

N° d'ordre : 40237

**UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE,
LILLE1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

Ecole Doctorale Sciences Pour l'Ingénieur

Doctorat

Spécialité Micro et Nanotechnologies, Acoustique et Télécommunications

Présenté par Gaëlle OFFRANC PIRET

Nanofils de silicium pour une analyse sensible de biomolécules par spectrométrie de masse et pour l'adressage fluide de cellules, en vue des applications laboratoires sur puce et biopuces.

Thèse soutenue le 16 février 2010

<u>Directeur de thèse</u>	Rabah Boukherroub,	Directeur de Recherche, Université de Lille
<u>Rapporteurs</u>	Jean-Claude Tabet	Professeur, Université de Paris UPMC
	Christophe Vieu	Professeur, Ecole INSA de Toulouse
<u>Examineurs</u>	Tuami Lasri	Professeur, Université de Lille
	Oleg Melnyk	Directeur de Recherche, Université de Lille
	Dominique Legrand	Chargé de Recherche, Université de Lille
	Daniel Riveline	Chargé de Recherche, Université de Strasbourg
	Pascal Maigné	Responsable de Domaine Scientifique, DGA

« Inventer, c'est penser à coté »

Albert Einstein

« L'homme et sa sécurité doivent constituer la première préoccupation de toute aventure technologique »

Albert Einstein

« C'est une triste chose de songer que la nature parle et que le genre humain n'écoute pas »

Victor Hugo

« Savoir que l'on sait ce que l'on sait, et savoir que l'on ne sait pas ce que l'on ne sait pas: voilà la véritable science »

Confucius

A mes proches.

Remerciements

Je présente mes remerciements à Messieurs Bernard Vandebunder et Ralf Blossey, qui ont été successivement les directeurs du laboratoire IRI durant ma thèse, ainsi que Monsieur Alain Cappy, directeur de l'EMN, pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires.

Je tiens à remercier Messieurs Jean Claude Tabet et Christophe Vieu, respectivement Professeurs à l'université UPMC de Paris et à l'école INSA de Toulouse pour avoir accepté d'examiner mon travail ainsi que pour leur participation au jury.

Pour avoir participé au jury et pour leur intérêt pour ce travail, je remercie Daniel Riveline, Chargé de Recherche à l'Université de Strasbourg, ainsi que Pascal Maigné, Responsable de Domaine Scientifique de la DGA.

J'adresse particulièrement mes remerciements à Monsieur Tuami Lasri, Professeur à l'université de Lille, qui a accepté de présider ce Jury de thèse.

Je remercie très sincèrement Monsieur Rabah Boukherroub, mon directeur de thèse, de m'avoir encadrée et accueillie au sein de son équipe. Je lui suis réellement reconnaissante pour le partage, durant ma thèse et encore aujourd'hui, de ses savoirs pluridisciplinaires, de son dynamisme, de sa rigueur scientifique et de sa profusion d'idées. Je le remercie également d'avoir organisé mon séjour scientifique à Tokyo, dans le cadre de sa collaboration avec le laboratoire du professeur Nobuyoshi Koshida (Department of Electrical Engineering, University of Agriculture and Technology). Je remercie Monsieur Bernard Gelloz de m'y avoir accueillie. Je n'oublierai jamais 'le natto', déjeuner préféré de certains japonais - à goûter absolument pour les curieux - ainsi que le restaurant avec le poisson encore semi-vivant qu'on y mange et l'appétissante crêpe pizza "Okonomiyaki" présentant des lamelles de poisson séché qui dansent. Finalement, merci encore pour les rencontres avec de jeunes chercheurs internationaux qui ont fait partie de son équipe (indiens, Manash & Manjusha ; chinois, Mei, Hong Qin ; vietnamiens, Nhung , algériens, Mohamed, Hana, Karima, Nawel, Nacera ; polonais, Joanna & Martin ; autrichiens, Véra ; italiens, Paolo ; américains Keith et Holly ; et biensûr les français ☺, Yannick, Elisabeth, Florian, Lionel) et donc merci à toute l'équipe pour les soirées et surtout les "Rateaux" délicieux qu'on a goûtés ensemble.

Je tiens également à exprimer mes plus sincères remerciements à Yannick Coffinier, Chargé de Recherche, et Elisabeth Galopin, pour leur soutien, leurs conseils, pour les discussions et le partage de leurs connaissances en biologie et en microfluidique.

Je remercie les personnes avec lesquelles j'ai collaboré, qui m'ont chaleureusement accueillie au sein de leurs équipes. Merci à Oleg Melnyk, Directeur de Recherche, d'avoir participé au jury de ma thèse et de m'avoir accueillie dans son groupe Chimie des

biomolécules de l'Institut Biologie de Lille. Merci également à Hervé Drobecq et à Rémi Desmet pour le travail mené à bien en collaboration et pour leur convivialité. Je remercie Dominique Legrand, Chargé de Recherche à l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle à Lille, pour avoir participé à mon jury, pour m'avoir initié à la manipulation stérile pour la culture cellulaire mais aussi pour son inventivité (pour la recherche et ... pour les blagues ☺). Merci à Vincent Thomy, Maître de Conférences à l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies, pour ses conseils et les discussions menées autour du projet de développement du laboratoire sur puce. Merci à Brigitte Sieber, Chargée de Recherche au Laboratoire de Structure et Propriétés de l'Etat Solide pour ses conseils, les discussions orientées physique des matériaux, le travail et les conférences partagés ensemble. Merci à Mohamed Bouzaoui, et à Bruno Capoen, respectivement Professeur et Maître de Conférences au laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules, pour leur collaboration et pour les mesures de photoluminescence réalisées. Je remercie aussi Christine Faille, Responsable de la structure de recherche des Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux à l'Institut National de Recherche Agronomique de Villeneuve d'Ascq, ainsi que Yannick Lequette, pour leur collaboration et leur engouement pour les études que nous avons lancées et réalisées.

J'adresse mes remerciements aux techniciens et ingénieurs de la salle blanche de l'IEMN pour leurs compétences, leur disponibilité, leur attention et conseils, leur bonne humeur et pour les formations administrées avec patience.

Je remercie aussi tous les doctorants et post-doctorants tant croisés en salle blanche d'avoir partagé les moments difficiles de la recherche quand "ça devrait marcher mais ... ça ne veut pas marcher". Je remercie particulièrement Alex et Salim pour leur divertissement théâtral et qualités de comédiens. Sans tout ce petit monde, parfois des heures en salle blanche n'auraient pas été des minutes ☺

Je remercie enfin très chaleureusement ma famille pour le soutien, le réconfort et la gaieté que l'on s'apporte, et puis mon chéri Olivier, pour sa sagesse, sa délicatesse et sa joie au quotidien.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	7
INTRODUCTION GENERALE	21
CHAPITRE 1 LA SPECTROMETRIE DE MASSE, LA DESORPTION/IONISATION LASER ASSISTEE PAR MATRICE (MALDI), ET LA DESORPTION/IONISATION LASER SUR SILICIUM (DIOS).....	29
1. INTRODUCTION.....	31
2. SOURCES D'IONISATION POUR LA SPECTROMETRIE DE MASSE.	32
2.1. <i>Rapide historique des sources d'ionisations dédiées à l'analyse de biomolécules.</i>	32
2.2. <i>Procédés d'ionisation d'une molécule.</i>	34
2.3. <i>Les sources d'ionisation dure</i>	36
2.3.1. L'ionisation électronique (EI).	36
2.3.2. L'ionisation chimique (CI).....	37
2.3.3. Désorption/ionisation par bombardement rapide d'atomes (FAB)	38
2.4. <i>Les sources d'ionisation douce.</i>	39
2.4.1. Désorption/Ionisation par ElectroSpray (ESI)	39
2.4.2. NanoESI.....	40
2.4.3. L'ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI).....	41
2.4.4. La Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)	41
2.4.5. La Désorption Ionisation sur Silicium poreux (DIOS).....	45
2.5. <i>Conclusion</i>	46
3. LES ANALYSEURS EN SPECTROMETRIE DE MASSE.	46
3.1. <i>L'analyseur quadripolaire (Q)</i>	47
3.2. <i>L'analyseur à trappe ionique (IT)</i>	47
3.3. <i>L'analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FT-ICR ou FT-MS)</i>	48
3.4. <i>L'analyseur à temps de vol (TOF)</i>	49
4. OPTIMISATION DES ANALYSES MALDI-TOF ET TECHNIQUES ALTERNATIVES LDI-MS SANS MATRICE.	50
4.1. <i>Evolution de l'instrumentation du MALDI-TOF</i>	50
4.2. <i>Le mécanisme complexe et encore occulte du MALDI</i>	52
4.2.1. Le protocole de préparation des échantillons	52
4.2.2. L'irradiation laser	52
4.2.3. Ejection des molécules.....	54
4.2.4. L'ionisation.....	54
4.2.5. La dynamique de la « plume »	55
4.3. <i>Limitations du MALDI et techniques alternatives de LDI-MS sans matrice.</i>	56
4.3.1. Applications et enjeux des techniques alternatives de LDI-MS vs MALDI.	56
4.3.2. Mécanisme des analyses LDI-MS sans matrice sur nanostructures.	57
5. CONCLUSION.....	58
6. BIBLIOGRAPHIE	59
CHAPITRE 2 SYNTHÈSE/FABRICATION DE NANOSTRUCTURES DE SILICIUM ET PROPRIÉTÉS.	65

1. INTRODUCTION.....	67
2. SYNTHÈSE DE NANOSTRUCTURES DE SILICIUM.	67
2.1. Croissance de nanofils de silicium par voie Vapeur-Liquide-Solide (VLS)	68
2.2. Fabrication de nanofils de silicium par gravure chimique sans électrode	71
2.3. Formation de nanofils de silicium par procédé Solide-Liquide-Solide (SLS).....	76
3. CHIMIE DE SURFACE.....	77
3.1. Modification chimique des surfaces par silanisation.....	77
3.1.1. Les organosilanes.....	77
3.1.2. Principe de la silanisation	78
3.2. Les liaisons non-covalentes	79
3.2.1. La liaison ionique	79
3.2.2. La liaison hydrogène (interactions polaires)	79
3.2.3. Les forces de Van Der Waals.....	80
3.2.4. Les interactions hydrophobes (ou interactions apolaires).....	80
4. PROPRIÉTÉS DE MOUILLAGE DES NANOFILS DE SILICIUM	81
4.1. Angle de contact.....	81
4.2. L'effet de superhydrophobicité : nanostructures et chimie de surface	84
5. PROPRIÉTÉS OPTIQUES ET THERMIQUE DES NANOSTRUCTURES DE SILICIUM.....	85
5.1. Introduction.....	85
5.2. Les électrons et les photons à l'échelle d'un nanofil.....	86
5.2.1. La masse effective des électrons.	86
5.2.2. Confinement quantique des électrons dans un nanofil.....	87
5.3. Structure de bande d'un nanofil de silicium et photoluminescence.	88
5.3.1. Mesures de photoluminescence d'échantillons de silicium poreux et de nanofils de silicium.	89
5.4. Les phonons et les propriétés thermiques des nanofils de silicium.	91
5.4.1. Le rôle des phonons.	91
5.4.2. Conductivité thermique des nanofils de silicium.	91
5.4.3. Dissipation de la chaleur.	93
6. CONCLUSION.....	93
7. BIBLIOGRAPHIE.....	95
CHAPITRE 3 SPECTROMÉTRIE DE MASSE PAR DESORPTION/IONISATION LASER SUR NANOFILS DE SILICIUM ET NANOTUBES D'OXYDE DE TITANE.	101
1. INTRODUCTION.....	103
2. OPTIMISATION DE LA LDI-MS SUR NANOFILS DE SILICIUM.....	105
2.1. Mouillabilité de surface.	105
2.2. Influence de la fonctionnalisation chimique des nanofils de silicium.	106
2.2.1. Terminaison chimique et tension de surface.	106
2.2.2. Résultats et discussion.....	108
2.3. Influence de la morphologie des nanofils de silicium.	109
2.3.1. Etat de l'art.	109
2.3.1. Résultats.	112

