Thèse présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE POLYTECHNIQUE

Spécialité : sciences des matériaux

Par

Larbi TOUAHIR

Sujet

Nouvelles architectures de biopuces à base de silicium amorphe

Soutenue le 24/ 06/ 2010 devant le jury composé de :

Pr Szunerits Sabine	**Présidente du jury**
Pr Benisty Henri	**Rapporteur**
Dr Pradier Claire-Marie	**Rapporteur**
Pr Stutzmann Martin	**Examinateur**
Dr Ozanam François	**Directeur de thèse**
Dr Gouget-Laemmel Anne Chantal	**Co-directrice de thèse**

« La recherche :
un métier peut-être…
une formation sûrement…
mais surtout une Passion !!! »
I. Solomon

A Khelti Kheira ;
Ma source d’inspiration !

A ma Mère ;
Ma source de motivation !

A mes proches,

A la famille Verhaeghe,

Sommaire

Introduction générale 11
Bibliographie 14

Chapitre 1 : Fonctionnalisation de surfaces de silicium 17
Introduction 19
A. Préparation de surfaces hydrogénées 20
1. Choix du substrat 20
2. Hydrogénation de la surface 22
a) Introduction 22
b) Mode opératoire 23
c) Caractérisation par microscopie à force atomique 24
d) Caractérisation par spectroscopie infrarouge 24
B. Préparation de surfaces acides 27
1. Greffage chimique 27
a) Introduction 27
b) Mode opératoire 28
c) Caractérisation par microscopie à force atomique 29
d) Caractérisation par spectroscopie infrarouge 30
C. Préparation de surfaces activées 33
1. Introduction 33
2. Mécanisme réactionnel 33
3. Etude quantitative de la réaction d'activation 38
a) Optimisation des concentrations et de la température 38
b) Effet de la température 40
c) Etude cinétique de l'activation par mesure infrarouge in situ 41
4. Conclusion : Mode opératoire choisi 47
D. Réaction d'amidation 48
1. Introduction 48
2. Amidation par l'hexylamine 48
3. Amidation par l'éthanolamine 49
Conclusion 52
Bibliographie 53

Chapitre 2 : Architecture de puces à ADN fluorescentes ultrasensibles 57
Introduction 59
A. Détection par fluorescence 60
1. Mécanisme de la fluorescence 60
2. Mesure de la fluorescence 61
3. Limite d'utilisation du silicium cristallin 63
B. Propriétés des couches minces de silicium amorphe carboné 65
1. Silicium amorphe hydrogéné 65
2. Modélisation de la fluorescence 67
a) Le silicium amorphe 67
b) Utilisation d'un réflecteur 69
c) Utilisation de couches minces de silicium amorphe carboné 71
C. Modes opératoires : Dépôt et fonctionnalisation de a-$Si_{1-x}C_x$:H 75
1. Evaporation du réflecteur 75

2. Dépôt par PECVD 75
3. Fonctionnalisation des couches minces 76
4. Protocole d'immobilisation des sondes 77
D. Transfert de la chimie et mesure de la fluorescence 78
1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge 78
2. Mesure de la fluorescence 79
E. Mise au point de l'architecture 81
1. Séparation de l'effet de la chimie de surface et de l'amplification optique 81
a) Protocole d'hybridation 81
b) Choix des architectures 81
c) Mesure de l'effet de la chimie et de l'optique 83
d) Hybridation in situ et réutilisabilité 86
2. Choix du taux de carbone 87
3. Utilisation d'un miroir de Bragg 88
a) Choix du substrat 88
b) Protocole d'immobilisation des sondes et hybridation 90
c) Amplification de la fluorescence et limite de détection 91
F. Différentes utilisations du biocapteur 93
1. Hybridation in situ 93
2. Détermination de la température de fusion 95
3. Etude cinétique 97
4. Fluorescence en fonction de la dilution des sondes 100
Conclusion 102
Bibliographie 103

Chapitre 3 : Couches minces de silicium amorphe carboné sur or ou argent pour une détection par résonance de plasmon surface (SPR) 105
Introduction 107
A. Les plasmons de surface 108
1. Théorie 108
a) Définition 108
b) Relation de dispersion 109
c) Couplage par prisme 111
d) Influence de la couche métallique 113
e) Fluorescence couplée au plasmon de surface 113
f) Biocapteurs basés sur la résonance de plasmon de surface 115
B. Utilisation des couches minces de silicium amorphe carboné 116
1. Intérêt des couches minces a-$Si_{1-x}C_x$:H 116
2. Mode opératoire 117
a) Préparation des interfaces SPR 117
b) Fonctionnalisation de surface 118
c) Mesure de la réflectivité 118
3. Optimisation de la sensibilité de capteurs SPR 119
a) Influence du taux de carbone et de l'épaisseur 119
b) Mesure de la sensibilité 120
c) Stabilité chimique 123
d) Caractérisations des couches 124
e) Caractérisation du greffage et de l'immobilisation 127
f) Mesure par SPR de l'interaction biotine-streptavidine 130
C. Fluorescence couplée au plasmon de surface : Applications aux puces à ADN 132

1. Contrôle de la chimie de surface 132
2. Calcul théorique de la réflectivité et du gain en fluorescence 133
3. Modes opératoires 134
a) Immobilisation des sondes 134
b) Hybridation 134
c) Mesure de la fluorescence 134
4. Détermination de constantes de dissociation 135
a) Isotherme de Langmuir 135
b) Etude de l'hybridation par SPFS 136
Conclusion 144
Bibliographie 145

Chapitre 4 : Biocapteurs à base de nanostructures pour une double détection : par résonance de plasmons de surface localisés et fluorescence 149
Introduction 151
A. Plasmons de surface localisés 152
1. Intérêt des nanoparticules 152
2. Théorie des plasmons de surface localisés 153
3. Biocapteurs LSPR 154
B. Utilisation des couches minces a-$Si_{1-x}C_x$:H 155
1. Modes opératoires 155
a) Evaporation des nanoparticules 155
b) Dépôt de silicium amorphe 155
c) Fonctionnalisation de surface 156
d) Immobilisation des sondes et hybridation 156
e) Mesure 157
2. Dépôt de couches minces a-$Si_{1-x}C_x$:H 157
a) Caractérisations des nanoparticules 157
b) Caractéristiques des plasmons de surface localisés 158
c) Influence de l'épaisseur de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H 160
d) Caractérisation de surfaces fonctionnalisées 161
3. Etude de l'hybridation 163
C. Etude par fluorescence 165
1. Fluorescence couplée aux plasmons de surface localisés 165
2. Influence de la composition des nanoparticules 166
3. Exaltation de la fluorescence 169
a) Influence de l'épaisseur de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H 169
b) Influence de l'épaisseur et sensibilité 170
4. Cinétique d'hybridation 173
Conclusion 177
Bibliographie 178

Conclusion générale 181
Remerciements 183
Publications, brevets et conférences 191

Introduction générale

Depuis plus de 20 ans, la détection rapide et sensible de molécules biologiques s'est développée de façon considérable grâce à l'apparition des biopuces. Ce sont des outils d'analyse, utilisés essentiellement pour la recherche médicale et pharmaceutique, qui ont pour objet d'identifier un grand nombre de gènes ou de protéines et d'étudier leurs fonctions.[1-3] Cela a largement motivé et contribué à de nombreux travaux de recherche pluridisciplinaires à l'interface de la physique, de la chimie et de la biochimie.

Parmi les biopuces, on peut citer les puces à ADN. L'ADN (acide désoxyribonucléique) est une molécule constituée de deux brins, enroulés en double hélice, où est stockée l'information génétique constituant le patrimoine héréditaire d'une cellule. Ce patrimoine s'exprime par six milliards de "lettres" puisées dans l'alphabet génétique composé des 4 bases : A, T, C, G, pour adénine, thymine, cytosine et guanine. L'appariement deux à deux de ces quatre bases, de façon très spécifique (A avec T et C avec G), permet de former la double hélice de l'ADN entre un brin et son brin complémentaire par liaisons hydrogènes.[4,5]

Le principe des puces à ADN repose sur la complémentarité des brins de la double hélice d'ADN. Ce sont des supports sur lesquels sont fixés des brins d'ADN caractéristiques de gènes connus (sondes) et que l'on utilise pour repérer la présence de séquences complémentaires d'un échantillon (cibles) en détectant l'hybridation entre les deux brins.[7,8] Cette détection est généralement mise en évidence par des mesures de fluorescence.[3,9]

Etant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, les puces à ADN sont d'un grand intérêt dans plusieurs domaines : le diagnostic médical, les études génétiques, la criminologie, la détection d'agents pathogènes, la détection de prédispositions génétique vis-à-vis de certaines maladies sous la forme de mutations ponctuelles SNP (Single Nucleotide Polymorphism).[6] Plus généralement, les biopuces offrent donc des solutions efficaces permettant une mesure massivement parallèle de plusieurs couples sondes/cibles sur le même support permettant des mesures à haut débit des interactions biomoléculaires, en particulier pour les protéines mais aussi pour des molécules de poids moléculaire plus faible comme les oligonucléotides. La mesure de ces interactions en temps réel est aussi nécessaire afin de disposer de solutions efficaces pour des applications dans le domaine de l'alimentaire par exemple.

Bien que très utilisée, cette technologie présente aujourd'hui un certain nombre de limites, notamment en termes de sensibilité et de reproductibilité. L'utilisation des puces à ADN nécessite généralement une préamplification biochimique, par PCR (Polymerase chain reaction : réplication *in vitro* du matériel génétique) des sondes. Cette étape, longue et coûteuse, peut introduire des biais.

Parmi les techniques actuellement disponibles, deux types de détection offrent des solutions efficaces au suivi des interactions moléculaires en temps réel : la fluorescence et la résonance de plasmon de surface (SPR).[10-12] La fluorescence offre la meilleure sensibilité, mais présente l'inconvénient de devoir marquer les cibles ou les sondes avec des groupements fluorophores. Par ailleurs, l'efficacité de détection des marqueurs fluorescents est généralement faible sur les puces usuelles, ce qui altère la fiabilité de l'analyse de la puce. La résonance de plasmons de surface a quant à elle l'avantage de pouvoir détecter des interactions entre cibles et sondes non marquées mais présente une sensibilité moins bonne, en particulier si les molécules détectées ont un poids moléculaire peu important. De plus, le couplage de la lumière et de la couche active impose un contrôle précis de l'angle d'incidence, et complique la détection d'images pour les applications à haut débit. On peut exciter des résonances localisées de plasmons de surface dans des couches métalliques structurées sous forme d'îlots de dimensions nanométriques.[13,14] Dans ce cas, les contraintes liées au contrôle de l'angle d'incidence disparaissent, et la détection se fait au moyen d'une analyse spectroscopique simple de la réponse optique de la couche.

En outre, on n'atteint pas la sensibilité théorique des différentes méthodes, principalement en raison de limitations dans la chimie d'immobilisation des sondes (silanisation sur lames de verre,[15] ou chimie des thiols sur or[16,17]). Ces techniques souffrent de limitations sérieuses pour passiver efficacement la surface et optimiser les propriétés physico-chimiques des couches fonctionnalisées vis-à-vis de l'immobilisation des sondes, des adsorptions non spécifiques et de la réutilisation des lames.

L'objectif de la thèse est le développement de nouvelles architectures de biopuces visant à obtenir un meilleur contrôle de la première couche moléculaire et donc à améliorer les performances finales des dispositifs fluorescents ou de ceux basés sur la résonance de plasmons de surface. En effet, la sensibilité (optimisation de la densité de sondes), la sélectivité (minimisation des adsorptions non spécifiques), la reproductibilité sont très fortement dépendantes de la structure et des propriétés physico-chimiques de la première couche moléculaire.[16,18,19] Le point commun entre toutes les architectures développées est

l'utilisation d'une couche de silicium amorphe carboné, qui peut tirer profit des avancées réalisées ces dernières années dans la chimie de greffage du silicium tout en optimisant les caractéristiques optiques des différentes architectures.[20-25]

Le premier chapitre est consacré à la fonctionnalisation de surfaces hydrogénées de silicium monocristallin d'orientation (111). Ces substrats présentent l'intérêt de pouvoir être fonctionnalisés via le greffage covalent de couches denses et ordonnées d'espèces organiques. Ils constituent un substrat idéal pour une étude de chimie de surface bien contrôlée. Les modifications chimiques seront suivies quantitativement par spectroscopie infrarouge en géométrie ATR (Attenuated Total Reflection) et l'état de surface sera observé par microscopie à force atomique (AFM). Ces techniques permettront d'aboutir à un protocole optimal pour l'accrochage covalent de sondes biologiques.

Le deuxième chapitre s'intéresse à l'élaboration de puces à ADN fluorescentes. Le savoir-faire acquis sur les surfaces modèles de silicium cristallin sera transféré sur des couches minces de silicium amorphe. Une étude théorique et expérimentale de l'exaltation de la fluorescence permettra d'optimiser la sensibilité optique du dispositif, en contrôlant le taux de carbone et les épaisseurs des couches pour différentes architectures de biopuces. Nous montrerons l'intérêt de ces biocapteurs pour l'étude de la réaction d'hybridation.

Le chapitre 3 est une étude détaillée de la mise au point d'un biocapteur SPR où l'utilisation de couches minces de silicium amorphe carboné sur des surfaces d'or ou d'argent permet à la fois une protection de la couche métallique et l'utilisation de protocoles d'immobilisation des sondes bien contrôlés. En jouant sur l'indice de réfraction et la qualité de la chimie de surface de ces couches, la sensibilité est optimisée tant pour la détection SPR que pour la détection par fluorescence couplée à la résonance. De tels capteurs sont particulièrement intéressants pour la mesure d'interactions biologiques et la détermination de la constante de dissociation pour différencier des hybridations d'ADN avec des brins d'ADN complémentaires ou des brins présentant des mésappariements (mutations locales de bases).

Le dernier chapitre s'intéresse aux capteurs exploitant la résonance de plasmons de surface localisés (LSPR). Par dépôt de couches minces de silicium amorphe carboné sur des nanoparticules, nous montrerons comment il est possible de contrôler à la fois les sondes biologiques immobilisées à la surface et les propriétés des nanoparticules pour bénéficier d'une bonne sensibilité LSPR. Ceci nous permettra notamment de pouvoir étudier sur ce même substrat des réactions d'hybridation par fluorescence couplée au plasmon de surface localisé.

Bibliographie

(1) Brown, P. O.; Botstein, D. *Nature Genetics* **1999**, *21*, 33-37.

(2) Lipshutz, R. J.; Fodor, S. P. A.; Gingeras, T. R.; Lockhart, D. J. *Nature Genetics* **1999**, *21*, 20-24.

(3) Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O. *Science* **1995**, *270*, 467-470.

(4) Bogard, M.; Ameziane, N.; Lamoril, J. *Immuno-Analyse & Biologie Specialisee* **2008**, *23*, 71-88.

(5) Lamoril, J.; Ameziane, N.; Deybach, J. C.; Bouizegarene, P.; Bogard, M. *Immuno-Analyse & Biologie Specialisee* **2008**, *23*, 260-279.

(6) Nakatani, K.; Sando, S.; Saito, I. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 51-55.

(7) Pirrung, M. C. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41*, 1277-+.

(8) Souteyrand, E.; Cloarec, J. P.; Martin, J. R.; Cabrera, M.; Bras, M.; Chauvet, J. P.; Dugas, V.; Bessueille, F. *Applied Surface Science* **2000**, *164*, 246-251.

(9) Schena, M.; Heller, R. A.; Theriault, T. P.; Konrad, K.; Lachenmeier, E.; Davis, R. W. *Trends in Biotechnology* **1998**, *16*, 301-306.

(10) Liebermann, T.; Knoll, W. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *171*, 115-130.

(11) Marcy, Y.; Cousin, P. Y.; Rattier, M.; Cerovic, G.; Escalier, G.; Bena, G.; Guéron, M.; McDonagh, L.; le Boulaire, F.; Benisty, H.; Weisbuch, C.; Avarre, J.-C. *Biotechniques* **2008**, *44*, 913-920.

(12) Weisbuch, C.; Rattier, M.; Martinelli, L.; Choumane, H.; Avarre, J.-C.; Marcy, Y.; Cerovic, G.; Miramon, M.-L.; Reymond, G.-O.; Benisty, H. *IRBM* **2007**, *28*, 216-223.

(13) Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 10596-10604.

(14) Malicka, J.; Gryczynski, I.; Lakowicz, J. R. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *306*, 213-218.

(15) Lindroos, K.; Liljedahl, U.; Raitio, M.; Syvanen, A. C. *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, E69-9.

(16) Briand, E.; Salmain, M.; Herry, J. M.; Perrot, H.; Compere, C.; Pradier, C. M. *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, *22*, 440-448.

(17) Mateo-Marti, E.; Briones, C.; Pradier, C. M.; Martin-Gago, J. A. *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, *22*, 1926-1932.

(18) Sassolas, A.; Leca-Bouvier, B. D.; Blum, L. J. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 109-139.

(19) Yu, Y. M.; Feng, C. L.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Knoll, W. *Langmuir* **2009**, *25*, 13680-13684.

(20) Boukherroub, R. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2005**, *9*, 66-72.

(21) Faucheux, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N. *Langmuir* **2006**, *22*, 153-162.

(22) Linford, M. R.; Fenter, P.; Eisenberger, P. M.; Chidsey, C. E. D. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 3145-3155.

(23) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Sénémaud, C.; Khodja, M. D. *Physical Review B* **1988**, *38*, 13263-13270.

(24) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Tran-Quoc, H. *Physical Review B* **1988**, *38*, 9895-9901.

(25) Lehner, A.; Steinhoff, G.; Brandt, M. S.; Eickhoff, M.; Stutzmann, M. *Journal of Applied Physics* **2003**, *94*, 2289-2294.

Chapitre 1 : Fonctionnalisation de surfaces de silicium

Introduction 19
A. Préparation de surfaces hydrogénées 20
1. Choix du substrat 20
2. Hydrogénation de la surface 22
a) Introduction 22
b) Mode opératoire 23
c) Caractérisation par microscopie à force atomique 24
d) Caractérisation par spectroscopie infrarouge 24
B. Préparation de surfaces acides 27
1. Greffage chimique 27
a) Introduction 27
b) Mode opératoire 28
c) Caractérisation par microscopie à force atomique 29
d) Caractérisation par spectroscopie infrarouge 30
C. Préparation de surfaces activées 33
1. Introduction 33
2. Mécanisme réactionnel 33
3. Etude quantitative de la réaction d'activation 38
a) Optimisation des concentrations et de la température 38
b) Effet de la température 40
c) Etude cinétique de l'activation par mesure infrarouge in situ 41
4. Conclusion : Mode opératoire choisi 47
D. Réaction d'amidation 48
1. Introduction 48
2. Amidation par l'hexylamine 48
3. Amidation par l'éthanolamine 49
Conclusion 52
Bibliographie 53

« Patience et longueur de temps font plus que force ni que rage »
La Fontaine

Introduction

Les années 1990 ont connu deux progrès spectaculaires dans la préparation des surfaces de silicium. Les travaux initiés par Chabal[1] ont permis de mettre au point des techniques de préparation de surfaces (111) de silicium, hydrogénées (vierges d'oxyde), atomiquement planes et ordonnées à grande échelle. Par ailleurs, les travaux de Chidsey[2] ont initié un vaste effort ayant abouti à la mise au point de nombreuses techniques de greffage de monocouches de molécules organiques sur la surface hydrogénée du silicium, permettant ainsi sa fonctionnalisation. Aujourd'hui, le silicium est donc considéré comme un substrat idéal pour des études de chimie de surface contrôlées. Parmi les différentes possibilités de le fonctionnaliser, l'hydrosilylation est apparue comme une méthode de greffage particulièrement intéressante grâce à la formation de la liaison Si-C, très robuste, et à la grande versatilité de la méthode.

Dans ce chapitre, nous présenterons les différentes étapes de fonctionnalisation qui permettent l'accrochage de biomolécules sur une surface de silicium. Nous décrirons dans un premier temps les surfaces hydrogénées et les surfaces terminées par des monocouches acides, avant de nous intéresser aux étapes d'activation et d'amidation.

La microscopie à force atomique et la spectroscopie infrarouge seront utilisées pour caractériser nos surfaces après chaque étape. Cela nous permettra de disposer de procédures opérationnelles validées quantitativement pour la modification de surface de silicium cristallin.

A. Préparation de surfaces hydrogénées

1. Choix du substrat

Depuis le milieu des années 90, la modification des surfaces de silicium hydrogénées a été largement étudiée en raison de ses divers domaines d'application, de la microélectronique aux biocapteurs.[3-7] Le silicium (100) est largement utilisé pour la microélectronique en raison des très bonnes propriétés électroniques de l'interface $Si(100)/SiO_2$. Dans le cadre de notre travail, nous privilégierons la face cristallographique (111) qui permet, par dissolution anisotrope du silicium dans NH_4F, d'obtenir des surfaces atomiquement planes à l'échelle atomique facilement caractérisables par Microscopie à Force Atomique (AFM).[8] Ces surfaces planes constituent un substrat idéal pour des études de chimie de surface bien contrôlées. Le silicium cristallise suivant le système cubique diamant. Son réseau possède donc une symétrie cubique, et on peut le représenter comme deux sous-réseaux cubiques à faces centrées décalés de ¼ l'un de l'autre le long d'une des diagonales principales du cube. Ce réseau possède une famille de plans denses orientés selon la direction [111] dont un exemple est représenté en rouge sur la figure 1.

Dans notre cas, la coupe du cristal est légèrement désorientée par rapport à une telle face. Un mode opératoire bien précis, qui sera détaillé par la suite, nous permet d'obtenir une surface vicinale, structurée en réseau de marches régulières dont la hauteur (3,14 Å) correspond exactement à la distance entre 2 bicouches atomiques. Ces marches atomiques, rectilignes et parallèles, séparent les terrasses atomiquement planes. La figure 2 représente le schéma de la « désorientation » (miscut), c'est-à-dire le plan de coupe du cristal par rapport à la face cristallographique (111). Le miscut est défini par 2 angles. L'angle α entre la normale au plan optique et la direction [111] est l'angle de la désorientation. L'angle θ qui définit l'azimut du miscut est formé par la projection des vecteurs [111] et $[11\bar{2}]$ dans le plan de la surface. Nous travaillons donc avec des substrats présentant une désorientation α faible mais finie de manière à contrôler soigneusement l'azimut de celle-ci (par exemple, pour une désorientation de 0,2°, les terrasses présentent une largeur d'environ 100 nm). Le contrôle de l'azimut pour avoir θ = 180° est crucial pour obtenir des marches rectilignes, alors orientées parallèlement à la direction $[1\bar{1}0]$.[8]

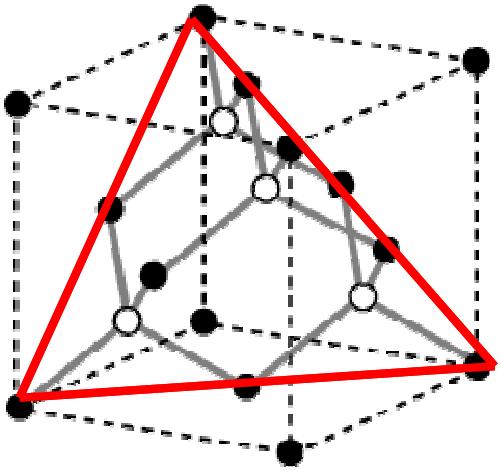


Figure 1 : Maille cubique du réseau de silicium cristallin : les 2 réseaux cubiques à faces centrées sont représentés en noir et en blanc, une face dense (111) est représentée en rouge.

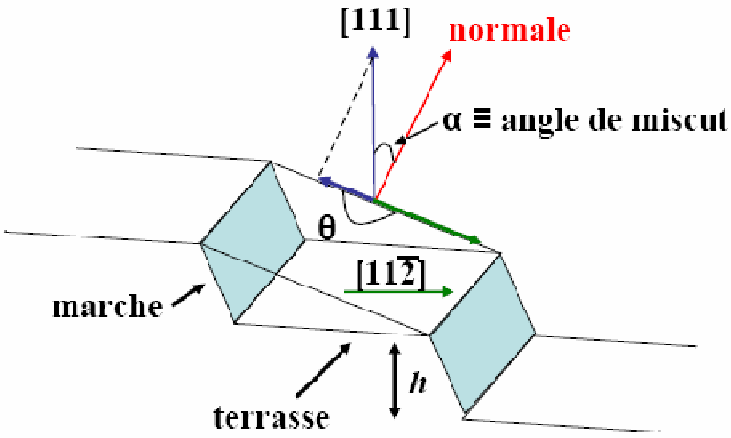


Figure 2 : Schéma d'une surface vicinale montrant la désorientation de la face vicinale par rapport au plan dense (111).

2. Hydrogénation de la surface

a) Introduction

Depuis la fin des années 60, on sait qu'après un traitement désoxydant dans l'acide fluorhydrique HF, le silicium est passivé par une couche contenant des liaisons SiH.[9,10] De nombreuses équipes de recherche se sont ensuite intéressées à la caractérisation de ces couches, mettant en évidence la présence d'une monocouche de liaisons Si-H à la surface.[11-17] Beaucoup de travaux ont été réalisés pour comprendre le mécanisme de dissolution du silicium.[1,15,18-20] En 1995, Allongue a mis en évidence la coexistence de deux voies réactionnelles de dissolution dans NH_4F, présentées sur la figure 3.[21] La cinétique de la réaction chimique est beaucoup plus rapide sur les sites de crans et de bords de marche que sur les terrasses. Cette réaction est très anisotrope et dépend peu du potentiel électrochimique. Elle consiste à oxyder le silicium par les molécules d'H_2O qui réagissent préférentiellement sur les sites de crans et les bords de marche pour des raisons stériques. La seconde réaction, électrochimique, a en revanche lieu de façon presque aléatoire sur la surface et consiste en la rupture électrochimique de la liaison Si-H. L'hydrogène est alors remplacé par un groupement hydroxyle pour former une liaison Si-OH. Le fluor attaque ensuite la liaison Si-OH formée. Des molécules d'eau s'insèrent alors dans les liaisons arrières Si-Si, rendues réactives par la polarité de la liaison Si-F. Ainsi un atome de silicium est détaché de la surface et les liaisons Si-H se reforment à la surface. Afin de favoriser la réaction chimique le traitement doit se faire à des pH compris entre 8 et 9, favorisant ainsi la formation d'une surface atomiquement plane.[1,18,19] Il a enfin été montré que l'oxygène dissous affecte notablement la topographie de surface en initiant la formation de piqûres sur les terrasses. L'ajout d'ions sulfites SO_3^{2-} dans la solution, réduisant l'oxygène dissous, permet de s'affranchir de ce problème.[22]

L'étape d'hydrogénation du silicium est une étape critique, qui nécessite des substrats et produits de grande qualité. Dans le cadre de cette étude, nous avons travaillé avec des échantillons de silicium Si(111) désorientés de 0,2° selon la direction $[11\bar{2}]$ de type n, dopés au phosphore. Ce silicium présente une résistivité de 5 à 10 Ω cm et une épaisseur comprise entre 500 et 550 µm. Des produits de qualité semi-conducteur ou VLSI Selectipur sont utilisés pour le décapage.

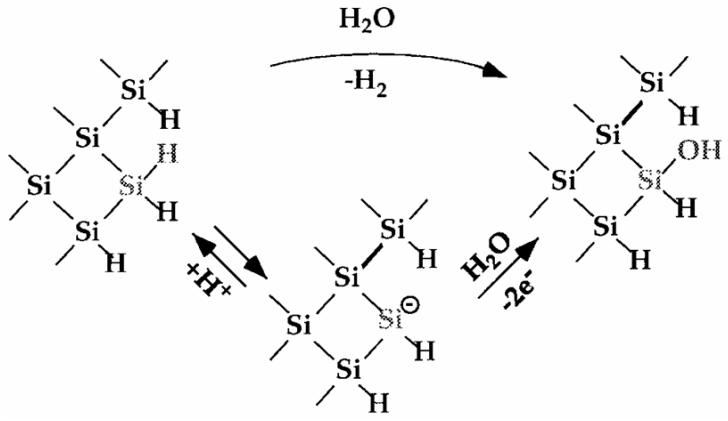


Figure 3 : Etape initiale de la dissolution du silicium par voie chimique (en haut) et par voie électrochimique (en bas).[21]

La qualité des couches obtenues a été contrôlée par AFM et par spectroscopie infrarouge en mode ATR (Attenuated Total Reflection). Le silicium utilisé pour l'AFM ne présente qu'une face polie, pour favoriser la réaction électrochimique sur l'autre face dépolie qui sert alors d'anode sacrificielle. Pour les mesures FTIR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier), le silicium a les deux faces polies, la zone supérieure de l'échantillon est alors dépolie pour y privilégier l'attaque électrochimique et ainsi garder la planéité atomique lors de l'hydrogénation de la partie polie. Dans le cas des mesures FTIR, on utilise des cristaux de silicium purifiés par le procédé de zone fondue « Float Zone » (FZ), pour minimiser la quantité d'oxygène contenue dans le volume.[23-26]

b) Mode opératoire

L'étape d'hydrogénation se fait en deux étapes :

- Une étape de nettoyage, durant laquelle l'échantillon et la verrerie sont nettoyés à 100°C dans une solution dite de Piranha, 1 : 3 H_2O_2 : H_2SO_4 (H_2O_2, 30% et H_2SO_4, 96% fournis par Carlo Erba). Cette étape permet de supprimer toutes les impuretés organiques et de former une couche d'oxyde à la surface. Le tout est soigneusement rincé à l'eau ultra pure (MilliQ, 18,2 MΩ cm à 25°C), afin d'éviter toute contamination organique pouvant limiter la dissolution du silicium.
- Une étape de décapage, qui consiste ensuite à enlever la couche d'oxyde obtenue à la surface du silicium et à former la monocouche Si(111)-H par dissolution du silicium. L'attaque s'effectue dans une solution de fluorure d'ammonium NH_4F 40% (Carlo Erba, pH 8-9). La solution de NH_4F dans laquelle une faible quantité

de sulfite d'ammonium a été dissoute est préalablement homogénéisée aux ultrasons, pendant 10 mn, dans un bécher en polytétrafluoroéthylène (PTFE). L'échantillon y est ensuite immergé 15 mn, puis retiré et abondamment rincé à l'eau ultra pure. Il est aussi possible de procéder à l'hydrogénation du silicium par immersion de l'échantillon de silicium pendant 10 s dans une solution d'acide fluorhydrique HF 50% (Carlo Erba). La surface obtenue est tout aussi hydrophobe mais présente une rugosité de surface à l'échelle de quelques angström.

c) Caractérisation par microscopie à force atomique

La topographie particulière des surfaces de silicium structurées en marches et terrasses est observable par AFM. La figure 4 montre des images AFM à différentes échelles obtenues par dissolution du silicium dans une solution de NH_4F à 40% pendant 15 minutes. On retrouve comme prévu la structure en marches d'escalier, on peut y distinguer les terrasses atomiquement planes séparées par des marches monoatomiques, d'une hauteur d'environ 3,14 Å, correspondant à une bicouche de silicium.[27] Ces images montrent que le procédé de préparation permet d'obtenir des surfaces de haute qualité, où aucun défaut de surface n'est apparent.

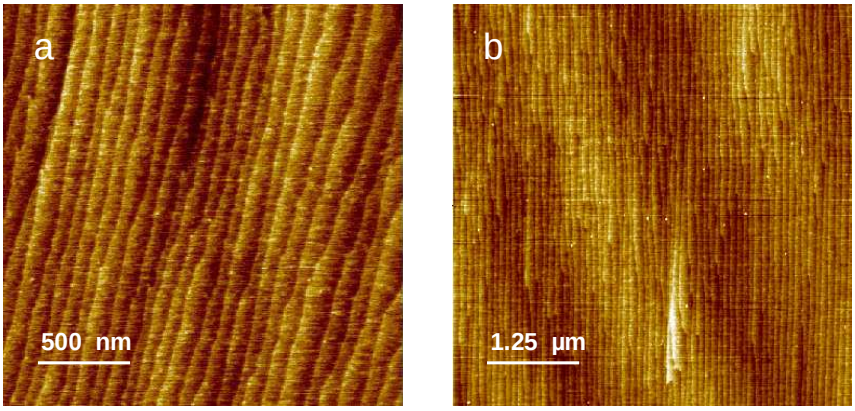


Figure 4 : Images AFM d'une surface H-Si (111) préparée dans NH_4F (a) 2×2 µm^2 (b) 5×5 µm^2.

d) Caractérisation par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge nous permet d'identifier les fonctions chimiques présentes dans un matériau via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. Grâce à des substrats de silicium polis sur les deux faces et biseautés manuellement à 45° sur les 2

bords, il est possible de procéder à une caractérisation en mode ATR, bénéficiant ainsi d'une meilleure sensibilité. Le faisceau infrarouge peut être polarisé en p ou en s selon la direction du champ électrique, parallèle ou perpendiculaire au plan d'incidence (figure 5).

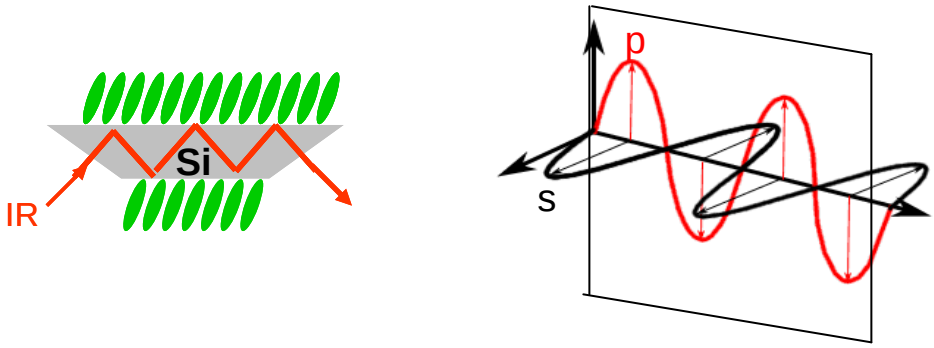


Figure 5 : Représentation schématique d'un prisme de silicium caractérisé par infrarouge en ATR (Attenuated total reflection).

Dans le cas d'une surface idéalement préparée, des monohydrures avec une liaison Si-H perpendiculaire à la surface sont obtenus.[1] La figure 6a montre les spectres d'une surface hydrogénée dans NH_4F en polarisation p et s, la référence étant la surface oxydée obtenue après nettoyage dans le piranha. L'observation de la vibration d'élongation νSiH à 2083 cm^{-1} en polarisation p seulement, l'intensité et la finesse du pic (ici limitée par le spectromètre), confirment la perpendicularité des liaisons Si-H. L'aire de ce pic correspond à une concentration d'atomes en surface égale à 7,8. 10^{14} cm^{-2}.

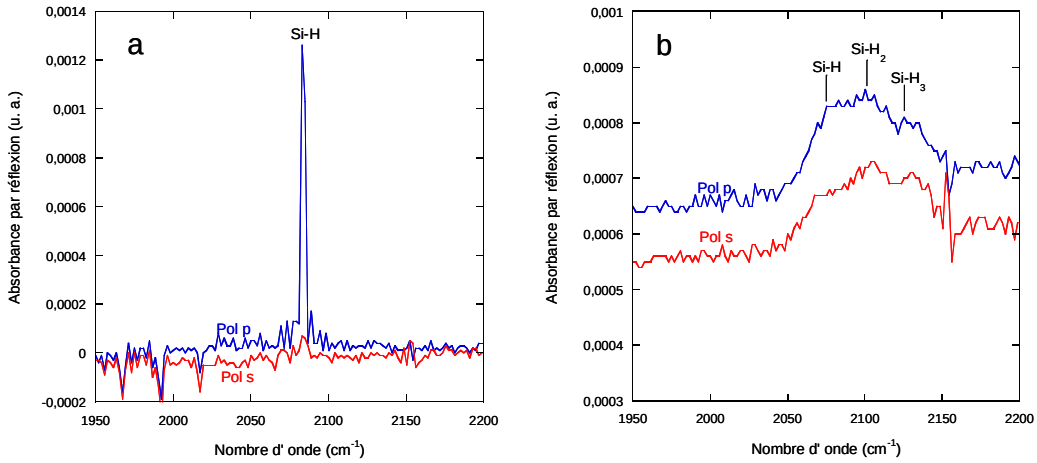


Figure 6 : Spectres infrarouges en polarisation p (bleu) et s (rouge) de surfaces de silicium hydrogénées dans NH_4F (a) et HF (b).

La figure 6b montre une surface préparée dans HF. Le signal obtenu est visible pour les deux polarisations et l'on peut distinguer différents modes de vibration dus aux différents types d'hydrures présents (les monohydrures SiH, les dihydrures SiH_2 et les trihydrures SiH_3). Ceci confirme la rugosité de surface à l'échelle atomique et l'influence du pH sur la présence en surface des différents types d'hydrures.[1,18,19,28,29]

B. Préparation de surfaces acides

1. Greffage chimique

a) Introduction

Les surfaces hydrogénées présentent des propriétés électroniques et chimiques bien meilleures que les interfaces Si/SiO_2,[30] pouvant être passivées par l'attachement covalent de monocouches sur une surface de silicium via la liaison Si-C. Ceci permet l'incorporation à la surface d'une grande variété de groupements fonctionnels qui ouvrent de nombreuses applications dans les domaines de la micro-électronique ou des biocapteurs.[3-7,31] Dans le cadre des biocapteurs et donc de notre étude, les surfaces terminées par des groupements carboxyles sont particulièrement intéressantes. Elles peuvent en effet être facilement activées pour accrocher à la surface une biomolécule de façon covalente via une réaction d'amidation en deux étapes.[32,33] Il est possible d'obtenir par hydrosilylation des monocouches d'acides bien contrôlées et compactes, avec une densité de sondes connue.[34] Comme le montre la figure 7, la réaction d'hydrosilylation consiste à insérer une double liaison carbone-carbone sur une liaison silicium-hydrogène. Le groupe fonctionnel Z doit toutefois être choisi de manière à posséder une réactivité chimique limitée vis-à-vis de la surface hydrogénée. Par exemple, les groupes amines ou alcool ne sont pas utilisés pour éviter la compétition entre la formation de liaisons Si-O-C ou Si-N-C et l'addition sur la double liaison C=C.[35]

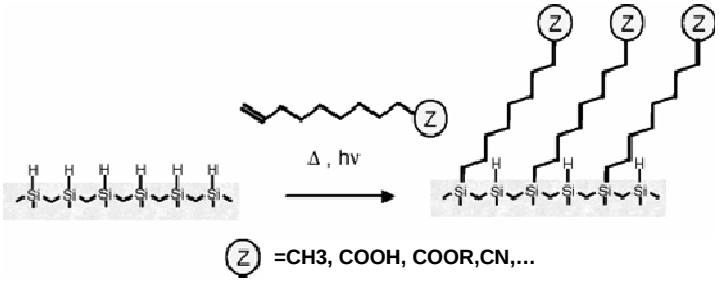


Figure 7 : Représentation schématique de l'hydrosilylation. [34]

L'équipe de Chidsey a obtenu la première couche organique greffée de façon covalente par réaction d'un alcène sur une surface de silicium préalablement hydrogénée en présence d'un peroxyde à 100°C pendant 1 heure.[2] Le mécanisme proposé est un mécanisme

radicalaire. Ces premiers travaux ont largement contribué à l'essor du greffage moléculaire sur silicium. De nombreuses recherches ont permis de mieux comprendre et d'améliorer l'hydrosilylation. D'autres voies ont été exploitées comme l'hydrosilylation par voie catalytique mise au point par Buriak et Allen[36] ou les greffages électrochimiques développés par les groupes de Chazalviel et Allongue.[37,38]

Le groupe de Zuilhof a montré qu'il était possible de procéder à l'hydrosilylation à une température comprise entre 150 et 200°C en fonction de la longueur des chaînes utilisées.[39,40] Le groupe de Chidsey a par la suite mis au point une méthode photochimique permettant le clivage homolytique de la liaison Si-H par irradiation UV (λ<352 nm) en présence d'alcènes aliphatiques en s'affranchissant de l'utilisation de hautes températures.[41]

Au laboratoire PMC, Faucheux et coll. ont montré l'importance des rinçages des surfaces acides avec l'acide acétique pour enlever les molécules d'acide undécylénique en solution qui, n'ayant pas réagi, forment des dimères via des liaisons hydrogènes avec les acides greffés à la surface. [34]

b) Mode opératoire

Comme pour les surfaces hydrogénées, la qualité des produits et la propreté de la verrerie sont primordiales. Les produits de greffage : l'acide undécylénique $C_{11}H_{20}O_2$ est fourni par Acros avec un taux de pureté de 99% et le décène est fourni par Aldrich avec un taux de pureté de 97%, nécessitant une purification par passage sur colonne de silice, afin d'éliminer l'eau et les impuretés éventuelles. Le Florisil, qui contient du MgO_3Si, est alors utilisé pour retenir les dérivés polaires. Les solvants de rinçage (tétrahydrofurane THF, dichlorométhane, acide acétique glacial) sont de qualité HPLC. Afin d'éliminer toutes les contaminations organiques, la verrerie est soigneusement et successivement lavée à l'éthanol, à l'eau avec un dégraissant, à l'eau osmosée (15 MΩ cm) contenant du détergent TFD4 puis enfin abondamment rincée à l'eau MilliQ (ultrapure 18,2 MΩ cm). Il est important de travailler en milieu sec pour éviter la formation d'une couche d'oxyde sur la surface de silicium. Les produits sont donc séchés à l'étuve une nuit à 75°C. Afin de prévenir la formation d'oxyde, l'ensemble de la verrerie et des solutions est dégazé à chaud sous argon.

Dans un tube de Schlenk préalablement dégazé 5 minutes à 100°C, la solution d'acide undécylénique est introduite puis dégazée à son tour pendant 30 minutes. Le tube de Schlenk est ensuite refroidi à température ambiante pendant 15 minutes avant d'y introduire la surface

hydrogénée fraîchement préparée. Une fois l'échantillon introduit, le dégazage continue quinze minutes avant de fermer le tube de Schlenk.

Lors d'un greffage thermique, le tube de Schlenk est chauffé à 180°C de 16 à 20 heures, alors que pour un greffage photochimique le tube de Schlenk est placé 3 heures dans un réacteur sous irradiation UV (λ=312 nm ; 6 mW cm^{-2}).

Après le temps imparti, en fonction du type de greffage, le tube de Schlenk est refroidi à température ambiante. L'échantillon est ensuite rincé 2 fois pendant 15 mn à l'acide acétique chauffé à 75°C sous argon.

c) Caractérisation par microscopie à force atomique

Pour pouvoir déterminer la densité de sondes présentes à la surface, il est nécessaire de vérifier la propreté des surfaces. Celles-ci sont imagées par AFM afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'espèces physisorbées sur la surface, dues à des contaminations ou à un mauvais rinçage. La figure 8 représente les images obtenues après fonctionnalisation par voie photochimique avec l'acide undécylénique et rinçage à l'acide acétique. On note que la structure en marches d'escalier est comparable à celle d'une surface hydrogénée. La présence de terrasses planes confirme la formation d'une monocouche homogène sur la surface.

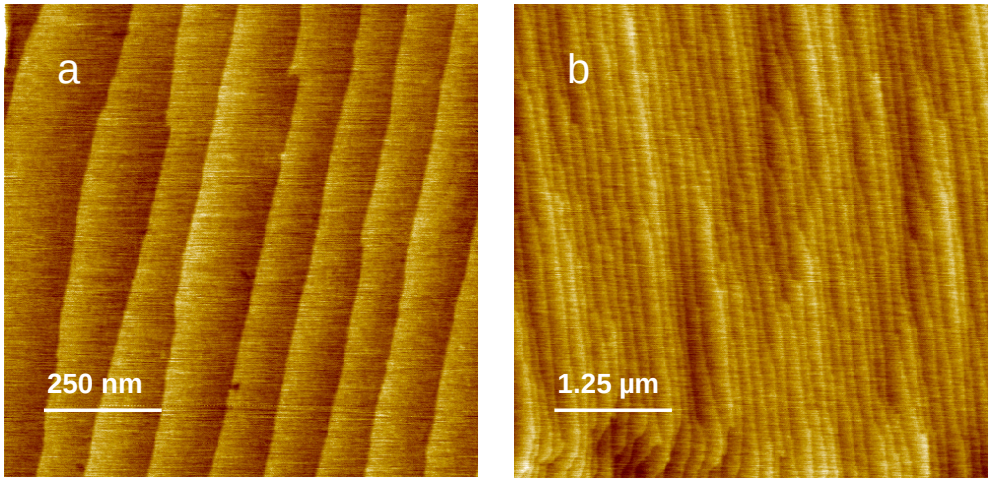


Figure 8 : Images AFM d'une surface Si(111)-$C_{10}H_{20}COOH$ préparée par un greffage photochimique (a) 1×1µm^2 (b) 5×5µm^2.

d) Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Les couches acides ont été caractérisées par infrarouge en mode ATR. La figure 9 montre les spectres en polarisation p et s dans la zone 980-3050 cm^{-1}, de surfaces acides obtenues par greffage thermique ou photochimique. La référence étant la surface hydrogénée, le pic négatif à 2083 cm^{-1} en polarisation p indique la disparition de liaisons Si-H. L'encombrement stérique des molécules ne permet pas la substitution complète des liaisons Si-H. En effet, le diamètre des molécules que l'on souhaite greffer à la surface est environ égal à 4,3 Å, alors que la distance entre 2 liaisons Si-H est de 3,84 Å.[42,43] Théoriquement 50% des groupements Si-H peuvent être substitués. Les groupements SiH restants sont responsables de la contribution positive large mais de faible amplitude de part et d'autre du pic négatif SiH.

La fonctionnalisation de la surface est confirmée par la présence des pics associés aux vibrations des différentes liaisons du groupement $–C_{10}H_{20}COOH$. Le pic intense à 1710 cm^{-1} est caractéristique du mode de vibration de la liaison C=O, alors que les petits pics à 1290 et 1415 cm^{-1} sont associés aux vibrations du groupement fonctionnel C-OH. Les pics situés à 2850 et 2920 cm^{-1} correspondent aux modes de vibration d'élongation symétrique et antisymétrique des groupements CH_2. La déformation de cette liaison dans le plan H-C-H δCH_2 est aussi visible à 1465 cm^{-1}. Dans la région située entre 1000 et 1300 cm^{-1}, caractéristique de l'oxyde de silicium ou des liaisons Si-O-C, on note une différence entre le greffage thermique et photochimique. L'intensité du pic plus élevée pour la surface greffée thermiquement suggère que de l'oxyde peut se former lors du greffage ou que la double liaison C=O peut réagir sur la surface hydrogénée pour former des liaisons Si-O-C. Ainsi, dans notre étude, afin de limiter la formation de l'oxyde et d'avoir des surfaces acides reproductibles, nous utiliserons de préférence la voie photochimique.

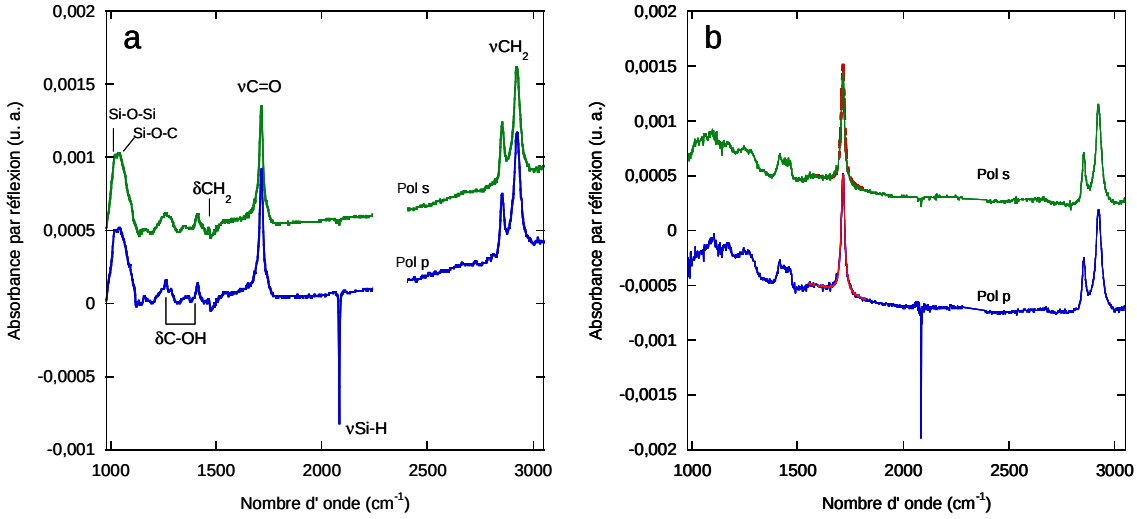


Figure 9 : Spectres infrarouges en polarisation p (bleu) et s (vert) de surfaces acides préparées par voie thermique (a) et voie photochimique (b). Le spectre de référence est une surface atomiquement plane préparée dans NH_4F. Les courbes rouges correspondent aux ajustements du pic C=O.

Il est par ailleurs possible de déterminer quantitativement la composition de la couche, comme l'ont montré Faucheux et coll. et d'en déduire le taux de greffage. En intégrant l'intensité du pic C=O, nous retrouvons comme dans la littérature que les surfaces acides préparées à partir de surfaces hydrogénées dans NH_4F (SiH) présentent une densité de sondes égale à 2,8. 10^{14} cm^{-2}, ce qui correspond à un taux de recouvrement de 36%.[34] En procédant au même greffage sur des surfaces hydrogénées dans HF (SiHx), on note la présence des mêmes pics sur la figure 10, ce qui confirme ainsi l'efficacité du greffage. Par une analyse quantitative des spectres obtenus, une densité de sondes moyenne de 2. 10^{14} cm^{-2} et donc un taux de recouvrement d'environ 25%, sont obtenus. La rugosité de la surface SiHx est la raison pour laquelle le taux de greffage est moins important. Afin de pouvoir transposer le protocole de greffage sur des surfaces de silicium amorphe, l'étude des réactions ultérieures (activation et amidation) se fera aussi sur des surfaces rugueuses, qui représentent une configuration atomique locale plus proche de celle d'un matériau désordonné (amorphe).

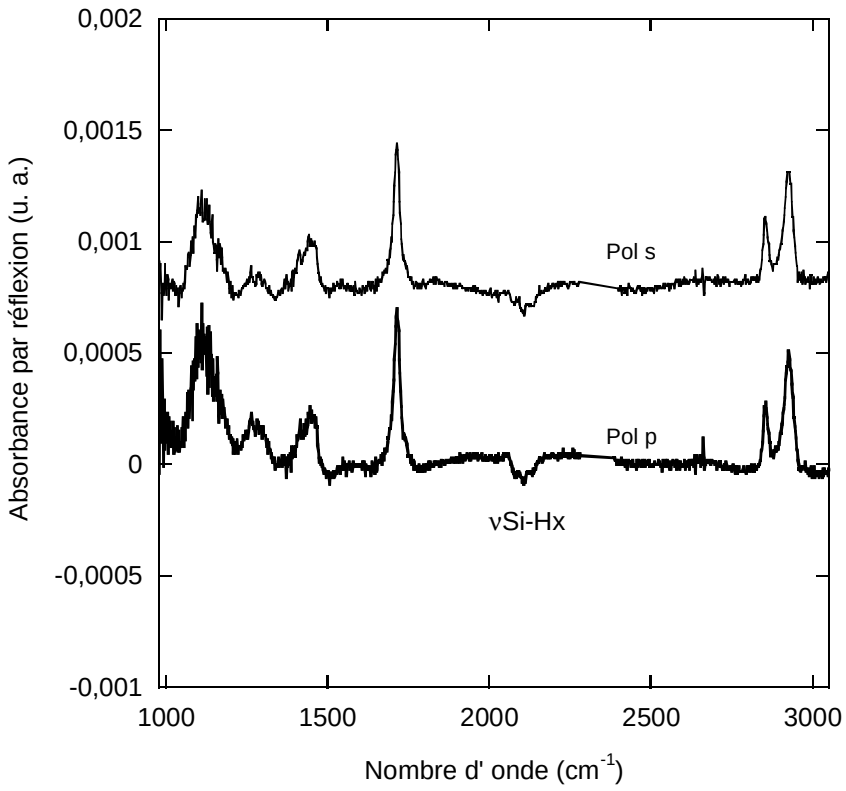


Figure 10 : Spectres infrarouges en polarisation p et s d'une surface acide préparée par voie photochimique. La référence est une surface hydrogénée dans HF.

C. Préparation de surfaces activées

1. Introduction

Comme il a été dit précédemment, les surfaces terminées par des monocouches homogènes d'acides sont très intéressantes pour des applications biologiques. En effet, la fonction chimique acide carboxylique peut être transformée en ester portant un bon groupe partant afin de rendre le carbone de la liaison carbonyle très réactif (figure 11). Pour accrocher des biomolécules de façon covalente dans des conditions douces à un substrat (or, silicium, verre,…), des surfaces terminées par un ester de succinimidyle (« ester NHS ») sont utilisées pour réagir avec la molécule comportant un groupement amine.[33,44-46] Une autre stratégie consiste à greffer directement un alcène qui contient le groupement fonctionnel ester NHS sur la surface hydrogénée.[47-51] Cependant cette méthode nécessite une synthèse organique spécifique et coûteuse en temps. En général, la surface est obtenue par réaction de la surface acide avec un carbodiimide soluble dans l'eau tel que le N-éthyl-N'-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDC) en présence du N-hydroxysuccinimide (NHS). D'autres agents de couplage peptidique similaires peuvent néanmoins être utilisés.[46,52]

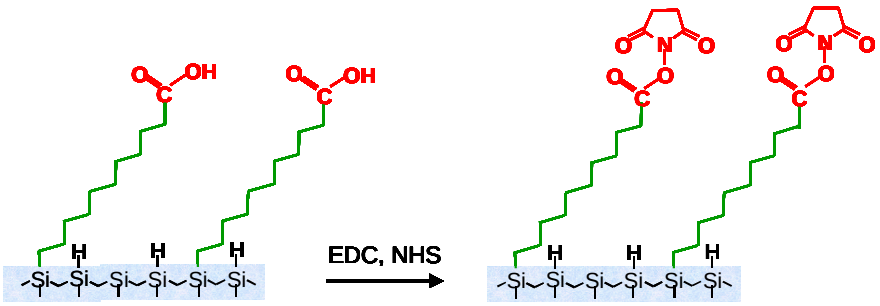


Figure 11 : Représentation schématique de la réaction d'activation.

2. Mécanisme réactionnel

Cette étape d'activation a largement été utilisée pour mettre au point plusieurs protocoles d'accrochage covalent de biomolécules. Elle peut être décrite à l'échelle moléculaire par le schéma réactionnel présenté sur la figure 12.[53] Ce schéma correspond aux différents chemins réactionnels établis en phase homogène.[52] La première étape est la

formation de l'O-acylisourée par réaction d'addition du groupement OH de l'acide carboxylique sur le carbone électrodéficient de l'EDC. Après la formation de cet intermédiaire trois réactions sont en compétition :

- une attaque nucléophile par le NHS pour former l'ester NHS (2),
- une réaction de l'O-acylisourée avec un groupement carboxylique voisin pour former un anhydride (3),
- un réarrangement irréversible par transfert d'acyl intramoléculaire pour former la N-acylurée (4).

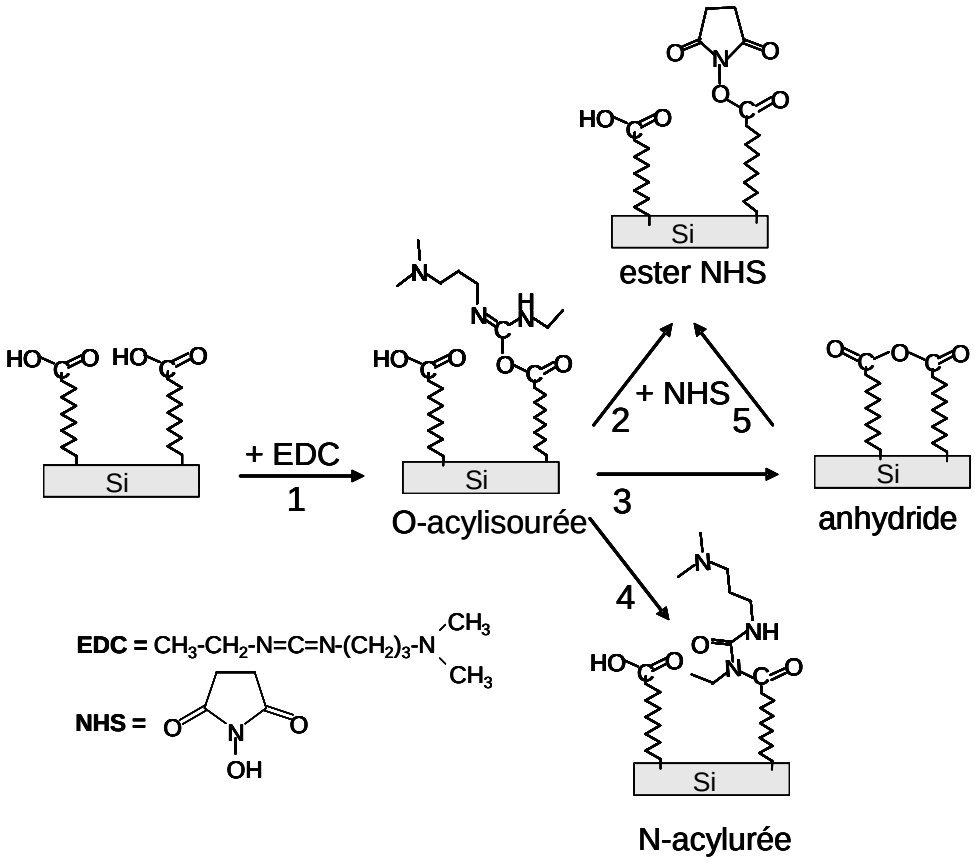


Figure 12 : Schéma réactionnel de l'étape d'activation. L'EDC réagit sur la surface acide pour former l'O-acylisourée (1) ; différents chemins réactionnels sont en compétition pour former l'ester NHS (2;5), l'anhydride (3) ou l'urée (4).

Alors que les conditions ont été précautionneusement optimisées en solution, il apparaît à l'inverse que l'activation de surfaces d'or ou de silicium n'a pas fait l'objet d'une telle optimisation, tant les conditions d'activation sont très différentes d'une étude à l'autre.[32,33,54-57] Etant donné la complexité de la réaction, l'influence des concentrations en

EDC et NHS sur les cinétiques des différentes réactions et l'effet des gênes stériques, il est difficile de prévoir comment activer les groupements acides de manière quantitative. En effet, dans la littérature, les concentrations en EDC ou NHS sont comprises entre 0,1 mM et 0,4 M et le rapport des concentrations entre les deux produits varie fortement. D'autres paramètres peuvent influencer la réaction comme la température ou le pH de la solution.[58,59] Nous avons décidé de mener une étude approfondie sur des surfaces acides afin de mieux comprendre le mécanisme et d'améliorer le rendement de la réaction.[53,60] Ces résultats viennent en complément d'une étude détaillée de l'influence des concentrations menée sur le silicium poreux par Sam et coll..[61]

Dans cette étude, le silicium poreux a été analysé par infrarouge en transmission grâce à sa très grande surface spécifique. De cette façon, on caractérise aisément l'acide restant à la surface en cas de réaction incomplète, et les divers produits de réaction (anhydride, urée, ester de succinimidyle). La figure 13 résume les résultats obtenus après activation à 15°C pendant 90 minutes pour différentes concentrations des réactifs EDC / NHS. Ce diagramme a été construit à partir de points expérimentaux pour définir les régions où l'on peut déterminer par infrarouge la présence de produits secondaires à la fin de la réaction d'activation :

- l'acide résiduel dans la zone 1,
- l'urée dans la zone 2,
- l'anhydride dans la zone 3.

