 and 5 nm thick PS brushes layers are depicted in Figure 4 (respectively pink and blue lines).



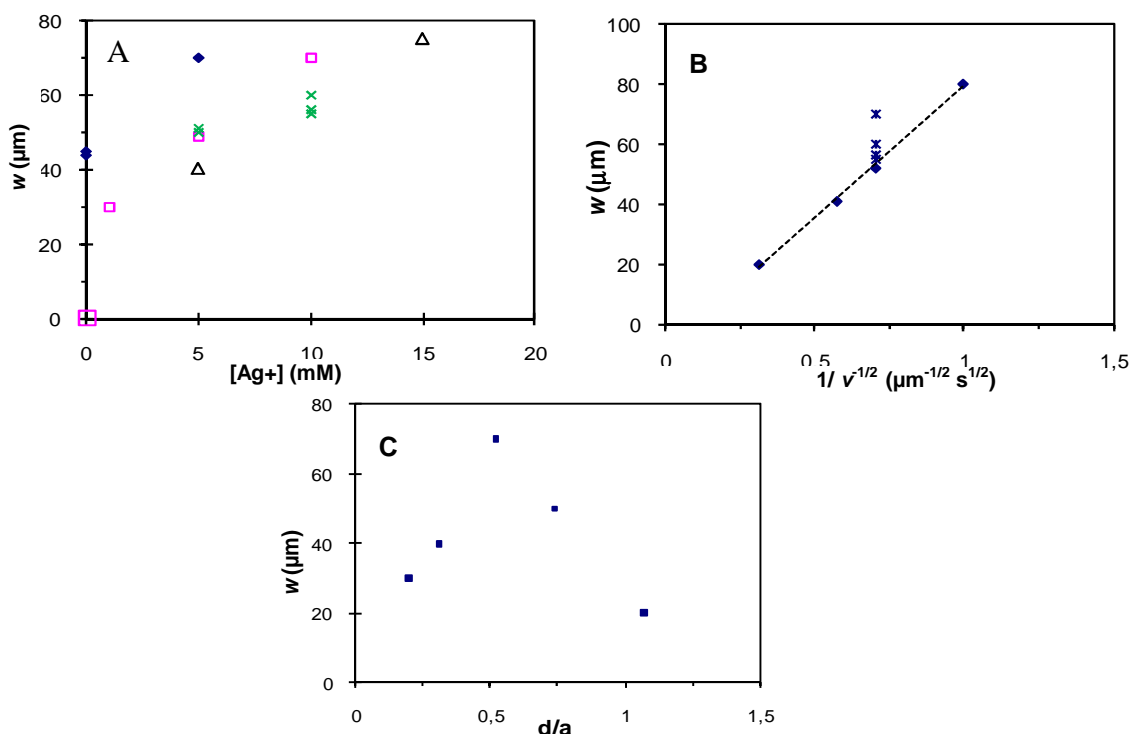
**Figure 4.** Transient evolution of the SECM tip current while electrogenerating  $0.01 \text{ M Ag}^{2+}$  at  $d = 5.5$  and  $3 \mu\text{m}$ , respectively from a 25 and 5 nm thin PS polymer brush layer on Au. Arbitrarily  $t=0 \text{ s}$  corresponds to the end of the tip positioning procedure (approach curve).

They show that after an induction time,  $t_i$ , the tip current increases as the time goes on and, for the thinnest 5 nm layer, it reaches a steady value. The induction period corresponds to the etching of polymer layers thinner than the polymer thickness. When the ET to the underlying Au surface is possible, the tip current starts to increase until the whole layer has been consumed. The induction time increases with the polymer layer thickness. It is approximately 20 times higher for the 5 times thicker PS layer, in agreement with a diffusion-limited process where a  $5^2=25$  times slower process would have been expected. A more quantitative analysis of the kinetics of the PS etching is delicate as (i) for the thinnest layer, the etching has likely started during the tip positioning procedure and (ii) for the thickest layer, the plateau of the steady current value corresponding to the permeation-diffusion controlled transport into the completely etched layer has not been reached, even after 600 s of etching.

### Patterning of PS surfaces.

The SECM mechanistic investigation of the etching of thin layers of PS is instructive as it shows how permeation affects the overall SECM kinetics. It is shown, for example, that for  $[Ag^+] < 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ , the etching is independent from the permeation, as  $PS_{ox}$  is likely thinner than 5 nm. For  $[Ag^+] = 10^{-2} \text{ M}$ ,  $PS_{ox}$  is thinner than 25 nm but comparable to 5 nm. Moreover, the recording of the transient current during the etching process shows that the complete etching of a 5 nm thin layer of PS (over an approximate 150  $\mu\text{m}$  diameter disk) requires 200 s. This indicates that the oxidation completion is a very slow process and that for efficient patterning experiments, the SECM tip has to be scanned slowly over the PS surface.

For SECM patterning, the tip was polarized on the oxidation plateau of  $Ag(I)$  or  $NO_3^-$  and scanned over the surface at a fixed  $d$ , and tip scan rate,  $v$ . Patterns were observed from surface wettability contrasts evidenced by water condensation.<sup>40-42</sup> The oxidized zones are indeed more hydrophilic than the surrounding PS and in a wet atmosphere, water droplets are larger and closer on the oxidized zones than on unmodified PS. Typical condensation figures such as that presented in Ref 18 (see Fig. SII in Supporting Information), show that water condensation is a convenient method to estimate the pattern width,  $w$  (5  $\mu\text{m}$  accuracy).



**Figure 5.** Patterning by SECM. Width of the etched zone as a function of (A) silver concentration, (B) tip scan rate, (C) tip-substrate distance. (A)  $v = 2 \mu\text{m s}^{-1}$ . RG = 3 ( $\square$ ), 4 ( $\Delta$ ,  $\blacklozenge$ ) and 3-5 ( $\times$ ).  $d/a = 0.26$  ( $\square$ ), 0.28 ( $\blacklozenge$ ), 0.48 ( $\Delta$ ) and 0.30–0.40 ( $\times$ ).  $E_p = 1.35 \text{ V}$  ( $\square$ ,  $\Delta$ ,  $\times$ ) and 1.40 V ( $\blacklozenge$ ). (B)  $[Ag^+] = 10^{-2} \text{ M}$ .  $E_p = 1.35 \text{ V}$ . ( $\blacklozenge$ ): RG = 3.5,  $d/a = 0.31$ . ( $\times$ ): RG = 3-5,  $d/a = 0.30$ –0.40. (C)  $v = 2 \mu\text{m s}^{-1}$ .  $[Ag^+] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

Figure 5A shows that  $w$  increases slightly with  $[\text{Ag(I)}]$ , but owing to the difficulty to reproduce the experiments and especially the tip-substrate distance, it is not reasonable to analyze more quantitatively the results in the range investigated. In the absence of silver, when the tip is polarized on the oxidation plateau of  $\text{Ag(I)}$ , no modification is detected on the PS plaque ( $\square$ ), but, when it is polarized at the  $\text{NO}_3^{\cdot}/\text{NO}_3^-$  potential ( $\blacklozenge$ ), PS is oxidized. In this case, the nitrate radical degrades PS chains. At the same potential and in the presence of silver, the effect of the two species  $\text{Ag(II)}$  and  $\text{NO}_3^{\cdot}$  are cumulated, which results in larger patterns in the same time for the same distance. However, such potential that is close to oxygen evolution is more difficult to control.

The influence of the tip scan rate,  $\nu$ , shows that for  $\nu > 30 \mu\text{m s}^{-1}$  ( $\nu^{-1/2} < 0.2 \mu\text{m}^{-1/2} \text{s}^{1/2}$ ), no pattern is observed, whilst for  $1 < \nu < 10 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $w$  depends linearly on  $\nu^{-1/2}$  (Figure 5B). This result may be correlated to that observed when reducing PTFE. For PTFE, the results were rationalized by considering that the patterns were obtained along a diffusion controlled process and the pattern width was shown to vary linearly with  $a\nu^{-1/2}$ . Here,  $a$  was not varied, but we may assume that a similar law was followed.<sup>43</sup>

Figure 5C represents the width of the pattern ( $\blacklozenge$ ) as a function of  $d/a$  ( $a$ , UME radius). When the tip-substrate separation distance  $d/a$  increases, the width,  $w$ , i) increases at short separation distance ( $d/a < 0.5$ ) and ii) decreases for  $d/a > 0.5$ . We have recently investigated the influence of the tip-substrate separation distance on pattern dimensions for patterning processes performed under steady mass-transfer rates in the ideal cases of insulating<sup>44</sup> and conducting<sup>45</sup> substrates. It is shown that during the patterning of an insulating substrate with an unstable electrogenerated etchant, an increase of  $d/a$  results in a decrease of the pattern dimension as long as the pattern dimension is smaller than  $RG$ , because of the decrease of mass-transfer hindrance by the substrate. Conversely, for a conducting surface, the increase of  $d/a$  yields an increase of the pattern width, as the regeneration of the tip-electrogenerated etchant is less focalized owing to better radial diffusion. These limiting situations do not apply here as the PS etching is performed under intermediate charge transfer. However, the change in trends observed for  $d/a \sim 0.5$  could be discussed according to the former limiting behaviours in term of change of feedback regime when the distance is changed. At the smallest distances ( $d/a < 0.5$ ) the PS etching regenerates  $\text{Ag}^+$  species and the observed increase of  $w$  with  $d/a$  is similar to the variations predicted for a conducting (regenerating) surface. Conversely, at high distance ( $d/a > 0.5$ ), owing to the instability of  $\text{Ag}^{2+}$ , the PS etching regenerates less efficiently  $\text{Ag}^+$  than at short  $d/a$ . The decrease of  $w$  with  $d/a$  is then

also consistent with the behaviour observed at an insulating surface in the absence of regeneration. This is also consistent with the difficulty to evidence any modification on the surface for  $d/a > 1.2$  because of the instability and the short life time of  $\text{Ag}^{2+}$ .

### Conclusion

Electrochemistry may be nicely used to modify the chemical and physical properties of hydrogenated polymers surfaces to improve their adhesion properties. Here, we have focused on the local modification of PS surfaces since PS is often used for the microfabrication of rigid microsystems.

Different ways to modify locally PS surfaces by electrochemically generated reactants such as  $\text{Ag}(\text{II})$  in concentrated nitric acid,  $\text{NO}_3^\bullet$  or  $\text{OH}^\bullet$  are described. The reactant is generated at the UME probe of a Scanning Electrochemical Microscope (SECM). The systems of  $\text{NO}_3^\bullet$  or  $\text{OH}^\bullet$  are less stable and oxidize less efficiently the surface.

The kinetic of etching of PS by electrogenerated  $\text{Ag}^{2+}$  oxidant has been investigated on i) massive PS and ii) on thin PS brushes obtained by ATRP on a gold surface. The SECM approach curves of electrogenerated  $\text{Ag}^{2+}$  were interpreted by combining the homogeneous chemical instability of  $\text{Ag}^{2+}$  (along a first order homogeneous reaction) with finite heterogeneous kinetics at the substrate. During the approach (less than 20 s), less than 20 nm of the PS has been etched. This agrees with the spectroscopic analyses (XPS and FT-IRRAS) of the etched surfaces. Actually, the PS oxidation is established by a limited number of active sites and the effective rate constant corresponds to the permeation of the mediator within the oxidized PS structure. When thin brushes of PS are etched, the permeation limitation is observed through direct electron transfer to the underlying Au surface. Such permeation is possible as the oxidized layer is rendered more hydrophilic and allows the partitioning and transport of aqueous species.

The patterns are evidenced by the surface wettability contrast between the hydrophobic virgin surface and the more hydrophilic pattern. The weaker the silver concentration and the faster the scanning rate, the thinner the pattern. The influence of the tip/substrate distance is rationalized by the extent of regeneration of  $\text{Ag}^+$  at the substrate.

Since this procedure generates discriminative surfaces able to promote or disfavour the adhesion and the growth of adherent cells, it should be used in fundamental cellular research to study, for instance, cell to cell interactions as well as to design new surfaces and microdevices for biomedical applications.

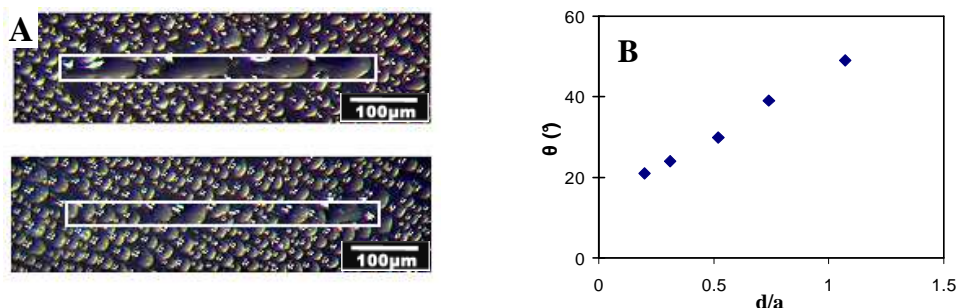
## REFERENCES

- (1) Brewis, D.M.; Dahm, R.H.; Mathieson, I. *J Mater. Sci. Lett.* **1997**, *16*, 93.
- (2) Bezigian, T. *Tappi Journal* **1992**, *75*, 139.
- (3) Farley, J.M.; Meka, P. *J. Appl. Polym. Sci.* **1994**, *51*, 121.
- (4) Shahidzadeh-Ahmadi, N.; Arefi-Khonsari F.; Amouroux, J. *J Mater Chem* **1995**, *5*, 229.
- (5) Shahidzadeh-Ahmadi, N.; Chehimi, M.M.; Arefi-Khonsari, F.; Foulon-Belkacemi, N.; Amouroux, J.; Delamar, M. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **1995**, *105*, 277.
- (6) Arefi, F.; Andre, V.; Montazer-Rahmati, P.; Amouroux, J. *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64*, 715.
- (7) Boyd, R.D.; Kenwright, A.M.; Badyal J.P.S.; Briggs, D. *Macromolecules* **1997**, *30*, 5429.
- (8) Brace, K.; Combellas, C.; Delamar, M.; Dujardin, E.; Kanoufi, F.; Shanahan, M.E.R.; Thiébault, A. *Polymer*, **1997**, *38*, 3295.
- (9) Amatore, C.; Combellas, C.; Kanoufi, F.; Sella, C.; Thiébault, A.; Thouin, L. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 820.
- (10) Combellas, C.; Richardson, S.; Shanahan, M.E.R.; Thiébault, A. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2001**, *21*, 59.
- (11) Brewis, D.M.; Dahm, R. H. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2001**, *21*, 397.
- (12) Bringmann, J.; Ebert, K.; Galla, U.; Schmieder, H. *J. Appl. Electrochem.* **1995**, *25*, 846.
- (13) Lehmani, A.; Turq, P.; Simonin, J.-P. *J. Electrochem. Soc.* **1996**, *143*, 1860.
- (14) Syper, L. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *42*, 4193.
- (15) Tomat, R.; Rigo, A. *J Appl Electrochem.* **1986**, *16*, 8.
- (16) Brewis, D.M.; Dahm, R.H.; Mathieson, I. *J Adhes.* **2000**, *72*, 373.
- (17) Brewis, D. M.; Briggs, D.; Dahm, R. H.; Fletcher, I. *Surf. Interface Anal.* **2000**, *29*, 572.
- (18) Ktari, N.; Poncet, P.; Sénéchal, H.; Malaquin, L.; Kanoufi, F.; Combellas, C. *Langmuir* **2010**, *26*, 17348.
- (19) Deiss, F.; Combellas, C.; Frétygny, C.; Sojic, N.; Kanoufi, F. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5169.
- (20) Combellas, C.; Fuchs, A.; Kanoufi, F. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3612.
- (21) Cortes-Salazar, F.; Traeuble, M.; Busnel, J.-M.; Gassner, A.-L.; Hojeij, M.; Wittstock, G.; Girault, H. H. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6889.
- (22) Cortes-Salazar, F.; Lesch, A.; Momotenko, D.; Busnel, J.-M.; Wittstock, G.; Girault, H. H. *Anal. Methods* **2010**, *2*, 817.
- (23) Brillas, E.; Sires, I.; Oturan, M. A. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6570.
- (24) Matrab, T.; Chehimi, M.M.; Perruchot, C.; Adenier, A.; Guillez, V.; Save, M.; Charleux, B.; Cabet-Deliry, E.; Pinson, J. *Langmuir* **2005**, *21*, 4686.
- (25) Slim, C.; Tran, Y.; Chehimi, M. M.; Garraud, N.; Roger, J.-P.; Combellas, C.; Kanoufi, F. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 6677.
- (26) Combellas, C.; Ghilane, J.; Kanoufi, F.; Mazouzi, D. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 6391.
- (27) Marcus, Y., In *Ion Properties*, Marcel Dekker, New York, 1997.
- (28) Cornut, R.; Lefrou, R. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *621*, 178.
- (29) Unwin, P. R.; Bard, A. J. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 5035.
- (30) Demaille, C.; Unwin, P. R.; Bard, A. J. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 14137.
- (31) Treichel, D. A.; Mirkin, M. V.; Bard, A. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 5751.
- (32) Kanoufi, F.; Cannes, C.; Bard, A. J. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8951.
- (33) Barker, A. L.; Macpherson, J. V.; Slevin, C. J.; Unwin, P. R. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1586.
- (34) Liu, B.; Rotenberg, S. A.; Mirkin, M. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 9855.

- 
- (35) Longobardi, F.; Cosma, P.; Milano, F.; Agostiano, F.; Mauzeroll, J.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5046.
- (36) Liu, B.; Bard, A. J.; Mirkin, M. V.; Creager, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1485.
- (37) Wei, C.; Bard, A. J.; Mirkin, M. V. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 16033.
- (38) Matrab, T.; Hauquier, F.; Combellas, C.; Kanoufi, F. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 670.
- (39) Bertonecello, P.; Ciani, I.; Li, F.; Unwin, P. R. *Langmuir* **2006**, *22*, 10380.
- (40) Beysens, D.; Knobler, C.M. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *57*, 1433.
- (41) Briscoe, B.J.; Galvin, K.P. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1989**, *23*, 422,
- (42) López, G.P.; Biebuyck, H.A.; Frisbie, C.D.; Whitesides, G.M. *Science* **1993**, *260*, 647.
- (43) Combellas, C.; Kanoufi, F.; Mazouzi, D. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *589*, 243.
- (44) Hazimeh, H.; Nunige, S.; Cornut, R.; Lefrou, C.; Combellas, C.; Kanoufi, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, submitted.
- (45) Cornut, R.; Nunige, S.; Lefrou, C.; Kanoufi, F. *Electrochim. Acta* **2011**, submitted.



### 3. Supporting Information



**Figure S11.** (from Ref 18) Patterning by SECM. a) Water condensation figures on PS surfaces modified by SECM.  $[Ag^+] = 5 \times 10^{-3} M$ , tip scan rate  $\nu = 2 \mu m s^{-1}$ , A:  $d = 2.5 \mu m$ , B:  $d = 13 \mu m$ . b) mean contact angle estimated from breath figures (2a) as a function of tip-substrate distance.  $\nu = 2 \mu m s^{-1}$ .  $[Ag^+] = 5 \times 10^{-3} M$ .

### 4. Analyse

Différentes voies électrochimiques d'oxygénation localisée par SECM de surfaces de polystyrène ont été testées. Malgré la complexité des systèmes  $Ag^{2+}/Ag^+$  et  $NO_3^{\cdot}/NO_3^-$ , l'établissement de courbes d'approche par microscopie électrochimique met en évidence la relative stabilité de l'ion  $Ag^{2+}$ . L'oxydation directe du polystyrène par le radical nitrate en absence d'argent est plus délicate car le potentiel du système  $NO_3^{\cdot}/NO_3^-$  est plus difficile à contrôler. Le polystyrène peut également être oxydé localement par en fabriquant des radicaux hydroxyles réaction de Fenton électrogénérée. Le système est également moins stable et oxyde moins efficacement la surface.

Les courbes d'approche de la surface en générant  $Ag(II)$  à la pointe du SECM permettent d'étudier la cinétique de l'oxydation du polystyrène. Dans ce cas, nous utilisons un film de polystyrène de 5 ou 25 nm obtenu par ATRP sur un substrat d'or. Nous interprétons les courbes SECM en considérant qu' $Ag^{2+}$  est un réactif instable qui se décompose en solution selon une réaction du premier ordre et que l'attaque de la surface par ce réactif suit une cinétique hétérogène finie au substrat. La vitesse d'attaque du polystyrène en profondeur confirme les résultats obtenus par spectroscopies XPS et IRRAS. La cinétique est régie par la perméation de l'espèce rédox dans le film de polymère oxydé qui est plus hydrophile que le polymère de départ, ce qui permet le partage et le transport d'espèces en solution aqueuse.

Nous avons ensuite utilisé ces réactifs pour oxyder localement des surfaces de PS. Les motifs oxydés étant plus hydrophiles que la surface vierge, nous avons utilisé la condensation d'eau comme moyen de visualisation et de mesure des tailles des modifications réalisées. Nous montrons l'effet de la concentration en argent, de la vitesse de balayage de la microélectrode et de la distance de celle-ci par rapport au substrat sur la taille des motifs.

## Chapitre 5 : Immobilisation de nanoparticules sur des supports modifiés

---

### 1. Introduction bibliographique

Aujourd'hui, l'utilisation de nanomatériaux ou de nanostructures est en plein essor. L'intérêt est lié à leurs propriétés physiques et chimiques exceptionnelles, différentes de celles du matériau massif [1].