2.3.2. Discussion.....	114
2.4. Désorption/ionisation, transfert d'énergie aux analytes.....	115
2.4.1. Propriétés optiques des nanofils de silicium.....	116
2.4.2. Propriétés thermiques des nanofils de silicium.....	119
2.5. Confinement de la chaleur dans les nanofils.....	121
2.5.1. Réduction taille du cœur de silicium : oxydation partielle.....	121
2.5.2. Densité des nanofils de silicium, infiltration des peptides et transfert d'énergie.....	122
2.5.3. Nature du substrat des nanofils de silicium.....	124
2.5.4. Dopage et cristallinité des nanofils de silicium.....	124
2.6. Conclusion et perspectives.....	125
3. NANOFILS DE SILICIUM ET PERFORMANCES EN LDI-MS.....	127
3.1. Haute sensibilité de détection pour des composés de petites masses.....	127
3.2. Validation à l'analyse protéomique.....	129
3.2.1. Introduction à la protéomique.....	129
3.3. Conclusion.....	133
4. ANALYSES LDI-MS SUR NANOTUBES DE TiO ₂ SANS MATRICE.....	134
4.1. TiO ₂ et MALDI.....	134
4.2. Optimisation et performances de la LDI-MS sur nanotubes de TiO ₂ sans matrice.....	135
4.2.1. Préparation des nanotubes de TiO ₂	135
4.2.2. Résultats en LDI-MS sur nanotubes de TiO ₂	137
5. CONCLUSION.....	139
6. BIBLIOGRAPHIE.....	141
CHAPITRE 4 ANALYSES LDI-MS SUR NANOFILS DE SILICIUM POUR DES APPLICATIONS BIOPUCE ET	
LABORATOIRE SUR PUCE.....	147
1. INTRODUCTION.....	149
2. SUIVI DE LA METHYLATION DE PEPTIDES « IN SITU » SUR NANOFILS DE SILICIUM POUR LE DEVELOPPEMENT D'UNE BIOPUCE A	
PEPTIDES.....	151
2.1. Principe de la biopuce.....	151
2.2. La méthylation.....	151
2.3. Biopuces à peptides méthylés.....	152
2.3.1. Principe des biopuces à peptides méthylés.....	152
2.3.2. Préparation des biopuces à peptides méthylés.....	152
2.4. Suivi de la méthylation de peptides adsorbés sur nanofils de silicium par LDI-MS.....	153
2.4.1. Immobilisation des peptides sur les nanofils de silicium.....	153
2.4.2. Méthylation des peptides in situ: protocole expérimental.....	154
2.4.3. Analyse par spectrométrie de masse de la cinétique de méthylation des peptides.....	155
2.5. Conclusion.....	156
3. LABORATOIRE SUR PUCE POUR UN DEPLACEMENT DE LIQUIDES BIOLOGIQUES PAR EWOD ET UNE ANALYSE PAR LDI-MS.....	157
3.1. Déplacement de goutte par électromouillage sur diélectrique : EWOD.....	157
3.2. Le microsystème EWOD.....	159
3.2.1. Capot de nanofils de silicium pour analyses LDI-MS.....	159

3.2.2. Instrumentation	160
3.2.3. Déplacement de goutte et taille des plots.	161
3.2.4. Validation du dépôt spécifique dans les plots.	162
3.3. Paramètres de réduction de l'adsorption non spécifique.	163
3.3.1. Analyse fluorescence	164
3.3.2. Résultats en LDI-MS sur nanofils de silicium.....	165
3.4. Conclusion et perspectives.....	167
4. CONCLUSION.....	168
5. BIBLIOGRAPHIE.....	169
CHAPITRE 5 IMMOBILISATION LOCALISEE DE CELLULES ET DE SPORES SUR NANOFILS DE SILICIUM	173
1. INTRODUCTION.....	175
2. IMMOBILISATION LOCALISEE DE CELLULES SUR NANOFILS DE SILICIUM ET VIABILITE DES CELLULES.	175
2.1. Etat de l'art.....	176
2.1.1. Les techniques d'immobilisation de cellules.....	176
2.1.2. Interaction cellules/nanofils.	178
2.2. Immobilisation localisée de cellules ovariennes d'hamster chinois sur nanofils de silicium.....	179
2.2.1. Immobilisation par voie chimique des cellules sur nanofils de silicium.	179
2.2.2. Interface cellules/ nanofils de silicium.....	182
2.2.3. Discussion et interprétation des résultats	183
2.3. Viabilité des cellules et processus passif d'interaction avec les nanofils de silicium.	185
2.4. Perspective : localisation de cellules sur surface plane à l'aide de nanofils de silicium.....	187
3. ANTI-ADHESION DE SPORES HYDROPHOBES SUR DES NANOFILS DE SILICIUM SUPERHYDROPHILES.	188
3.1. Adhésion de spores sur l'acier	188
3.2. Adhésion sélective de spores <i>Bacillus Cereus</i> sur nanofils de silicium dans des zones hydrophobes et superhydrophobes.....	190
3.3. Influence de la micro/nano structuration de surface sur la rétention de spores soumises à la pression d'un flux microfluidique.....	193
4. CONCLUSION.....	195
5. BIBLIOGRAPHIE.....	196
CONCLUSION GENERALE	201
- ANNEXES -.....	207
ANNEXE 1 – HYSTERESIS, SUPERHYDROPHOBICITE, SUPEROLEOPHOBICITE.....	209
ANNEXE 2 – REALISATION DE MOTIFS HYDROPHILES/HYDROPHOBES OU DE PLOTS DE NANOFILS DE SILICIUM SUR UNE SURFACE PAR LITHOGRAPHIE OPTIQUE.....	212
ANNEXE 3 - PROTOCOLE POUR L'IMAGERIE MEB/TEM DE CELLULES ADHEREES SUR SURFACE.	215
- INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS -	219
- PUBLICATIONS ET CONFERENCES -	225

Introduction générale

Les nanosciences, les nanotechnologies et les nanomatériaux constituent des enjeux majeurs pour la santé, l'environnement, la sécurité et le confort de demain.¹ On associe au préfixe « nano » une dimension mille fois inférieure à celle du micron (l'épaisseur moyenne d'un cheveu est de 100 micromètres, la taille moyenne d'un atome est de 0,1 nanomètre). A l'échelle sub-micronique ou nanométrique (de 100 nm à 0,1 nm), de nouvelles propriétés physiques et de nouveaux phénomènes apparaissent, et mènent à de nouveaux défis autant techniques que scientifiques.² C'est grâce au développement de nombreux outils de manipulation (lithographie, gravure, auto-assemblage, ...) et d'observation (Microscope à effet Tunnel (STM) mis au point en 1981, Microscope à balayage électronique (MEB), le Microscope à force atomique (AFM), Microscope optique à champ proche (SNOM), ...) que ces nouveaux phénomènes ont été découverts, continuent d'être mis en évidence et deviennent petit à petit maîtrisables. Aujourd'hui, les applications industrielles sont multiples et dans des champs de plus en plus divers.

En ce qui concerne les technologies de la communication et de l'information, il serait possible de traiter des données, les stocker, et communiquer avec des capacités largement supérieures à ce que l'on fait de nos jours. Les composants nanoélectroniques pourraient améliorer la qualité et les puissances de calcul tout en nécessitant une faible consommation électrique : transistor à un électron, électronique moléculaire, transfert de quanta de flux magnétique,^{3,4} structures mésoscopiques, circuits à haute densité d'intégration.⁵ Le nanomagnétisme présente un grand potentiel pour le stockage d'informations (spintronique).⁶ Les matériaux à bande interdite photonique sont eux, déjà employés dans les télécommunications. Enfin, l'électronique bas coût et/ou sur substrat flexible progresse à grand pas.

L'environnement est aussi au cœur d'une série d'innovations exploitant les nanotechnologies. De nouveaux dispositifs nanostructurés sont élaborés pour la production d'énergie (photovoltaïque, pile à combustible, accumulateurs, biomimétisme des organismes photosynthétiques, nanofiltres pour la dépollution, ...). Il s'agit également de matériaux comme le bois, les biopolymères et les composites qui peuvent être alliés à des nanoparticules d'argile ou d'autre matière, pour acquérir de nouvelles propriétés mécaniques et optiques. Finalement, la diminution des transports si énergétivores sera de plus en plus envisageable dans notre quotidien grâce à l'amélioration (options, adaptabilité, confort d'utilisation, ...) des outils de communication et d'information (téléconférence, réalité virtuelle).

Aussi, l'étude des phénomènes à de très petites échelles et à l'embranchement de diverses disciplines comme les micro/nanotechnologies, la chimie, la biologie, l'informatique et la physique est très prometteuse pour le domaine de la santé : automatisation des diagnostics au niveau moléculaire, suivi de l'activité d'une cellule en améliorant les temps et les sensibilités des systèmes d'analyse (biopuces, laboratoires sur puce), implants,⁷ prothèses intelligentes⁸ (organes sensoriels, contrôle locomoteur, commande d'ordinateur par ondes cérébrales, interface homme/machine⁹), nanoparticules capables de cibler et neutraliser les cellules cancéreuses.¹⁰

Les ruptures et innovations émergent donc de plusieurs disciplines et des interactions transversales entre celles-ci. C'est de ce constat que s'est créé l'Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI), doté au sein du même établissement (inauguré ce mois de juin 2009), de salles et de matériel expérimental dédiés à la fois à la biologie cellulaire et moléculaire, à la chimie et à la physique. Aussi, l'architecture du bâtiment accueillant les chercheurs de l'IRI vise à favoriser la communication et la création de nombreuses collaborations. Les chercheurs de l'IRI ont également accès au centre de hautes technologies situé à quelques pas : l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN).

Ce travail de thèse, financé par la DGA et réalisé au sein du groupe NanoBiointerfaces de l'IRI, dirigé par R. Boukherroub, consiste à développer un support de nanofils de silicium pour améliorer les sensibilités d'analyses de biomolécules par désorption/ionisation laser en spectrométrie de masse. Grâce à de nombreuses collaborations, ce projet interdisciplinaire a pu s'étendre et s'intégrer aux projets de laboratoire sur puce (groupe microfluidique, IEMN) et de biopuces (groupe chimie des biomolécules, Institut de Biologie de Lille), ou encore d'étude d'adhésion de cellules ou de bactéries (Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Institut National de Recherche Agronomique - Génie des procédés et technologie alimentaires).

Le présent manuscrit se décompose en cinq chapitres.

Le chapitre 1 expose un des outils majeurs pour l'analyse et la détection de molécules et de biomolécules : la spectrométrie de masse. Depuis les années 1990, de nombreux progrès ont été apportés aux instruments de spectrométrie de masse. Les sources d'ionisation ESI et MALDI en particulier ont entraîné une révolution dans la chimie des protéines ainsi que dans leur analyse. Les techniques de séparation (gels 2D, chromatographie liquide) des protéines et de peptides ont aussi largement évolué.^{11,12} Enfin, les nouveaux outils bioinformatiques et la croissance exponentielle dans l'annotation des génomes ont alimenté les banques de

données protéiques et permis l'identification de centaines de protéines. Toutefois, de nombreux processus biologiques demeurent incompris et requièrent encore l'amélioration des analyses de spectrométrie de masse. Tout au long de ce manuscrit de thèse, nous montrerons que les nanostructures apportent un plus et présentent un haut potentiel d'intégration à de nombreuses techniques d'analyse. Dans ce chapitre, nous montrerons en quoi l'association d'un support de nanofils de silicium à l'instrumentation du MALDI ouvre des perspectives en terme d'amélioration des sensibilités d'analyse (peptides standards, petites molécules) et des performances d'analyses protéomiques.

Dans le chapitre 2, nous décrirons quelques techniques de nanostructuration de surfaces de silicium ou de croissance de nanostructures de silicium. La dimension nanométrique des matériaux entraîne l'apparition de nouvelles propriétés. Par exemple, nous verrons que les principales réactions de greffages de molécules chimiques sur une surface plane s'appliquent à des surfaces micro/nanostructurées et qu'il peut en résulter une activité chimique ou biologique spécifique mais aussi des propriétés uniques de tension de surface solide/liquide (répulsion de liquides, infiltration de liquides selon la nature des liquides). Nous montrerons comment ces propriétés varient selon les terminaisons chimiques à la surface des matériaux et suivant la forme des micro/nanostructurations. Non plus en surface mais au niveau volumique des matériaux, leur dimension nanométrique implique un confinement spatial des ondes/corpuscules (électrons, photons, phonons) les composant ou les pénétrant (courant, irradiation). Nous présenterons les conséquences de la nanostructuration du silicium en termes de propriétés optiques et thermiques.

Le chapitre 3 s'articule autour de l'optimisation (sensibilité, adaptabilité, précision de masse) du support de nanofils de silicium pour l'analyse de biomolécules par Désorption/Ionisation Laser en Spectrométrie de Masse (LDI-MS). Les propriétés évoquées au chapitre 2 nous ont conduits à tester plusieurs morphologies, composition et chimies de surface pour les nanofils de silicium. De ces observations nous dégageons et discutons ce qui nous semble être les paramètres clefs du support de nanofils de silicium pour la LDI-MS. Cependant, si nous avons dégagé quelques tendances, les phénomènes associés à cette technique sont multiples et complexes (optique, thermique, infiltration et accessibilité des molécules au faisceau laser, énergie d'activation des molécules, ...) et rendent l'analyse difficilement prédictible au niveau théorique bien qu'au niveau pratique, elle instaure de nombreuses perspectives. Par ailleurs, nous avons également testé plusieurs morphologies de nanotubes d'oxyde de titane, support également candidat pour l'analyse de biomolécules par LDI-MS.