Il existe des zones de recouvrement lorsque, pour les mêmes conditions, différents produits sont détectés. Les conditions optimales pour l'activation correspondent à la zone 4, particulièrement lorsque les concentrations équimolaires en EDC et NHS se trouvent comprises entre 5 et 10 mM. Dans ces conditions, sur le silicium poreux, la réaction d'activation est totale.

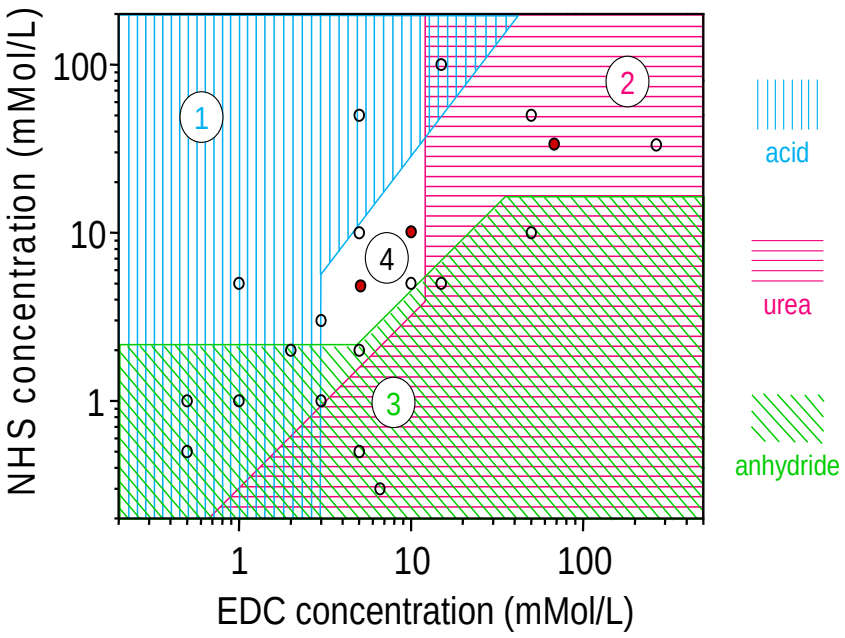


Figure 13 : Diagramme montrant la composition d'une surface poreuse après activation 90 minutes à 15°C avec différentes concentrations en EDC et NHS. Les frontières entre les zones ont été dessinées en fonction des résultats expérimentaux. Dans Les zones (1 ;2 ;3) on peut distinguer les différents produits indiqués à droite du diagramme. La zone 4 correspond aux conditions optimales.[61]

La fonctionnalisation de la surface lors de l'activation est caractérisée par infrarouge (figure 14). En effet, en comparant les modes de vibration entre 1500 et 1800 cm^{-1} dus aux liaisons carbonyles C=O, on peut facilement distinguer une surface acide d'une surface activée. Alors que, pour une surface acide, un seul pic apparaît à 1710 cm^{-1}, la surface activée par l'ester NHS se caractérise par trois pics à 1745, 1785 et 1820 cm^{-1}. Ces vibrations correspondent essentiellement aux modes de vibration antisymétrique et symétrique νC=O des deux groupes carbonyles du succinimide et au mode de vibration νC=O de l'ester. [61]

Afin d'optimiser la réaction et d'obtenir les rendements d'activation les plus élevés sur des surfaces planes, une étude quantitative sur des surfaces de silicium hydrogénées SiHx a été menée. Comme pour les surfaces acides, il est possible de déterminer précisément le nombre de molécules activées par cm^2. D'après la procédure d'ajustement des surfaces activées décrite par Moraillon et coll., nous avons intégré l'intensité des deux petits pics à 1785 et 1820 cm^{-1} pour calculer la densité de sites actifs (figure 15). En comparant le nombre de molécules activées par rapport au nombre de sites acides, nous déterminons le rendement de la réaction.[32] Les résultats sont rassemblés dans la partie suivante.

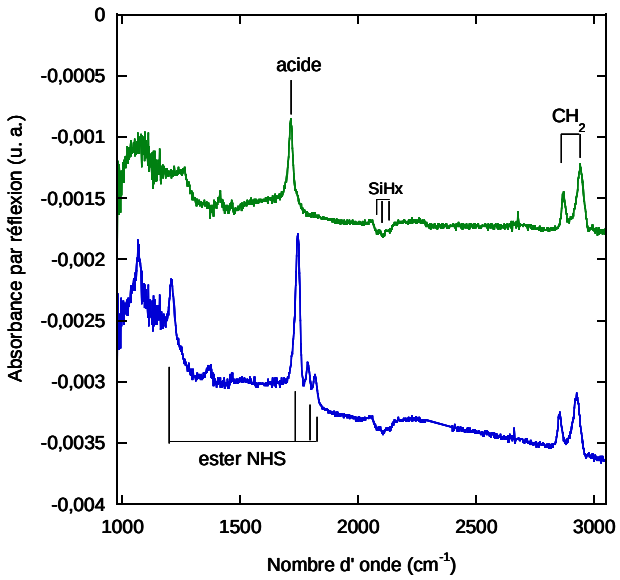


Figure 14 : Spectres infrarouges d'une surface acide (vert) et d'une surface activée (bleu).

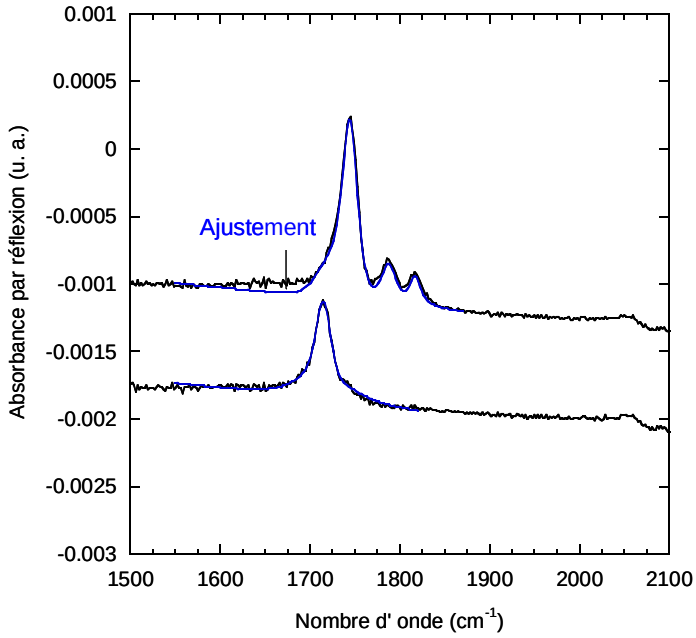


Figure 15 : Spectres infrarouges et ajustements des pics carbonyles d'une surface acide (en bas) et d'une surface activée (en haut). La référence est une surface SiHx.

3. Etude quantitative de la réaction d'activation

a) Optimisation des concentrations et de la température

(1) Etude de l'influence des concentrations [EDC] et [NHS]

Comme dans le cas du silicium poreux, nous avons dans un premier temps étudié l'effet de la concentration. La figure 16 montre les spectres d'une surface acide (2 10^{14} cm^{-2}) et de 4 surfaces activées pendant 90 minutes à 15°C avec différentes concentrations en EDC et NHS. Dans le cas de faibles concentrations, l'activation n'est pas complète et le rendement calculé dans ce cas est égal à 65%. On note par ailleurs la présence de bandes amides à 1550 et 1650 cm^{-1} caractéristiques de la formation de N-acylurée (étape 4 figure 12) ou d'urée soluble physisorbée à la surface formée lors de la réaction (étapes 2 et 3 figure 12). En augmentant les concentrations on voit une augmentation des pics NHS. En effet pour des concentrations élevées [EDC]= 270 mM et [NHS]= 33 mM,[33] on note que la réaction peut être quantitative mais les deux bandes amides de l'urée demeurent. Cela suggère un état de surface peu contrôlé où l'urée serait physisorbée sur la surface. Un bon compromis est obtenu pour des concentrations équimolaires en EDC et NHS comprises entre 5 et 10 mM comme sur le silicium poreux. Dans cette gamme de concentrations, les rendements d'activation sont compris en moyenne entre 85 et 95% sur des surfaces SiHx, mais restent plus faibles sur des surfaces SiH, variant de 60 à 80%. Cette différence peut s'expliquer par un effet de gênes stériques, dans la mesure où les surfaces acides sont bien plus denses lorsqu'elles sont préparées à partir de surfaces SiH qu'à partir de surfaces SiHx. Le même argument peut expliquer pourquoi sur le silicium poreux, où l'irrégularité de la topographie de la surface ne permet pas la formation d'une couche moléculaire localement très dense, la réaction effectuée dans ces conditions est quantitative.

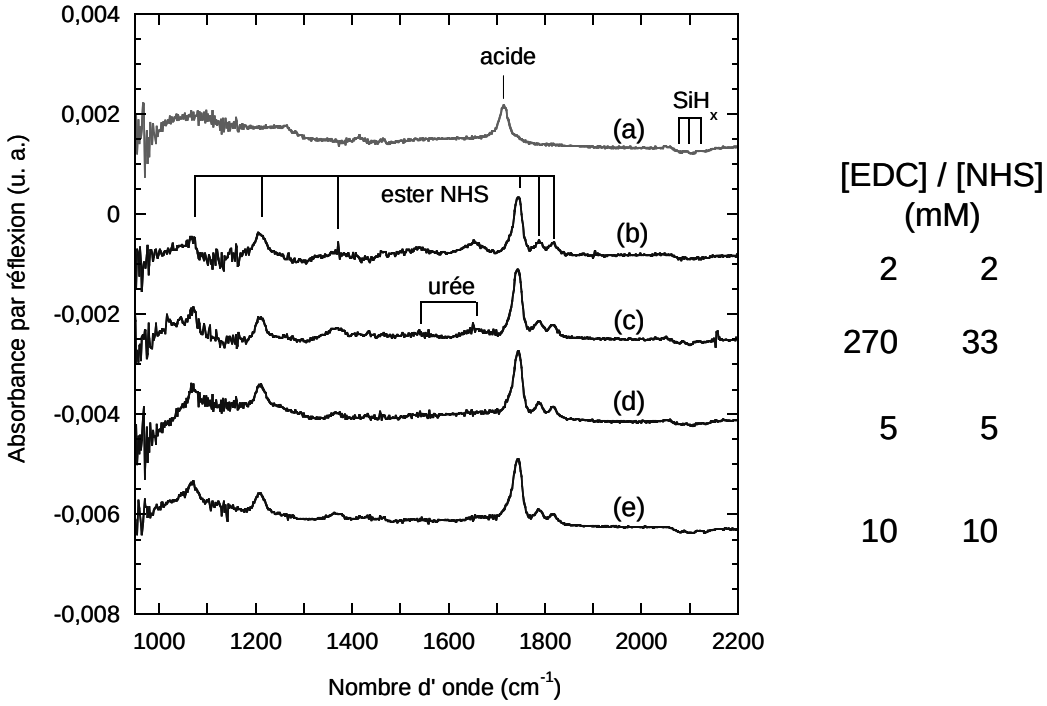


Figure 16 : Spectres infrarouges d'une surface acide (a) et activée dans différentes conditions à 15°C pendant 90 mn (b-e). Le spectre de référence est une surface hydrogénée dans HF.

Après avoir déterminé la densité de sites activés présents à la surface, il est nécessaire de vérifier la propreté des surfaces. Celles-ci sont imagées par AFM afin de s'assurer qu'il n'y ait pas d'espèces physisorbées sur la surface, dues à des contaminations ou à un mauvais rinçage. La figure 17 représente les images obtenues après activation de surfaces acides préparées sous différentes conditions. On note que, dans le cas des concentrations diluées ([EDC]= 7 mM et [NHS]=0,33 mM) ou équimolaires à 5 mM en réactifs, la structure est comparable à celle d'une surface hydrogénée. La présence de terrasses planes confirme la formation d'une monocouche homogène sur la surface. Dans le cas des concentrations élevées ([EDC]= 266 mM et [NHS]= 33 mM, voir figure 17 c et d), il est plus difficile d'obtenir des surfaces reproductibles. Cela peut être corrélé avec les mesures en infrarouge, où en dépit d'un bon rendement d'activation, la présence d'urée a été mise en évidence. Pour leur part, les surfaces activées avec des concentrations équimolaires autour de 5 mM sont très bien contrôlées d'un point de vue topographique tout en conduisant à des rendements d'activation élevés.

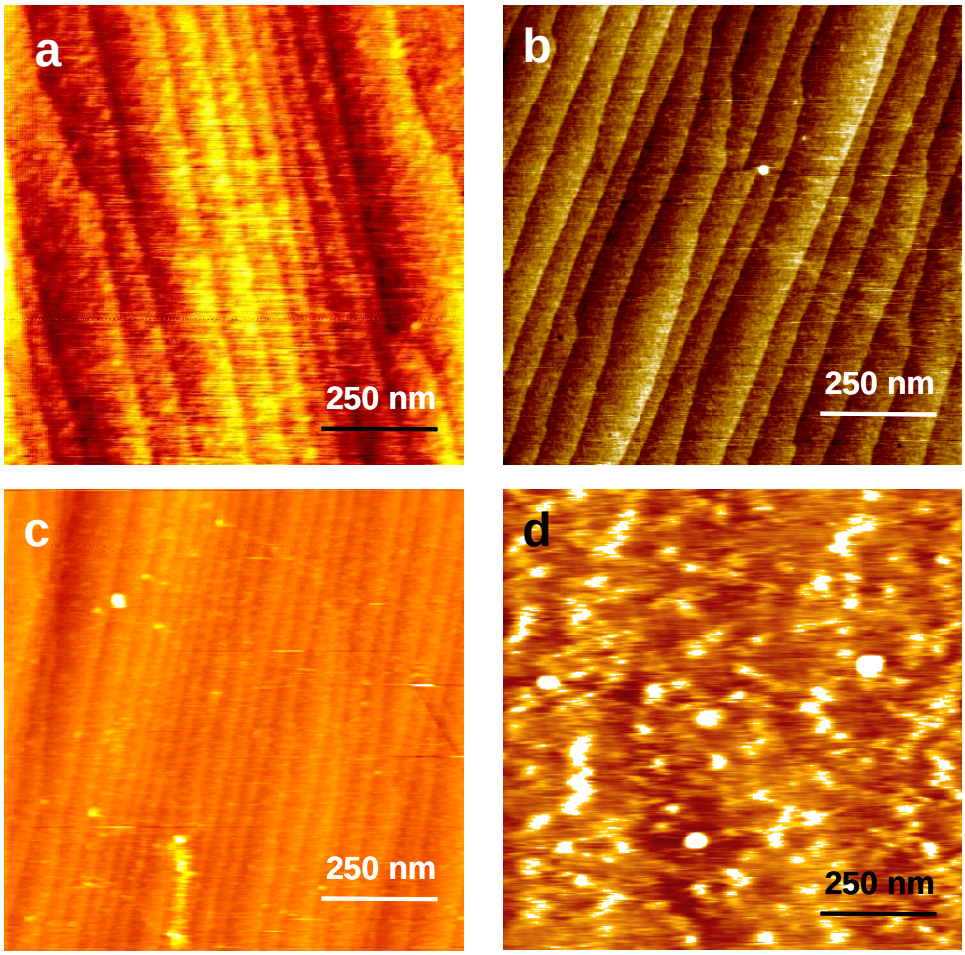


Figure 17 : Images AFM de surfaces activées 90 min à 15°C avec différentes concentrations : [EDC]=7 mM , [NHS]= 0,33mM (a) ; [EDC]=5 mM , [NHS]= 5mM (b) ; [EDC]=266 mM , [NHS]= 33 mM (c, d)

b) Effet de la température

Afin d'étudier l'influence de la température sur la réaction, des activations à des températures différentes ont été réalisées. La figure 18 montre les spectres obtenus à 5, 15 et 25°C. Alors qu'à 5°C la réaction n'est pas complète avec un rendement égal à 60%, le rendement de la réaction est plus élevé (~85%) à 15°C et approche l'unité à 25°C. Cependant, à 25°C, les bandes amides à 1550 et 1650 cm^{-1} apparaissent, comme dans le cas des concentrations élevées, suggérant ainsi la formation d'urée à la surface. Ainsi, afin de favoriser le contrôle de la chimie de surface, la réaction se fera à 15°C. De même, pour prévenir la formation d'urée, nous avons décidé d'utiliser les réactifs à 5mM.

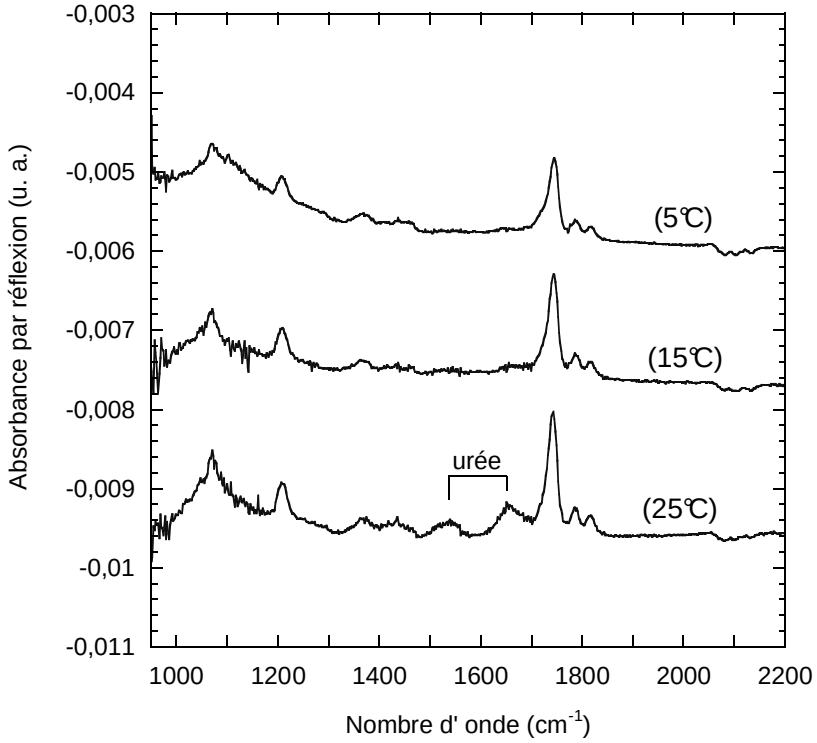


Figure 18 : Spectres infrarouges de surfaces activées à différentes températures (5°C, 15°C °, 25°C) pendant 90 min avec [EDC]= [NHS]= 10 mM.

c) Etude cinétique de l'activation par mesure infrarouge in situ

Afin de mieux comprendre la cinétique complexe de la réaction, des mesures in situ ont été effectuées à l'aide d'une cellule infrarouge décrite sur la figure 19a, qui permet de contrôler la température.[60] Ces mesures ont été effectuées avec des concentrations de 5 mM ou 10 mM et analysées quantitativement dans la région comprise entre 1500 et 2000 cm^{-1}. La figure 19b montre une succession de spectres mesurés à différents stades lors d'une activation à 5°C avec [EDC] = [NHS]= 5 mM, le spectre de référence étant la surface acide. Dans cette région, l'évolution des spectres est complexe. Dès les premières minutes, un pic négatif caractéristique de l'acide à 1720 cm^{-1} est observable et son évolution se corrèle très bien avec l'augmentation des trois pics caractéristiques de l'ester NHS. D'autres contributions rendent l'analyse quantitative plus complexe, la plus importante est celle de l'eau observable par un pic de plus en plus large à 1650 cm^{-1}. D'autres contributions, de l'EDC (1700 cm^{-1}) et du NHS (1707 cm^{-1}) sont aussi discernables. Enfin une contribution due à l'absorption des

carboxylates à 1550 cm^{-1} apparaît également dans le dernier spectre : le pH ayant varié au cours de la réaction, les fonctions acides s'ionisent partiellement.

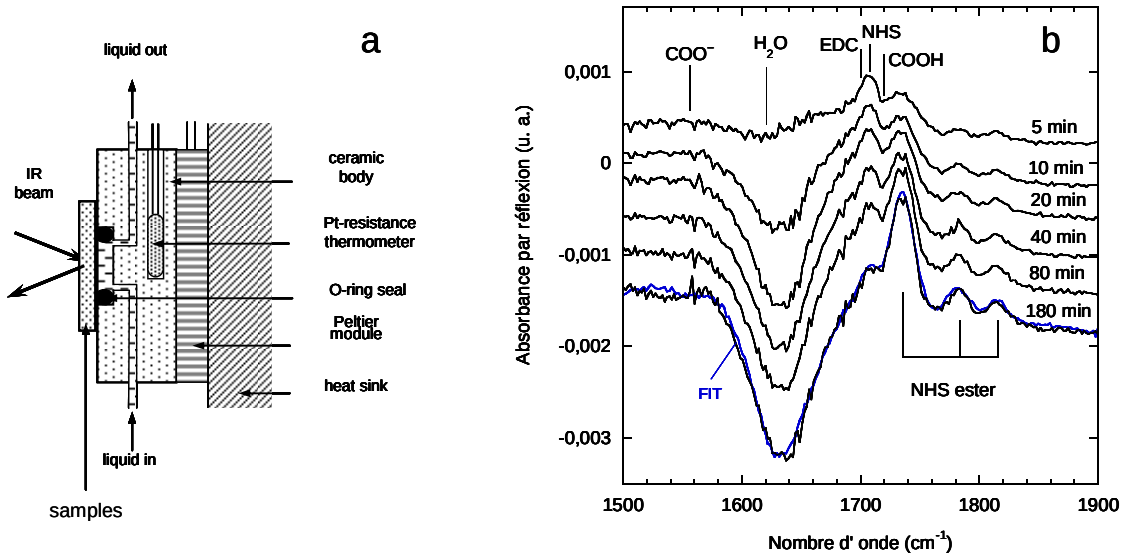


Figure 19 : (a) Schéma de la cellule utilisée pour les mesures infrarouges in-situ ; (b) succession de spectres in situ mesurés à différents temps pour une surface acide activée à 5°C avec [EDC]=[NHS]=5mM. On tient compte de plusieurs contributions pour analyser les spectres lors de la réaction in situ. L'ajustement du spectre à 180 minutes est superposé en bleu au spectre mesuré.

Afin d'analyser au mieux les spectres, les 5 pics (3 pics de l'ester NHS ; le pic de l'acide et un pic pour les carboxylates) ont été ajustés par des fonctions de Voigt. Pour permettre l'analyse, l'ajustement inclut également une ligne de base quadratique, une contribution de l'électrolyte (eau, EDC, NHS) et un spectre de vapeur d'eau (l'atmosphère dans la chambre infrarouge ne reste pas parfaitement stable au cours du temps). La figure 20 montre un exemple de décomposition pour un spectre donné, l'ajustement obtenu en combinant toutes ces fonctions se trouve superposé au spectre du bas sur la figure 19. Une telle analyse nous permet de suivre quantitativement l'évolution des différents pics.

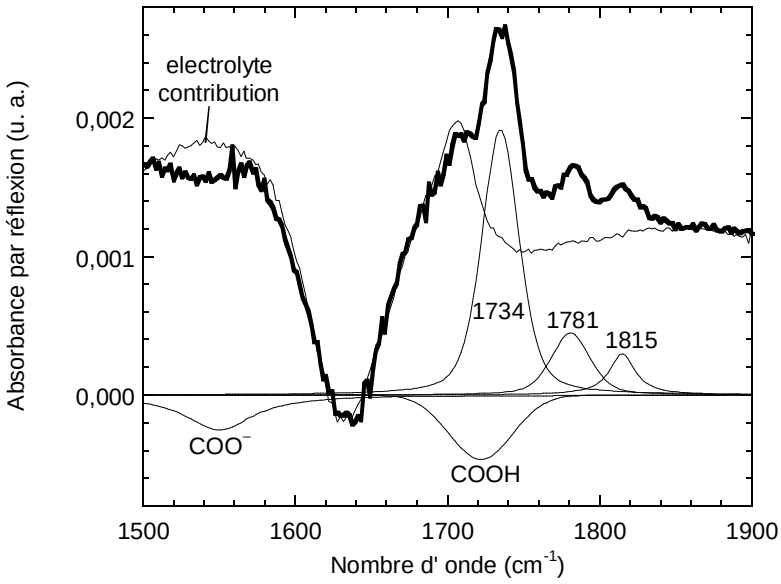


Figure 20 : Différentes contributions prises en considération pour ajuster les données expérimentales. 5 pics sont calculés pour ajuster les modes de vibration des espèces présentes à la surface. Les contributions additionnelles de l'électrolyte, de la vapeur d'eau et une ligne de base permettent d'ajuster le spectre expérimental (figure 19).

La figure 21 montre l'évolution du pic acide et celle des trois pics de l'ester NHS en temps réel. La perte de groupements acides se fait au profit de l'apparition des pics caractéristiques de l'ester. Toutefois en raison de la multiplicité des contributions ajustées indépendamment les unes des autres, cette analyse demeure délicate. Son conditionnement mathématique insuffisant rend les détails incertains au vu de la complexité du spectre dans la région 1500-2000 cm^{-1}. Nous avons donc vérifié ces résultats par une autre méthode d'ajustement. On peut analyser les spectres comme une combinaison linéaire du dernier spectre obtenu, des spectres de l'électrolyte (eau liquide, EDC, NHS) et du spectre de vapeur d'eau. On obtient ainsi un indicateur (non calibré) de l'avancement de la réaction. Afin de corriger la ligne de base, une fonction linéaire et une constante sont ajustées avec les autres contributions lors de la procédure. Après avoir normalisé le résultat obtenu par le rendement d'activation déterminé ex situ, on peut représenter l'avancement de la réaction au cours du temps (figure 22). On remarque que l'évolution ne suit pas une loi exponentielle. La réaction n'est donc pas régie par une cinétique du premier ordre. En effet, les différentes courbes peuvent toutes être ajustées par une loi bi-exponentielle. Une première exponentielle nous

permet d'ajuster la première partie de la courbe, la plus rapide, la seconde reproduit la deuxième partie qui correspond à une évolution plus lente.

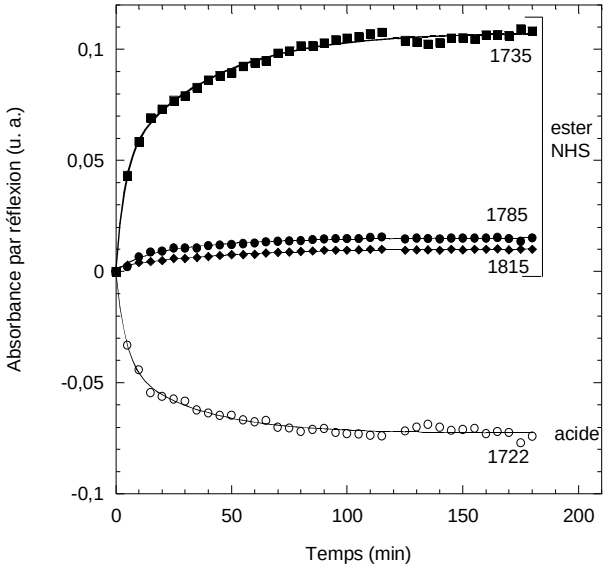


Figure 21 : Evolution des bandes de l'ester NHS et de l'acide en fonction du temps pour une surface acide (SiH) activée à 5°C. Ces points résultent de l'analyse des différents spectres par la méthode décrite en figure 19. On peut remarquer la coïncidence parfaite entre l'apparition des bandes ester et la disparition de la bande acide.

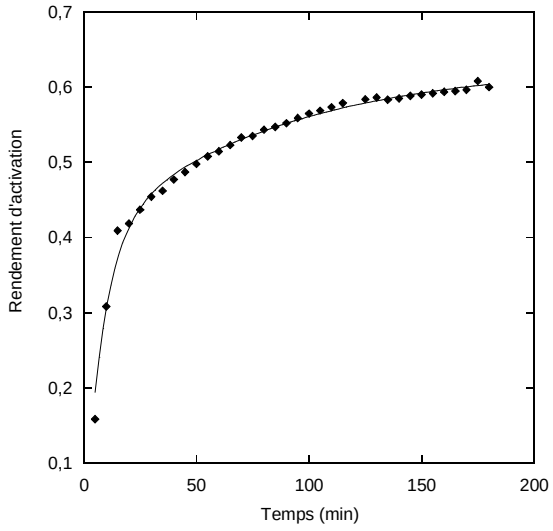


Figure 22 : Rendement d'activation en fonction du temps pour une surface acide (SiH) activée à 5°C avec [EDC]= [NHS]= 5mM.

Ces méthodes d'analyse nous ont permis d'interpréter les expériences réalisées dans différentes conditions : concentrations en EDC et NHS de 5 et 10 mM, températures de 5 et 15°C sur SiH et SiHx. Le tableau 1 récapitule les résultats obtenus en ajustant les différentes évolutions avec une loi bi-exponentielle. Ainsi deux temps caractéristiques sont déterminés : τ_1 (le plus rapide) et τ_2 (le plus lent) pour chaque expérience. Les temps obtenus et présentés ci-dessous sont des moyennes faites à partir des résultats obtenus par les différentes méthodes d'ajustement. La pertinence des valeurs déterminées pour le temps τ_1 peut se poser dans la mesure où il faut plus de 2 minutes pour prendre un spectre. Concernant le temps τ_2, l'incertitude n'excède pas 10 minutes. On peut se rendre compte que la cinétique dépend peu du type de surface hydrogénée et de façon plus surprenante de la concentration en EDC et NHS. Le temps τ_2 se trouve légèrement diminué lorsque les concentrations sont multipliées par deux. Par contre, diminuer la température de 15 à 5°C permet d'avoir un effet notable sur la cinétique puisque les valeurs des temps caractéristiques augmentent de façon significative.

Surface hydrogénée	**SiH**	**SiH**	**SiH**	***SiHx***
Température	**15°C**	**15°C**	**5°C**	***15°C***
[EDC]/[NHS] mM	**5/5**	**10/10**	**5/5**	***5/5***
τ_1 (mn)	3	4	9	*4*
τ_2 (mn)	*50*	*40*	*80*	*50*

Tableau 1 : Temps caractéristiques déterminés par un ajustement bi-exponentiel.

La complexité de la réaction présentée précédemment (figure 12) permet de comprendre le caractère non exponentiel de la cinétique et de proposer une interprétation pour expliquer le caractère bi-exponentiel. Après réaction de l'EDC sur la surface acide pour former l'O-acylisourée (1), il y a deux voies pour former l'ester NHS : les chemins notés (2) et (3+5) sur la figure 12, ce qui peut expliquer la présence de 2 temps caractéristiques. La molécule NHS peut en effet réagir directement avec l'O-acylisourée (2) ou réagir sur l'anhydride (5). Des mesures complémentaires in situ ont permis de montrer la formation très rapide d'anhydride lorsque la surface acide est en présence d'EDC seul (figure 23). Ceci suggère que la réaction rapide associée à la constante de temps τ_1 pourrait impliquer la formation d'anhydride.

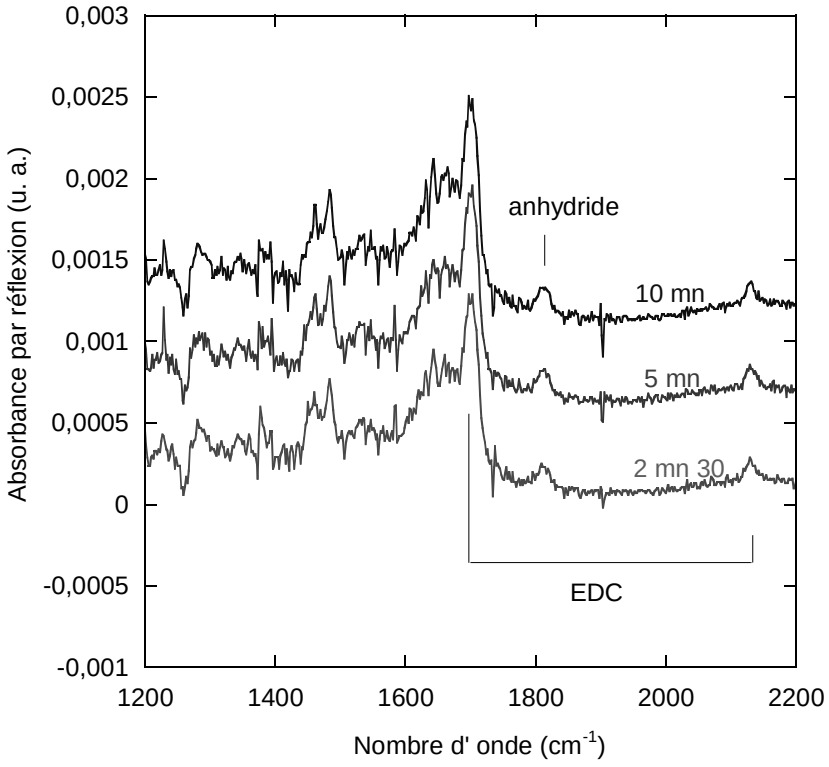


Figure 23 : Spectre infrarouge d'une surface acide modifiée en solution par l'EDC (10 mM). La référence est une surface acide dans l'eau milliQ.

Afin de confirmer cette hypothèse et d'associer sans ambiguïté les deux chemins réactionnels (2) et (3+5) aux réactions lente et rapide révélées par les mesures cinétiques, nous avons préparé des surfaces acides où les chaînes acides greffées sont diluées parmi les chaînes alkyles (25% et 10% d'acide en solution). Ces surfaces diluées permettent de limiter la formation de l'anhydride, car l'O-acylisourée ne peut pas trouver facilement un groupement acide suffisamment proche pour réagir. Ainsi par suivi in situ de l'activation on peut se rendre compte (figure 24) que plus la surface est diluée plus la contribution de la partie rapide diminue. Ceci nous permet de conclure que le chemin réactionnel rapide est celui qui correspond à l'attaque du NHS sur l'anhydride (3+5) et que le processus lent correspond à l'action directe du NHS sur l'O-acylisourée (2).

Cette étude nous a permis de comprendre et d'optimiser les conditions d'activation. Nous avons par la suite essayé d'agir sur le temps pour arriver à des rendements d'activation de 100%, mais nous nous sommes aperçu que faire des activations de plus de 90 minutes pouvait engendrer une compétition entre l'hydrolyse de l'ester NHS et l'activation des sites acides. Ainsi nous avons décidé d'adopter le mode opératoire suivant pour les activations sur silicium poreux, cristallin ou amorphe.

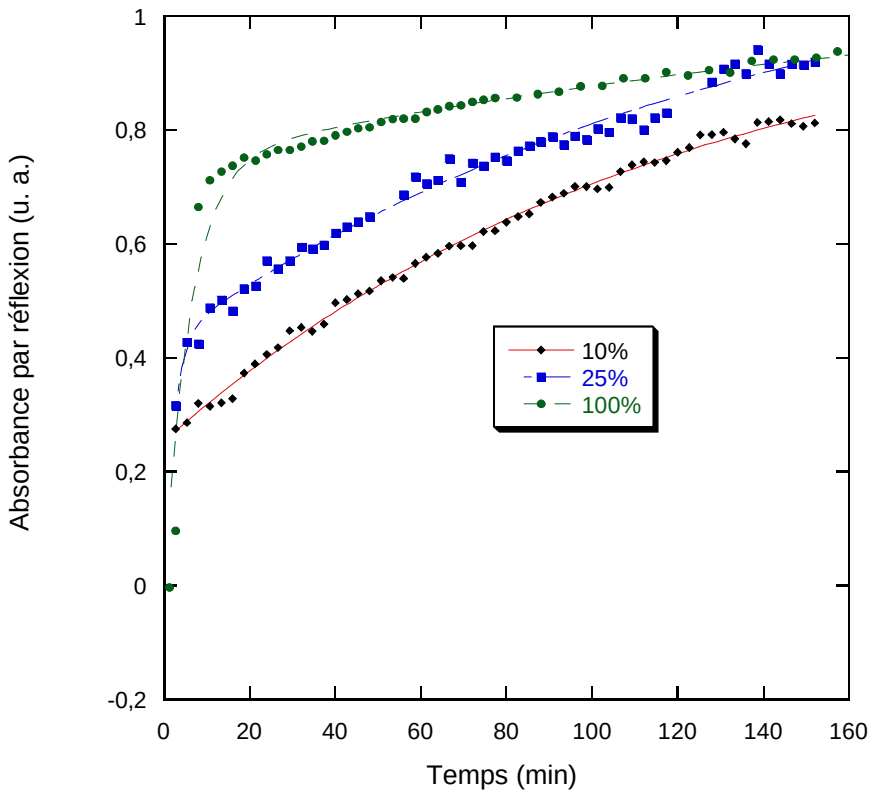


Figure 24 : Rendement d'activation à 15°C avec [EDC]= [NHS]= 5mM pour différentes surfaces : 100%, 25% et 10% acide.

4. Conclusion : Mode opératoire choisi

Comme pour la préparation de surfaces acides, la verrerie est lavée au détergent, copieusement rincée à l'eau MilliQ puis séchée à l'étuve. Les réactifs EDC et NHS (98% de pureté) sont fournis par Sigma Aldrich. Des solutions sont fraîchement préparées pour chaque réaction avec de l'eau MilliQ à 4°C et stockées dans la glace. Dans un tube de Schlenk préalablement dégazé sous argon pendant 5 minutes dans un bain thermostaté à 15°C, un volume égal des solutions d'EDC (10^{-2} M) et de NHS (10^{-2} M) est introduit et dégazé 10 minutes pour atteindre la température du bain thermostaté. L'échantillon y est enfin introduit puis laissé pendant 90 minutes. La surface est enfin abondamment rincée à l'eau MilliQ puis séchée sous un flux d'azote.

D. Réaction d'amidation

1. Introduction

La dernière réaction du protocole pour attacher une biomolécule de façon covalente à la surface est l'étape d'amidation. Comme le montre la figure 25, une (bio)molécule contenant une amine primaire peut réagir avec l'ester activé pour former une liaison amide très robuste.[32,33] Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi d'étudier l'amidation en utilisant de l'hexylamine (CH_3-$(CH_2)_5$-NH_2) et de l'éthanolamine (HO-CH_2-CH_2-NH_2).

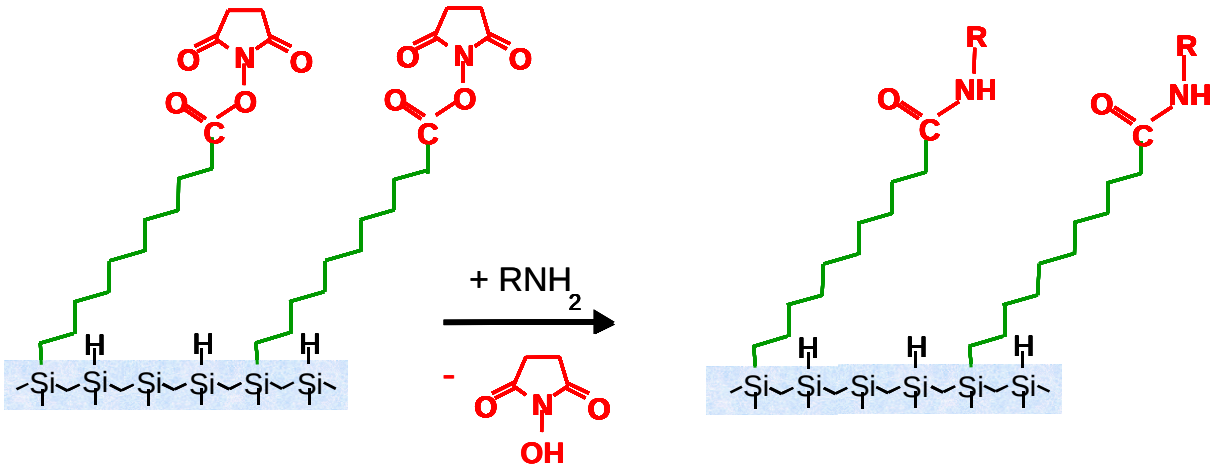


Figure 25 : Représentation schématique de l'amidation.

2. Amidation par l'hexylamine

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'accrochage de l'hexylamine sur des surfaces activées dans les conditions décrites précédemment. Pour ce faire, nous avons suivi le protocole décrit par A. Moraillon et coll.[32]:

On laisse réagir une surface activée dans une solution d'hexylamine à 10^{-3} M dans un tampon phosphate PBS 1X ([NaCl] = 0,137 M ; [KCl] = 0,002 M ; [Na_2HPO_4] = 0,008 M ; [KH_2PO_4] = 0,002 M) à pH 7. La figure 26 montre les spectres d'une surface acide, activée et amidée. Le spectre de référence est une surface hydrogénée atomiquement plane. Les bandes caractéristiques de l'ester NHS disparaissent au bénéfice des bandes de vibration des liaisons amides I et II (1550 et 1650 cm^{-1}). On note aussi que les bandes de vibration des CH_2 sont

nettement plus intenses et qu'un épaulement apparaît à 2960 cm^{-1}, caractéristique de la vibration des liaisons CH_3. La disparition complète des bandes caractéristiques de l'ester de succinimidyle nous montre que la réaction d'amidation est totale. On peut noter la présence d'acide résiduel à la surface grâce au pic élargi entre 1710 et 1740 cm^{-1} caractéristique de groupements carboxyles isolés. Ceci est en accord avec ce que Moraillon et coll. ont observé dans le cadre de leur étude quantitative de l'amidation de surfaces de silicium.[32]

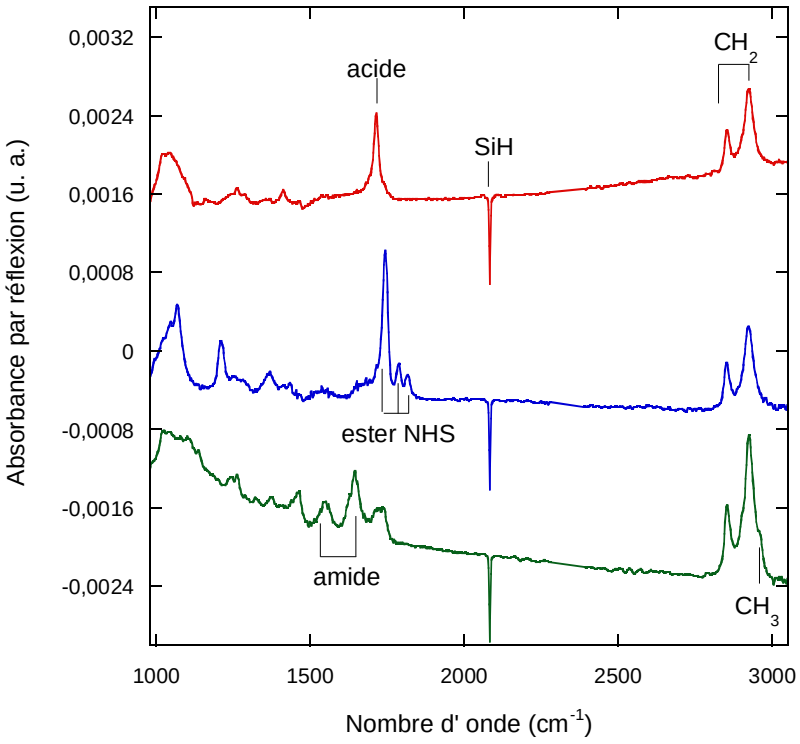


Figure 26 : Spectres infrarouges d'une surface acide (rouge), activée (bleu) et amidée avec l'hexylamine 10^{-3} M dans le PBS 1X (vert) en polarisation p. Le spectre de référence est une surface SiH.

3. Amidation par l'éthanolamine

Nous avons étudié l'amidation par l'hexylamine car dans la suite de nos travaux, nous utiliserons des brins d'ADN terminés par des groupements aminohexyles pour les accrocher de façon covalente à la surface. Cependant nous ne déposerons pas des brins d'ADN sur toute la surface, nous procéderons à l'amidation par « spotting » (étape décrite au chapitre suivant). Afin de limiter l'adsorption non spécifique et de favoriser l'hybridation entre les brins d'ADN complémentaires lors de l'utilisation de la biopuce, les sites non amidés par l'ADN sont

bloqués par réaction pendant 15 minutes avec une amine primaire, l'éthanolamine.[62] La solution utilisée est une solution à 5 10^{-2} M préparée dans l'eau MilliQ à partir d'une solution d'éthanolamine stock à 99,5% fournie par Sigma-Aldrich. La figure 27 montre les spectres obtenus à chaque étape de fonctionnalisation d'une surface hydrogénée dans HF (SiHx). Comme dans le cas d'une surface atomiquement plane et amidée par l'hexylamine, on se rend compte du caractère quantitatif de la réaction d'amidation.

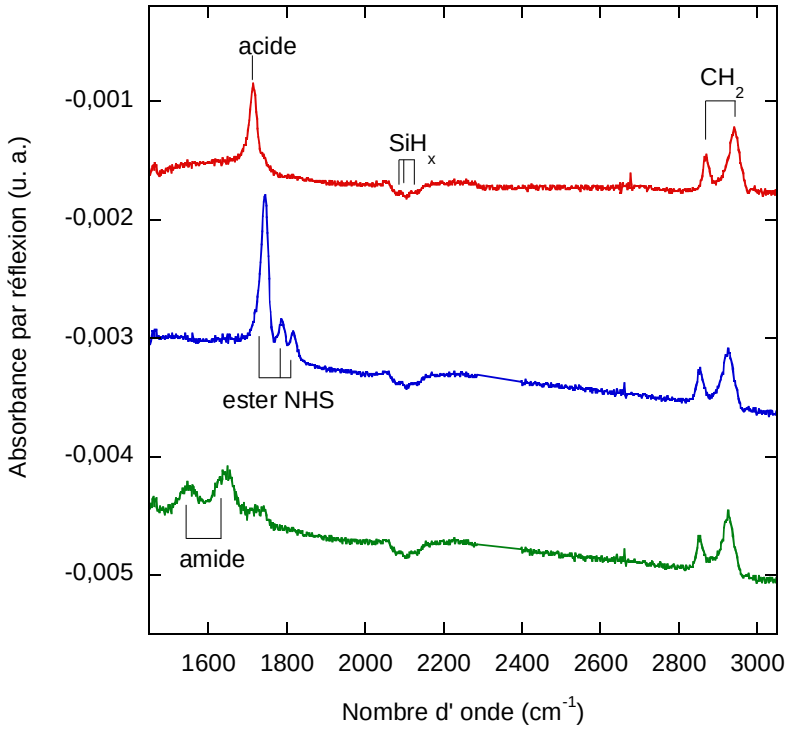


Figure 27 : Spectres infrarouges d'une surface acide (rouge), activée (bleu) et amidée avec l'éthanolamine 5 10^{-2} M (vert) en polarisation p. Le spectre de référence est une surface SiHx.

La figure 28 montre les images AFM d'une surface hydrogénée atomiquement plane (a), successivement fonctionnalisée par l'acide undécylénique (b), activée dans les conditions optimales ([EDC] = 5 mM / [NHS] = 5 mM, 90 min à 15°C) (c) et amidée dans l'éthanolamine (d). Ces images AFM nous permettent de voir qu'à chaque étape du traitement, la topographie de la surface est comparable à celle de l'état initial. La présence des terrasses atomiquement planes et l'absence de résidus sur la surface indiquent la formation de couches homogènes à la surface.

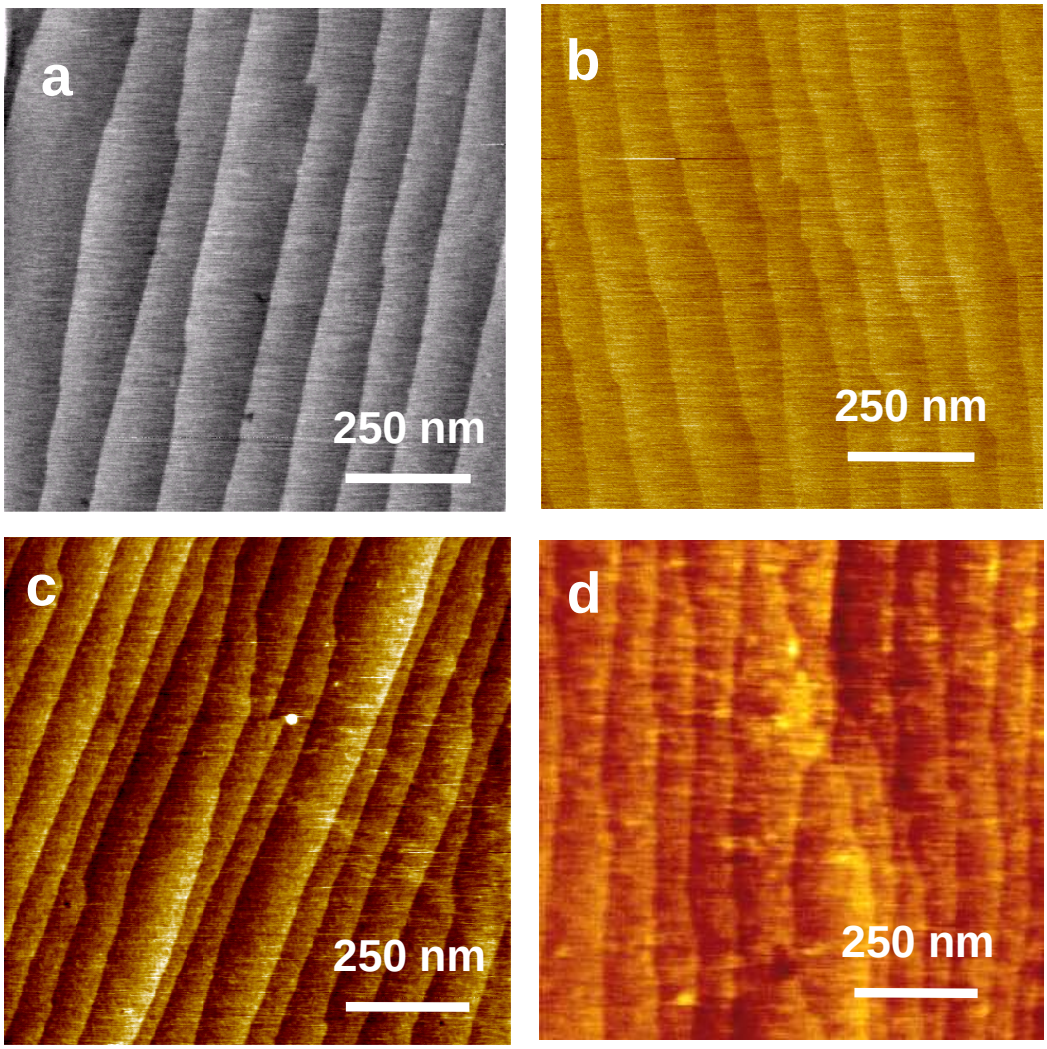


Figure 28 : Images AFM 1×1 µm^2 d'une surface : hydrogénée (a) ; acide (b) ; activée (c) et amidée avec l'éthanolamine 10^{-2} M (d).

Conclusion

Nous avons montré comment accrocher de façon covalente des molécules organiques à une surface de silicium, à partir de monocouches terminées acides. Ceci est possible par un mécanisme en deux étapes (activation / amidation) résumé sur la figure 29. Grâce à des caractérisations par microscopie à force atomique et des mesures en spectroscopie infrarouge en mode ATR (ex situ et in situ), nous avons pu optimiser chaque étape du protocole. Les surfaces acides ayant fait l'objet de nombreuses études détaillées,[23,24,26] nous les avons donc utilisées comme substrat de départ pour étudier de façon quantitative la réaction d'activation. Ceci nous a permis de comprendre le mécanisme et d'établir quelles étaient les meilleures conditions d'activation. Nous avons pu aussi montrer le caractère contrôlé de l'étape d'amidation.

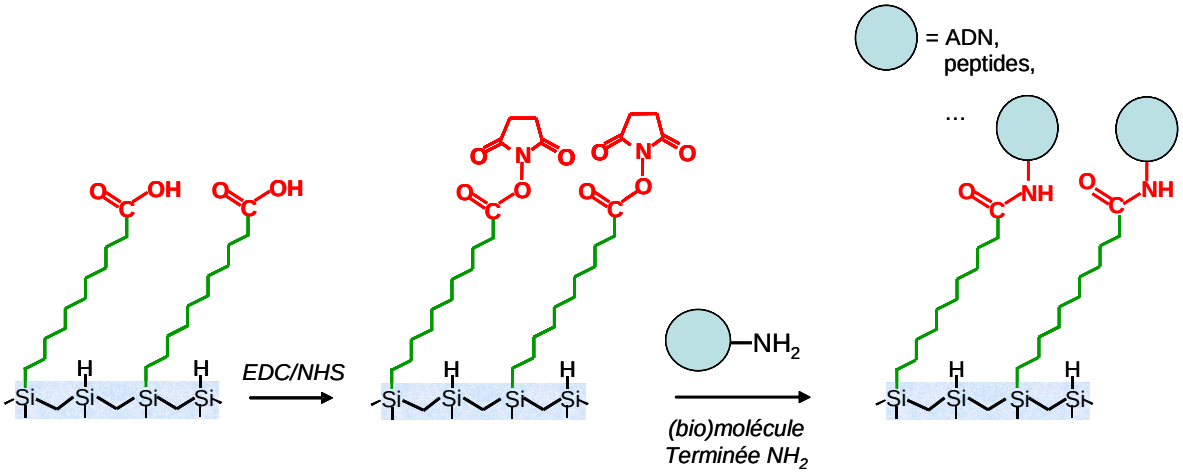


Figure 29 : Représentation schématique du mécanisme d'accrochage covalent de biomolécules à une surface de silicium fonctionnalisée par des groupements carboxyles.

Au terme de cette première partie, nous disposons donc d'une procédure de fonctionnalisation de surface du silicium cristallin, robuste et validée quantitativement. En l'absence de gênes stériques des sondes immobilisées lors de l'étape d'amidation, le rendement d'immobilisation sera limité par l'étape d'activation. De façon intéressante, si ce rendement est limité à des valeurs de l'ordre de 2/3 sur des surfaces atomiquement planes pour lesquelles les couches greffées sont très denses, il atteint des valeurs élevées de l'ordre de 85% sur les surfaces SiHx, rugueuses à l'échelle atomique.

Bibliographie

(1) Higashi, G. S.; Chabal, Y. J.; Trucks, G. W.; Raghavachari, K. *Applied Physics Letters* **1990**, *56*, 656-658.

(2) Linford, M. R.; Fenter, P.; Eisenberger, P. M.; Chidsey, C. E. D. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 3145-3155.

(3) Buriak, J. M. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 1271-1308.

(4) Wayner, D. D. M.; Wolkow, R. A. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **2002**, 23-34.

(5) Boukherroub, R. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2005**, *9*, 66-72.

(6) Shirahata, N.; Hozumi, A.; Yonezawa, T. *Chemical Record* **2005**, *5*, 145-159.

(7) Stutzmann, M.; Garrido, J. A.; Eickhoff, M.; Brandt, M. S. *Physica Status Solidi a* **2006**, *203*, 3424-3437.

(8) Munford, M. L.; Cortès, R.; Allongue, P. *Sensors and Materials* **2001**, *13*, 259-269.

(9) Beckmann, K. H. *Surface Science* **1965**, *3*, 314-&.

(10) Harrick, N. J.; Beckmann, K. H. *éd. par P.F. Kane et G. R. Larrabee* **1974**, 242-243.

(11) Burrows, V. A.; Chabal, Y. J.; Higashi, G. S.; Raghavachari, K.; Christman, S. B. *Applied Physics Letters* **1988**, *53*, 998-1000.

(12) Chabal, Y. J. *Surface Science* **1986**, *168*, 594-608.

(13) Chabal, Y. J.; Higashi, G. S.; Raghavachari, K.; Burrows, V. A. *Journal of Vacuum Science & Technology a* **1989**, *7*, 2104-2109.

(14) Tardella, A.; Chazalviel, J.-N. *Applied Physics Letters* **1985**, *47*, 334-336.

(15) Ubara, H.; Imura, T.; Hiraki, A. *Solid State Communications* **1984**, *50*, 673-675.

(16) Yablonovitch, E.; Allara, D. L.; Chang, C. C.; Gmitter, T.; Bright, T. B. *Physical Review Letters* **1986**, *57*, 249-252.

(17) Weinberger, B. R.; Peterson, G. G.; Eschrich, T. C.; Krasinski, H. A. *Journal of Applied Physics* **1986**, *60*, 3232-3234.

(18) Jakob, P.; Chabal, Y. J. *Journal of Chemical Physics* **1991**, *95*, 2897-2909.

(19) Jakob, P.; Chabal, Y. J.; Raghavachari, K.; Becker, R. S.; Becker, A. J. *Surface Science* **1992**, *275*, 407-413.

(20) Trucks, G. W.; Raghavachari, K.; Higashi, G. S.; Chabal, Y. J. *Physical Review Letters* **1990**, *65*, 504-507.

(21) Allongue, P.; Kieling, V.; Gerischer, H. *Electrochimica Acta* **1995**, *40*, 1353-1360.

(22) Fukidome, H.; Matsumura, M. *Applied Surface Science* **1998**, *130*, 146-150.

(23) Aureau, D. *Thèse (PMC, Ecole Polytechnique)* **2008**, *http://pastel.paristech.org/*.

(24) Douarche, C. *Thèse (IRI, Université de Lille 1)* **2007**.

(25) Dusciac, D. *Thèse (PMC, Ecole Polytechnique)* **2008**, *http://pastel.paristech.org/*.

(26) Faucheux, A. *Thèse (PMC, Ecole Polytechnique)* **2005**.

(27) Allongue, P.; Henry de Villeneuve, C.; Morin, S.; Boukherroub, R.; Wayner, D. D. M. *Electrochimica Acta* **2000**, *45*, 4591-4598.
(28) Jakob, P.; Chabal, Y. J.; Kuhnke, K.; Christman, S. B. *Surface Science* **1994**, *302*, 49-56.
(29) Raghavachari, K.; Jakob, P.; Chabal, Y. J. *Chemical Physics Letters* **1993**, *206*, 156-160.
(30) Aureau, D.; Rappich, J.; Moraillon, A.; Allongue, P.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, accepted.
(31) Schöning, M. J.; Luth, H. *Physica Status Solidi a* **2001**, *185*, 65-77.
(32) Moraillon, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 7158-7167.
(33) Voicu, R.; Boukherroub, R.; Bartzoka, V.; Ward, T.; Wojtyk, J. T. C.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **2004**, *20*, 11713-11720.
(34) Faucheux, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N. *Langmuir* **2006**, *22*, 153-162.
(35) Boukherroub, R.; Morin, S.; Sharpe, P.; Wayner, D. D. M.; Allongue, P. *Langmuir* **2000**, *16*, 7429-7434.
(36) Buriak, J. M.; Allen, M. J. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 1339-1340.
(37) Henry deVilleneuve, C.; Pinson, J.; Bernard, M. C.; Allongue, P. *Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 2415-2420.
(38) Ozanam, F.; Vieillard, C.; Warntjes, M.; Dubois, T.; Pauly, M.; Chazalviel, J. N. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **1998**, *76*, 1020-1026.
(39) Sieval, A. B.; Demirel, A. L.; Nissink, J. W. M.; Linford, M. R.; van der Maas, J. H.; de Jeu, W. H.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R. *Langmuir* **1998**, *14*, 1759-1768.
(40) Sieval, A. B.; Vleeming, V.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R. *Langmuir* **1999**, *15*, 8288-8291.
(41) Cicero, R. L.; Linford, M. R.; Chidsey, C. E. D. *Langmuir* **2000**, *16*, 5688-5695.
(42) Sieval, A. B.; Linke, R.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 1457-1460.
(43) Sieval, A. B.; van den Hout, B.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R. *Langmuir* **2000**, *16*, 2987-2990.
(44) Hermanson, G. T. *Academic Press: San Diego* **2008**.
(45) Strother, T.; Cai, W.; Zhao, X. S.; Hamers, R. J.; Smith, L. M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 1205-1209.
(46) Valeur, E.; Bradley, M. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 606-631.
(47) Bocking, T.; James, M.; Coster, H. G. L.; Chilcott, T. C.; Barrow, K. D. *Langmuir* **2004**, *20*, 9227-9235.
(48) Dordi, B.; Schonherr, H.; Vancso, G. J. *Langmuir* **2003**, *19*, 5780-5786.
(49) Taratula, O.; Galoppini, E.; Mendelsohn, R.; Reyes, P. I.; Zhang, Z.; Duan, Z.; Zhong, J.; Lu, Y. *Langmuir* **2009**, *25*, 2107-13.
(50) Wojtyk, J. T. C.; Morin, K. A.; Boukherroub, R.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 6081-6087.
(51) Yang, M.; Teeuwen, R. L. M.; Giesbers, M.; Baggerman, J.; Arafat, A.; de Wolf, F. A.; van Hest, J. C. M.; Zuilhof, H. *Langmuir* **2008**, *24*, 7931-7938.
(52) Staros, J. V.; Wright, R. W.; Swingle, D. M. *Analytical Biochemistry* **1986**, *156*, 220-222.