Récemment, l'immobilisation de nanoparticules et leur assemblage sur des matériaux en une, deux et trois dimensions ont suscité un vif intérêt en raison de multiples applications envisageables dans différents domaines : catalyse, détection, optique, électronique, biochimie... [2-9]

De nombreuses stratégies ont été utilisées pour immobiliser différentes sortes de nanoparticules sur des surfaces solides diverses. La première est la modification de la surface du substrat par certains groupements fonctionnels comme les thiols, pyridines, amines, ou carboxyles qui ont une affinité chimique pour les nanoparticules. Par exemple, la modification de surfaces de verre avec des thiols silanés a été initialement utilisée pour améliorer l'adhésion d'un film d'or lors de son dépôt sous vide [10]. Plus tard, cette approche a été étendue pour immobiliser des nanoparticules d'argent, d'or et d'autres métaux sur, par exemple, le verre, le quartz, le silicium et des surfaces d'ITO [11-14].

Dans une stratégie alternative, les nanoparticules elles-mêmes peuvent être fonctionnalisées et immobilisées par la suite sur des substrats présentant des affinités fonctionnelles sur leur surface [15-18]. Par exemple, Yamanoi et *al.*[18] ont décrit l'immobilisation de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des  $\omega$ -alkène-1-thiols en mettant en jeu une interaction covalente avec les hydrogènes terminaux d'une surface de silicium (111). Une autre approche est l'utilisation d'une interaction électrostatique entre des groupements de charges opposées, via l'adsorption de polycations / polyanions [19-23]. Notons les travaux de Yuri Lvov [21, 22] qui traitent des assemblages couche par couche de nanoparticules de silice et d'un polycation (le poly diméthyl diallyl ammonium). Ce protocole implique l'optimisation de la densité de charge du polyélectrolyte et de la surface des nanoparticules en contrôlant par exemple la valeur du pH.

C'est dans ce cadre que se situe ce travail, l'objectif étant d'étudier l'immobilisation de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées sur des surfaces modifiées, notamment sur les substrats de polystyrène que nous avons modifiés localement. Ces entités fonctionnelles font l'objet d'une recherche intense en vue de leur intérêt potentiel dans différents domaines.

Parmi tous les défis qu'elles se proposent de relever, une application semble particulièrement stimulante : la fonctionnalisation de particules magnétiques pour la reconnaissance de tumeurs cancéreuses, suivie de l'application d'un champ magnétique pour chauffer les particules et détruire ainsi les cellules malignes [24].

Nous commencerons ce chapitre par une brève description de la procédure de synthèse des nanoparticules cœur-coquille que nous avons utilisées. Ensuite, nous traiterons et caractériserons l'immobilisation de ces nanoparticules sur des surfaces conductrices que nous prendrons comme surfaces modèles. Ces surfaces seront préalablement modifiées par électrogreffage d'un sel de diazonium. Après avoir déposé la première couche de nanoparticules, nous examinerons rapidement l'éventualité d'y assembler une deuxième couche puis de décoller l'ensemble. Enfin, nous appliquerons cette immobilisation sur des surfaces de polystyrène modifiées localement (chapitres précédents).

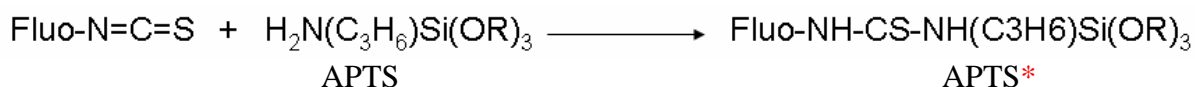
## **2. Les nanoparticules fonctionnalisées cœur-coquille $\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$**

Nous avons choisi d'utiliser des nanoparticules cœur-coquille  $\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$  fonctionnalisées par des groupements amines et polyéthylène glycol (PEG). Elles nous ont été fournies par Bruno Teste (doctorant, PECSA), qui les synthétise en collaboration avec Jean Michel Siaugue (maître de conférences, PECSA). La synthèse des nanoparticules fut publiée en 2009 dans « Journal of Magnetism and Magnetic Materials » [25].

Brièvement, des nanoparticules de maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) de 7 nm de diamètre sont obtenues par co-précipitation en milieu basique d'un mélange de chlorures ferriques et ferreux selon le protocole de Massart [26]. Les nanoparticules ainsi obtenues sont ensuite fonctionnalisées par des anions citrates avant d'être dispersées et stabilisées en milieu aqueux à pH 7.

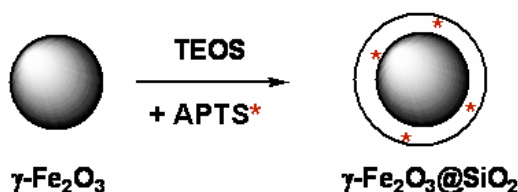
Ces nanoparticules modifiées subissent par la suite une première étape d'enrobage par une couche de silice selon le procédé sol-gel. La synthèse de cette enveloppe de silice est réalisée dans un mélange d'éthanol et d'eau (2:1) à partir d'un alcoxysilane, le tétraéthylorthosilicate (TEOS). La condensation de cet organosilane est initiée en milieu basique par ajout d'une solution aqueuse d'ammoniac.

Durant cette étape de synthèse, il est possible d'incorporer un fluorophore au sein de la couche de silice. Pour cela, on dérive l'organosilane aminé (APTS) par un fluorophore fonctionnalisé par une fonction isothiocyanate :



Cet organosilane fluorescent (APTS\*) peut être condensé en même temps que le TEOS.

Le schéma 1 résume la première étape de la synthèse des nanoparticules cœur magnétique / couche de silice.

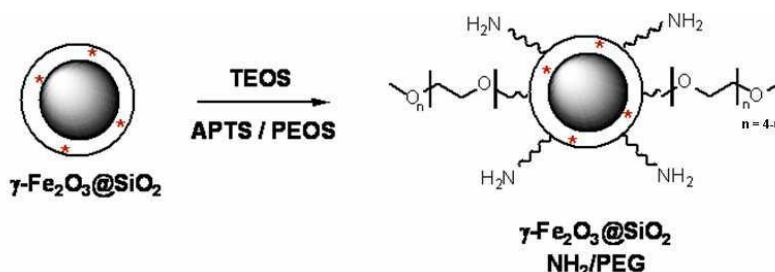


**Schéma 1 :** Synthèse des particules cœur/coquille  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$  fluorescentes en milieu éthanol/eau et en présence d'ammoniac

Dans un second temps, la couche de silice est fonctionnalisée conjointement par la condensation de deux autres organosilanes (chaînes de polyéthylène glycol (PEG) et fonctions amines) en présence d'une nouvelle fraction de TEOS (schéma 2).

- PEG : 2-[méthoxy(polyéthylèneoxy)propyl]triméthoxysilane (PEOS)
- Fonctions amines : 3-Aminopropyltriéthoxysilane (APTS)

Les chaînes de PEG (4-6 motifs éthylène glycol) apportent au système une stabilisation stérique tandis que les fonctions amines, au-delà d'assurer la stabilité colloïdale par interactions électrostatiques, constituent de bons sites de greffage covalent.



**Schéma 2:** Fonctionnalisation des nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$  fluorescentes en milieu éthanol/eau et en présence d'ammoniac

La réaction de condensation de la coquille de silice se déroule pendant une nuit et la suspension de particules est ensuite déstabilisée par le diéthyl éther. Un précipité rouge se forme alors puis il est séparé par un champ magnétique. Le précipité est lavé deux fois avec

un mélange diéthyl éther : éthanol (15:1) avant d'être redispersé dans une solution tampon de pH 7.5 (10 mM de MOPS (acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique)).

Les nanoparticules cœur-coquille synthétisées ont une taille physique d'environ 35 +/- 6 nm et sont chargées positivement. Leur densité de charge superficielle peut être contrôlée en variant la proportion molaire de l'APTS par rapport au PEOS ; nous avons laissé la quantité de PEOS constante en augmentant la quantité d'APTS à partir de 1:1 APTS : PEOS. Il y a alors environ 1200 fonctions NH<sub>2</sub> par nanoparticule.

Les solutions de nanoparticules amino- et PEG fonctionnalisés ainsi obtenues, de concentration approximative de  $3.1 \times 10^{14}$  nanoparticules mL<sup>-1</sup>, sont stables pendant plusieurs mois.

### **3. Immobilisation de nanoparticules sur une surface « modèle »**

#### **3.1. Principe et intérêt**

Notre objectif est d'utiliser une surface modèle conductrice pour y greffer de façon reproductible des groupements carboxyliques via la réduction cathodique d'un sel de diazonium (le 4 carboxyphényl diazonium tétrafluoroborate). La réduction de sels d'aryldiazonium conduit au greffage covalent des groupes aryles correspondant à la surface de l'électrode. Ces groupements pourront s'associer par interaction électrostatique avec les groupements amines greffés sur la coquille des nanoparticules.

Les études ont été réalisées sur des électrodes d'or et de carbone vitreux. Deux techniques électrochimiques de greffage ont été utilisées : la voltamétrie cyclique et la chronoampérométrie. Nous avons ensuite analysé les couches greffées par électrochimie, spectroscopie IRRAS et ellipsométrie. Ces analyses électrochimiques et physiques de surface nous permettront d'étudier l'immobilisation des nanoparticules sur ce type de substrat et la nature des forces d'interactions qui peuvent y intervenir. Après cette étape sur des surfaces modèles, nous tenterons d'appliquer la méthode au cas des surfaces de polystyrène que nous avons modifiées localement.

#### **3.2. Préparation de la surface modifiée par électrogreffage des groupements carboxyliques**

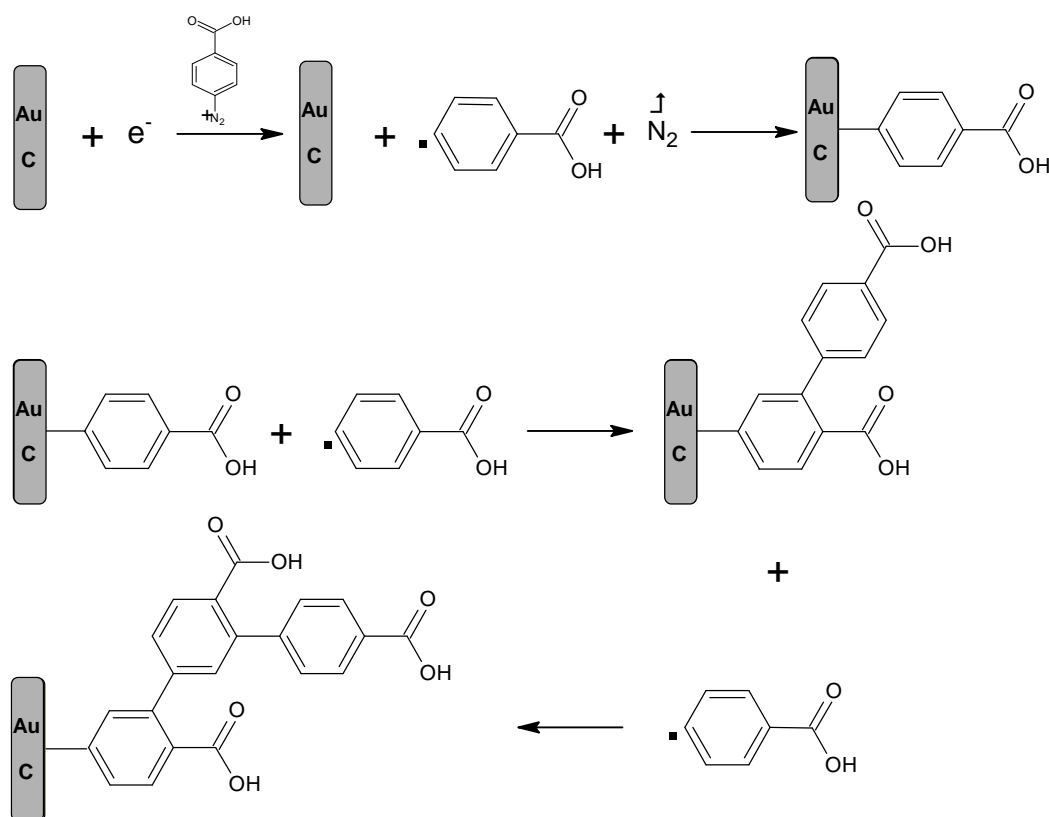
Les voies de synthèse pour le greffage d'une couche organique sur une surface sont nombreuses et ont fait le sujet d'intenses recherches dans le domaine des surfaces.

Notre stratégie s'est basée sur l'électrogreffage par réduction cathodique de sels de diazonium. Cette méthode, proposée en 1992 par Pinson *et al.* [27] a été initialement utilisée

sur des surfaces de carbone vitreux pour former des couches de phényles compactes. Ensuite, elle a été généralisée pour être appliquée aux métaux [28], semi-conducteurs [29], oxydes, nanotubes de carbone [30] ainsi qu'au diamant [31] et au Téflon<sup>®</sup> localement carbonisé par électrochimie [32].

C'est une méthode de greffage électrochimique covalent basée sur la réduction de sels d'aryl diazonium par application d'un faible potentiel cathodique. Comme c'est décrit sur le schéma 3, elle permet de former à la cathode des radicaux aryles, avec dégagement de N<sub>2</sub>. Ces radicaux, étant instables, réagissent avec la surface de la cathode pour former une liaison covalente. Cependant, dans certains cas (sur des surfaces de métaux réducteurs), le greffage peut être spontané [33]. Il peut aussi être déclenché par des réducteurs en solution [34] ou par ultrasons [35].

La réaction conduit généralement à une multicouche désordonnée. En effet, les radicaux aryles formés peuvent réagir aussi bien avec la surface qu'avec une couche greffée (cf. schéma 3), d'où la difficulté de contrôler la structure de la couche.



**Schéma 3 :** Réduction de sels de diazonium et formation de multicouches à la surface de la cathode (dans notre cas, il s'agit de l'or ou de carbone)

Le greffage électrochimique des sels de diazonium se fait le plus souvent dans l'acétonitrile, avec comme sel de fond  $\text{NBu}_4\text{BF}_4$ . Nous avons retenu ce milieu car il stabilise les sels d'aryldiazonium.

### 3.2.1. Choix du substrat

Le greffage de couches organiques par électrochimie nécessite l'utilisation de surfaces conductrices électroniques. Nous avons utilisé des électrodes bâtons d'or et de carbone vitreux présentant une surface utile de quelques  $\text{mm}^2$ . Ces deux matériaux sont communément utilisés pour l'électrogreffage des sels de diazonium. Pour d'autres caractérisations physiques, qui nécessitent un meilleur état de surface, nous avons travaillé sur des wafers de silicium recouverts d'une fine couche d'or de 100 nm d'épaisseur et de quelques  $\text{cm}^2$  de surface. L'or, historiquement le plus utilisé pour fabriquer des matériaux multicouches, est un métal relativement inerte, qui peut aussi être greffé chimiquement. Sa faible rugosité et son caractère réfléchissant permettent un excellent contraste avec les milieux organiques. Il est donc un matériau de choix pour les techniques de réflectivité telles que l'ellipsométrie et l'interférométrie. Nous pouvons aussi, grâce à son caractère réfléchissant, contrôler la chimie de surface par spectroscopie infrarouge en mode IRRAS (réflexion-absorption ou réflexion à incidence rasante). Cette technique permet, en effet, sur un tel substrat, l'analyse de dépôts très minces de matière organique.

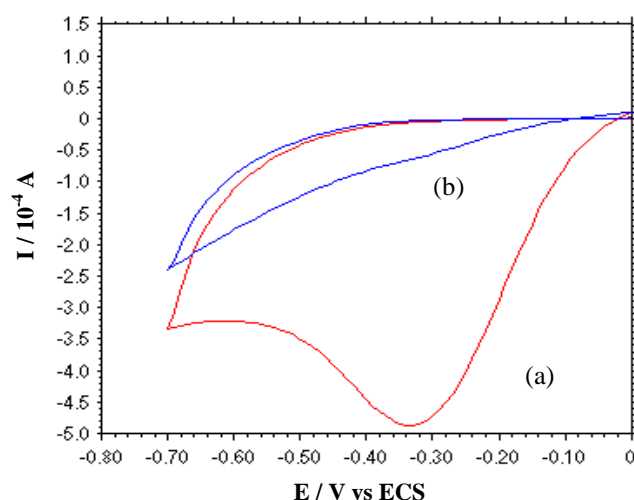
Avant de commencer les modifications de surfaces d'or, il faut nettoyer le substrat dans une solution de piranha (70 % d'acide sulfurique concentré et 30 % de peroxyde d'hydrogène) afin d'éliminer les composants organiques éventuellement présents à la surface.

### 3.2.2. Greffage par voltamétrie cyclique

Lorsqu'on réalise une voltamétrie cyclique, à partir du potentiel de repos d'une électrode vers les potentiels négatifs, dans un électrolyte qui contient un sel de diazonium, on observe la réduction du sel de diazonium.

La figure 1 représente deux voltamogrammes successifs obtenus lors de la réaction du 4 carboxyphényl diazonium sur un wafer d'or.





**Figure 1 :** Voltamétrie cyclique d'un wafer d'or dans une solution ACN + 0.1 M  $\text{NBu}_4\text{BF}_4$  + 2 mM de 4 carboxyphényl diazonium. (a) premier cycle, (b) deuxième cycle. Référence ECS

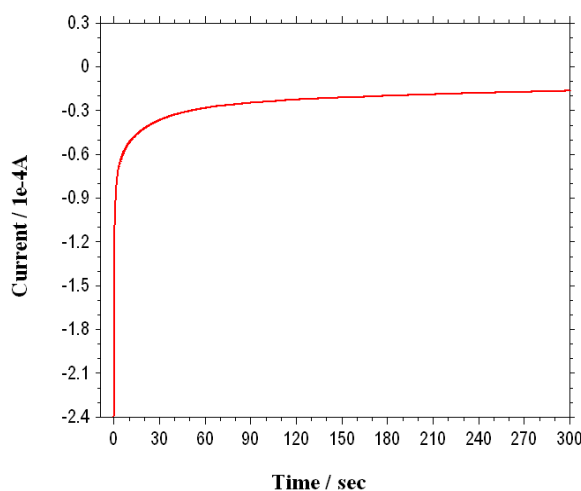
On observe sur le premier voltamogramme une vague cathodique large et irréversible à  $E_{p,c,or} = -330 \text{ mV/SCE}$  qui correspond à la réduction concertée du sel de diazonium en radical aryle. Ce dernier réagit aussi bien avec la surface qu'avec une couche greffée selon le mécanisme illustré dans le schéma 3. On assiste alors à une croissance du film en multicouches. Lors du deuxième balayage, la vague disparaît complètement, la surface étant déjà quasi-bloquée par le greffage des groupes aryles.

Le même phénomène a été observé sur les électrodes bâton d'or et de carbone vitreux.

### 3.2.3. Greffage par chronoampérométrie

Après la détermination par voltamétrie cyclique des potentiels de réduction du 4-carboxyphényl diazonium sur la surface de chaque substrat, nous avons suivi le greffage par chronoampérométrie. Pour cela, nous imposons un potentiel où le greffage doit avoir lieu,  $E = E_{pc} - 300 \text{ mV}$ , pendant un temps suffisamment long (5 min).

Examinons le cas de la réduction du 4 carboxyphényl diazonium sur une surface d'or (figure 2). Dès qu'on lance la mesure, on observe un courant important qui chute considérablement pendant les premières secondes. Ensuite, le courant continue à diminuer progressivement jusqu'à atteindre un plateau de valeur très faible. Ce comportement traduit, d'une part le fait que le greffage se déroule essentiellement pendant un temps très court et, d'autre part, l'arrêt ou la fin du processus de réduction du sel de diazonium, suite au blocage ou à la saturation de la surface par les groupes greffés.



**Figure 2 :** Chronoampérométrie sur un wafer d'or dans une solution ACN + 0.1 M  $\text{NBu}_4\text{BF}_4$  + 2 mM de 4 carboxyphényl diazonium.  $E = -0.6$  V. Référence ECS.

Dans certains cas évoqués plus loin, nous choisirons de ne pas saturer la surface du substrat par les groupements aryles en faisant varier les paramètres du greffage (temps plus court et potentiel moins négatif).

### 3.3. Caractérisation électrochimique de la surface modifiée

Le greffage des groupements aryles sur la surface du substrat conduit à un film qui comporte des défauts structuraux. L'électrochimie se prête bien à l'identification, voire à la quantification de ces défauts. Par exemple, on peut accéder par voltamétrie cyclique aux caractéristiques du transfert électronique entre des marqueurs rédox, connus pour donner lieu à un transfert de charge à sphère externe (afin de ne pas induire de complications cinétiques supplémentaires), et la surface modifiée. Selon la nature du dépôt sur l'électrode (structure, compacité, présence de défauts, électrostatique de surface), divers modes de transfert électronique ont été identifiés.

Dans notre cas, nous ne considérons que le transfert électronique direct entre la sonde et le substrat (transfert diffusionnel) à travers des défauts (pinholes)<sup>1</sup>, étant donné que l'on forme une multicouche suffisamment épaisse pour défavoriser d'autres modes comme l'effet tunnel. Nous supposons donc que le transfert électronique n'a lieu qu'à travers les pinholes dont la taille est plus grande que la taille moléculaire des sondes redox utilisées.