Le chapitre 4 montre que le support de nanofils de silicium optimisé au chapitre 3 s'intègre à deux dispositifs (biopuces et laboratoires sur puce) dont la principale caractéristique est la miniaturisation d'instruments utilisés pour les investigations biologiques. Ces dispositifs présentent l'avantage de diminuer les quantités de réactifs nécessaires, de permettre une rapidité et un nombre d'analyses plus élevés: les coûts des recherches et des examens biomédicaux sont par conséquent réduits. Ces systèmes contribuent aussi à mieux comprendre les phénomènes biochimiques cellulaires complexes. En première partie de chapitre, nous verrons que le support de nanofils de silicium pour la LDI-MS a permis d'instaurer un contrôle complémentaire sur le suivi cinétique des modifications chimiques d'une biopuce à peptides. La deuxième partie du chapitre présente un laboratoire sur puce basé sur le principe microfluidique de l'électromouillage sur diélectrique (EWOD). Ce microsystème inclut des composants élémentaires pour des opérations de prétraitement des échantillons biologiques ainsi que l'interface de nanofils de silicium. Celle-ci permet d'améliorer le dispositif mais surtout de coupler le laboratoire sur puce à l'instrumentation d'analyse LDI-MS, outil de référence pour l'identification des protéines. Nous montrons que la performance de ce laboratoire sur puce dépend des caractéristiques de déplacement microfluidique, de la technologie et la chimie de surface appliquée au nanofils de silicium.

Finalement, le chapitre 5 présente des résultats originaux sur l'adhésion de cellules et de bactéries sur les surfaces de nanofils de silicium. La chimie et la topographie de surface, combinées à des techniques de lithographie optique permettent la création de zones de différentes tensions de surface liquide/solide. Nous montrons qu'il est possible de contrôler la localisation des cellules en milieu cellulaire et des bactéries dans l'eau grâce à ces tensions de surface. La méthode est pratique et pourra s'adapter à des dispositifs pour suivre l'activité d'une cellule unique. Nous discutons les phénomènes impliqués et soumettons des explications pouvant mener à ces résultats, de ceci se dégagent notamment des pistes sur la compréhension des proliférations bactériennes (forces d'interaction avec les matériaux, résistance à des flux de nettoyage).

¹ Pautrat, J.L. *"Demain le nanomonde"*, édition Fayard. **2002**.

² Lahmani, M.; Dupas, C.; Bréchnignac, C.; Boisseau, P.; Houdy, P. *"Les nanosciences"*, édition Belin **2004**

³ Vion, D.; Aassime, A. ; Cottet, A. ; Joyez, P. ; Pothier, H. ; Urbina, C. ; Esteve, D. ; Devoret, M.H. *"Manipulating the Quantum State of an Electrical Circuit"*. *Science*, **2002**, 296, 886-889

- ⁴ DiCarlo, L.; Chow, J. M.; Gambetta, J. M.; Bishop, L. S.; Johnson, B. R.; Schuster, D.I.; Majer, J.; Blais, A.; Frunzio, L.; Girvin, S.M.; Schoelkopf, R.J. "Demonstration of two-qubit algorithms with a superconducting quantum processor". *Nature*, **2009**, 460, 240
- ⁵ Baker, R. J. "CMOS: Circuit Design, Layout, and Simulation", Revised Second Edition. *Wiley-IEEE*, **2008**
- ⁶ Garcia, V. ; Fusil, S. ; Bouzehouane, K. ; Enouz-Vedrenne, S. ; Mathur, N.D. ; Barthelemy, A. ; Bibes, M. "Giant tunnel electroresistance for non-destructive readout of ferroelectric states". *Nature*, **2009**, 460, 81-84.
- ⁷ Oh, S.; Brammer, K. S.; Li Y. S. J.; Teng, D.; Engler , A. J.; Chien, S.; Jin, S. "Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension". *PNAS*. **2009**, 106, 7, 2130-2135.
- ⁸ Carmena, J.; Lebedev, M.; Crist, R.; O'Doherty, J.; Santucci, D.; Dimitrov, D.; Patil, P.; Henriquez, C.; Nicolelis, M. "Learning to control a brain-machine interface for reaching and grasping by primates". *PLoS biology*. **2003**, vol 1, 2, 193-208
- ⁹ Baquiast, J. P. ; Jacquemin, C. "Les visions du Professeur Warwick", <http://www.automatesintelligents.com/labo/2003/nov/warwick.html>. **2003**
- ¹⁰ Shenoy, D. B.; Amiji, M.M. "Poly(ethylene oxide)-modified poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer *International J. Pharmaceutics*", **2005**, 293, 1-2, 261-270
- ¹¹ Issaq H.J. "Proteomics in Gerontology: Current Applications and Future Aspects - A Mini-Review". *Electrophoresis*. **2001**, 22, 3629-3638.
- ¹² Issaq H.J. "Application of separation technologies to proteomics research". *Adv. Protein Chem*. **2003**, 65, 249-269.

Chapitre 1

**La spectrométrie de masse,
la désorption/ionisation laser
assistée par matrice (MALDI),
et la désorption/ionisation laser
sur Silicium (DIOS)**

1. Introduction

La spectrométrie de masse est utile à de nombreux domaines professionnels et de recherche : étude de la physico-chimie des matériaux, analyse de particules atmosphériques, recherche spatiale, dosage des composants d'un parfum, ... En ce qui nous concerne, nous nous intéressons au développement des techniques de spectrométrie de masse pour la détection et l'identification des molécules biologiques et organiques.

Techniquement, la spectrométrie de masse (MS) est basée sur l'analyse du rapport entre la masse moléculaire m des ions et leur charge z , noté m/z , qui permet l'approche de la composition élémentaire et de la masse moléculaire réelle des molécules à analyser (analytes). Le spectromètre de masse est constitué des parties suivantes :

- Un système d'introduction de l'échantillon. L'échantillon peut être introduit tel quel dans la source : sous forme gazeuse, en solution (infusion directe) ou sous forme solide (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque, ...) selon les sources. La source peut également être associée à une méthode séparative de l'échantillon (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire, ...).
- Une source d'ions dans laquelle se produit l'ionisation. Il se produit également le passage en phase gazeuse (vaporisation/sublimation/désorption) si l'échantillon est liquide ou solide. On pourra étudier les ions positifs et négatifs en modes respectifs positif et négatif.
- Un analyseur qui permet de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z . Ainsi le pic correspondant au peptide $C_{37}H_{68}N_{16}O_{14}^{2+}$, de masse 976.5 Da (Daltons ou unités de masse atomique), prend la valeur de 488,3 sur le spectre de masse obtenu. De même, si un seul peptide est ionisé à différents degrés, plusieurs pics correspondront à ce même peptide.
- Un détecteur qui comptabilise les ions en leur associant leur rapport m/z
- Un enregistreur pour le traitement du signal et la visualisation des spectres
- Un système de calibration qui permet l'étalonnage entre la grandeur réelle mesurée et le rapport m/z .

Dans la première partie de ce chapitre, nous donnons un aperçu global des différents spectromètres de masse. Pour cela nous décrivons les différents principes d'ionisation des molécules, les inventions successives des sources d'ions, leurs avantages, leurs limitations, et l'importance de chacune pour le développement des analyses moléculaires et

biomoléculaires. Nous présentons ensuite les analyseurs qu'il est possible de coupler à ces sources, ainsi que leur rôle dans la précision des masses détectées.

En seconde partie, nous nous penchons sur l'évolution de l'instrumentation du spectromètre de masse employé pour la technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI), et sur l'équipement utilisé au cours de cette thèse. Nous verrons ensuite que l'amélioration de cette technique d'analyse est limitée par la complexité de ses aspects mécanistiques, et que la technique évolue et a évolué majoritairement de manière empirique.

Finalement nous présenterons la technique de désorption/ionisation laser sur silicium poreux (DIOS) qui a remédié à la principale limitation du MALDI, c'est à dire l'analyse des composés de masses inférieures à 700 Da. En effet, lors de l'analyse MALDI, les ions de la matrice organique interfèrent dans cette gamme de masse. L'idée de substituer la matrice organique au cœur du fonctionnement de la technique MALDI par un support inorganique de silicium poreux s'est révélée non seulement très pratique et performante, mais elle a également encouragé l'utilisation d'autres types de nanostructures comme supports inorganiques pour aller toujours plus loin dans les prouesses de détection. Le MALDI est incontestablement l'un des principaux outils pour la protéomique (étude des protéines) dont les défis sont majeurs en terme de compréhension des processus biologiques : caractérisation complète de toutes les séquences peptidiques pour la mise en évidence des phénomènes associés au cancer (modifications post-traductionnelles, mutations, liaisons intra- et intermoléculaires), analyse toujours plus sensible car les protéines responsables des maladies sont le plus souvent sous-exprimées (en faible quantité). C'est aussi dans cet objectif que s'inscrit l'étude de la désorption ionisation laser sur nanofils de silicium de la présente thèse.

2. Sources d'ionisation pour la spectrométrie de masse.

2.1. Rapide historique des sources d'ionisations dédiées à l'analyse de biomolécules.

L'ionisation par impact électronique (EI), mise en place par Dempster en 1921 puis améliorée par Nier en 1947, est une des premières techniques permettant l'analyse de molécules volatiles ionisées au sein d'une source. C'est aussi grâce à l'EI qu'est réalisée une des premières analyses de peptide¹³ : la fortuitine de masse 1359 Da. Cependant,

l'efficacité des analyses EI reste plutôt limitée à l'analyse de molécules de petites masses, inférieures à 400 Da. Elle est pratique pour l'étude de petites molécules hydrophobes, sous forme gazeuse ou qui peuvent être préalablement volatilisées sous vide (donc thermiquement stables), mais elle n'est pas encore adaptée à l'analyse de composés organiques ou bio-organiques qui constituent actuellement la plus grosse part des échantillons analysés par spectrométrie de masse (MS). Il en est de même pour la technique d'ionisation chimique (CI), qui lui succède en 1966 (développée par Munson et Field), bien qu'elle réduise le phénomène de fragmentation de biomolécules en comparaison à l'EI.

Les techniques de désorption dont une des premières est la désorption par champs (FD)¹⁴ ont considérablement avantagé les analyses en spectrométrie de masse, notamment pour des problématiques liées à la biologie, en rendant possible l'étude de composés non volatiles et thermiquement instables. Les applications biochimiques pour l'étude de peptides et de protéines prennent ensuite leur essor avec la découverte de l'ionisation par impact des analytes par des faisceaux primaires d'atomes ou d'ions très énergétiques. Notamment, l'ionisation par désorption de plasma (PDMS) développée en 1974 permet l'analyse de molécules non volatiles de masses allant jusqu'à 15 000 Da.¹⁵ En 1976, la technique de spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS) améliore les sensibilités de détection mais l'échantillon est rapidement détérioré par le flux d'ions primaires à haute énergie. Peu après, Barber instaure la technique du bombardement rapide d'atomes (FAB) qui utilise un faisceau d'atomes d'argon neutres à la place du faisceau d'ions primaires, et limite ainsi les phénomènes de charges et la dispersion des analytes ionisés. Dans la continuité, Barber développe finalement la spectrométrie de masse à ionisation secondaire liquide (LSIMS), pour laquelle l'échantillon mélangé à une matrice liquide est constamment renouvelé sous le faisceau d'ions césium primaires. Des peptides de 6 000 Da sont observés avec une sensibilité très convenable.¹⁶

Toutes ces techniques sont toutefois rapidement relayées par celles de l'ionisation électrospray (ESI) et de la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Jusqu'à présent, ces sources d'ionisation sont encore les plus couramment employées pour les analyses biomoléculaires et protéomiques. Ce sont des techniques dites de désorption /ionisation « douce » : la fragmentation des analytes est limitée, voire elle peut être maîtrisée et apporter des informations complémentaires. Elles se sont imposées de par leur haute sensibilité d'analyse (on passe d'une dizaine de picomoles à l'attomole, en comparaison avec les méthodes antérieures) et de par leur possibilité de détecter une très large gamme de masse (jusqu'à des molécules de 10⁶ Da pour l'ESI selon l'analyseur et pour le MALDI).

Si ces deux sources ont eu un succès indéniable, d'autres ont vu le jour pour l'analyse d'échantillons spécifiques. C'est le cas de l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), qui a la particularité de former des ions à pression atmosphérique comme l'ESI mais

qui est plus adaptée à l'analyse de composés apolaires. Finalement, les techniques de nanoESI et de la désorption ionisation sur silicium poreux DIOS ont aussi pallié quelques unes des insuffisances respectives de l'ESI et du MALDI.

Finalement, les sources d'ionisation ont évolué et ont fait appel à différents procédés d'ionisation des molécules que nous voyons ci-après.