(53) Touahir, L.; Sam, S.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N.; Allongue, P.; Henry de Villeneuve, C.; Gabouze, N.; Djebbar, S.; Gouget-Laemmel, A. C.; *Sensor Letters* **2010**, accepted.

(54) Briand, E.; Salmain, M.; Compere, C.; Pradier, C. M. *Colloids and Surfaces B* **2006**, *53*, 215-224.

(55) Chi, Y. S.; Jung, Y. H.; Choi, I. S.; Kim, Y. G. *Langmuir* **2005**, *21*, 4669-4673.

(56) Lahiri, J.; Isaacs, L.; Tien, J.; Whitesides, G. M. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 777-790.

(57) Wei, F.; Sun, B.; Liao, W.; Ouyang, J. H.; Zhao, X. S. *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, *18*, 1149-1155.

(58) Jang, L. S.; Keng, H. K. *Biomedical Microdevices* **2008**, *10*, 203-211.

(59) Mirsky, V. M.; Riepl, M.; Wolfbeis, O. S. *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, *12*, 977-989.

(60) Touahir, L.; Moraillon, A.; Sam, S.; Gouget-Laemmel, A. C.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; Henry de Villeneuve, C.; Ozanam, F. *ECS Trans.* **2009**, *19*, 283-292.

(61) Sam, S.; Touahir, L.; Salvador Andresa, J.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Gabouze, N.; Djebbar, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 809-814.

(62) Touahir, L.; Moraillon, A.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; de Villeneuve, C. H.; Ozanam, F.; Solomon, I.; Gouget-Laemmel, A. C. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *25*, 952-955.

Chapitre 2 : Architecture de puces à ADN fluorescentes ultrasensibles

Introduction 59
A. Détection par fluorescence 60
1. Mécanisme de la fluorescence 60
2. Mesure de la fluorescence 61
3. Limite d'utilisation du silicium cristallin 63
B. Propriétés des couches minces de silicium amorphe carboné 65
1. Silicium amorphe hydrogéné 65
2. Modélisation de la fluorescence 67
a) Le silicium amorphe 67
b) Utilisation d'un réflecteur 69
c) Utilisation de couches minces de silicium amorphe carboné 71
C. Modes opératoires : Dépôt et fonctionnalisation de a-$Si_{1-x}C_x$:H 75
1. Evaporation du réflecteur 75
2. Dépôt par PECVD 75
3. Fonctionnalisation des couches minces 76
4. Protocole d'immobilisation des sondes 77
D. Transfert de la chimie et mesure de la fluorescence 78
1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge 78
2. Mesure de la fluorescence 79
E. Mise au point de l'architecture 81
1. Séparation de l'effet de la chimie de surface et de l'amplification optique 81
a) Protocole d'hybridation 81
b) Choix des architectures 81
c) Mesure de l'effet de la chimie et de l'optique 83
d) Hybridation in situ et réutilisabilité 86
2. Choix du taux de carbone 87
3. Utilisation d'un miroir de Bragg 88
a) Choix du substrat 88
b) Protocole d'immobilisation des sondes et hybridation 90
c) Amplification de la fluorescence et limite de détection 91
F. Différentes utilisations du biocapteur 93
1. Hybridation in situ 93
2. Détermination de la température de fusion 95
3. Etude cinétique 97
4. Fluorescence en fonction de la dilution des sondes 100
Conclusion 102
Bibliographie 103

« La société peut prédire mon avenir, moi seul peux l'influencer »
A. Robbins

Introduction

Les biopuces sont des outils d'analyse et de diagnostic utilisés essentiellement dans le domaine de la génétique et de la pharmacie et qui ont pour objet d'identifier un grand nombre de gènes ou de protéines et d'étudier leurs fonctions.[1] Pour ce qui concerne les puces à ADN, la technique de détection utilisée est généralement la fluorescence, en raison de sa sensibilité.[2-4]

Grâce à des techniques d'amplification de la fluorescence, les biopuces les plus performantes permettent d'approcher la détection d'une molécule unique. La société Genewave a démontré que le signal de fluorescence peut être amplifié par un facteur 15 par rapport aux lames standard en déposant un miroir de Bragg adapté sur les lames de verre.[5] Ces caractéristiques permettent de suivre *in situ* et en temps réel la reconnaissance sonde – cible avec une instrumentation adaptée.[6,7] Comme la plupart des biopuces, les lames de Genewave sont fonctionnalisées par silanisation en phase vapeur pour éviter la polymérisation de surface et abaisser les coûts.[8-11] Cette technique souffre cependant de limitations sérieuses pour passiver efficacement la surface et optimiser les propriétés physico-chimiques des couches fonctionnalisées vis-à-vis de l'immobilisation des sondes, des adsorptions non spécifiques et de la réutilisation des lames. Ces facteurs sont particulièrement critiques dans le cas des lames amplificatrices.

L'objectif de ce chapitre est le développement d'une nouvelle architecture de biopuces ultrasensibles à base de silicium amorphe pour un meilleur contrôle de la chimie de surface.[12]

Nous nous intéresserons à l'utilisation de couches minces de silicium amorphe carboné et à l'ajustement des propriétés optiques pour étudier l'exaltation de la fluorescence d'un point de vue théorique et expérimental. Nous montrerons aussi l'intérêt de tels biocapteurs pour des études de la réaction d'hybridation.

A. Détection par fluorescence

1. Mécanisme de la fluorescence

La fluorescence est un processus de luminescence permettant à une molécule de passer d'un état électronique excité à un état d'énergie plus basse, par émission de lumière. Plus précisément, la photoluminescence (luminescence induite par absorption de la lumière) est appelée fluorescence ou phosphorescence suivant la nature de l'état excité et la voie de désexcitation (figure 30).

Le processus de fluorescence peut être décrit à partir du diagramme de Jablonski (figure 30).[13] Pour une molécule donnée, il existe différents états électroniques (état fondamental et états excités) notés S0, S1 et S2 sur le diagramme ci-dessous. Chaque niveau d'énergie d'une molécule est subdivisé en niveaux correspondant aux différentes excitations vibrationnelles et rotationnelles. L'état électronique est dit singulet lorsque le spin total est nul ou triplet lorsque le spin est égal à 1. Dans la très grande majorité des cas, les molécules susceptibles de fluorescer dans le visible possèdent un système d'électrons appariés dans un état singulet où seul l'état vibrationnel v0 est peuplé. Lors de l'absorption d'un photon suffisamment énergétique (dans la bande d'absorption des molécules), les électrons accèdent alors à un niveau d'énergie plus élevé : la molécule se trouve dans un état " excité". Les niveaux excités atteints sont par nature instables, la durée de vie de l'état excité est souvent de l'ordre de quelques nanosecondes.

Deux types de processus photophysiques permettent à la molécule excitée de dissiper son énergie excédentaire : les processus de désactivation non radiative et les processus de désactivation radiative ou luminescence. Si l'émission radiative se produit entre deux états singulets, le phénomène est appelé fluorescence. Si l'émission se produit entre deux états de multiplicité différente (triplet – singulet), le phénomène est appelé phosphorescence et la durée de vie de l'état excité est généralement plus longue que pour la fluorescence. Le spectre d'émission de fluorescence est en général décalé vers des longueurs d'onde plus grandes que la longueur d'onde d'excitation (les photons émis par fluorescence ayant une énergie plus faible que celle des photons absorbés).

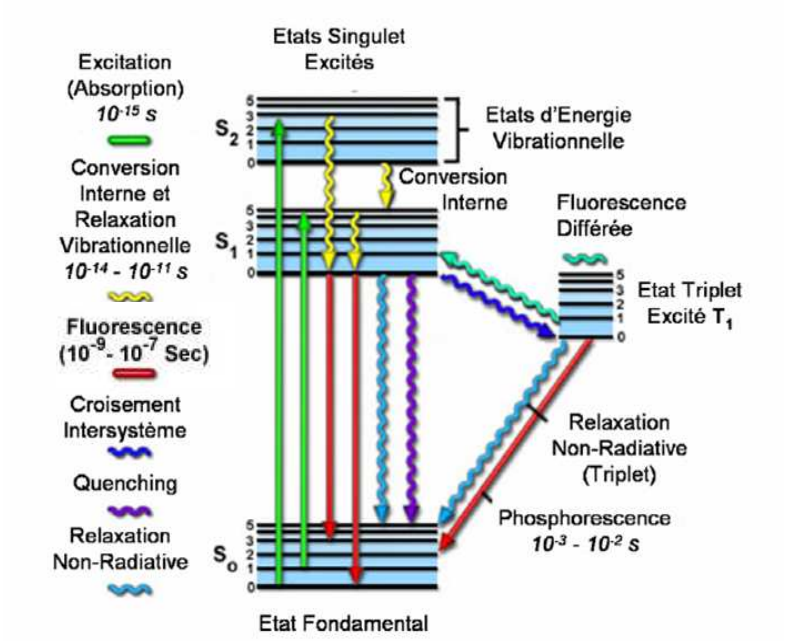


Figure 30 : Diagramme de Jablonski.

Il est possible d'exciter une molécule fluorescente revenue à l'état fondamental plusieurs fois ; ainsi un fluorophore peut émettre des milliers de photons. Ceci explique la très bonne sensibilité des puces à ADN fluorescentes. Il faut cependant éviter d'exposer le fluorophore à une excitation trop longue ou trop intense pour éviter le photoblanchiment, souvent associé à une réaction de l'oxygène avec la molécule dans l'état excité et qui aboutit à une diminution de la fluorescence. La fluorescence peut aussi être affectée par des processus d'extinction lorsque de nouveaux canaux de recombinaison deviennent efficaces, par exemple au voisinage de métaux ou dans certaines configurations où les fluorophores forment des dimères.

2. Mesure de la fluorescence

Il existe de nombreux fluorophores organiques permettant de travailler à n'importe quelle longueur d'onde dans le visible. Parmi les fluorophores organiques, les cyanines sont couramment utilisées dans le domaine des puces à ADN. Aussi choisirons-nous de travailler avec les carbocyanines (Cy) Cy3 (λ_{ex} = 550 nm ; λ_{em} = 570 nm) et Cy5 (λ_{ex} = 650 nm, λ_{em}= 670 nm) dont les structures sont données figure 31. Chaque fluorophore est caractérisé par son rendement quantique Φ (nombre de photons émis/ nombre de photons absorbés). Les carbocyanines 3 et 5 ne présentent pas des rendements très élevés (Cy3 = 0,04 et Cy5 = 0,28)

mais ont l'avantage de pouvoir être intégrées de façon très contrôlée lors de la synthèse de séquences d'oligonucléotides marqués.[14]

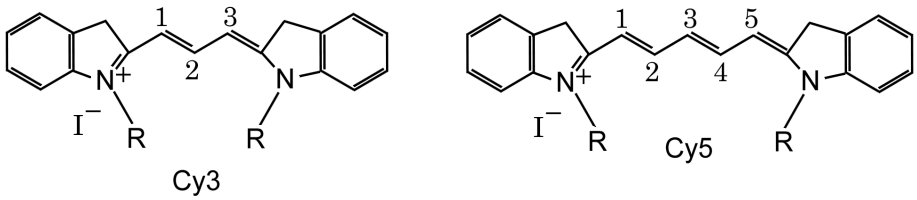


Figure 31: Structure des carbocyanines 3 et 5.

Pour les mesures de fluorescence, nous utilisons deux types de système :

- Un scanner commercial Axon instrumentation Personal 4100A (figure 32a). Dans ce cas, les fluorophores sont excités par un laser à la longueur d'onde d'absorption (532 nm pour Cy3 et 635 nm pour Cy5) et l'émission est filtrée par un filtre d'excitation. La fluorescence est détectée en géométrie confocale par un photomultiplicateur (PMT), auquel est appliquée une tension de 350 ou 450 V qui permet d'ajuster le gain pour la mesure de l'intensité du signal.
- Un imageur Hyblive, commercialisé par Genewave (figure 32b). Cette machine permet de mesurer des images de fluorescence au cours de la réaction d'hybridation.[6,7] Dans ce cas, les fluorophores sont excités par des diodes électroluminescentes et la fluorescence est collectée par un capteur CCD (Charge Coupled Device).

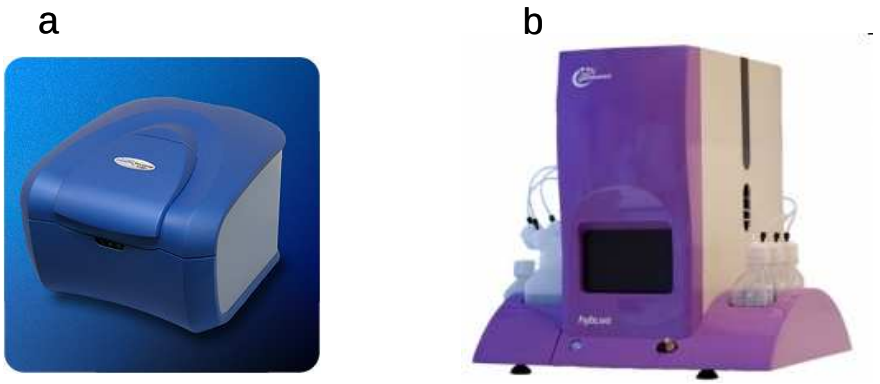
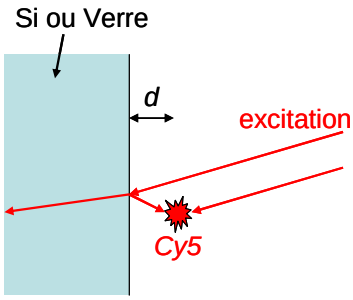


Figure 32 : (a) scanner confocal Axon instrumention Personal 4100 A ; (b) machine Hyblive permettant des mesures de fluorescence in situ en temps réel.

3. Limite d'utilisation du silicium cristallin

Une première idée pour s'affranchir des limites liées aux procédés d'immobilisation des sondes à la surface est de travailler sur substrat de silicium cristallin, pour lequel des procédés robustes et bien contrôlés de greffage de molécules organiques ont été mis au point. Toutefois, le calcul de l'intensité du champ d'excitation et d'émission pour un fluorophore placé à une distance d (~5 nm) d'un substrat de silicium cristallin (figure 33) révèle certaines limites. Dans le cadre de cette étude nous choisirons d'optimiser les architectures pour la cyanine 5 : nous ferons donc les calculs avec les longueurs d'onde dans le rouge, en utilisant les longueurs d'onde d'excitation (635 nm) et d'émission (670 nm) de la cyanine 5. Le rendement de fluorescence d'une molécule accrochée à une surface dépend de façon critique des indices de réfraction des différents substrats. L'intensité du champ d'excitation est gouvernée par le champ électrique local E du faisceau d'excitation, qui diffère généralement de celui dans l'air en l'absence d'interface E_0. En considérant la superposition de l'onde incidente et de l'onde réfléchie, il est possible de déterminer l'intensité du champ d'excitation en incidence quasi-normale (équation 1). Nous pouvons en déduire que pour le silicium (n=3,4 ; kd <<1) $E^2 \sim 0{,}2\ E_0^2$ alors que pour le verre nous avons $E^2 \sim 0{,}64\ E_0^2$.



$$E^2 = 2E_0^2 \frac{(n^2+1)-(n^2-1)\cos 2kd}{(n+1)^2} \qquad (1)$$

Figure 33 : Représentation schématique pour le calcul de l'intensité du champ d'excitation pour un fluorophore placé à une distance (d) d'un substrat de verre ou de silicium.

Ces résultats sont valables autant pour l'excitation que pour l'émission. Ainsi en définissant la fluorescence F comme le produit de l'intensité du signal émis par l'intensité du signal excité, nous avons F ~ 0,04 pour le silicium cristallin et F ~ 0,4 pour le verre. Il y a donc un facteur de perte d'un ordre de grandeur en utilisant un substrat de silicium à cause de son indice de réfraction élevé. Ceci peut difficilement être compensé même si la chimie de surface est plus robuste. Toutefois, pour pouvoir bénéficier d'une chimie de surface contrôlée,

nous pouvons utiliser une couche mince de silicium amorphe hydrogéné ou un alliage silicium-carbone amorphe.[15,16] Ceci permettra d'optimiser l'optique assurant que l'onde incidente et l'onde réfléchie sont en phase au niveau de la molécule fluorescente (figure 34).[17,18]

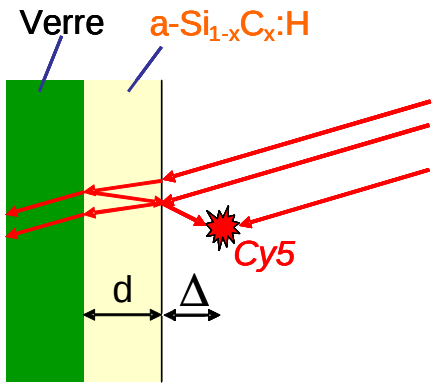


Figure 34 : Représentation schématique d'une lame de verre recouverte d'une couche mince de silicium amorphe carboné.

Nous développerons cette approche dans la suite de ce chapitre en nous intéressant aux propriétés des couches minces de silicium amorphe et des alliages silicium-carbone amorphes.

B. Propriétés des couches minces de silicium amorphe carboné

1. Silicium amorphe hydrogéné

Depuis la fin des années 60, le silicium amorphe a connu un réel essor.[12,19,20] Les premières couches de silicium amorphe hydrogéné ont été fabriquées par le groupe de Chittik.[21] De nombreuses études ont permis de développer l'utilisation de ce matériau pour diverses applications dans le domaine de la microélectronique, telles que les cellules photovoltaïques ou les transistors TFT (Thin Film Transistors) pour le contrôle des écrans plats,[22,23] ou depuis peu dans le domaine des biocapteurs.[16,24,25]

Comme décrit au chapitre 1, le silicium cristallin est parfaitement ordonné. La distance interatomique est de 0,235 nm et l'angle tétraédrique de 109°C. Même si le silicium amorphe ne présente pas une structure ordonnée à grande échelle, celle-ci est tout de même plus ou moins préservée à l'échelle atomique. La distance interatomique est de 0,235 nm ± 2% et les angles de 109° ± 10% (figure 35).[26] Il existe dans ce matériau un grand nombre de défauts, liés aux distorsions du réseau amorphe et aux liaisons pendantes dans le matériau. Les défauts impliquent l'apparition d'états électroniques à l'intérieur de la bande interdite. Ainsi la figure 36 représente schématiquement la densité d'états électronique du silicium amorphe (trait plein) et celle du cristallin (tiretés) où l'on peut distinguer les queues de bandes liées aux déformations de liaisons et les niveaux proches du milieu de gap, associés aux liaisons pendantes dans le cas du silicium amorphe (densité d'états profonds).[22]

Dans le matériau amorphe les défauts profonds forment des centres de recombinaison pour les photoporteurs. Une grande partie des liaisons pendantes est saturée avec un atome d'hydrogène. En effet, l'introduction de l'hydrogène dans la structure amorphe permet de diminuer considérablement le nombre de liaisons pendantes au profit de liaisons Si-H et donc de diminuer la densité d'états profonds.[27] Nos couches minces de a-Si:H sont déposées par décomposition chimique en phase vapeur assistée par plasma (PECVD) et contiennent ~10% d'atomes d'hydrogène.[28,29] Ceci permet de saturer plus de 99,9% des liaisons pendantes. La faible densité d'états localisés pour le silicium amorphe hydrogéné (~10^{15} cm^{-3}) a ainsi permis son utilisation en électronique et pour la conversion photovoltaïque de l'énergie.[22]

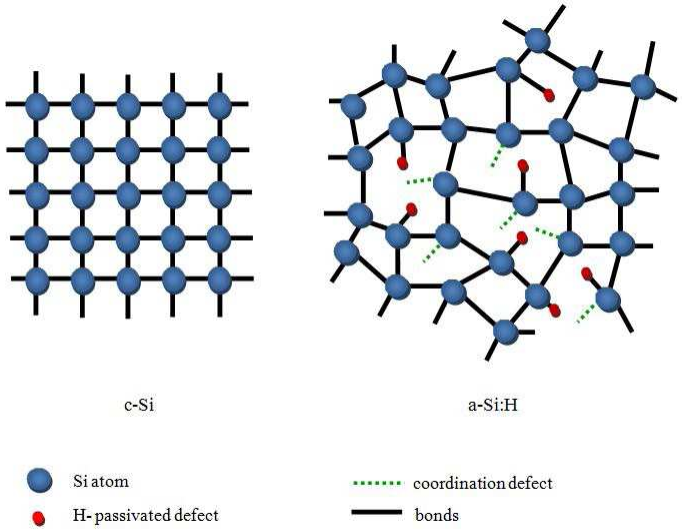


Figure 35 : Représentation schématique de la structure du silicium cristallin et du silicium amorphe.

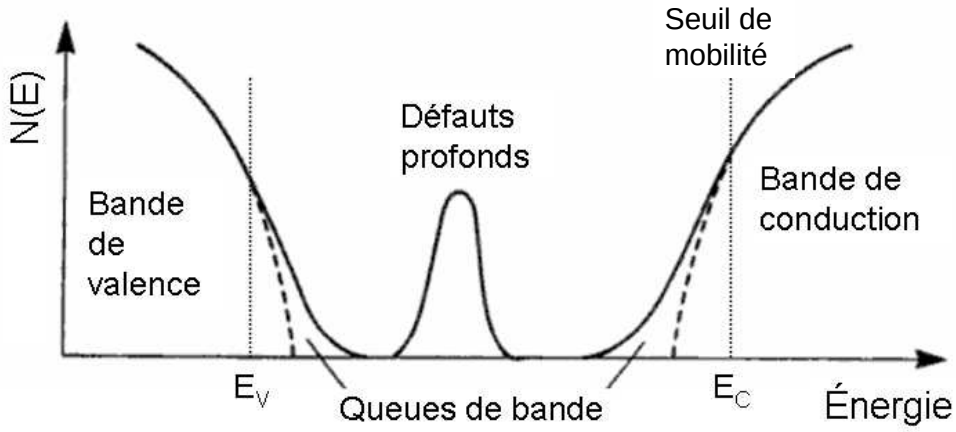


Figure 36 : Distribution de la densité d'états dans la structure cristalline (tiretés) et dans la structure amorphe (trait plein).

Le silicium amorphe est un matériau souvent comparé au silicium cristallin. Il est considéré lui aussi comme semi-conducteur, mais il se différencie du silicium cristallin assez distinctement pour différentes raisons : les propriétés optiques sont différentes, le gap optique du silicium amorphe est plus élevé (1,7 eV) et moins nettement marqué en termes de seuil d'absorption que celui du silicium cristallin (1,1 eV). C'est aussi un matériau plus absorbant ($\alpha_{\text{silicium amorphe}}$=1,17 μm^{-1} et α_{silicium}= 0,38 μm^{-1} à 635 nm). Il peut être déposé sur de grandes surfaces (verre, métal, silicium, inox…). Le procédé de fabrication (PECVD) est assez simple

et présente l'avantage de se faire à basse température (< 300°C).[22] Le silicium amorphe est donc particulièrement intéressant pour l'élaboration de biocapteurs à fluorescence.

2. Modélisation de la fluorescence

a) Le silicium amorphe

Afin de déposer l'épaisseur pour laquelle la fluorescence sera la plus élevée, il convient de calculer le facteur $F(d)$, qui affecte l'intensité de la fluorescence en fonction de l'épaisseur d de a-Si:H. $F(d)$, calculé à partir des équations d'optique classique,[30] est le produit de deux fonctions périodiques $f_{exc}(d)$ (facteur à l'excitation) et $f_{em}(d)$ (facteur à l'émission (collection)) avec des périodes légèrement différentes, ce qui contribue à l'amortissement de $F(d)$.

Le comportement oscillatoire (figure 37) est de toute évidence un effet dû à l'interférence entre le rayon réfléchi directement à la surface et un rayon ayant traversé la couche a-Si:H et qui a été réfléchi à l'interface verre / couche mince de a-Si :H.

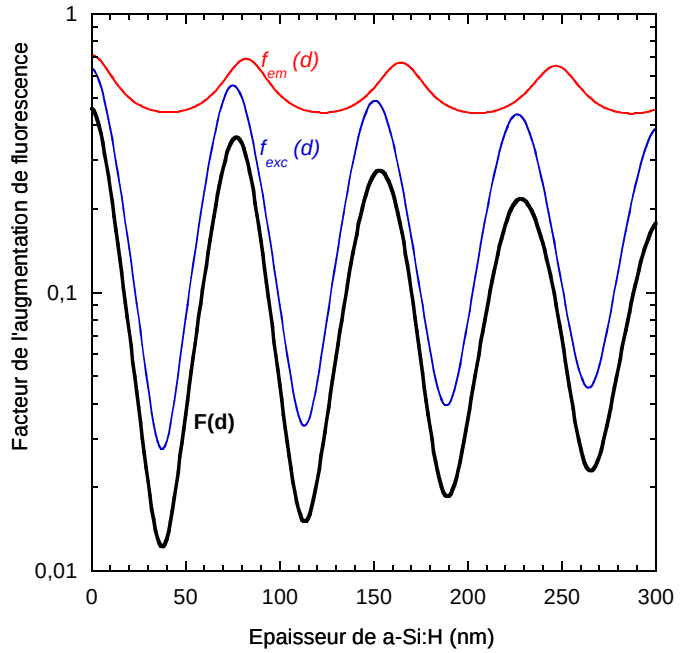


Figure 37 : Calcul théorique des facteurs affectant l'intensité du champ excitateur $f_{exc}(d)$, du champ émis $f_{em}(d)$ et de la fluorescence $F(d)$ en fonction de l'épaisseur de la couche de a-Si:H.

Dans le cas simple d'interférences entre 2 rayons lumineux cohérents de même intensité I_0 et déphasés de $\Delta\varphi$ l'intensité résultante est égale à :

$$I_0 (1+\cos(\Delta\varphi)) \quad (2)$$

Les interférences constructives se produisent quand la différence du chemin optique entre ces deux rayons est un multiple entier de la longueur d'onde. Cependant, cette condition précise ne peut pas être remplie simultanément pour l'excitation (longueur d'onde 635 nm) et pour l'émission (longueur d'onde 670 nm). Il convient donc de faire un calcul plus détaillé.

Naïvement l'expression de l'intensité récupérée par le capteur est de la forme :

$$I=K\times|E|^2 \quad (3)$$

avec E l'amplitude du champ électrique excitateur au niveau des fluorophores. En effet, l'amplitude du champ électrique $\vec{E}_{\text{émis}}$ réémis par les fluorophores est proportionnelle à celle du champ électrique excitateur au niveau des fluorophores et l'intensité I est proportionnelle à $\left|\vec{E}_{\text{émis}}\right|^2$. Or E est affecté par les caractéristiques du système : le champ électrique auquel les fluorophores sont en réalité soumis est $E'_{laser} = E_{laser}\times(1+r_E)$ avec r_E le coefficient de réflexion en amplitude du système en incidence normale pour la longueur d'onde du laser. C'est un nombre complexe compris à l'intérieur du disque unité. Une deuxième contribution vient du fait que l'intensité récupérée est également affectée à la réémission. En supposant le rendement non radiatif inchangé, on a alors

$$K' = K\,\frac{\int_0^{45°}\left|1+r'_E(i)\right|^2\sin(i)di}{\int_0^{45°}\sin(i)di} \quad (4)$$

où $r'_E(i)$ est le coefficient de réflexion en amplitude pour le champ électrique du système optique considéré pour la longueur d'onde de réémission à l'angle d'incidence i. L'intégration vient du fait que l'on moyenne les contributions sur le cône de demi-ouverture 45°, qui représente toutes les directions que peuvent prendre les rayons lumineux qui vont être collectés par le capteur. Au total on peut donc écrire un gain

$$F = \frac{I'}{I} = \left|1+r_E\right|^2\,\frac{\int_0^{45°}\left|1+r'_E(i)\right|^2\sin(i)di}{\int_0^{45°}\sin(i)di} \quad (5)$$

C'est cette grandeur, comprise entre 0 et 16, que nous allons tenter de maximiser. Les calculs de r_E et r'_E ne sont pas détaillés dans ce chapitre, ils sont basés sur les formules classiques de Fresnel fournies par exemple par l'ouvrage de Born et Wolf.[30] Grâce à un programme écrit en fortran, nous pouvons calculer les fonctions f_{exc}(d) et f_{em}(d) pour une excitation en incidence normale et une émission supposée non polarisée. Pour ce faire, le coefficient $r_{,E}$ a été calculé en polarisation p et s, puis moyenné.

De plus, puisque l'émission est collectée sur un angle de demi-ouverture de 45° et la différence du chemin optique dépend de l'angle d'incidence, la période d'oscillation pour le facteur d'émission $f_{em}(d)$ est en réalité distribuée, ce qui amène une contribution supplémentaire à l'amortissement. L'absorption du matériau (α_{635} = 1,17 μm^{-1} ; α_{670} = 0,5 μm^{-1}) contribue aussi à cet amortissement.

Dans le cas idéal où les fluorophores sont libres dans l'air, *F* est égal à 1 par définition. Or, dans une architecture classique où les fluorophores sont déposés sur du verre, le facteur *F* est de 0,45 (= F(0 nm)). La courbe calculée prédit un premier maximum à 77 nm (couche λ/2n) avec une légère diminution de la fluorescence F(77 nm) = 0,36. Nous définirons un facteur d'amplification G:

$$G = \frac{F_d(\max)}{F(0)} = \frac{F_d(\max)}{0{,}45} \qquad (5)$$

Dans le cas de a-Si :H, la figure 37 montre que :

$$G = \frac{F_d(\max)}{0{,}45} = 0.8$$

La fluorescence calculée est donc plus faible que celle calculée sur verre. On voit toutefois que l'on a amélioré sensiblement la situation par rapport au silicium cristallin.

b) Utilisation d'un réflecteur

Afin d'augmenter davantage la fluorescence, il convient d'incorporer un réflecteur entre la couche de silicium amorphe et le verre comme le montre la figure 38. En présence d'un réflecteur, la courbe calculée comme précédemment (figure 38c. bleu) montre que le facteur *F* est égal à 4,2 pour une épaisseur optimale de 25 nm (l'épaisseur de la "couche λ/4n" n'est pas exactement la moitié de celle de la "couche λ/2n", parce que le changement de phase

associé à la réflection sur le métal diffère de sa valeur idéale de π). L'introduction d'une couche d'aluminium (n= 1-7i) nous permet d'obtenir un signal avec un gain G égal à 9,3. L'augmentation possible du rendement quantique due au couplage optique entre les fluorophores et le réflecteur est négligée.

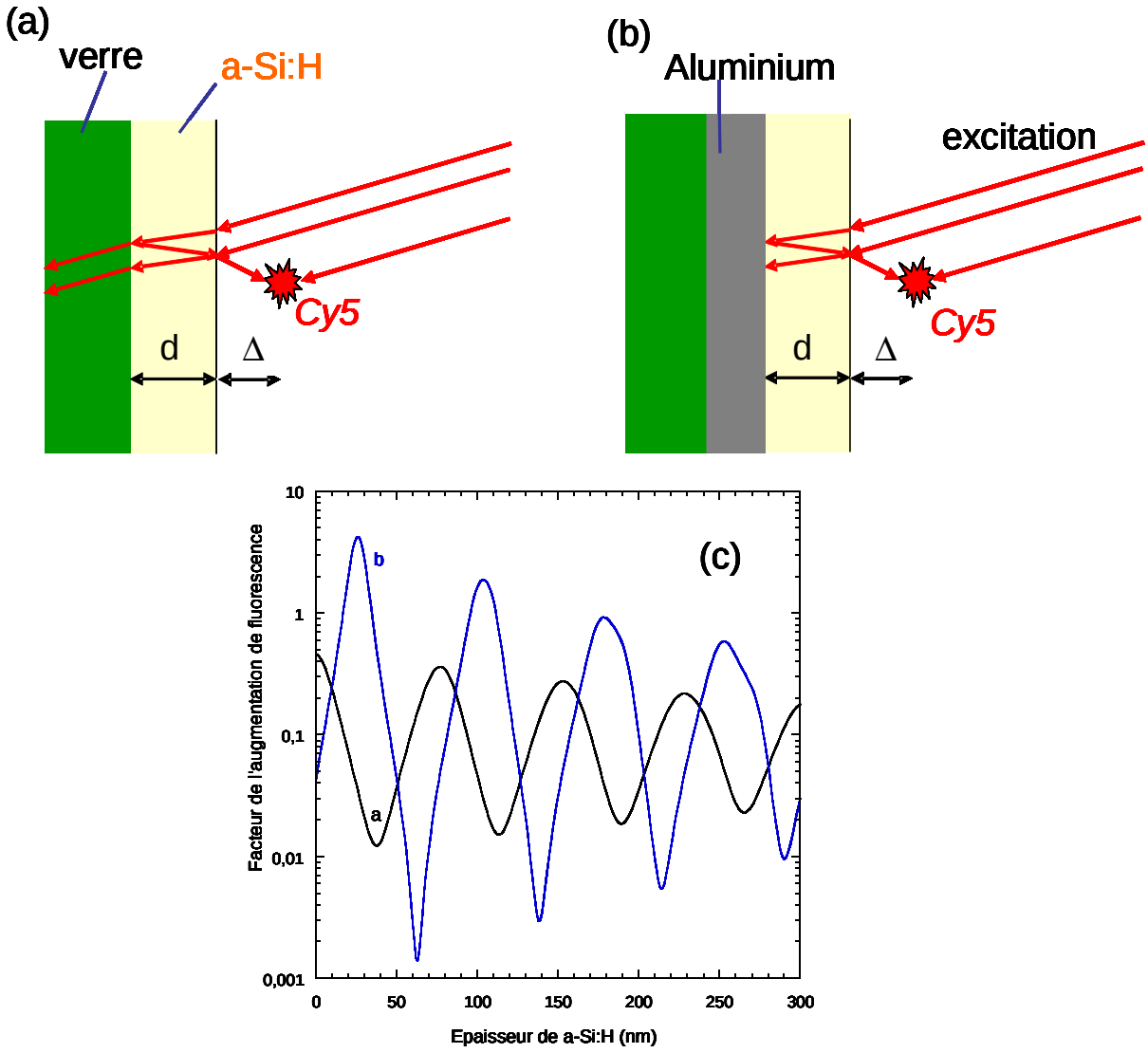


Figure 38 : (a) et (b) Représentation schématique des différentes structures ; (c) calcul théorique pour une couche avec (bleu) et sans aluminium (noir).

c) Utilisation de couches minces de silicium amorphe carboné

(1) Caractérisation des couches

Afin d'optimiser la fluorescence, il est intéressant de pouvoir ajuster les propriétés optiques en diminuant l'indice optique de la couche de silicium amorphe. En effet, l'indice de réfraction du silicium(n_{635} = 4,2) est trop élevé par rapport à celui de la couche d'aluminium qui n'est pas un miroir parfait. Ainsi avons-nous été amenés à étudier les alliages silicium-carbone amorphes (a-$Si_{1-x}C_x$:H). Ces alliages présentent l'avantage de pouvoir être déposés par PECVD en utilisant comme gaz précurseur un mélange de méthane et de silane.[28,29,31] Le tableau 2 présente les parties réelle n' et imaginaire n'' pour différents alliages a-$Si_{1-x}C_x$:H. Ces valeurs ont été déterminées par spectroscopie à transmission suivant une procédure décrite par Solomon.[32] Les mesures ont été faites à l'aide d'un spectromètre Shimazu UV-visible entre 500 et 1100 nm, domaine spectral pour lequel des interférences sont observées. Plus le taux de carbone est important, plus l'indice de réfraction n' diminue. En effet, l'atome de carbone étant plus petit que l'atome de silicium, la liaison Si-C est plus courte que la liaison Si-Si. Ceci entraîne une augmentation des interactions entre les atomes, donc une augmentation de l'énergie du gap optique E_g qui conduit à une diminution de l'indice optique. La teneur en carbone dans nos couches est limitée à 37% pour rester dans le régime « basse puissance » permettant d'éviter un bombardement ionique.[28,29]

Taux de carbone (%)	n'_{635}	n''_{635}	n'_{670}	n''_{670}
0	4,2	0,0681	4,09	0,025
2	3,92	0,0382	3,82	0,0131
5	3,61	0,0173	3,53	0,0056
13	3,24	0,00472	3,19	0,0015
15	2,91	0,014	2,87	0,0004
20	2,63	0,0005	2,60	0,0003
25	2,37	0,0004	2,35	0,0002
33.3	1,97	0,0005	1,93	0,0003
37	1,81	0,0011	1,92	0,001

Tableau 2 : Indice de réfraction des alliages a-$Si_{1-x}C_x$:H à 635 et 670 nm.

Ces alliages déposés par PECVD ont été très bien caractérisés par Solomon et coll. il y a plus de 20 ans. La RMN du proton a par exemple pu montrer que l'incorporation du carbone se fait sous forme de groupements méthyle $-CH_3$ pour un taux de carbone < à 20% comme le montre la figure 39.[28,29]

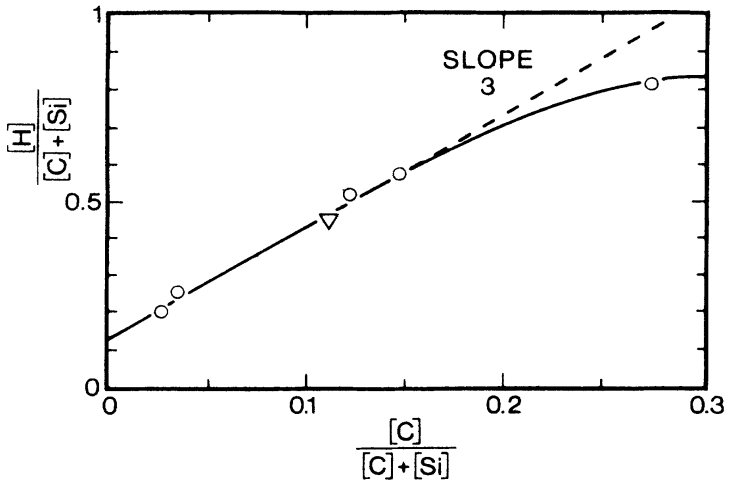


Figure 39 : Concentration atomique d'hydrogène dans les couches minces a-$Si_{1-x}C_x$:H.[29]

(2) Simulation de la fluorescence

Dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser la fluorescence en faisant varier le taux de carbone. En considérant une architecture avec un réflecteur et une couche de silicium amorphe carboné avec un taux x variable de 0 à 37%, nous avons pu calculer comme précédemment le gain de la fluorescence. La figure 40 montre les résultats obtenus pour différents taux de carbone (0, 15, 20, 37%). On note que la fluorescence augmente avec le taux de carbone x, jusqu'à un maximum atteint pour un taux de 37% (qui est en outre le maximum envisageable par la technique PECVD). On note de plus que l'épaisseur à déposer varie selon le taux de carbone.

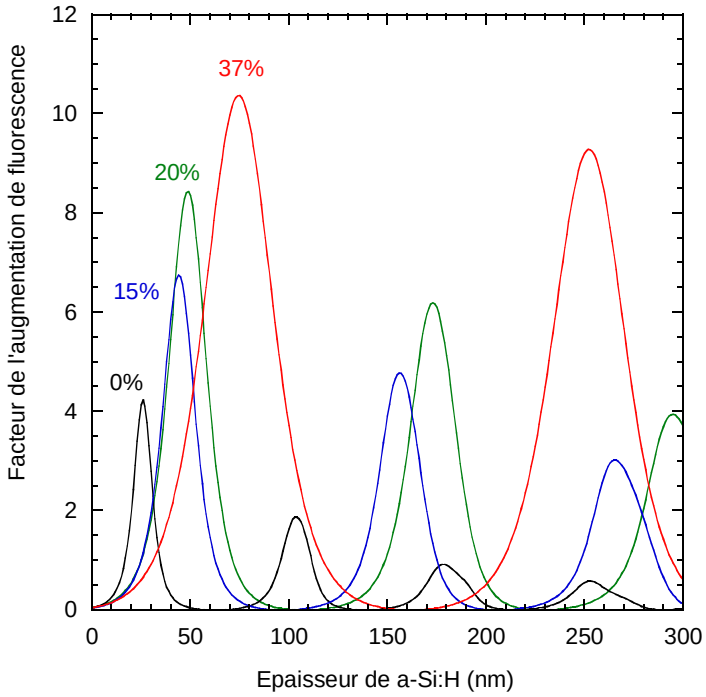


Figure 40 : Simulation du facteur d'augmentation de la fluorescence pour différentes couches de silicium amorphe carboné a-$Si_{1-x}C_x$:H déposées sur aluminium : 0% (noir) ; 15%(bleu) ; 20% (vert) ; 37% (rouge).

Le tableau 3 résume les résultats obtenus en présentant les facteurs F pour les différentes architectures.

Taux de carbone	G
0	9,5
2	11,1
5	13,1
13	15,5
15	17,2
20	19
25	20,6
33,3	22,9
37	23,2

Tableau 3 : Gain G calculé pour différentes couches a-$Si_{1-x}C_x$:H.

(3) Utilisation de différents métaux

Il est encore possible d'améliorer ces valeurs de gain en utilisant d'autres réflecteurs métalliques, tels que l'or ou l'argent. Le tableau 4 présente les gains en fluorescence pour une couche de a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H déposée sur différents métaux. Les résultats obtenus montrent que la fluorescence peut-être de 23 à 27 fois plus élevée suivant le métal utilisé. Nous privilégierons cependant l'utilisation de l'aluminium, moins coûteuse et plus facile.

Métal	Aluminium	Argent	Or
Indice du métal	1-7i	0.135- 4.02 i	0.181-3.02i
F (max)	10.3	12.3	10.8
Gain /verre	23	27	24
Epaisseur déposée (nm)	74	63	57

Tableau 4 : Gain G calculé pour une couche de a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H déposée sur différents métaux.

C. Modes opératoires : Dépôt et fonctionnalisation de a-$Si_{1-x}C_x$:H

1. Evaporation du réflecteur

Les métaux sont déposés par évaporation sous vide sur des lames de verre. Elles sont préalablement nettoyées, successivement avec du détergent dilué dans de l'eau osmosée (15 MΩ cm), de l'éthanol, du piranha (1vol. H_2O_2, 3vol. H_2SO_4) et abondamment rincées à l'eau ultrapure. Elles sont ensuite séchées sous azote. Enfin, les lames sont introduites dans une chambre sous vide p= 2 10^{-5} Torr et de l'aluminium est placé sur un filament de tungstène (figure 41). On applique un courant qui permet l'évaporation de l'aluminium par chauffage (effet Joule). L'aluminium se dépose de façon homogène sur les lames de verre.

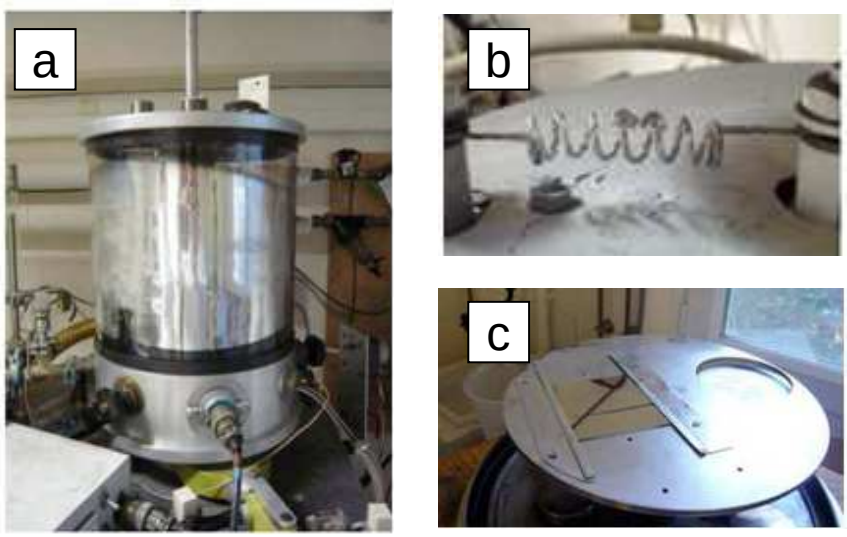


Figure 41 : (a) Enceinte de l'évaporateur d'aluminium ; (b) Filament de tungstène ; (c) Lames métallisées.

2. Dépôt par PECVD

Nous déposerons nos couches minces de a-Si:H par décomposition chimique en phase vapeur assistée par plasma (PECVD) en « régime basse puissance » (RF= 13,56 MHz) avec une densité de puissance de 0,1 W cm^{-2} (figure 42). Les dépôts sont effectués à 250°C sous

une pression de 35 mTorr et avec un flux des gaz de 2 L/h. La proportion des gaz à introduire est calculée d'après le modèle empirique proposé par Solomon et coll., ainsi pour une couche $aSi_{0,85}C_{0.,5}$:H, 73% (1,45 L/h soit 24 sccm) de méthane et 27% de silane (0,55 L/h soit 9 sccm) sont nécessaires ; alors que pour d'autres couches il faut 81%(1,62 L/h soit 27 sccm) de méthane et 19% de silane (0,38 L/h soit 6,3 sccm) pour $aSi_{0.8}C_{0.2}$:H et 97%(1,94 L/h soit 32 sccm) de méthane et 3% de silane (0,06 L/h soit 1 sccm) pour une couche $aSi_{0.63}C_{0.37}$:H,[29] ce qui nous permet par exemple d'obtenir en 1 heure des couches de 1,2 µm de a-Si:H ou de 1 µm pour des couches de $aSi_{0,8}C_{0,2}$:H. Les substrats (lames de verre, lames métallisées ou prismes de silicium ATR) sont introduits et placés à l'anode. Les lames métallisées sont introduites telles quelles dans le réacteur, les lames de verre sont nettoyées comme pour l'évaporation de métaux.

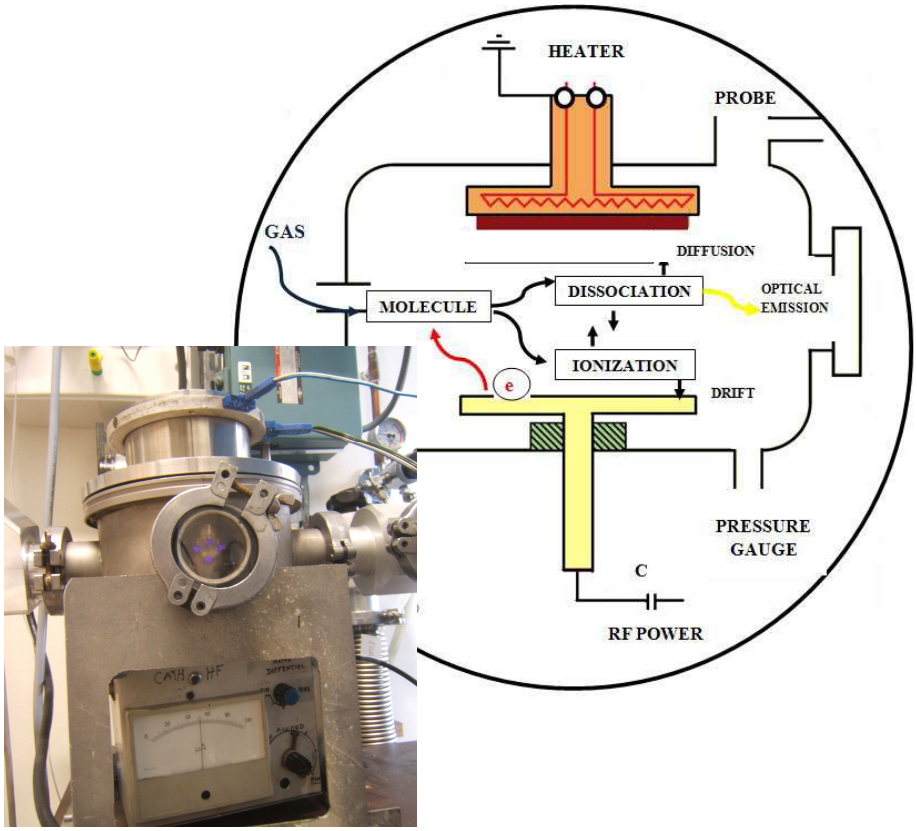


Figure 42 : Représentation schématique du réacteur et du processus lors du plasma.

3. Fonctionnalisation des couches minces

La surface a-$Si_{1-x}C_x$:H est hydrogénée par exposition à des vapeurs de HF pendant 15 secondes, puis greffée avec des chaînes 10-carboxydécyle par hydrosilylation photochimique dans l'acide undécylénique (312 nm, 6 mW cm^{-2}, 3 h), et finalement rincée à l'acide acétique

(75°C, 30 mn). Les groupes carboxyles sont ensuite activés dans un mélange de EDC et NHS (5 mM/5 mM) à 15°C pendant 1h30.[33] Pour l'étude par spectroscopie infrarouge, les surfaces sont amidées par de l'éthanolamine à 5 10^{-2} M pendant 15 minutes. [34]

4. Protocole d'immobilisation des sondes

Pour l'étude par fluorescence de l'immobilisation et de l'hybridation de brins d'ADN, deux sondes d'oligonucléotides sont utilisées : une sonde 25-mer [5' Cy5-AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T-NH_2-$(CH_2)_6$ 3'] nommée Cy5-$\overline{ON}$-G (G= groupement aminohexyle) et une sonde non marquée 50-mer [5'AGC-ACA-ATG-AAG-ATC-AAG-ATC-ATT-GCT-CCT-CCT-GAG-CGC-AAG-TAC-TCC-GT-$(CH_2)_6$-NH_2 3'] nommée ON1. Les deux sondes, diluées à 10^{-5}M dans 150 mM d'un tampon phosphate contenant 0,01% de SDS (sodium dodécyl sulfate) à pH 8,5, sont déposées par contact sur la surface activée en utilisant un robot de dépôt (spotter) Biorobotics MicroGrid II (figure 43). Une lame de verre commerciale fonctionnalisée par des groupements ester de succinimidyle sert de référence. Après dépôt, les sites activés non amidés sont bloqués avec de l'éthanolamine (5 10^{-2} M), les lames sont rincées dans 0,1% SDS (pH 6,5), puis dans de l'eau ultrapure (Millipore) et séchées sous un flux d'azote.

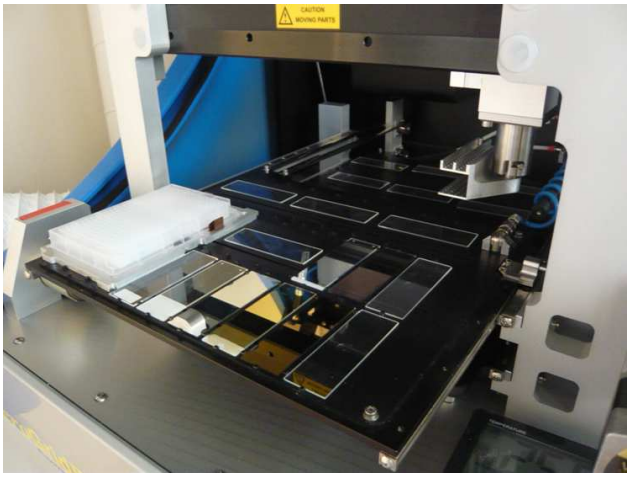


Figure 43 : robot de dépôt Biorobotics MicroGrid II.

D. Transfert de la chimie et mesure de la fluorescence

1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Nous vérifions, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, la qualité des surfaces acides obtenues par hydrosilylation pour une couche de a-Si:H (figure 44, courbe rouge). En intégrant le pic correspondant à la vibration C=O, on peut déterminer la quantité N~ 2 10^{14} de molécules par cm^2.[35,36] La surface acide est ensuite activée par EDC/NHS (courbe verte) et amidée par l'éthanolamine (courbe bleue). Aux chapitres 3 et 4, nous montrerons la caractérisation par infrarouge des alliages a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H et a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H, utilisés pour la mise en œuvre de capteurs à résonance de plasmons de surface.

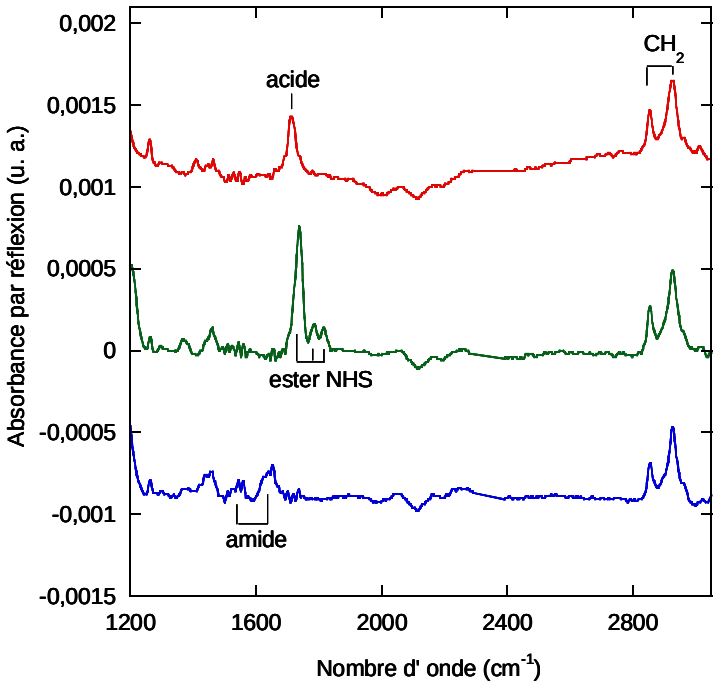


Figure 44 : Spectres infrarouges d'une surface a-Si:H acide (rouge) ; activée (vert); amidée (bleu). Le spectre de référence est une surface a-Si:H hydrogénée par HF.

2. Mesure de la fluorescence

La figure 45 montre l'intensité de la fluorescence mesurée après dépôt des sondes fluorescentes Cy5-$\overline{ON}$-G pour différentes architectures (différents taux de carbone et différentes épaisseurs).

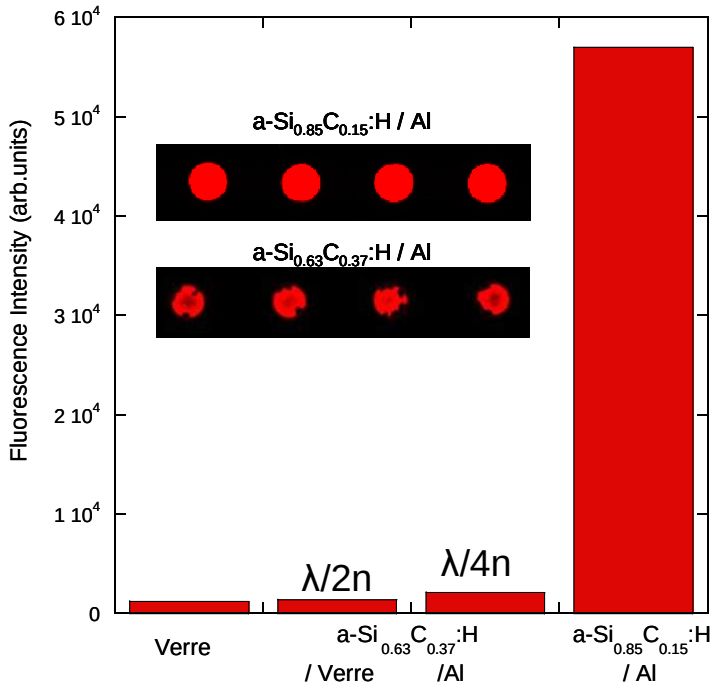


Figure 45 : Diagramme de l'intensité de la fluorescence et formes des spots obtenues sur différentes structures de biocapteurs. Les valeurs des histogrammes correspondent aux valeurs médianes corrigées par les (faibles) valeurs de fluorescence du fond continu, mesurées au voisinage des spots.

On constate que les résultats ne se corrèlent pas du tout aux prévisions théoriques (tableau 3). En effet, la fluorescence mesurée sur les couches de a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H sur aluminium est légèrement plus intense que celle mesurée pour une lame de verre. Comme attendu la lame ($\lambda/2n$) a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H / verre se comporte comme une lame de verre. De façon plus surprenante, la lame ($\lambda/4n$) avec une couche de a-$Si_{0.85}C_{0.15}$:H / Al présente de meilleures caractéristiques que la lame ($\lambda/4n$) avec une couche de a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H / Al. La couche de silicium amorphe carboné a une influence sur la fixation des sondes à la surface de silicium. Il y a un fait expérimental frappant lorsque l'on regarde la figure 45 : l'inhomogénéïté des spots. Celle-ci montre que sur le silicium amorphe carboné à 37%, la chimie n'est pas aussi contrôlée que sur le silicium amorphe-carboné à 15%. Les couches contenant plus de carbone

comptent moins de sites sur lesquels on peut greffer et le rendement d'immobilisation y est plus faible (par exemple étape d'activation comme on le montrera au chapitre 3). On comprend donc que la fluorescence sur une couche de 37% n'est pas optimale dans la mesure où la chimie de surface n'est pas parfaitement homogène. Cependant nous montrerons au chapitre 3 l'intérêt de cette couche pour d'autres architectures de biopuces.

Le facteur d'amplification G est égal à 46 pour une lame ($\lambda/4n$) a-$Si_{0.85}C_{0.15}$:H/Al. Il est bien supérieur à celui calculé théoriquement. Ceci peut se comprendre dans la mesure où la chimie de surface utilisée est différente de celle de la lame commerciale. Nous avons donc cherché à dissocier l'optimisation due à l'optique et à la chimie de surface. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec une couche de silicium amorphe carboné à 15%, qui nous permet d'avoir des spots homogènes (figure 45) et donc d'étudier la fluorescence après immobilisation des sondes Cy5-$\overline{\overline{ON}}$-G et hybridation des oligonucléotides ON1 avec leurs brins complémentaires. Nous optimiserons ensuite le taux de carbone.