Le recouvrement surfacique de l'électrode par le film greffé peut être quantifié par le paramètre  $\theta$ ;  $(1 - \theta)$  correspond au pourcentage de pinholes. Diverses approches théoriques ont été décrites dans la littérature [36-39] pour modéliser le transfert électronique par les pinholes,

<sup>[1]</sup> Le mot pinhole en anglais signifie le chas d'une aiguille.

que l'on considère uniformément répartis en surface et présentent une géométrie simple (disque). Notons la théorie d'Amatore en 1983 [39] qui a permis de relier le taux de recouvrement, la dimension des pinholes, leur espacement et la constante de transfert électronique ( $k$ ).

En admettant que tout le courant passe par les points de faible dimension où l'électrode est nue, il a été montré que pour un grand recouvrement ( $\theta \approx 1$ ), la diminution de la constante de transfert de charge apparente est reliée à  $\theta$  et est donnée par l'expression suivante [39]:

$$k_s = k^\circ(1 - \theta) \quad (1)$$

Où  $k^\circ$  et  $k_s$  sont les constantes de transfert de charge, mesurées sur le substrat nu et sur substrat modifié, respectivement.

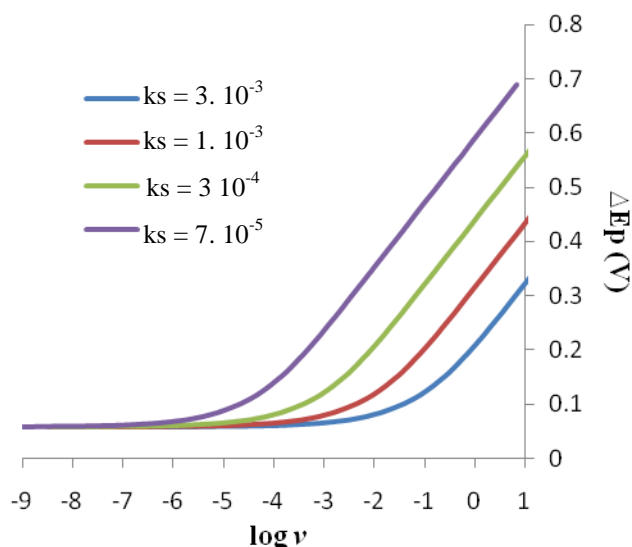
D'autre part, en voltamétrie cyclique [40] et pour un système quasiréversible, la constante de transfert de charge est reliée à la vitesse de balayage  $\nu$ , au coefficient de transfert  $\alpha$  et au déplacement  $\Delta E_p$  (différence entre les potentiels d'oxydation et de réduction) par la relation suivante :

$$\Psi = \frac{\left(\frac{D_O}{D_R}\right)^{\alpha/2} k_s}{\sqrt{\pi D_O \frac{nF}{RT} \nu}} \quad (2)$$

avec  $\Psi$  un paramètre cinétique adimensionnel qui ne dépend que du déplacement  $\Delta E_p$  pour  $0.3 < \alpha < 0.7$ .  $D_O$  et  $D_R$  sont les coefficients de diffusion des espèces rédox en solution,  $F$  est la constante de Faraday et  $T$  la température en Kelvin.

La méthode de Nicholson [40] consiste alors à déterminer une constante apparente,  $k_s$ , pour un système quasi réversible en étudiant les variations de  $\Delta E_p$  avec la vitesse de balayage,  $\nu$ .

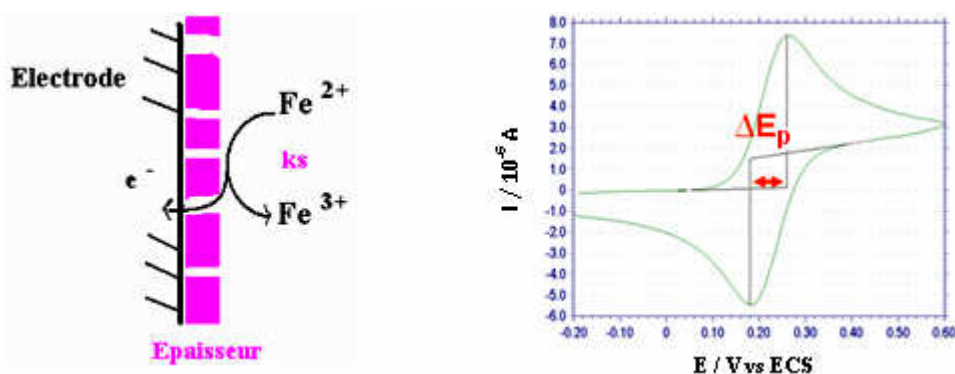
Ainsi, on peut tracer pour différentes valeurs de  $k_s$  des courbes théoriques de  $\log \nu = f(\Delta E_p)$  (figure 3)



**Figure 3 :** Variation de  $\Delta E_p$  en fonction de  $\log \nu$  pour différentes valeurs de  $k_s$ . Calcul basé sur l'équation (2) pour  $n=1$  ;  $D_O = D_R = 6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  et la table de la variation de  $\Delta E_p$  en fonction de  $\Psi$  (ref [40]).

Nous avons utilisé deux sondes rédox: le ferrocène méthanol (1.5 mmol/L) et le ferrocyanure (5 mmol/L).

En traçant la courbe  $\Delta E_p$  en fonction de  $\log \nu$ , nous serons en mesure d'estimer  $k_s$  qui est représentatif de l'état de la surface de l'électrode. En effet comme c'est illustré sur la figure 4, plus la surface d'une électrode est passivée, plus le transfert électronique est difficile et plus  $\Delta E_p$ , mesuré par voltamétrie cyclique, pour une vitesse de balayage donnée, est important.

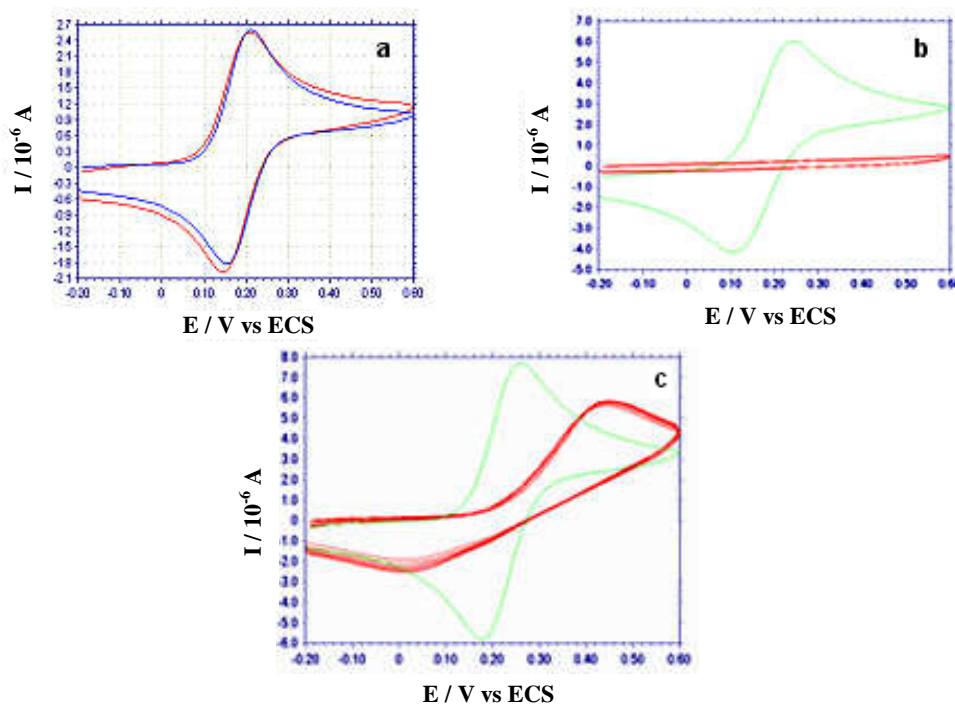


**Figure 4 :** à gauche : illustration du transfert de charge à travers les pinholes d'une surface d'électrode greffée sur laquelle on oxyde  $\text{Fe}^{2+}$ . À droite : définition de  $\Delta E_p$  sur une voltamétrie cyclique d'une électrode de carbone vitreux dans une solution aqueuse de ferrocyanure 5 mmol/L + 0.1 M KCl. Référence ECS

### 3.3.1. Sur électrode de carbone vitreux (CV)

Après rinçage dans l'acétone puis l'eau, l'électrode greffée est transférée dans une solution aqueuse contenant une sonde rédox (ferrocène méthanol ou ferrocyanure) et un électrolyte support (0.1 M KCl). Comme le montre la figure 5a, la réponse électrochimique en présence de ferrocène méthanol ne présente aucune variation entre l'électrode nue et l'électrode greffée. Le transfert électronique de cette sonde n'est pas suffisamment sensible à la présence des groupements aryles. A pH neutre, le film organique chargé négativement (groupes carboxylates) est perméable au ferrocène méthanol. Le ferrocène méthanol ne peut donc pas être utilisé pour mettre en évidence les modifications de la surface de l'électrode.

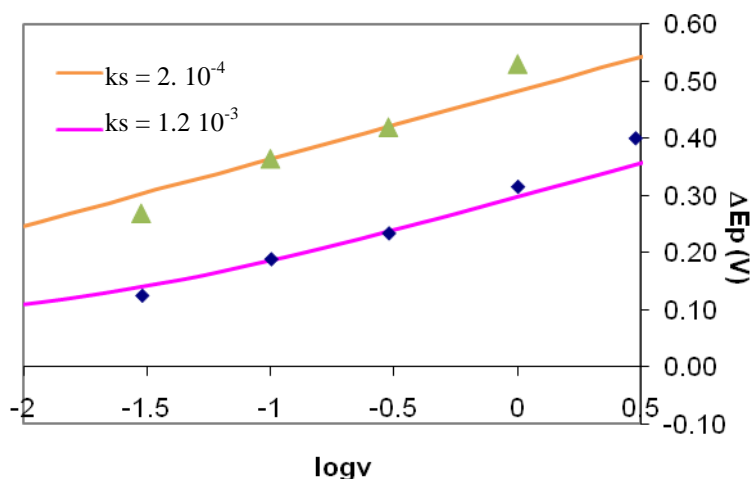
Le ferrocyanure est par contre chargé négativement ce qui devrait défavoriser la diffusion de la sonde rédox vers la surface du substrat et donc ralentir le transfert d'électrons. La figure 5b confirme cette hypothèse. La réponse électronique après greffage est très faible par rapport à l'électrode nue, ce qui montre un recouvrement quasi-total de la surface de l'électrode de carbone vitreux par la couche organique. Dans la suite, nous utiliserons le ferrocyanure comme sonde rédox pour caractériser le greffage.



**Figure 5:** Voltamétries cycliques d'une électrode de carbone vitreux nue (courbe bleue **a**, courbes vertes **b** et **c**) et greffée 4 carboxyphényl diazonium par chronoampérométrie à  $E = -0.4 \text{ V}$  pendant 300 s (courbes rouges **a** et **b**) et à  $E = -0.05 \text{ V}$  pendant 0.25 s (courbe rouge **c**) dans une solution aqueuse de ferrocène méthanol 1.5 mmol/L (**a**) et ferrocyanure 5 mmol/L (**b** et **c**) + 0.1 M KCl. Référence ECS

Si on veut utiliser ensuite la même technique pour mettre en évidence une couche ultérieure de nanoparticules, il faut diminuer le taux de recouvrement de la surface par les groupements aryles. Ainsi, nous pourrions suivre et quantifier en fonction du déplacement de  $\Delta E_p$ , la formation de couches successives sur la surface de l'électrode.

Plusieurs conditions de greffage ont été testées. Nous avons retenu le greffage par chronoampérométrie à  $-0.05$  V pendant  $0.25$  s (cf. figure 5c). Nous avons pu obtenir grâce à ces conditions un taux de recouvrement des groupements aryles répétable de 85%. La figure 6 présente les différentes valeurs de  $\Delta E_p$  en fonction de  $\log v$  obtenues sur une électrode de carbone vitreux nue ( $\blacklozenge$ ) et une électrode modifiée ( $\blacktriangle$ ). Nous avons simulé ces points par des courbes théoriques (figure 3), ce qui donne pour l'électrode nue une valeur de  $k_0$  de  $1.2 \times 10^{-3}$  cm/s et pour l'électrode modifiée une valeur de  $k_s$  de  $2 \times 10^{-4}$  cm/s.



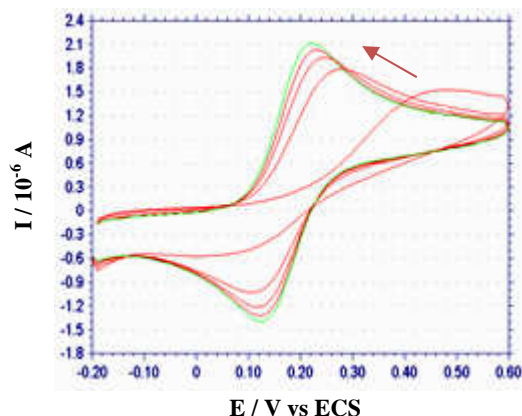
**Figure 6 :** Variations de  $\Delta E_p$  en fonction de  $\log v$  obtenues sur une électrode de carbone vitreux nue ( $\blacklozenge$ ) et greffée 4 carboxyphényl diazonium ( $\blacktriangle$ ). Simulations théoriques (figure 4) des points expérimentaux par ( $\square$ )  $k_s = 1.2 \times 10^{-3}$  cm/s et ( $\square$ )  $k_s = 2 \times 10^{-4}$  cm/s.

### 3.3.2. Sur électrode d'or

Sur or, plusieurs conditions de greffage ont été testées, mais les résultats sont peu répétables. De plus, nous avons constaté que les mesures électrochimiques par voltamétrie cyclique ne sont pas stables. Le signal électrochimique tend de plus en plus, au fur et à mesure des cycles, vers un signal correspondant à une électrode nue, et ce quel que soit le niveau de greffage ou de  $\Delta E_p$  de départ (cf. figure 7).

Ce résultat a été déjà décrit dans la littérature lors du greffage des sels de diazonium sur or [41]. Il a été observé aussi bien en balayant le potentiel qu'au moyen des ultrasons. On

attribue cet effet à un processus de restructuration des chaînes ou à une perte des groupements aryles piégés dans le film sans être greffés sur la surface d'or d'une façon covalente.



**Figure 7 :** Voltamétries cycliques d'une électrode d'or nue (courbe verte) et greffée 4 carboxyphényl diazonium par chronoampérométrie à  $E = -0.6$  V pendant 300 s (courbes rouges ; de bas en haut suivant la flèche : 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> cycle) dans une solution aqueuse de ferrocyanure 5 mmol/L + 0.1 M KCl. Référence ECS

Par la suite, nous avons retenu les électrodes de carbone vitreux pour les mesures électrochimiques.

### 3.4. Autres caractérisations d'une surface d'or modifiée

Nous allons maintenant nous intéresser aux wafers d'or sur lesquels nous réduisons par chronoampérométrie le 4 carboxyphényl diazonium, comme précédemment décrit. Plusieurs techniques de caractérisation sont possibles sur ce substrat afin de suivre la formation de la couche organique. Nous utilisons l'ellipsométrie, l'IRRAS et les mesures d'angles de contact. Les surfaces de carbone vitreux ne permettent pas de faire ce type de mesures.

#### 3.4.1. Ellipsométrie

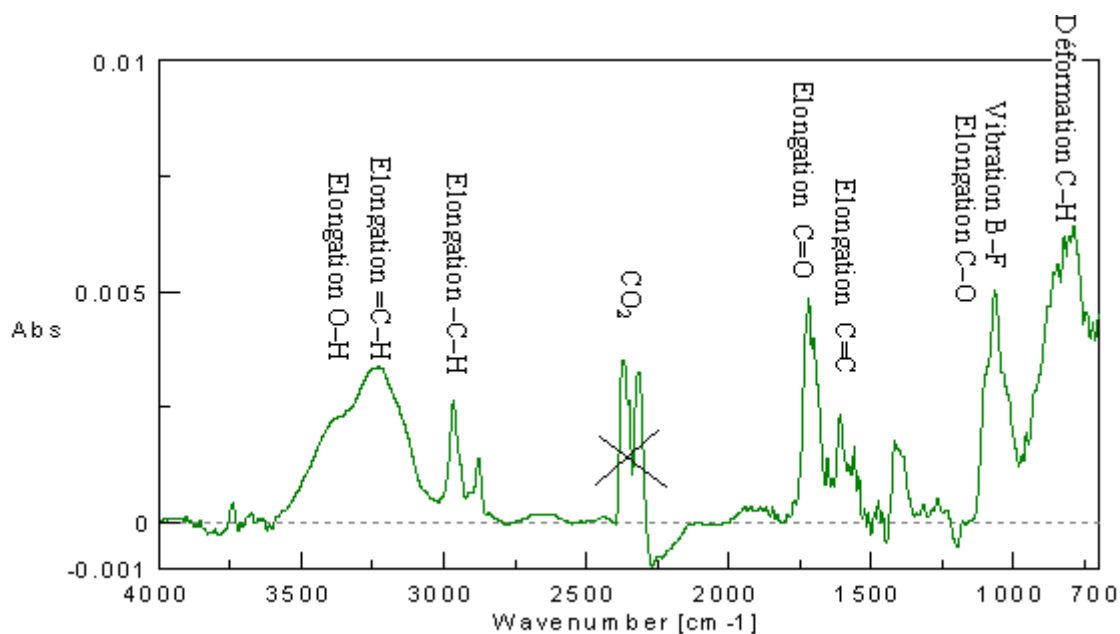
L'ellipsométrie est une méthode optique permettant de déterminer les épaisseurs et les indices de réfraction d'un film homogène à la surface d'un substrat réfléchissant. Nous avons interprété les résultats des mesures par le modèle SENTECH SE 400. Le principe consiste à mesurer et analyser les variations d'amplitude et de phase (respectivement caractérisées par les paramètres  $\Psi$  et  $\Delta$ ) d'un faisceau laser après sa réflexion sur le substrat, sur une région d'environ  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  (voir Annexe 2). L'appareil réalise ensuite un calcul numérique pour déterminer les épaisseurs des couches superficielles, dont les indices de réfraction sont connus.

Les résultats de l'analyse appliquée sur nos échantillons (greffés par chronoampérométrie pendant 300 s à  $-0.6$  V) indiquent une épaisseur assez homogène du film organique de 20 à 30 Å. Ces mesures sont généralement répétables pour les mêmes conditions de greffage. Ce

résultat prouve la croissance du film en multicouches sur environ 5 épaisseurs de diazonium (composé benzoïque).

### 3.4.2. IRRAS (Infra Red Reflexion Absorption Spectroscopy)

Lors d'une analyse de films minces (quelques nanomètres d'épaisseur) par spectroscopie IR, le nombre réduit de sites en interaction avec le rayonnement électromagnétique cause un sérieux problème de détection. Le développement de la spectroscopie de réflexion absorption couplée à l'analyse par transformée de Fourier (IRRAS) a, en partie, résolu ce problème.



**Figure 8 :** Spectre IRRAS du film de carboxyphényles greffés sur un wafer d'or.

La figure 8 montre un spectre IRRAS du film organique greffé sur un wafer d'or dans les mêmes conditions que pour les mesures d'ellipsométrie. Les bandes de vibrations des élongations O-H entre 3100 et 3500  $\text{cm}^{-1}$ , C=O à 1720  $\text{cm}^{-1}$  et C-O à 1070  $\text{cm}^{-1}$  témoignent de la présence des groupements carboxyliques à la surface du substrat. De plus, nous distinguons des bandes caractéristiques des noyaux aromatiques : deux pics entre 1550 et 1600  $\text{cm}^{-1}$  attribués à l'élongation C=C, un pic vers 3100  $\text{cm}^{-1}$  à l'élongation =C-H (confondue avec la bande O-H) et plusieurs pics entre 760 et 870  $\text{cm}^{-1}$  qui correspondent à la déformation en dehors du plan des liaisons C-H caractéristiques d'un noyau tri ou tétrasubstitué. Ce résultat confirme le greffage des groupements acides phényl- carboxyliques et la croissance du film en multicouches. Par ailleurs, la présence de bandes d'élongation de C-H aliphatiques entre 2800 et 3000  $\text{cm}^{-1}$  et de vibration asymétrique B-F du contre ion  $\text{BF}_4^-$  à 1030  $\text{cm}^{-1}$  montre la



présence du sel de fond (le tétrabutylammonium tétrafluoborate  $\text{NBu}_4\text{BF}_4$ ) qui reste probablement piégé dans la couche greffée.