2.2. Procédés d'ionisation d'une molécule.

Une molécule neutre peut s'ioniser de plusieurs façons.

- Il peut s'agir de la perte d'un électron. La probabilité d'arracher un électron à un atome dépend de l'énergie de liaison entre l'électron situé sur la couche électronique la plus externe (couche de valence) et le noyau de l'atome (Figure 1.1). Plus cet électron de la couche de valence est éloigné du noyau, ou plus le nombre d'électrons interne est grand, plus l'énergie de liaison est faible.

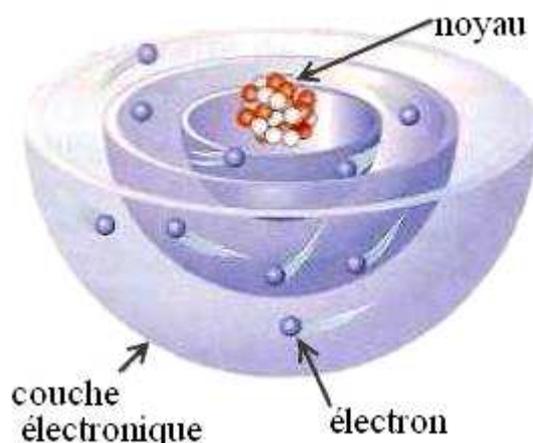


Figure 1.1. Schéma d'un atome : noyau et couches électroniques

Or, plus cette énergie de liaison est faible, plus l'atome est « polarisable » à l'approche d'un champ électrique (puisque les électrons sont plus sensibles à la polarisation du champ électrique qu'aux forces le reliant au noyau). Une molécule constituée de ce type d'atomes possèdera elle aussi un nuage électronique facilement polarisable et selon l'énergie des influences extérieures (champs électrique, molécules nécessitant un électron pour être stable, chaleur...), elle pourra perdre un ou plusieurs électrons. Lorsque l'énergie du champ électrique est trop conséquente, la molécule peut perdre des électrons engagés dans les liaisons entre atomes et subir une fragmentation. Cet effet est assez indésirable pour les analyses de spectrométrie de masse lorsqu'il n'est pas initié volontairement ou contrôlé.

- Une molécule neutre peut également s'ioniser par capture d'un électron. Ce phénomène peut avoir lieu suivant l'environnement et le caractère électrophile de la molécule. Celui-ci dépend de l'électronégativité des atomes constituant la molécule, soit l'aptitude des atomes à conserver à leur voisinage les électrons engagés dans les liaisons avec les autres atomes de la molécule. En exemple, la molécule d'hexachlorobenzène (Figure 1.2) possède des atomes de chlore susceptibles de remplir entièrement leur couche de valence (règle de l'octet), et qui ont un rayon atomique relativement petit. Cela signifie que les électrons sont proches du noyau du chlore et que les électrons impliqués dans les liaisons avec les atomes de carbone sont plus fortement attirés vers le noyau du chlore (effets inductifs).

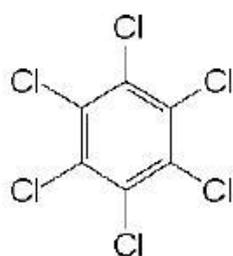


Figure 1.2. Formule de l'hexachlorobenzène

Les électrons de la molécule sont donc délocalisés vers les atomes de chlore et il se crée une charge partielle positive au centre de la molécule. La molécule possède alors un pôle négatif et un pôle positif, elle possède un moment dipolaire et elle est dite « polaire ». Le pôle positif de la molécule est donc sensible à l'approche d'un électron et la molécule est susceptible d'accueillir cet électron.

- La protonation ou addition d'un proton permet aussi l'ionisation d'une molécule. La protonation confère une charge positive à la molécule.
- A l'inverse, la déprotonation ou perte d'un proton confère une charge négative à la molécule.
- Finalement, une molécule peut aussi s'ioniser par le phénomène de cationization : un ion de charge positive se « lie » par interaction cation-dipôle (Chapitre 2 .3.2.1) à la molécule.

En définitive, ces différents types d'ionisation sont étroitement liés aux propriétés de la molécule à ioniser (atomes constituants, polarisabilité, caractère électrophile, basique, ...) et à son environnement (atmosphérique ou liquide). Le choix des sources d'ionisation est donc fonction de la nature de l'échantillon (gaz, liquide, solide, composé volatil ou thermolabile) et du type d'analyse (élémentaire, structurale, ...) à effectuer. Le Tableau 1.1 résume les

modes d'ionisations associés aux sources d'ionisations que nous explicitons en détail dans les paragraphes suivants.

Sources d'ionisation	EI	CI	FAB	APCI	ESI nanoESI	MALDI DIOS
Événement	Faisceau d'électrons	Faisceau d'électrons et collision avec les ions du gaz	Bombardement rapide d'ions argons neutralisés	Décharge électrique et collision avec les ions du gaz	Évaporation de gouttelettes chargées	Absorption de photons et désorption
Ejection d'électron	+	+	Rare (aromatiques)	-	-	Rare (aromatiques, azotés)
Capture d'électron	-	+	Rare (aromatiques)	Rare	-	Rare (aromatiques, azotés)
Protonation	-	+	+	+	+	+
Déprotonation	-	+	+	+	+	+
cationization	-	-	+	+	+	+

Tableau 1.1. Modes d'ionisations selon les sources d'ionisation.

2.3. Les sources d'ionisation dure

2.3.1. L'ionisation électronique (EI).

- **Introduction de l'échantillon**

L'échantillon est introduit sous forme gazeuse à l'aide d'un capillaire, lequel peut constituer une colonne de séparation appelée GC/MS (Chromatographie Gaz pour la Spectrométrie de Masse). Les différents composés sont dilués dans un gaz inerte puis séparés suivant leur affinité avec la phase stationnaire (liquide polaire ou apolaire) fixée à l'intérieur des colonnes capillaires. Dans le cas où l'échantillon est sous forme liquide, il est déposé sur une sonde puis évaporé thermiquement.

- **Ionisation de l'échantillon**

Dans la source, un filament métallique parcouru par des électrons est chauffé pour que les électrons acquièrent une énergie cinétique nécessaire à leur éjection. Ces électrons sont ensuite accélérés entre une cathode (filament) et une anode par un champ électrique de 70 V à l'intérieur d'une chambre où le vide est de 10^{-7} à 10^{-9} Torr. Lorsque les analytes sont introduits dans la source, ils passent à travers le faisceau électronique (Figure 1.3), entrent alors en collision avec les électrons et perdent ainsi un électron ou se fragmentent. Il est

possible que des molécules ayant une haute affinité électronique s'ionisent aussi par capture d'électrons.

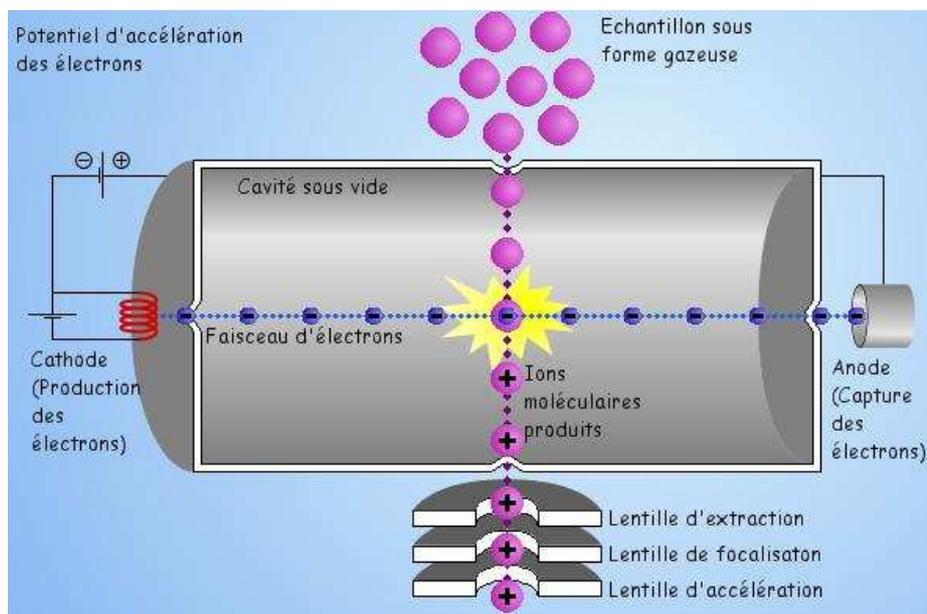


Figure 1.3. Source d'ionisation électronique.

- **Analyses et limitations**

L'EI se limite à l'analyse de composés volatiles de masses inférieures à 2 000 Da. En effet, les molécules de masses supérieures se décomposent thermiquement avant de se vaporiser, ou alors elles sont faiblement volatiles et donc inadaptées à l'instrumentation de l'EI. D'autre part, l'EI est une technique « d'ionisation dure » et peut mener à des fragmentations excessives, non contrôlées, car l'énergie cinétique des électrons est trop élevée (70 eV) comparée à l'énergie moyenne requise pour l'ionisation d'une molécule (7,5 eV).

2.3.2. L'ionisation chimique (CI).

- **Introduction de l'échantillon**

Les échantillons sont introduits de la même manière que dans la source EI.

- **Ionisation de l'échantillon**

Dans la source, des ions primaires sont produits par ionisation de gaz réactifs (l'ammoniac, le méthane et l'isobutane) avec un faisceau d'électrons à la pression d'environ 1 mm Hg. Les analytes rentrent alors en collision avec ces ions primaires, ce qui crée alors un plasma d'ionisation : des ions positifs et négatifs des analytes se forment par réactions chimiques tant par transfert de protons, que par transfert de charges.

- **Analyses et limitations**

Cette technique met en jeu des transferts de protons, ce qui limite la fragmentation des ions comparée à l'EI. Toutefois, le rendement d'ionisation est plus faible car la probabilité de collision entre les molécules et les ions est faible. Les hydrocarbures, les alcanes, les aromatiques, les éthers et les composés nitrés seront notamment très peu ionisés.

2.3.3. Désorption/ionisation par bombardement rapide d'atomes (FAB)

- **Introduction de l'échantillon**

Les composés non volatiles sont déposés en solution dans une matrice ionique liquide peu volatile de type glycérol, thioglycérol ou acide 3-nitrobenzylique.

- **Ionisation de l'échantillon**

Un canon produit des ions argon ou xénon par bombardement électronique. Ces derniers sont ensuite « neutralisés » dans une chambre puis focalisés sur l'échantillon. Les ions non neutralisés étant trop énergétiques, ils sont déviés par un champ électrique. Lors du bombardement rapide d'atomes, la matrice stabilise physiquement le composé lors de son éjection. Le composé s'ionise par protonation et déprotonation à température ambiante.

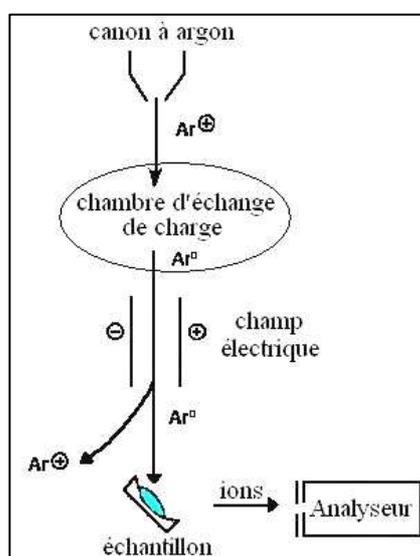


Figure 1.4. Source d'ionisation FAB.

- **Analyses et limitations**

Le FAB est efficace pour des solutions contenant des ions dans des solvants non volatiles (par exemple si le solvant est de la glycérine). Pour les autres échantillons, les techniques de MALDI et de l'ESI se révèlent nettement plus appropriées.

2.4. Les sources d'ionisation douce.

2.4.1. Désorption/Ionisation par ElectroSpray (ESI)

Le principe de l'électrospray est introduit par Chapman en 1930 mais ce n'est qu'en 1960 qu'il est adapté à la spectrométrie de masse par Dole¹⁷ qui découvre au même moment le phénomène des molécules de charges multiples. Whitehouse et al.¹⁸ puis Fenn et al.¹⁹ développent ensuite l'instrumentation de l'ionisation électrospray (ESI) utilisée de nos jours qui remplace définitivement l'ancienne source d'ions thermospray.^{20,21} L'ESI est aujourd'hui très couramment employée pour l'analyse de peptides, de protéines, de carbohydrates, de petits oligonucléotides, de polymères synthétiques et enfin de lipides.