E. Mise au point de l'architecture

1. Séparation de l'effet de la chimie de surface et de l'amplification optique

a) Protocole d'hybridation

La surface sur laquelle ont été immobilisées les sondes ON1 (cf C. 4) est exposée à une solution de concentration 5 10^{-9} M contenant l'oligonucléotide complémentaire de la sonde ON1 et marqué Cy5 (5' AC-GGA-GTA-CTT-GCG-CTC-AGG-AGG-AGC-AAT-GAT-CTT-GAT-CTT-CAT-TGT-GCT-Cy5 3') dans une chambre d'hybridation Tecan HS 4100. L'hybridation se fait sous agitation pendant 1 heure à 42°C dans un tampon contenant 2,5X SSC (tampon salin de citrate de sodium, pH 7), de solution de Denhardt 1X (agent bloquant), 0,5% SDS et 25% de formamide. Des rinçages post-hybridation de 2 minutes sont ensuite réalisés, en utilisant 3 tampons : 0,5 X SSC + 0,5% SDS ; 0,2 X SSC + 0,5% SDS et 2,5 X SSC.

Les mesures *ex situ* sont réalisées à chaque étape du protocole d'immobilisation des sondes (spotting, lavage) et après hybridation avec le scanner à fluorescence (PMT 450 V) (figure 32a). Plusieurs cycles d'hybridation/déshybridation sont réalisés *in situ*, grâce à la station d'hybridation en temps réel Hyblive (figure 32 b).[6,7] La déshybridation est réalisée *in situ* à 50°C dans la même chambre dans un mélange formamide (50%), 2,5X SSC. Une image de fluorescence (temps d'intégration 1 seconde) a été prise toutes les 30 secondes.

b) Choix des architectures

La Figure 46 a-b montre les deux structures utilisées pour séparer l'effet de la chimie de surface de celui de l'amplification optique. La Figure 46a représente une structure comprenant une couche a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H déposée sur une couche d'aluminium. La Figure 46b représente une couche a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H déposée directement sur du verre. La Figure 46c montre le facteur théorique *F(d)* qui affecte l'intensité de la fluorescence (courbes en trait plein et pointillés) en fonction de l'épaisseur *d* de a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H. Le calcul est réalisé pour le marqueur Cy5 (excitation à 635 nm, émission à 670 nm).

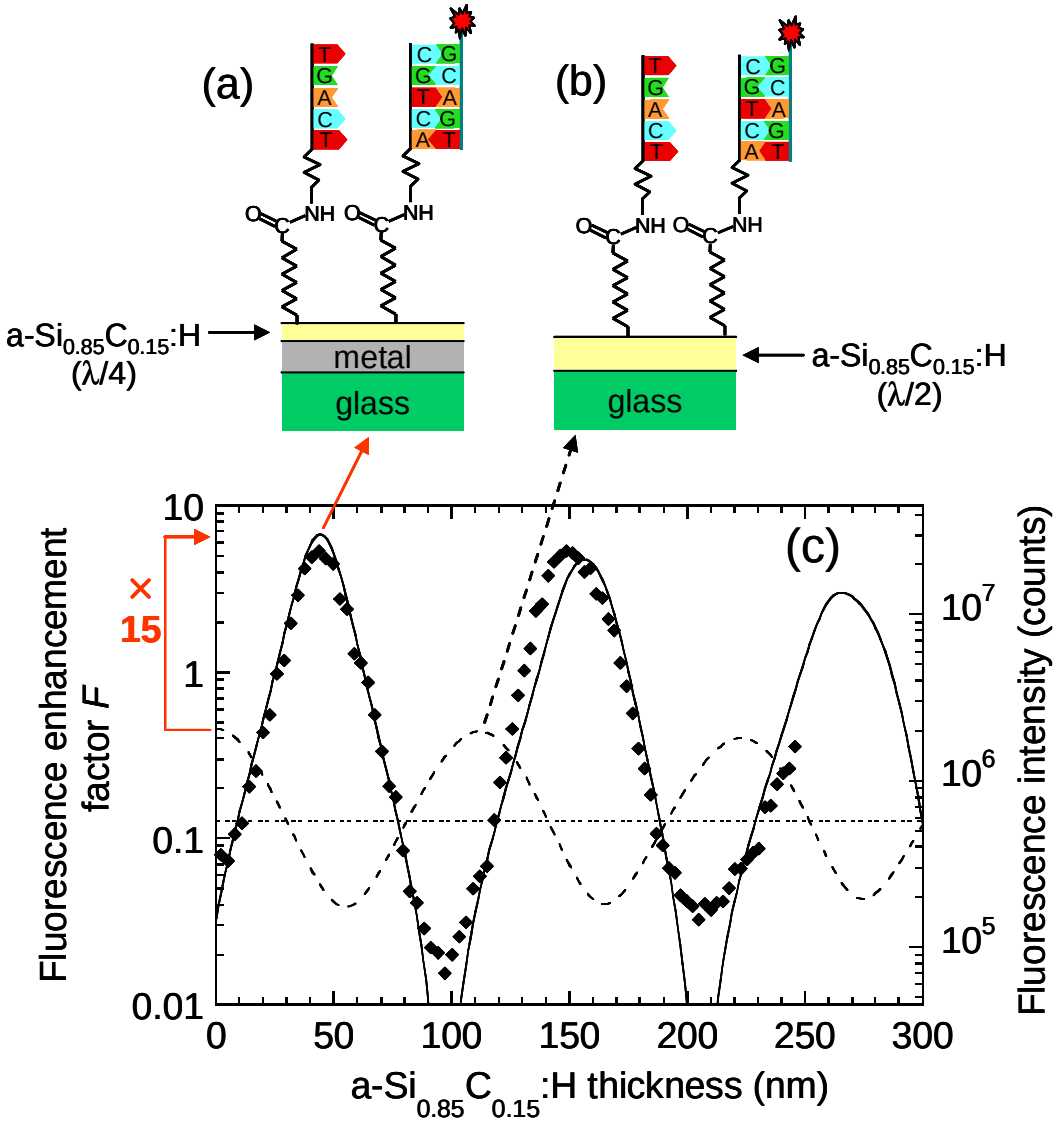


Figure 46 : Vue schématique de l'architecture d'une puce à ADN comprenant une couche a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H déposée (a) sur un réflecteur en aluminium (b) directement sur verre (c) facteur F affectant l'intensité de la fluorescence (ligne pleine, échelle de gauche) comparée à la mesure de l'intensité de fluorescence (diamants, échelle de droite) en fonction de l'épaisseur de la couche a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H [schéma (a)]. La courbe en tiretés représente le facteur F calculé pour une couche de a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H déposée directement sur du verre [schéma (b)]. La droite horizontale en pointillés est la valeur de F calculée pour une couche de a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H très épaisse.[37]

En l'absence de réflecteur, la courbe calculée (Fig. 46c, tiretés) prédit un premier maximum à 112 nm sans augmentation de la fluorescence. En effet, un dépôt direct de λ/2n de la couche de a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H sur du verre est optiquement équivalent au verre « nu » et la seule différence avec les lames ordinaires est la différence de la chimie de greffage.

En présence d'un réflecteur, la courbe calculée (figure 46c, trait continu) montre que le facteur *F* est égal à 7 pour une épaisseur optimale de 44 nm. Ainsi, on obtient une amélioration du gain G d'un facteur d'environ 17 par rapport à une lame standard. Pour des épaisseurs très élevées, le facteur *F* calculé diminue à 0,12 à cause de l'indice de réfraction élevé du a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H massif. Afin de tester ces prédictions théoriques, une couche est déposée en utilisant un cache mobile pendant l'étape de PECVD pour varier de manière continue l'épaisseur de la couche *d* sur le même substrat. L'intensité de la fluorescence mesurée sur les spots est montrée sur la Figure 46c (diamants). Afin de pouvoir comparer calcul et expérience, les deux échelles ont été ajustées par translation. Il y a donc une bonne adéquation entre la théorie et l'expérience. Dans ce qui suit, la structure optimisée consiste en une couche de a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H de 44 nm d'épaisseur déposée sur un réflecteur d'aluminium.[37]

c) Mesure de l'effet de la chimie et de l'optique

La Figure 47 compare l'intensité de fluorescence mesurée sur les deux structures définies précédemment (une lame de verre portant une couche de a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H de 112 nm d'épaisseur (« couche λ/2n ») (figure 47 b,e) et une couche de a-$Si_{0,85}C_{0,15}$:H de 44 nm d'épaisseur sur un réflecteur (figure 47 c,f) avec celles mesurées sur une lame commerciale (a,d), après l'immobilisation de la sonde Cy5-$\overline{\text{ON}}$-G (figure 47 a,b,c) et l'hybridation de la sonde ON1 avec son complémentaire Cy5 (figure 47 d,e,f). Afin de pouvoir les comparer, les mêmes conditions (celles recommandées par le fournisseur des lames commerciales) ont été utilisées sur nos lames et sur les lames commerciales de verre.

L'augmentation de l'intensité de la fluorescence de (b) à (c) peut être attribuée à l'optique optimisée (effet « physique »). Puisqu'une couche λ/2n est optiquement équivalente au verre « nu », l'augmentation de la sensibilité de (a) à (b) de la figure 47 peut être attribuée à l'amélioration de la chimie de surface (effet « chimique »). La figure 47 montre que l'amélioration totale est de l'ordre d'un facteur 40, avec un facteur 13 attribué à l'optique et un facteur 3 attribué à la chimie de surface. Plusieurs points sont à noter :

- les lames basées sur la chimie Si-C (figure 47 b, c) ne manifestent essentiellement aucune perte du signal fluorescent après lavage, ce qui est une preuve de la stabilité de l'immobilisation covalente des sondes;
- les spots (b) et (c) sont bien circulaires et reproductibles;

- Malgré la forte augmentation du signal, le niveau du fond continu dans (c) reste bas, ce qui indique une faible fluorescence des substrats. La figure 47 (d-f) montre le résultat d'une comparaison similaire au niveau de l'hybridation (oligomères sondes non marqués hybridés avec les cibles marquées au Cy5). Tandis que la lame commerciale (d) montre une fluorescence plus forte qu'en (a), après spotting, les résultats de (e) et (f) sont essentiellement équivalents à ceux obtenus au niveau du spotting. Une fois de plus, le fond continu de la lame (f) est très faible, indiquant une très faible adsorption non spécifique des cibles.

Le vieillissement des lames a été testé en les conservant dans une solution de 1X SSC (pH~7) pendant un mois. Aucune dégradation mesurable de la fluorescence n'a été observée.

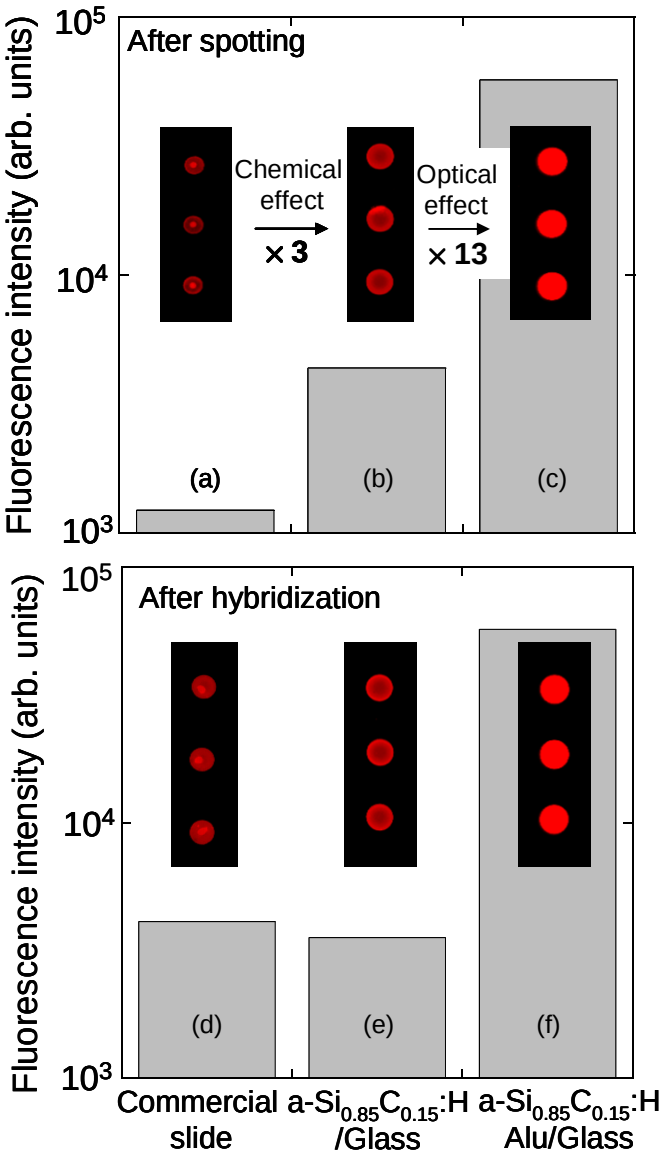


Figure 47 : Diagrammes de l'intensité de fluorescence et formes des spots obtenus sur les lames commerciales (a, d), sur a-$Si_{0,85}C_{0,15}$ (112 nm) / verre (b, e) et sur a-$Si_{0,85}C_{0,15}$ (44 nm) /Al/verre (c, f), après spotting (a, b, c) et après hybridation (d, e, f). Les spots Cy5-$\overline{\text{ON}}$-G sont montrés en haut, et les spots après hybridation des brins ON1-50 mer non marqués avec les brins complémentaires marqués avec la Cy5 sont montrés en bas. Les valeurs des histogrammes correspondent aux valeurs médianes corrigées par les (faibles) valeurs de fluorescence du fond continu, mesurées au voisinage des spots.[37]

d) Hybridation in situ et réutilisabilité

L'intensité de la fluorescence sur une lame optimisée (figure 46a) permet de suivre l'hybridation de ON1 in situ en milieu liquide. La figure 48 montre un cycle typique d'hybridation-déshybridation. Différents cycles ont été réalisés sur une période de 3 semaines pour explorer la réutilisabilité et la stabilité de nos biocapteurs. Les lames ont été stockées dans une solution de 1X SSC entre les différents cycles. Ce type de support permet donc d'enregistrer plusieurs cycles successifs d'hybridation-déshybridation sans perdre de sensibilité. Ceci montre que nos biocapteurs sont réutilisables et confirme la robustesse de la chimie d'accrochage des sondes.

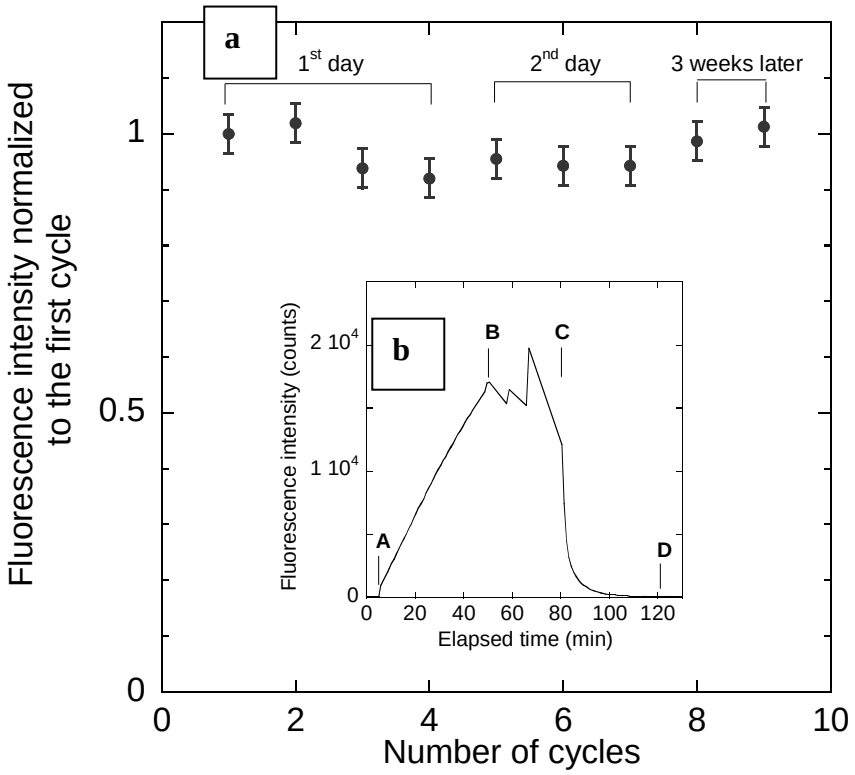


Figure 48 : (a) Intensité de la fluorescence après 30 minutes d'hybridation, en fonction du nombre de cycles d'hybridation/ déshybridation, normalisée au premier cycle. (b) détail d'un cycle d'hybridation/ déshybridation :(A) Introduction de la solution contenant les cibles complémentaires marquées avec Cy5, (B) cycles de lavage post-hybridation, (C) introduction de la solution de déshybridation ; (D) rinçage après la déshybridation.

2. Choix du taux de carbone

Nous pouvons aussi ajuster le taux de carbone pour augmenter la fluorescence, en vérifiant pour quel taux de carbone, le plus élevé possible, la chimie reste contrôlée. Comme Solomon l'a montré, c'est à partir de 20% de carbone que la couche carbonée n'est plus homogène. Il paraît donc raisonnable de ne pas dépasser cette valeur. En effet la figure 49 montre que pour une couche a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H les spots sont d'une très bonne homogénéité, de plus comme attendu théoriquement la fluorescence, calculée pour une lame ($\lambda/4n$) sur l'aluminium, est plus intense que pour une couche de 15%. Nous privilégierons donc ces couches pour la suite de notre étude.

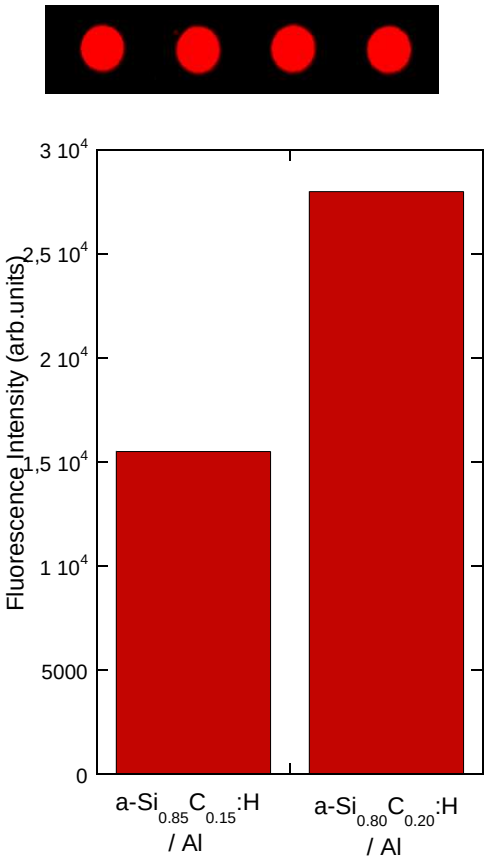


Figure 49 : Diagramme de l'intensité de la fluorescence pour différentes structures de biocapteurs et homogénéité des spots obtenus sur une couche a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H. Les valeurs des histogrammes correspondent aux valeurs médianes corrigées par les (faibles) valeurs de fluorescence du fond continu mesurées au voisinage des spots avec un PMT= 400 V.

3. Utilisation d'un miroir de Bragg

a) Choix du substrat

Le problème de l'optimisation de la fluorescence pour une puce à ADN conduit à chercher le substrat le plus réfléchissant possible aux longueurs d'ondes d'absorption et d'émission des fluorophores utilisés. Jusqu'ici, nous avons présenté des architectures comprenant une couche réfléchissante métallique, qui n'est pas la solution optimale du problème :

- La couche métallique, particulièrement l'aluminium ou l'argent, peut facilement s'oxyder. Il faut donc déposer la couche de silicium amorphe directement après le dépôt de la couche métallique.
- D'un point de vue théorique, les meilleurs rendements de réflexion à une longueur d'onde donnée ne sont pas obtenus par des miroirs métalliques, mais par des miroirs diélectriques dits « miroirs de Bragg ».[30]

Un miroir de Bragg, conçu pour une longueur d'onde λ_{Bragg} donnée, consiste en une alternance de couches d'indices élevés et faibles, d'épaisseurs choisies telles que le déphasage induit par le passage dans une couche sous une incidence normale vaille $\pi/2$ (figure 50). Ainsi l'épaisseur e_i d'une couche i d'indice n_i est choisie d'après l'équation (6) telle que :

$$e_i \times n_i \times \frac{2\pi}{\lambda_{Bragg}} = \frac{\pi}{2} \rightarrow e_i = \frac{\lambda_{Bragg}}{4n_i} \qquad (6)$$

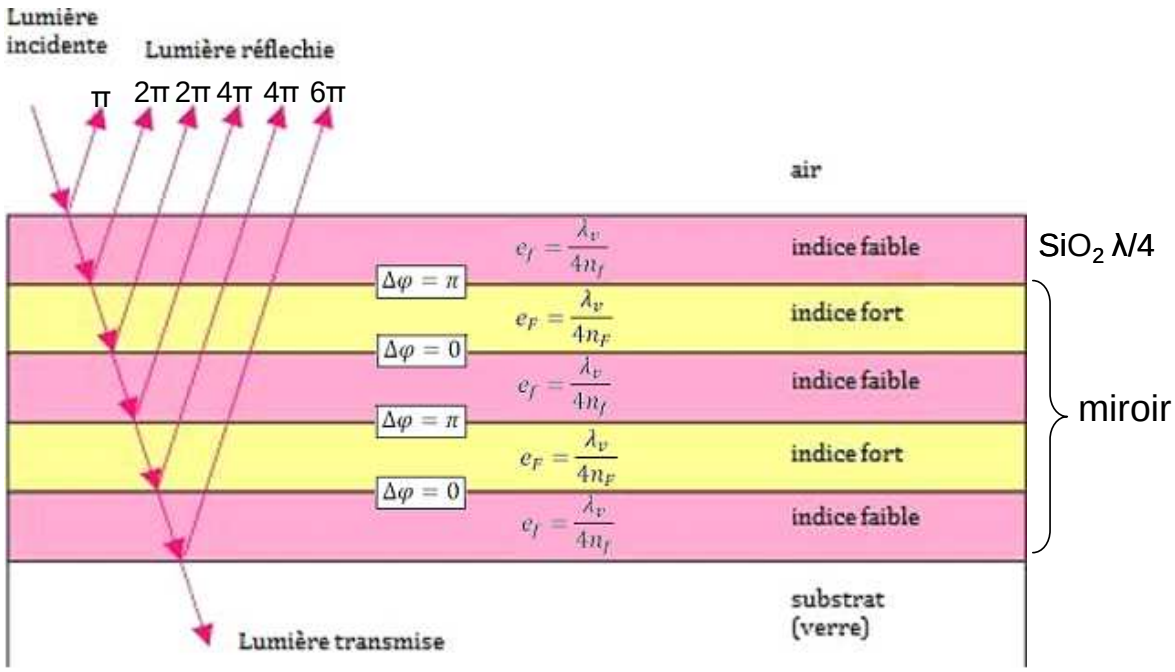


Figure 50 : Architecture d'une lame amplificatrice (couche de SiO_2 sur un miroir de Bragg).

Lors de la réflexion entre une couche d'indice faible et une couche d'indice élevé, le rayon lumineux subit un déphasage de π. Comme lors de son trajet aller-retour dans le miroir le rayon subit, pour chaque couche, un déphasage de π (π/2 aller ; π/2 retour), il suffit de commencer le miroir par une couche d'indice fort pour que tous les rayons qui ressortent du miroir en phase soient réfléchis. Pour un nombre suffisant de couches, le coefficient de réflexion est très proche de 1.

Dans le domaine des biocapteurs plusieurs équipes (CEA, Genewave) ont cherché à optimiser la fluorescence en utilisant des miroirs de Bragg, essentiellement basés sur une alternance de couches SiO_2 / TiO_2 (n_{SiO2} = 1,48 / n_{TiO2} = 2,4).[5,38,39]

Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé en étroite collaboration avec la société Genewave. Nous avons donc décidé d'utiliser leur miroir de Bragg (lame « Amplislide ») qui correspond à une lame de verre sur laquelle 8 couches alternées SiO_2/TiO_2 ont été déposées. La longueur d'onde choisie est λ_{Bragg} = 612 nm, ce qui correspond à une valeur moyenne des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission pour les fluorophores Cy3 et Cy5.[5]

Afin d'utiliser la lame « Amplislide » de Genewave dans nos expériences et d'utiliser une chimie de surface contrôlée, nous avons décidé de recouvrir cette lame d'une très fine couche

(5 nm) de a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H. L'épaisseur *e* de la couche rajoutée induit un déphasage Φ pour les rayons lumineux (équation 7) :

$$\Phi = \frac{2\pi}{\lambda_{\text{Bragg}}} \times 2 \times n_{\text{couche ajoutée}} \times e \qquad (7)$$

$$\text{Soit } \Phi = \frac{2\pi}{612} \times 2 \times 2{,}6 \times 5 = 0{,}3 \text{ rad}$$

Ce déphasage est très faible par rapport à π, déphasage caractéristique d'une interférence destructive. Plus précisément l'intensité I reçue par le fluorophore lors de l'excitation varie comme

$I = I_0(1+\cos(\Phi))$, terme d'interférence à deux ondes. (8)

La perte d'intensité due à l'ajout d'une fine couche de a-$Si_{1-x}C_x$:H est donc d'ordre 2 en Φ, soit 2% par rapport à un miroir de Bragg non modifié. Ceci nous permet aisément d'utiliser cette architecture pour bénéficier d'une chimie contrôlée et d'un gain optique maximal.[37]

Pour étudier la fluorescence et l'hybridation de ces biocapteurs nous avons utilisé de nouvelles sondes et optimisé les tampons de lavage et d'hybridation.

b) Protocole d'immobilisation des sondes et hybridation

Trois oligonucléotides sondes sont utilisés : la sonde Cy5-$\overline{ON}$-G [5' Cy5-AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T-$(CH_2)_6$-NH_2 3'], une sonde non marquée 25-mer [5' $(CH_2)_6$-NH_2-AAC-GCC-CAT-CTT-AAA-ATC-GAC-GCC-T 3'] nommée G-ON et la sonde marquée Cy3 [5' Cy3-AAC-GCC-CAT-CTT-AAA-ATC-GAC-GCC-T-$(CH_2)_6$-NH_2 3'] nommée Cy3-ON-G. Les trois sondes sont diluées à 5 10^{-6} M ou 10^{-5}M dans 150 mM d'un tampon phosphate contenant 0,01% de SDS à pH 8,5, puis déposées par contact sur la surface activée en utilisant le même robot de dépôt que précédemment. Après dépôt, les sites ester de succinimidyle non amidés sont bloqués avec de l'éthanolamine (5 10^{-2} M, pendant 15 min), puis les lames sont rincées dans de l'eau ultrapure (Millipore) et séchées sous un flux d'azote. La surface est alors exposée à une solution de concentration 5 10^{-15} M, 5 10^{-13} M, 5 10^{-11} M ou 5 10^{-9} M contenant l'oligonucléotide complémentaire des sondes ON-G et Cy3-ON-G 5'Cy5 [AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T 3'] nommé Cy5-$\overline{ON}$ à 42°C pendant 4 heures dans un tampon d'hybridation contenant (2X SSC, 0,1% SDS, 35% formamide, 0,1% de sperme de saumon). Des rinçages post-hybridation de 2 minutes sont

ensuite réalisés, en utilisant 4 tampons (2XSSC + 1% SDS ; 1X SSC +0,1 SDS ; 0,1X SSC et 2,5 X SSC).

Les mesures *ex situ* sont réalisées à chaque étape du protocole décrit ci-dessus avec le scanner à fluorescence (PMT 350 V). La déshybridation est réalisée *in situ* par fusion dans la même chambre dans une solution de 2,5X SSC. La rampe en température est de 1°C par minute de 42°C à 85 °C. Une image de fluorescence (temps d'intégration 1 seconde) a été prise toutes les 30 secondes.

c) Amplification de la fluorescence et limite de détection

La figure 51 montre la fluorescence mesurée sur une lame commerciale et 4 lames « Amplislide » recouvertes de 5 nm de a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H. La fluorescence a été mesurée avant et après l'étape de lavage. Alors que pour la lame commerciale la fluorescence diminue de ~50% après le lavage, celle sur nos lames à base de silicium amorphe augmente légèrement. L'absence de diminution de la fluorescence montre que l'accrochage covalent des sondes sur silicium est robuste.[40,41] L'augmentation du signal après lavage pourrait être associée à la disparition de dimères de fluorophores dont la fluorescence peut être modifiée en fréquence ou en intensité. L'intensité des spots marqués après l'étape de lavage correspond à une amplification d'un facteur 100. On remarque aussi la très bonne reproductibilité et l'homogénéité des spots.

Nous avons pu ensuite réaliser 4 hybridations à différentes concentrations (5 fM, 500 fM, 50 pM et 5nM). La figure 52 nous montre qu'un tel système nous permet de détecter une hybridation avec une très faible quantité de sondes complémentaires (5 fM). On remarque cependant que l'intensité de la fluorescence après l'hybridation en fonction de la concentration ne suit pas une isotherme de Langmuir. On pourrait rendre compte de ces résultats en considérant que l'hybridation implique une distribution bimodale d'enthalpies de réaction associée, par exemple, à une distribution des sites sur la surface. L'hybridation ne serait alors pas totale aux très faibles concentrations (première enthalpie de réaction) et il faudrait atteindre un régime de concentrations plus élevées (~5 nM) pour atteindre la seconde enthalpie de réaction et permettre l'hybridation complète des différentes sondes. Ces expériences ont été faites en dehors du laboratoire et nous n'avons pu réaliser une étude plus détaillée notamment pour explorer l'origine d'une éventuelle distribution de réactivité. Cependant nous verrons par la suite que pour d'autres types de détection des résultats similaires sont obtenus et qu'il serait donc important de s'y intéresser plus spécifiquement.

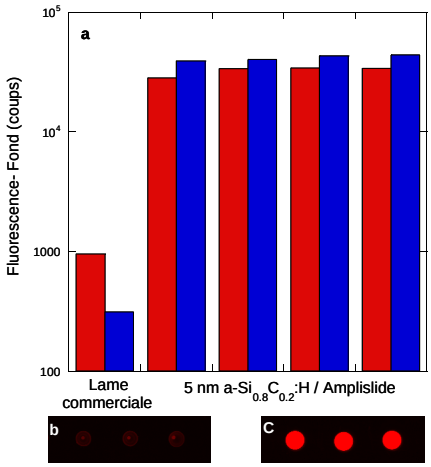


Figure 51 : (a) Diagramme d'intensité de fluorescence des sondes Cy5-$\overline{ON}$-G (10^{-5}M) immobilisées à partir d'une solution à 10^{-5} M sur une lame commerciale et sur 4 lames (5 nm de a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H/Amplislide) rouge : fluorescence des spots avant lavage ; bleu : fluorescence des spots après lavage. (b) Homogénéité des spots d'une lame commerciale. (c) Homogénéité des spots d'une lame 5 nm de a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H/Amplislide.

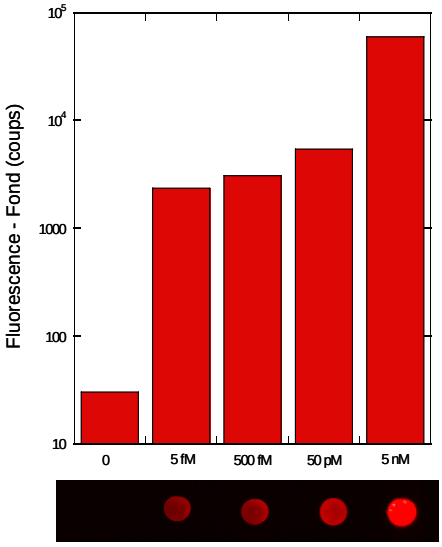


Figure 52 : Diagramme de l'intensité de la fluorescence après hybridation et homogénéité des spots obtenus sur une couche a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H / Amplislide. Les valeurs des histogrammes correspondent aux valeurs médianes corrigées par les (faibles) valeurs de fluorescence du fond continu mesurées au voisinage des spots. Pour la lame immergée dans le tampon d'hybridation (0 M), l'intensité de fluorescence correspond à la valeur brute mesurée.

F. Différentes utilisations du biocapteur

1. Hybridation in situ

Comme pour les lames avec un réflecteur métallique (aluminium), il est possible de procéder à un suivi de la cinétique en temps réel pour les lames utilisant un miroir de Bragg. Des hybridations in situ ont été réalisées pour pouvoir suivre l'hybridation des cibles avec les sondes en temps réel (figure 53). Bien que l'immobilisation des sondes soit très reproductible et les spots très homogènes (figure 51 c), on note cependant une certaine variabilité de spot à spot lors de l'hybridation in situ (figure 53a). Ceci peut s'expliquer par une agitation non homogène. En effet, dans le système que nous utilisons, le mélange se fait par des ondes acoustiques de surface, ce qui induit différentes vitesses pour le fluide selon la position des spots dans la chambre d'hybridation.[42] Ainsi pour la suite nous présenterons le signal moyenné obtenu pour 7 spots (figure 53 b).

On peut suivre l'évolution de la fluorescence lors d'un cycle d'hybridation et fusion (de 42° à 85°C par paliers de 1° C dans une solution 2,5X SSC) de différentes sondes (G-ON et Cy3-ON-G) avec la cible complémentaire Cy5-$\overline{\text{ON}}$ à 5 nM. Les expériences ont été faites pour 2 concentrations superficielles de sondes obtenues en utilisant des solutions concentrées à 5 et 10 µM lors de l'immobilisation. Le suivi de la fluorescence de sondes témoins (Cy5-$\overline{\text{ON}}$-G) nous permet de contrôler qu'il n'y a pas de perte de sondes immobilisées et de mesurer la variation de fluorescence en fonction de la température (figure 53b). Le signal est en effet constant au cours de l'hybridation, l'intensité diminue progressivement lorsque la température augmente puis brusquement lors de la fusion, et remonte lorsque la température diminue (courbe rouge). On note par ailleurs que la fluorescence augmente de façon systématique au début de chaque lavage. L'indice du tampon d'hybridation (~1,43) est plus élevé que celui des solutions de rinçage (~1,33) ce qui est vraisemblablement la cause de cette augmentation de la fluorescence mesurée.

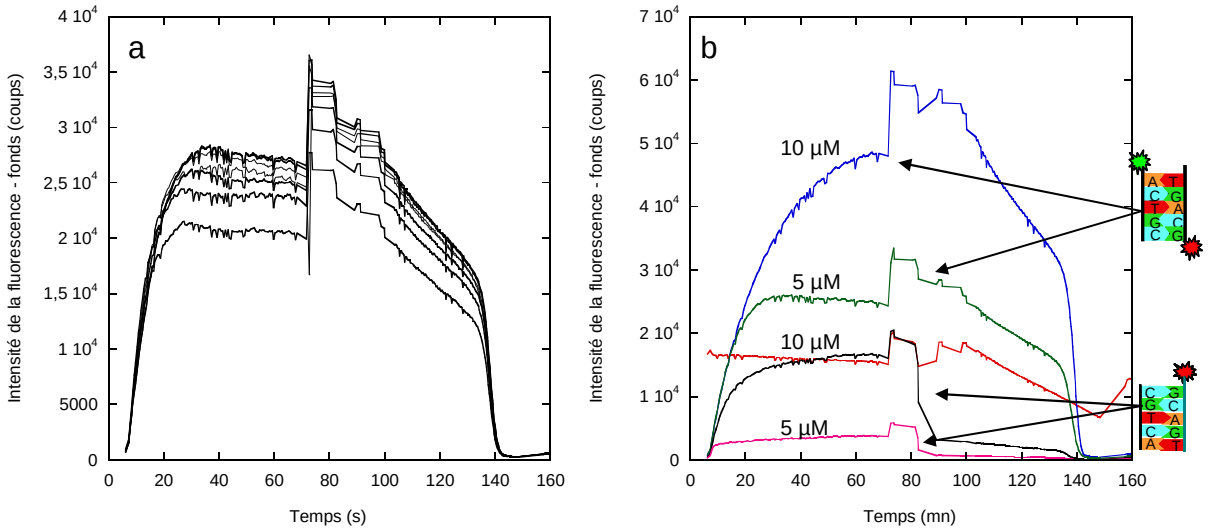


Figure 53 : Cycle d'hybridation et fusion avec les cibles complémentaires Cy5-$\overline{ON}$ à 5 nM (a) pour 7 spots : sondes Cy3-ON-G 5µM. (b) bleu : Cy3-ON-G 10µM ; vert : Cy3-ON-G 5µM ; noir : G-ON 10 µM ; rose : G-ON 5µM ; rouge : sondes Cy5-$\overline{ON}$-G (non hybridées) 10 µM.

On note sur la figure 53b que l'intensité de fluorescence des sondes Cy5-$\overline{ON}$-G marquées Cy5 à 10µM (courbe rouge) est identique à celle des sondes G-ON spottées à 10 µM et hybridées à 5 nM. Ceci avait déjà été observé avec les lames avec l'aluminium comme réflecteur (figure 47 b et e). Ceci laisserait supposer que toutes les sondes sont appariées avec leurs cibles complémentaires. La constante d'association serait de l'ordre de quelques nM^{-1}.[43]

On remarque aussi que la fluorescence est plus importante pour les sondes Cy3-ON-G que pour les sondes G-ON, dont le groupe amino-hexyle est accroché à l'autre extrémité du brin. Les brins complémentaires sont donc orientés différemment suivant qu'ils sont hybridés avec les sondes Cy3-ON-G et G-ON. Le fluorophore Cy5 des cibles hybridées avec les sondes G-ON est à une distance environ égale à 15 nm du miroir de Bragg (a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H = 5nm ; Couche organique =2 nm ; longueur du brin = 8 nm) ; celui des cibles hybridées avec les sondes Cy3-ON-G est à une distance d'environ 7 nm ce qui pourrait expliquer la différence d'intensité mesurée lors des expériences in situ.

Afin de tester la plausibilité de cette hypothèse, une couche de a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H est déposée en utilisant un cache mobile pendant l'étape de PECVD pour varier de manière continue l'épaisseur de la couche (0 à 250 nm) sur la lame « Amplislide ». L'intensité de la fluorescence mesurée sur les spots par le scanner est montrée sur la figure 54. Ce résultat permet de mesurer la différence de signal observée lorsque la couche de silicium amorphe

carboné varie de 7 à 15 nm. De façon frappante, l'intensité détectée varie appréciablement pour de faibles épaisseurs de la couche de a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H. On observe que le signal est plus faible à 15 nm qu'à 7 nm, d'un facteur 1,3 environ, alors qu'in situ le facteur est ~3. Plusieurs raisons peuvent expliquer que l'accord n'est pas quantitatif. Tout d'abord, puisque sur la lame à épaisseur variable, on mesure la fluorescence sur des spots de 300 µm, on moyenne le signal sur une région où l'épaisseur de la couche varie de 1 à 2 nm. Ceci sous-estime certainement la valeur mesurée pour une épaisseur de 7 nm, où le signal passe par un maximum étroit. Par ailleurs, on peut penser que l'intensité ne décroît pas tout à fait de la même façon suivant que le fluorophore est éloigné du réflecteur via une couche diélectrique ou via l'assemblage cibles-sondes en solution. En conclusion, on peut considérer (au moins qualitativement) que la différence d'intensité de fluorescence enregistrée sur les spots G-ON et Cy3-ON-G est en bonne partie imputable à la variation d'éloignement entre le fluorophore et le réflecteur.

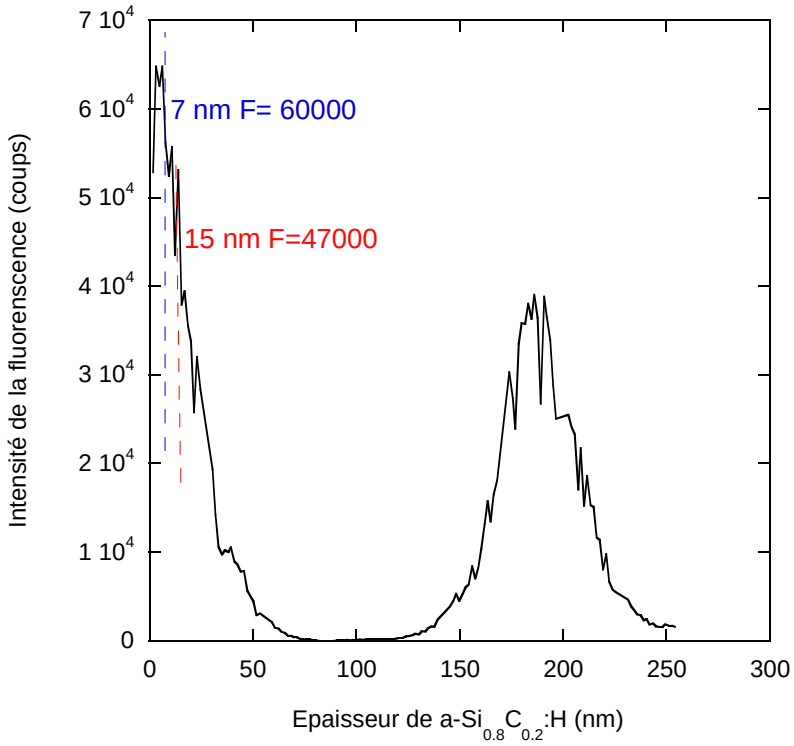


Figure 54 : Intensité de la fluorescence en fonction de l'épaisseur de a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H mesurée sur des spots de sondes Cy5-$\overline{ON}$-G à 10 µM. (PMT = 350).

2. Détermination de la température de fusion

Après le cycle de lavage, une fusion est réalisée pour explorer la résistance de la structure à un traitement thermique de nature à déshybrider les sondes et les cibles. Un tel

traitement thermique serait moins contraignant qu'une déshybridation par voie chimique et pourrait permettre plus facilement une cyclisation du processus. Sur des biopuces réalisées sur une couche d'aluminium, la couche d'aluminium n'avait pas résisté au traitement thermique. Nous avions donc procédé à des déshybridations par voie chimique pour étudier la réutilisabilité (figure 48).

La figure 55a correspond à une courbe de fusion de 42°C (température d'hybridation) à 85°C pour les sondes Cy3-ON-G immobilisées à 5 et 10 µM hybridées avec les cibles $\overline{ON}$-Cy5 à 5 nM. Lors de la rampe en température, on peut aussi mesurer la variation de fluorescence en fonction de la température pour des sondes Cy5-$\overline{ON}$-G à 10 µM. Ceci nous permet de corriger les courbes de fusion des sondes Cy3-ON-G pour mieux déterminer la température de fusion (figure 55b). On définit la température de fusion d'un duplex (T_m) comme la température à laquelle 50% des doubles brins sont désappariés.[44] Celle-ci est déterminée par le point d'inflexion de la courbe de fusion, obtenu par l'extremum de la dérivée première (figure 55c). Plusieurs paramètres influent sur la stabilité des duplex d'oligonucléotides et donc sur la mesure de la température de fusion. Parmi eux on peut citer :

- la concentration en sel de la solution dans laquelle se fait la fusion (dans notre cas 250 mM).
- La longueur des oligonucléotides : plus le brin est long plus il est stable.
- La proportion des bases AT et CG. La paire C-G implique 3 liaisons hydrogène contre 2 pour A-T. Un appariement C-G a donc une énergie de dissociation plus grande : 5,5 kcal/mol contre 3,5 kcal/mol pour un appariement A-T. Ainsi, plus une séquence d'ADN est riche en paires G-C, plus il faudra fournir d'énergie pour la dénaturer.

L'oligonucléotide utilisé est un 25-mer, sa température de fusion théorique déterminée par le fournisseur dans une solution saline 50 mM est de 74°C. Comme le montre la figure 55c, cette température est très proche de celle que nous obtenons. La température de fusion pour des sondes immobilisées en surface apparaît donc sensiblement identique à celle mesurée en solution. Dans le détail, on peut toutefois constater de légères différences. Ainsi, pour les cibles hybridées avec les sondes à 5 µM, T_m= 74,8 °C, alors que T_m = 75,9 °C pour les sondes à 10 µM (figure 55c). Cette différence de température (1°C) suggère que les gênes stériques ont une légère influence sur T_m : il faut fournir plus d'énergie pour séparer les duplex lorsqu'ils sont arrangés de manière dense.

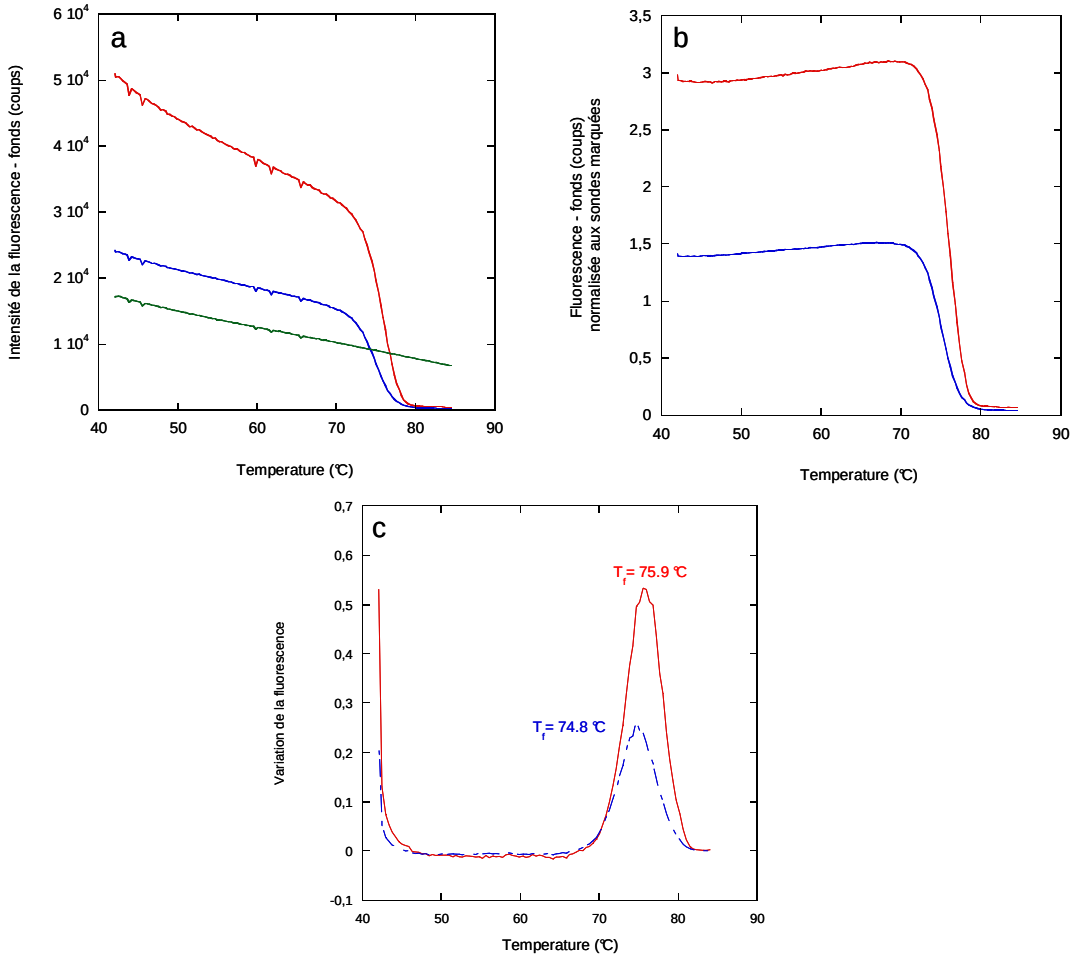


Figure 55 : (a) Courbe de fusion de sondes Cy3-ON-G immobilisées à partir d'une solution à 5µM (bleu) ou à 10 µM (rouge), et hybridées avec les cibles complémentaires Cy5-$\overline{\text{ON}}$ à 5 nM; vert : variation de la fluorescence en fonction de la température pour les sondes Cy5-$\overline{\text{ON}}$-G à 10 µM. (b) Courbe de fusion normalisée par rapport à la variation de fluorescence en fonction de la température. (c) courbes dérivées des courbes de fusion corrigées.

3. Etude cinétique

Après une fusion il est possible de procéder à une deuxième hybridation (figure 56 courbe noire). De façon surprenante, l'intensité de fluorescence atteinte au bout d'une heure d'hybridation est plus importante après le second cycle. L'intensité mesurée résulte de l'hybridation de sondes Cy3-ON-G spottées à 5 µM avec des cibles marquées Cy5 à 5 nM. Ainsi il est possible de suivre l'évolution du signal en Cy3 (courbe bleue) et Cy5 (courbe noire). On note que le signal de la Cy3 avant le deuxième cycle (~ 40000 coups) est plus

intense qu'au départ (~ 30000 coups). Cette augmentation a lieu après la fusion de 42° à 85°C et retour à la température d'hybridation à 42°C. Une hypothèse raisonnable serait que le traitement thermique subi lors du premier cycle permet une meilleure organisation des sondes qui se traduit par une augmentation du signal des sondes. Ceci peut expliquer l'augmentation du signal de la Cy5 lors du deuxième cycle d'hybridation.[43]

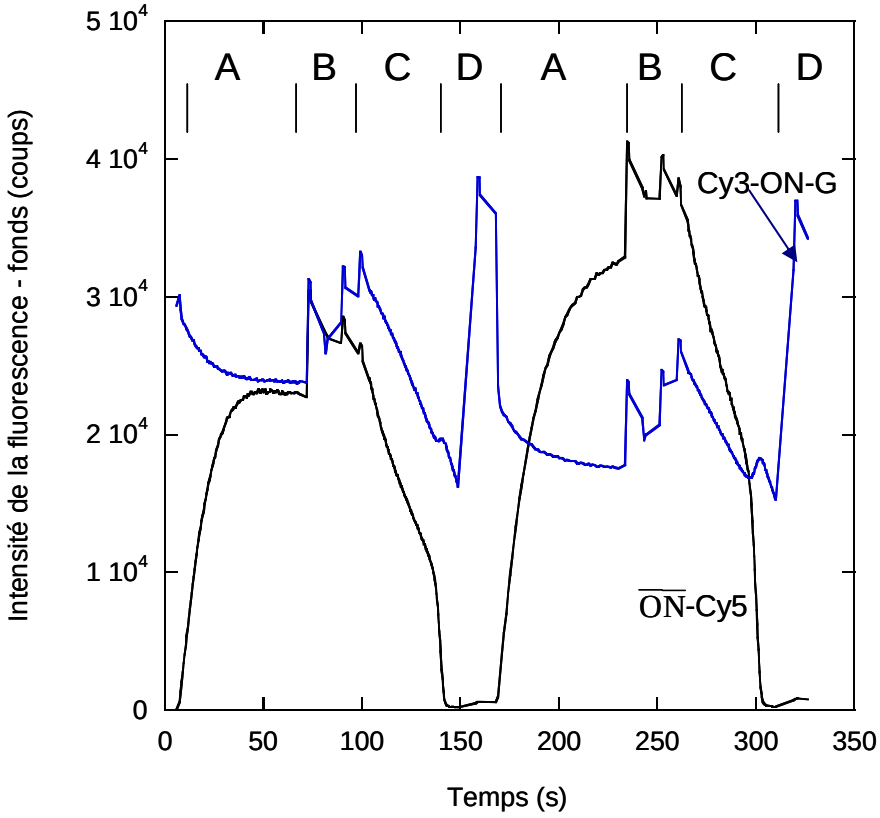


Figure 56 : 2 cycles (hybridation/fusion) ; Hybridation $\overline{ON}$-Cy5 à 5 nM (noir) avec les sondes Cy3-ON-G spottées à 5µM (bleu). A : Hybridation ; B : Cycles de lavage ; C : Fusion de 42°C à 85°C ; D : Préhybridation à 42 °C.

Le suivi in situ de l'hybridation permet de procéder à des études cinétiques pour mieux comprendre le processus d'hybridation. En effet, sur la figure 56 on remarque que la cinétique d'hybridation n'est pas la même avant et après fusion. Ceci est confirmé par des ajustements (figure 57). Lors de la première hybridation, la cinétique ne suit pas une loi exponentielle et n'est donc pas une cinétique de premier ordre simple (figure 57 courbe bleue). Par contre, l'ajustement de la courbe d'hybridation du second cycle avec une exponentielle nous montre que la cinétique est ici une cinétique du premier ordre. Les temps caractéristiques sont tout de même très proches (13 minutes pour le premier cycle ; 19 minutes pour le second).

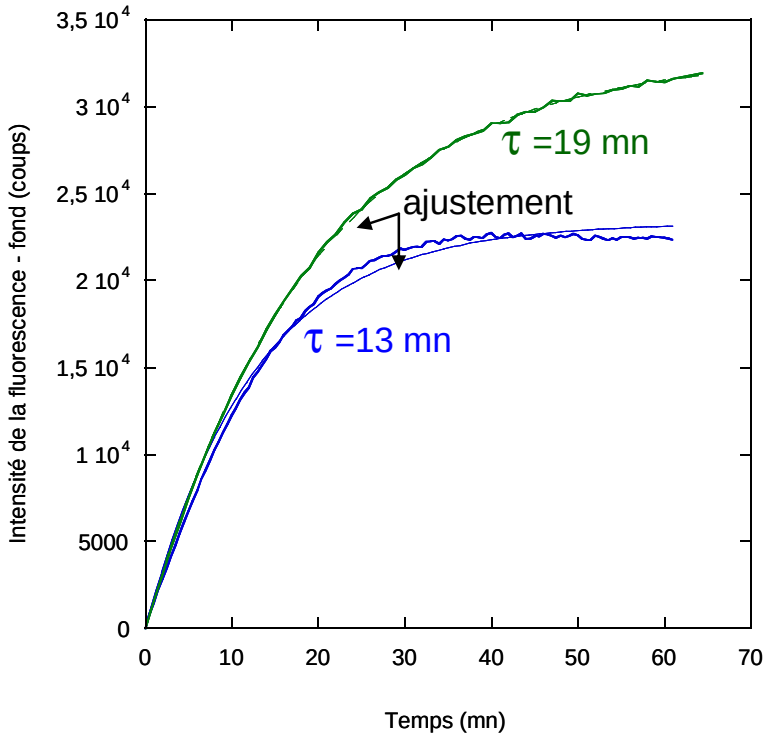


Figure 57 : Ajustement des courbes d'hybridation de la figure 56. (bleu) première hybridation ; (vert) seconde hybridation.

La différence observée dans les cinétiques peut être reliée à l'orientation des molécules. En effet nous avions vu, figure 56, qu'il était possible que les sondes soient mieux orientées après le premier cycle, ce qui favoriserait une cinétique d'hybridation du premier ordre. Par ailleurs, on note que la différence est aussi observée sur la figure 58. L'hybridation de sondes à 5 µM marquées Cy3 (vert) ou non (rose) ne suit pas une loi exponentielle, par contre pour des sondes de 10 µM marquées Cy3 (noir) ou non (bleu) la cinétique suit une loi exponentielle. Quelle que soit la concentration des sondes, le diamètre des spots est identique (300 µm). Plus la concentration des sondes est importante, plus la chance que les brins ont d'être ordonnés est grande, ce qui leur permet d'être mieux orientés et donc de favoriser l'hybridation. On peut comprendre ainsi la différence observée selon la concentration des sondes.

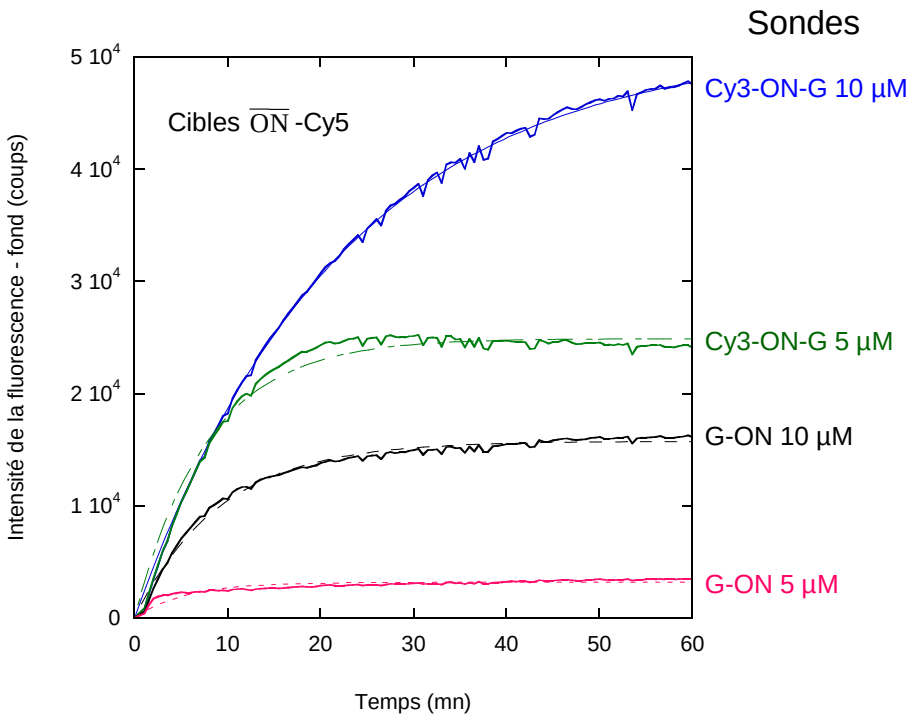


Figure 58 : ajustements des courbes d'hybridation de la figure 53b. Hybridation Cy5-$\overline{ON}$ **5nM avec différentes sondes.**

Au vu de la complexité des cinétiques d'hybridation en fonction de la concentration des sondes, nous avons choisi d'étudier l'influence de la concentration superficielle des sondes sans changer la concentration des solutions utilisées lors de l'immobilisation.

4. Fluorescence en fonction de la dilution des sondes

Sur une couche a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H, le greffage de groupes carboxydécyles par hydrosilylation conduit à une concentration superficielle de ~ 8.10^{13} cm^{-2} pour les chaînes greffées.[45] Même si la concentration en sondes immobilisées à la surface est certainement bien inférieure à cette valeur, celle-ci est probablement plus élevée que la quantité de sondes immobilisées sur des lames commerciales (~10^{12} cm^{-2}).[46] Il paraît donc naturel de chercher à ajuster la densité des fonctions fournissant des sites d'accrochage pour les sondes afin d'éviter d'éventuelles contraintes stériques qui pourraient gêner l'hybridation et rendre encore plus complexe l'étude cinétique.

Pour faire varier la quantité de sondes nous avons procédé à l'hydrosilylation comme décrit dans le premier chapitre en utilisant un mélange acide undécylénique/1-décène (figure 59).[36]

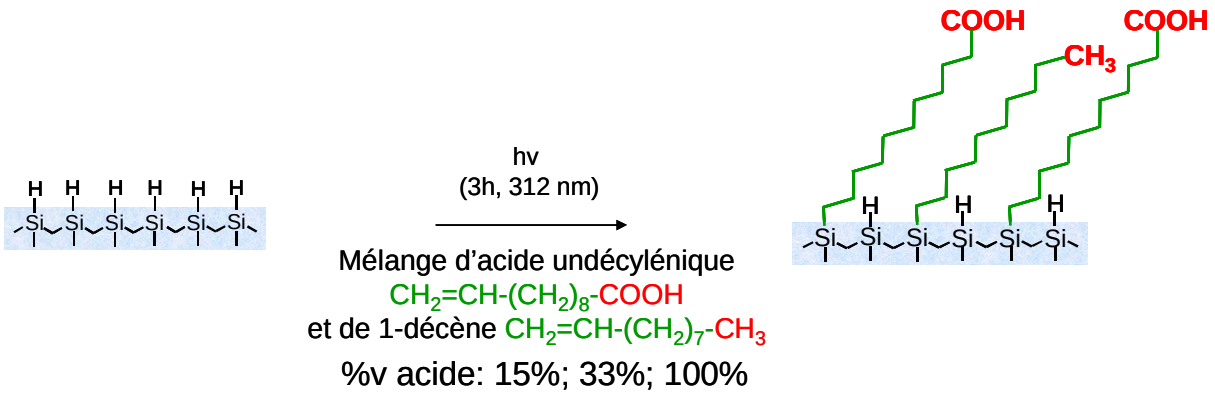


Figure 59 : Schéma du procédé de fabrication des couches à terminaisons mixtes carboxyles et méthyles.