### 3.4.3. Angles de contact - Etude de la réversibilité $\text{COOH}/\text{COO}^-$ sur une surface d'or greffée par l'acide benzoïque

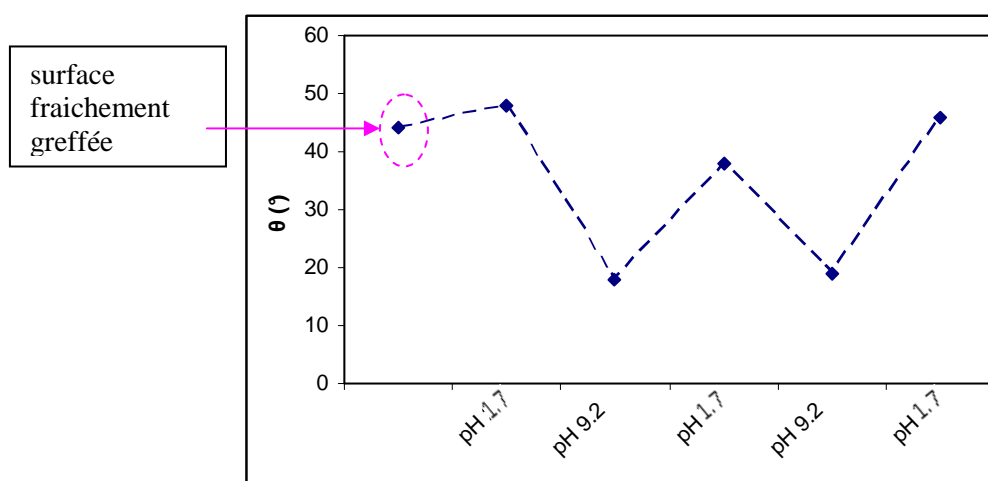
La modification de l'énergie d'une surface se traduit par une variation de l'angle de contact d'une goutte liquide déposée sur la surface. A une surface hydrophile correspond un angle de contact faible, voire nul, et à une surface hydrophobe un grand angle de contact.

Nous avons utilisé les angles de contact pour (1) caractériser l'hydrophilie des surfaces d'or modifiées par la couche organique et (2) étudier la dynamique et la réversibilité du film greffé par rapport au transfert de proton (groupements carboxyles) en tant qu'exemple de réponse du film à l'environnement immédiat.

Le principe et la technique utilisés pour mesurer des angles de contact sont détaillés dans l'annexe 1.

Une surface d'or nue, initialement hydrophobe, a un angle de contact de l'ordre de  $80^\circ$ .

Nous reportons dans la figure 9, les mesures d'angles,  $\theta$ , de gouttes d'eau pure obtenues sur un film de carboxyphényl fraîchement préparé, rincé puis ayant séjourné pendant 30 min dans une solution de pH acide ou basique. Nous avons utilisé une solution d'acide sulfurique à  $10^{-2}$  M et une solution tampon tétraborate de sodium + HCl respectivement pour les pH 1.7 et 9.2.



**Figure 9 :** Angles de goutte d'eau pure sur un wafer d'or greffé par des groupements carboxyphényles qui a préalablement séjourné 30 min dans une solution de pH donné.

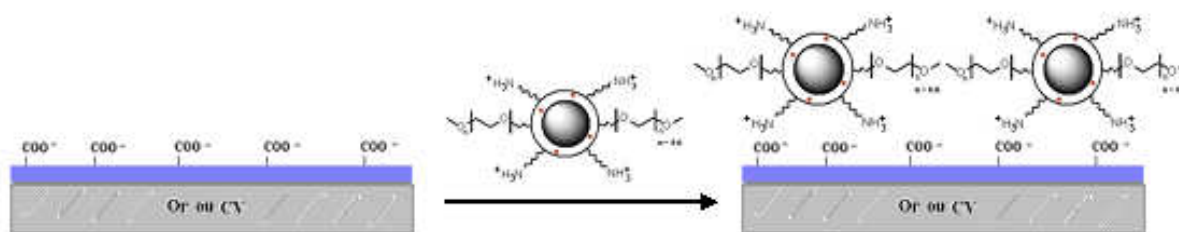
Après une modification électrochimique par les groupements carboxyles polaires, la surface d'or passe d'un état hydrophobe à un état hydrophile avec un angle de contact de  $45^\circ$ . Ceci confirme la présence du film et de fonctions polaires sur la surface.

Lorsque nous plaçons cet échantillon en contact avec une solution de pH 1.7 pendant 30 min, nous constatons que l'angle reste pratiquement inchangé étant donné que la précision de la méthode est d'environ 4°. Ensuite, une mise en contact avec une solution basique de pH 9.2 engendre une importante augmentation de l'hydrophilie de la surface avec un angle de contact qui passe de 50° à 18°. Cette évolution est due à la déprotonation des fonctions carboxyliques qui augmente la polarité de la surface. En effet, ce pH est supérieur au pKa du couple COOH/COO<sup>-</sup> greffé sur une surface d'or via un groupement phényle, qui est de 2.8 selon Downard [41]. Ainsi, nous pouvons conclure qu'à l'issue du greffage, les fonctions carboxyles présentes sur la surface sont majoritairement protonées (premier point entouré en rose, figure 9).

Lorsque nous répétons l'expérience, nous retrouvons à peu près les mêmes valeurs des angles de contact. Ceci montre que le processus de protonation / déprotonation de la surface est réversible.

### 3.5. Etude de l'immobilisation des nanoparticules

Après greffage et caractérisation du film organique, notre objectif est de former et caractériser un assemblage électrostatique entre ce film et des nanoparticules fonctionnalisées par des groupements amines, comme indiqué sur le schéma 4. D'après le paragraphe précédent, avant de mettre la solution de nanoparticules, il est nécessaire de faire passer la surface en milieu basique pour déprotoner les fonctions carboxyles et favoriser les interactions électrostatiques. La solution mère de nanoparticules est diluée trois fois dans un tampon phosphate salin (PBS) contenant un tensioactif (tween à 1‰) afin d'éviter l'agglomération des nanoparticules. Après avoir laissé quelques gouttes de la solution diluée 2 min en contact avec la surface du substrat, celui-ci est rincé à l'eau.



**Schéma 4:** immobilisation des nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$  sur des surfaces d'or ou de carbone vitreux modifiées par les groupements carboxyphényles.

### 3.5.1. Caractérisation électrochimique de la surface modifiée

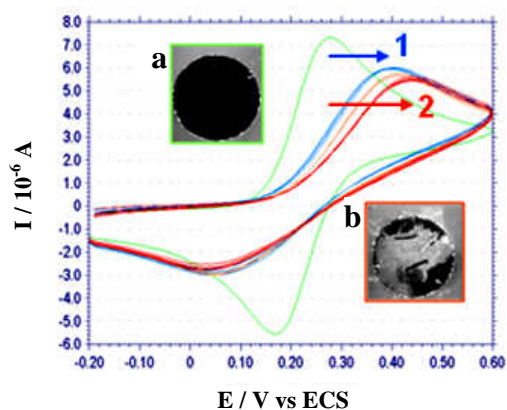
Nous avons caractérisé par voltamétrie cyclique des couches de nanoparticules immobilisées sur des électrodes de carbone vitreux greffées, puisque nous avons vu précédemment que la réponse de ces électrodes greffées était stable et répétable.

La Figure 10 montre les voltamogrammes d'une électrode de carbone vitreux dans une solution aqueuse de ferrocyanure 5 mmol/L + 0.1 M KCl, obtenus après l'étape 1 de greffage du film organique (courbe bleue) et l'étape 2 d'immobilisation des nanoparticules (courbe rouge). La courbe verte correspond à l'électrode de carbone vitreux non greffé.

La solution des nanoparticules contient également des macromolécules qui peuvent s'adsorber sur la surface de l'électrode et entrer en compétition avec les nanoparticules pour passiver l'électrode. Pour connaître la contribution des nanoparticules, nous avons tracé la courbe obtenue sur une électrode fraîchement greffée par le sel de diazonium mise en présence d'une solution témoin (tween + PBS + MOPS), dans les mêmes proportions, mais sans les nanoparticules (courbe orange, figure 10). Cette courbe montre une modification du signal électrochimique qui confirme l'existence d'une interaction entre ces macromolécules et la surface de l'électrode. Néanmoins, la variation du signal due à cette interférence reste plus faible que celle obtenue en présence des nanoparticules. Malgré ces variations qui sont toutes faibles, les résultats de cette expérience sont assez répétables et montrent un effet réel entre les différentes étapes.

Comme les nanoparticules sont fluorescentes, des photos de fluorescence **a** et **b** sur la figure 10 de l'électrode respectivement avant et après immobilisation des nanoparticules confirment la présence des nanoparticules sur la surface de l'électrode.

L'analyse de ces courbes permet d'estimer le taux de recouvrement des nanoparticules sur la surface modifiée par les aryles et les macromolécules à ~ 27%. Les données électrochimiques nous permettent donc de caractériser la couche de nanoparticules sur carbone vitreux. Nous obtenons des signaux stables dont l'exploitation donne des informations répétables.

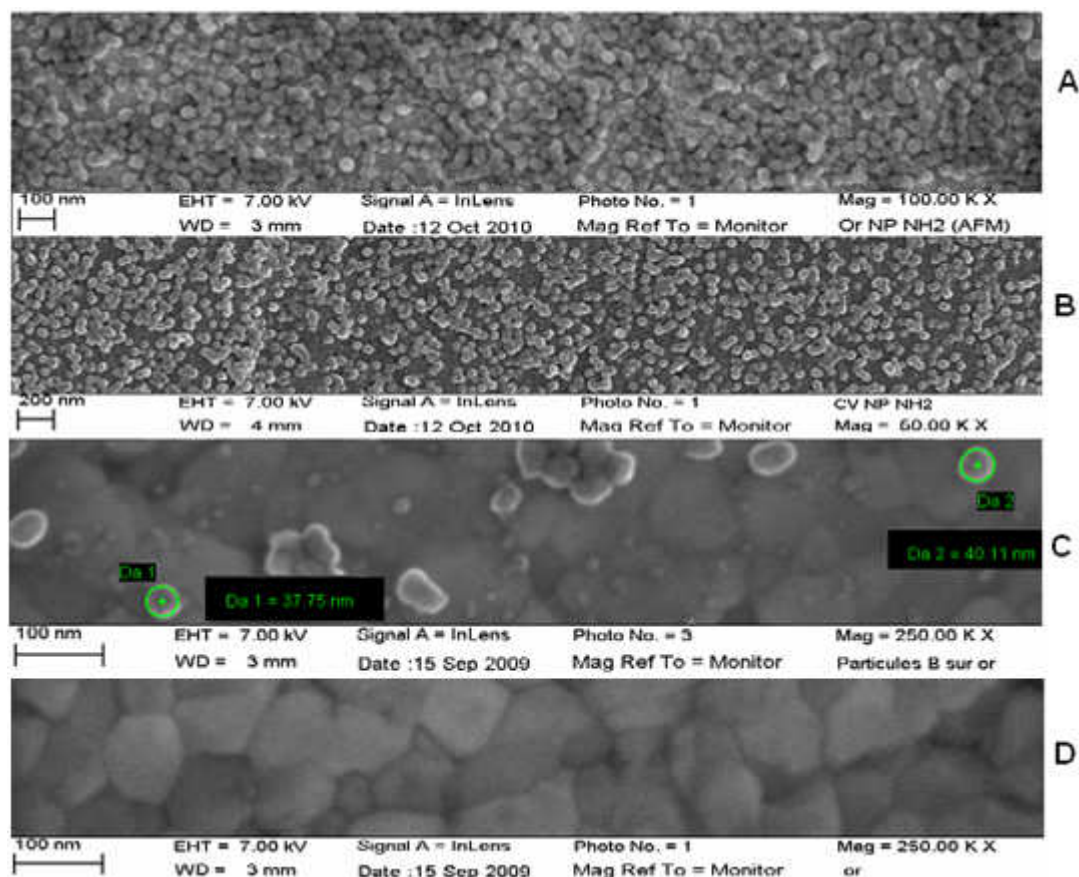


**Figure 10** : Voltamétries cycliques d'une électrode de carbone vitreux nue (courbe verte), greffée 4 carboxyphényl diazonium par chronoampérométrie à  $E = -0.05$  V pendant 0.25 s (courbe bleue), + macromolécules sans les nanoparticules (courbe orange) ou + macromolécules et nanoparticules (courbe rouge) dans une solution aqueuse de ferrocyanure 5 mmol/L + 0.1 M KCl. Référence ECS. **a** et **b** : photos de fluorescence de l'électrode respectivement avant et après immobilisation des nanoparticules

### 3.5.2. Autres caractérisations de la surface

#### Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'immobilisation des nanoparticules sur les surfaces nues et modifiées a été aussi mise en évidence par MEB. L'examen des surfaces montre la présence d'une concentration importante de nanoparticules, de diamètre d'environ 40 nm sur les deux surfaces modifiées (or : figure 11 A et carbone vitreux : figure 11 B). Les nanoparticules sont immobilisées en une monocouche compacte, parfois surmontée d'une autre couche moins homogène.



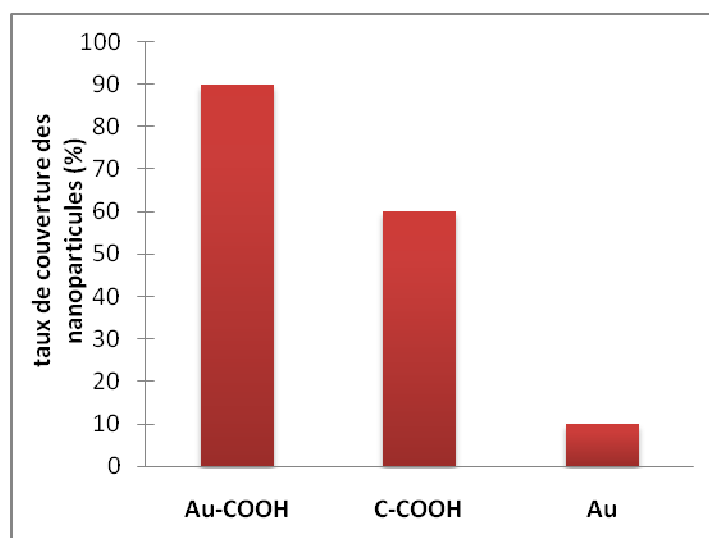
**Figure 11 :** Images MEB de nanoparticules  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> sur un wafer d'or (A) ou une électrode de carbone vitreux modifiée par les groupements carboxyphényles (B) et sur une surface de wafer d'or nu (C). D : témoin : image MEB d'une surface de wafer d'or.

D'autre part, l'analyse d'une surface « témoin » d'or nu, mise en contact avec des nanoparticules, montre un taux d'immobilisation beaucoup plus faible malgré l'affinité bien connue entre les fonctions amines et l'or (cf. figure 11 C). Ce résultat prouve l'importance du film organique et des groupements carboxyles dans le processus d'adhésion des nanoparticules sur une surface. Il est à noter que la surface d'un wafer d'or nu vue par MEB (figure 11 D) présente des terrasses, parfois de la taille des nanoparticules, ce qui complique dans certains cas (à forte densité) l'estimation du taux de couverture des nanoparticules.

La figure 12 regroupe les taux de recouvrement des surfaces par les nanoparticules, estimés pour chaque substrat à partir de différentes images MEB à différentes échelles.

Normalement, nous devrions nous attendre à des résultats similaires entre l'échantillon d'or et le carbone vitreux modifiés. La différence observée peut être due à la différence entre les deux supports ou aux mesures électrochimiques réalisées sur le substrat de carbone vitreux avant l'analyse MEB. En effet, il s'agit pour ce substrat de l'électrode bâton de carbone

vitreux de 2 mm de diamètre que nous avons utilisée pour la caractérisation électrochimique décrite au paragraphe précédent. Il serait alors possible d'avoir perdu quelques nanoparticules à l'issue de ces mesures.



**Figure 12 :** Taux de recouvrement des surfaces par les nanoparticules estimés par MEB pour un wafer d'or ou une électrode de carbone vitreux modifiés par les groupements benzophényles et sur un wafer d'or nu

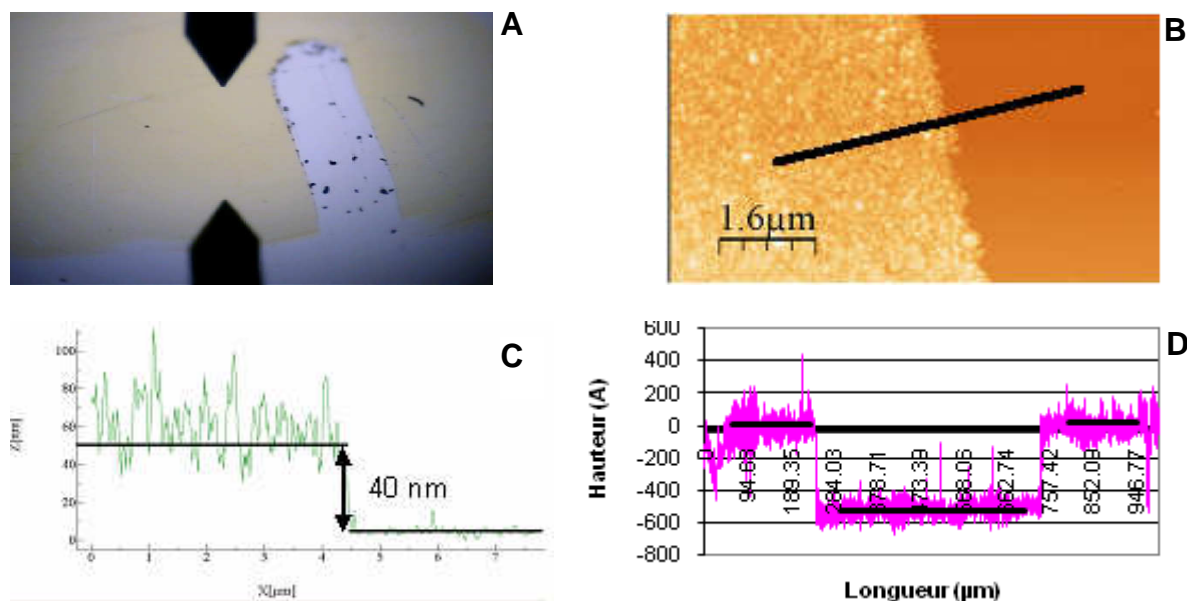
### **Microscopie à force atomique (AFM)**

L'AFM, qui est une technique d'analyse de surface de plus haute résolution, donne des renseignements sur l'état de surface des plaques d'or greffées avec des nanoparticules. Les surfaces sont imagées en mode « tapping » à l'aide d'une pointe opérant à une fréquence de résonance autour de 300 kHz.

En plus de l'imagerie de la surface, cette technique permet aussi d'accéder à la rugosité et au profil de la surface. Pour cela, nous nous plaçons à l'interface entre une zone avec nanoparticules et une zone d'or nu (figure 13 A). Cette dernière est obtenue par frottement de la surface à l'aide d'un morceau de plastique.

L'image AFM (figure 13 B) montre à cette échelle un tapis assez dense de nanoparticules, avec un taux de recouvrement proche des 100% (partie gauche de l'image). Le profil associé (figure 13 C) indique une marche de ~ 40 nm. Sachant que le diamètre des nanoparticules est de 30-40 nm, cette topographie montre une couche homogène de nanoparticules avec en quelques points une couche moins homogène qui surmonte la première couche.

Ce résultat est en accord avec les données obtenues par profilométrie de contact (figure 13 D) qui indiquent une marche d'environ 50 nm.



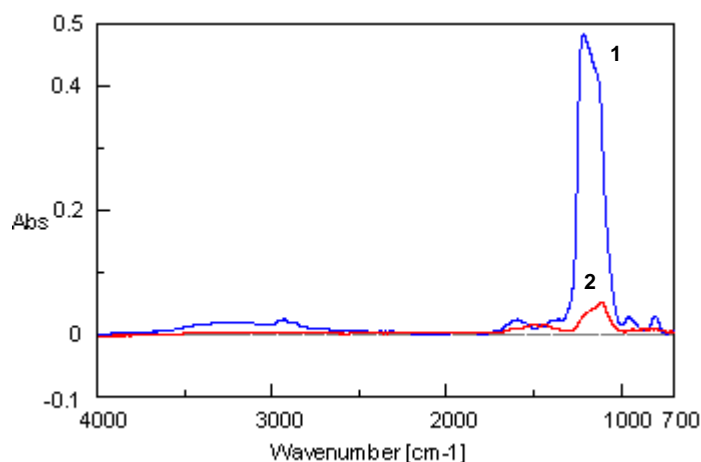
**Figure 13 :** Analyses AFM et de profilométrie de contact à l'interface entre une zone avec nanoparticules et une zone d'or nu. **A :** photographie du substrat analysé ; **B :** image AFM en mode « tapping » ; **C :** profil associé et **D :** topographie obtenue par profilométrie de contact.

### Ellipsométrie

L'ellipsométrie renseigne sur l'épaisseur des couches formées. Elle donne accès à une épaisseur moyenne pour une couche d'indice donné. Dans le cas d'une surface d'or modifiée par le film organique puis par les nanoparticules, l'épaisseur moyenne de la couche de nanoparticules varie entre 20 et 40 nm (en prenant pour indice de réfraction de la couche  $n = 1.46$ ). Ce résultat est en bon accord avec les résultats précédents.

### IRRAS

La figure 14 montre les spectres IRRAS de wafers d'or sur lequel les nanoparticules ont été immobilisées. En 1, le wafer a été greffé  $\text{CO}_2\text{H}$  (courbe bleue) et en 2, l'or est nu (courbe rouge). Nous distinguons sur les deux spectres une large bande entre 1000 et 1200  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique de l'élongation Si-O [25], que nous attribuons à la coquille de silice des nanoparticules. Cette bande est environ 10 fois plus intense sur le spectre 1 (or greffé) que sur le 2 (or nu). Ceci montre que les nanoparticules s'immobilisent préférentiellement sur le substrat modifié par le film organique greffé, en bon accord avec les résultats des autres analyses.