- **Introduction de l'échantillon**

L'échantillon est introduit en continu sous forme liquide dans un tube de métal, au bout duquel il est vaporisé. Les solvants sont choisis suivant la solubilité de l'échantillon, mais ils doivent donc être volatiles et de potentiels donneurs de protons : méthanol, mélange méthanol/eau (1/1) ou acétonitre/eau (1/1). On peut utiliser des techniques de chromatographie liquide (LC) telles que la LC à haute performance (HPLC) ou l'électrophorèse capillaire pour séparer les analytes avant leur introduction.

- **Ionisation de l'échantillon**

L'extrémité du tube de métal est soumise à un potentiel de 700 à 5000 V. En présence d'un champ électrique et à pression atmosphérique, l'échantillon liquide forme alors des petites gouttelettes chargées qui vont s'évaporer à l'aide de la chaleur ou d'un gaz sec (azote). Le solvant s'évapore au fur et à mesure et les gouttelettes se subdivisent en de plus fines gouttelettes en formant des cônes de Taylor (Figure 1.5). La diminution de la taille des gouttelettes implique l'augmentation de leurs densités de charges et par conséquent l'augmentation des forces de répulsion électrostatiques résultantes. Les gouttelettes se fragmentent alors jusqu'à contenir quelques molécules chargées (modèle d'Iribarne et Thomson²²), voire une seule macromolécule chargée (modèle de Dole¹⁷). Ces molécules ionisées sont ensuite dirigées par des lentilles électrostatiques vers une chambre à vide puis vers l'analyseur.

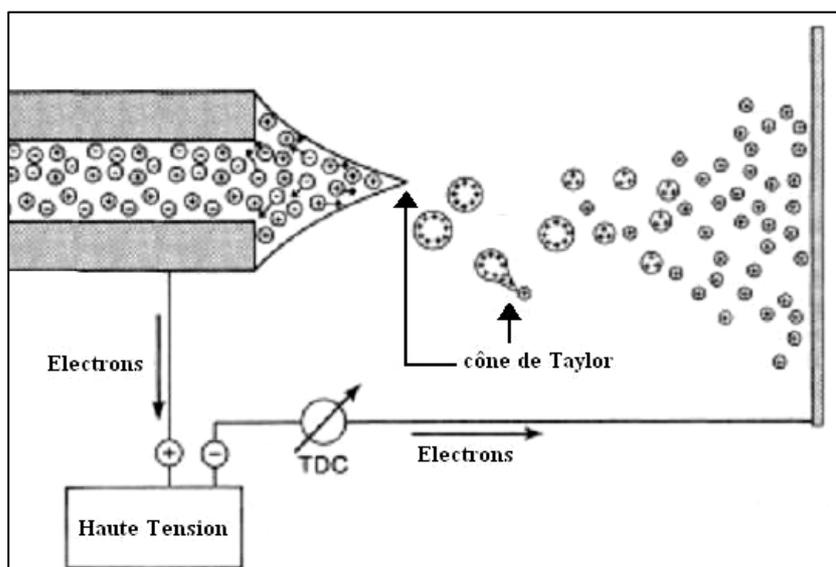


Figure 1.5. Formation de cône de Taylor lors du procédé électrospray.

- **Analyses et limitations**

La sensibilité des analyses ESI atteint la femtomole. L'ionisation douce conduit à la formation de molécules mono et multi-chargées : il est alors possible de détecter les molécules de très haut poids moléculaire dans des gammes de faibles m/z et donc de coupler l'ESI à des analyseurs de petites masses qui coûtent moins chers. Le fait que l'ESI s'associe facilement aux techniques de chromatographie liquide présente également un grand avantage. Par contre, l'ESI est limitée lors de l'analyse de mélanges de plusieurs composés : la sensibilité de détection peut être réduite et les spectres d'ions multichargés peuvent être difficilement interprétables. La pureté de l'échantillon qui est souvent difficile à obtenir s'avère donc critique pour les analyses ESI. Enfin, la présence de sels peut nettement réduire la sensibilité de l'analyse et contrairement au cas du MALDI, l'utilisation de l'acétate d'ammonium ne limite pas cet effet.

2.4.2. NanoESI

L'instrumentation du nanoESI est quasi-identique à celle de l'ESI : le diamètre à l'extrémité du tube de métal (où l'échantillon s'évapore) est réduit à 200 nanomètres environ. De cette manière on obtient un débit très faible de quelques centaines de nanolitres par minutes. Alors qu'en une minute 5 picomoles sont libérées pour l'ESI, seulement 50 femtomoles sont libérées pour le nanoESI tout en conservant une très bonne qualité d'analyse. L'analyse est même plus sensible que l'ESI car l'extrémité du tube peut être placée beaucoup plus près de l'analyseur.

2.4.3. L'Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI)

- **Introduction de l'échantillon**

L'échantillon est introduit de la même manière que dans la source d'ionisation électrospray.

- **Ionisation de l'échantillon**

L'échantillon est vaporisé dans un tube en graphite chauffé à $500\pm 50^\circ\text{C}$, puis amené vers une électrode (aiguille) à décharge électrique dans une chambre de nébulisation qui sert de contre-électrode. Une différence de potentiel élevée est alors appliquée à l'électrode créant une source constante d'électrons et ionisant le gaz nébuliseur (azote + solvants vaporisés). L'ionisation des analytes s'effectue par collision et par réactions chimiques avec les ions radicalaires du gaz ($\text{N}_2\bullet^+$, $\text{O}_2\bullet^+$, $\text{H}_2\text{O}\bullet^+$, $\text{NO}\bullet^+$, ...). On assiste aussi bien à des transferts de protons qu'à des transferts de charges. Un flux d'azote élimine ensuite « les ions solvants » puis les analytes ionisés sont dirigés vers l'analyseur de masse.

- **Analyses et limitations**

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), contrairement à l'électrospray, ne produit pas d'ions multichargés et génère quelques fragmentations, mais celles-ci peuvent se révéler utiles pour la caractérisation structurale des analytes.

2.4.4. La Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)

La désorption ionisation laser assistée par matrice organique (MALDI), est mise en place par Karas & Hillenkamp en 1988.²³ Cette technique s'est révélée très utile pour l'analyse de nombreuses biomolécules (peptides, oligonucléotides, carbohydrates, lipides, ...) ou de macromolécules synthétiques. Le MALDI est aussi l'outil principal (avec l'ESI) employé pour la protéomique, étude des protéines dont les principales étapes seront décrites au Chapitre 3 .3.2.1.

- **Introduction de l'échantillon**

La préparation de l'échantillon pour l'analyse MALDI consiste à déposer sur une plaque métallique une goutte contenant les analytes conjointement à une goutte contenant la matrice.

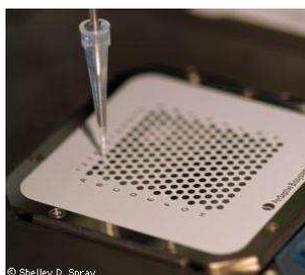


Figure 1.6. Plaque métallique MALDI

Lors du séchage de ce mélange, la matrice étant en large excès molaire, elle co-cristallise avec les analytes. La plaque métallique est alors introduite dans la source du spectromètre de masse.

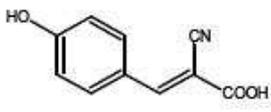
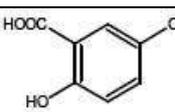


Figure 1.7. Cristallisation des matrices²⁴ : a) Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), b) Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), c) Acide Sinapinique (SA).

- **Ionisation de l'échantillon**

Choix de la matrice

Il existe plusieurs matrices pouvant être utilisées pour le MALDI, le choix dépend de la nature des molécules à analyser comme on peut le voir dans le cas des matrices les plus couramment utilisées du Tableau 1.2.

Matrice	Structure	Utilisation
Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA)		Protéines, peptides
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)		Protéines, peptides, Oligosaccharides

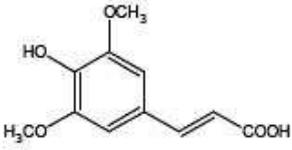
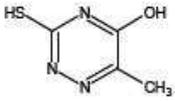
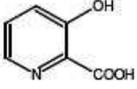
Acide 3,5-diméthoxybenzoïque ou acide sinapinique (SA)		Protéines, Polymères
6-aza-2-thiothymine (ATT)		Oligonucléotides, Protéines
Acide 3-hydroxypicolinique (HPA)		Oligonucléotides, Glycoprotéines

Tableau 1.2. Matrices les plus utilisées pour l'analyse de biomolécules en MALDI.

Ces matrices ont le point commun d'être une molécule organique, de petite masse moléculaire, qui possède un cycle aromatique ayant la propriété d'absorber à la longueur d'onde du laser.

Choix du laser

Le choix du laser est également important pour obtenir une bonne désorption des analytes. Il dépend de la longueur d'onde à laquelle la matrice absorbe le mieux et dépend également de la nature des analytes. Le plus répandu est le laser à azote qui irradie à 337 nm et qui possède une durée d'impulsion très courte. Le Tableau 1.3 regroupe une liste non exhaustive de différents types de lasers utilisés.

Laser	Longueur d'onde	Energie des photons (eV)	Durée de l'impulsion (ns)	Exemples de matrices compatibles
Azote N ₂	337 nm (UV)	3,68	<4	HCCA, ATT, HPA, SA, DHB
4Nd:YAG x3	355 nm (UV)	3,49	5	HCCA, ATT, HPA, SA, DHB
Nd:YAG x4	266 nm (UV)	4,66	5	HCCA, ATT, HPA, SA, DHB
Er: YAG	2,94 µm (IR)	0,42	85	DHB
CO ₂	10,6 µm (IR)	0,12	100	DHB

Tableau 1.3. Liste de lasers utilisés pour l'ionisation MALDI, longueur d'onde d'émission (UV pour Ultraviolet, IR pour Infrarouge), énergie des photons, durée de l'impulsion (ns pour nanoseconde) et quelques matrices compatibles.²⁵

Désorption/ionisation

Nous exposons ici brièvement le principe de désorption/ionisation car le mécanisme exact et détaillé est toujours discuté à l'heure actuelle comme nous le verrons au paragraphe 4.2. En ce qui concerne la désorption, il est globalement communément admis³⁴ qu'elle se déroule selon les étapes suivantes : la matrice

- absorbe l'énergie des photons
- s'ionise
- se dissocie
- se sublime
- subit une expansion en phase gazeuse dans laquelle elle entraîne les analytes (du fait de leur co-cristallisation)

L'ionisation des analytes demeure aussi quelque peu énigmatique : on ne sait pas si elle intervient avant (en phase solide) et/ou après l'étape de désorption mais on pense qu'elle se produit majoritairement grâce à la matrice. En effet, la matrice favorise la séparation des analytes en réduisant les forces intermoléculaires lors de la cristallisation des analytes (le ratio molaire matrice/analyte étant généralement 2500 pour 1 en moyenne). Ce serait aussi la matrice qui assurerait un transfert de protons aux analytes²⁶ (par protonation, déprotonation et cationisation). Après leur désorption/ionisation, schématisée en Figure 1.8 ci-dessous, les ions sont dirigés vers l'analyseur par application d'un champ électrique.

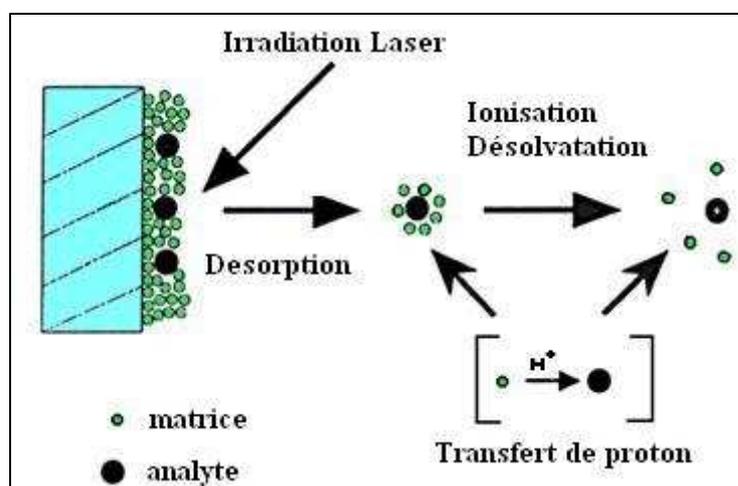


Figure 1.8. Principe de l'ionisation MALDI²⁷.

- **Analyses et limitations**

La technique MALDI est la seule à pouvoir détecter des molécules de haut poids moléculaire entre 70 000 et 300 000 Da et est très pratique pour l'analyse de mélanges complexes (les ions sont souvent monochargés) ou d'échantillons contenant des

concentrations millimolaires de sels. Sa sensibilité de détection est de l'ordre du femtomole, voir de l'attomole pour certaines molécules. Le MALDI est cependant moins efficace pour l'analyse de masses inférieures à 700 Da car le signal des analytes interfère avec celui de la matrice organique. Certains analytes peuvent également se dégrader lors de l'irradiation laser ou parfois avec l'acidité de la matrice, et ne pas être détectés.