Nous avons adopté le mode opératoire précédemment décrit pour l'immobilisation des sondes. La figure 60 montre la cinétique d'un cycle hybridation/fusion pour trois concentrations différentes en groupements acides (15 %v, 33 %v, 100%v). L'hybridation correspond à la reconnaissance de cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$ 5 nM avec des sondes Cy3-ON-G 5µM. S'il n'y avait aucune gêne stérique à l'immobilisation et à l'hybridation, on s'attendrait à obtenir une fluorescence d'autant plus importante que la concentration en acide sur la surface initiale est élevée. Or, la surface 15% est la surface qui permet d'obtenir une intensité de fluorescence plus importante. La dilution permet une meilleure fixation des cibles sur les sondes.

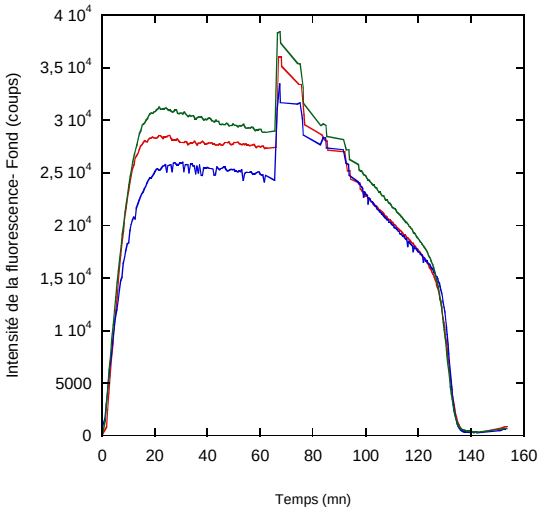


Figure 60 : Hybridation de cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$ à 5 nM avec les sondes Cy3-ON-G 5µM ; (bleu) surfaces acides 100%v ; (rouge) 33%v ; (vert) 15%.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré comment à partir de couches minces à base de silicium amorphe carboné il est possible de bénéficier de l'apport de la chimie de greffage sur silicium bien contrôlée pour élaborer des puces à ADN. Nous avons mis au point une nouvelle architecture de biocapteurs qui permet de combiner à la fois les avantages de l'amplification optique du signal de la fluorescence et de l'accrochage covalent de brins d'ADN via les liaisons Si-C très robustes. La fluorescence peut être jusqu'à 100 fois plus intense en comparaison avec une lame commerciale selon le type de réflecteur utilisé. Il devient alors possible de détecter l'hybridation de très faibles quantités de cibles (5 fM).

De plus, cette très bonne sensibilité et spécificité ont permis l'étude in situ et en temps réel de la réaction d'hybridation, permettant de s'intéresser aux cinétiques de la réaction. Le caractère réutilisable et donc stable de nos biocapteurs a pu être démontré par la réalisation de plusieurs cycles d'hybridation/déshybridation sur des lames où le réflecteur était une couche d'aluminium. Par ailleurs nous avons pu déterminer les températures de fusion pour des biocapteurs où une couche de a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H est déposée sur un miroir de Bragg.

Nous avons aussi montré que les surfaces acides diluées présentent l'avantage de limiter les gênes stériques et fournissent donc une meilleure reconnaissance entre les cibles et les sondes.

L'architecture proposée présente l'avantage de pouvoir faire de la double détection Cy3 et Cy5. De plus le procédé de fabrication de nos biocapteurs est tout à fait approprié pour une production à grande échelle en vue d'une commercialisation.[47]

Les biocapteurs développés présentent aussi l'avantage de servir de support pour une analyse détaillée de la réaction d'hybridation qui pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme d'hybridation en fonction de plusieurs paramètres tels que les gênes stériques, l'orientation des sondes, et les traitements thermiques. Les résultats obtenus montrent que l'architecture développée permet de disposer d'un outil efficace pour ce type de détection mais que les phénomènes complexes en jeu sur la surface mériteraient une étude plus approfondie.

Bibliographie

(1) Bogard, M.; Ameziane, N.; Lamoril, J. *Immuno-Analyse & Biologie Specialisee* **2008**, *23*, 71-88.

(2) Brown, P. O.; Botstein, D. *Nature Genetics* **1999**, *21*, 33-37.

(3) Lipshutz, R. J.; Fodor, S. P. A.; Gingeras, T. R.; Lockhart, D. J. *Nature Genetics* **1999**, *21*, 20-24.

(4) Epstein, J. R.; Biran, I.; Walt, D. R. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *469*, 3-36.

(5) Choumane, H.; Ha, N.; Nelep, C.; Chardon, A.; Reymond, G. O.; Goutel, C.; Cerovic, G.; Vallet, F.; Weisbuch, C.; Benisty, H. *Applied Physics Letters* **2005**, *87*, 3.

(6) Marcy, Y.; Cousin, P. Y.; Rattier, M.; Cerovic, G.; Escalier, G.; Bena, G.; Guéron, M.; McDonagh, L.; le Boulaire, F.; Benisty, H.; Weisbuch, C.; Avarre, J.-C. *Biotechniques* **2008**, *44*, 913-920.

(7) Weisbuch, C.; Rattier, M.; Martinelli, L.; Choumane, H.; Avarre, J.-C.; Marcy, Y.; Cerovic, G.; Miramon, M.-L.; Reymond, G.-O.; Benisty, H. *IRBM* **2007**, *28*, 216-223.

(8) Lindroos, K.; Liljedahl, U.; Raitio, M.; Syvanen, A. C. *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, E69-9.

(9) Saldarriaga Fernandez, I. C.; van der Mei, H. C.; Lochhead, M. J.; Grainger, D. W.; Busscher, H. J. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4105-12.

(10) Angenendt, P.; Glokler, J.; Sobek, J.; Lehrach, H.; Cahill, D. J. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1009*, 97-104.

(11) Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O. *Science* **1995**, *270*, 467-470.

(12) Dahmen, C.; Janotta, A.; Dimova-Malinovska, D.; Marx, S.; Jeschke, B.; Nies, B.; Kessler, H.; Stutzmann, M. *Thin Solid Films* **2003**, *427*, 201-207.

(13) Johnson, I. D.; Davidson, M. W. *http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro/index.html*.

(14) Schaferling, M.; Nagl, S. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *385*, 500-517.

(15) Lehner, A.; Steinhoff, G.; Brandt, M. S.; Eickhoff, M.; Stutzmann, M. *Journal of Applied Physics* **2003**, *94*, 2289-2294.

(16) Stutzmann, M.; Garrido, J. A.; Eickhoff, M.; Brandt, M. S. *Physica Status Solidi a* **2006**, *203*, 3424-3437.

(17) Bras, M.; Dugas, V.; Bessueille, F.; Cloarec, J. P.; Martin, J. R.; Cabrera, M.; Chauvet, J. P.; Souteyard, E.; Garrigues, M. *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, *20*, 797-806.

(18) Goodman, A. M. *Applied Optics* **1978**, *17*, 2779-2787.

(19) Brodsky, M. H.; Title, R. S.; Weiser, K.; Pettit, G. D. *Physical Review B* **1970**, *1*, 2632-2641.

(20) Chaussat, C.; Bruyere, J. C. *Revue De Physique Appliquee* **1984**, *19*, 51-58.

(21) Chittick, R. C.; Alexande, J. H.; Sterling, H. F. *Journal of the Electrochemical Society* **1969**, *116*, 77.

(22) Street, R. A. *Cambridge University Press, Cambridge* **1991**.

(23) Tsai, C. C.; Fritzsche, H. *Solar Energy Materials* **1979**, *1*, 29-42.

(24) de Cesare, G.; Caputo, D.; Nascetti, A.; Guiducci, C.; Ricco, B. *Applied Physics Letters* **2006**, *88*.

(25) Kamei, T.; Toriello, N. M.; Lagally, E. T.; Blazej, R. G.; Scherer, J. R.; Street, R. A.; Mathies, R. A. *Biomedical Microdevices* **2005**, *7*, 147-152.

(26) Kuo, Y. *Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA* **2003**.

(27) Kruzelecky, R. V.; Racansky, D.; Zukotynski, S.; Perz, J. M. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1988**, *99*, 89-96.

(28) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Sénémaud, C.; Khodja, M. D. *Physical Review B* **1988**, *38*, 13263-13270.

(29) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Tran-Quoc, H. *Physical Review B* **1988**, *38*, 9895-9901.

(30) Born, M.; Wolf, E. *4th ed. Pitman Press, Bath* **1970**.

(31) Tessler, L. R.; Solomon, I. *Physical Review B* **1995**, *52*, 10962-10971.

(32) Solomon, I. *Philosophical Magazine B-Physics of Condensed Matter Statistical Mechanics Electronic Optical and Magnetic Properties* **1997**, *76*, 273-280.

(33) Sam, S.; Touahir, L.; Salvador Andresa, J.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Gabouze, N.; Djebbar, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 809-814.

(34) Touahir, L.; Sam, S.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N.; Allongue, P.; Henry de Villeneuve, C.; Gabouze, N.; Djebbar, S.; Gouget-Laemmel, A. C.; *Sensor Letters* **2010**, accepted.

(35) Faucheux, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N. *Langmuir* **2006**, *22*, 153-162.

(36) Moraillon, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 7158-7167.

(37) Touahir, L.; Moraillon, A.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; de Villeneuve, C. H.; Ozanam, F.; Solomon, I.; Gouget-Laemmel, A. C. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *25*, 952-955.

(38) Fouque, B.; Brachet, A. G.; Getin, S.; Pegon, P.; Obeid, P.; Delapierre, G.; Chatelain, F. *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, *22*, 2151-2157.

(39) Fouque, B.; Schaack, B.; Obeid, P.; Combe, S.; Getin, S.; Barritault, P.; Chaton, P.; Chatelain, F. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *20*, 2335-2340.

(40) Bocking, T.; Killan, K. A.; Gaus, K.; Gooding, J. J. *Langmuir* **2006**, *22*, 3494-3496.

(41) Voicu, R.; Boukherroub, R.; Bartzoka, V.; Ward, T.; Wojtyk, J. T. C.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **2004**, *20*, 11713-11720.

(42) Guttenberg, Z.; Rathgeber, A.; Keller, S.; Radler, J. O.; Wixforth, A.; Kostur, M.; Schindler, M.; Talkner, P. *Physical Review E* **2004**, *70*.

(43) Peterson, A. W.; Wolf, L. K.; Georgiadis, R. M. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 14601-14607.

(44) Khomyakova, E.; Livshits, M. A.; Steinhauser, M. C.; Dauphinot, L.; Cohen-Kaminsky, S.; Rossier, J.; Soussaline, F.; Potier, M. C. *Biotechniques* **2008**, *44*, 109-117.

(45) Galopin, E.; Touahir, L.; Niedziólka-Jönsson, J.; Boukherroub, R.; Gouget-Laemmel, A. C.; Chazalviel, J.-N.; Ozanam, F.; Szunerits, S. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *25*, 1199-1203.

(46) Levicky, R.; Horgan, A. *Trends in Biotechnology* **2005**, *23*, 143-149.

(47) Touahir, L.; Galopin, E.; Boukherroub, R.; Chazalviel, J.-N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Szunerits, S.; Ozanam, F. *Brevet FR 09 02747* **2009**.

Chapitre 3 : Couches minces de silicium amorphe carboné sur or ou argent pour une détection par résonance de plasmon surface (SPR)

Introduction 107
A. Les plasmons de surface 108
1. Théorie 108
a) Définition 108
b) Relation de dispersion 109
c) Couplage par prisme 111
d) Influence de la couche métallique 113
e) Fluorescence couplée au plasmon de surface 113
f) Biocapteurs basés sur la résonance de plasmon de surface 115
B. Utilisation des couches minces de silicium amorphe carboné 116
1. Intérêt des couches minces a-$Si_{1-x}C_x$:H 116
2. Mode opératoire 117
a) Préparation des interfaces SPR 117
b) Fonctionnalisation de surface 118
c) Mesure de la réflectivité 118
3. Optimisation de la sensibilité de capteurs SPR 119
a) Influence du taux de carbone et de l'épaisseur 119
b) Mesure de la sensibilité 120
c) Stabilité chimique 123
d) Caractérisations des couches 124
e) Caractérisation du greffage et de l'immobilisation 127
f) Mesure par SPR de l'interaction biotine-streptavidine 130
C. Fluorescence couplée au plasmon de surface : Applications aux puces à ADN 132
1. Contrôle de la chimie de surface 132
2. Calcul théorique de la réflectivité et du gain en fluorescence 133
3. Modes opératoires 134
a) Immobilisation des sondes 134
b) Hybridation 134
c) Mesure de la fluorescence 134
4. Détermination de constantes de dissociation 135
a) Isotherme de Langmuir 135
b) Etude de l'hybridation par SPFS 136
Conclusion 144
Bibliographie 145

« Pour progresser, il ne suffit pas de vouloir agir, il faut d'abord savoir dans quel sens agir. »
G. Lebon

Introduction

Parmi les biocapteurs, ceux basés sur la détection de la résonance de plasmon de surface (SPR) sont de plus en plus utilisés.[1] Contrairement à ceux exploitant la détection par fluorescence, ils présentent l'avantage d'une détection directe (sans fluorophore) et permettent une détection sensible et en temps réel de reconnaissance moléculaire par suivi du changement d'indice à la surface. Depuis leur invention à la fin des années 90, les biocapteurs SPR sont devenus des outils d'analyse particulièrement intéressants pour l'étude d'interactions moléculaires.[2]

Dans le cadre de cette étude, nous avons collaboré avec le groupe de S. Szunerits et R. Boukherroub de l'institut de recherche interdisciplinaire de Villeneuve d'Ascq, pour améliorer la physico-chimie des substrats plasmoniques et avec le Groupe de A. T. A. Jenkins du département de chimie de l'université de Bath (G.B.) pour l'étude de la fluorescence couplée au plasmon de surface (SPFS).

Le but de ce chapitre est de montrer comment la fonctionnalisation de surface jusqu'alors utilisée essentiellement sur or peut être améliorée en utilisant une couche mince de silicium amorphe. Nous nous intéresserons à la sensibilité de ces substrats et à l'utilisation combinée des plasmons de surface et de la fluorescence pour la détermination de constantes de dissociation, particulièrement intéressantes pour identifier des mutations ponctuelles de bases dans les brins d'ADN.

A. Les plasmons de surface

1. Théorie

a) Définition

Certaines des propriétés des métaux nobles peuvent être décrites par le modèle des électrons libres, dans lequel la présence du réseau d'atomes est ignorée. Les électrons libres sont dans ce cas considérés comme un plasma d'électrons ce qui confère au métal une fonction diélectrique de la forme :

$$\varepsilon_m = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \qquad (9)$$

où ω_p est la pulsation du plasma, qui correspond au quantum d'excitation d'oscillations d'ondes de densité électronique qui peuvent se propager dans le volume du métal lorsque $\varepsilon_m = 0$, c'est-à-dire lorsque $\omega = \omega_p$.[2] Dans la gamme de fréquence $\omega < \omega_p$, où $\varepsilon_m < 0$, il apparaît des modes de surface, appelés plasmons de surface, qui se couplent au champ électromagnétique.[2,3]

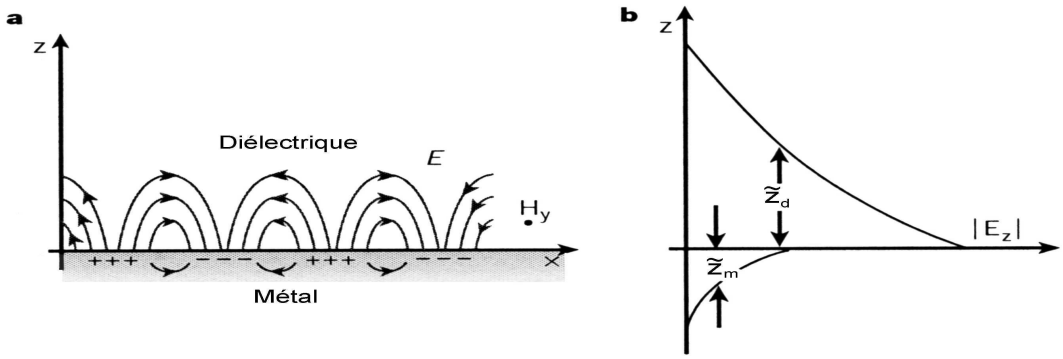


Figure 60 : (a) Représentation schématique de la propagation des oscillations de charge à l'interface métal/diélectrique ; (b) dépendance du champ électrique associé selon la direction perpendiculaire.[4]

La figure 60 représente les oscillations de charge (a) et la dépendance exponentielle du champ électrique associé (b). Le maximum d'intensité du champ associé à cette onde se trouve à

l'interface métal – diélectrique et décroît exponentiellement dans les deux milieux suivant les directions perpendiculaires à l'interface.[4]

b) Relation de dispersion

Les plasmons de surface se propagent le long de l'interface métal/diélectrique avec une constante de propagation k_x (équation 10) déterminée grâce aux équations de Maxwell :

$$k_x = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} \tag{10}$$

où ω est la pulsation, c la vitesse de la lumière, ε_d et ε_m les permittivités respectives du diélectrique et du métal. La fonction diélectrique du métal ε_m ($\varepsilon_m = \varepsilon_m^{'} + i\varepsilon_m^{''}$) est complexe, on peut donc écrire $k_x = k_x^{'} + ik_x^{''}$ avec :

$$k_x' = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon_m' \varepsilon_d}{\varepsilon_m' + \varepsilon_d}} \tag{11}$$

$$k_x'' = \frac{\omega}{c}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_m' \varepsilon_d}{\varepsilon_m' + \varepsilon_d}}\right)^3 \left(\frac{\varepsilon_m''}{2(\varepsilon_m')^2}\right) \tag{12}$$

Afin de comprendre le couplage de l'onde incidente avec les plasmons de surface, il est utile d'étudier leur relation de dispersion.

Le vecteur d'onde et la fréquence d'oscillation d'une onde électromagnétique sont liés par leur relation de dispersion (figure 61). Celle d'un photon se propageant dans le milieu diélectrique s'écrit :

$$k_{photon} = \frac{\omega}{c}\sqrt{\varepsilon_d} \tag{13}$$

La relation de dispersion du mode plasmon est donnée par les relations (11) et (12). Pour coupler un plasmon de surface à une excitation électromagnétique seule la partie propagative de l'onde importe, c'est à dire la partie réelle k_x' du vecteur d'onde (équation 11). La figure 61 représente la relation de dispersion $\omega(k'_x)$ des plasmons de surface. Celle-ci n'est pas linéaire puisque la fonction diélectrique ε_m dépend de ω. On note que pour les grands vecteurs d'onde, la fréquence d'oscillation tend vers une valeur ω_s :

$$\omega_s = \frac{\omega_p}{\sqrt{1+\varepsilon_d}} \qquad (14)$$

Au-delà de cette limite, le plasmon de surface est non propagatif (il n'existe que des plasmons de volume dont la fréquence d'oscillation est ω_p).

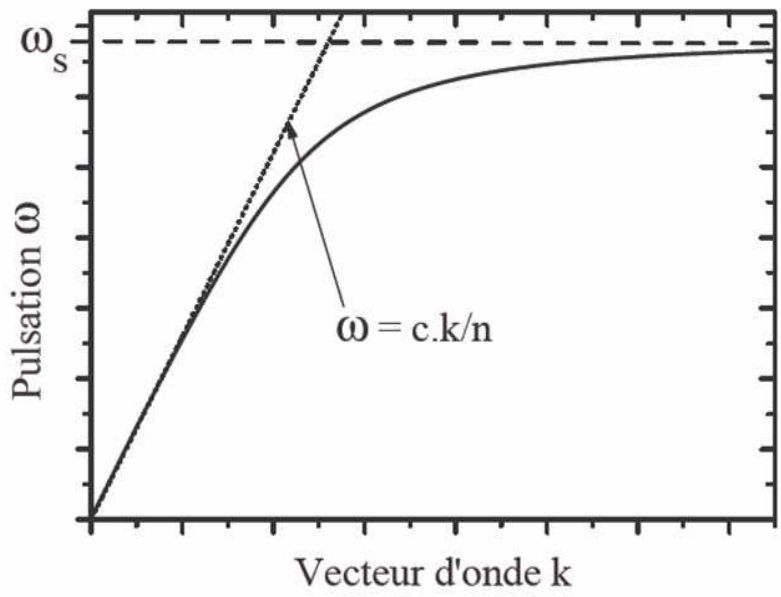


Figure 61 : Relation de dispersion d'un plasmon de surface se propageant entre un métal et un milieu diélectrique d'indice n. La droite correspondant à $\omega = c.k/n$ est la droite de dispersion de la lumière dans le milieu diélectrique n. La droite horizontale en pointillés correspond à la pulsation des plasmons de surface ω_s.

On note que, pour une pulsation donnée, le vecteur d'onde du plasmon de surface est toujours plus grand que celui de la lumière se propageant dans le diélectrique. L'absence d'interaction entre leurs courbes de dispersion interdit tout couplage. Par conséquent les deux courbes ne se croisent jamais. Il ne peut donc pas y avoir de couplage entre une onde lumineuse qui se propage dans le diélectrique et un mode de plasmon de surface. Il existe différentes techniques pour réaliser l'adaptation entre les vecteurs d'ondes : le couplage par prisme (expliqué ci-dessous) ou le couplage par réseau.[5]

c) Couplage par prisme

Il est possible d'illuminer la surface métallique au travers d'un milieu optique élevé, par exemple un prisme, pour augmenter le vecteur d'onde de la lumière incidente. Il existe 2 types de configurations :

- la configuration d'Otto : La lumière est projetée sur le métal en approchant un prisme de la surface métallique figure 62a.[5]
- la configuration de Kretschmann : la face arrière d'un film métallique est éclairée au travers d'un prisme figure 62b.[5]

Dans ces configurations, au-delà d'un certain angle (appelé angle critique) nous sommes en réflexion totale interne (ATR) ce qui permet l'apparition d'une onde évanescente à l'interface prisme / diélectrique possédant un vecteur d'onde plus grand que celui d'une onde se propageant dans le diélectrique (configuration d'Otto) ou l'excitation des plasmons de surface à l'interface métal / diélectrique dans la mesure où l'indice de réfraction du prisme est suffisamment grand devant celui du diélectrique (configuration de Kretschmann).

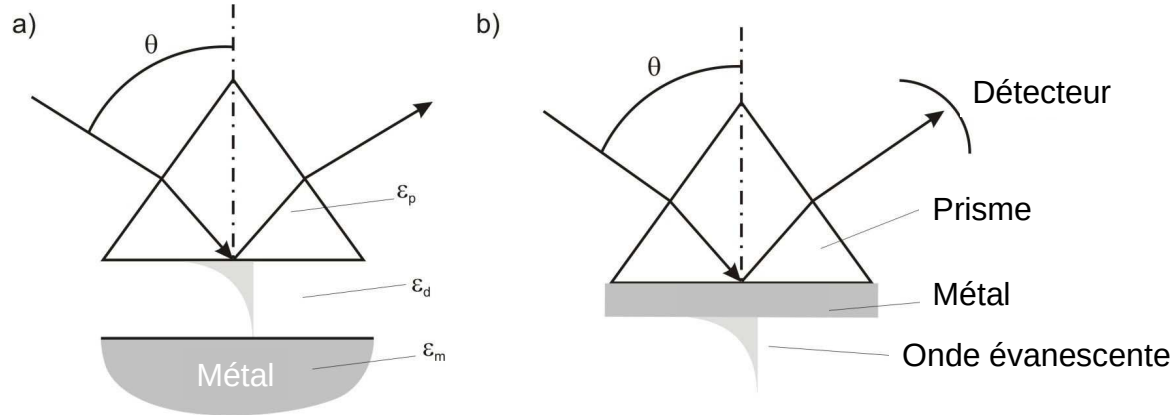


Figure 62 : Couplage d'une onde incidente d'angle θ par rapport à la normale avec un plasmon de surface en utilisant la configuration d'Otto (a) et la configuration de Kretschmann (b).

Dans les 2 cas, le faisceau de lumière incidente se réfléchit à la base du prisme. La relation de dispersion de la lumière dans la direction parallèle à l'interface est dans ce cas égale à :

$$k_{x,\,photon} = \frac{\omega}{c}\sqrt{\varepsilon_p}\,\sin(\theta) \qquad (15)$$

avec ε_p la fonction diélectrique du prisme.

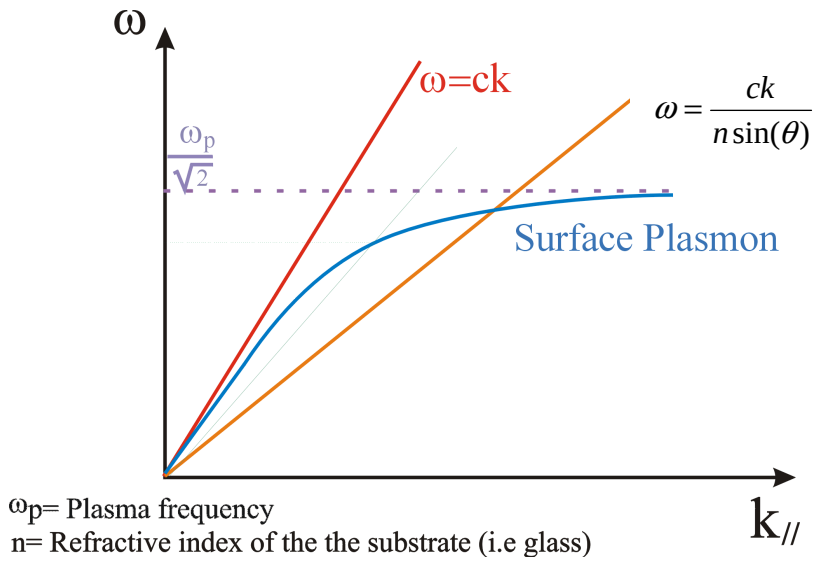


Figure 63 : Relations de dispersion de la lumière émise (rouge) ; d'un plasmon de surface à l'interface avec l'air (bleu) et d'une onde incidente en configuration de Kretschmann ou d'Otto pour un prisme d'indice n (orange).

La pente de la courbe de dispersion est ainsi divisée par un facteur $1/n_p$ ce qui permet à cette courbe de couper la courbe de dispersion des plasmons pour un angle d'incidence θ appelé angle de résonance plasmon (figure 63). L'équation de couplage est donc :

$$k_{x,photon} = k'_{x,plasmon} \tag{16}$$

$$\frac{\omega}{c}\sqrt{\varepsilon_p}\sin(\theta) = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon'_m \varepsilon_d}{\varepsilon'_m + \varepsilon_d}} \tag{17}$$

A l'angle de résonance, l'énergie des photons incidents est convertie pour exciter les plasmons de surface, ce qui se traduit par un minimum de réflectivité comme présenté sur la figure 64.[2,5]

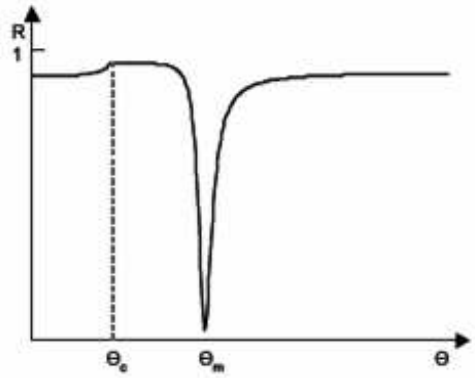


Figure 64 : Courbe de réflectivité en configuration de Kretschmann.

d) Influence de la couche métallique

La fonction diélectrique d'un métal varie en fonction de la pulsation de l'onde incidente. Chaque métal aura donc une résonance plasmon spécifique à un couple longueur d'onde et angle d'incidence (λ, θ) particulier et des caractéristiques de dispersion propres qui vont influencer le couplage entre l'onde incidente et les plasmons de surface.[5,6]

Pour une excitation dans le rouge, l'or et l'argent présentent les meilleures propriétés. L'argent possède la résonance plasmon la plus étroite et donc la meilleure sensibilité, mais est très peu utilisé du fait qu'il s'oxyde à l'air. Des sous-couches d'adhérence de titane ou de chrome sont utilisées pour l'accrochage du métal sur la lame de verre ou prisme.

L'efficacité du couplage entre excitation et plasmons de surface d'un substrat SPR, maximale lorsque la réflectivité est nulle (c'est à dire à la résonance) dépend de l'épaisseur du métal $d_{m.}$ En configuration de Kretschmann, l'onde se propageant dans le prisme ne peut en effet qu'exciter le mode plasmon à l'interface métal / diélectrique. Il faut donc éviter que la couche soit trop épaisse et n'atténue l'excitation. Réciproquement, il faut que la couche métallique soit suffisamment épaisse pour que l'oscillation de la densité de charge, qui s'étend sur une épaisseur finie à la surface, puisse se développer. La longueur correspondante est de l'ordre de l'épaisseur de la couche métallique, soit environ 30 nm (en fait 38 nm Ag ; 50 nm Au). Le plasmon reste donc très confiné dans le prisme et il sera sensible à toutes variations qui peuvent se produire à la surface du métal.[6]

e) Fluorescence couplée au plasmon de surface

A l'angle de résonance presque toute l'énergie des photons est utilisée pour exciter les plasmons de surface. Ceci conduit au minimum de réflectivité et à l'exaltation du champ électromagnétique à l'interface métal/diélectrique (air ou eau). Ainsi il sera possible d'exciter plus efficacement des biomolécules marquées par un fluorophore.[7] La figure 65 montre bien que la bande plasmon centrée sur le minimum de réflectivité est plus étroite dans le cas de l'argent que dans celui de l'or. Le facteur d'exaltation du champ électromagnétique a été calculé pour différentes interfaces (prisme/métal/air ; prisme/métal/eau) pour l'or et l'argent. Comme on peut le voir sur la figure 65, chaque intensité du champ atteint un maximum à un angle proche de la résonance (la valeur indiquée sur l'échelle de droite est normalisée par rapport à l'intensité du champ incident). Les facteurs sont de 58 et 17 pour les interfaces Ag/eau et Au/eau.[7] L'augmentation significative du facteur pour l'argent s'explique par le fait

que l'argent présente une fonction diélectrique avec une partie imaginaire plus petite. Le facteur d'exaltation est plus faible pour les interfaces immergées dans l'eau que dans l'air parce que le champ associé au plasmon de surface se dissipe davantage dans le métal pour des milieux diélectriques plus denses.

On note par ailleurs que l'angle de résonance correspondant au maximum du facteur d'exaltation du champ électromagnétique et celui associé au minimum de réflectivité ne sont pas strictement égaux. On peut expliquer cela si l'on considère notre système comme un résonateur guidé par la lumière incidente. La partie imaginaire ε'' de la fonction diélectrique correspond au facteur de perte du résonateur et entraîne ainsi la séparation entre l'angle de résonance des plasmons et le maximum de l'intensité du champ. Plus ε'' est grand, plus la séparation entre les angles est importante, ce qui explique que cette séparation est plus faible dans le cas de l'argent que dans celui de l'or.[7]

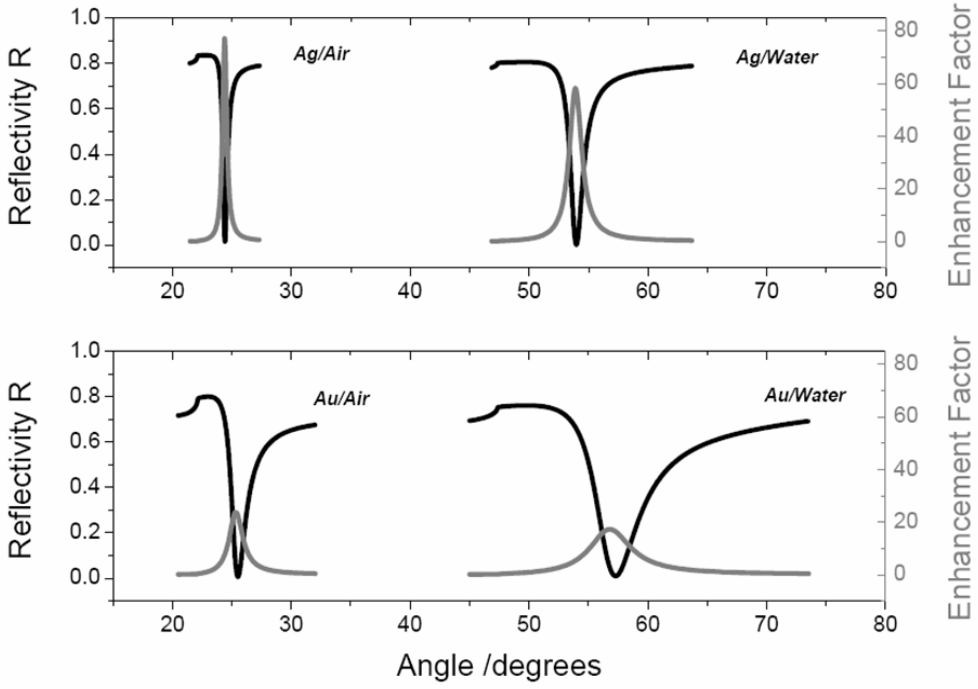


Figure 65 : Courbes théoriques de réflectivité et de l'intensité du carré du champ en fonction de l'angle d'incidence pour différents substrats (prisme/Ag/air ; prisme/Ag/eau ; prisme/Au/air ; prisme/Au/eau).

f) Biocapteurs basés sur la résonance de plasmon de surface

Pour la plupart des biocapteurs basés sur la résonance de plasmon de surface, les sondes sont souvent immobilisées sur la couche métallique (or) et permettent une reconnaissance cible-sonde. L'accrochage de biomolécules à l'interface induit un changement de l'indice de réfraction, ce qui modifie la constante de propagation des plasmons de surface et change donc le couplage lumière émise / plasmons de surface. Ainsi les interactions moléculaires peuvent être suivies en mesurant les variations de la courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence comme le montre la figure 66a. Il est par ailleurs possible de faire des études cinétiques en mesurant la réflectivité à un angle donné pendant une réaction moléculaire (figure 66b).[1]

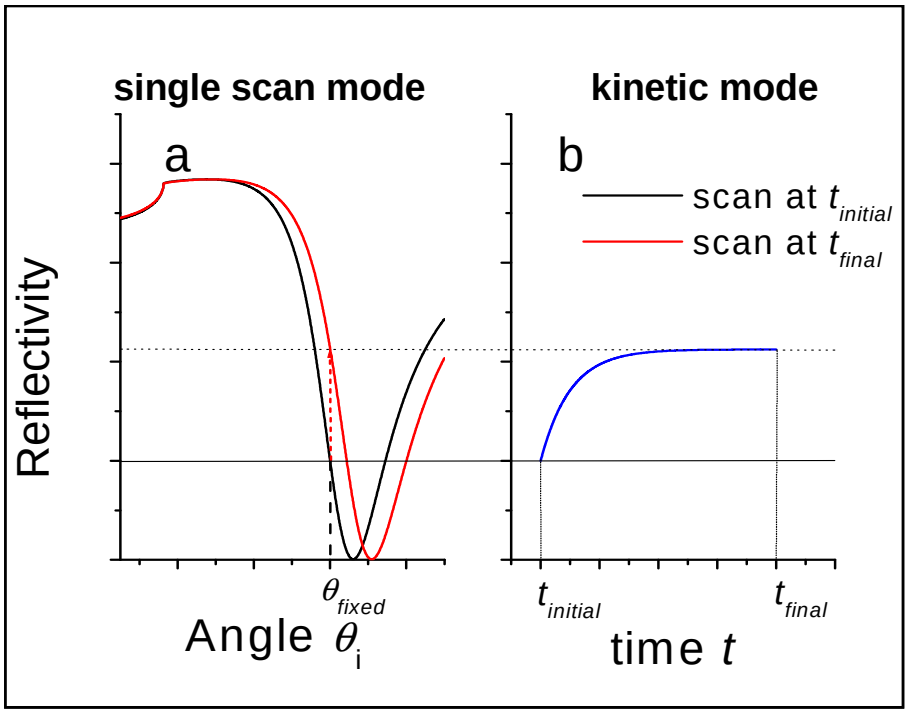


Figure 66 : (a) Mesure de réflectivité avant (noir) et après (rouge) une reconnaissance moléculaire ; (b) cinétique d'une réaction de reconnaissance moléculaire à un angle donné θ_{fixed}.

B. Utilisation des couches minces de silicium amorphe carboné

1. Intérêt des couches minces a-$Si_{1-x}C_x$:H

L'or est plus couramment utilisé pour ses propriétés optiques et chimiques. En effet, de nombreuses expériences de reconnaissance moléculaire par SPR sont réalisées sur des substrats d'or sur lesquels des groupements fonctionnels ou ligands sont immobilisées via la chimie des thiols.[8-10] Même si les liaisons Au-S sont relativement fortes, elles sont sujettes à l'oxydation et à la désorption thermique.[11] Ainsi de nombreuses autres techniques de fonctionnalisation ont été développées.[12-14] Le groupe de Livache s'est par exemple intéressé à l'utilisation de polymères comme le polypyrrole pour immobiliser des brins d'ADN.[12,13] Comme pour la détection par fluorescence, la silanisation permet l'accrochage de biomolécules comme l'ADN, des carbohydrates ou des protéines sur des substrats recouverts d'une couche d'oxyde de silicium.[15-19] Cependant, comme montré précédemment, l'or n'est pas le meilleur matériau pour une détection par plasmon de surface très sensible. Des modèles théoriques réalisés par Franzen et coll. ont montré que les substrats à base d'ITO sont plus sensibles mais nécessitent une excitation et une détection dans l'infrarouge.[20,21] Dans le visible, l'argent présente les meilleures propriétés pour une très bonne sensibilité concernant la détection du plasmon de surface ou de la fluorescence couplée au plasmon de surface.[7,22-24] Les substrats d'argent peuvent être fonctionnalisés de façon similaire aux substrats d'or par les thiols ou les molécules disulfures qui permettent d'obtenir des monocouches compactes et denses.[25,26] Cependant l'argent ne présente pas une très bonne stabilité chimique (oxydation à l'air), ce qui altère son utilisation pour la détection par SPR. Plusieurs stratégies ont été mises au point pour l'utilisation de l'argent. Zynion et coll. ont par exemple montré qu'il était possible d'utiliser une bicouche métallique (Ag/Au), et d'accrocher par des thiols des sondes à la surface du capteur.[27] Szunerits et Boukherroub ont aussi montré qu'il était possible d'utiliser des couches d'oxyde (SiO_x, ITO, SnO_2) pour protéger l'argent et immobiliser des sondes à la surface de ces capteurs.[23,28-30]

Dans cet esprit Smith et coll. ont transféré sur des couches d'argent la stratégie mise au point sur or qui consiste à déposer une couche de carbone amorphe. Dans ce cas, une chimie de surface très stable utilisant la liaison C-C pour accrocher de façon covalente des

biomolécules a été utilisée. De l'imagerie par SPR a pu être réalisée sur de tels substrats, cependant la sensibilité est plus faible que celle mesurée sur des substrats de verre à cause de l'absorption dans le visible, montrant qu'il est préférable d'utiliser des couches minces non absorbantes dans le visible.[31,32]

De ce point de vue, les alliages silicium-carbone amorphes (a-$Si_{1-x}C_x$:H) étudiés au chapitre 2 peuvent être particulièrement intéressants pour la fabrication des subtrats SPR multicouches. Il est possible de contrôler l'indice optique de la couche en faisant varier le taux de carbone.[33,34] Ils peuvent être déposés en couches minces. Les surfaces hydrogénées peuvent enfin être fonctionnalisées par hydrosilylation en utilisant la liaison Si-C pour permettre un accrochage covalent des molécules biologiques (biotine, ADN…).[35-40] Nous allons montrer comment ces couches nous permettent d'optimiser la sensibilité des capteurs SPR pour des mesures de réflectivité (SPR) et de fluorescence (SPFS). Nous comparerons la sensibilité pour des couches métalliques d'or et d'argent d'épaisseurs optimales (50 nm or, 38 nm argent) pour le signal SPR et SPFS.

2. Mode opératoire

a) Préparation des interfaces SPR

(1) Evaporation du film métallique

Sur des substrats de verre soigneusement rincés, une couche mince de 5 nm de t**!Fin de formule inattendue**itane est déposée par évaporation thermique. Des couches de 50 nm d'or ou 38 nm d'argent sont ensuite déposées par évaporation en utilisant un bâti MEB 500 (Passys, France).

(2) Dépôt de la couche de a-$Si_{1-x}C_x$:H

Des films de silicium amorphe carboné sont déposés comme décrit au chapitre 2 par PECVD en régime « basse puissance ». Le taux final en carbone (C) dans le matériau est ajusté en variant la proportion de méthane dans le mélange gazeux ($[CH_4]/ \{[CH_4]+[SiH_4]\}$). Pour le dépôt d'un film mince avec la stoechiométrie suivante : a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H, on utilise un taux de méthane de 97 at.% dans le mélange gazeux, tandis que pour un film a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H, un taux de 81 at.% est nécessaire. L'épaisseur est ajustée en contrôlant le temps de dépôt et vérifiée par ajustement des mesures SPR à l'aide du logiciel Winspall 2.0.[3]

Lors des dépôts sur argent, il s'est avéré que la couche métallique s'oxyde à cause du chauffage prolongé (pour atteindre la température de dépôt à 250°C et laisser le système dégazer) de la couche avant le dépôt du silicium amorphe. Ainsi, un prétraitement de l'échantillon juste avant dépôt par un plasma d'hydrogène (150 mTorr, 0,1 W cm^{-2}, 5 mn) permet de réduire l'oxyde d'argent formé et de déposer le silicium amorphe carboné directement sur la couche d'argent.

b) Fonctionnalisation de surface

A la sortie du réacteur de dépôt le film a-$Si_{1-x}C_x$:H s'oxyde. Il est exposé pendant 15 secondes à des vapeurs de HF pour obtenir une surface terminée par des liaisons Si-H. La surface hydrogénée est ensuite immergée dans l'acide undécylénique et soumise à une irradiation photochimique à 312 nm pendant 3 h.

L'activation des fonctions acides en esters de succinimidyle est réalisée comme aux chapitres 1 et 2 à 15°C en présence de l'EDC à 5 mM et du NHS à 5 mM pendant 90 mn. La surface est ensuite soigneusement rincée et séchée à l'azote. Les esters ainsi obtenus réagissent ensuite par réaction d'amidation en conditions physiologiques avec la N-(-2-aminoéthyl) biotine (1 mg/ mL PBS) pendant 2h à température ambiante.

Pour l'étude par fluorescence couplée aux plasmons de surface (SPFS), nous détaillerons la procédure d'immobilisation des brins d'ADN dans la partie correspondante.

c) Mesure de la réflectivité

La réflectivité est mesurée à l'aide d'un appareil commercial de type Autolab SPRINGLE (mesure effectué à une longueur d'onde λ =670 nm) (figure 67). [41,42]

Figure 67 : Appareil de mesure Autolab SPRINGLE pour des études SPR.

3. Optimisation de la sensibilité de capteurs SPR

a) Influence du taux de carbone et de l'épaisseur

L'influence du taux de carbone et de l'épaisseur d'un film de a-$Si_{1-x}C_x$:H sur le signal SPR a été étudiée pour un taux compris entre 20 et 37 % et une épaisseur comprise entre 0 et 10 nm (figure 68).

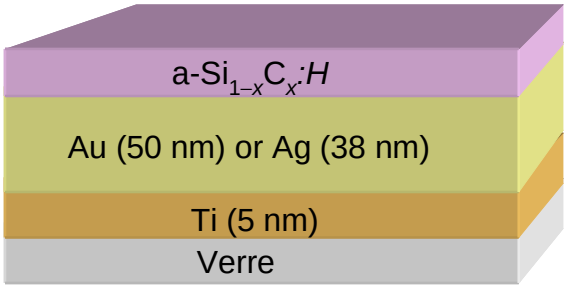
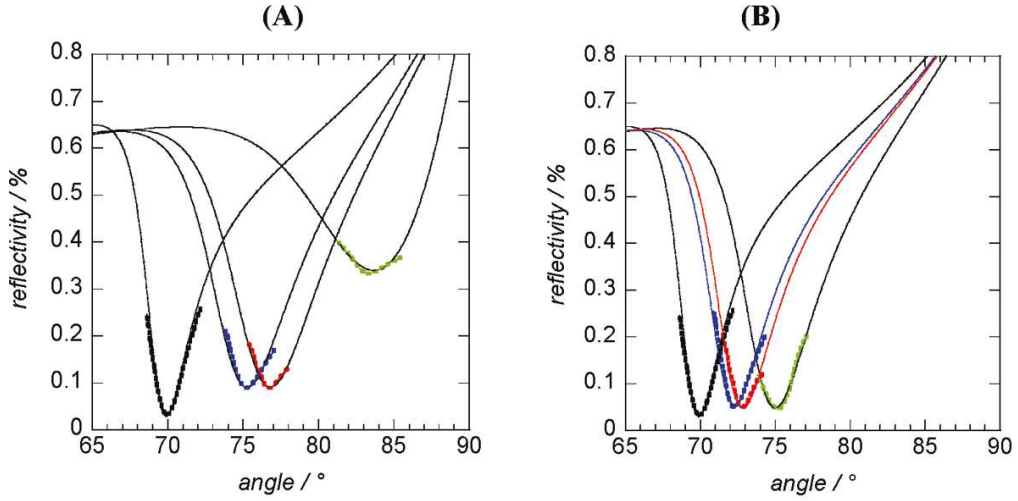


Figure 68 : Schéma de la structure de résonance de surface plasmonique, composée d'une structure multicouche dans laquelle une couche d'or a été revêtue avec une couche mince de a-$Si_{1-x}C_x$:H.

La Figure 69 montre les courbes SPR expérimentales superposées aux courbes théoriques de Fresnel pour des couches d'or recouvertes de 10 nm (A) et 5 nm (B) de a-$Si_{1-x}C_x$:H (x= 20% ; 33% et 37%). Les différences dans les courbes de SPR sont dues à la modification de l'indice de réfraction *n* (*n = n'-i n''*). En effet, plus le taux de carbone est important, plus l'indice de réfraction est faible : à 633 nm $n=2{,}63-5\times10^{-4}i$ pour une couche a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H alors que $n=1{,}815-1{,}07\times10^{-3}i$ pour une couche de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H. Avec un revêtement possédant un taux de carbone de 20%, on constate une diminution dans l'efficacité de couplage photon-plasmon de surface et un élargissement des courbes SPR en dépit de la faible absorption du matériau (faible partie imaginaire). En fait, en augmentant le taux de carbone on augmente le gap optique mais aussi la densité d'états dans les queues de bandes. On note que les valeurs *n''* déterminées par les ajustements des courbes SPR sont plus grandes que celles déterminées par transmission optique (couches de 1 µm déposées directement sur verre).



(C)

material	*n'(SPR) | n'(optical)*	*n" (SPR) | n" (optical)*
Ti	2.400	3.313
Au	0.197	3.670
a-$Si_{0.80}C_{0.20}$	2.51|2.60	0.002|0.0003
a-$Si_{0.67}C_{0.33}$	1.95| 1.93	0.03|0.0003
a-$Si_{0.63}C_{0.37}$	1.81| 1.81	0.04|0.0010

Figure 69 : Courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence (exprimé en degrés) des couches d'or revêtues par des films de a-$Si_{1-x}C_x$:H épais de 10 nm (A) et 5 nm (B): or non revêtu (noir), ou revêtu par a- $Si_{0,80}C_{0,20}$ (vert), a-$Si_{0.67}C_{0.33}$ (rouge), a-$Si_{0.63}C_{0.37}$ (bleu) dans l'eau. Les valeurs expérimentales obtenues (points) ont été comparées aux courbes théoriques de SPR (courbes) calculées en utilisant WinSpall 2.0. (C) Liste des indices de réfraction à 670 nm déterminés à partir de mesures SPR et de mesures optiques de réflectivité.[43]

La meilleure structure en termes de signal SPR est obtenue en utilisant une couche de 50 nm d'or déposée sur une couche de 5 nm de titane (5 nm Ti/50 nm Au) et revêtue d'un film de 5 nm de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H. Si l'on compare les signaux SPR, on note un faible élargissement du signal après dépôt de l'alliage a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H.

b) Mesure de la sensibilité

La sensibilité des substrats SPR est une fonction qui dépend de façon complexe à la fois de la largeur à mi-hauteur et de l'angle de réflectivité minimum. Un facteur de sensibilité (FOM *Figure of Merit*) est défini pour évaluer la sensibilité des différents capteurs :[44]

$$FOM = \frac{m\,(\deg reeRIU^{-1})}{fwhm\,(\deg ree)} \qquad (18)$$

où *m* correspond à la pente de la droite du minimum de reflectivité (angle de résonance Θ_{SPR}) en fonction de l'indice de réfraction n du milieu extérieur dans lequel est réalisée la mesure ; *fwhm* correspond à la largeur à mi-hauteur du signal SPR pour les différentes courbes de réflectivité mesurées dans différentes solutions à indice de réfraction variable (n_{eau}=1,33 ; $n_{éthanol}$=1.361 ; $n_{butanol}$= 1,397 ; $n_{propane\ diol}$=1,43).

La figure 70 montre les courbes de sensibilité pour différentes structures. Les droites correspondent au changement d'angle de résonance divisé par la largeur à mi-hauteur en fonction de l'indice du milieu (la variation des angles est mesurée par rapport à l'angle de résonance dans l'eau). La pente de ces droites est donc égale au facteur de sensibilité *FOM*. Le FOM est égal à 35 RIU^{-1} pour une couche d'or alors qu'il est de 74 RIU^{-1} pour une couche d'or recouverte de 5 nm de a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H. Ainsi la présence de la couche mince de silicium amorphe carboné apporte une sensibilité plus grande au capteur contrairement à ce que l'on observe avec une couche de carbone amorphe.[32] La sensibilité du capteur est même plus importante que pour un capteur à base d'argent recouvert d'ITO, dont le FOM est égal à 47 RIU^{-1}.[23]

Comme attendu en remplaçant la couche d'or (50 nm) par une couche d'argent, la sensibilité est augmentée, comme on peut le voir sur la figure 70. Les courbes de réflectivité et courbes d'ajustement de Fresnel (figure 71) permettent d'en comprendre la raison. En comparant les courbes de réflectivité des différentes structures a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H/Au et a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H /Ag, on voit que la largeur à mi-hauteur est bien plus faible pour la couche a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H sur Ag que sur Au.

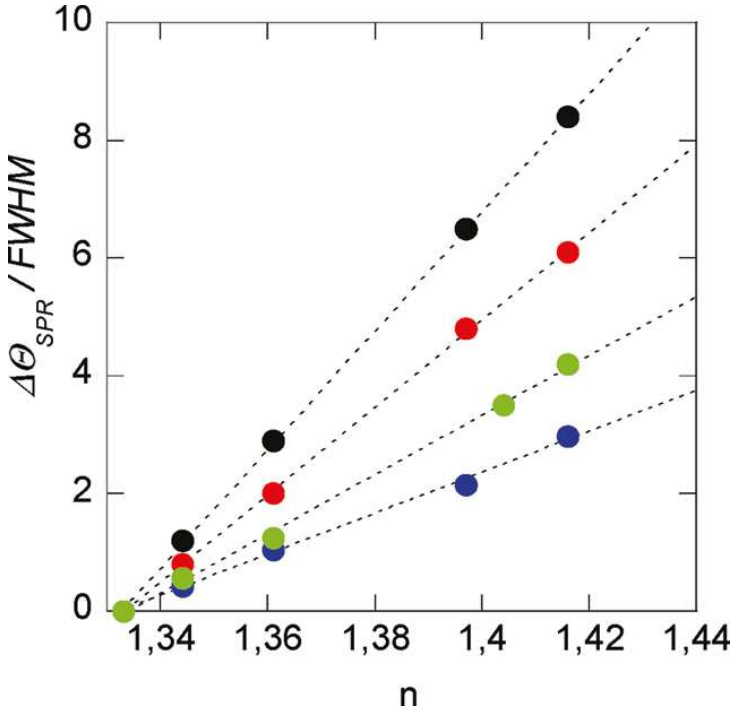


Figure 70 : Courbe de sensibilité ($\Delta\theta_{SPR}$/fwhm) en fonction de l'indice de réfraction n : Au (bleu) ; Ag (vert) ; Au/a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H (5 nm) (rouge) ; Ag/a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H (5 nm) (noir).

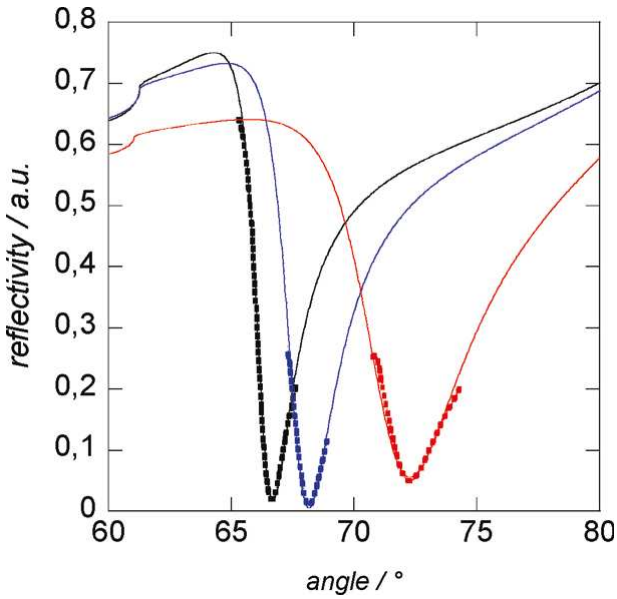


Figure 71 : Courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence (exprimé en degrés) pour différents substrats SPR dans l'eau: Ag (noir), Ag/a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H (5 nm) (bleu) Au/a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H (5 nm) (rouge),. Les valeurs expérimentales obtenues (points) ont été comparées aux courbes théoriques de SPR (courbes) calculées en utilisant WinSpall 2.0.

La sensibilité de la structure a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H /Ag est de 101 RIU^{-1}, respectivement 2 fois et 2,8 fois plus sensible que pour une simple couche d'argent (51 RIU^{-1}) ou or (35 RIU^{-1}). Finalement, il apparaît ici clairement que le revêtement d'une structure plasmonique active par une couche mince de silicium amorphe carboné transparente dans le visible permet d'augmenter significativement la sensibilité, contrairement à ce qui a été observé pour une couche de carbone amorphe.[31,32] L'indice de réfraction de la couche doit être suffisamment élevé pour permettre le couplage photons-plasmons de surface mais pas trop élevé pour éviter un élargissement du signal SPR (figure 71). L'épaisseur doit donc être contrôlée pour éviter l'élargissement du signal (figure 69). Ainsi la structure (5 nm) a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H /Ag permet d'obtenir un signal SPR de très bonne qualité (figure 71).

Le facteur de sensibilité défini ci-dessus et utilisé classiquement pour comparer les différentes structures SPR n'est pas pleinement satisfaisant pour l'application aux biocapteurs. En effet, il mesure la sensibilité de la mesure à un changement d'indice de réfraction du liquide adjacent. Pour un biocapteur tel que ceux que nous mettons au point, il vaudrait mieux pouvoir évaluer la sensibilité de la mesure à un (petit) changement d'indice de réfraction au voisinage immédiat (1 à 10 nm) de la surface. Ceci suggèrerait de définir un test évaluant la variation du signal lorsqu'on attache diverses quantités bien contrôlées de sondes à la surface du capteur. Lorsqu'on modifie l'architecture d'un capteur, il faudrait être capable de séparer les effets liés à l'architecture optique et ceux liés aux procédures d'immobilisation des sondes comme nous l'avons fait pour les capteurs à fluorescence au chapitre 2. Nous n'avons pas tenté de faire de même ici.

Nous allons nous intéresser maintenant à la stabilité de cette structure pour la fonctionnalisation de surfaces en vue d'une étude de reconnaissance moléculaire (Biotine–streptavidine ou ADN sondes- cibles).

c) Stabilité chimique

La stabilité chimique de l'interface est étudiée par immersion pendant 6 heures dans 0,1 M H_2SO_4 et 0,1 M NaOH. Aucun changement dans le signal SPR n'est enregistré après ces traitements, ce qui indique que le film de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H d'épaisseur 5 nm stabilise efficacement la surface métallique en évitant l'oxydation de la couche d'argent et supportera des étapes de fonctionnalisation chimique ultérieures. Des mesures de réflectivité de tels substrats stockés à l'air ou dans une solution de PBS ont montré une parfaite stabilité au cours du temps (mesures pendant un mois).

d) Caractérisations des couches

(1) Mesures électriques et électrochimiques

Des mesures électriques et électrochimiques ont été réalisées sur différentes structures. Lors de la mesure de la conductivité dans le plan, on mesure la résistance entre deux contacts pris à la surface de l'échantillon comme les contacts 1 et 2 schématisés figure 72. Dans ce cas, la résistance d'une structure multicouches telle que Ti/Ag/ a-$Si_{1-x}C_x$:H peut être décrite comme la résistance équivalente à la combinaison de trois résistances en parallèle. La résistance R du capteur est alors égale à : $1/R=1/R_{Ti} + 1/R_{Ag} + 1/R_{a\text{-}Si1\text{-}xCx:H}$ (R_{Ti} étant la résistance de la couche de titane, R_{Ag} celle de la couche d'argent et $R_{a\text{-}Si1\text{-}xCx:H}$ celle de la couche d'alliage).

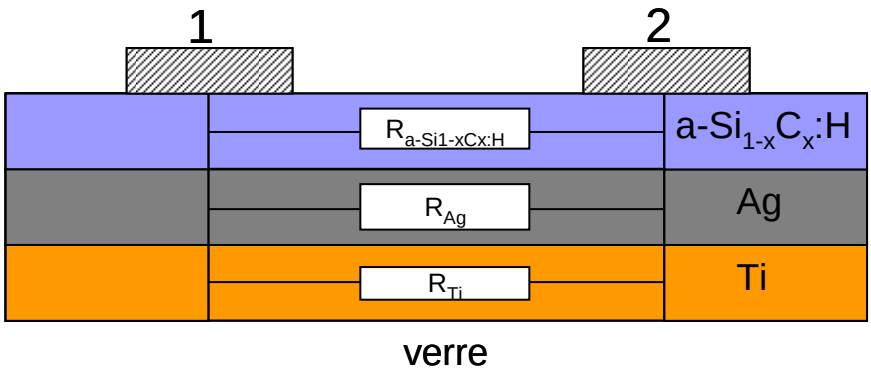


Figure 72 : Représentation schématique du substrat lors de la mesure de résistivité.

La figure 73 (a) montre l'évolution de la résistivité des structures hybrides en fonction de l'épaisseur pour différents taux de carbone (20%, 33% et 37%). La résistivité décroît avec le contenu en carbone et augmente avec l'épaisseur de la couche, atteignant une limite lorsque la couche est épaisse d'environ 20 nm. Ceci suggère que la résistivité globale est déterminée par la résistivité de la couche d'argent plutôt que par la résistivité du revêtement et que la conductivité de l'alliage est négligeable. Etant donné que la résistivité d'un film mince métallique est gouvernée par la diffusion aux joints de grains,[45] l'augmentation de la résistivité peut être attribuée à la dissolution du silicium amorphe carboné dans la couche d'argent durant le dépôt par PECVD. Les propriétés électrochimiques des différentes surfaces ont été mesurées par voltampérométrie cyclique en utilisant $Fe(CN)_6^{4-}$ comme une sonde redox (Figure 73 b).