**Figure 14 :** Spectres IRRAS des nanoparticules sur un wafer d'or greffé par les groupements carboxyles (spectre **1**, bleu) et sur un wafer d'or nu (spectre **2**, rouge).

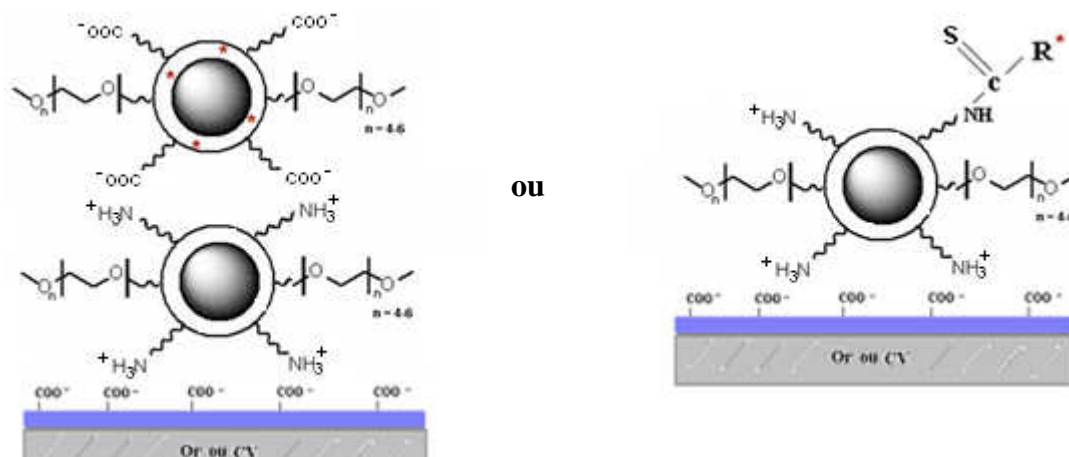
### 3.6. Fonctionnalisation des nanoparticules

#### 3.6.1. Introduction et principe

Après avoir immobilisé des nanoparticules porteuses de groupements aminés sur des substrats d'or, notre objectif est de fonctionnaliser ces nanoparticules immobilisées. Pour cela, nous proposons d'utiliser les groupements  $\text{NH}_2$  encore réactifs des nanoparticules non fluorescentes pour développer des interactions avec des groupements  $\text{COOH}$  d'une autre espèce, cette fois-ci, fluorescente. Nous pourrions ainsi suivre par fluorescence la formation d'une nouvelle couche. Deux types d'espèces ont été retenus : des petites molécules, type fluorescéine, et une structure plus complexe composée de nanoparticules fluorescentes aux propriétés identiques à celles précédemment utilisées mais avec des groupements  $\text{COOH}$  à la place des groupements  $\text{NH}_2$  (schéma 5).

Deux types d'interaction sont envisageables pour chaque espèce : des interactions de nature électrostatique (un exemple est illustré sur le schéma 5 gauche avec les nanoparticules  $\text{COOH}$ ) ou covalente (un exemple est illustré sur le schéma 5 droite avec l'isothiocyanate de fluorescéine). Selon les conditions de réaction et les réactifs choisis, décrits plus loin, nous espérons favoriser l'une ou l'autre des interactions.

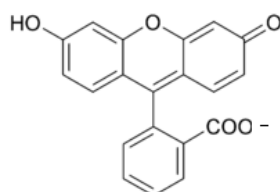




**Schéma 5 :** Principe de fonctionnalisation des nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$  par des nanoparticules fluorescentes fonctionnalisées  $\text{COOH}$ , exemple, selon des interactions électrostatiques (à gauche) ou par une molécule, exemple : isothiocyanate de fluorescéine, selon des interactions covalentes (à droite).

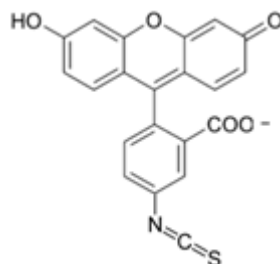
### 3.6.2. Fonctionnalisation par la fluorescéine

La fluorescéine est une petite molécule fluorescente comprenant une fonction carboxylique de  $\text{pK}_a=6.3$  :



Nous diluons ce composé dans quelques gouttes d'acétone puis dans un tampon phosphate PBS (de pH 7.5) titré à 1 mg/mL. À ce pH, les fonctions carboxyliques sont déprotonées, ce qui favorise des interactions électrostatiques avec les fonctions amines protonées libres des nanoparticules immobilisées. Nous laissons alors interagir ces dernières avec la solution de fluorescéine avant rinçage à l'eau.

Pour favoriser les interactions covalentes, nous avons utilisé l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, fluorescein isothiocyanate en anglais) qui est une molécule de fluorescéine fonctionnalisée avec un groupe réactif isothiocyanate ( $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ ).

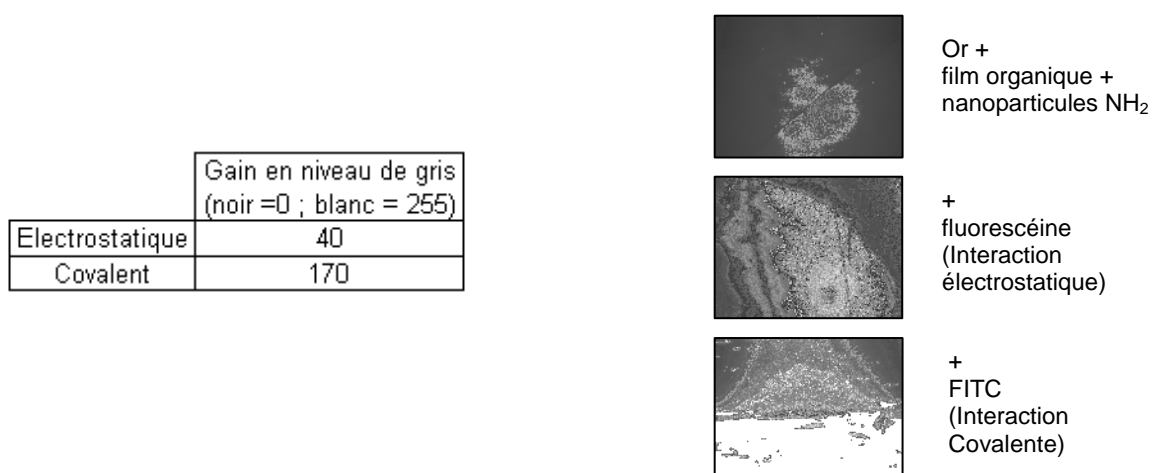


Ce dérivé réagit avec les nucléophiles comme les groupements amines pour former un thioamide (schéma 5 droite).

Nous pratiquons la même procédure de dilution que pour la fluorescéine (pH 7.5), bien qu'on recommande usuellement un pH=9 pour cette réaction. En effet, l'expérience a montré qu'à pH 9 on dénature la coquille de silice des nanoparticules. Nous laissons alors interagir les nanoparticules immobilisées avec la solution de FITC pendant une nuit puis nous rinçons à l'eau.

Comme la taille de la molécule de fluorescéine est négligeable devant la taille et la rugosité de la première couche de nanoparticules, l'ellipsométrie ne permet pas de détecter la présence de cette petite molécule sur la surface. L'analyse par infrarouge ne permet pas, non plus, de détecter cette molécule en raison de la forte intensité de la bande Si-O.

Par contre, la fluorescence permet de mettre en évidence l'immobilisation de la fluorescéine et de montrer que l'immobilisation est beaucoup plus intense dans le cas du FITC où nous avons favorisé les interactions covalentes (rapport des intensités de fluorescence 170/40).



**Figure 15 :** Images par fluorescence des nanoparticules  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> non fluorescentes fonctionnalisées par la fluorescéine

Il semble donc possible de fonctionnaliser les nanoparticules par des molécules fluorescentes.

### 3.6.3. Fonctionnalisation par des nanoparticules

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à favoriser une interaction entre deux nanoparticules. Pour cela, nous avons utilisé des nanoparticules fluorescentes fonctionnalisées COOH aux propriétés identiques à celles des nanoparticules fonctionnalisées NH<sub>2</sub>

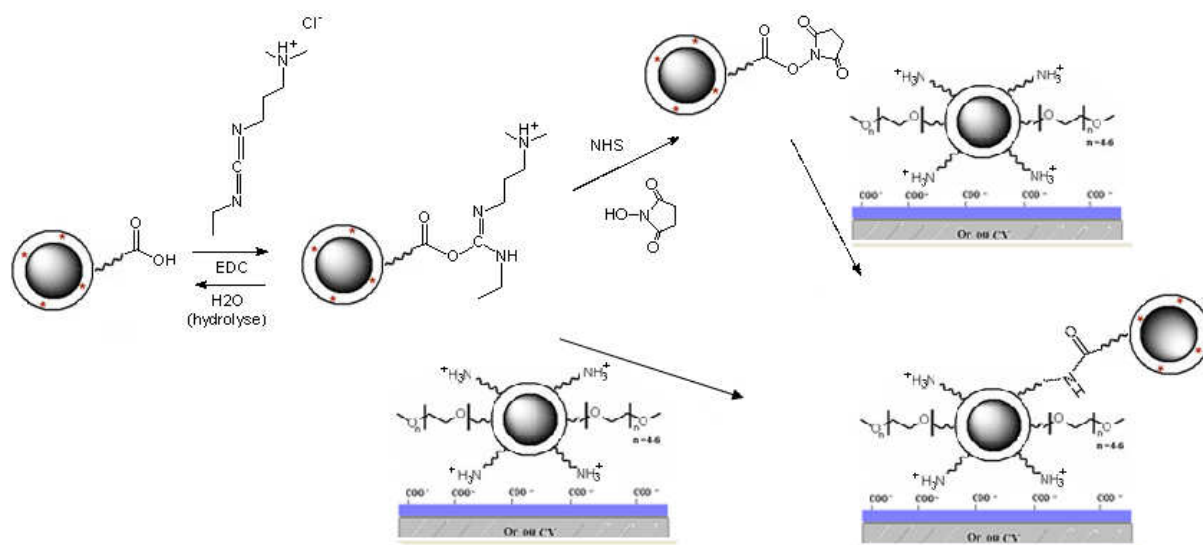
immobilisées sur un wafer d'or modifié. Comme pour la fluorescéine, nous avons cherché à étudier les deux types d'interaction entre ces deux groupements fonctionnels.

Pour le cas le plus simple, nous avons mis les deux types de nanoparticules en contact pendant 10 min

dans une solution de pH neutre (tampon PBS). Ainsi, les fonctions carboxyles des nanoparticules libres sont déprotonées et les fonctions amines des nanoparticules immobilisées sont protonées, ce qui favorise des interactions électrostatiques entre les deux particules (schéma 5 gauche).

Pour accrocher une fonction amine de façon covalente à une fonction acide carboxylique, celui-ci doit être transformé en ester portant un bon groupement partant. Ainsi, le carbone de la liaison carboxylique devient très réactif et, en présence d'une amine, il forme un amide stable. Nous faisons alors réagir en solution tampon neutre et pendant une nuit les nanoparticules acides avec un carbodiimide : le N-éthyl-N'-(3-(diméthylamino)propyl)carbodiimide (EDC) en présence du N-hydroxysuccinimide (NHS). La réaction passe par l'addition du groupement OH de l'acide carboxylique sur le carbone électrodéficient de l'EDC pour former un intermédiaire instable, puis par une attaque nucléophile par le NHS pour former l'ester NHS (cf. schéma 6).

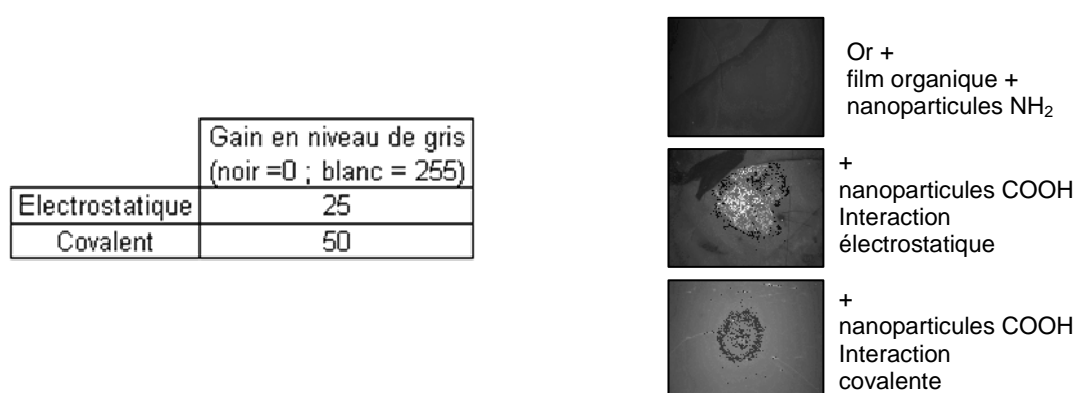
Les surfaces des nanoparticules terminées par l'ester de succinimidyle réagissent alors avec les nanoparticules immobilisées comportant des groupements amines. Nous obtenons ainsi deux nanoparticules liées par une liaison amide stable.



**Schéma 6 :** Représentation schématique de la réaction d'activation des nanoparticules fluorescentes COOH pour la fonctionnalisation des nanoparticules NH<sub>2</sub> selon des interactions covalentes.

### Fluorescence

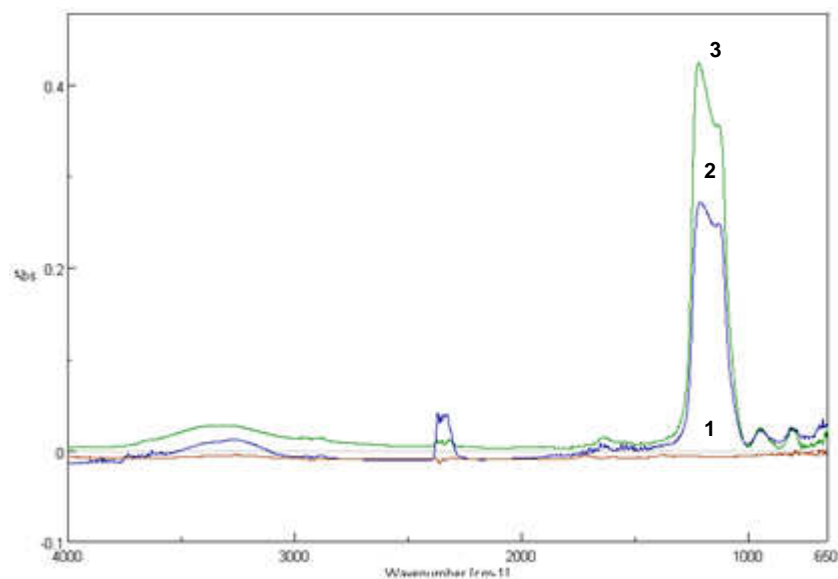
Les résultats de fluorescence obtenus pour les deux types d'interactions étudiées sont présentés sur la figure 16. Ils montrent que globalement le greffage des nanoparticules COOH sur des nanoparticules NH<sub>2</sub> est possible, mais relativement modeste dans les deux cas. Comme dans le cas de la fluorescéine, l'immobilisation des nanoparticules COOH est plus importante dans les conditions d'interactions covalentes (rapport des intensités de fluorescence de 2), mais étant donné la différence entre les durées de réaction et ce faible rapport, nous ne pouvons pas tirer plus de conclusion.



**Figure 16 :** Images par fluorescence des nanoparticules  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> non fluorescentes fonctionnalisées par des nanoparticules fluorescentes substituées COOH.

### IRRAS

Nous avons caractérisé par infrarouge le greffage de la deuxième couche de nanoparticules en suivant à chaque étape l'évolution de l'aire du pic associé au signal des Si-O de la coquille des nanoparticules, vers 1150 cm<sup>-1</sup> (cf. Figure 17 ). Les spectres obtenus entre la première et la deuxième couche de nanoparticules montrent un gain de 10 à 30 % dans le cas des interactions électrostatiques. Il est de l'ordre de 40 % lorsque nous favorisons les interactions covalentes.



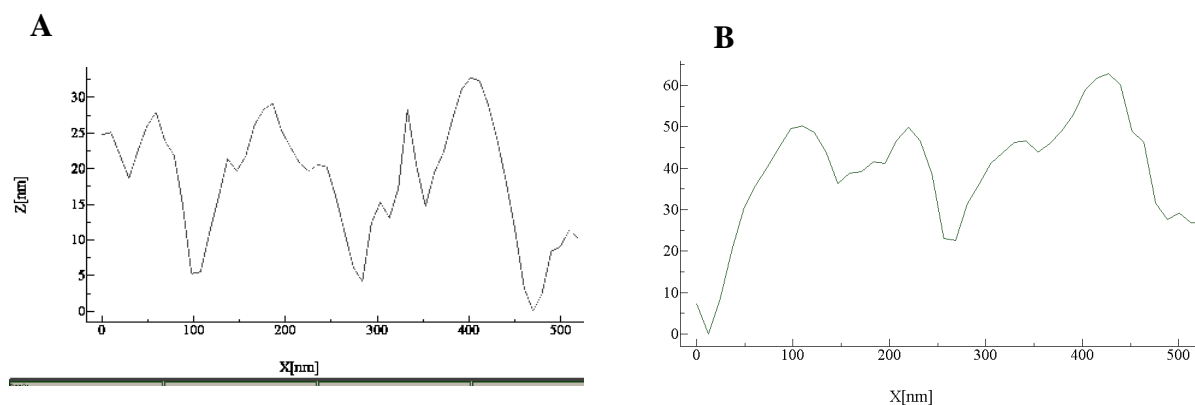
**Figure 17** : Spectres IRRAS après greffage sur un wafer d'or du film carboxyphényle (spectre 1, rouge), après immobilisation des nanoparticules  $\text{NH}_2$  (spectre 2, bleu), après greffage peptidique des nanoparticules  $\text{COOH}$  (spectre 3, vert)

Les spectres infrarouges obtenus sur des surfaces témoins montrent que les interactions entre nanoparticules  $\text{COOH}$  et la surface d'or nue ainsi qu'entre nanoparticules  $\text{COOH}$  et la couche de diazoniums sont négligeables. La modification des spectres IRRAS résulte donc uniquement des interactions entre les nanoparticules de nature différente. Notons que les nanoparticules  $\text{COOH}$  n'ont pas le même comportement que les nanoparticules  $\text{NH}_2$ , qui adhèrent faiblement sur or nu (cf Figure en 3.5.2.).

### AFM

Vu la forte densité de la première couche de nanoparticules  $\text{NH}_2$  sur l'image AFM, il était difficile de mettre en évidence une nouvelle couche de nanoparticules, sachant que les nanoparticules  $\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$  ont la même forme et la même taille.

Néanmoins, le profil du film à courte distance (100 nm) après réaction avec les nanoparticules  $\text{COOH}$  (échantillon B) est moins accidenté que lorsque seules les nanoparticules  $\text{NH}_2$  sont présentes (échantillon A). La différence des profils A et B montre qu'il y a par endroits une bicouche.



**Figure 18** : profil AFM d'une couche de nanoparticules  $\text{NH}_2$  immobilisées sur un wafer d'or modifié (A) et après ajout de nanoparticules  $\text{COOH}$  (B). zéro relatif.

### Ellipsométrie

L'analyse par ellipsométrie montre que l'épaisseur moyenne du film augmente légèrement (~20 %) après réaction avec les nanoparticules  $\text{COOH}$ . Ceci indique que le taux de fonctionnalisation de la couche de nanoparticules  $\text{NH}_2$  par des nanoparticules  $\text{COOH}$  est faible.

### MEB

Une image de microscopie électronique à balayage montre, de la même façon, une légère augmentation (~5%) du taux de recouvrement lorsque l'on fait réagir les nanoparticules  $\text{COOH}$ . Sachant que le taux de recouvrement par la première couche  $\text{NH}_2$  était déjà élevé (~90%), on ne pouvait pas s'attendre à une augmentation supérieure à 10%.

### Electrochimie

Les mesures électrochimiques (voltamétrie cyclique) sur carbone vitreux ne varient pas lorsque l'on fait réagir les nanoparticules  $\text{COOH}$ . Ceci s'explique par le faible rendement d'immobilisation de la deuxième couche.

### Corrélation entre les différentes méthodes d'analyse

Au vu des résultats présentés ci-dessus, nous pouvons conclure qu'il est possible d'immobiliser une deuxième couche de nanoparticules, mais la réaction est peu efficace et la couche est peu homogène.

Les résultats obtenus par différentes techniques d'analyse sur les différentes étapes de greffage sont résumés dans le tableau ci dessous :

surface	IR	AFM	Profilométrie	éllipsométrie	MEB	Electrochimie
or+ $\phi$ -COOH + np NH <sub>2</sub>	50	100% 40 nm	50 nm	20-40 nm	90%	
or+ $\phi$ -COOH + np NH <sub>2</sub> + np COOH	64 (~20%)	100% 40-60 nm	50 nm	26-50 nm (~20%)	95% (5%)	
cv+ $\phi$ -COOH + np NH <sub>2</sub>					60%	27%

$\phi$ -COOH: film organique de 4 carboxyphényle ; np : nanoparticules. nombres entre parenthèses : accroissement du taux de recouvrement ou de l'épaisseur par rapport à la première couche.