2.4.5. La Désorption Ionisation sur Silicium poreux (DIOS).

La désorption ionisation laser sur silicium poreux (DIOS) est une technique développée par Wei et al.²⁸ qui ne nécessite pas de matrice organique, contrairement au MALDI, et présente de hautes sensibilités de détection pour les molécules de masses inférieures à 700 Da. Le silicium poreux est formé en surface d'une plaquette de silicium par anodisation électrochimique.²⁹ Il a la propriété d'absorber les UV comme la matrice organique. Dans un premier temps, la goutte d'analytes est déposée sur le silicium poreux puis évaporée à l'air ambiant (le silicium poreux retient dans sa structure les analytes), le silicium poreux absorbe ensuite l'énergie des photons du laser UV et transfère aux analytes l'énergie nécessaire à leur désorption ionisation (Figure 1.9). Le mécanisme de ce transfert d'énergie n'est pas totalement expliqué à l'heure actuelle mais nous aurons l'occasion d'approfondir le sujet au cours du Chapitre 3. Techniquement l'instrumentation du DIOS est la même que celle du MALDI : au lieu de déposer une matrice organique, on fixe le silicium poreux sur la plaque métallique creusée (Voyager sample plate for membrane gels, Applied Biosystems) avec du double scotch conducteur (Standard Carbon Adhesive Tabs, 25mm, Electron Microscopy Science). La plaque métallique est ensuite insérée dans la source comme pour le MALDI. Une petite calibration est nécessaire pour la précision des masses détectées lors des analyses. Les limitations et avantages des analyses MALDI et DIOS sont discutés de manière plus détaillée au paragraphe 4.3.

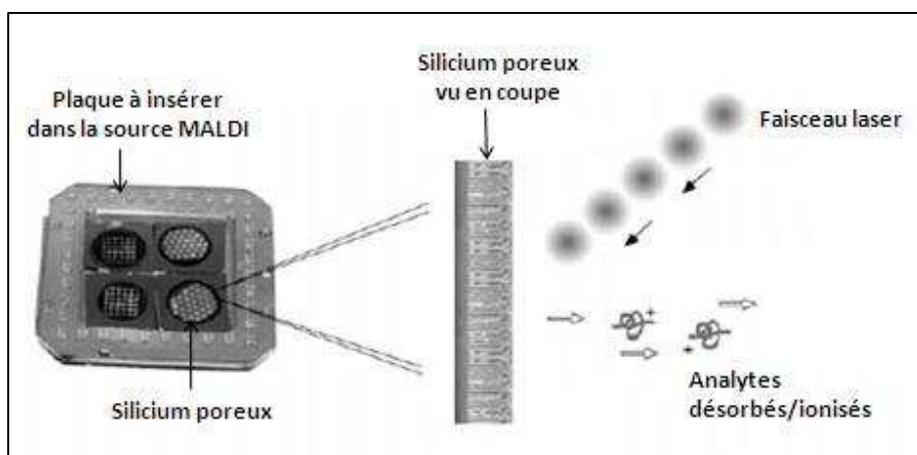


Figure 1.9. Schéma de principe du DIOS.

2.5. Conclusion

En conclusion, le Tableau 1.4 ci-dessous récapitule les caractéristiques et aptitudes des différentes sources d'ionisation. Nous détaillerons dans la suite de ce chapitre les analyseurs qu'il est possible de coupler à ces différentes sources puis nous verrons plus particulièrement l'évolution de l'analyseur principal du MALDI et du DIOS.

Source d'ionisation	EI	CI	FAB	APCI	ESI	nanoESI	MALDI	DIOS
Gamme de masse détectée (Da)	1200	1200	20 000	1200	10 ⁶	10 ⁶	700-10 ⁶	3000
Interférence de matrice	Non	Non	Oui	Non	Possible	Non	Oui	Non
Dégradation de l'échantillon	Thermique	Thermique	Thermique	Thermique	Non	Non	Laser	Laser
Analyse de mélanges complexes	Limité, couplage GC/MS	Limité, couplage GC/MS	Faisable	Faisable, couplage LC/MS	Limité, couplage LC/MS	Limité, couplage LC/MS	Bonne	Bonne
Couplage LC/MS	Très limité	Très limité	Très limité	Excellent	Excellent	Excellent	Possible	Possible
Sensibilité en mole/ μ l	1 Pico	1 Pico	1 Nano	100 à 10 Femto	10 Femto	1 Atto	1 Femto	1 Femto

Tableau 1.4. Comparaison générale des sources d'ionisation.³⁰

3. Les analyseurs en spectrométrie de masse.

Les premiers analyseurs utilisaient des champs magnétiques pour séparer les ions. Depuis, la technologie des analyseurs a évolué et permet selon l'analyseur d'atteindre de hautes résolutions^{1,30,31} (précision de masse et sensibilité d'analyse), de générer des spectres de masse pour une gamme m/z très large et de donner des informations précises lors de la fragmentation de peptides.

Les quatre types d'analyseurs les plus couramment utilisés aujourd'hui sont : le quadripôle (Q), le piège ionique (IT), l'analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FT-ICR), le temps de vol (TOF).

Chacun de ces analyseurs présente des performances, avantages et inconvénients différents mais peuvent être couplés entre eux³² : analyseurs Q-TOF, Q-Q-Q, TOF-TOF, etc. Au final, ils sont couplés ou utilisés individuellement selon la nature de l'étude à mener.

¹ La résolution R correspond à l'aptitude d'un analyseur à séparer une masse M d'une masse M+ δ M (on utilise souvent une valeur de δ M = 1 qui correspond à la séparation des pics isotopiques). Elle se calcule en faisant le rapport entre la masse d'un pic et sa largeur δ M à 10 % de son intensité globale. On admet que deux pics sont résolus quand l'intensité de la vallée entre ces deux pics est égale à 10% de l'intensité du pic le plus faible. On appelle cela la résolution à 10 % de vallée. Actuellement, on utilise couramment la résolution FWHM (Full Width at Half Maximum), on prend alors la valeur à 50 % de l'intensité globale du pic.

3.1. L'analyseur quadripolaire (Q)

Depuis sa description³³ effectuée par Paul et Steinweger en 1953, l'analyseur quadripolaire est couramment employé en protéomique et généralement associé à une source électrospray. Cet analyseur soumet les ions à un champ électrique qui les sépare alors en fonction de la stabilité de leur trajectoire.³⁴

Un quadripôle est constitué de quatre barres parallèles de section hyperbolique ou cylindrique. Chacune de ces barres sont soumises à un potentiel ayant une composante continue U et une composante sinusoïdale $V \cdot \cos(\omega t)$, radiofréquence d'amplitude V et de pulsation ω .

De manière à créer un champ électrique, on applique une tension de $[U + V \cos(\omega t)]$ à deux barres reliées entre elles, et une tension opposée de $-[U + V \cos(\omega t)]$ aux deux autres barres elles aussi reliées entre elles. Les ions sont introduits à une vitesse donnée dans l'analyseur suivant l'axe z . Ils vont ensuite être accélérés par le champ électrique, et déstabilisés suivant les axes x et y (Figure 1.10).

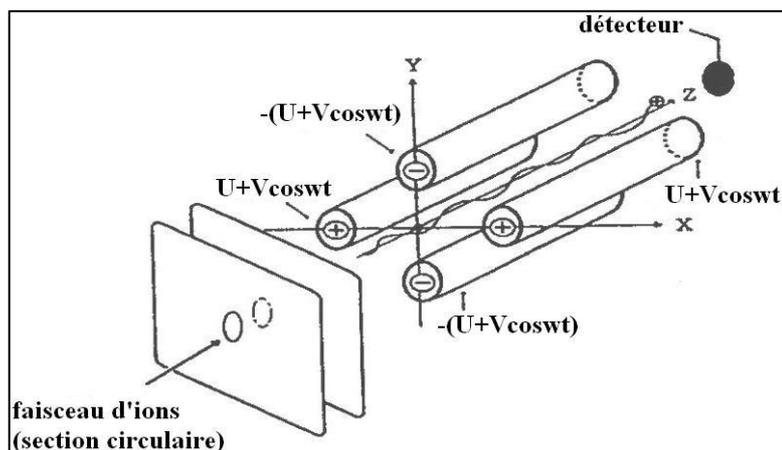


Figure 1.10. Représentation de l'Analyseur Quadripolaire.

Les ions traversent alors le quadripôle selon une trajectoire connue³⁴ et en fixant les valeurs de U et de V , on peut ainsi déterminer la masse des ions selon leur arrivée au détecteur.

3.2. L'analyseur à trappe ionique (IT)

La trappe ionique se constitue de trois électrodes, deux électrodes « chapeau » de géométrie hyperbolique et une électrode annulaire (Figure 1.11). Les électrodes « chapeau » possèdent respectivement une petite ouverture qui permet l'entrée des ions et plusieurs petites ouvertures qui permettent la sortie des ions. Les trois électrodes créent un champ

électrique lorsque la radiofréquence appliquée aux électrodes vaut $V_{\omega}\cos(2\pi\omega t)$, ω étant la pulsation. Ce champ électrique piège les ions dans un puits de potentiel et le rapport « m/z » correspond à une fréquence de mouvement propre. L'ajustement de la radiofréquence alors permet de fragmenter puis de sélectionner les ions à analyser.

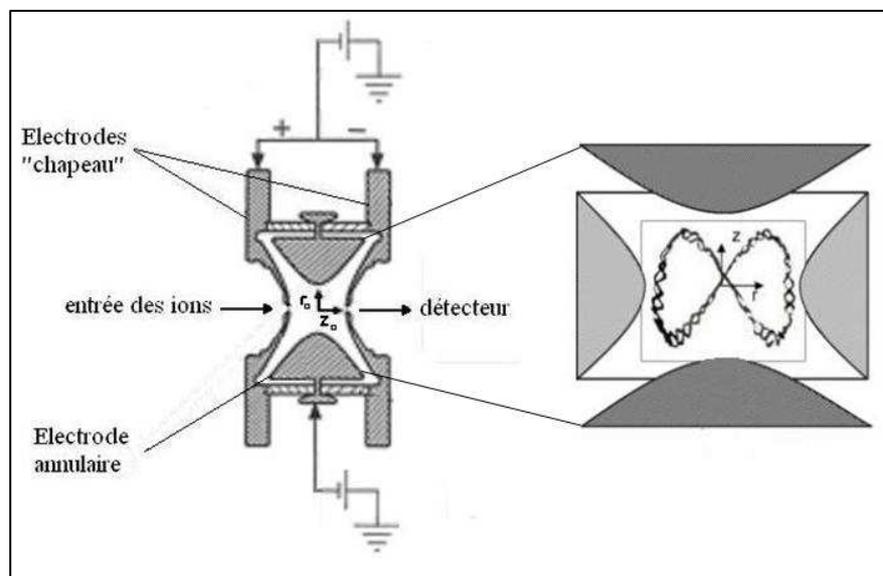


Figure 1.11. Schéma d'une trappe ionique

3.3. L'analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FT-ICR ou FT-MS)

L'analyseur à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier FT-ICR peut être représenté par une cellule cubique placée dans un champ magnétique élevé.³⁵ La cellule est composée de deux 'trapping plates' opposées, de deux 'exciting plates' opposées et de deux 'receiver plates' opposées. Un ion de masse m , de charge élémentaire z décrit dans la cellule un cercle perpendiculaire au champ magnétique : la fréquence cyclotronique de l'ion est inversement proportionnelle au rapport m/z . Un champ électrique sinusoïdal est ensuite appliqué. Lorsque la fréquence sinusoïdale est identique à celle de la fréquence cyclotronique de l'ion, il y a résonance, l'ion est accéléré de manière régulière et décrit un cercle de rayon plus grand. Ce mouvement est alors détecté par les receiver plates³⁶ qui enregistrent toutes les informations des fréquences des ions en signal de rotation. La transformée de Fourier convertit finalement le signal du domaine-temps en un signal domaine-fréquence afin d'obtenir le spectre de masse. La particularité de cet analyseur est sa très haute résolution (10^6) et son domaine de masse assez élevé (5000 Da).

Aujourd'hui, il existe des instruments à transformée de Fourier qui n'utilisent pas de champs magnétiques supraconducteur. Par exemple l'Orbitrap présente une plus grande précision de mesures de m/z . Et si sa résolution reste encore dix fois inférieure à celle du FT-ICR, ce type d'instruments est toujours en évolution.

3.4. L'analyseur à temps de vol (TOF)

Mis en place par Cameron et Eggers en 1948, puis amélioré par Wiley and McLaren en 1955,³⁷ l'analyseur à temps de vol (TOF) ne fait réellement ses preuves qu'en 1978 avec l'apparition de la source MALDI, notamment pour des analyses protéomiques.³⁸

Le TOF se constitue :

- d'une zone d'accélération
- d'une zone de libre champ où a lieu le temps de vol.