L'argent revêtu de 5 nm de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H présente une cinétique de transfert de charges similaire à celle de l'argent seul, tandis que lorsqu'il est revêtu de 5 nm de a-$Si_{0,67}C_{0,33}$:H ou de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H la cinétique de transfert de charges de l'électrode est partiellement bloquée. L'effet bloquant peut être attribué au caractère semi-conducteur des alliages silicium-carbone amorphes et à la barrière de l'interface plutôt qu'à la valeur de la résistance que la couche rajoute en série dans le circuit (négligeable pour une couche de 5 nm). Dans le cas de la couche a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H, le faible effet bloquant pourrait être attribué à la présence de trous dans la couche et expliquer ainsi le comportement similaire à l'électrode d'argent. Cependant ceci n'est pas en accord avec la stabilité de ces substrats décrite précédemment. Nous avons aussi mesuré les propriétés électrochimiques de ces différents substrats après immersion pendant 6h dans des solutions d'acide (0,1M H_2SO_4) et de base (0,1M NaOH). Les cyclovoltamogrammes mesurés ne présentent aucune différence significative. Ceci permet de confirmer la stabilité de ces structures. L'augmentation de la résistivité suggère qu'il y a de l'interdiffusion entre la couche a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H et l'argent lors du dépôt par PECVD.

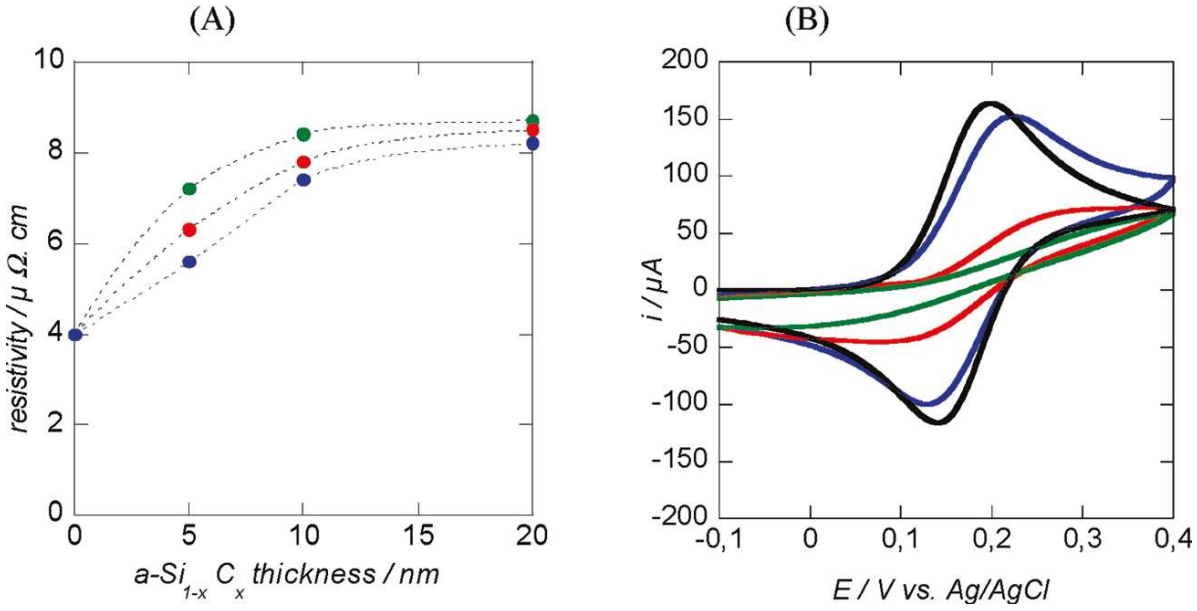
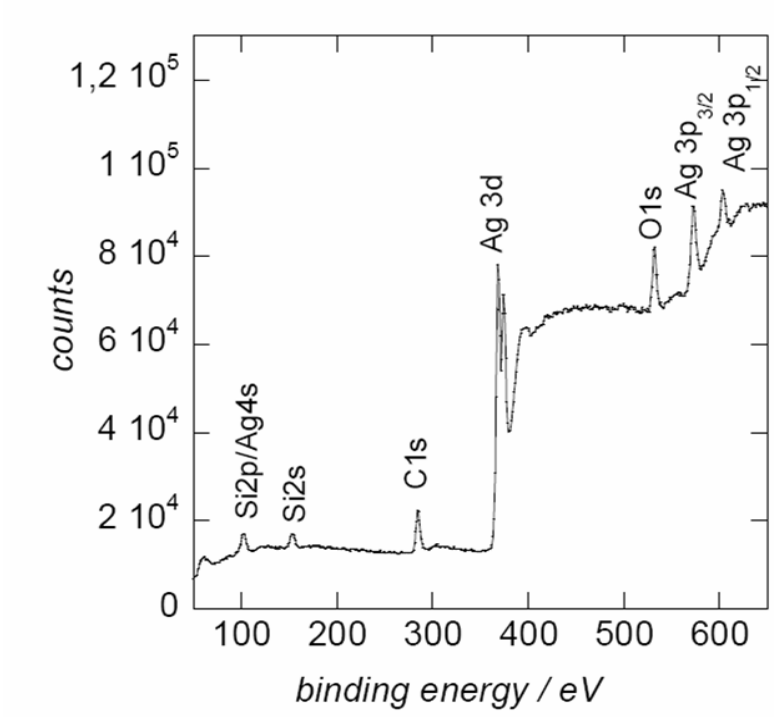


Figure 73 : (A) Mesures de résistivité des substrats en fonction de l'épaisseur de la couche de a-$Si_{1-x}C_x$:H ; (B) les courbes de voltampérométrie cyclique dans une solution aqueuse de $Fe(CN)_6^{4-}$ (10 mM)/PBS (0,1 M) pour un film d'argent de 38 nm déposé sur du verre avec une sous-couche d'adhérence de titane de 5 nm, non revêtu (ligne noire) et revêtu de 5 nm d'a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H (bleu), a-$Si_{0,67}C_{0,33}$:H (rouge) et a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H (vert) ; vitesse de balayage: 0,05 V s^{-1}, Surface de l'électrode=0,07 cm^2.

(2) Caractérisation des surfaces par XPS

Comme l'illustre la figure 74, le spectre XPS d'une couche mince de 5 nm de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H déposé sur argent montre qu'une quantité limitée d'argent est présente près de la surface (le rapport apparent Ag/Si est égal à 0,37 après correction des facteurs de sensibilité atomique, alors qu'une atténuation complète du signal est attendue dans le cas d'une couche de silicium amorphe carboné exempt d'argent en prenant en compte la profondeur d'échappement des photoélectrons). Dans ce contexte, le faible effet bloquant observé dans les mesures électrochimiques peut être attribué à la densité d'états plus importante lorsque le taux de carbone augmente et à l'interdiffusion avec l'argent. Par ailleurs, nous avions constaté figure 69c, que les valeurs de *n''* déterminées pour les structures SPR étaient plus importantes que celles pour des couches déposées directement sur verre, ce qui va dans le sens d'une interdiffusion entre le silicium amorphe carboné et la couche métallique.



.

Figure 74 : Spectre d'analyse XPS après dépôt de 5 nm de la couche de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H sur une couche métallique d'argent.

En conclusion, en dépit de leurs bonnes performances lorsqu'elles sont utilisées dans les capteurs SPR, les couches a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H montrent certaines limites. Les mesures électriques montrent un certain degré d'interdiffusion entre argent et silicium amorphe carboné lors du dépôt. Les mesures électrochimiques suggèrent que la couche pourrait être discontinue. Les

mesures XPS sont compatibles avec la présence de trous comme d'interdiffusion entre l'argent et la couche déposée, sans pouvoir faire la part entre ces deux contributions possibles. Toutefois, la bonne stabilité chimique des couches suggère que les trous dans la couche sont en quantité limitée et que l'effet d'interdiffusion domine.

e) Caractérisation du greffage et de l'immobilisation

(1) Caractérisation par XPS

Afin de greffer des biomolécules, l'hydrosilylation de l'acide undécylénique est faite sur des surfaces hydrogénées de 5 nm de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H. Des mesures d'angle de contact et d'XPS nous ont permis de caractériser les structures avant et après fonctionnalisation.

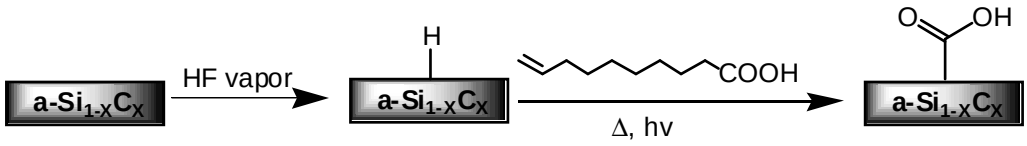


Figure 75 : Hydrogénation en surface d'un film mince de a-$Si_{1-x}C_x$:H et fonctionnalisation subséquente avec l'acide undécylénique.

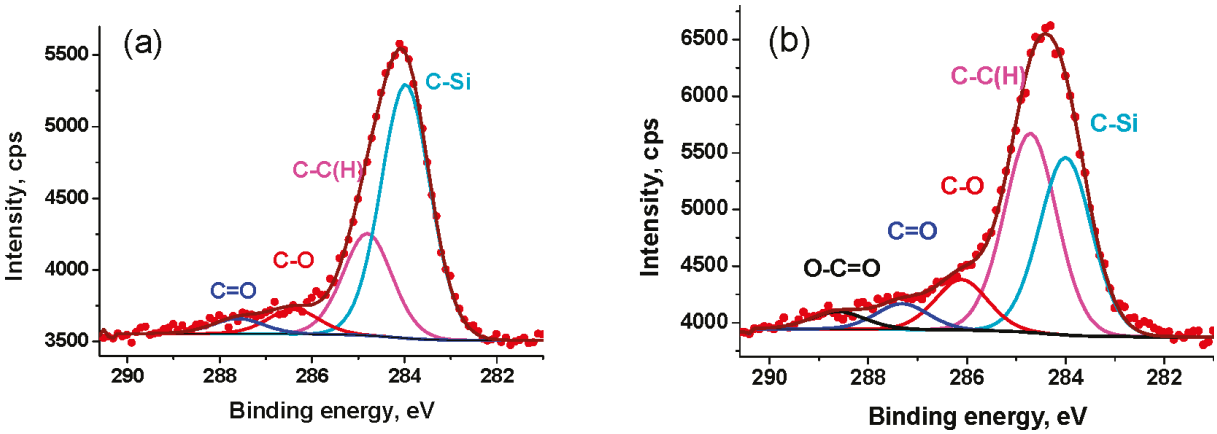


Figure 76 : Spectre XPS haute résolution de C1s d'a-$Si_{0,63}C_{0,37}$ tel que déposé avant (a) et après réaction avec l'acide undécylénique (b).

Le spectre XPS en haute résolution de la bande C 1s est montré sur la figure 76 (a). Cette bande peut être décomposée en 4 composantes. Le pic principal est centré à 283,9 eV (64%), il est caractéristique des liaisons C-Si, tandis que le signal à 284,9 eV (26%) correspond aux liaisons $(CH_2)_n$. Le processus de formation du film de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H utilisant

de fortes concentrations de méthane, on peut penser que le matériau obtenu contient non seulement des groupements Si-CH_3 mais également des groupements $(CH_2)_n$; en d'autres termes, pour ces fortes proportions de carbone, on arriverait à la limite du régime basse puissance lors du dépôt. Les signaux à 286,4 et 287,6 eV correspondant aux structures C-O (4%) et C=O (6%) révèlent la présence d'une contamination organique de la surface due à l'adsorption d'hydrocarbones. Cette contamination peut aussi expliquer (en bonne partie au moins) la présence du pic à 284,9 eV. La présence de tels produits peut s'expliquer par le fait que la surface a été préparée plusieurs jours avant d'être introduite dans la chambre XPS.

Le spectre C1s en haute résolution de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H après greffage de groupements carboxydécyles, montré sur la figure 76b, peut être décomposé en cinq composantes différentes. Le pic principal centré à 284,7 eV (43%) est caractéristique des groupements CH_2 des chaînes alkyles et des structures $(CH_2)_n$, tandis que les autres pics à 284,0 (37%), 286,1 (10%) et 287,3 eV (5%) correspondent aux fonctions C-Si, C-O et C=O. Une bande additionnelle à 288,6 eV caractéristique des liaisons O-C=O est aussi présente. L'attestation de cette contribution et l'augmentation notable de celle à 284,7 eV, maintenant plus importante que celle à 284 eV, sont des signes tangibles de la fonctionnalisation de la surface avec l'acide undécylénique.

Le groupe fonctionnel acide carboxylique est particulièrement utile pour sa réactivité chimique et ses propriétés de mouillage.[46,47] Les substrats SPR fonctionnalisés par un groupement carboxyle permettent un couplage efficace avec des ligands terminés par une amine suivant le principe montré sur la Figure 77.

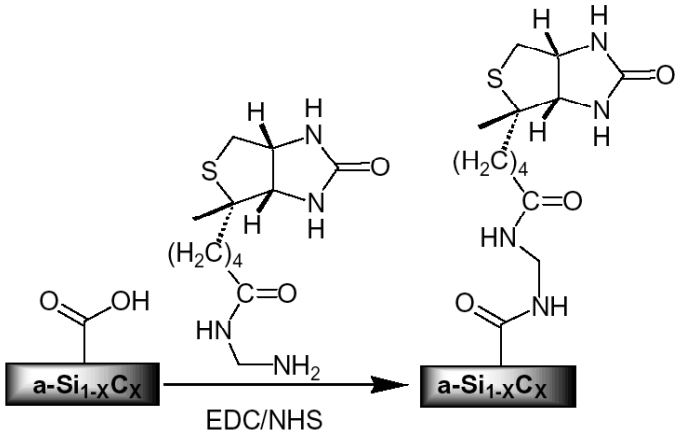


Figure 77 : Représentation schématique du procédé de greffage de la biotine à terminaison NH_2 sur la surface à terminaison acide à l'aide d'un couplage peptidique EDC / NHS.

(2) Caractérisation par IR-ATR

En complément de l'analyse XPS, des mesures IR-ATR ont permis de caractériser les différentes étapes de fonctionnalisation de la couche a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H. La figure 78 (a) montre les spectres infrarouge en polarisations p et s d'une couche mince de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H (20 nm) déposée sur prisme ATR. Le pic intense à 2100 cm^{-1} confirme la présence de nombreuses liaisons Si-H dans la masse du matériau. Les pics à 2890 et 2953 cm^{-1} et entre 1250 et 1500 cm^{-1} suggèrent que le carbone présent dans la couche est essentiellement sous forme CH_3 comme attendu pour un matériau déposé en « régime basse puissance ». Après hydrosilylation de l'acide undécylénique, les modes vibrationnels des liaisons C=O à 1711 cm^{-1} et ceux des CH_2 à 2855 et 2930 cm^{-1} sont clairement visibles sur la figure 78 b. Comme pour l'XPS cette analyse permet de confirmer le greffage de groupements carboxyles à la surface. Par une analyse quantitative, on peut déterminer la densité de molécules acides qui est dans ce cas égale à 2 10^{13} cm^{-2}. Cette valeur est plus faible que celle obtenue dans le cas du silicium cristallin.[36,48]

L'apparition des pics à 1744, 1788 et 1816 cm^{-1} caractéristiques des modes de vibration des liaisons C=O de l'ester de succinimidyle montre que les groupements acides sont ensuite activés en ester de succinimidyle (ester NHS) (figure 78). La quantité d'ester, égale à 1 10^{13} cm^{-2}, a été déterminée aussi de manière quantitative. Nous avons montré que l'activation se faisait plus rapidement par la voie anhydride (chapitre 1, figure 12). Pour de telles couches de silicium amorphe carboné, la formation de l'anhydride est plus difficile du fait de la présence des groupements CH_3, qui éloigne les chaînes acides greffées les unes des autres comme lors des expériences représentées figure 24. Le rendement n'est donc pas optimal pour de telles interfaces (~50%). L'amidation des sites esters par la molécule N-(-2-aminoéthyl) biotine permet l'accrochage covalent de la biotine à la surface, caractérisé par la présence des pics à 1650 et 1550 cm^{-1}.

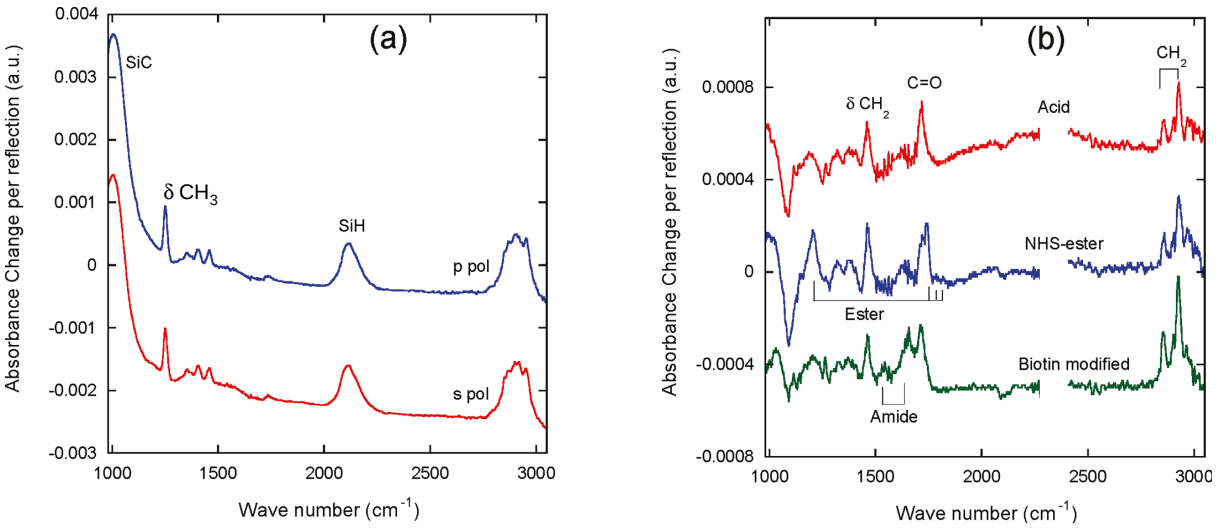


Figure 78 : (A) Spectres ATR-FTIR d'un film de a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H 20 nm déposé sur un prisme de silicium, enregistré avec des polarisations p (bleu) et s (rouge), le spectre de référence étant la surface du prisme nu hydrogéné; (B) Spectres ATR-FTIR du même film de a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H modifié avec l'acide undécylénique (rouge), réaction avec EDC/NHS (bleu), et amidation avec la N-(2-aminoéthyl)biotine (vert).

f) Mesure par SPR de l'interaction biotine-streptavidine

Les systèmes avidine-biotine ont souvent été utilisés comme systèmes d'assemblage par affinité pour le développement de biocapteurs.[49] De tels systèmes peuvent être facilement utilisés ici en couplant un groupement biotine situé en position terminale sur un groupement amino-alkyle (biotine-NH_2).

D'après les courbes de réflectivité (Figure 79a), la liaison de la biotine modifiée NH_2 à la surface résulte en un changement d'angle de la résonance de plasmons de surface de 0,12° que l'on sait modéliser par une variation d'épaisseur équivalente de 3,1nm, ce qui est cohérent avec la dimension moléculaire de la biotine non modifiée (0,52 nm x 1,00 nm x 2,10 nm). La reconnaissance moléculaire biotine-streptavidine (5,4 nm x 5,8 nm x 4,8 nm)[50,51] est suivie par SPR et la cinétique de la réaction de couplage est montrée sur la Figure 79b. Comme attendu, une forte hausse (changement d'angle de 0,25°) est observée pour les interfaces modifiées par la biotine tandis que seulement une petite augmentation a été observée pour celles non modifiées. Le changement d'angle de 0,25° correspond à l'épaisseur de la couche de streptavidine d'environ 6,3 nm ou 2,5 ng/mm^2.[52] En répétant l'expérience pour diverses concentrations une limite de détection 6 ng/mL a été déterminée.

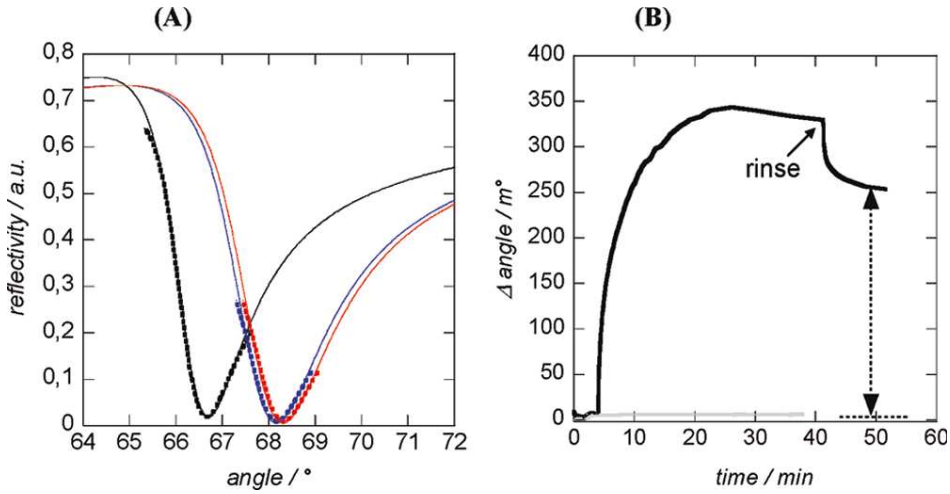


Figure 79 : (A) Courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence de substrats en argent (noir) revêtus avec 5 nm d'a-$Si_{0,63}C_{0,37}$ à terminaison acide (bleu) et modifiés avec la biotine (rouge) dans du PBS. Valeurs obtenues expérimentalement (courbes en pointillés) comparées aux courbes de RPS théoriques (courbes en trait plein) calculées grâce à WinSpall 2.0, (B) Cinétique associée à l'interaction de l'avidine (10 µg/mL) avec une surface Ag/a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H modifiée par la biotine (noir), et avec une surface Ag/a-$Si_{0,63}C_{0,37}$ non modifiée (gris).

C. Fluorescence couplée au plasmon de surface : Applications aux puces à ADN

1. Contrôle de la chimie de surface

En vue d'étudier l'interaction entre brins d'ADN, nous avons optimisé la structure pour bénéficier de la sensibilité requise et d'une chimie de surface bien contrôlée. Les couches minces a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H ne sont parfaitement homogènes ni au plan macroscopique (figure 45), ni au plan microscopique (voir B.3.d). Pour combiner les avantages d'une couche de faible indice (favorable pour la détection SPR) et d'une couche homogène et performante pour l'immobilisation des sondes, des structures multicouches (37% et 20%) ont été étudiées puis caractérisées par SPR. La figure 80a montre les courbes de réflectivité pour différentes structures (Ag ; 5nm a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H/Ag ; 2 nm a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H/3 nm a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H/Ag ; 3 nm a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H/3 nm a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H/Ag). On note que les courbes de réflectivité pour les structures avec les couches minces sont semblables, seul l'angle de résonance varie. Au vu de ces résultats, nous privilégierons la structure 3 nm a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H/3 nm a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H/Ag (figure 80 B), qui nous permet de pouvoir bien contrôler le plasma (9 s de temps de dépôt).

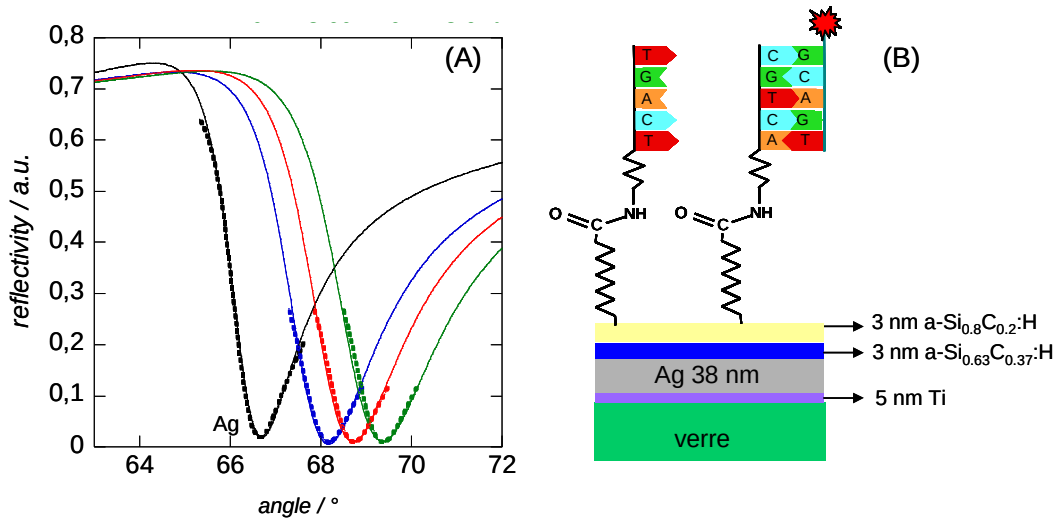


Figure 80 : (A) Courbes de réflectivité pour différentes structures : Ag (noir); 5nm a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H / Ag (bleu); 2 nm a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H / 3 nm a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H / Ag (rouge); 3 nm a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H / 3 nm a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H / Ag (vert). (B) Représentation schématique du capteur choisi pour la suite de l'étude.

2. Calcul théorique de la réflectivité et du gain en fluorescence

Afin de bénéficier de la sensibilité nécessaire pour mesurer des constantes d'interaction de la réaction d'hybridation entre brins d'ADN, nous avons exploité l'exaltation de la fluorescence couplée au plasmon de surface, technique couramment appelée SPFS (Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy).[7] De nombreuses recherches ont montré que les capteurs SPFS étaient bien plus sensibles que les capteurs SPR. Knoll a montré qu'il était possible d'atteindre une limite de détection de 500 attomolaires par SPFS.[53] Nous avons d'abord modélisé l'intensité du champ électromagnétique pour la structure décrite figure 80 pour un capteur à base d'or (50 nm) ou d'argent (38 nm). La figure 81 montre les courbes de réflectivité et le facteur d'augmentation de la fluorescence identifié au carré du champ excitateur pour les capteurs à base d'argent (vert) et or (bleu). Comme pour des capteurs sans silicium amorphe, le facteur d'exaltation calculé pour des couches minces déposées sur argent est 3,5 fois plus important que pour des couches déposées sur or (voir figure 65). On note aussi que pour ces structures le signal plasmon est de meilleure qualité sur argent que sur or. Ainsi avons-nous décidé de faire les mesures SPFS essentiellement sur des substrats d'argent.

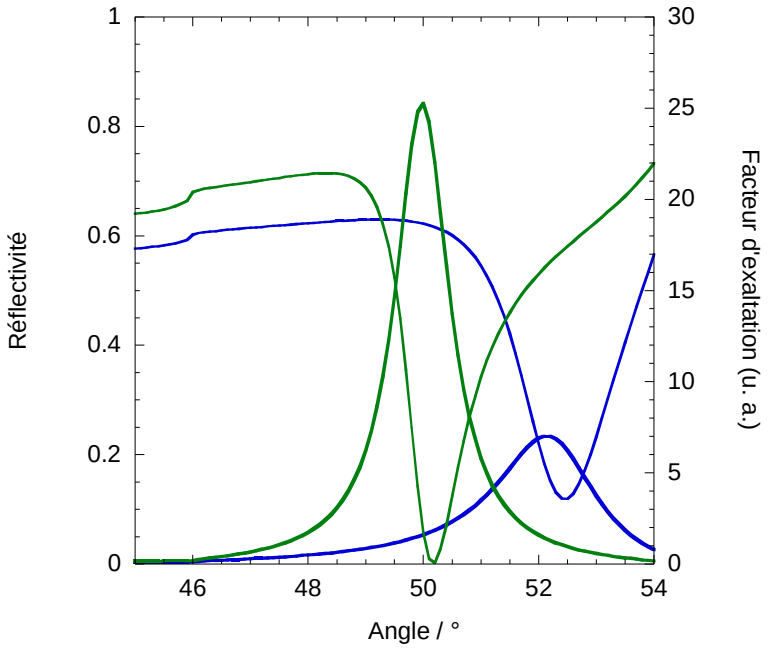


Figure 81 : Courbes théoriques de la réflectivité et de l'intensité du carré du champ dans l'eau pour 2 capteurs, 3 nm a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H / 3 nm a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H / Ag (vert) et 3 nm a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H / 3 nm a-$Si_{0.63}C_{0.37}$:H / Au (bleu).

3. Modes opératoires

a) Immobilisation des sondes

En partant de surfaces activées, la sonde G-ON (non marquée 25-mer [5' $(CH_2)_6$-NH_2-AAC-GCC-CAT-CTT-AAA-ATC-GAC-GCC-T 3']) est diluée à 5 µM ou 500 nM dans 150 mM d'un tampon phosphate contenant 0,01% de SDS à pH 8,5. L'immobilisation se fait ensuite entre lame et lamelle en déposant 20 µL par cm^{-2} pendant 14-16 h. Après dépôt, les sites activés non amidés sont bloqués avec de l'éthanolamine (5 10^{-2} M, pendant 15 min), puis dans de l'eau ultrapure (Millipore) et les lames sont séchées sous un flux d'azote.

b) Hybridation

La surface est alors exposée successivement à des solutions de concentration de 5 nM à 500 nM contenant l'oligonucléotide Cy5-$\overline{ON}$, complémentaire des sondes, G-ON (5'Cy5 [AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T 3']) à température ambiante pendant 20 minutes dans un tampon 150 mM de phosphate. De la même manière, des cibles contenant des mésappariements ont été utilisées, une séquence avec un seul mésappariement 5'Cy5 [AGG-CGT-CGA-TTT-AAA-GAT-GGG-CGT-T 3'] nommée Cy5-$\overline{ON}$' et une séquence en contenant 4, 5'Cy5 [AGG-CGT-GCA-TTT-TAA-GTA-GGG-CGT-T 3'] nommée Cy5-$\overline{ON}$''.

c) Mesure de la fluorescence

Les mesures de réflectivité et de fluorescence sont réalisées à l'aide du montage ci-dessous. Afin de mesurer une constante d'affinité K_d, nous avons mesuré des cinétiques d'hybridation en temps réel que nous avons pu analyser selon le modèle de l'isotherme de Langmuir.[54-56]

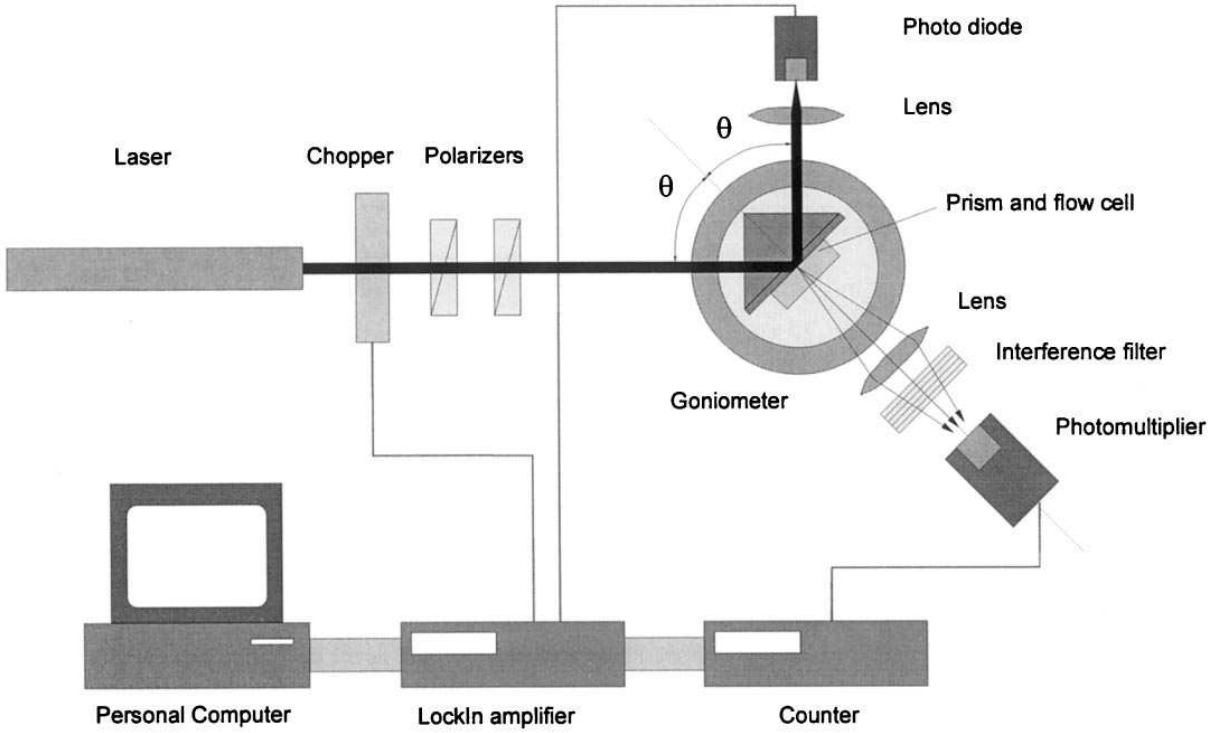


Figure 82 : Représentation schématique du montage expérimental permettant la mesure simultanée de la réflectivité en configuration Kretschmann grâce à la photodiode et de la fluorescence via le photomultiplicateur.[7]

4. Détermination de constantes de dissociation

a) Isotherme de Langmuir

Dans le cadre de cette étude, nous avons analysé nos données d'après l'isotherme de langmuir, largement adoptée pour de telles études.[57-61] On suppose l'adsorption d'espèces neutres sur une surface présentant une quantité finie de site d'adsorption pouvant recevoir chacun une seule espèce. Si on considère une concentration N_c d'ADN cible C, une concentration superficielle N_s d'ADN sonde S, et une concentration superficielle N_h d'ADN double brin H, nous avons :

$$\frac{\partial N_h}{\partial t} = k_{on} N_c (N_s - N_h) - k_{off} N_h \qquad (19)$$

avec k_{on} et k_{off} les constantes d'association et de dissociation de la réaction

$$C + S \underset{koff}{\overset{kon}{\rightleftharpoons}} H \qquad (20)$$

A l'équilibre thermodynamique $\frac{\partial N_h}{\partial t} = 0$, atteint après un temps de l'ordre de $1/(k_{on}N_C + k_{off})$, nous obtenons l'isotherme de Langmuir :

$$\frac{N_h}{N_s} = \frac{K_a N_c}{1 + K_a N_c} \tag{20}$$

où K_a est la constante d'affinité et est égale à k_{on}/k_{off}. On peut aussi inverser l'expression ci-dessus et, plutôt qu'une constante d'équilibre d'association (K_a), obtenir une constante de dissociation (K_d) qui a l'avantage de s'exprimer en (mol L^{-1}). Cette constante est souvent utilisée pour exprimer l'affinité d'un ligand pour son récepteur, indication importante pour l'emploi thérapeutique des agonistes et antagonistes : un faible K_d se traduit par une forte affinité du récepteur pour son ligand, ce qui signifie également qu'une très faible concentration du ligand (agoniste ou antagoniste) sera efficace.

b) Etude de l'hybridation par SPFS

(1) surface 100% acide

A partir de surfaces 100% acides, nous avons immobilisé les sondes G-ON à partir d'une solution concentrée à 5 µM et mesuré l'intensité de la fluorescence au cours du temps pour des hybridations successives dans des solutions de cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$ de différentes concentrations (5, 25, 50, 100 et 250 nM), sans lavages intermédiaires (figure 83 a). A l'équilibre, nous avons à chaque fois mesuré le signal de réflectivité et de fluorescence (figure 83b). On peut se rendre compte ici de la différence de sensibilité entre le SPR et le SPFS. En effet la différence entre les courbes de fluorescence est bien plus appréciable que celle observée pour les courbes de réflectivité.

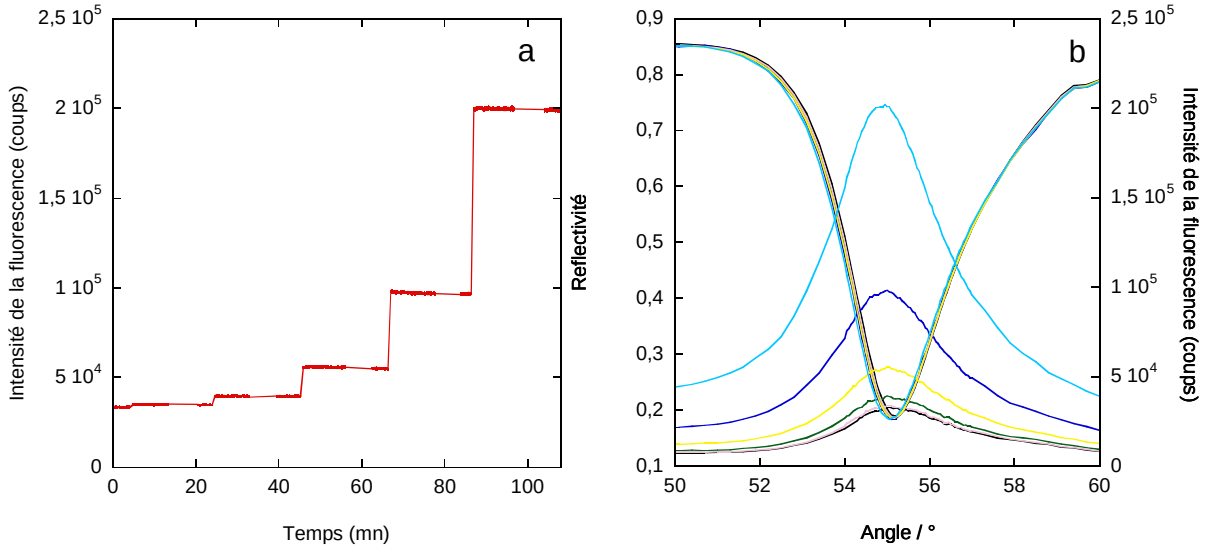


Figure 83 : (a) Cinétique d'hybridation mesurée par fluorescence pour les sondes G-ON (5 µM) hybridées successivement avec les cibles Cy5-$\widetilde{\text{ON}}$ (5 , 25, 50, 100 et 250 nM) ; (b) courbes de réflectivité et de fluorescence pour chaque étape de l'hybridation: PBS (noir), 5 nM (rose), 25 nM (vert), 50 nM (jaune), 100 nM (bleu) et 250 nM (cyan).

Sur la figure 83, on note que l'équilibre est atteint très rapidement pour chaque hybridation. La figure 84 (courbe rouge) montre la variation du signal de fluorescence (cinétique d'hybridation) mesurée dans une solution de cibles concentrée à 5 nM. Le régime transitoire est difficilement résolu, et après 30 secondes le palier est atteint. Ce temps correspond à la durée nécessaire pour remplacer la solution tampon par la solution contenant les brins complémentaires, ce qui signifie que dans ces conditions l'hybridation est quasi-instantanée. Pour une concentration en sondes plus faible obtenue en immobilisant les sondes à partir d'une solution concentrée à 500 nM, la cinétique est ralentie et l'on retrouve un comportement proche de celui observé au chapitre 2 figure 57 (quasi premier ordre). De façon surprenante, l'intensité de fluorescence pendant l'hybridation est plus faible lorsque les sondes ont été immobilisées à partir d'une solution à 5 µM plutôt qu'à 500 nM. Cela suggère que dans le premier cas, seule une partie des sondes est hybridée et qu'ensuite les gênes stériques limitent la réaction, alors que dans le second cas le rendement d'hybridation est bien plus élevé. Par conséquent, nous avons par la suite décidé d'immobiliser les sondes à partir de solutions concentrées à 500 nM.

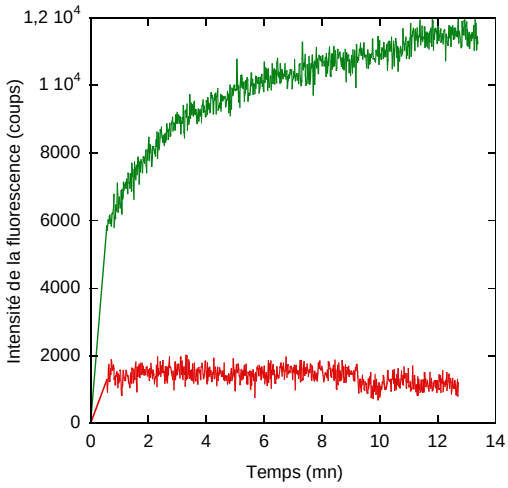


Figure 84 : Cinétique d'hybridation des sondes G-ON 5 µM (rouge) et 500 nM (vert) avec les cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$ 5 nM.

L'immobilisation des sondes sur une surface 100% acide à partir d'une solution concentrée à 500 nM permet de suivre les hybridations successives avec une sensibilité environ 4 fois plus importante que lorsque les sondes étaient immobilisées à partir de solutions concentrées à 5 µM, comme le montre la comparaison des figures 83 et 85. En effet pour une hybridation à 250 nM sur une surface avec des sondes immobilisées à 5 µM, le signal est égal à 2. 10^5 coups par seconde alors qu'il est égal à 9. 10^5 coups par seconde pour une surface avec des sondes immobilisées à 500 nM.

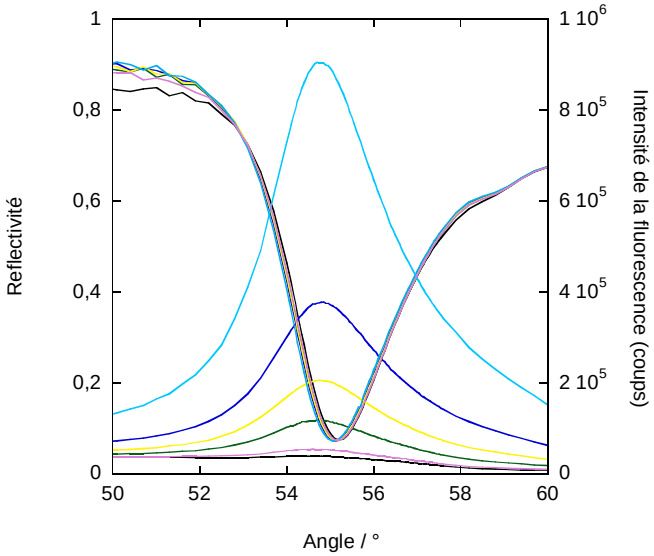


Figure 85 : Courbes de réflectivité et de fluorescence pour une surface avec les G-ON (500 nM) hybridées successivement avec les cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$: 5 nM (rose), 25 nM (vert), 50 nM (jaune), 100 nM (bleu) et 250 nM (cyan).

Comme au chapitre 2, nous avons optimisé les substrats en préparant des surfaces acides diluées dans le décène pour favoriser l'hybridation. La figure 86 montre les différentes cinétiques d'hybridation dans des solutions de cibles concentrées à 5 nM pour des surfaces acides 100%, 33%, 25% et 15%, activées et amidées avec des sondes concentrées à 500 nM. Alors que pour les trois premières surfaces, les hybridations suivent des cinétiques du premier ordre, l'hybridation des sondes immobilisées sur la 15% est instantanée, comme si tous les sites activés avaient été amidés et qu'ensuite tous les sites accessibles soient facilement hybridés. Comme sur la figure 84, le signal ne suit pas une cinétique de premier ordre, mais de façon remarquable l'intensité de la fluorescence obtenue à partir d'une surface acide 15% (cinétique instantanée) est significativement supérieure à celles obtenues à partir de surfaces acides plus concentrées (cinétique de premier ordre). L'effet observé ici est beaucoup plus net que celui observé au chapitre 2 pour des sondes immobilisées à partir de solutions concentrées à 5 µM (figure 60). Ceci suggère que dans le cas des surfaces préparées à partir de couches acides à 15 %, l'accessibilité des sondes à l'hybridation est meilleure.

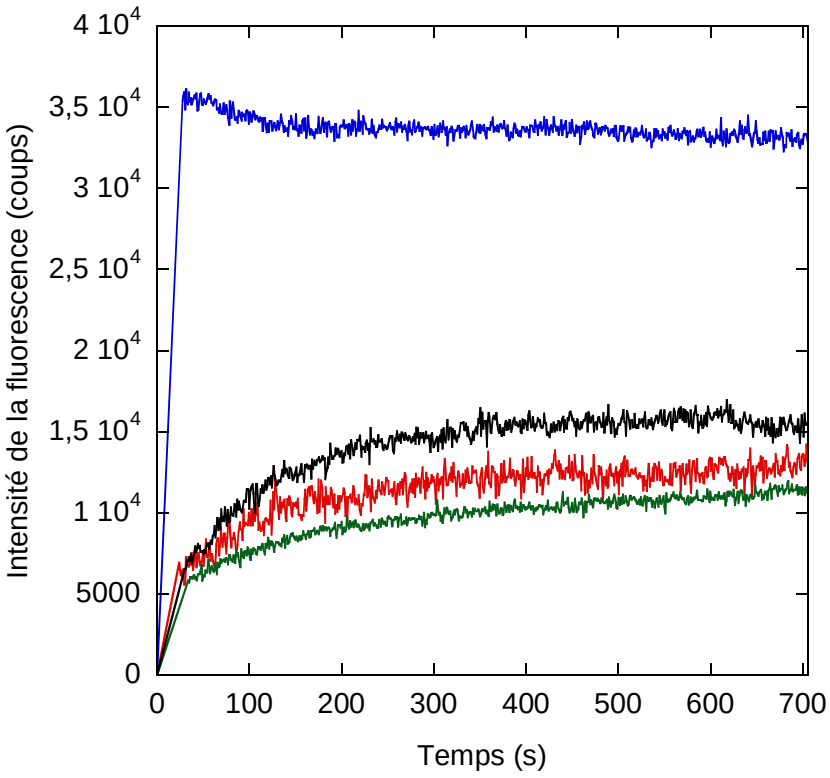


Figure 86 : Cinétique d'hybridation des sondes G-ON 500 nM avec les cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$ 5 nM pour différentes surfaces : 100% acide (vert) ; 33% (rouge) ; 25% (noir) et 15% (bleu).

Nous avons donc réalisé pour le capteur à base d'une couche acide 15% différentes hybridations successives (pour des cibles concentrées de 5 nM à 500 nM). La figure 87 montre les valeurs de fluorescence obtenues à l'équilibre ainsi que la courbe d'ajustement à une isotherme de Langmuir permettant de déterminer la constante d'association. Dans le cas de cette surface la constante K_d est égale à 1,8 10^{-6} mol/L. Cette valeur est plus importante que celle observée dans la littérature, ce qui pourrait être lié à la valeur élevée de la densité des sondes sur nos surfaces.[61] Les valeurs de K_d déterminées d'après nos mesures souffrent toutefois de ne couvrir que la partie de la courbe de Langmuir correspondant aux basses concentrations. Elles gagneraient en fiabilité en répétant les expériences dans une gamme de concentrations des cibles supérieures à K_d.

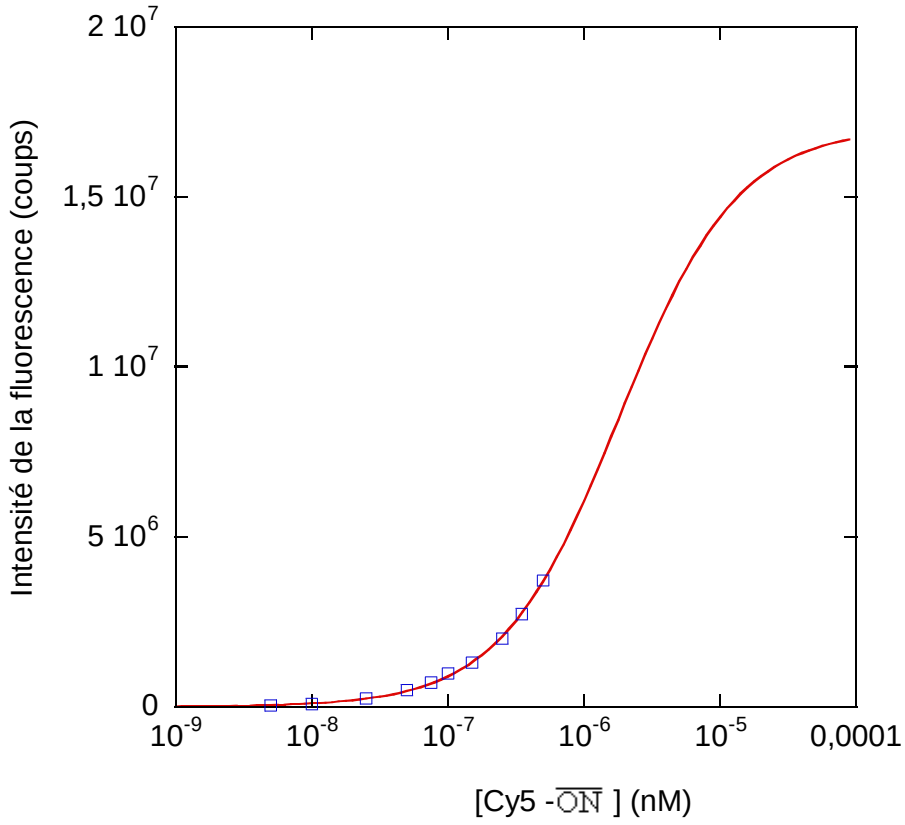


Figure 87 : Intensité de fluorescence maximale atteinte à l'équilibre en fonction de la concentration des cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$ (bleu) et courbe d'ajustement (rouge).

Nous avons ensuite utilisé ces capteurs pour identifier la présence de mésappariements sur les sondes complémentaires. La figure 88 montre les cinétiques d'hybridation des séquences Cy5-$\overline{\text{ON}}$, Cy5-$\overline{\text{ON}}$', Cy5-$\overline{\text{ON}}$'' à 5 nM avec les sondes G-ON (500 nM). On

note que les cinétiques ont la même allure mais la fluorescence dépend du nombre de mésappariements. En effet pour des brins complémentaires la fluorescence est égale à 34000 coups par seconde contre 24000 pour un mésappariement et 10500 pour 4 mésappariements.

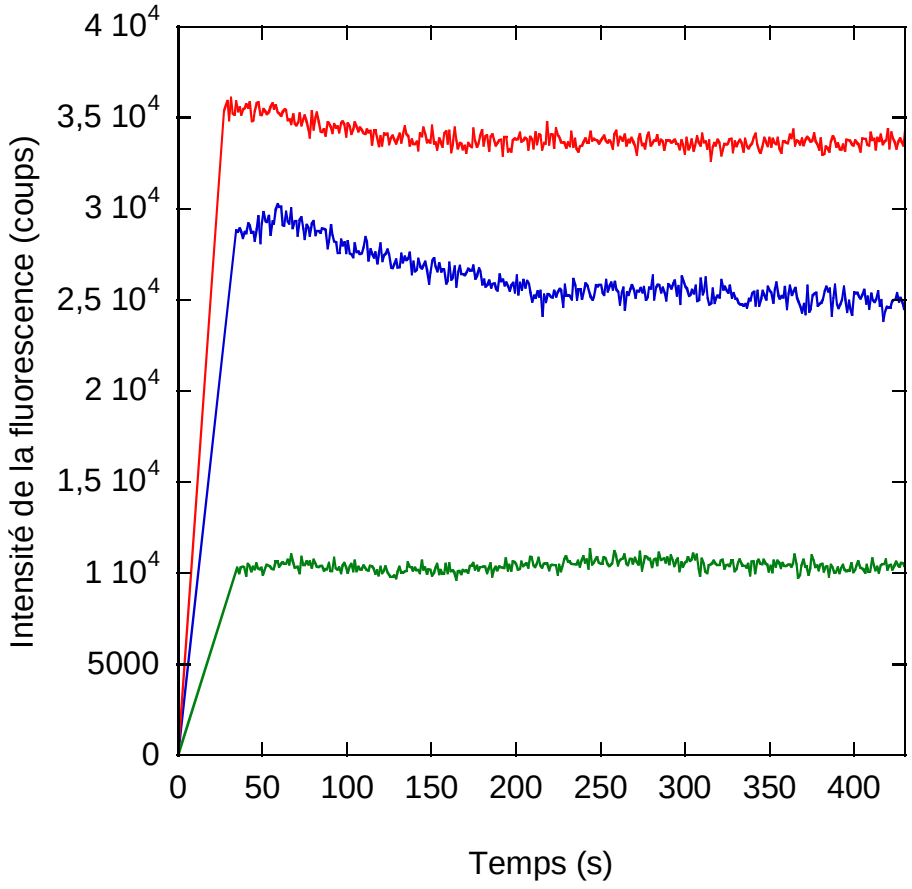


Figure 88 : Cinétiques d'hybridation des sondes G-ON 500 nM (vert) avec les cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$ (rouge) ; Cy5-$\overline{\text{ON}}$' (bleu) ; Cy5-$\overline{\text{ON}}$'' (vert) à 5 nM.

Nous pouvons déterminer les constantes de dissociation pour les différentes cibles contenant ou non des mésappariements par des hybridations successives (à des concentrations de cibles croissantes à 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 350 et 500 nM). La figure 89 montre les isothermes pour les différentes cibles. Les constantes de dissociation déterminées par ajustement des valeurs obtenues à l'isotherme de Langmuir sont rassemblées dans le tableau 5. Comme attendu, les constantes de dissociation sont plus grandes lorsqu'il y a des mésappariements (plus il y a de mésappariements dans les séquences, plus il faut augmenter la concentration des cibles pour « forcer » l'appariement). Cependant la valeur théorique de la fluorescence determinée au palier est aussi plus importante, ce qui n'est pas intuitif (si on

force l'hybridation, on s'attend à trouver un niveau de fluorescence équivalent dans la mesure où les sondes sont immobilisées avec la même concentration superficielle). Dans le cas présent, les valeurs du plateau de fluorescence obtenues à partir des ajustements paraissent même aberrantes, car on voit mal pourquoi le niveau de fluorescence atteint en hybridation de séquences présentant des mésappariements serait plus élevé que lorsque la correspondance est parfaite. Il s'agit sans aucun doute ici d'imprécision de la procédure liée au fait qu'on ne dépose que des valeurs aux faibles concentrations.

Pour obtenir des valeurs réalistes, il faut donc ajuster les courbes en imposant le même niveau de fluorescence final. Si on ajuste les trois courbes en même temps, on trouve un niveau de fluorescence final égal à $2\ 10^7$ coups. On ajuste alors les isothermes indépendamment les unes des autres en imposant pour la valeur palier le même niveau de fluorescence à $2\ 10^7$ coups. Comme avec l'ajustement sur la figure 89, on trouve des constantes de dissociation plus élevées lorsqu'il y a des mésappariements (Tableau 6). La différence dans les constantes de dissociation est plus faible que lors de l'ajustement précédent mais sans doute plus réaliste aussi. Ces valeurs permettent tout de même de différencier les brins complémentaires des brins contenant des mésappariements.

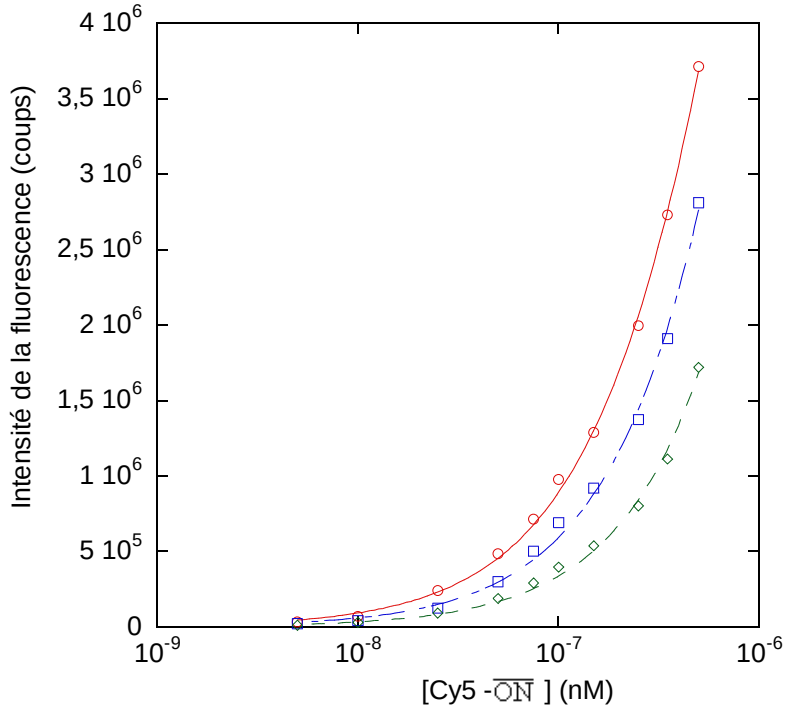


Figure 89 : Intensité de fluorescence maximale atteinte à l'équilibre en fonction de la concentration des cibles avec leur courbe d'ajustement Cy5-$\overline{\text{ON}}$ (rouge), Cy5-$\overline{\text{ON}}$' (bleu) ; Cy5-$\overline{\text{ON}}$'' (vert).

	Cy5-$\overline{\text{ON}}$	Cy5-$\overline{\text{ON}}$ ’	Cy5-$\overline{\text{ON}}$ ’’
K_d (mol/L)	$1{,}8\ 10^{-6}$	$3{,}4\ 10^{-6}$	$1{,}5\ 10^{-4}$
Fluorescence au palier (coups)	$1{,}7\ 10^{7}$	$3{,}3\ 10^{7}$	$5{,}1\ 10^{8}$

Tableau 5 : Valeur de la constante de dissociation et de la fluorescence théorique au palier de l’isotherme pour les différentes cibles (ajustement libre).

	Cy5-$\overline{\text{ON}}$	Cy5-$\overline{\text{ON}}$ ’	Cy5-$\overline{\text{ON}}$ ’’
K_d (mol/L)	*$2{,}2\ 10^{-6}$*	*$3{,}2\ 10^{-6}$*	*$5{,}6\ 10^{-6}$*

Tableau 6 : Valeur de la constante de dissociation pour les différentes cibles (ajustement avec contrainte d’une même valeur au plateau) obtenue en fixant à la même valeur (2. 10^7 coups) la valeur de fluorescence au palier de la courbe de Langmuir.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré comment les alliages silicium-carbone amorphes, déposés en couche mince, permettent d'augmenter la sensibilité des capteurs SPR de façon significative en fonction de l'indice de la couche. En effet, un capteur 5 nm a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H /Ag est 2,8 fois plus sensible qu'un capteur SPR à base d'or et 2 fois plus sensible qu'un capteur à base d'argent seul. Une étude de stabilité chimique a montré qu'il était possible d'utiliser ces substrats pour des applications biologiques. Même si nous suspectons la présence d'interdiffusion entre la couche métallique et la couche de silicium amorphe, nous avons pu démontrer, par XPS et infrarouge, que l'on peut greffer sur la couche amorphe de façon covalente des monocouches acides, qui peuvent ensuite être activées et amidées pour l'étude d'interactions biologiques comme entre la biotine et la streptavidine.

Une étude par fluorescence nous a permis d'optimiser la sensibilité en nous intéressant à l'homogénéité de la chimie de surface et à la densité des sondes. Ainsi nous avons montré qu'un substrat d'argent recouvert d'une double couche d'alliages silicium-carbone amorphes Ag/a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H/a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H fonctionnalisée avec un mélange (15% acide / 85% décène) permet d'augmenter la sensibilité d'un facteur 3.5. Ces substrats, en plus d'être très sensibles, sont suffisament sélectifs pour différencier aisément des cibles complémentaires de cibles contenant un mésappariement.

Il serait cependant intéressant de procéder à des études de cinétique d'hybridation par SPFS en faisant varier la densité de sondes sur une surface 15% acide, ainsi que la concentration superficielle des molécules cibles. Des mesures de fluorescence couplées à des mesures infrarouge sur silicium amorphe permettraient de mieux comprendre les cinétiques mesurées et les comportements observés.