**Tableau 1 :** Taux de recouvrement et épaisseurs de film immobilisé lors des différentes étapes

Les valeurs d'IR correspondent aux aires de la bande de vibration des Si-O vers 1150 cm<sup>-1</sup>. Les pourcentages indiquent les taux de recouvrement de la surface par les nanoparticules. Les mesures données en nm indiquent les épaisseurs des couches formées. Les nombres entre parenthèses représentent l'accroissement du taux de recouvrement ou de l'épaisseur par rapport à la première couche.

Ces valeurs sont en bon accord. Elles montrent que les taux de recouvrement sont élevés. Nous notons, par ailleurs, un certain écart entre les résultats MEB et ceux obtenues par les autres techniques. En effet, lors du calcul du taux de recouvrement des nanoparticules à partir des images, nous ne nous sommes intéressés qu'à la surface non couverte, c'est-à-dire que nous n'avons pas pris en compte les nanoparticules superposées.

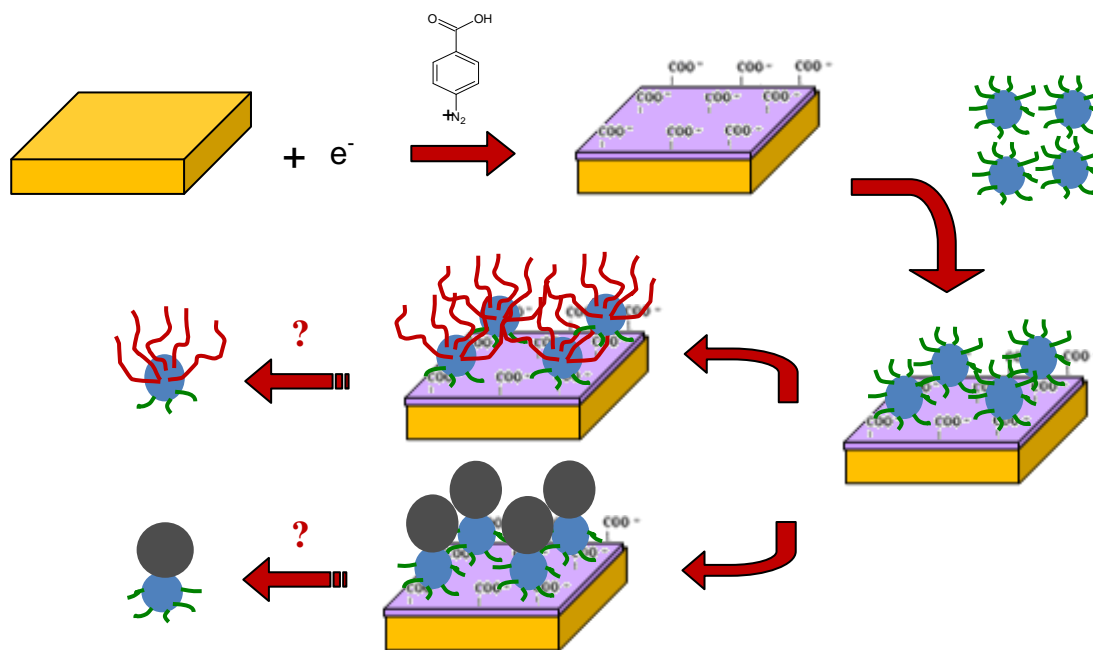
D'autre part, la différence de 10% entre les mesures MEB et l'AFM peut être due à la présence d'un artefact en résolution latérale de la mesure AFM qui dépend de la taille du pas du balayage et de la taille de la pointe. En générale, l'AFM est mieux adaptée pour mesurer des marches (très bonne résolution verticale).

Pour les mesures électrochimiques, le taux estimé correspond à la surface de contact entre les nanoparticules et l'électrode, en tenant compte de la géométrie sphérique des nanoparticules. Les sondes rédox peuvent alors passer librement entre les nanoparticules pour atteindre la surface de l'électrode. Ceci peut être favorisé par les forces d'attraction entre les nanoparticules chargées positivement et le ferrocyanure chargé négativement. Les deux estimations par MEB (60%) et électrochimie (~30%) sont en bon accord parce que l'estimation MEB prend en compte le volume global greffé (défauts compris) ( $V_{tot}$ ) alors que l'estimation par électrochimie prend en compte le volume réel occupé ( $V_{occupé}$ ).

### 3.7. Rupture des interactions nanoparticules/substrat ?

On peut envisager d'utiliser nos supports pour fabriquer des nanoparticules asymétriques de type « Janus » [42]. Pour cela, il faudrait 1) fonctionnaliser les nanoparticules une fois qu'elles sont immobilisées sur le support, de façon à ne modifier que la surface des nanoparticules  $\text{NH}_2$  qui n'est pas en interaction avec le support et 2) décoller les nanoparticules asymétriques obtenues (cf. schéma 7). Les nanoparticules asymétriques peuvent avoir des applications dans la manipulation d'objets biologiques ou colloïdaux ainsi que dans les domaines d'analyse en raison de leurs propriétés particulières liées à leur asymétrie.

Nous avons abordé rapidement le problème du décollement des nanoparticules en essayant de trouver des conditions expérimentales permettant de rompre les interactions nanoparticules/substrat afin de décoller les nanoparticules.



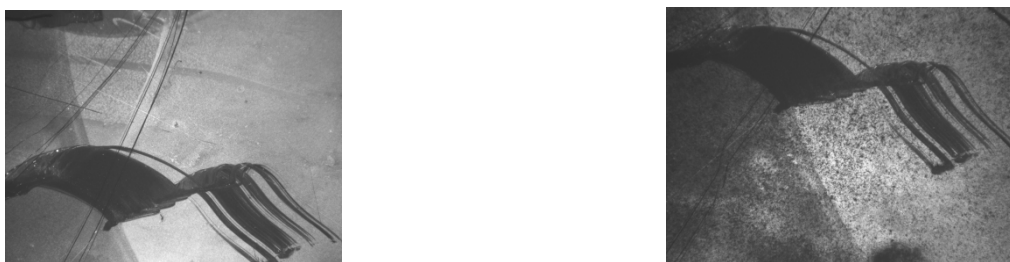
*Schéma 7 : principe de notre procédure pour l'obtention de nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$  asymétriques.*

Nous avons utilisé des nanoparticules fluorescentes et nous avons suivi leur décollement par fluorescence. Diverses méthodes ont été testées pour faire diminuer ou disparaître le signal de fluorescence.

Nous avons observé que dès que la surface fonctionnalisée avait été en contact avec l'air, des rinçages, même énergiques (à l'eau ou avec une solution acide HCl 1M suivie d'une sonification pendant une heure) ou l'application de potentiels aux limites du domaine



d'électroactivité du solvant, aussi bien en oxydation qu'en réduction, ne permettaient pas de modifier significativement le signal de fluorescence (cf. Figure 19).

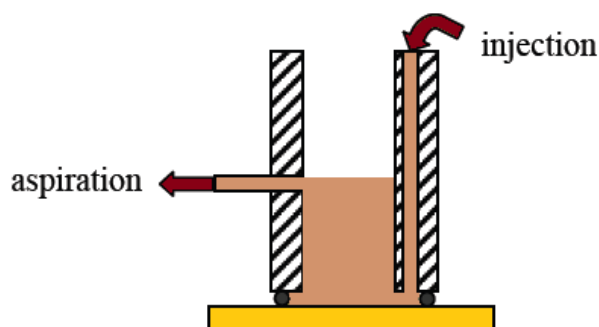


**Figure 19 :** Photos par fluorescence de nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$  fonctionnalisées  $\text{NH}_2$  fraîchement immobilisées sur un wafer d'or modifié (gauche) après 20 voltamétries cycliques de -0.9 à 0.9 V dans l'eau (droite).

Suite à cette difficulté, notre stratégie s'est orientée vers l'utilisation d'un dispositif permettant de maintenir la surface en contact permanent avec la solution et d'assurer ainsi une fonctionnalisation et un rinçage en continu.

Pour cela, nous avons développé une microcellule à écoulement dans laquelle on peut injecter et aspirer par trompe à vide une solution de façon à préserver continuellement un volume contrôlé ( $\sim 250\ \mu\text{L}$ ) au dessus du substrat (schéma 8).

Une fonctionnalisation de la surface par les nanoparticules puis un rinçage acide de la surface via ce dispositif nous a permis de réduire considérablement la réponse de fluorescence. Un rinçage à l'eau a aussi été testé, mais le résultat manquait de reproductibilité.



**Schéma 8:** Représentation en coupe de la cellule à écoulement pour l'étude de la rupture des interactions nanoparticules/substrat.

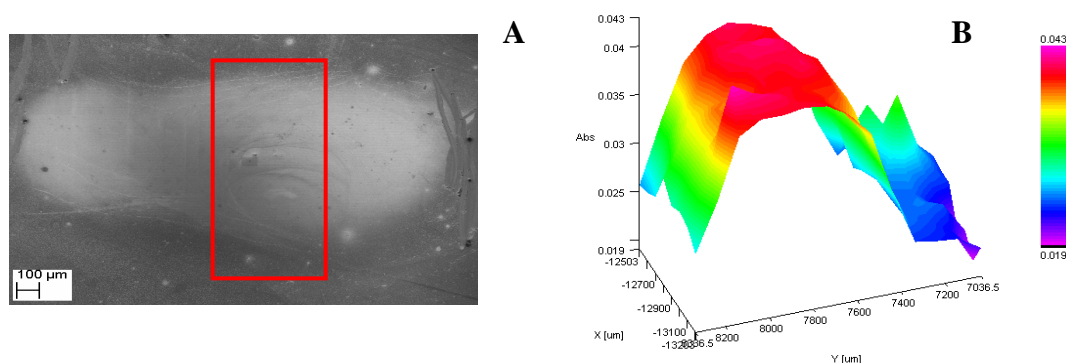
Il serait alors judicieux de continuer à optimiser la procédure en utilisant un microcanal fluide qui assurera en plus de la continuité du flux, un meilleur taux d'immobilisation et de récupération des nanoparticules en augmentant le rapport surface sur volume.

#### 4. Immobilisation de nanoparticules sur une surface de polystyrène modifiée

L'étape d'immobilisation des nanoparticules étant maîtrisée sur des substrats conducteurs modifiés par des groupes carboxyliques, nous avons appliqué cette méthode d'immobilisation sur nos surfaces de polystyrène localement modifiées. En effet, nous avons montré dans le chapitre que l'oxydation de la surface du polystyrène engendre, entre autres, des fonctions carboxyliques. L'idée serait alors de parvenir à immobiliser les nanoparticules d'une manière localisée.

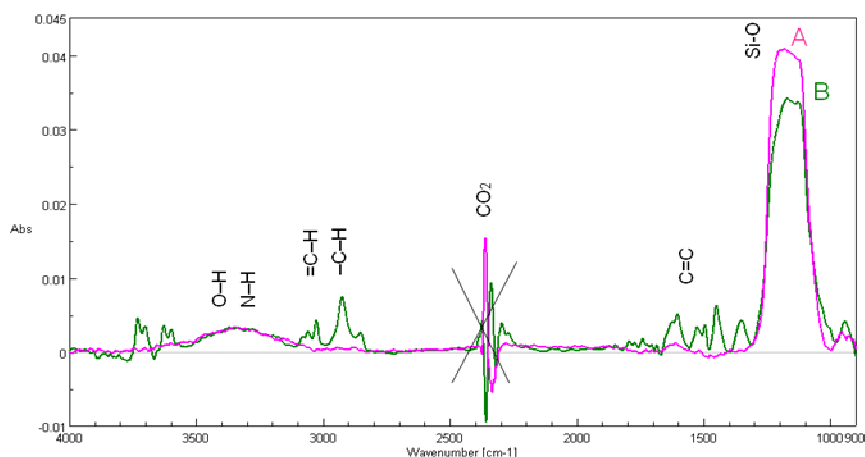
Pour faciliter la caractérisation de la surface modifiée, nous avons déposé par polymérisation radicalaire (ATRP) sur une surface d'or une fine couche de polystyrène de quelques dizaines de nanomètres. Nous avons ensuite oxydé localement la surface du film de polystyrène en suivant la procédure précédemment présentée, mais en utilisant cette fois-ci une électrode de plus grande taille (250  $\mu\text{m}$ ). Une image de microscopie électronique (figure 20 A) montre le résultat de l'immobilisation des nanoparticules magnétiques cœur-coquille  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$  fonctionnalisées par des groupements amines et polyéthylène glycols sur le support localement oxydé. Cette image montre que les nanoparticules sont immobilisées préférentiellement sur la zone modifiée électrochimiquement.

Ce résultat est confirmé par une image de microscopie IRRAS (figure 20 B) réalisée à l'intérieur et à l'extérieur de la zone modifiée sur la région du substrat encadrée sur la figure 20 A. Nous avons analysé plusieurs micro-zones et relevé pour chaque spectre l'absorbance de la bande de silice à  $1150\text{ cm}^{-1}$ . Les absorbances les plus importantes sont enregistrées à l'intérieur de la zone modifiée.



**Figure 20 :** images MEB (A) et de microscopie IRRAS (B), réalisées à l'intérieur du cadre rouge sur l'image A, de nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$  immobilisées sur une surface de polystyrène modifiée.

Nous avons comparé sur la figure 21 les spectres IRRAS de nanoparticules immobilisées sur polystyrène oxydé (spectre **B**, vert) et sur une surface d'or modifiée par des groupements carboxyliques via la réduction d'un sel de diazonium (spectre **A**, rose). Les deux spectres présentent des bandes de vibration de Si-O d'intensités voisines. Ceci montre que le polystyrène oxydé permet d'immobiliser aussi bien que la « surface modèle » les nanoparticules étudiées.



**Figure 21** : Spectres IRRAS des nanoparticules immobilisées sur un wafer d'or modifié par des groupements benzophényles (spectre **A**, rose) et sur une surface de polystyrène modifiée (spectre **B**, vert)

## 5. Conclusions et perspectives

Nous avons mis en évidence l'intérêt des groupements carboxyliques greffés pour l'immobilisation directe et dense de nanoparticules cœur-coquille  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$  amino fonctionnalisées sur des surfaces macroscopiques. Les groupements carboxyliques sont greffés sur des surfaces d'or ou de carbone vitreux via la réduction cathodique du 4 carboxyphényl diazonium. Cette approche offre la possibilité d'un assemblage dense rigide et irréversible des nanoparticules sur ces deux surfaces.

Plusieurs techniques d'analyses de surface (électrochimie, IRRAS, MEB, ellipsométrie, AFM, profilométrie) ont été utilisées pour caractériser les couches obtenues à l'issue des différentes étapes de l'assemblage.

La caractérisation par voltamétrie cyclique de la couche de nanoparticules formée n'est possible que sur carbone vitreux et parmi les deux sondes rédox utilisées, seul le ferrocyanure dans l'eau permet d'observer un effet. Les études par voltamétrie cyclique montrent que la

vitesse de transfert de charge d'une sonde rédox dépend de l'état de la surface de l'électrode et permet d'estimer un taux de recouvrement de celle-ci, aussi bien par le film organique que par les nanoparticules.

L'éventualité d'utiliser nos supports pour fabriquer des nanoparticules asymétriques de type « Janus » a été rapidement abordée. Nous avons montré qu'il était possible de réaliser un deuxième assemblage : nanoparticules  $\text{NH}_2$  / fluorescéine ou nanoparticules  $\text{NH}_2$  / nanoparticules  $\text{COOH}$ . Les essais que nous avons réalisés dans une cellule à écoulement montrent que la procédure serait mieux adaptée dans un système à flux continu du type microcanal fluidique. C'est dans cette voie que l'on pourrait poursuivre ces travaux. Il serait aussi intéressant de mener une étude en fonction du pH dans ces canaux afin de mieux contrôler l'immobilisation et le décollement des nanoparticules.

Finalement, nous avons immobilisé localement les nanoparticules cœur-coquille  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$  amino fonctionnalisées sur les motifs de polystyrène oxydé que nous avons réalisés par SECM.

## Références bibliographiques du chapitre 5

1. Gupta, S., et al., *Covalent immobilization of quantum dots on macroscopic surfaces using poly(acrylic acid) brushes*. Journal of Materials Chemistry, 2008. **18**(2): p. 214-220.
2. Shipway, A.N., E. Katz, and I. Willner, *Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications*. Chemphyschem, 2000. **1**(1): p. 18-52.
3. Michalet, X., et al., *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. Science, 2005. **307**(5709): p. 538-544.
4. Biju, V., T. Itoh, and M. Ishikawa, *Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(8): p. 3031-3056.
5. Wang, F., et al., *Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy*. Analyst, 2010. **135**(8): p. 1839-1854.
6. Agrawal, M., et al., *Polystyrene-ZnO composite particles with controlled morphology*. Chemistry of Materials, 2007. **19**(7): p. 1845-1852.
7. Klein, D.L., et al., *A single-electron transistor made from a cadmium selenide nanocrystal*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 699-701.
8. Kiely, C.J., et al., *Spontaneous ordering of bimodal ensembles of nanoscopic gold clusters*. Nature, 1998. **396**(6710): p. 444-446.
9. Taton, T.A., et al., *The DNA-mediated formation of supramolecular mono- and multilayered nanoparticle structures*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(26): p. 6305-6306.
10. Goss, C.A., D.H. Charych, and M. Majda, *application of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane as a molecular adhesive in the fabrication of vapor-deposited gold electrodes on glass substrates*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(1): p. 85-88.
11. Chumanov, G., et al., *colloidal metal-films as a substrate for surface-enhanced spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**(23): p. 9466-9471.
12. Freeman, R.G., et al., *self-assembled metal colloid monolayers - an approach to sers substrates*. Science, 1995. **267**(5204): p. 1629-1632.
13. Grabar, K.C., et al., *preparation and characterization of au colloid monolayers*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(4): p. 735-743.
14. Shavel, A., N. Gaponik, and A. Eychmuller, *Covalent linking of CdTe nanocrystals to amino-functionalized surfaces*. Chemphyschem, 2005. **6**(3): p. 449-451.
15. Brust, M., et al., *synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2-phase liquid-liquid system*. journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 1994(7): p. 801-802.
16. Levy, R., et al., *Rational and combinatorial design of peptide capping Ligands for gold nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(32): p. 10076-10084.
17. Brust, M., et al., *Self-assembled gold nanoparticle thin films with nonmetallic optical and electronic properties*. Langmuir, 1998. **14**(19): p. 5425-5429.
18. Yamanoi, Y., et al., *Immobilization of gold nanoparticles onto silicon surfaces by Si-C covalent bonds*. Langmuir, 2004. **20**(4): p. 1054-1056.
19. Decher, G., *Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites*. Science, 1997. **277**(5330): p. 1232-1237.

20. Kotov, N.A., I. Dekany, and J.H. Fendler, *layer-by-layer self-assembly of polyelectrolyte-semiconductor nanoparticle composite films*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**(35): p. 13065-13069.
21. Lvov, Y., et al., *Alternate assembly of ordered multilayers of SiO<sub>2</sub> and other nanoparticles and polyions*. Langmuir, 1997. **13**(23): p. 6195-6203.
22. Lvov, Y., et al., *A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 1999. **146**(1-3): p. 337-346.
23. Ostrander, J.W., A.A. Mamedov, and N.A. Kotov, *Two modes of linear layer-by-layer growth of nanoparticle-polyelectrolyte multilayers and different interactions in the layer-by-layer deposition*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(6): p. 1101-1110.
24. Mornet, S., et al., *Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy*. Journal of Materials Chemistry, 2004. **14**(14): p. 2161-2175.
25. Maurice, V., et al., *Synthesis and characterization of functionalized core-shell [gamma]Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> nanoparticles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2009. **321**(10): p. 1408-1413.
26. Bacri, J.C., et al., *Magnetic colloidal properties of ionic ferrofluids*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1986. **62**(1): p. 36-46.
27. Delamar, M., et al., *Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(14): p. 5883-5884.
28. Adenier, A., et al., *Covalent modification of iron surfaces by electrochemical reduction of aryldiazonium salts*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(19): p. 4541-4549.
29. deVilleneuve, C.H., et al., *Electrochemical formation of close-packed phenyl layers on Si(111)*. Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(14): p. 2415-2420.
30. Dyke, C.A. and J.M. Tour, *Solvent-free functionalization of carbon nanotubes*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(5): p. 1156-1157.
31. Jian, W., et al., *Surface functionalization of ultrananocrystalline diamond films by electrochemical reduction of aryldiazonium salts*. Langmuir, 2004. **20**(26): p. 11450-11456.
32. Combellas, C., et al., *Surface modification of halogenated polymers. 4. Functionalisation of poly(tetrafluoroethylene) surfaces by diazonium salts*. Polymer, 2003. **44**(1): p. 19-24.
33. Adenier, A., et al., *Grafting of nitrophenyl groups on carbon and metallic surfaces without electrochemical induction*. Chemistry of Materials, 2005. **17**(3): p. 491-501.
34. Pandurangappa, M., N.S. Lawrence, and R.G. Compton, *Homogeneous chemical derivatisation of carbon particles: a novel method for functionalising carbon surfaces*. Analyst, 2002. **127**(12): p. 1568-1571.
35. Bureau, C. and J. Pinson. 2007, Brevet PCT WO2007/048894.
36. Gueshi, T., K. Tokuda, and H. Matsuda, *Voltammetry at partially covered electrodes .1. chronopotentiometry and chronoamperometry at model electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1978. **89**(2): p. 247-260.
37. Gueshi, T., K. Tokuda, and H. Matsuda, *Voltammetry at partially covered electrodes .2. linear potential sweep and cyclic voltammetry*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1979. **101**(1): p. 29-38.
38. Tokuda, K., T. Gueshi, and H. Matsuda, *Voltammetry at partially covered electrodes .3. faradaic impedance measurements at model electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1979. **102**(1): p. 41-48.