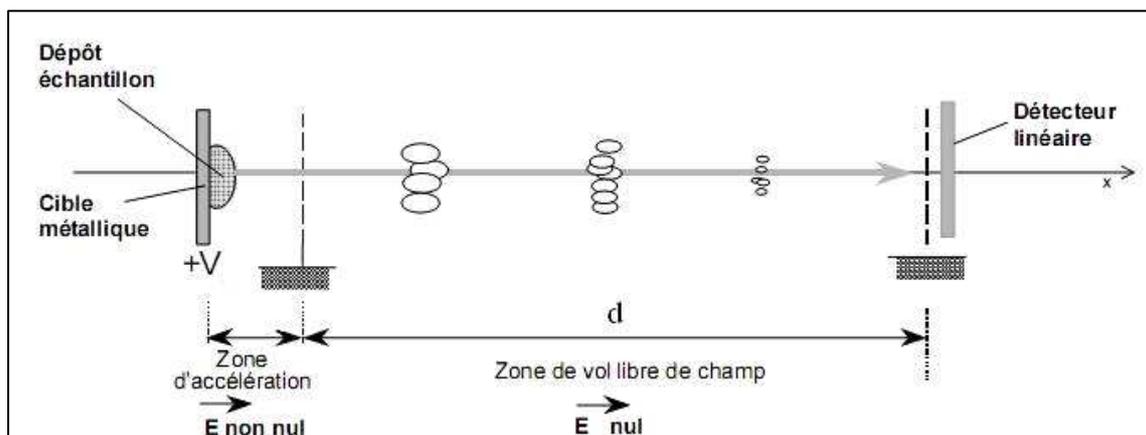


Figure 1.12. Schéma de principe de l'analyseur à temps de vol TOF.

Les ions accélérés par le champ électrique ($E = e.V$) pénètrent dans la zone libre de champ (ou tube de vol) avec une énergie cinétique: $E_c = z.e.V = \frac{1}{2}.m.v^2$. Le temps de vol avec lequel les ions arrivent au détecteur, dépend donc directement du nombre de charges (z) et de la masse (m) de l'ion:

$$v = \frac{d}{t} = \sqrt{\frac{2.z.e.V}{m}}$$

Les ions de plus petite masse parcourent plus vite le tube de vol (Figure 1.12) ; on obtient le type de spectre de masse présenté en Figure 1.13.

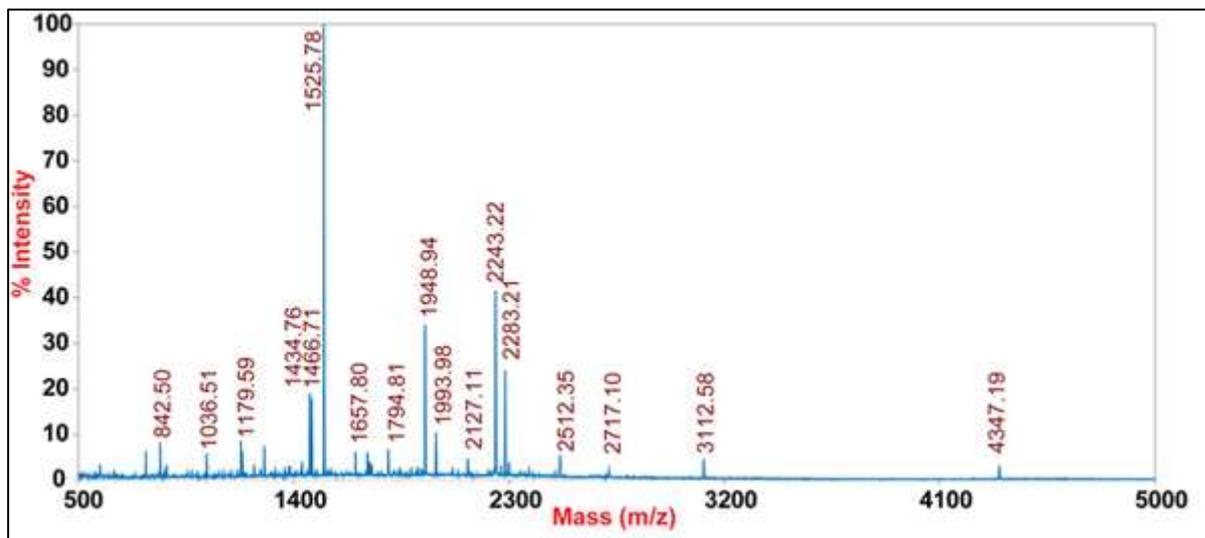


Figure 1.13. Exemple de spectre de masse MALDI-TOF d'un mélange de peptides.

Aujourd'hui, les spectromètres de masse MALDI-TOF ont encore évolué : ils peuvent atteindre de très hautes résolutions et offrent une large gamme de m/z analysable allant jusqu'à 300 000 m/z.

4. Optimisation des analyses MALDI-TOF et techniques alternatives LDI-MS sans matrice.

4.1. Evolution de l'instrumentation du MALDI-TOF

En général, la source MALDI est associée à un analyseur en temps de vol qui s'adapte bien à l'ionisation pulsée par désorption laser. Toutefois, il n'y a pas de raison fondamentale pour limiter le MALDI au TOF : le MALDI peut aussi être couplé à un analyseur à résonance ionique cyclotronique à transformée de Fourier,³⁹ à une trappe ionique,⁴⁰ à un analyseur à secteur magnétique,⁴¹ et à des combinaisons de secteur/trappe ionique, secteur/TOF, TOF/trappe ionique et TOF/TOF.⁴²

Lors du couplage du TOF avec le MALDI, les molécules ne sont pas ionisées simultanément et sont dispersés spatialement. Cela empêche les ions d'avoir exactement la même énergie cinétique à l'entrée du tube de vol et affecte la résolution et la sensibilité des analyses MALDI-TOF. Pour remédier à ce phénomène, l'instrumentation du MALDI-TOF est d'abord complétée par fonctionnalités (Figure 1.14) :

- Le principe de DE (Delayed Extraction) permet de retarder les ions selon un gradient de voltage. Les ions effectuent ensuite un départ simultané dans le tube de vol.⁴³ L'efficacité du principe de DE diminue cependant pour des masses supérieures à 30 000 Da.
- Le réflecteur électrostatique : une série de lentilles se comportant comme un miroir électrostatique sont placées à l'extrémité du tube de vol. Ces lentilles sont soumises à des potentiels croissants, ce qui freine là aussi les ions progressivement et les refocalise avant qu'ils ne soient renvoyés vers le détecteur du mode réflecteur. Le temps de vol étant deux fois plus long, les ions sont mieux séparés et cela augmente considérablement la résolution.⁴⁴

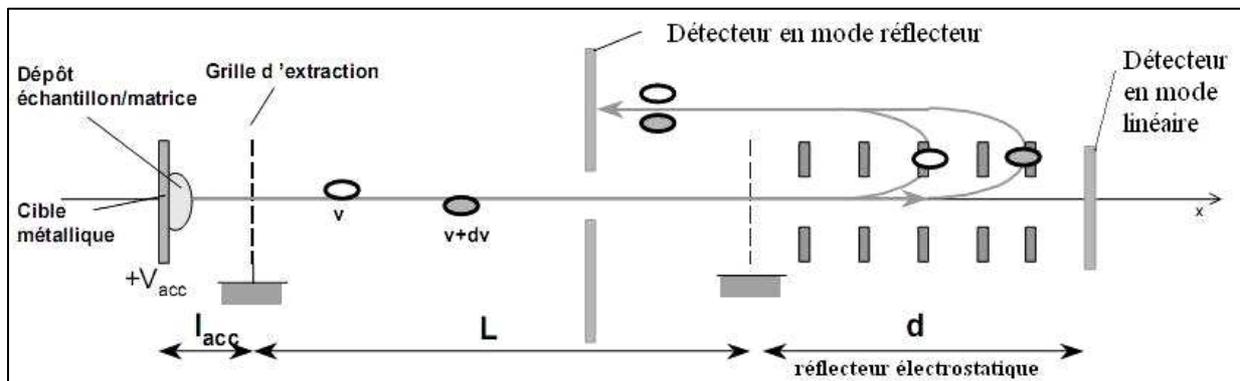


Figure 1.14. Schéma de principe du réflecteur électrostatique du MALDI-TOF.

Le MALDI utilisé au cours de cette thèse est un Voyager-DE-STR de la compagnie Applied Biosystem, avec un laser à azote de longueur d'onde 337 nm et de pulsation 3 ns. Hormis les deux fonctionnalités citées plus haut, celui-ci possède l'option « low mass gate » qui permet de détecter les ions uniquement à partir du début de la gamme de masse d'intérêt et amplifie les signaux de masses à analyser.

Depuis, d'autres modifications ont été apportées sur le dernier modèle 4800 MALDI de la compagnie Applied Biosystem et ont amélioré les sensibilités de détection :

- des déflecteurs ont été rajoutés à différents endroits de la source pour mieux diriger les ions vers l'entrée du tube de vol.
- l'angle d'arrivée du laser sur la plaque MALDI a été modifié : le laser arrive perpendiculairement et non plus à 45° car cela avait pour effet de disperser des ions.

4.2. Le mécanisme complexe et encore occulte du MALDI.

De nombreuses découvertes ont rapidement eu lieu en chimie et en biomédecine depuis la mise en place du MALDI-TOF alors que ses aspects mécanistiques n'ont émergé que dix ans plus tard.^{45,46} La qualité des analyses MALDI a donc majoritairement progressé de manière empirique et les observations révèlent qu'elle dépend aussi bien de la méthode de préparation de l'échantillon avant introduction dans la source, que des paramètres d'irradiation laser. En parallèle de ces optimisations se sont multipliées des études et des modélisations sur les phénomènes de dynamique moléculaire possibles pour « la plume ». Ce terme correspond au nuage formé par les analytes une fois désorbés de la cible métallique. Nous résumons ici quelques unes des investigations qui ont éclairé ou amélioré le procédé de désorption/ionisation (DI) de la technique MALDI.

4.2.1. Le protocole de préparation des échantillons

On sait maintenant que l'efficacité varie selon la nature de la matrice organique, la méthode de dépôt de l'échantillon, le pH et la nature du solvant, le ratio matrice/analytes (fixé à 1000/1 car la matrice en large excès limite l'agrégation des molécules et la formation d'ions moléculaires M_2^+), la présence de tensioactifs (molécules amphiphiles), et finalement selon les caractéristiques intrinsèques des analytes.

Les modes de dépôts de l'échantillon les plus employés sont la méthode de la goutte séchée et la méthode en sandwich. La première technique consiste à déposer le mélange matrice/analyte sur la plaque MALDI et à le laisser sécher tandis que pour la seconde l'analyte est inséré entre deux couches de matrice. Il n'y a pas eu de règle générale établie ; le choix du mode de dépôt est empirique et dépend de l'échantillon à analyser. Toutefois, si de nombreux groupes s'accordent à dire qu'il n'y a aucune relation entre la morphologie de la matrice et la qualité des analyses MALDI, le fait d'incorporer les analytes dans la matrice ou non a été et demeure un long débat.⁴⁵ Horneffer et al. ont de leur côté souligné l'importance de déposer les analytes dans un solvant et non pas directement sur le dépôt sec de la matrice.⁴⁷

4.2.2. L'irradiation laser

- **Longueur d'onde du laser et spectre d'absorption de la matrice**

Comme nous l'avons vu, plusieurs lasers et plusieurs matrices peuvent être utilisés pour les analyses MALDI-TOF. La relation entre la longueur d'onde du laser et la longueur d'onde d'absorption de la matrice a été étudiée par de nombreux groupes.^{48,49} Par exemple pour la gamme des UV, il en ressort quantitativement que la performance de l'analyse culmine

lorsque la longueur d'onde du laser correspond au maximum du spectre d'absorption de la matrice.⁵⁰ Néanmoins, il a aussi été démontré que lorsque le spectre d'absorption d'une matrice est suffisamment large (absorption sur une large gamme de longueur d'onde), une faible absorption à la longueur d'onde du laser peut être compensée par une puissance laser plus importante. Il y a tout de même un coefficient d'absorption critique en dessous duquel quelle que soit la puissance laser utilisée, il n'y a pas de signal MALDI.⁵¹

- **Puissance du laser et taille du faisceau laser**

On ne l'explique pas encore exactement, mais lorsque la taille du faisceau laser diminue (donc la surface irradiée diminue), la puissance laser doit être augmentée afin d'obtenir le signal optimal.^{52,53} Une des raisons peut être que l'augmentation de la puissance du laser conduit à la désorption d'un plus grand nombre d'analytes par pulse laser et à des paquets d'analytes désorbés plus volumineux.⁵⁴