Bibliographie

(1) *Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology*; Förch, R.; Schönherr, H.; Jenkins, A. T. A., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2009.

(2) *Surface Plasmon Resonance Based Biosensors*; Homola, J., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2006.

(3) *Surface Plasmons on smooth and Rough Surfaces and on Gratings*; Raether, H., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1988.

(4) Fort, E.; Gresillon, S. *Journal of Physics D-Applied Physics* **2008**, *41*, 3001-3031.

(5) Knoll, W. *Annual Review of Physical Chemistry* **1998**, *49*, 569-638.

(6) Lecaruyer, P.; Canva, M.; Rolland, J. *Applied Optics* **2007**, *46*, 2361-2369.

(7) Liebermann, T.; Knoll, W. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *171*, 115-130.

(8) Damos, F. S.; Luz, R. C. S.; Kubota, L. T. *Langmuir* **2005**, *21*, 602-609.

(9) Smith, E. A.; Thomas, W. D.; Kiessling, L. L.; Corn, R. M. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 6140-6148.

(10) Smith, E. A.; Wanat, M. J.; Cheng, Y. F.; Barreira, S. V. P.; Frutos, A. G.; Corn, R. M. *Langmuir* **2001**, *17*, 2502-2507.

(11) Ulman, A. *Academic Press: Boston, MA*, **1991**.

(12) Guedon, P.; Livache, T.; Martin, F.; Lesbre, F.; Roget, A.; Bidan, G.; Levy, Y. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 6003-6009.

(13) Szunerits, S.; Knorr, N.; Calemczuk, R.; Livache, T. *Langmuir* **2004**, *20*, 9236-9241.

(14) Thiel, A. J.; Frutos, A. G.; Jordan, C. E.; Corn, R. M.; Smith, L. M. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 4948-4956.

(15) Phillips, K. S.; Han, J. H.; Martinez, M.; Wang, Z. Z.; Carter, D.; Cheng, Q. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 596-603.

(16) Reimhult, E.; Zach, M.; Hook, F.; Kasemo, B. *Langmuir* **2006**, *22*, 3313-3319.

(17) Szunerits, S.; Boukherroub, R. *Langmuir* **2006**, *22*, 1660-1663.

(18) Szunerits, S.; Coffinier, Y.; Janel, S.; Boukherroub, R. *Langmuir* **2006**, *22*, 10716-10722.

(19) Tawa, K.; Morigaki, K. *Biophysical Journal* **2005**, *89*, 2750-2758.

(20) Franzen, S. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 6027-6032.

(21) Rhodes, C.; Franzen, S.; Maria, J. P.; Losego, M.; Leonard, D. N.; Laughlin, B.; Duscher, G.; Weibel, S. *Journal of Applied Physics* **2006**, *100*.

(22) Chah, S.; Hutter, E.; Roy, D.; Fendler, J. H.; Yi, J. *Chemical Physics* **2001**, *272*, 127-136.

(23) Szunerits, S.; Castel, X.; Boukherroub, R. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 15813-15817.

(24) Yuan, X. C.; Hong, B.; Tan, Y. G.; Zhang, D. W.; Irawan, R.; Tjin, S. C. *Journal of Optics a-Pure and Applied Optics* **2006**, *8*, 959-963.

(25) Dubois, L. H.; Nuzzo, R. G. *Annual Review of Physical Chemistry* **1992**, *43*, 437-463.

(26) Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 1990-1995.

(27) Zynio, S. A.; Samoylov, A. V.; Surovtseva, E. R.; Mirsky, V. M.; Shirshov, Y. M. *Sensors* **2002**, *2*, 62-70.

(28) Manesse, M.; Sanjines, R.; Stambouli, V.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *Electrochemistry Communications* **2008**, *10*, 1041-1043.

(29) Manesse, M.; Sanjines, R.; Stambouli, V.; Jorel, C.; Pelissier, B.; Pisarek, M.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *Langmuir* **2009**, *25*, 8036-8041.

(30) Szunerits, S.; Castel, X.; Boukherroub, R. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 10883-10888.

(31) Lockett, M. R.; Smith, L. M. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 6429-6437.

(32) Lockett, M. R.; Weibel, S. C.; Phillips, M. F.; Shortreed, M. R.; Sun, B.; Corn, R. M.; Hamers, R. J.; Cerrina, F.; Smith, L. M. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 8611-8613.

(33) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Sénémaud, C.; Khodja, M. D. *Physical Review B* **1988**, *38*, 13263-13270.

(34) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Tran-Quoc, H. *Physical Review B* **1988**, *38*, 9895-9901.

(35) Boukherroub, R. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2005**, *9*, 66-72.

(36) Faucheux, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N. *Langmuir* **2006**, *22*, 153-162.

(37) Linford, M. R.; Fenter, P.; Eisenberger, P. M.; Chidsey, C. E. D. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 3145-3155.

(38) Rosso, M.; Arafat, A.; Schroen, K.; Giesbers, M.; Roper, C. S.; Maboudian, R.; Zuilhof, H. *Langmuir* **2008**, *24*, 4007-4012.

(39) Voicu, R.; Boukherroub, R.; Bartzoka, V.; Ward, T.; Wojtyk, J. T. C.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **2004**, *20*, 11713-11720.

(40) Strother, T.; Cai, W.; Zhao, X. S.; Hamers, R. J.; Smith, L. M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 1205-1209.

(41) Kooyman, R. P. H.; Lenferink, A. T. M.; Eenink, R. G.; Greve, J. *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 83-85.

(42) Wink, T.; van Zuilen, S. J.; Bult, A.; van Bennekom, W. P. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 827-832.

(43) Solomon, I. *Philosophical Magazine B-Physics of Condensed Matter Statistical Mechanics Electronic Optical and Magnetic Properties* **1997**, *76*, 273-280.

(44) Sherry, L. J.; Chang, S. H.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P.; Wiley, B. J.; Xia, Y. N. *Nano Letters* **2005**, *5*, 2034-2038.

(45) Mayadas, A. F.; Shatzkes, M. *Physical Review B* **1970**, *1*, 1382-1389.

(46) Blankespoor, R.; Limoges, B.; Schollhorn, B.; Syssa-Magale, J. L.; Yazidi, D. *Langmuir* **2005**, *21*, 3362-3375.

(47) Moraillon, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 7158-7167.

(48) Boukherroub, R.; Morin, S.; Bensebaa, F.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **1999**, *15*, 3831-3835.

(49) Wayment, J. R.; Harris, J. M. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 336-342.

(50) Hendrickson, W. A.; Pahler, A.; Smith, J. L.; Satow, Y.; Merritt, E. A.; Phizackerley, R. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, 2190-2194.

(51) Weber, P. C.; Ohlendorf, D. H.; Wendoloski, J. J.; Salemme, F. R. *Science* **1989**, *243*, 85-88.

(52) Knoll, W.; Zizlsperger, M.; Liebermann, T.; Arnold, S.; Badia, A.; Liley, M.; Piscevic, D.; Schmitt, F. J.; Spinke, J. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *161*, 115-137.

(53) Yu, F.; Persson, B.; Lofas, S.; Knoll, W. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8902-8903.

(54) Nelson, B. P.; Grimsrud, T. E.; Liles, M. R.; Goodman, R. M.; Corn, R. M. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 1-7.

(55) Okahata, Y.; Kawase, M.; Niikura, K.; Ohtake, F.; Furusawa, H.; Ebara, Y. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 1288-1296.

(56) Yu, F.; Yao, D. F.; Knoll, W. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*.

(57) Dostalek, J.; Knoll, W. *Biointerphases* **2008**, *3*, FD12-FD22.

(58) Stengel, G.; Knoll, W. *Nucleic Acids Research* **2005**, *33*.

(59) Williams, T. L.; Jenkins, A. T. A. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 6438-6443.

(60) Williams, T. L.; Vareiro, M.; Jenkins, A. T. A. *Langmuir* **2006**, *22*, 6473-6476.

(61) Yu, Y. M.; Feng, C. L.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Knoll, W. *Langmuir* **2009**, *25*, 13680-13684.

Chapitre 4 : Biocapteurs à base de nanostructures pour une double détection : par résonance de plasmons de surface localisés et fluorescence

Introduction 151
A. Plasmons de surface localisés 152
1. Intérêt des nanoparticules 152
2. Théorie des plasmons de surface localisés 153
3. Biocapteurs LSPR 154
B. Utilisation des couches minces a-$Si_{1-x}C_x$:H 155
1. Modes opératoires 155
a) Evaporation des nanoparticules 155
b) Dépôt de silicium amorphe 155
c) Fonctionnalisation de surface 156
d) Immobilisation des sondes et hybridation 156
e) Mesure 157
2. Dépôt de couches minces a-$Si_{1-x}C_x$:H 157
a) Caractérisations des nanoparticules 157
b) Caractéristiques des plasmons de surface localisés 158
c) Influence de l'épaisseur de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H 160
d) Caractérisation de surfaces fonctionnalisées 161
3. Etude de l'hybridation 163
C. Etude par fluorescence 165
1. Fluorescence couplée aux plasmons de surface localisés 165
2. Influence de la composition des nanoparticules 166
3. Exaltation de la fluorescence 169
a) Influence de l'épaisseur de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H 169
b) Influence de l'épaisseur et sensibilité 170
4. Cinétique d'hybridation 173
Conclusion 177
Bibliographie 178

« La science ne consiste pas seulement à savoir ce qu'on doit ou peut faire, mais aussi à savoir ce qu'on pourrait faire quand bien même on ne doit pas le faire. »
U. Eco

Introduction

Des progrès remarquables ont été réalisés ces dernières années pour le développement des biocapteurs à résonance de plasmon de surface afin d'étudier les interactions de biomolécules.[1,2] Comme montré au chapitre précédent, la SPR est considérée comme une technique de référence dans le domaine des biocapteurs, particulièrement pour l'étude de cinétiques de réaction et la détermination de constantes thermodynamiques, par exemple la constante de dissociation. Quand les plasmons de surface sont confinés dans des nanoparticules métalliques, des modes optiques localisés sont observés permettant un champ électromagnétique élevé à l'interface nanoparticule/milieu diélectrique.[1-6] Comme pour les plasmons de surface, les plasmons de surface localisés (LSPR) sont sensibles au changement local d'indice de réfraction qui varie lors d'une reconnaissance moléculaire entre des sondes et les cibles complémentaires. Pour la plupart des capteurs LSPR utilisant des nanoparticules d'or, l'accrochage des sondes sur les capteurs LSPR se fait principalement via les liaisons Au-S en utilisant la chimie des thiols.[7] Alternativement le dépôt d'une couche mince sur les nanoparticules permet d'adapter différentes techniques de fonctionnalisation, par exemple l'accrochage via des liaisons électrostatiques d'espèces chargées négativement avec des amines greffées sur une couche de silice déposée à la surface de nanoparticules d'or.[8-10]

Bien que le champ électrique localisé décroisse sur une distance de l'ordre de la taille de la nanoparticule,[11,12] plusieurs groupes ont montré récemment qu'il était possible d'optimiser la sensibilité du capteur en y intercalant un espaceur, comme la silice.[9,13,14]

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à l'utilisation des alliages silicium-carbone amorphes comme espaceur. Nous montrerons l'intérêt de pouvoir contrôler la sensibilité du capteur LSPR via un contrôle de la chimie de surface. Enfin nous étudierons le couplage fluorescence / plasmons de surface localisés, pour une étude de la réaction d'hybridation par fluorescence à partir d'un substrat LSPR.

A. Plasmons de surface localisés

1. Intérêt des nanoparticules

Depuis la fin des années 90, les nanotechnologies ont connu un réel essor. Les nanoparticules, dont les propriétés optiques dépendent fortement de la taille, trouvent cependant leurs premières applications il y a plusieurs siècles. Un exemple connu de tous est l'utilisation de nanoparticules pour les vitraux des églises du Moyen-Age ou encore la coupe de Lycurgus qui apparaît verte en réflexion et rouge en transmission (400 après J.-C.) (figure 90). Aujourd'hui les nanoparticules sont utilisées dans différents domaines, de la photonique à la médecine. [5]

Figure 90 : Coupe de Lycurgus (exposée au British Museum à Londres). Verte en réflexion et rouge en transmission.

En 1908, Gustav Mie a montré que les propriétés optiques des nanoparticules métalliques reposent sur l'oscillation collective des électrons de conduction induite par interaction avec un rayonnement électromagnétique (figure 91).[15] Les modes d'oscillation des charges sont nommés plasmons de surface localisés. Les charges étant soumises à une force de rappel qui les ramène toujours vers le centre de la particule, leur oscillation est résonnante pour une certaine fréquence d'excitation.[6,16] L'impossibilité de créer des excitations propagatives de l'ensemble des nanoparticules disjointes relâche la condition de couplage existante en SPR classique (chapitre 3), il y a donc moins de contraintes expérimentales en LSPR ce qui rend l'utilisation des nanoparticules intéressante.

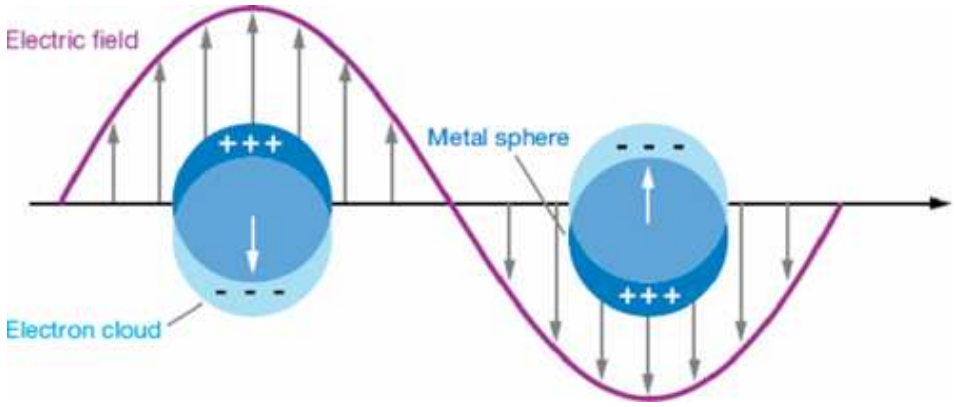


Figure 91 : Action d'un champ électromagnétique sur le plasmon d'une nanoparticule métallique montrant le déplacement du nuage électronique par rapport au centre de la nanoparticule.[6]

2. Théorie des plasmons de surface localisés

Gustav Mie a développé en 1908 une théorie explicitant les solutions au problème de l'interaction de sphères métalliques isolées avec la lumière. Ces solutions ont une expression simple dans le cadre plus restreint de l'approximation de Rayleigh où le diamètre des nanoparticules est très petit devant la longueur d'onde, car on peut alors considérer que le champ électrique est uniforme dans la sphère. Le coefficient d'absorption d'un ensemble de nanoparticules avec une concentration N_A s'exprime alors de la manière suivante :

$$A = \frac{24\pi^2 N_A a^3 \varepsilon_{medium}^{3/2}}{\lambda}\left[\frac{\varepsilon''}{(\varepsilon' + 2\varepsilon_{medium})^2 + \varepsilon''^2}\right] \qquad (18)$$

Où a est le rayon de la particule, ε_{medium} la constante diélectrique du milieu extérieur et ε' *et* ε'' les parties réelle et imaginaire de la fonction diélectrique du métal constituant la nanoparticule. L'absorbance est maximale quand le dénominateur tend vers zéro.[17] Le phénomène de résonance apparaît donc à la fréquence électromagnétique ω pour laquelle $\varepsilon' = -2\,\varepsilon_{medium}$ *et* ε'' très petit, déterminant ainsi l'existence de plasmons de surface localisés. Seuls les métaux possédant des électrons libres (essentiellement l'or et l'argent, le cuivre et les métaux alcalins) possèdent des résonances plasmons dans le spectre visible présentant ainsi de telles couleurs (figure 92).[5,17] La fréquence de résonance plasmon dépend de plusieurs paramètres comme la composition, ou la taille des particules. Elle dépend aussi de la

forme des nanoparticules, bien que cela n'apparaisse pas explicitement dans l'équation (18) obtenue pour le cas de nanoparticules sphériques.

Dans le cas de substrats pour lesquels la densité des nanoparticules est importante et où la longueur d'onde est grande devant la taille des nanoparticules et la distance les séparant, nous pouvons considérer que nous sommes à la limite électrostatique. Les nanoparticules sont en interaction les unes avec les autres, ce qui résulte en la concentration de champs électriques intenses entre les nanoparticules, appelés parfois « points chauds ».

A la résonance, une forte extinction de la lumière est observée, associée à un intense champ autour de la particule, dont l'intensité décroît rapidement avec la distance. Une molécule placée à proximité de la nanoparticule métallique verra dans ce cas un champ avec une intensité un à deux ordres de grandeur supérieure par rapport à celle du champ incident.

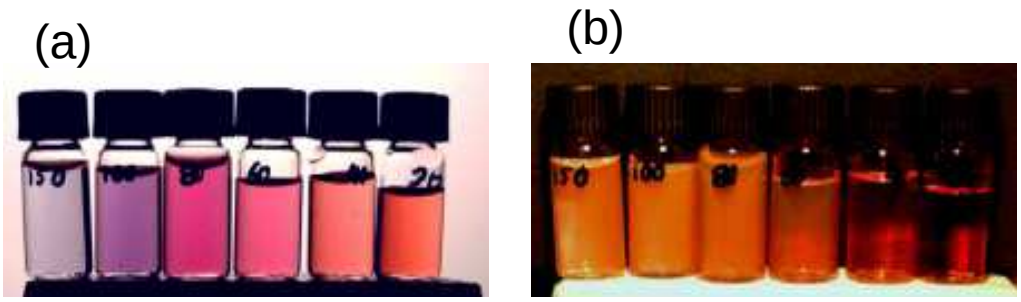


Figure 92 : Photographie en lumière blanche, en transmission (a) et en réflexion (b), de solutions colloïdales contenant des nanoparticules d'or de différentes tailles : de gauche à droite (150 nm, 100 nm, 80 nm, 60 nm, 40 nm, 20 nm).

3. Biocapteurs LSPR

Au début des années 2000, le groupe de Van Duyne a montré qu'il était possible d'utiliser des substrats à base de nanoparticules pour l'étude de réactions biologiques grâce à l'évolution du pic LSPR (λ_{max}).[4] En effet, comme le montre la figure 93a le signal dépend fortement de l'indice de réfraction à la surface du substrat. L'évolution du pic LSPR pour des nanoparticules d'argent dans différents solvants permet de déterminer la sensibilité du capteur grâce à la pente de la droite de λ_{max} en fonction de l'indice de réfraction.[4,17] De nombreuses équipes se sont alors intéressées à la réaction d'hybridation et ont montré qu'il était possible d'obtenir une sensibilité plus élevée que pour les capteurs SPR.[4,9,17]

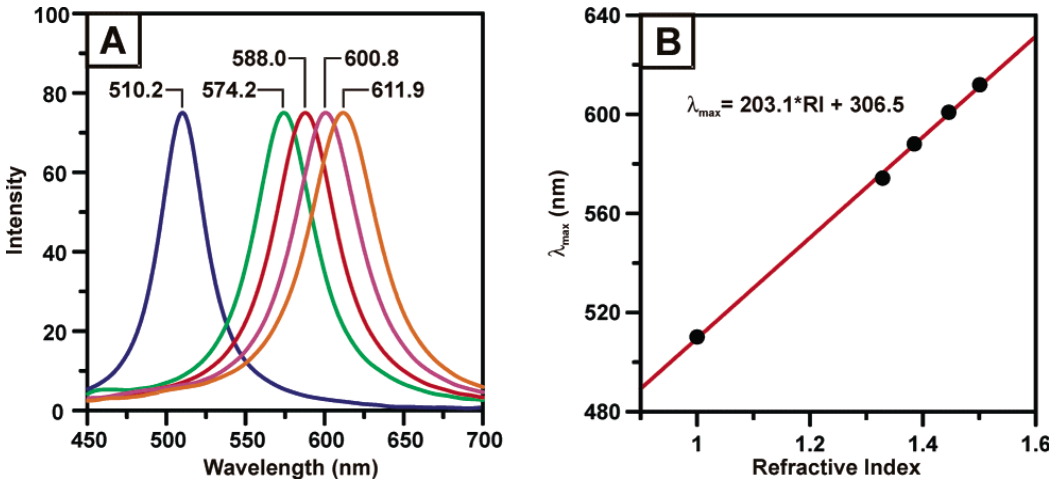


Figure 93 : (A) Spectre d'absorbance de nanoparticules d'argent immergées dans différents milieux de gauche à droite (azote, méthanol, 1-propanol, chloroforme et benzène) ; (B) Variation de λ_{max} en fonction de l'indice de réfraction du solvant.[17]

B. Utilisation des couches minces a-$Si_{1-x}C_x$:H

1. Modes opératoires

a) Evaporation des nanoparticules

Les lames de verre sont dans un premier temps lavées aux ultrasons dans l'isopropanol et l'acétone. Après un rinçage soigneux à l'eau MilliQ, elles sont séchées sous azote et introduites dans la chambre d'évaporation (MEB 550S Plassys).

Les nanoparticules (Np) sont déposées sur des lames de verre par évaporation thermique d'un film mince métallique (par exemple un film d'or de 4 nm), suivie d'un démouillage du film par un traitement thermique rapide : un recuit à 500°C pendant 60 secondes sous un flux d'azote grâce au four Jipelec Jet First 100.[13,18]

b) Dépôt de silicium amorphe

Des films de silicium amorphe carboné sont déposés comme aux chapitres 2 et 3 par PECVD en régime « basse puissance », le taux final en carbone (C) dans le matériau étant ajusté en variant la proportion de méthane dans le mélange gazeux ($[CH_4]/\{[CH_4]+[SiH_4]\}$).[19,20]

c) Fonctionnalisation de surface

La couche mince a-$Si_{1-x}C_x$: H est ensuite fonctionnalisée suivant les procédures précédemment décrites dans les chapitres précédents. En bref, la surface est hydrogénée par des vapeurs de HF (15 s) puis une monocouche d'acide undécylénique est greffée par photochimie (3 h ; 312 nm). Les sites acides sont ensuite activés par traitement dans un mélange équimolaire EDC/NHS à 5 mM. Pour l'étude par infrarouge, la réaction d'amidation a été étudiée avec l'éthanolamine à 5 10^{-2} M pendant 15 minutes à température ambiante.

d) Immobilisation des sondes et hybridation

(1) Etude LSPR

En partant de surfaces activées, la sonde G-ON (non marquée 25-mer [5' NH_2-$(CH_2)_6$-AAC-GCC-CAT-CTT-AAA-ATC-GAC-GCC-T 3'] est diluée à 10^{-5} M dans 150 mM d'un tampon phosphate contenant 0,01% de SDS à pH 8,5. L'immobilisation se fait ensuite entre lame et lamelle en déposant 20 µL par cm^{-2} pendant 14 à 16 h pour l'analyse. Après dépôt, les sites ester de succinimidyle non amidés sont bloqués avec de l'éthanolamine (5 10^{-2} M, pendant 15 min), puis dans de l'eau ultrapure (Millipore) et les lames sont séchées sous un flux d'azote.

La surface est alors hybridée avec des solutions de différentes concentrations de 50 nM à 500 nM contenant l'oligonucléotide $\overline{ON}$ (complémentaire des sondes ON-G) 5' [AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T 3'] à température ambiante pendant 40 minutes dans un tampon d'hybridation contenant (2X SSC, 0,1% SDS, 35% formamide, 0,1% de sperme de saumon).

(2) Etude en Fluorescence

Les sondes G-ON, Cy5-$\overline{ON}$-G (5' [Cy5-AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T-$(CH_2)_6$-NH_2]3') et Cy3-ON-G (5'[Cy3-AAC-GCC-CAT-CTT-AAA-ATC-GAC-GCC-T-$(CH_2)_6$-NH_2]3') sont déposées dans les mêmes conditions (10^{-5} M, tampon phosphate 0,01% SDS) par le robot Microgrid Biorobotics II sur des lames activées.

La surface est alors hybridée avec des solutions de concentrations de 5 fM, 500 fM, 50 pM et 5 nM contenant l'oligonucléotide Cy5-$\overline{ON}$, complémentaire des sondes G-ON et Cy3-ON-G, (5' [Cy5-AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T 3']) à température

ambiante pendant 40 minutes dans un tampon d'hybridation contenant (2X SSC, 0,1% SDS, 35% formamide, 0,1% de sperme de saumon). De la même manière, la séquence Cy5-$\overline{\overline{ON}}$'' 5'Cy5 [AGG-CGT-GCA-TTT-TAA-GTA-GGG-CGT-T 3'] contenant 4 mésappariements a été utilisée.

Des rinçages post-hybridation de 2 minutes sont ensuite réalisés, en utilisant 4 tampons (2XSSC + 1% SDS ; 1X SSC +0,1 SDS ; 0,1X SSC et 2,5 X SSC) lorsque les hybridations sont réalisées dans une chambre d'hybridation ou Hyblive (voir chapitre 2).

e) Mesure

Les mesures LSPR ont été faites grâce au spectrophotomètre UV-Vis Cary 50 scan pour des longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm. Les mesures de fluorescence ont été faites comme au chapitre 2 en utilisant le scanner Axon instrumentation personal 4100A pour mesurer l'intensité après immobilisation des sondes et après leur hybridation avec les cibles en chambre d'hybridation (Tecan). Pour l'étude in-situ de l'hybridation, on utilise à nouveau l'appareil Hyblive.

2. Dépôt de couches minces a-$Si_{1-x}C_x$:H

a) Caractérisations des nanoparticules

La figure 94 montre une image MEB (microscopie électronique à balayage) de la surface obtenue après évaporation et recuit à 500°C d'un film d'or (4 nm). Cela conduit à la formation de nanostructures en or (AuNp) avec une taille moyenne de 33 nm.

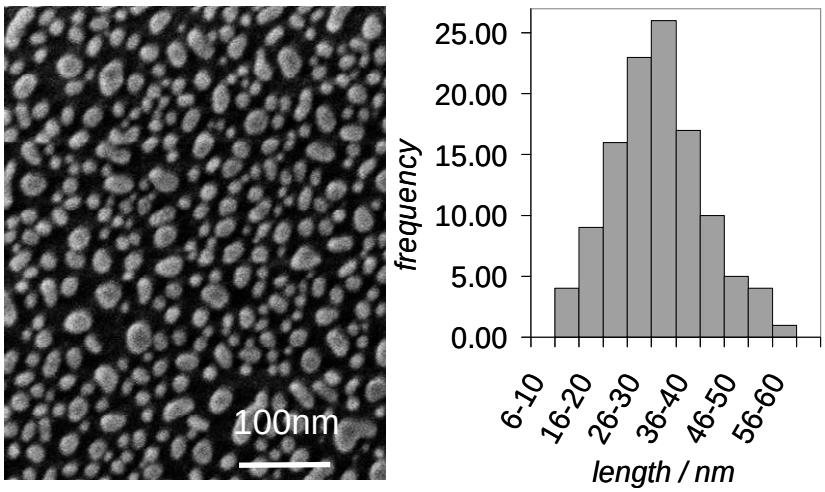


Figure 94: Image en microscopie électronique à balayage (MEB) typique de la structure LSPR formée et histogramme de distribution des tailles des nanoparticules.[18]

b) Caractéristiques des plasmons de surface localisés

La figure 95 (courbe grise) montre que les nanostructures présentent un maximum d'absorption à λ_{max} = 575 nm, une absorption I_{max} de 0,24 et une largeur à mi-hauteur (fwhm) de 120 nm. La reproductibilité des lames est évaluée en mesurant le signal LSPR sur 8 lames différentes. Nous avons mesuré un écart-type de 2 nm pour λ_{max} et 0,02 unité d'absorbance pour I_{max}. Ces substrats présentent des bandes d'extinction fortes dans le spectre de transmission UV-Visible dues à l'excitation des plasmons de surface localisés (LSPR) sur les nanostructures d'or.

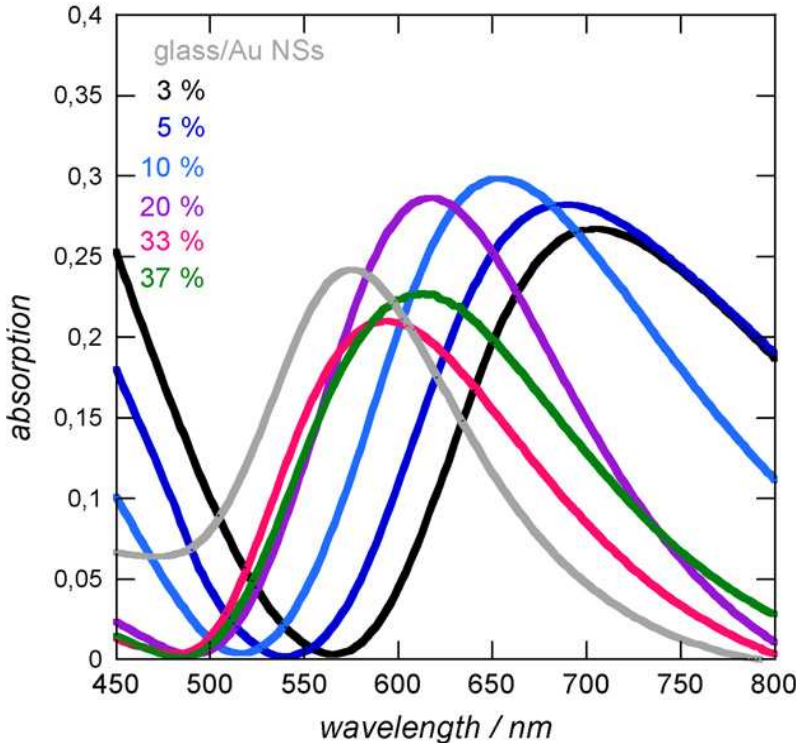


Figure 95 : Spectre de transmission UV-Visible (UV-Vis) dans l'air d'une interface verre/nanoparticules d'or nue ou revêtue d'un film de 20 nm d'épaisseur d'a-$Si_{1-x}C_x$:H, x variant de 3 à 37%.[18]

Nous avons ensuite étudié l'influence du dépôt de films de a-$Si_{1-x}C_x$:H sur les propriétés LSPR. Pour faire cette étude, des films de a-$Si_{1-x}C_x$:H de 20 nm d'épaisseur présentant des taux de carbone allant de 3 % à 37 % sont déposés et l'effet du dépôt sur le spectre de transmission UV-Visible de l'interface est ensuite recherché (Figure 95). On remarque que le dépôt des films de a-$Si_{1-x}C_x$:H déplace les bandes LSPR vers les longueurs d'onde plus élevées tout en augmentant leur largeur à mi-hauteur.

La Figure 95 montre qu'un faible taux de carbone résulte en un déplacement plus fort. En outre, une augmentation du taux de carbone dans le film de a-$Si_{1-x}C_x$:H au-delà de 20 % diminue l'absorption et augmente la largeur à mi-hauteur. Ces comportements sont liés à un changement dans les parties réelle (principalement pour λ_{max}) et imaginaire (principalement pour la largeur à mi-hauteur) des indices de réfraction des alliages de a-$Si_{1-x}C_x$:H formés. Ceux-ci varient respectivement entre n=4,2-0,07i et n=1,81-1,07×$10^{-3}i$ pour a-Si:H et pour a-$Si_{0,63}C_{0,37}$:H. Le film de a-$Si_{1-x}C_x$:H avec un taux de carbone de 20 % permet d'obtenir une structure avec des caractéristiques spectrales favorables en termes de sensibilité et d'intensité d'absorption : maximum d'absorption situé à λ_{max} = 614 nm, absorption au pic de 0,29 et largeur à mi-hauteur de 150 nm.

c) Influence de l'épaisseur de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H

L'influence de l'épaisseur de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H sur le décalage du maximum d'absorption LSPR est maintenant examinée. La Figure 96 montre les changements dans le spectre de transmission UV-Visible lorsque les nanoparticules d'or sont revêtues d'un film de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H d'épaisseur croissante. Le spectre représentant le décalage de λ_{max} en fonction de l'épaisseur du film de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H montre un comportement oscillatoire avec une période de 125 nm et une amplitude $\Delta\lambda_{max}$ de 40 nm (Figure 96B). Un comportement oscillatoire similaire a été rapporté récemment pour les nanoparticules d'or revêtues d'un mince film de SiO_x dans l'eau.[9] Le dépôt d'un film de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H de 5 nm entraîne un déplacement de λ_{max} de 20 nm vers les grandes longueurs d'onde par rapport à des nanostructures en or non revêtues.

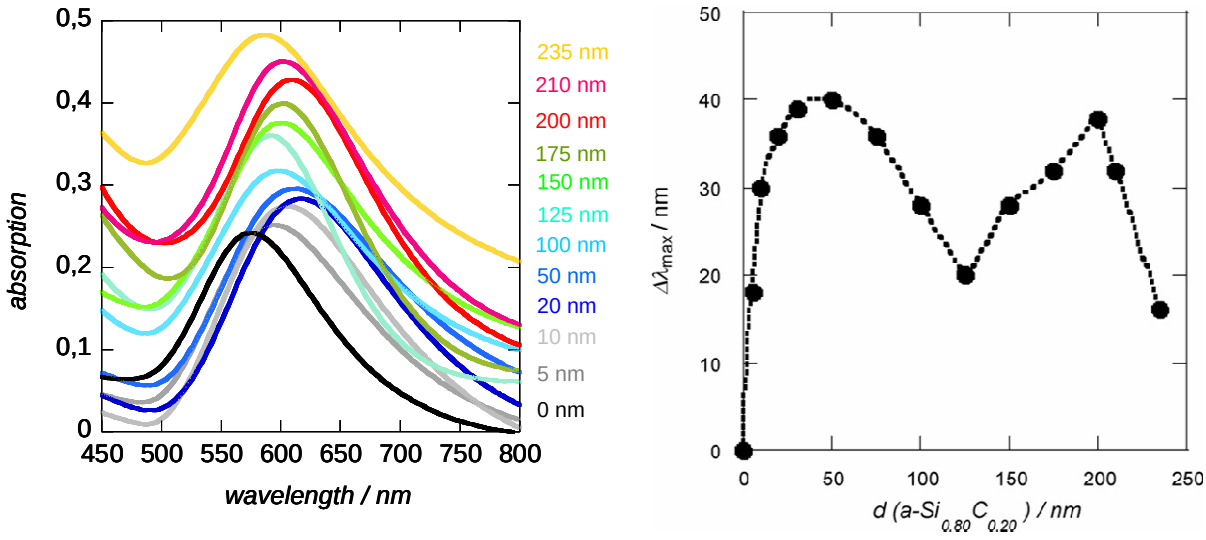


Figure 96 : (A) Spectre de transmission UV-Vis dans l'air d'une interface verre / nanoparticules d'or recouverte de couches de a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H d'épaisseur croissante ; (B) Variation du déplacement du maximum de λ_{max} (LSPR) en fonction de l'épaisseur en nm de la couche superposée de a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H.

Comme dans le cas des structures SPR étudiées au chapitre précédent, la sensibilité a été déterminée par immersion de ces différentes structures dans des solvants d'indices de réfraction différents (figure 97). Un changement de λ_{max} de 80 nm par unité d'indice de réfraction est observé pour un film de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H de 20 nm, tandis qu'un changement de 112 nm par unité d'indice de réfraction est observé pour une couche de 5 nm d'épaisseur. Cette sensibilité est en bon accord avec des travaux déjà publiés notamment par Haynes et

Van Duyne.[21] L'utilisation des interfaces revêtues de films de 150-200 nm est possible pour des études de détection à longue distance, avec un décalage λ_{max} de 50 nm par unité d'indice de réfraction.

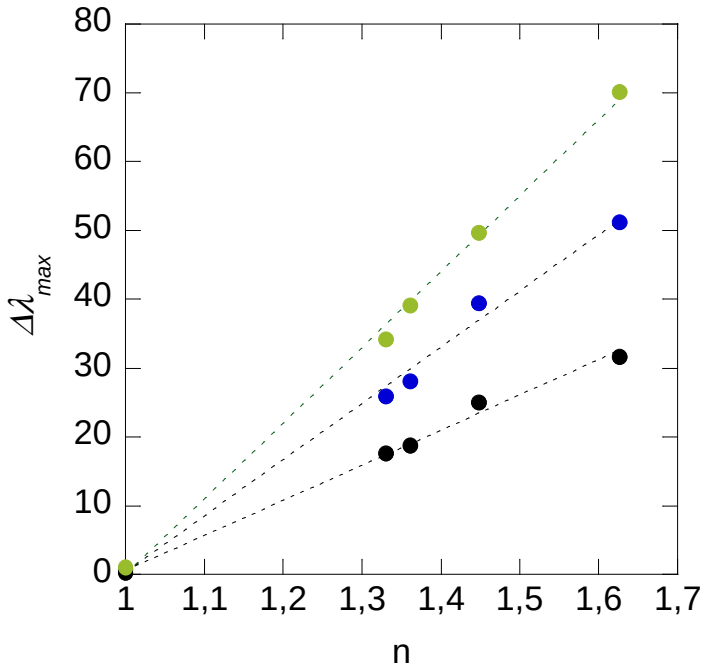


Figure 97 : Variation de λ_{max} en fonction de l'indice de réfraction de différents solvants pour différents substrats verre / AuNp recouverts de 5 nm (vert), 20 nm (bleu) and 150 nm (noir) de *a*-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H.

La stabilité chimique des interfaces LSPR revêtues d'un film de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H de 5 nm a été testée par le suivi du signal LSPR des interfaces immergées dans l'eau, l'éthanol et un tampon phosphate à température ambiante. Aucun changement dans le signal LSPR n'a été observé lors de ces immersions successives de 2 h chacune à température ambiante. Ces substrats peuvent donc supporter les étapes de fonctionnalisation et sont stables durant les mesures cinétiques.

d) Caractérisation de surfaces fonctionnalisées

Les substrats LSPR sont ensuite fonctionnalisés pour permettre l'immobilisation de molécules biologiques. C'est dans le cadre de cette étude que nous avons pu remarquer que la couche mince a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H était particulièrement intéressante pour bénéficier de bonnes propriétés optiques et qu'elle nous permettait de contrôler la chimie.[18] Aussi avons-nous décidé de caractériser la couche par infrarouge (figure 98) et d'étudier les différentes étapes

de fonctionnalisation par la suite. La figure 98 montre le spectre ATR FT-IR (Absorption Infrarouge par Transformée de Fourier en réflexion totale atténuée) d'un film de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H déposé sur un prisme ATR de silicium référencé au spectre du prisme de silicium cristallin nu. Le pic intense à 2100 cm^{-1} confirme la présence d'une grande quantité de liaisons silicium-hydrogène dans le matériau. Les bandes détectées à 2890 cm^{-1} et 2953 cm^{-1} indiquent que le carbone dans le film est majoritairement sous forme de CH_3.[19,20]

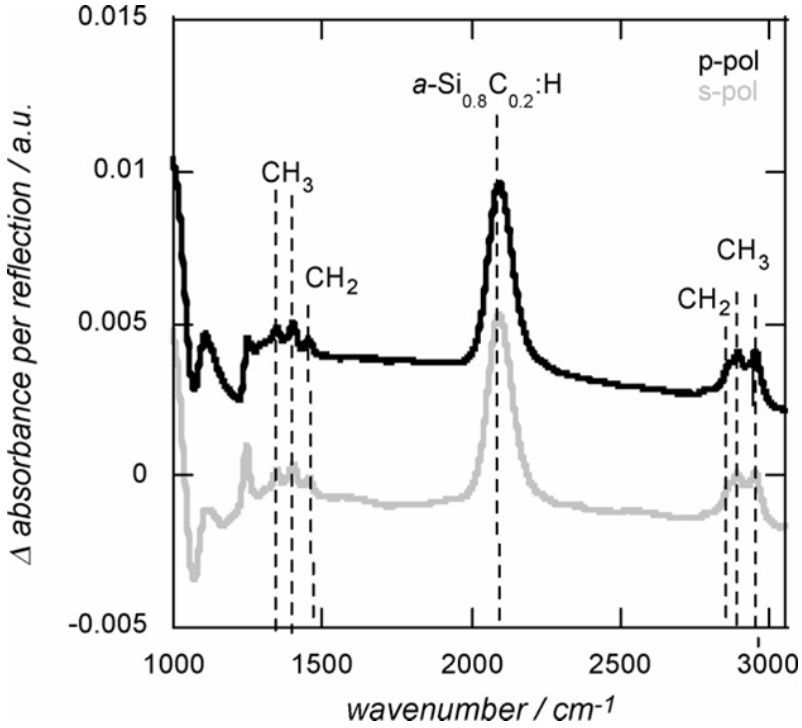


Figure 98 : Spectre ATR-FTIR en polarisations p et s d'une couche mince de a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H (20 nm) déposée sur un prisme de silicium. La référence est le prisme de silicium cristallin « nu » avant dépôt.

La figure 99 montre les différentes étapes de fonctionnalisation de la couche a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H. Les bandes vibrationnelles C=O à 1711 cm^{-1} et CH_2 à 2855 cm^{-1} et 2930 cm^{-1} permettent de caractériser le greffage de groupes carboxydécyles sur la couche mince a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H. L'intégration de l'aire des pics de la bande C=O permet de déterminer la densité moléculaire des groupes carboxydécyles liés : N= 7,8 10^{13} cm^{-2} (courbe bleue). Cette valeur, inférieure à celle du silicium cristallin (N= 2,5 10^{14} cm^{-2}),[22,23] est probablement due à une rugosité de la surface et à la moindre disponibilité des sites d'accrochages en surface liée à la présence de groupes méthyles au sein du matériau.

La fonction acide est par la suite convertie en un groupement ester dans une solution de EDC / NHS (N-éthyl-N'-[3-diméthylaminopropyl] carbodiimide/N-hydroxy succinimide) à 5

mM / 5 mM. Comme précédemment, on observe la formation des esters activés par la disparition complète du pic caractéristique de l'acide à 1711 cm^{-1} et l'apparition de nouveaux pics à 1744, 1788 et 1816 cm^{-1} associés à l'ester de succinimidyle.[24,25] La quantité des groupements ester formés est estimée à N= 7,2 10^{13} mol cm^{-2}. Ceci correspond à une efficacité d'activation de l'ordre de 90%.

Le spectre ATR-FTIR de la surface activée par l'ester après réaction avec l'éthanolamine, représenté sur la figure 99 (courbe noire), montre l'apparition de pics à 1651 et 1551 cm^{-1} des groupes amides. La quantité de groupements amides formés est N = 7,2 10^{13} cm^{-2}. Le pic carboxyle restant à 1711 cm^{-1} révèle la présence des acides non activés.[26]

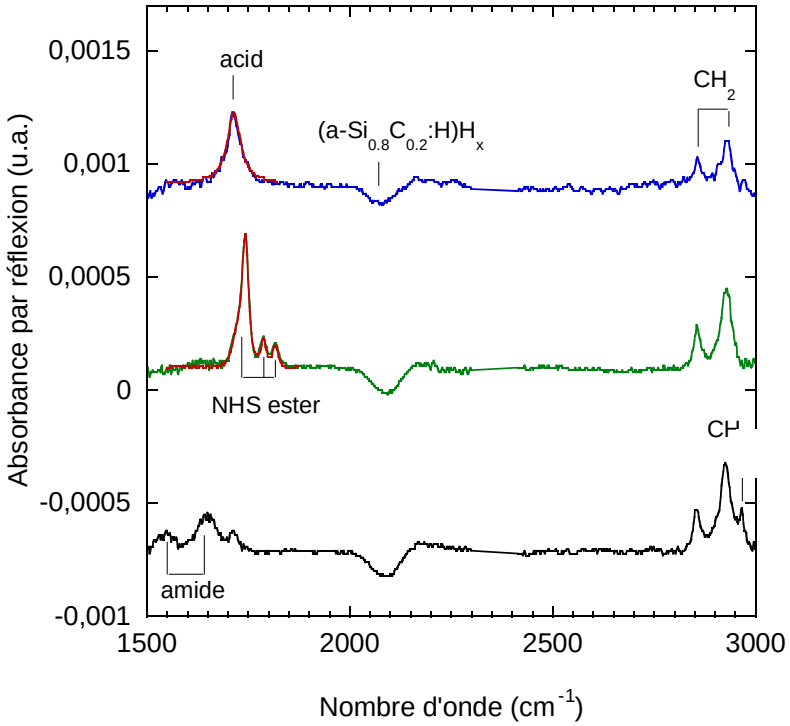


Figure 99 : Spectre ATR-FTIR de a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H modifié avec l'acide undécylénique (bleu), réaction avec EDC/NHS (vert), et amidation avec l'éthanolamine (noir) ; Les courbes rouges correspondent aux courbes ajustées pour calculer les concentrations superficielles des groupes fonctionnels liés à la surface.

3. Etude de l'hybridation

Les interfaces (5 nm a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H / Au Np) sont suffisamment optimisées pour permettre de suivre l'hybridation. Pour cela nous suivons par des mesures in situ et en temps

réel l'évolution de l'absorption à une longueur d'onde donnée (figure 100). Les mesures sont réalisées dans un premier temps dans le tampon de préhybridation puis la cinétique de la réaction est mesurée en introduisant la solution contenant les brins d'ADN complémentaires. La figure 100 (A) montre une cinétique mesurée avec des brins complémentaires à 500 nM à une longueur d'onde donnée (595 nm). On peut par ailleurs suivre la cinétique en regardant le décalage et la variation d'absorbance à λ_{max}. La figure 100 B montre la variation d'absorbance à λ_{max} mesurée après hybridation avec différentes concentrations en cibles. Cela nous permet de pouvoir déterminer la limite de détection (dans les conditions conventionnelles de détermination de celle-ci, quantifiée selon le changement d'absorbance à la longueur d'onde λ_{max} déterminée en l'absence de cibles dans la solution d'hybridation) qui est ici environ égale à 40 nM. Cette limite est légèrement plus faible que celle mesurée par Szunerits et coll. pour un substrat SiOx/AuNp/ verre, égale à 60 nM.[9] Il est cependant clair que pour bénéficier de la sensibilité maximale, il vaudrait mieux se placer au point d'inflexion de la couche d'absorption plutôt qu'à son maximum. Dans ces conditions, la limite de détection pratique peut être sensiblement inférieure à la valeur ci-dessus. On voit d'ailleus en comparant les figures 100a et 100b que la sensibilité est bien meilleure si on regarde la variation d'absorbance à une longueur d'onde fixe différente de λ_{max}.

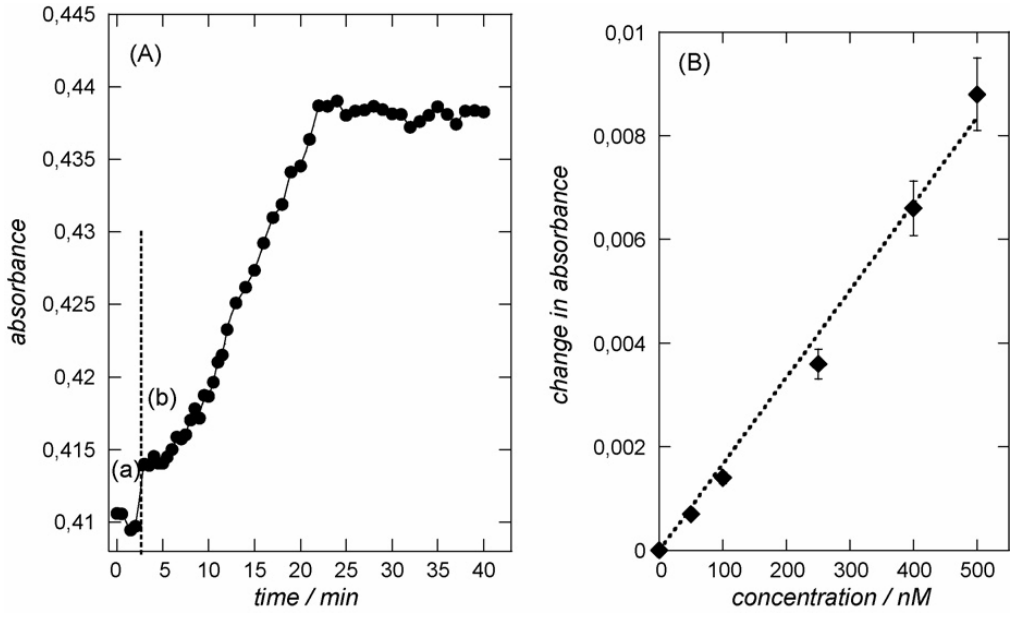


Figure 100 : (A) Evolution de l'absorption (signal LSPR) à 595 nm au cours de l'hybridation sonde/cible des oligos sondes G-ON 10 µM et des oligomères cibles $\overline{ON}$ à 500 nM mesurée in situ par spectrométrie optique avant (a) et après introduction des cibles (b); (B) variation de l'absorbance au niveau de λ_{max}.

C. Etude par fluorescence

1. Fluorescence couplée aux plasmons de surface localisés

Dans la partie précédente, nous avons montré comment les propriétés optiques des nanoparticules permettent l'élaboration d'un capteur très sensible en suivant le signal LSPR. Nous nous intéresserons désormais à l'exaltation de fluorescence par les nanoparticules.[18]

L'étude de la fluorescence est bien plus complexe sur les nanoparticules que sur les films plans où le phénomène de recombinaison non radiative (« quenching ») est particulièrement gênant pour une distance métal/fluorophore inférieure à 20 nm.[27] Le champ électrique autour de la nanoparticule, résultant du couplage de la lumière incidente et des plasmons de surface localisés, est très intense et entraîne une augmentation de la fluorescence et une diminution du temps de vie du fluorophore.[28] Le facteur d'exaltation dépend fortement de la taille, de la répartition, de la forme, de la longueur d'onde de résonance des nanoparticules, de la distance métal / fluorophore mais aussi de la longueur d'onde d'émission et d'excitation des fluorophores.[1,16,29-32] La relaxation non radiative est le principal canal de désexcitation lorsque la distance est inférieure à 5 nm.[33-35] Au-delà de cette distance, le canal radiatif redevient appréciable et la diminution du temps de vie persiste encore, conduisant à un maximum d'exaltation à une distance environ égale à 10 nm.[36]

Un compromis pour contrôler la distance est d'utiliser un espaceur. Ceci permet aussi de limiter l'instabilité de la morphologie des nanoparticules et des propriétés optiques lors de l'immersion des substrats dans différents solvants et lors du séchage.[37-39] Il faut utiliser pour cela une couche mince semi-transparente ou transparente.[9,37,40,41] Cette couche peut aussi permettre de contrôler l'accrochage des biomolécules. Nous avons en effet montré dans la partie précédente que nous pouvons contrôler la chimie de surface sur des couches minces (5 nm) d'alliages silicium-carbone amorphes et que la fluorescence est même amplifiée grâce au contrôle de la chimie (chapitre 2).[18] L'objet de cette partie est de voir comment le substrat LSPR à base de silicium peut aussi être utilisé avantageusement pour des études en fluorescence, notamment d'hybridation de brins d'ADN.

2. Influence de la composition des nanoparticules

La figure 101 montre une représentation schématique du capteur LSPR utilisé pour cette étude. Il consiste en une répartition homogène de nanoparticules (or, argent ou or/argent) recouvertes de silicium amorphe carboné (20%), sur lequel sont greffées les sondes. On détecte l'appariement des cibles marquées avec un fluorophore.

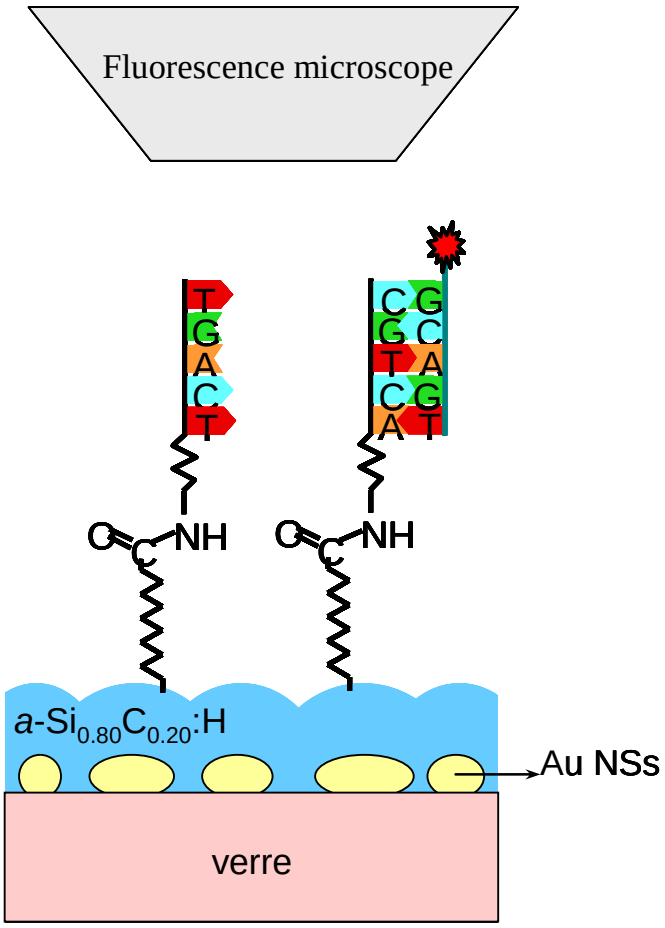


Figure 101: Représentation schématique du capteur LSPR

Dans le cadre des capteurs SPR, on a remarqué que l'argent est plus sensible que l'or. Qu'en est–il ici ? On peut aussi songer à utiliser des alliages argent-or pour ajuster les propriétés du signal LSPR. A partir des images MEB, comme celles de la figure 102, la morphologie des nanoparticules d'argent (a) ou d'or (b) peut être déterminée. Par exemple pour les nanoparticules d'or obtenues par évaporation d'un film d'or de 4 nm suivie d'un traitement thermique à 500°C pendant 1 minute, le diamètre moyen est d = 25 ± 8 nm avec une distance entre les particules a = 16 ± 8 nm et une hauteur h = 13,6 ± 3 nm.[13] Ceci

conduit à une valeur *d/h*= 1,8 ± 0.2. Dans le cas de l'argent les nanoparticules sont formées à partir d'un film de 2 nm. Le diamètre et les dimensions sont plus faibles *d* = 12 ± 6 nm et *h* = 5,5 ± 1,7 nm respectivement, conduisant à une valeur *d/h* = 2,1± 0,4 comparable à celle de l'or.[21]

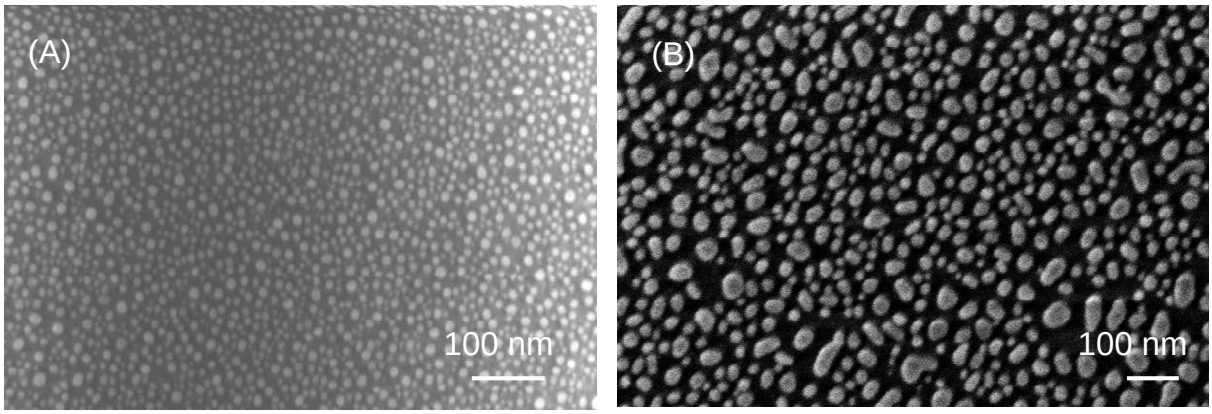


Figure 102: Images MEB de nanoparticules après évaporation de films de 2 nm d'argent (A) et 4 nm d'or (B) et recuit à 500°C.

Les spectres d'absorption de tels substrats (couche mince après recuit) sont représentés figure 103 pour les nanoparticules d'or. Le maximum d'absorption est atteint pour une longueur d'onde λ_{max} égale à 548 nm alors que pour les nanoparticules d'argent le pic est à 421 nm. Cette dernière valeur est typique de celles obtenues pour des nanoparticules d'argent sphériques, généralement comprises entre 400 et 500 nm. On remarque que le pic correspondant aux nanoparticules d'argent présente une largeur à mi-hauteur (fwhm=53 nm) plus faible que celle pour l'or (100 nm). Ces résultats sont bien connus et s'expliquent par la plus faible valeur de la partie imaginaire de la fonction diélectrique.[42] D'autres substrats ont été préparés par évaporation de couches minces d'or et d'argent de différentes épaisseurs et recuit. La deuxième colonne du tableau 7 indique les épaisseurs des couches d'argent puis d'or évaporées pour réaliser les différentes structures étudiées. Sur la figure 103a on constate que les spectres des différentes structures ne présentent qu'une seule bande plasmon. Si des nanoparticules distinctes d'or et d'argent s'étaient formées sur la surface lors du recuit, on aurait obtenu deux bandes plasmons distinctes. Cela indique qu'on observe ici au contraire la formation d'un alliage Au/Ag.[43,44] On note que plus l'épaisseur d'or évaporée initialement est élevée, plus le pic se décale vers les grandes longueurs d'ondes.[43] Cela donne un moyen d'ajuster les propriétés optiques des nanoparticules de métaux nobles.

Pour stabiliser leurs morphologies et leurs propriétés optiques, les nanoparticules sont recouvertes d'une couche a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H. Nous avons montré dans la première partie que cette

structure permet d'obtenir un substrat sensible en LSPR. La figure 103b montre les spectres d'absorption des différentes structures après dépôt de 5 nm de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H. On note que la présence de la couche entraîne une augmentation de l'intensité d'absorbance et de la largeur à mi-hauteur. Les résultats sont synthétisés dans le tableau 7.

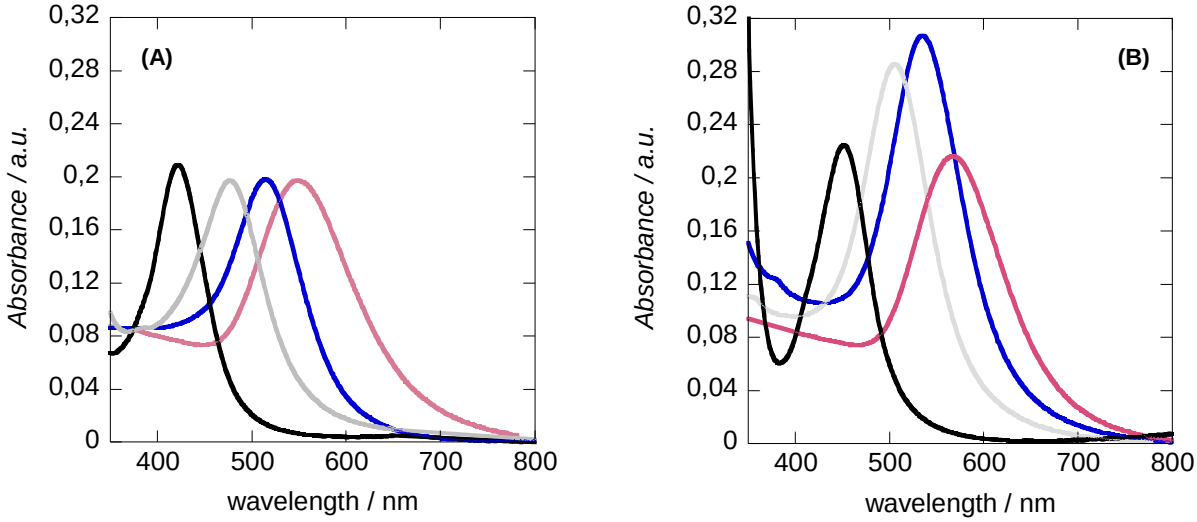


Figure 103 : Spectre d'absorption de différents substrats (verre / métal après recuit) (A) avant (B) après dépôt de 5 nm de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H : 2nm Ag (noir) ; 2nm Ag/2nm Au (gris) ; 1 nm Ag/4 nmAu (bleu) et 4 nm Au (rouge).

	composition	λ_{max} /nm	fwhm /nm	λ_{max} / nm (après dépôt)	fwhm / nm (après dépôt)	λ_{max} / nm (dans PBS)
1	2 nm Ag	421	53	450	62	519
2	2 nm Ag 2 nm Au	474	62	502	97	523
3	1 nm Ag 4 nm Au	512	76	534	100	548
4	4 nm Au	548	100	566	102	580

Tableau 7 : Caractéristiques des spectres d'absorption de différentes structures avant et après dépôt de 5 nm de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H.