39. Amatore, C., J.M. Saveant, and D. Tessier, *Charge-transfer at partially blocked surfaces - a model for the case of microscopic active and inactive sites*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1983. **147**(1-2): p. 39-51.
40. Nicholson, R.S., *Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics*. Analytical Chemistry, 1965. **37**(11): p. 1351.
41. Paulik, M.G., et al., *Grafting aryl diazonium cations to polycrystalline gold: Insights into film structure using gold oxide reduction, redox probe electrochemistry, and contact angle behavior*. Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(21): p. 7808-7815.
42. Wang, B., et al., *Amphiphilic Janus Gold Nanoparticles via Combining "Solid-State Grafting-to" and "Grafting-from" Methods*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(35): p. 11594-11595.





## Conclusion générale

---

Les recherches menées au cours de ce travail concernent la réalisation de modifications électrochimiques adaptées à l'immobilisation spécifique d'entités essentiellement biologiques ou de nanoparticules. Pour cela, nous avons sélectionné principalement le polystyrène et des monocouches fluorées auto-assemblées comme supports de nos modifications. Parmi les diverses voies de fonctionnalisation localisée de surface, nous avons choisi la microscopie électrochimique et nous avons utilisé la sonde du SECM pour électrogénérer différentes espèces susceptibles de réagir avec la surface à modifier.

Sur les supports fluorés, nous avons tout d'abord réduit localement la surface au moyen des électrons solvatés, obtenus dans l'éthylène diamine sec contenant du tétrafluoroborate de lithium. Ce traitement a été caractérisé par des analyses de microscopie XPS, microscopie ToF-SIMS et de condensation d'eau. Nous avons montré que l'adhésion de cellules biologiques est possible sur une surface fluorée réduite de grande dimension. Pour des dimensions micrométriques, nous avons post-fonctionné la zone réduite par des réactions chimiques. Ceci permet, d'une part, d'augmenter le contraste d'hydrophobie entre le support fluoré et les motifs réduits et d'autre part, d'y immobiliser des entités facilement identifiables par fluorescence (fluorescéine), ou microscopie optique (particules d'or), ainsi que des cellules humaines vivantes.

Nous avons ensuite exploité différentes voies électrochimiques d'oxydation localisée de surfaces de polymères hydrogénés tels que le polystyrène ou le cyclo olefine copolymer (COC). Les motifs oxydés étant plus hydrophiles que la surface vierge, nous avons utilisé la condensation d'eau comme moyen de visualisation et de mesure de la taille des modifications réalisées. La densité des gouttes d'eau qui se condensent au niveau des motifs renseigne sur le rendement de l'oxydation de la surface. Nous avons comparé les capacités oxydantes du cation  $\text{Ag}^{2+}$ , des radicaux  $\text{NO}_3^\cdot$  et  $\text{HO}^\cdot$ . Les meilleurs résultats sont obtenus avec  $\text{Ag}^{2+}$ .

Les motifs oxydés ont été également caractérisés par des méthodes physiques (XPS, FT-IRRAS). Le traitement oxydant a pour effet de générer des fonctions oxygénées, ce qui augmente l'hydrophilie de la surface. Pour corroborer la présence de certaines fonctions chimiques dans les motifs et comprendre leur rôle sur l'adhésion d'espèces biologiques, nous avons testé les motifs oxydés vis-à-vis de l'adhésion de protéines modèles. Ces supports à motifs ont finalement permis le confinement de cellules de lignées adhérentes. Ils sont sélectifs par rapport aux propriétés adhésives de certaines cellules de culture primaire. Ils sont

également robustes et un an après fabrication, ils conservent leurs propriétés et sont réutilisables.

Après avoir tracé des motifs oxydés sur un substrat de polystyrène, nous avons étudié par électrochimie le mécanisme d'oxydation du polystyrène par  $\text{Ag}^{2+}$ . Nous avons interprété les courbes d'approche SECM en tenant compte, d'une part de la réaction homogène de décomposition de  $\text{Ag}^{2+}$  en solution et d'autre part, de la réaction hétérogène d'attaque de la surface par ce réactif. Nous avons montré que la cinétique est régie par la perméation de l'espèce rédox dans le film de polymère oxydé qui est plus hydrophile que le polymère de départ.

Enfin, nous avons tenté d'utiliser les motifs de polystyrène oxydé par SECM pour immobiliser des architectures nanostructurées fonctionnalisables à bases de nanoparticules magnétiques. Ces entités fonctionnelles font, en effet, l'objet d'une recherche intense en vue de leur intérêt potentiel dans différents domaines. Le contrôle et la compréhension des processus d'immobilisation de nanoparticules sur des surfaces fonctionnelles sont des étapes fondamentales à la fabrication d'architectures nanostructurées fonctionnelles. Elles sont primordiales pour le développement de capteurs, de surfaces présentant des propriétés catalytiques, de bioessais ou de matériaux pour l'énergie. Dans ce contexte, nous avons exploré les possibilités d'assemblage sélectif de nanoparticules d'oxyde de fer sur des surfaces de polystyrène à motifs. Nous avons tout d'abord exploré les interactions possibles entre des nanoparticules d'oxyde de fer et des surfaces oxygénées modèles. Ces dernières sont obtenues aisément par électrogreffage d'un sel de diazonium substitué par un groupement carboxylique sur une surface conductrice. Plusieurs techniques d'analyses de surface ont montré un assemblage dense et irréversible des nanoparticules sur les surfaces modifiées. Nous avons ensuite évalué la possibilité de fonctionnaliser ces couches de nanoparticules dans le but d'utiliser ces assemblages de nanoparticules comme support pour la synthèse de nanoobjets dissymétriques. De premiers essais montrent qu'un deuxième assemblage de nanoparticules et donc la nanostructuration chimique de l'architecture sont possible. La procédure d'assemblage doit toutefois être optimisée, l'utilisation de cellules microfluidiques devrait être prometteuse. Elle permettrait notamment de mieux apprécier les paramètres physico-chimiques (force ionique, pH, chimie de surface, sollicitation électrochimique, etc...) qui contrôlent l'immobilisation et plus particulièrement le décollement des nanoparticules. Dans ce cadre, il faut pouvoir transposer ces résultats à des matériaux utilisés pour la microfabrication de cellules microfluidiques. C'est pourquoi nous avons transposé ce travail à

une surface de polymère (PS) et montré que les nanoparticules amino fonctionnalisées sont immobilisées spécifiquement sur des motifs de polystyrène oxydé réalisés par SECM.

L'ensemble de nos résultats montre comment utiliser le SECM pour modifier localement des supports fluorés et des polymères hydrogénés. Ces deux exemples sont des cas où la réduction (verres fluorés) ou l'oxydation (polymères hydrogénés) est difficile et nécessite des espèces électrogénérées très réactives. Ces résultats sont transposables aisément aux matériaux (pressentis et) utilisés pour la microfabrication de dispositifs microfluidiques. Ils ont été transposés au COC par exemple. La méthode s'applique à toute surface possédant des propriétés redox. La taille des motifs dépend de paramètres imposés par l'expérimentateur comme le temps de réaction, la distance microélectrode-substrat, la nature et la concentration de l'espèce qui transfère les électrons (médiateur redox). Elle dépend également de la chimie et de la structuration de la surface et de réactions secondaires liées au médiateur redox (instabilité chimique, réaction chimique avec la surface, ...).

Même dans les cas favorables (par exemple, réduction d'une surface bromée), cette méthode d'écriture par balayage est lente par rapport aux méthodes physiques telles que la photolithographie. Si ce défaut n'est pas gênant en recherche, il le devient si on veut fabriquer des supports à grande échelle. La SECM offre néanmoins une plus grande souplesse d'utilisation pour réaliser n'importe quel motif bidimensionnel. L'utilisation de sondes constituées d'une bande (ou d'un tampon pour des géométries plus complexes) devrait permettre de circonvenir ce problème.

L'intérêt de l'approche lithographique électrochimique proposée dans ce travail est illustré par l'étude des propriétés physico-chimiques des surfaces localement modifiées. Nous avons mis en évidence leur capacité à interagir spécifiquement avec des cellules biologiques ou des nanoparticules fonctionnalisées. Ce travail ouvre la voie à des applications dans les domaines de la biologie, des matériaux ou des nanosciences. Parmi d'autres, ce travail définit des voies de fabrication de puces cellulaires permettant l'immobilisation ou l'assemblage spécifique de cellules ou le tri cellulaire, ou de supports permettant la synthèse de nanoparticules fonctionnelles dissymétriques (nanoobjets de type Janus), ou d'architectures nanostructurées à haute densité de nanoobjets magnétiques, étape primordiale à la définition de supports pour mettre en œuvre des phénomènes d'hyperthermie par application d'un champ magnétique.



## Annexe1 :

## Angles de contact et condensation

I. Angles de contact

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur un solide homogène, en présence d'un second fluide (liquide ou gaz), deux situations sont envisageables : soit le liquide s'étale complètement, nous sommes dans le cas du mouillage total, soit le liquide forme une goutte et nous sommes dans le cas du mouillage partiel. Ces deux situations sont caractérisées par le paramètre d'étalement  $S$ , défini par :

$$S = E_{\text{sec}}^{\text{substrat}} - E_{\text{mouillé}}^{\text{substrat}}$$

$$S = \gamma_s - (\gamma_{SL} + \gamma)$$

Les trois tensions sont respectivement la tension superficielle solide/air, solide/liquide, liquide/air. La tension de surface solide/vapeur correspond à la tension de surface du solide en équilibre avec la vapeur du liquide.

Dans le cas du mouillage total,  $S \geq 0$ , l'angle de contact est nul : le solide est recouvert d'une couche de liquide dont l'épaisseur nanométrique dépend de l'équilibre entre forces moléculaires et capillaires.

Lorsque  $S < 0$ , nous sommes dans le cas du mouillage partiel. Il existe alors une interface entre le liquide, le solide et la vapeur appelée ligne triple ou ligne de contact. Dans ce cas, nous pouvons définir un angle de contact résultant de l'équilibre des forces par unité de longueur (tensions superficielles) (cf. Fig. 7). Cet équilibre se traduit par la loi de Young :

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma \cos \theta_0$$

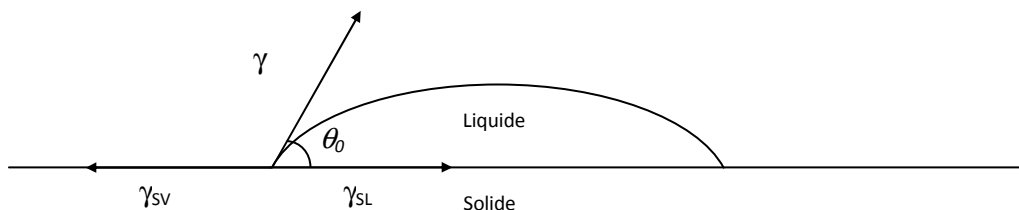


Fig. 1 : Représentation d'une goutte sur un solide pour un angle de contact non nul

L'angle  $\theta_0$  représente un angle à l'équilibre et n'a de sens que si la surface est idéalement lisse, homogène, plane et non déformable. En général, le système est dans un état métastable qui résulte d'une certaine hétérogénéité de surface (rugosité, hétérogénéité chimique). Il

choisit un angle métastable en fonction du volume de la goutte, des vibrations extérieures et de la manière dont la goutte est déposée. Dans ce cas, pour caractériser la surface, il est préférable d'utiliser les angles avançants et reculants. L'angle avançant  $\theta_a$  est obtenu en gonflant une goutte jusqu'à ce que l'angle de contact atteigne un palier. L'angle reculant  $\theta_r$  est obtenu en aspirant une goutte jusqu'à atteindre un palier. (cf. Fig. 2)

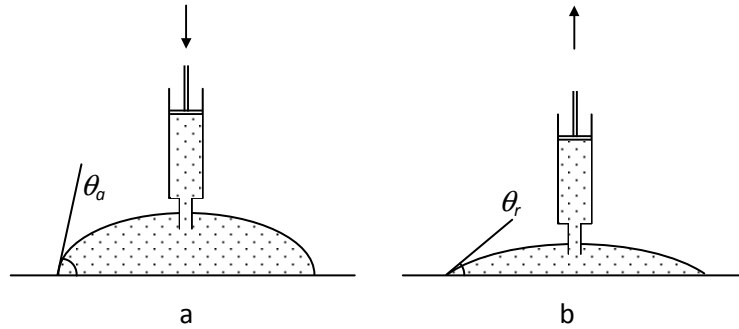


Fig.2 : Mesure de (a) l'angle avançant, (b) l'angle reculant

La différence entre ces deux angles est appelée hystérésis  $\varepsilon$ . L'hystérésis doit son origine aux irrégularités de surface. Ses sources sont multiples. La rugosité de la surface dépend de la préparation de la surface et de sa structure. Le matériau solide n'est pas forcément homogène chimiquement ou il peut avoir été contaminé par l'adsorption de gaz ou de liquide. Ainsi, si la surface a déjà été en contact avec le liquide, la mesure de l'angle de contact est modifiée.

Lorsque l'hystérésis est forte, l'interprétation de l'angle de contact est délicate. Dans ce cas, c'est l'angle reculant qui est perturbé car pour le mesurer, le liquide est d'abord mis en contact avec la surface pour être ensuite retiré. L'angle avançant est donc utilisé de préférence pour déterminer l'énergie de surface.

Les angles de contact avançants nous ont servi à caractériser l'hydrophilie des surfaces modifiées de manière homogène. Le liquide que nous avons utilisé est de l'eau ultra pure (MilliQ grade).

## II. Condensation

### 1. Introduction

La condensation d'eau sur une surface froide est un phénomène de la vie de tous les jours. Les motifs formés par condensation de gouttelettes d'eau sur une surface froide sont appelés « breath figure » car il est possible de les obtenir en soufflant sur une surface. Ces motifs sont sensibles aux changements d'énergie de la surface sur laquelle les gouttes de vapeur se condensent. La condensation forcée d'eau sur nos échantillons est donc un bon moyen de caractériser indirectement les modifications localisées de surface. La condensation

de liquide sur une surface homogène d'angle de contact nul donne un film d'épaisseur croissante au cours du temps, alors que pour un angle de contact proche de  $90^\circ$  des gouttelettes se forment. La formation de film sur une surface homogène totalement mouillante ainsi que les mécanismes qui régissent la disposition et la croissance des gouttes sur une surface non mouillante ( $90^\circ$ ) ont beaucoup été étudiés dans la littérature<sup>i,ii,iii,iv,v,vi</sup>.

## 2. Quelques éléments de théorie

Dans le cas du mouillage total, il est possible de montrer que la variation de l'épaisseur  $e$  du film est monotone au cours du temps.

Pour un angle proche de  $90^\circ$ , la condensation se déroule selon quatre régimes. Le premier régime est un régime de nucléation, les gouttes apparaissent sur la surface. Le second régime est un régime de croissance : les gouttes grossissent et coalescent sans que de nouvelles gouttes n'apparaissent. Le troisième régime apparaît lorsque la coalescence des gouttes originales laisse suffisamment d'espace libre pour la nucléation et la croissance de nouvelles gouttes. Enfin dans le dernier régime, plusieurs générations de gouttes coexistent.

Lorsque l'angle de contact sur une surface homogène est inférieur à  $90^\circ$ , la condensation suit toujours les quatre régimes énoncés précédemment. Mais la diminution de l'angle de contact et l'hystérésis vont modifier certaines propriétés de ces régimes. En particulier :

- . le taux de nucléation augmente quand l'angle de contact diminue
- . la taille de la goutte augmente quand l'angle de contact diminue
- . l'hystérésis déforme les gouttes qui ne sont plus sphériques

Les deux premiers points entraînent une apparition du second régime, la coalescence est facilitée. L'hystérésis déforme d'autant plus les gouttes que l'angle de contact est petit. Celles-ci ne relaxent pas vers leur situation d'équilibre et ont un taux d'occupation de surface qui sature à une valeur plus forte que pour  $\theta_0 = 90^\circ$ . D. Beysens et C. Knobler montrent que le taux d'occupation de surface par le liquide  $\epsilon$  est tel que  $0,55 < \epsilon^2 < 0,95$  pour  $90^\circ > \theta_0 > 10^\circ$ <sup>vii</sup>. De plus, la saturation est atteinte plus rapidement lorsque l'angle de contact est plus faible. Il est donc possible d'estimer  $\theta_0$  à partir du taux de couverture pour  $\theta_0 \leq 90^\circ$

par l'expression :  $\theta_0 \sim \frac{(1 - \epsilon^2) \times 90}{1 - 0,55}$

Nous avons utilisé cette équation pour estimer la mouillabilité des motifs micrométriques que nous avons modifiés par SECM aussi bien sur les verres fluorés que les surfaces de polystyrène.

## Annexe 2 :

### L'ellipsométrie

L'ellipsométrie est une méthode optique permettant de déterminer les épaisseurs et les indices de réfraction d'un film homogène à la surface d'un substrat réfléchissant. Le principe de la mesure consiste à mesurer et analyser les variations d'amplitude et de phase d'un faisceau laser après sa réflexion sur le substrat

#### I. Principe de l'ellipsométrie

Lorsque l'on envoie une onde plane sur une surface réfléchissante, la réflexion modifie l'état de polarisation de la lumière. Afin de décrire cette modification, on définit les coefficients de réflexion parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence, respectivement  $r_p$  et  $r_s$  définis par :

$$r_p = \frac{E_{pr}}{E_{pi}} = |r_p| \exp(j\delta_p)$$

$$r_s = \frac{E_{sr}}{E_{si}} = |r_s| \exp(j\delta_s)$$

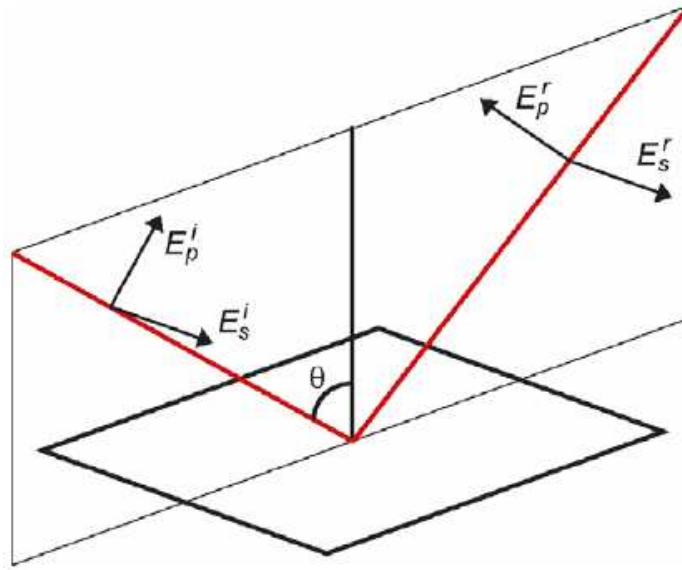
avec  $E_{pi}$  et  $E_{si}$ , respectivement les champs électriques parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence et  $E_{pr}$  et  $E_{sr}$  respectivement les champs électriques parallèle et perpendiculaire après réflexion (figure 1). Les coefficients  $r_p$  et  $r_s$  sont des nombres complexes. Leur module  $|r_p|$  et  $|r_s|$  représente la modification de l'amplitude du champ électrique et leur phase  $\delta_p$  et  $\delta_s$ , le retard introduit par la réflexion sur le substrat.

L'ellipsométrie est basée sur la mesure des états de polarisation des ondes incidente et réfléchie et conduit à la détermination de l'ellipticité  $\rho$  qui est le rapport des coefficients complexes  $r_p$  et  $r_s$  :

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \frac{|r_p|}{|r_s|} e^{j(\delta_p - \delta_s)} = \tan \Psi e^{i\Delta}$$

$\tan \Psi = \frac{|r_p|}{|r_s|}$ , le rapport des modules est associé à un changement d'amplitude après réflexion sur la surface et  $\Delta = \delta_p - \delta_s$ , est associé à un changement de phase après réflexion sur la surface.