3. Exaltation de la fluorescence

a) Influence de l'épaisseur de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H

Outre préserver de bonnes propriétés optiques, les couches de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H permettent le greffage covalent de biomolécules, ainsi que la maîtrise de la distance métal/fluorophore. En effet, la fonctionnalisation de la surface par l'acide nous permet de pouvoir accrocher les brins d'ADN à une distance de 7 nm (5 nm + 2 nm couche moléculaire). Après l'étape d'activation, les sondes Cy5-$\overline{ON}$-G et Cy3-ON-G sont immobilisées à la surface (10 µM) des différents substrats (tableau 7) et sur une lame commerciale terminée par des groupements NHS ester. La figure 104 montre l'intensité de la fluorescence (Cy3 et Cy5) et l'homogénéité des spots sur les différentes structures en comparaison avec la lame commerciale. On note sur cette figure que les sondes marquées Cy5 fluorescent plus que celles marquées Cy3. Même si une comparaison quantitative n'est pas possible dans la mesure où nous n'avons pas calibré précisément l'intensité des lasers utilisés, nous pouvons clairement corréler cette tendance au rendement quantique des fluorophores qui est bien plus faible pour le marqueur Cy3 (0,04) que pour Cy5 (0,3).[45] Pour les sondes Cy5-$\overline{ON}$-G, le substrat verre/AuNp/ a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H est le plus fluorescent. La fluorescence mesurée est 3 fois plus importante que pour la structure 3 (1 nm Ag/ 4 nm Au) et 35 fois plus intense que pour la lame commerciale. Pour les sondes Cy3-ON-G, c'est la structure 3 qui présente le facteur d'exaltation le plus élevé. La comparaison des longueurs d'onde associées au signal LSPR (λ_{max}) et des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de Cy3 (550 nm ; 570 nm) et de Cy5 (650 nm, 670 nm) permet de comprendre ces résultats. Nous remarquons (tableau 7) que la structure 4 (λ_{max}=580 nm) est la structure dont la longueur d'onde de résonance est la plus proche des longueurs d'onde caractéristiques de Cy5, tout comme la structure 3 (λ_{max} =548 nm) vis-à-vis de Cy3. L'intensité de la fluorescence est en effet maximale lorsque la longueur d'onde d'excitation du fluorophore est très proche de la longueur d'onde de résonance grâce au couplage à la résonance.[29] On comprend ainsi pourquoi l'intensité des brins Cy3 est comparable à celle des brins Cy5 pour la structure 1 à base de nanoparticules d'argent.[46]

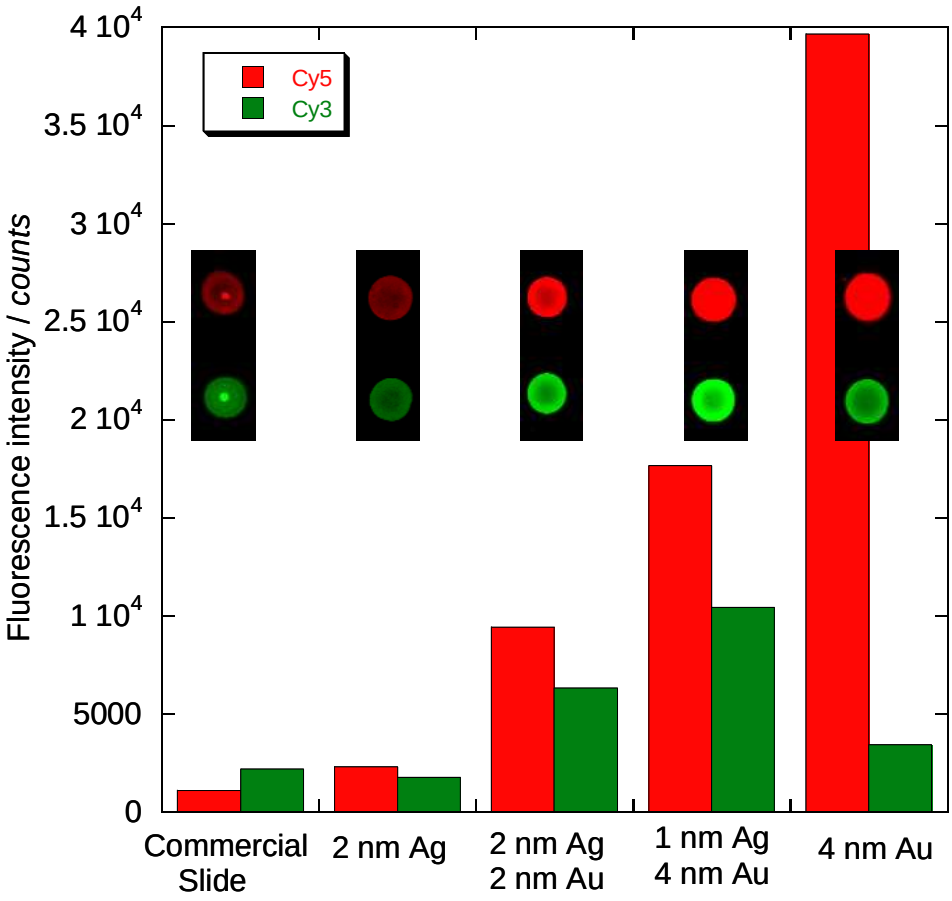


Figure 104 : Intensité de la fluorescence et images des spots associés pour les sondes Cy5-$\overline{\text{ON}}$-G et Cy3-ON-G immobilisées à 10 µM sur les différents substrats. La valeur des histogrammes correspond aux valeurs médianes corrigées par les valeurs de fluorescence du fond continu mesurées au voisinage des spots.

b) Influence de l'épaisseur et sensibilité

Comme le montre la figure 105a, indépendamment de l'exaltation par les plasmons de surface (efficace seulement pour les très faibles épaisseurs de la couche de a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H), l'épaisseur d'une couche de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H déposée sur une couche métallique continue a un effet significatif sur l'intensité de la fluorescence de sondes Cy5 immobilisées à la surface. Le facteur d'exaltation a été calculé comme au chapitre 2 (facteur calculé à l'excitation et à l'émission). La figure 105b montre la variation de fluorescence des sondes Cy5-ON en fonction de l'épaisseur de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H déposée sur les nanoparticules d'or. Il faut cependant tenir compte du fait que les fluorophores sont à une distance égale à environ 10 nm du diélectrique (2 nm couche d'accrochage + 8 nm pour les bases de l'ADN) pour calculer la

distance métal/fluorophore. La courbe bleue continue sur la figure 105b montre l'intensité des sondes Cy5-$\overline{ON}$-G immobilisées par le robot Biorobotics Microgrid II sur une couche à épaisseur variable (déposée comme décrit au chapitre 2). Dans cette expérience, la variation d'épaisseur sur un même spot (diamètre de 300 µm) est d'environ de 1 à 2 nm, ce qui moyenne le signal mesuré. C'est pourquoi, aux faibles épaisseurs où la variation du signal en fonction de l'épaisseur est rapide, des mesures indépendantes ont été faites sur des couches d'épaisseur homogène (3, 5, 10 et 20 nm, points roses figure 105b). L'intensité maximale est obtenue pour le substrat avec 5 nm de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H. En supposant que les brins d'ADN sont orientés perpendiculairement à la surface, le fluorophore est alors à une distance de 15 nm du métal, une distance pour laquelle l'exaltation est proche du maximum.[31,36]

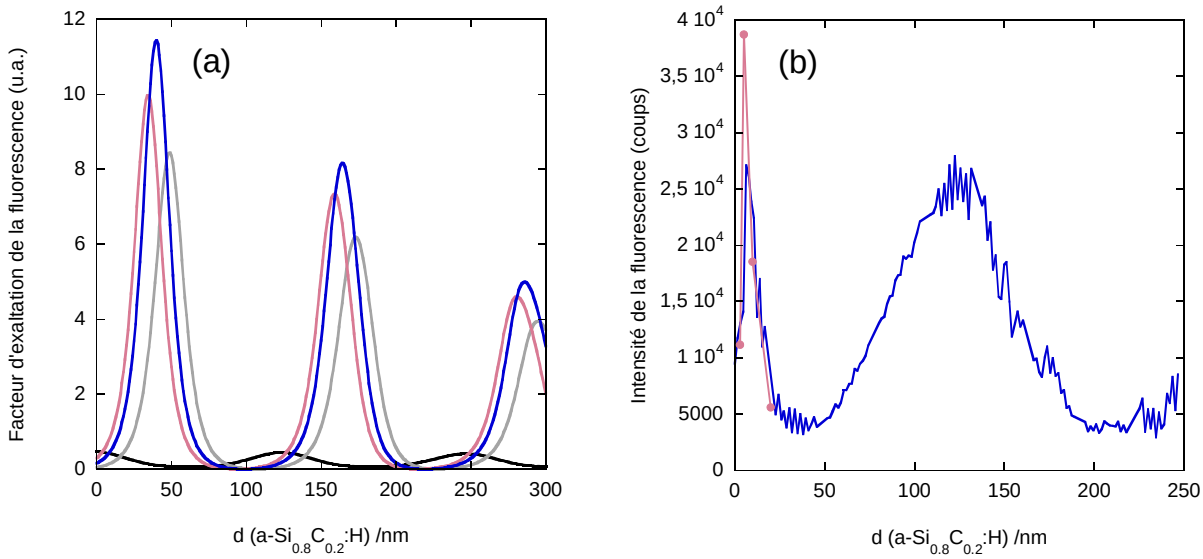


Figure 105 : (a) Calcul du facteur d'exaltation de la fluorescence de sondes marquées Cy5 en fonction de l'épaisseur de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H sur différents substrats : verre (noir) ; aluminium (gris) ; or (rose) et argent (bleu) ; (b) Intensité de la fluorescence pour différentes épaisseurs de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H déposé sur le substrat verre/AuNp, mesurée sur des couches d'épaisseur homogène (courbe rose) ou une couche d'épaisseur variable (courbe bleue).

Pour des couches plus minces que 5 nm, l'intensité de la fluorescence décroît à cause de l'intervention de processus de recombinaison non radiatifs dus à la proximité du métal. Parallèlement, on note que pour de grandes épaisseurs, on retrouve un maximum de fluorescence dû au phénomène d'interférences entre la lumière directement émise et celle réfléchie par la couche des nanoparticules. Les deux maxima sont séparés par une valeur proche de $\lambda/2n$ comme sur la figure 105a. Toutefois on remarque que les franges sont

décalées d'une valeur proche de $\lambda/4n$. Ce décalage est dû au fait que le déphasage lors de la réflexion sur la couche de nanoparticules est distinct de celui enregistré à la surface d'une couche métallique continue.

Le substrat 5 nm a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H/AuNP/ apparaît comme étant le meilleur substrat pour obtenir une fluorescence optimale avec des sondes marquées Cy5. Nous n'avons pas dans ce cas calculé le facteur d'exaltation, mais nous pouvons remarquer que le rapport d'intensité entre les deux premiers maxima de la courbe théorique de la figure 105a est sensiblement identique à celui mesuré expérimentalement d'après la figure 105b. Cela indique que pour des conditions optimales, l'intensité de la fluorescence des sondes marquées Cy5 immobilisées sur la structure 5 nm a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H / Au Np est du même ordre de grandeur que celle calculée et mesurée expérimentalement sur des couches métalliques planes. Cela suggère que le facteur d'exaltation est du même ordre que le facteur d'augmentation déterminé sur des couches métalliques planes (à $\lambda/4$), donc compris entre 10 et 15. On peut atteindre ainsi un niveau de sensibilité très élevé et proche des meilleurs capteurs à fluorescence sur réflecteur. En d'autres termes, dans les conditions optimales, le gain dû à l'augmentation du champ local compense les pertes imputables aux phénomènes de recombinaison non radiative dus à la proximité du métal. De telles valeurs permettent la détection de l'hybridation pour des valeurs très faibles en fluorescence, comme le montre la figure 106 où l'hybridation à 5 fM est détectée. Au vu de l'intensité du signal par rapport au signal de fond, la limite de détection peut être comparée à celle obtenue par SPFS (500 attomolaire).[47] Sur de tels substrats nous avons essayé de déterminer comme pour le LSPR la limite de détection (figure 106), mais nous avons rencontré le même comportement que celui observé et discuté au chapitre 2 (partie E §3 c).

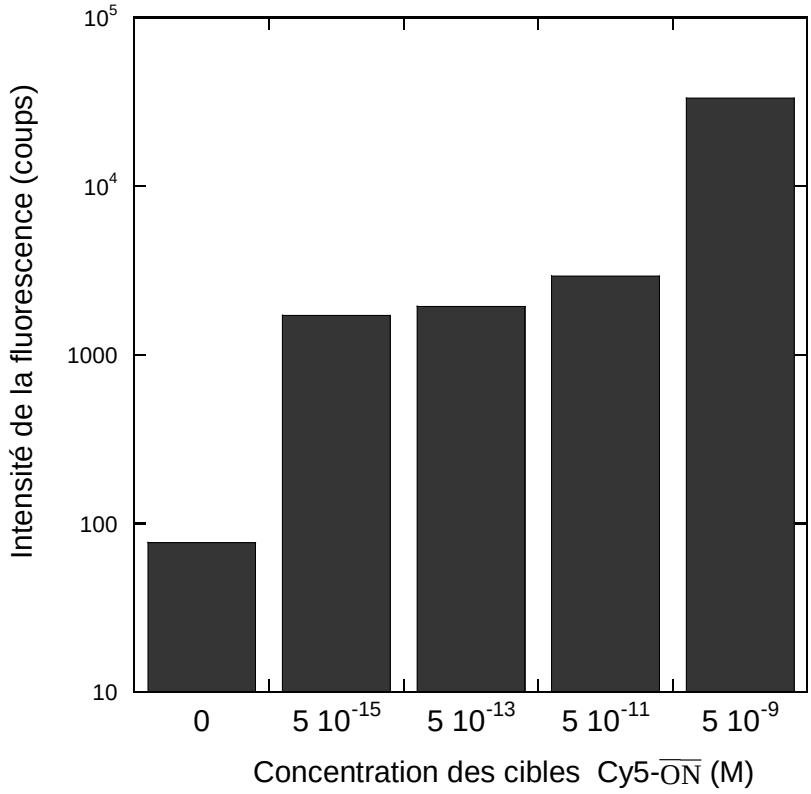


Figure 106 : Diagramme d'intensité de fluorescence après hybridation des spots à différentes concentrations (5 fM, 500 fM, 50 pM, 5 nM). Les valeurs des histogrammes sont corrigées par les faibles valeurs de fluorescence du fond continu au voisinage des spots. Pour la lame immergée dans le tampon de préhybridation (0M), l'intensité de fluorescence correspond à la valeur brute mesurée.

4. Cinétique d'hybridation

Comme pour les biocapteurs SPFS ou fluorescents, la très bonne sensibilité permet de suivre l'hybridation in situ en temps réel. La figure 107 montre l'intensité de fluorescence obtenue avec les cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$ et Cy5-$\overline{\text{ON}}$ '' marquées Cy5. La courbe (a) correspond à l'hybridation des cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$ avec les sondes Cy3-ON–G et la courbe (b) montre celle entre les mêmes cibles Cy5-$\overline{\text{ON}}$ et les sondes G-ON. La cible Cy5-$\overline{\text{ON}}$ est complémentaire des deux sondes, mais s'hybride avec le fluorophore Cy5 orienté vers la surface sur la sonde Cy3-ON-G (figure 107) alors que lors de l'hybridation avec la sonde G-ON, le fluorophore est orienté vers l'extérieur. Les cibles (5 nM) sont introduites après 15 minutes (temps nécessaire pour faire le réglage de l'intensité et mesurer la stabilité des sondes en solution

dans le tampon de préhybridation). Dans les deux cas, l'hybridation est très rapide (la prise de mesure pendant les premières minutes est limitée par les conditions opératoires : échange de solution, et homogénéisation de la solution contenant les cibles).

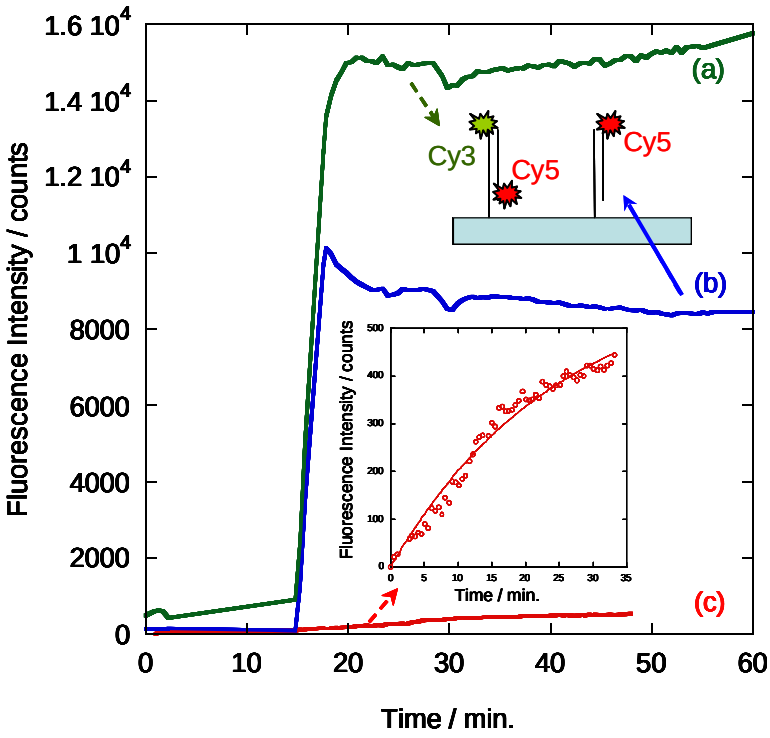


Figure 107 : Intensité de la fluorescence des cibles Cy5-$\overline{ON}$ (5 nM) hybridées avec les sondes Cy3-ON-G (a vert) et G-ON (b bleu) à 10µM. L'encart et la courbe c (rouge) montrent l'intensité de la fluorescence des cibles Cy5-$\overline{ON}$'' hybridées avec les sondes Cy3-ON-G.

Comme pour la couche déposée sur le miroir de Bragg, on note ici que la fluorescence est environ 2 fois plus importante pour l'hybridation avec les sondes Cy3-ON-G qu'avec les sondes G-ON.

Une explication plausible serait de considérer que cette différence est principalement due à l'appariement des fluorophores en dimères non fluorescents, ou fluoresçant à une autre longueur d'onde. Cela reste concevable au vu de la forte densité des sites d'accrochage (> 10^{13} molécules cm^{-2}).[48] Dans ce cas le phénomène serait plus important avec les sondes G-ON qu'avec les sondes Cy3-ON-G car les fluorophores des sondes Cy3-ON-G sont plus proches des sites d'accrochage ce qui les maintient plus ou moins séparés les uns des autres, alors

qu'avec les sondes G-ON, les fluorophores se retrouvent en bout de chaîne, plus libres de se déplacer et de former des dimères.

Cependant, au vu de la dépendance de l'intensité de la fluorescence en fonction de la distance métal/fluorophore, une autre explication apparaît plus plausible. Une séquence d'oligonucléotides 25-mer sans un groupement amino hexyle peut être considérée comme un tube d'une longueur de 8 nm. Comme on peut le voir sur la figure 105b, l'intensité de la fluorescence est 2 à 3 fois plus faible quand l'épaisseur varie de 5 à 15 nm pour la couche de a-$Si_{0,80}C_{0,20}$:H. Le facteur mesuré experimentalement (~2) quand on compare l'intensité du fluorophore avec les sondes Cy3-ON-G (d= 7 nm) et les sondes G-ON (15 nm) est légèrement plus petit, ce qui se conçoit dans la mesure où les duplex ne sont en réalité pas parfaitement perpendiculaires à la surface notamment à cause de la rugosité de surface.

La courbe c (figure 107) montre l'hybridation des cibles Cy5-$\overline{ON}$'' avec les sondes Cy3-ON-G. Cette séquence contient 4 mésappariements (deux à la septième et huitième base en partant de l'extrémité 5' et deux autres à la huitième et neuvième en partant de l'extrémité 3'). En comparant la cinétique d'hybridation pour les cibles on voit que la cinétique est fortement ralentie et que le signal de fluorescence est bien plus bas (diminution d'un facteur ~25). La fluorescence augmente selon une cinétique de premier ordre avec un temps caractéristique de 25 minutes.

Même si un signal de fluorescence est détecté aussi bien pour une hybridation avec les cibles parfaitement complémentaires qu'imparfaitement complémentaires, une analyse quantitative du signal nous permet aisément de différencier les deux situations. Pour une densité de sondes immobilisées connue, l'intensité du signal à la saturation montre que les cibles et les sondes appariées ont une bien plus grande affinité que dans la situation où l'on a mésappariement. Par ailleurs la cinétique beaucoup plus lente pour les cibles (temps caractéristique = quelques minutes pour les cibles parfaitement complémentaires et 25 minutes pour les cibles Cy5-$\overline{ON}$ et Cy5-$\overline{ON}$'') permet aussi d'améliorer encore en pratique la spécificité de reconnaissance sur nos substrats. Cependant, une telle différence de cinétique n'est pas vraiment attendue si l'on considère le cas classique de la formation de la double hélice d'ADN (nucléation d'un appariement sur un ensemble de quelques bases puis appariement complet par un mécanisme de type « fermeture éclair »).[49] En effet, les mésappariements sont localisés au milieu de la séquence permettant la reconnaissance entre 6 à 8 paires de bases de part et d'autre de la séquence. De telles longueurs sont largement suffisantes pour nucléer l'appariement. Ainsi, une influence marginale dans la cinétique

devrait être observée. La cinétique particulièrement ralentie nous suggère ici une interaction entre les sondes immobilisées (gênes stériques, répulsions électrostatiques) qui interviennent lorsque la densité de sondes est trop importante (ce qui est le cas sur nos couches minces). Peterson et coll. ont montré que sur des surfaces d'or, les cinétiques étaient aussi ralenties pour des cibles contenant des mésappariements lorsque la densité de sondes est élevée.[50] Nous pouvons par ailleurs rapprocher ce résultat de ceux obtenus par SPFS au chapitre 3 lors de l'étude de l'hybridation de cibles complémentaires ou non avec des sondes immobilisées sur des surfaces préparées à partir de couches acides diluées 15% (figure 88). On remarque en effet que dans ce cas les cinétiques sont semblables alors que les sondes sont plus diluées. Une dilution des chaînes permet de favoriser la cinétique de l'hybridation et on peut donc tenter d'expliquer le ralentissement de la cinétique observé figure 107 par la présence de gênes stériques. Un scénario possible sur des surfaces où les sondes sont insuffisamment diluées serait qu'une cible puisse s'hybrider avec deux sondes voisines. Ce mécanisme est certainement plus favorable lorsque la cible est partiellement mésappariée avec les sondes. En effet, l'appariement par fermeture éclair se trouve alors bloqué par les substitutions de base, ce qui laisse la partie non appariée de la cible libre de se lier éventuellement avec la partie complémentaire qu'elle peut trouver sur une sonde voisine. L'interaction d'une même cible avec deux sondes distinctes, en bloquant plus ou moins irréversiblement certaines sondes, peut à la fois ralentir la cinétique de reconnaissance et limiter le nombre de cibles susceptibles de se fixer à la surface.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis au point un substrat LSPR à base de silicium amorphe sur des nanoparticules. L'intérêt de l'utilisation de ces couches minces est de pouvoir contrôler à la fois la chimie de surface, grâce à une fonctionnalisation par des monocouches terminées par des groupements carboxyles, et aussi les propriétés optiques des nanoparticules. Ainsi avons-nous pu étudier l'hybridation de brins d'ADN sur un substrat 5 nm a-$Si_{0,8}C_{0,2}$:H/ AuNp /verre par suivi du signal LSPR. Ce substrat présente par ailleurs une très bonne sensibilité (40 nM).

Nous avons montré que sur ce même substrat, il est possible d'étudier l'hybridation de l'ADN par fluorescence couplée aux plasmons de surface localisés. L'intensité de la fluorescence, très élevée (35 fois plus importante que sur une lame commerciale), permet de détecter de faibles quantité d'ADN (limite de détection < 5 fM).

Un aspect particulièrement intéressant de ce substrat est de pouvoir étudier simultanément l'hybridation par fluorescence et l'imagerie par LSPR (même si la sensibilité est plus faible en LSPR). De telles mesures en LSPR et fluorescence n'ont jamais été réalisées et peuvent être obtenues simultanément sans contrainte géométrique particulière, contrairement au cas de la fluorescence couplée au SPR. Cela sera un outil particulièrement intéressant pour la compréhension de réactions compétitives, qui jouent un rôle important dans les essais réalistes nécessaires à de nombreux diagnostics.

Bibliographie

(1) Fort, E.; Grésillon, S. *Journal of Physics D-Applied Physics* **2008**, *41*, 3001-3031.

(2) Lakowicz, J. R. *Plasmonics* **2006**, *1*, 5-33.

(3) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 209-217.

(4) Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 10596-10604.

(5) Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayad, M. A. *Plasmonics* **2007**, *2*, 107-118.

(6) Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 494-521.

(7) Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P. *Nature Materials* **2008**, *7*, 442-453.

(8) Ruach-Nir, I.; Bendikov, T. A.; Doron-Mor, I.; Barkay, Z.; Vaskevich, A.; Rubinstein, I. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 84-92.

(9) Szunerits, S.; Das, M. R.; Boukherroub, R. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 8239-8243.

(10) Whitney, A. V.; Elam, J. W.; Zou, S. L.; Zinovev, A. V.; Stair, P. C.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 20522-20528.

(11) Haes, A. J.; Zou, S. L.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 6961-6968.

(12) Xu, H. X.; Kall, M. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2002**, *87*, 244-249.

(13) Galopin, E.; Noual, A.; Niedziolka-Jonsson, J.; Jonsson-Nedziolka, M.; Akjouj, A.; Pennec, Y.; Djafari-Rouhani, B.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 15921-15927.

(14) Rindzevicius, T.; Alaverdyan, Y.; Kall, M.; Murray, W. A.; Barnes, W. L. *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 11806-11810.

(15) Mie, G. *Ann. Phys* **1908**, *25*, 377.

(16) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 668-677.

(17) McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P. *Nano Letters* **2003**, *3*, 1057-1062.

(18) Galopin, E.; Touahir, L.; Niedziólka-Jönsson, J.; Boukherroub, R.; Gouget-Laemmel, A. C.; Chazalviel, J.-N.; Ozanam, F.; Szunerits, S. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *25*, 1199-1203.

(19) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Sénémaud, C.; Khodja, M. D. *Physical Review B* **1988**, *38*, 13263-13270.

(20) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Tran-Quoc, H. *Physical Review B* **1988**, *38*, 9895-9901.

(21) Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 5599-5611.

(22) Boukherroub, R.; Morin, S.; Bensebaa, F.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **1999**, *15*, 3831-3835.

(23) Faucheux, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N. *Langmuir* **2006**, *22*, 153-162.

(24) Sam, S.; Touahir, L.; Salvador Andresa, J.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Gabouze, N.; Djebbar, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 809-814.

(25) Voicu, R.; Boukherroub, R.; Bartzoka, V.; Ward, T.; Wojtyk, J. T. C.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **2004**, *20*, 11713-11720.

(26) Moraillon, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 7158-7167.

(27) Barnes, W. L. *Journal of Modern Optics* **1998**, *45*, 661-699.

(28) Lakowicz, J. R.; Shen, Y. B.; D'Auria, S.; Malicka, J.; Fang, J. Y.; Gryczynski, Z.; Gryczynski, I. *Analytical Biochemistry* **2002**, *301*, 261-277.

(29) Chen, Y.; Munechika, K.; Ginger, D. S. *Nano Letters* **2007**, *7*, 690-696.

(30) Pompa, P. P.; Martiradonna, L.; Della Torre, A.; Della Sala, F.; Manna, L.; De Vittorio, M.; Calabi, F.; Cingolani, R.; Rinaldi, R. *Nature Nanotechnology* **2006**, *1*, 126-130.

(31) Ray, K.; Badugu, R.; Lakowicz, J. R. *Langmuir* **2006**, *22*, 8374-8378.

(32) Stranik, O.; McEvoy, H. M.; McDonagh, C.; MacCraith, B. D. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2005**, *107*, 148-153.

(33) Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L. *Physical Review Letters* **2006**, *96*, 3002-3005.

(34) Aslan, K.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Matveeva, E.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, *16*, 55-62.

(35) Thomas, M.; Greffet, J. J.; Carminati, R.; Arias-Gonzalez, J. R. *Applied Physics Letters* **2004**, *85*, 3863-3865.

(36) Malicka, J.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Lakowicz, J. R. *Analytical Biochemistry* **2003**, *315*, 57-66.

(37) Bendikov, T. A.; Rabinkov, A.; Karakouz, T.; Vaskevich, A.; Rubinstein, I. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 7487-7498.

(38) Luo, Y.; Ruff, J.; Ray, R.; Gu, Y. L.; Ploehn, H. J.; Scrivens, W. A. *Chemistry of Materials* **2005**, *17*, 5014-5023.

(39) Malinsky, M. D.; Kelly, K. L.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 1471-1482.

(40) Irit, N.; Bendikov, T. A.; Doron-Mor, I.; Barkay, Z.; Vaskevich, A.; Rubinstein, I. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 84-92.

(41) Okamoto, T.; Yamaguchi, I.; Kobayashi, T. *Optics Letters* **2000**, *25*, 372-374.

(42) Lee, K. S.; El-Sayed, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 19220-19225.

(43) Link, S.; Wang, Z. L.; El-Sayed, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 3529-3533.

(44) Mulvaney, P. *Langmuir* **1996**, *12*, 788-800.

(45) Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chemistry* **1993**, *4*, 105-111.

(46) Lakowicz, J. R.; Malicka, J.; Gryczynski, I. *Biotechniques* **2003**, *34*, 62-68.

(47) Yu, F.; Persson, B.; Lofas, S.; Knoll, W. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8902-8903.

(48) Touahir, L.; Moraillon, A.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; de Villeneuve, C. H.; Ozanam, F.; Solomon, I.; Gouget-Laemmel, A. C. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *25*, 952-955.

(49) *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions in Nucleic Acids: structures, properties, and functions, Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, Jr., I.*; Turner, D. H., Ed.; University Science Books, Sausalito, CA 2000.

(50) Peterson, A. W.; Wolf, L. K.; Georgiadis, R. M. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 14601-14607.

Conclusion générale

Ce travail de thèse consistait en l'élaboration de nouvelles architectures de biocapteurs ultra sensibles permettant le contrôle de la physico-chimie des sondes immobilisées. Cette étude repose sur l'utilisation de couches minces de silicium amorphe carboné pour le développement de nouvelles puces à ADN avec différents procédés d'analyse, tels que la fluorescence, la résonance de plasmons de surface ou la résonance de plasmons de surface localisés.

Sous forme cristalline, il est difficile d'envisager de profiter du savoir-faire permettant de préparer des surfaces de silicium maîtrisées à l'échelle atomique car c'est un substrat qui pénalise fortement l'efficacité de luminescence et est inutilisable pour une architecture SPR.

Nous avons pu cependant montrer qu'il était possible de surmonter ces difficultés, et qu'au contraire l'utilisation de couches minces à base de silicium est une solution très efficace pour mettre au point des architectures performantes. Les raisons du succès : i) la possibilité de transposer facilement les procédures de greffage très contrôlées du silicium cristallin au silicium amorphe ; ii) la faculté des couches moléculaires ainsi greffées de protéger efficacement le silicium amorphe, y compris en milieu physiologique ; iii) la possibilité d'utiliser une couche mince adaptée pour augmenter la photoluminescence au lieu de subir une forte atténuation, et la possibilité d'utiliser une couche ultramince pour revêtir une structure exploitant la résonance plasmon, sans dégrader notablement la largeur de la résonance, donc la sensibilité ; iv) la faculté d'utiliser des alliages de silicium amorphe carboné pour ajuster finement les propriétés optiques de la couche mince.

Ces couches présentent aussi l'intérêt de pouvoir être déposées sur plusieurs substrats, tels des lames de verre, des miroirs de Bragg, de l'aluminium, de l'or ou de l'argent. Ceci permet de combiner l'effet bénéfique de la chimie de surface et aussi de la sensibilité optique suivant les différentes techniques de mesure.

Grâce à des mesures par fluorescence, nous avons montré que la chimie de surface permet une exaltation de la fluorescence d'un facteur 4 par rapport aux lames commerciales et que l'adsorption non spécifique est très faible pour de tels substrats.

En combinant l'effet de la chimie de surface et la sensibilité optique des différents capteurs (miroir de Bragg pour la fluorescence, couche d'argent pour le SPR, nanoparticules d'or avec un espaceur de 5 nm pour le LSPR), nous avons montré qu'il est possible de

détecter des quantités très faibles de cibles, inférieures à 5 fM, grâce à des facteurs d'exaltation de fluorescence allant jusqu'à 2 ordres de grandeur. Il faudrait cependant pouvoir déterminer la limite de détection des différents capteurs en utilisant des cibles avec des concentrations plus faibles (de 5 aM à 500 fM).

La très bonne sensibilité a permis de réaliser des mesures in situ, qui conduisent à la détermination de constantes d'association et de cinétique d'hybridation. En effet grâce à de telles mesures nous avons pu observer des différences d'intensité pour des brins complémentaires et non-complémentaires avec plus ou moins d'appariements, montrant ainsi la spécificité de notre chimie de surface.

La réalisation de couches organiques ordonnées sur silicium amorphe carboné avec une densité de sites actifs variable et une forte résistance chimique permet par ailleurs la réutilisation des lames. Cette réutilisation a été testée et démontrée par fluorescence lors de traitements chimiques ou thermiques (fusion).

Les puces à ADN développées au cours de cette thèse peuvent servir à une approche fondamentale du mécanisme d'hybridation. Afin de favoriser l'hybridation, les surfaces acides peuvent être diluées davantage en rationalisant les différentes façons de le faire, en jouant sur le taux de carbone des couches, la dilution des fonctions acides au sein de la couche moléculaire initialement greffée, ou encore la concentration des solutions d'immobilisation Ceci devrait permettre une diminution des gênes stériques et un meilleur contrôle de la quantité de sondes immobilisées. Par leur structure et leur chimie contrôlée, les biopuces mises au point ouvrent la voie aux études fondamentales sur les interactions et l'auto-organisation en surface de molécules ou biomolécules. Elles peuvent par ailleurs être utilisées pour étudier d'autres types d'interactions, comme celles entre protéines.

Les couches minces de silicium amorphe carboné fonctionnalisées sont aussi d'un intérêt croissant pour plusieurs applications. Elles peuvent en effet servir de support à l'élaboration de guides d'onde pour procéder à des études d'interactions par fluorescence en limitent la fluorescence de la solution, ou encore servir de couche de greffage pour des capteurs à effet de champ, afin de caractériser les réactions de reconnaissance moléculaire par des mesures électriques.

Remerciements

Après ces années de travail pour obtenir le grade de docteur de l'école polytechnique, je ne saurais conclure ce mémoire sans remercier toutes les personnes qui ont contribué à mon épanouissement tant professionnel que personnel. Ce fut une expérience extraordinaire, que je ne peux limiter à ce manuscrit synthétisant mes résultats scientifiques. Il me sera difficile au travers des quelques lignes suivantes de témoigner toute ma reconnaissance tant j'ai apprécié cette période de ma vie. Je tiens à remercier tous ceux qui ont cru en moi, qui m'ont accompagné, qui m'ont soutenu.

Merci tout d'abord à mes encadrants François Ozanam et Anne Chantal Gouget-Laemmel. C'est d'abord Anne Chantal qui m'a encadré et mis sur les rails de façon remarquable. Son enthousiasme, sa disponibilité, son sens de la pédagogie, sa bonne humeur ne sont que quelques qualités qui lui sont propres et qui font d'elle une directrice de thèse remarquable. Je n'ai jamais ressenti son absence même durant son congé de maternité. Sa grossesse fut même d'ailleurs une aubaine car cela m'a permis d'être très rapidement autonome sur la chimie de surface. Travailler à ses côtés, écrire nos papiers, nos résumés pour les conférences, discuter auront été des moments très agréables. Nos nombreux fous rires témoignent de l'excellente relation que nous avons. Elle a toujours su être critique et me féliciter dès les premiers résultats significatifs obtenus, elle a été d'un soutien exceptionnel… je ne saurais lui dire combien je l'apprécie…le temps me permettra de le lui témoigner et je suis certain que je parlerai d'elle comme elle parle de son directeur de thèse…les yeux qui brillent !!! (n'est-ce pas Alistair…)

Merci à François. J'ai rapidement eu une très bonne complicité et ce n'est pas un hasard si c'est la première personne que j'ai tutoyée au laboratoire dont il est le directeur. Je pourrais aussi écrire de nombreuses lignes le concernant tant ses qualités sont grandes et nombreuses. Sa simplicité, son intelligence, sa sympathie à l'égard de tous, sa loyauté, sa disponibilité, sa curiosité scientifique, son sens du travail en équipe, sa confiance en moi mais surtout son amitié m'auront permis de faire ma thèse dans d'excellentes conditions. Ces quelques lignes (qu'il reconnaîtra sans doute) sont un moyen de lui témoigner toute mon amitié.

Francois « a été omniprésent dans tous les aspects de ce travail. Son extraordinaire dextérité, sa grande rigueur scientifique et son ingéniosité marqueront, je crois pendant longtemps encore ma carrière ». « Sa patience et ses qualités pédagogiques certaines m'ont permis d'apprendre énormément de choses durant ces années. Alors à lui aussi, je veux dire tout simplement merci, beaucoup ».

Merci aussi à Jean-Noël, toujours présent, motivé, ultra disponible et plus qu'efficace de 7h20 à 18h00. Il a été plus qu'un directeur de thèse. Il m'a été agréable de côtoyer quelqu'un d'aussi intelligent, cultivé, manuel…la perfection n'est certes pas de ce monde mais je crois avoir rencontré la personne qui s'en approche le plus tant Jean-Noël est exceptionnel. Il aura été d'une aide remarquable pour les manips in-situ de l'activation, pour le dépôt à épaisseur variable du silicium amorphe, pour ses relectures rapides et minutieuses de nos publications et de ce manuscrit…merci d'avoir pris le train le premier week-end d'avril…

Merci à Ionel Solomon, pour sa bonne humeur, ses blagues tout aussi drôles les unes que les autres, sa qualité de formation, son degré d'exigence, son cadeau qui m'aura beaucoup servi mais surtout pour son goût pour la recherche. Ce fut durant cette thèse une source d'inspiration constante et je ferai en sorte de ne rien oublier de ce que j'ai pu apprendre grâce à lui…

Merci à toute l'équipe d'Electrochimie et Couches Minces. Anne et Sabrina avec qui j'ai passé d'excellents moments dans notre salle de manips à discuter, rire et partager nos résultats (bons et mauvais) pour avancer. Elles ont été moteurs tant sur l'activation que sur la réalisation du premier capteur. Je remercie aussi Philippe responsable du groupe et Catherine pour nos discussions et leur contribution sur l'activation et Fouad pour m'avoir incité à faire mon séminaire labo si tôt.

Merci à Elisabeth, Joanna, Rabah et Sabine pour la collaboration IRI/PMC. Ce travail en commun m'aura permis de découvrir et d'apprendre énormément de choses. Leur dynamisme unique a largement contribué à l'avancée des travaux sur les plasmons de surface. Je remercie Elisabeth pour avoir mis cette collaboration sur pied et pour avoir pris le temps de venir maniper à PMC en semaine comme certains week-ends….

Merci à Toby Jenkins de m'avoir accueilli dans son équipe au département de chimie de Bath. J'y ai passé trois mois extraordinaires où j'ai pu acquérir des résultats très

intéressants et surtout passer de bons moments à travailler en musique. Je remercie tous les thésards de l'équipe de Toby et Petra, Antun, Ellie, Charlie, Jin, Neil, Beckie and Romala… J'espère qu'ils me pardonneront d'avoir écouté les mêmes albums en boucle au labo.

Merci à la fondation de l'école qui m'a financé ce séjour. Je remercie particulièrement Véronique, François, Jean-Bernard et Philippe avec qui j'apprécie de collaborer dans le cadre du travail AX-FX. Je remercie aussi l'AX, associations des anciens élèves et diplômés de l'école polytechnique, qui a vu ses statuts changer et a donc accueilli les doctorants et docteurs de l'X. Merci à tous les membres du conseil d'administration de l'association, c'est pour moi un réel plaisir que d'y être à leur côté et d'échanger sur des sujets très intéressants.

Merci à mes élèves PSC, Clément, Clémence, Charles, Edson, Sylvain et Victoire. Ce fut un plaisir de les encadrer et je les remercie pour le travail qu'ils ont fourni tout au long de leur projet. Je leur suis très reconnaissant de la qualité des résultats obtenus et de leur implication dans le sujet. Je remercie aussi affectueusement Clémentine, Claire, Cyrille et Anna qui ont chacun fait un excellent stage.

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire. Je tiens à remercier Marcel, le directeur adjoint qui m'a accordé son temps pour l'entretien mi-thèse et qui m'aura poussé à commencer la rédaction de ce mémoire dès le début de la troisième année.

Merci aux chercheurs permanents pour leur disponibilité, leur aide et surtout leur bonne humeur. Une dédicace à tous ceux que j'ai croisés à des heures interdites le week-end, le soir ou jour férié notamment Isabelle, Dominique, Mathis, Yves, Denis et spécialement Alistair. Nos discussions m'auront permis de garder ma motivation intacte et je le remercie pour le recul que j'ai pu prendre sur mon travail grâce à lui. Merci aussi à Jacques Peretti, pour son aide précieuse sur les plasmons de surface.

Merci aussi à Khalid. Avoir pu encadrer Claire et Cyrille à ses côtés aura été de très bonnes expériences grâce à son engouement pour la recherche, son incroyable savoir et ses nombreuses idées. J'espère qu'il saura convaincre Sofia de faire une formation par la recherche…

Merci à mes nombreux co-bureaux (Denis G, Nicolas, Alistair, Denis, Mathis et Vu, les visiteurs de la salle info) mais particulièrement Joëlle et François pour m'avoir

supporté et accepté les nombreux coups de téléphone et les nombreux dérangements. Merci à François pour ses relectures de divers documents notamment de ma conclusion…

Merci à l'ensemble du personnel de Genewave particulièrement Françoise, Aurélie, Angélique, Michaël et Pierre-Yves. Je les remercie pour leur accueil, leur disponibilité, leur patience et pour le temps qu'ils ont pris à me former pour maîtriser tous les aspects de la biologie dont j'avais besoin pour mener ma thèse. Je les remercie aussi pour leur formation sur le scanner, le Hyblive (v0-v11 et enfin v1-3…) et le Tecan…

Merci aussi à Tous les ITA du labo. Ils ne sont peut-être pas co-auteurs de mes publications ou brevets mais sans eux rien n'aurait été possible. Je tiens à remercier spécialement Eve, Anne-Marie Jonquères, Annie, Denis, Dominique, André et Bernard pour avoir répondu à mes diverses sollicitations. Un merci particulier à Patrice, Anne-Marie Hernecq et Julien pour leur amitié. Je garderai longtemps en souvenirs mes moments cappucino (matin, midi avec Patrice surtout pendant la rédaction). Je remercie Patrice pour tout ce qu'il a fait pour moi…et pour m'avoir dirigé toujours vers les bonnes personnes. Je remercie Julien qui m'a bien aidé quand je luttais avec mon ordi et Mélanie qui le laissait venir le dimanche me dépanner mon ordi ou m'aider à récupérer une version de mon manuscrit non enregistrée… je les remercie aussi pour les délicieux repas et les très bonnes soirées wii…Enfin merci à Anne-Marie Hernecq, pour sa bonne humeur, sa jovialité quotidienne qui saurait redonner le sourire à n'importe qui, son efficacité au travail et aussi son sens de l'écoute. Grâce à Anne-Marie et Patrice, nous avons pu faire une surprise à Solomon, qui me tenait énormément à cœur. La journée ITA du 7 juin aura été pour moi un moyen de leur témoigner à tous ma très grande reconnaissance.

Merci aussi à tous les thésards et post-docs du labo. Véritable atout du laboratoire, j'ai passé de très bons moments avec presque tous les doctorants que ce soit au laboratoire, sur un terrain de foot, de tennis, de badminton, au mac do, chez moi, chez eux, au bord du lac, au barbecue du labo, au repas de Noël, au ski… Merci donc à Aurélie et Martin, Houria, Hugo et Juliana, Blaise, Vincent, Vu, Nayely, Xaoxin, Magali, Joëlle, Fred, Jason et Marisa, Amel, Alexis, Simon, Dorin, Emmanuel, Morgane, Hanane, Gabriel, Amélie, Juliana, Sabrina, Abdelhak, Nazek, Lynda, Rodolphe, Audrey, Amar, Rodaina et Grégory. Un grand merci à Stéphane pour ses relectures attentives de mon manuscrit, son aide le jour J et nos discussions très passionnantes.

Merci à tous les membres d'X-doc 2008, X-doc 2007. X-doc aura été sans doute l'un des chapitres les plus importants de ma thèse. En tant que président de l'association, je me suis efforcé de mener au mieux toutes les manisfestations où nous étions présents. Ceci à pu être apprécié de tous grâce à des membres motivés et dynamiques. Je remercie donc tous ceux qui ont participé à l'organisation des visites d'entreprise, du tournoi de foot, de la cérémonie de remise des diplômes, des journées d'accueil, de la visite de Jorge Cham, du bar du point Gamma, du X-Forum, des visites de laboratoires…Un clin d'œil particuliers à Antoine, David, Cyril, Anirban, Mahsa, Marion, Thomas, Florian, Gaëlle, Isabelle, Tek et Eric pour m'avoir supporté en tant que prez pendant un an…et j'espère qu'ils sont aussi fiers que moi de tous ce que l'on a pu faire…vive X-doc 2008! Je souhaite aussi remercier Blaise et Marc pour leur investissement en tant que président et trésorier d'X-doc 2010 !

Merci à toutes les personnes de l'Ecole qui m'ont permis de concrétiser beaucoup de projets grâce à leur mise à disposition de nombreux moyens humains comme matériel. Je tiens à remercier chaleureusement les membres de l'EDX : Fabrice, Audrey, Claudette, Christine, Alexandra et Michel Rosso. Ils contribuent au rayonnement de la formation par la recherche de l'Ecole tant ils s'investissent pour les doctorants de l'Ecole. Merci à Marie-Dominique Pujol et Claude Forsans pour m'avoir donné dès le début de ma thèse de précieux conseils. Je ne saurais qu'inciter les doctorants à suivre leur formation, surtout le NCT. Merci aussi pour les bons moments partagés depuis notre première rencontre. Merci aussi à Brigitte Duret d'avoir autant fait pour l'insertion des doctorants dans les visites d'entreprises et les ateliers de formations destinés aux élèves ingénieurs. Merci aussi à toute l'équipe de la communication Jean, Nathalie, Alexandra, Sabine et Pauline. Merci aussi à Isabelle, Aymeric, Anne et Sylvain de GEPPM (une grande école pourquoi pas moi), j'ai beaucoup apprécié nos discussions sur le sujet de la diversité et surtout nos nombreux échanges avec les jeunes lycéens ou collégiens. Les visites du laboratoire sont d'excellents moyens de communiquer avec eux pour éveiller quelques vocations…. Si j'ai pu me sentir intégré et vouloir participer à l'évolution de la vie de l'Ecole, c'est sans doute grâce à l'Amiral Alquier, directeur du cabinet. Sa générosité, ses qualités humaines, sa gentillesse et son ouverture d'esprit sont un atout considérable de l'Ecole polytechnique. Il m'aura permis de croiser et discuter avec le ministre de la défense et de l'enseignement supérieur et de la recherche et même avec le président de la République….

Merci aussi à Gloria et Clarisse de l'Ecole Centrale Paris où j'encadrais les Tps d'optique. Cette expérience a été très enrichissante grâce aux étudiants mais surtout grâce à la bonne ambiance qui y régnait et les qualités humaines des deux mamans hors pair qu'elles sont.

Merci aussi à tous mes amis avec qui j'ai passé de très bons moments avant et pendant la thèse. Ils sont pour moi très importants, je mesure au quotidien la chance que j'ai d'avoir de si bons amis présents dans toutes les circonstances. Je remercie chaleureusement Romain et Séverine, Pierre-François et Elodie, Adeline, Arlette, Henri, Niassa, Louis, Sébastien, Arnaud, Fatima, Gaëlle, Elisabeth, Caroline, Erwan, Pierre et Céline, Pépette et Kpu… J'en profite pour remercier mes amis de Karlsruhe et Garoche voyages qui m'aura permis de les revoir et de passer d'agréables séjours pendant ma thèse en Slovénie, Allemagne, Angleterre, Turquie, Canada…Un grand merci à vous tous !

Merci à Moussa et Halima. Je les remercie pour nos grandes soirées dolipranes et surtout pour l'amitié réciproque qu'ils me témoignent depuis de nombreuses années. Merci aussi à Khelti Bert pour ses nombreuses invocations… Je remercie aussi la famille Azizi pour le respect et l'amitié qu'ils ont toujours témoignés à ma famille. J'ai une pensée particulière pour Khelti Kheira, que je considérais comme ma grand-mère de cœur.

Merci à la famille Verhaeghe, Catherine, Yves, Mathieu et surtout Romain. Depuis 10 ans une amitié véritable nous lie. Je lui dédicace cette thèse pour le soutien qu'il m'a apporté depuis mes premières années de classe préparatoire jusqu'à la soutenance de thèse. Il a toujours eu une grande confiance en moi et cela m'a permis de franchir de nombreux obstacles. Il a été et reste un modèle pour moi. Je souhaite à Romain et Séverine tout le bonheur qu'ils méritent.

Merci aussi à mon jury de thèse. Henri Benisty et Claire-Marie Pradier pour avoir accepté le rôle de rapporteur et avoir lu mon manuscrit avec tant d'attention. Je les remercie aussi pour la qualité de l'échange que nous avons pu avoir le jour de la soutenance. Merci à Martin Stutzmann, examinateur, pour s'être déplacé un jour de grève à Paris malgré son agenda très chargé. Ce fut pour moi un plaisir d'avoir un scientifique allemand dans mon jury, de surcroît de renom, d'autant plus que la première publication lue au début de ma thèse était une des siennes. Enfin je remercie Sabine Szunerits d'avoir accepté de présider mon jury de

thèse. Je ne saurais la remercier convenablement tant elle m'a apporté. Je ne peux que la féliciter d'être comme elle est, souriante, agréable, intelligente, dynamique…unique !

Merci à tous ceux que je viens de citer mais aussi à ceux que j'aurai pu oublier comme mes anciens directeurs de stage Lutz Müller, Michael Hüttinger, Jérôme Touzel, Suzanne Maximovitch, Francis Dalard, mes anciens directeur d'Ecole Jean-Claude Poignet, Jean-Pierre Petit, mes profs de prépas la Duquette, la Zymette, Mr Morin,.. mes profs de lycée Mme Pateau, Mme Lamps, Mr Miro, Mme Huet, Mr Verdière… mes profs de collège Mr Calo, Mme Boniface, Mme Ledoux,… et enfin mes instituteurs Mr Amat et Mr Arnaud…bref tous ceux qui m'ont marqué et que je n'oublierai jamais.

Merci enfin à ma famille, Bouya, Ma, Fafa, Saada, Aicha, Zahia, Barta, Mustapha, Belaid et Smain. Ce sont des êtres qui me sont très chers et qui représentent tant à mes yeux. Si j'ai pu faire ma thèse, c'est qu'ils ont toujours été là de ma plus tendre enfance jusqu'à la soutenance. Je mesure au quotidien la chance d'avoir une famille aussi extraordinaire et les remercie pour m'avoir soutenu pendant ces nombreuses années (et à n'importe quelle heure… même un fameux 26 juin 2009 à 3h00…). Je remercie aussi mes neveux et nièces, les deux rayons de soleil de ma thèse Sofia et Anissa, qui m'ont aussi beaucoup apporté durant ces dernières années.

Merci à Tous…

Je conclurai sur une phrase extraite de la vie est belle (elle l'a été pendant ma thèse) de Capra, « Un homme ne connaît pas l'échec s'il a des amis » !

Publications, brevets et conférences

Publications :

L. Touahir, A. Moraillon, P. Allongue, J.-N. Chazalviel, C. Henry de Villeneuve, F. Ozanam, I. Solomon, A.C. Gouget-Laemmel, Biosensors & Bioelectronics, 2009, 25, 952-955.

L. Touahir, E. Galopin, R. Boukherroub, A. C. Gouget-Laemmel, J.-N. Chazalviel, F. Ozanam, S. Szunerits, Biosensors & Bioelectronics, 2010, 25, 2579-2585.

L. Touahir, A. Moraillon, S. Sam, A. C. Gouget-Laemmel, P. Allongue, J.-N. Chazalviel, C. Henry de Villeneuve, F. Ozanam, ECS Transactions 2009,19,283-292.

L. Touahir, J. Niedziółka-Jönsson, E. Galopin, R. Boukherroub, A. C. Gouget-Laemmel I. Solomon, M. Petukhov, J.-N. Chazalviel, F. Ozanam, S. Szunerits, Langmuir, 2010, 26, 6058–6065.

L. Touahir, S. Sam, A. Moraillon, F. Ozanam, J.-N. Chazalviel, P. Allongue, C. Henry de Villeneuve, N. Gabouze, S. Djebbar, A. C. Gouget-Laemmel, Sensor Letters, 2010, 8, 447-456.

E. Galopin, **L. Touahir**, J. Niedziółka-Jönsson, R. Boukherroub, A. C. Gouget-Laemmel, J.-N. Chazalviel, F. Ozanam, S. Szunerits, Biosensors & Bioelectronics, 2010, 25, 1199–1203.

S. Sam, **L. Touahir**, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J.-N. Chazalviel, A. C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, N. Gabouze, S. Djebbar, Langmuir, 2010, 26, 809–814.

L. Touahir, P. Allongue, D. Aureau, R. Boukherroub, J.-N. Chazalviel, E. Galopin, A. C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, J. Niedziółka-Jönsson, F. Ozanam, J. Salvador Andresa, S. Sam, I. Solomon, S. Szunerits, Bioelectrochemistry, 2010, in press, doi :10.1016/j.bioelechem.2010.03.011.

Brevets :

Touahir, Galopin, Boukherroub, Chazalviel, Gouget-Laemmel, Szunerits, Ozanam;
FR 09 02747 déposé le 5 juin 2009 (École Polytechnique, CNRS, Université Lille1)
Utilisation d'une couche de silicium amorphe et procédés d'analyse

Jordy, Caillon, Roumegous, Gacoin, Ozanam, Kocan, **Touahir** ;
FR 10 50613 déposé le 28 janvier 2010 (Saft, CNRS, École Polytechnique)
Matière active à base de silicium greffé pour électrode négative d'accumulateur au lithium

Conférences :

Biosensors 2010 (Glasgow- United Kingdom)
Poster: Amorphous silicon carbon alloys for efficient sensing through localized surface plasmon and fluorescence detection

Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing 2009 (Prezgorzaly – Pologne)
Keynote Lecture: Highly sensitive biosensors based on amorphous silicon carbon alloys

E-MRS Spring Meeting 2009 (Strasbourg - France)
Oral: Innovating and efficient biosensors based on amorphous silicon

12th Meeting Young Researchers & Life Sciences 2009 (Paris - France)
Oral: Innovating and efficient biosensors based on amorphous silicon

Interdisciplinary school on Nano Objects in Living cells 2008 (Lille - France)
Poster: Amorphous silicon for efficient biochips

Les biopuces sont des outils d'analyse et de diagnostic de plus en plus utilisés dans le domaine de la génétique et de la pharmacie. Cette thèse s'est plus particulièrement intéressée aux puces à ADN qui sont constituées d'un support sur lequel sont fixés des brins d'ADN. On détecte l'hybridation de ces brins avec des cibles de séquence complémentaire présentes au sein d'un échantillon. Cette détection se fait généralement par des mesures de fluorescence. En l'absence de marqueurs fluorescents on utilise souvent une détection par résonance plasmon. Cette thèse a permis de développer de nouvelles architectures visant à améliorer les performances finales de ces dispositifs. La sensibilité (optimisation de la densité de sondes), la sélectivité (minimisation des adsorptions non spécifiques) et la reproductibilité sont très fortement dépendantes de la structure et des propriétés physico-chimiques de la première couche moléculaire utilisée pour l'immobilisation des sondes. L'incorporation d'une couche de silicium amorphe carboné au sein de l'architecture a permis de tirer profit des avancées réalisées ces dernières années dans la chimie de greffage du silicium. En optimisant les caractéristiques de cette couche, on réalise des biopuces présentant une grande stabilité et une sensibilité augmentée tant pour la fluorescence que pour la résonance plasmon. En combinant les deux techniques au sein d'un même capteur réutilisable, on peut détecter in situ et en temps réel l'hybridation de brins d'ADN présents dans une solution très diluée ($5\ 10^{-15}$ mol/L) et discriminer efficacement des cibles présentant seulement un mésappariement dans leur séquence.

Mots-clés : biocapteur, silicium amorphe carboné, hydrosilylation, hybridation, exaltation de la fluorescence, plasmons de surface, plasmons de surface localisés

Biochips are more and more widely used for genetics or drug-screening applications. DNA chips have been considered here. Single strand DNA probes anchored on a surface hybridize with target molecules present in an assay solution. The recognition event is most often detected by fluorescence. With unlabelled targets, plasmon resonance is generally used for detection. This work has been devoted to the development of new architectures to improve biochips performances. The reliability of probe anchoring to the surface represents a critical issue for state-of-the art biochips. The use of thin layers of amorphous hydrogenated silicon and amorphous silicon-carbon alloys offers a convenient and inexpensive route to improve the reliability and robustness of probe anchoring. This allows for benefiting from recent progress in surface chemistry of silicon, with the possibility to realize direct covalent Si-C bonding. By adjusting the characteristics of the layer, enhanced optical response may be obtained for fluorescence and surface-plasmon resonance detection. Both techniques can be combined into the same reusable sensor, allowing for the detection of highly diluted DNA targets ($5\ 10^{-15}$ mol/L) and single mismatch discrimination.

Keywords: biosensor, amorphous silicon carbon alloy, hydrosilylation, hybridization, fluorescence enhancement, surface plasmon, localized surface plasmon