**Figure 1** : Définition des composantes perpendiculaire et parallèle au plan d'incidence de l'onde lumineuse.

Les coefficients de réflexion dépendent de l'angle et des indices des deux milieux (ceux-ci sont fonction de la longueur d'onde  $\lambda$ ). En pratique, à l'aide d'un ellipsomètre, on mesure  $\tan \Psi$  et  $\cos \Delta$ . Une mesure faite à une incidence et à une longueur d'onde données permet de déterminer deux paramètres de l'échantillon analysé, tels que son épaisseur  $\gamma$  et son indice de réfraction  $n$ . En effet, un calcul numérique à partir des équations ellipsométriques reliant  $(\Psi, \Delta)$  à  $(n, \gamma)$  permet de déduire l'indice de réfraction et l'épaisseur du film à partir de la mesure de  $\tan \Psi$  et  $\cos \Delta$ . Dans le cas d'un wafer de silicium nu, soit un système composé de trois milieux différents, le silicium, la couche d'oxyde natif  $\text{SiO}_2$  et le milieu ambiant, il existe deux interfaces 0 - 1 et 1 - 2 (Figure 1). En calculant les coefficients de réflexion globaux résultants d'un wafer de silicium nu on obtient une expression théorique de  $\rho$  :

$$\rho = \frac{r_{0-1}^p + r_{1-2}^p X}{1 + r_{0-1}^p r_{1-2}^p X} \times \frac{1 + r_{0-1}^s r_{1-2}^s X}{r_{0-1}^s + r_{1-2}^s X}$$

où  $r_{i-j}^p$  et  $r_{i-j}^s$  sont respectivement les coefficients de réflexion parallèle et perpendiculaire à l'interface  $i-j$ . Le coefficient  $X$  est défini par :

$$X = \exp(-j \frac{4\pi n_0 \cos(\theta_0) \gamma}{\lambda})$$

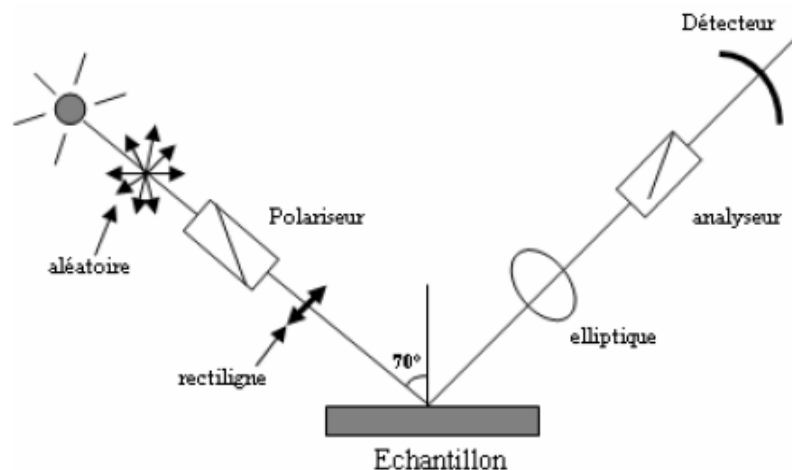
avec  $\gamma$  l'épaisseur du film de silice,  $n_0$  l'indice de réfraction du milieu 0 (air ou eau) et  $\theta_0$ , l'angle d'incidence du faisceau laser. Dans le cas du silicium, l'angle d'incidence est choisi

proche de l'angle de Brewster, qui correspond à l'angle d'incidence pour lequel le coefficient de réflexion perpendiculaire  $r_{0-1}^p$  est nul. Dans l'air, l'angle de Brewster d'un substrat de silicium est proche de  $75^\circ$  et dans l'eau, il est de  $71^\circ$ .

Dans le cas de couches multiples, ce calcul devient fastidieux, car il faut tenir compte des réflexions multiples. Dans le cas d'échantillons très minces (pour des films d'épaisseur inférieure à  $100\text{\AA}$ ), on ne peut pas déterminer indépendamment l'indice et l'épaisseur du film. Il devient alors nécessaire de fixer l'indice de réfraction de l'échantillon afin d'en déduire l'épaisseur. En effet, un développement au premier ordre des équations paramétriques en  $(\gamma/\lambda)$  montre que les variations de  $\Psi$  sont du deuxième ordre et donc négligeables par rapport aux variations de  $\Delta$  qui sont du premier ordre. La variation de  $\Delta$  est donc directement proportionnelle à  $\gamma$ . Il faut donc fixer l'indice pour déterminer l'épaisseur.

## II. Montage expérimental

### II.1. Le modèle SENTECH SE 400 (figure 2)



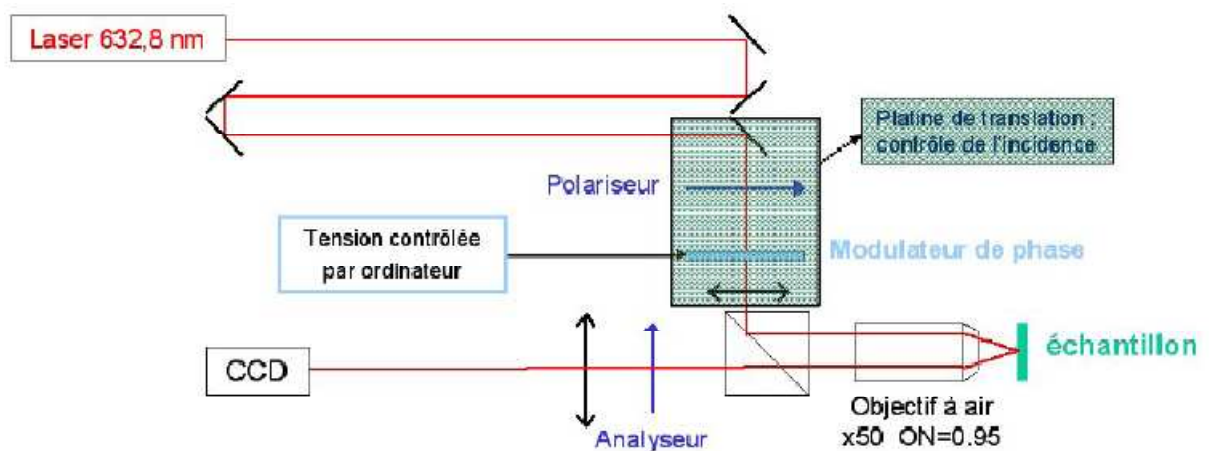
**Figure 2 :** Montage expérimental de l'ellipsomètre à analyseur tournant SENTECH SE 400.

Ce modèle fonctionne suivant le principe de l'analyseur tournant. La source de lumière est un laser He-Ne non polarisé, de longueur d'onde  $\lambda = 6328 \text{ \AA}$ . A la sortie du polariseur, le faisceau est polarisé rectilignement avec un angle de  $45^\circ$ . Après réflexion sur l'échantillon, l'onde est polarisée elliptiquement. L'analyseur tourne à vitesse constante et est placé devant une photodiode. Le signal est enregistré puis digitalisé durant deux révolutions de l'analyseur. La transformée de Fourier des deux signaux est analysée et permet de déduire les deux angles

ellipsométriques  $\Psi$  et  $\Delta$ . Dans le cas d'un substrat de silicium, l'angle d'incidence doit être proche de l'angle de Brewster, afin d'avoir la meilleure sensibilité sur les mesures. L'ellipsomètre utilisé permet de choisir un angle d'incidence d'incrément  $5^\circ$ . On choisit un angle de  $70^\circ$ , proche de l'angle de Brewster du silicium. Les données obtenues sont exploitées en utilisant le logiciel « ellipsometer » fourni par le constructeur. On utilise un modèle à plusieurs couches qui sont caractérisées par un coefficient d'extinction  $k$ , un indice de réfraction  $n$  et une épaisseur  $\gamma$  variables.

La résolution en épaisseur est de l'ordre de l'angström et la résolution spatiale est de  $0,3 \times 0,5 \text{ mm}^2$ . Pour nos mesures, on utilise un modèle à une couche entre deux milieux semi-infinis. Le milieu semi-infini inférieur est constitué du substrat d'or d'indice de réfraction 0.47. L'air ambiant est le milieu semi-infini supérieur d'indice de réfraction 1,00. On considère que la couche organique greffée et la couche de nanoparticules forment une couche unique, d'indice de réfraction 1,460 et d'épaisseur  $\gamma$ .

## II.2. Imagerie ellipsométrique



**Figure 3** : Schéma du montage de l'imagerie ellipsométrique fabriqué au laboratoire d'optique physique.

Le modèle de cet ellipsomètre a été conçu au laboratoire d'optique physique de l'ESPCI, le principe consiste à réaliser une image où à chaque point  $(x,y)$  on fait correspondre la valeur de  $\Delta$  ou de  $\Psi$  correspondante. La source de lumière est un laser He-Ne non polarisé, de longueur d'onde  $\lambda = 6328 \text{ \AA}$ . La source lumineuse traverse un premier polariseur puis passe par le modulateur variable à cristaux liquides qui introduit un retard commandé par une tension appliquée. L'objectif à air permet de frapper l'échantillon sous une grande incidence.

Le faisceau traverse ensuite un analyseur et se focalise sur un détecteur CCD grâce à une lentille. On essaie de se rapprocher de l'angle de Brewster afin d'avoir des variations des paramètres ellipsométriques les plus significatives. La platine de translation sert à régler l'angle d'incidence en faisant varier la distance entre le faisceau et l'axe central de l'objectif. Nous travaillons avec ce dispositif à un angle de  $70^\circ$ . Le chemin optique du faisceau laser a été augmenté de telle sorte qu'il couvre la totalité du capteur CCD.

L'intensité lumineuse qui arrive sur la caméra CCD est fonction des paramètres ellipsométrique, son expression est :

$$I = E_f^* E_f = I_0 + I_s \sin(\alpha) + I_c \cos(\alpha) \quad (1)$$

Avec:

$$I_0 = r_s^2 (\sin(P)E_0^s + \cos(P)E_0^p)^2 (\cos(A)^2 \cos(P)^2 \tan(\Psi)^2 + \sin(A)^2 \sin(P)^2) \\ = \frac{r_s^2}{8} (E_0^s + E_0^p)^2 (\tan(\Psi)^2 + 1) \quad (2)$$

$$I_s = -A \sin(\Delta) \quad (3)$$

$$I_c = A \cos(\Delta) \quad (4)$$

$$A = r_s^2 (\sin(P)E_0^s + \cos(P)E_0^p)^2 \sin(2A) \sin(2P) \tan(\Psi / 2) \\ = \frac{r_s^2}{2} (E_0^s + E_0^p)^2 \tan(\Psi / 2). \quad (5)$$

Les valeurs des angles du polariseur P, de l'analyseur A et du modulateur M ont été choisis pour simplifier au maximum les équations précédentes.

$$\sin \Delta = \frac{-I_s}{A}, \cos \Delta = \frac{I_c}{A},$$

$$\Psi = \tan^{-1} \left( \frac{I_0}{A} + \sqrt{\left( \frac{I_0}{A} \right)^2 - 1} \right) \quad (6)$$

$$\text{Avec } A = \sqrt{I_s^2 + I_c^2}.$$

Ainsi  $I_0$ ,  $I_s$  et  $I_c$  nous permettent de déduire les paramètres ellipsométriques  $\Delta$  et  $\Psi$ .

Etant donné que l'acquisition se fait avec des retards de quart d'onde, on mesure alors  $E\lambda/4$ ,  $E\lambda/2$ ,  $E3\lambda/4$  et  $E\lambda$ . On détermine facilement  $I_s$ ,  $I_c$  et  $I_0$  :

$$I_s = \frac{E_{\lambda/4} - E_{3\lambda/4}}{2}$$

$$I_c = \frac{E_{\lambda} - E_{\lambda/2}}{2}$$

$$I_0 = \frac{E_{\lambda} + E_{\lambda/2} + E_{\lambda/4} + E_{3\lambda/4}}{4}$$

Les paramètres  $I_0$ ,  $I_s$  et  $I_c$  sont des combinaisons linéaires des quatre images prises et on déduit facilement  $\Delta$  et  $\Psi$  grâce à l'équation (6).

### Annexe 3 :

#### **Mode opératoire pour l'immobilisation de nanoparticules sur des supports modifiés**

##### Préparation des substrats

Pour des mesures électrochimiques, nous avons utilisé des électrodes bâtons d'or et de carbone vitreux présentant une surface utile de quelques  $\text{mm}^2$  (généralement disques de 1 mm de diamètre). Avant de greffer les électrodes, celles-ci sont polies à l'alumine puis rincées à l'eau milliQ.

Les surfaces d'or que nous avons modifiées pour les caractérisations physiques sont des wafers de silicium recouverts d'une fine couche d'or de 100 nm d'épaisseur fournies par Aldrich. Avant de commencer les modifications de ces surfaces, nous les nettoyons dans une solution de piranha (70 % d'acide sulfurique concentré et 30 % de peroxyde d'hydrogène) au bain marie à 80°C pendant 10 min. Elles sont ensuite rincées à l'eau milliQ avant d'être séchées sous flux de  $\text{N}_2$ .

##### Greffage de la couche de diazonium

Le greffage électrochimique du sel de diazonium a été fait dans l'acétonitrile contenant 2 mmol/L de 4 carboxyphényl diazonium et du tétrafluoroborate de tétrabutylammonium  $\text{NBu}_4\text{BF}_4$  à 0.1 mol/L comme sel de fond. Nous suivons le greffage par chronoampérométrie.

Le processus de protonation / déprotonation des fonctions carboxyliques greffées a été étudié en utilisant deux solutions à deux pH différents:

- Solution pH=2 : HCl à  $10^{-2}$  mol  $\text{L}^{-1}$  : obtenue par dilution d'une solution HCl commerciale.
- Solution pH=9 : solution tampon : tetraborate de sodium ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) à 0.025 M + HCl à 9.2 mmol/L.

##### Immobilisation des nanoparticules

Solution de nanoparticules : La solution de nanoparticules fournie par B. Teste (PECSA, ESPCI) de  $3.1 \times 10^{14}$  nanoparticules  $\text{mL}^{-1}$  est diluée 3x dans une solution de Tween (est-ce du tween 20 ? polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate) à 1 pour 1000 en volume dans du PBS (tampon phosphate, 137 mM NaCl, 8.3 mM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), pH 7.4, Aldrich).

Nous commençons par conditionner la surface préalablement greffée avec les fonctions carboxyliques dans une solution de pH 9 pendant 5 min. Après avoir laissé 30  $\mu\text{L}$  de la

solution diluée 2 min en contact avec la surface du substrat, celui-ci est rincé à l'eau puis séché sous flux de N<sub>2</sub>.

### Fonctionnalisation des nanoparticules

- Fluorescéine (conditions électrostatiques):

La fluorescéine est diluée dans quelques gouttes d'acétone (pour assurer la dissolution) puis dans un tampon phosphate PBS (de pH 7.5) à 1 mg/mL. À ce pH, les fonctions carboxyliques sont déprotonées, ce qui favorise des interactions électrostatiques avec les fonctions amines protonées libres des nanoparticules immobilisées. Nous laissons alors interagir ces dernières avec la solution de fluorescéine pendant 10, 20, 40 min ou 24 h puis nous rinçons à l'eau.

- FITC (conditions covalentes) :

Pour favoriser les interactions covalentes, nous avons utilisé l'isothiocyanate de fluorescéine. Ce dérivé réagit avec les nucléophiles comme les groupements amines pour former un thioamide.

Nous pratiquons la même procédure de dilution de la fluorescéine, bien qu'on recommande usuellement un pH=9 pour cette réaction. En effet, l'expérience a montré qu'à ce pH on dénature la coquille de silice des nanoparticules.

Nous laissons alors interagir les nanoparticules immobilisées avec la solution de FITC pendant une nuit puis nous rinçons à l'eau.

- Nanoparticules COOH (conditions électrostatiques)

Pour ce faire, nous avons utilisé des nanoparticules fluorescentes fonctionnalisées COOH aux propriétés identiques à celles non fluorescentes fonctionnalisées NH<sub>2</sub> immobilisées sur un wafer d'or modifié. Ces nanoparticules sont aussi diluées 3 fois. Nous avons mis les deux types de nanoparticules en contact pendant 10 min dans une solution de pH neutre (tampon PBS). Ainsi, les fonctions carboxyles des nanoparticules libres sont déprotonées et les fonctions amines des nanoparticules immobilisées sont protonées. Solution de nanoparticules : 10 µL de solution de nanoparticules fournie par B. Teste (PECSA, ESPCI), 20 µL de solution Tween+PBS (1 pour 1000, pH=7.5).

- Nanoparticules COOH (conditions covalentes)

Nous faisons réagir, pendant une nuit, en solution tampon neutre (MOPS, acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique, à 10 mM), les nanoparticules immobilisées avec 20  $\mu$ L de la solution mère de nanoparticules acides, 20  $\mu$ L de N-éthyl-N'-(3-(diméthylamino)propyl)carbodiimide (EDC) à 5 mg/mL et 20  $\mu$ L de N-hydroxysuccinimide (NHS) à 5 mg/mL. Nous rinçons ensuite à l'eau milliQ.

#### Microscope à fluorescence

Le microscope à fluorescence permet de visualiser la fluorescéine qui a un maximum d'absorbance à 494 nm et un maximum d'émission à 521 nm. Un traitement par Image J permet d'évaluer les niveaux de gris obtenus. Cependant il faut prendre garde d'enregistrer les images au même format.

#### Infra-rouge FT-IRRAS

L'analyse infra rouge nous renseigne sur la présence des nanoparticules via l'analyse de l'aire de la large bande vers 1200  $\text{cm}^{-1}$ . L'interface utilisé est un spectromètre JASCO FT/IR-6100 type A équipé d'un détecteur MCT refroidi par de l'azote liquide et d'un accessoire à réflexion d'angle rasant à 85° (RAS-PRO410-H). Chaque spectre est obtenu par accumulation de 500 interférogrammes avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Le spectromètre est purgé avec un air sec dépourvu de dioxyde de carbone environ 10 min avant de lancer la mesure.

Les données ont été traitées en retirant du spectre les bandes de CO<sub>2</sub> et de H<sub>2</sub>O et en rectifiant la ligne de base.

---

<sup>i</sup> D. Beysens, C. M. Knobler, *Phys. Rev. Lett.*, 57, 1433, **1986**.

<sup>ii</sup> F. Family, P. Meakin, *Phys. Rev. A*, 40, 383, **1989**.

<sup>iii</sup> B. J. Briscoe, K. P. Galvin, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 23, 422, **1989**.

<sup>iv</sup> A. Steyer, P. Guenoun, D. Beysens, C. M. Knobler, *Phys. Rev. A*, 44, 8271, **1991**.

<sup>v</sup> B. J. Briscoe, K. P. Galvin, *Phys. Rev. A*, 43, 2858, **1991**.

<sup>vi</sup> D. Fritter, C. M. Knobler, D. Beysens, *Phys. Rev. A*, 43, 2858, **1991**.

<sup>vii</sup> H. Zhao, D. Beysens, *Langmuir*, 11, 627, **1995**.



L'électrochimie peut être utilisée pour, de façon élégante, modifier les propriétés chimiques et physiques de différentes surfaces. La modification de surfaces de polymères hydrogénés (en particulier le polystyrène) et de monocouches fluorées auto-assemblées est présentée dans ce contexte. La sonde d'un microscope électrochimique (SECM) permet d'électrogénérer différentes espèces réactives à la surface du substrat. Sur les supports fluorés, la réduction locale de la surface est effectuée par des électrons solvatés puis la zone réduite est post-fonctionnalisée par des réactions chimiques. Sur le polystyrène, la modification localisée de surface est réalisée essentiellement par  $\text{Ag}^{2+}$ . L'ensemble de ces traitements permet sur les deux substrats i) d'augmenter le contraste d'hydrophobie entre le support et les motifs modifiés et ii) d'y immobiliser différentes entités essentiellement biologiques (cellules vivantes). Le mécanisme d'oxydation du polystyrène par  $\text{Ag}^{2+}$  a été étudié par électrochimie. Les courbes d'approche SECM s'interprètent par l'instabilité chimique de  $\text{Ag}^{2+}$  en solution et la réaction hétérogène d'attaque de la surface par ce réactif. La cinétique est régie par la perméation de l'espèce rédox dans le film de polymère oxydé.

Ensuite, et après avoir exploré les possibilités d'assemblage de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées sur une surface oxygénée modèle (surface conductrice électrogreffée par des groupements carboxyliques), des nanoparticules amino fonctionnalisées ont été immobilisées spécifiquement sur des motifs de polystyrène oxydé.

Mots clés : Microscope électrochimique à balayage (SECM), modification de surfaces, polystyrène, monocouches fluorées auto-assemblées, adhésion spécifique d'entités biologiques, nanoparticules fonctionnalisées.

Electrochemistry may be nicely used to modify the chemical and physical properties of different surfaces. In this context, the surface modification of hydrogenated polymers (particularly polystyrene) and of fluorinated self-assembled monolayers is presented. For that, the probe of a scanning electrochemical microscope (SECM) is used to generate various reactants on the surface of the substrate. With fluorinated substrates, the surface is reduced locally by micrometric sources of solvated electrons and the patterned surface is post-functionalized by chemical reactions. With polystyrene, the etching of the surface is essentially performed by  $\text{Ag}^{2+}$ . With both substrates, these treatments allow i) to increase the contrast of wettability between the pristine substrate and the patterns, and ii) to selectively immobilize various entities such as biological ones (living cells). Moreover, the mechanism for the oxidation of polystyrene by  $\text{Ag}^{2+}$  is studied by electrochemical means. The SECM approach curves are interpreted by the homogeneous chemical instability of  $\text{Ag}^{2+}$  and the heterogeneous reaction of this reagent with the surface. The kinetics is governed by the permeation of the redox species into the oxidized polymer layer.

The ability of functionalized iron oxide nanoparticles to be assembled onto a model oxygenated surface (conductive surface electrografted by carboxylic moieties) is evaluated. Finally, amino functionalized nanoparticles are immobilized specifically onto the oxidized patterns of a polystyrene surface.

Keywords: Scanning electrochemical microscope (SECM), surface modification, polystyrene, fluorinated self-assembled monolayers, specific adhesion of biological entities, functionalized nanoparticles.