- **Puissance laser et intensité du signal des ions**

Il existe un seuil de puissance laser pour lequel le signal est optimal : il faut une certaine puissance afin de désorber un nombre d'analytes suffisant mais la puissance laser ne doit pas être trop élevée afin d'éviter la fragmentation des molécules ou la saturation du détecteur. Ce seuil a même été mis en évidence par des mesures de comptage d'ion unique par conversion des données numériques en temps (TDC pour Time to Digital Conversion).^{53,55}

- **Durée du pulse laser**

Si la durée du pulse laser est trop longue (>25 nanosecondes), les analytes se dégradent thermiquement avant qu'ils ne passent en phase gazeuse.⁵⁶ Vertes et al. ont souligné l'importance d'un passage rapide^{56,57} de la phase condensée à la phase gaz, autrement dit d'un transfert rapide d'énergie de la matrice aux analytes. Ils ont montré que la rapidité est fonction de la durée du pulse laser, des propriétés physico-chimique de la matrice (absorption optique et profondeur de pénétration laser associée, densité, chaleur spécifique, conductivité thermique), mais aussi du rapport analytes/matrice. Une concentration d'analytes trop élevée par rapport à la matrice conduit effectivement à un transfert d'énergie trop important de la matrice vers les analytes et à une dégradation thermique de ces derniers. La matrice permet en fait de dissiper l'énergie laser et d'éviter cette dégradation thermique. Deux types de dissipation d'énergie laser par la matrice entrent particulièrement en considération dans la littérature : le premier serait un transport de chaleur pris en charge par la matrice tandis que le second serait une dissipation d'énergie par ondes de stress mécanique dans le réseau matrice/analytes.⁴⁵

Vertes et al. ont aussi testé des durées de pulse laser de l'ordre de la femtoseconde et conclu à de moins bonnes performances (notamment dues à des phénomènes de fragmentations) qu'avec des durées de pulse laser de l'ordre de la nanoseconde. Ceci

suggère qu'il y ait un impact de la durée du pulse laser sur la dynamique de dissociation des molécules lors de leur éjection.

4.2.3. Ejection des molécules.

S'il y a peu de chance qu'il existe un modèle uni du phénomène d'expansion en phase gazeuse, quelques hypothèses reposent sur l'instabilité thermodynamique (surchauffage) ou la décomposition spinodale de l'échantillon. Des valeurs expérimentales semblent aussi concorder avec des lois de dépendance⁵⁸ entre le taux de molécules éjectées et les paramètres d'énergie d'activation, de densité, de chaleur spécifique, de température initiale des molécules, et également de paramètres optiques (coefficient d'absorption, fluorescence, profondeur de pénétration laser). Cependant, l'éjection de molécules individuelles est un cas simplifié. L'éjection de paquets de molécules de matrice/analytes et leur dissociation est un phénomène encore plus difficile à éclaircir.⁴⁵

4.2.4. L'ionisation

Deux grandes phases du processus d'ionisation ont été décrites par Knochenmuss et Vertes : l'ionisation primaire et l'ionisation secondaire.⁵⁹ L'ionisation primaire serait le résultat combiné de la photo-excitation des molécules de matrice (un électron passe à un niveau d'énergie électronique supérieur de la matrice) et d'un mécanisme thermique favorisé par une température locale très élevée. L'ionisation d'une molécule de matrice dépend aussi de son potentiel d'ionisation : ce dernier est connu pour les matrices en solution mais il l'est moins pour les matrices sous leurs formes cristallines. L'ionisation secondaire aurait lieu, elle, lors de la phase d'expansion, par transfert de protons en phase gazeuse.⁶⁰ Durant ces processus d'ionisation, l'affinité protonique est un paramètre essentiel qui favorise l'ionisation de l'analyte. Les protéines et les peptides ont une affinité protonique de l'ordre de 240 kcal/mol,⁶¹ supérieure aux affinités protoniques des matrices les plus couramment utilisées (Tableau 1.5) : la protonation des analytes et la déprotonation des molécules de matrice sont donc thermodynamiquement favorisées. Si l'écart entre les valeurs d'affinités protoniques des analytes et des molécules de matrice est important, la réaction du transfert de protons peut être exothermique et expliquer la fragmentation de certains analytes.^{62,63,64}

Matrices	4-HCCA	2,5-DHB	HPA	SA	Glycine	Lysine	Arginine
Affinité protonique mesurée (Kcal/mol)	223	204		214			
	183	202.4	214	204	210.5	235.6	244.8
	201	204	214.5	212			
				210			
Basicité mesurée en phase gazeuse (Kcal/mol)	215	197		206	202.7	221.8	237

Tableau 1.5. Valeurs de basicité et d'affinités protoniques mesurées de matrices et d'analytes (glycine, lysine et arginine).⁶⁵

4.2.5. La dynamique de la « plume »

Les études expérimentales et à la fois les simulations de la dynamique moléculaire du panach (ou de la « plume » en anglais) dans la phase gaz sont très importantes et ont aidé à l'optimisation de l'instrumentation du MALDI. Les paramètres qui caractérisent la plume sont majoritairement sa composition (ions, molécules neutres, paquets de matrice/analytes, fragments, protons, électrons) et son évolution temporelle (désintégration des paquets, collisions, réactions intermoléculaires, mouvement « hydrodynamique », vitesse et vitesse initiale de chaque élément composant la plume).

Les mesures expérimentales des vitesses des molécules lors d'analyses MALDI utilisant un laser UV sont assez différentes selon les groupes.⁴⁵ Les conclusions sont aussi difficiles à tirer de par les différentes méthodes de mesures employées (méthode DE, méthode de dérivation du champ libre FFD). Les études s'accordent tout de même sur certains points : la vitesse des ions ne dépendraient pas de la masse des ions ou de la puissance du laser, par contre, la réduction de la taille du faisceau laser entraînerait une augmentation de la vitesse des ions. La vitesse des molécules neutres a aussi majoritairement été déterminée légèrement inférieure à celle des ions. Aussi, les vitesses axiales sont nettement supérieures aux vitesses radiales et les molécules co-désorbées ont leur nuage d'expansion moins diffus que celui des ions de la matrice. Finalement, il semble qu'il y ait deux phases selon le type de molécules co-désorbées (une phase d'évaporation et une phase d'expansion) alors que ce serait moins le cas pour les molécules de la matrice.

Malgré des tendances globales, les études montrent aussi que la dynamique moléculaire est largement dépendante du type d'analytes et de la matrice qui leur est associée. Par ailleurs, les simulations tendent à s'approcher des valeurs mesurées mais ne correspondent pas encore très précisément.

4.3. Limitations du MALDI et techniques alternatives de LDI-MS sans matrice.

4.3.1. Applications et enjeux des techniques alternatives de LDI-MS vs MALDI.

Le DIOS est d'abord un complément essentiel au MALDI dans le sens où cette technique remédie à l'inconvénient majeur du MALDI et excelle dans la détection sensible de molécules de poids moléculaire inférieur à 700 Da (marqueurs de cancer, inhibiteurs enzymatiques, toxines, molécules de médicaments, ...) puisqu'il n'y a pas d'interférence avec des ions de matrice organique.⁶⁶ Par rapport au MALDI, le signal d'analyse est également optimisé par le fait que le DIOS conduit à une désorption/ionisation avec très peu, voire aucune dégradation (fragmentation) des analytes. Aussi, les analytes sont concentrés dans une petite zone de dépôt homogène (dont la taille peut être contrôlée) alors que pour le MALDI le dépôt de l'échantillon est inhomogène et s'étale sur 2,5 mm en moyenne : en conséquence les analytes sont moins éparpillés et le signal détecté est plus intense. Finalement, les échantillons à analyser peuvent être déposés par des automates sur lesquels le support de silicium poreux s'adapte, et tout comme pour le MALDI, il est possible de procéder à des opérations de dessalage des échantillons.

Récemment, Northen et al. ont révélé le potentiel de la spectrométrie de masse initiée par nanostructures (NIMS) : ils ont montré qu'avec cette technique, il est possible de caractériser des dépôts de réseaux de peptides, d'analyser directement de l'urine, du sang, une cellule unique ou encore de faire de l'imagerie de tissu, tout en améliorant la sensibilité des analyses, la résolution de l'imagerie et la fragmentation des analytes.⁶⁷

Les supports de nanomatériaux inorganiques peuvent effectivement servir à faire de l'imagerie, autrement dit à cartographier la distribution de composés (peptides, protéines) par spectrométrie de masse d'une fine section de tissu. L'intensité du signal pour chaque m/z de chaque coordonnée de la grille d'acquisition est intégrée et une image bidimensionnelle de la densité d'ions reconstruite. La technique est illustrée en Figure 1.15.

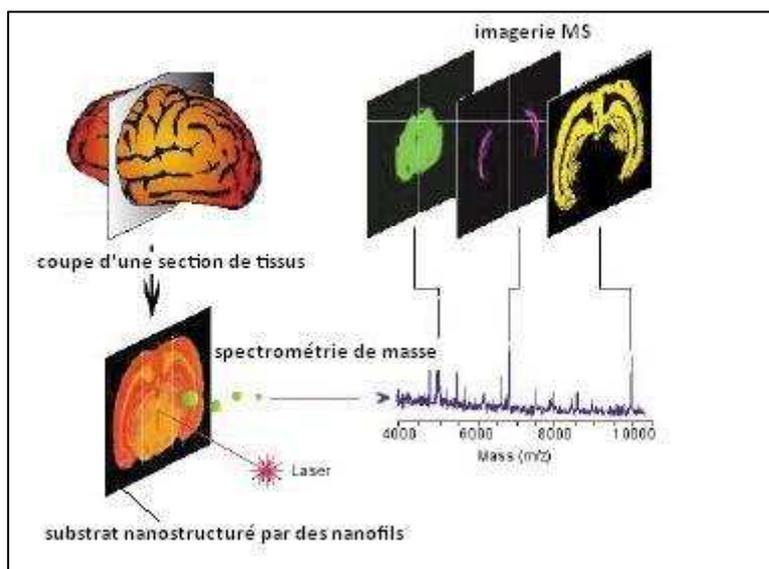


Figure 1.15. Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse.

Cette technique permet par exemple de suivre la position de certains marqueurs du cancer (suivi de la progression de la maladie), ou encore de mieux identifier la sur- ou sous-expression de protéines d'un tissu malade par rapport à un tissu sain.

Les nanostructures peuvent également servir comme support sélectif pour l'accrochage de molécules « sondes »,⁶⁸ ceci grâce à une chimie de surface que nous verrons au chapitre 2. Cela laisse donc entrevoir des perspectives de détection par LDI-MS de molécules cibles ayant interagi avec les molécules sondes immobilisées sur les nanofils. Les enjeux de tels nanocapteurs seraient l'analyse d'interactions biomoléculaires protéine-protéine, peptide-protéine pour améliorer les diagnostics médicaux.

4.3.2. Mécanisme des analyses LDI-MS sans matrice sur nanostructures.

Un peu comme le développement empirique du MALDI, les techniques d'analyses LDI-MS sans matrice se sont multipliées et ont élargi leur spectre d'applications avec l'utilisation de diverses nanostructures. En parallèle, le phénomène permettant à ces nanostructures de mener à la désorption/ionisation laser de biomolécules a fait l'objet de quelques investigations mais paraît complexe et reste globalement incompris. Au cours de cette thèse, l'optimisation du support de nanofils de silicium pour la LDI-MS s'est aussi majoritairement basée sur la variation de paramètres expérimentaux. L'influence de ces paramètres sur les performances des analyses LDI-MS nous amènerons à discuter le phénomène au chapitre 3.

5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons situé la technique d'analyse MALDI par rapport aux autres techniques de spectrométrie de masse. L'ESI et le MALDI sont les deux principales techniques employées pour l'analyse d'échantillons de biomolécules mais le MALDI présente l'avantage d'analyser plus facilement les mélanges complexes et d'échantillons à forte concentration en sels. Le MALDI donc est une méthode d'analyse incontournable pour caractériser les protéines, peptides et molécules chimiquement actives mais son principal inconvénient réside dans l'analyse de molécules de masses inférieures à 700 Da. Nous avons introduit la technique du DIOS qui est apparue pour pallier cet inconvénient majeur de la technique MALDI. Nous avons ensuite décrit les différentes améliorations qui ont été apportées au cours du temps à l'instrumentation du spectromètre de masse utilisé pour les techniques MALDI et DIOS. Finalement, nous avons donné un aperçu de la complexité du mécanisme de désorption/ionisation et fait état des perspectives que laissent entrevoir les techniques de LDI-MS sans matrice sur supports inorganiques. Ces supports sont notamment des nanostructures ou matériaux nanostructurés dont les diverses propriétés (optiques, thermiques, ...) présentées au chapitre 2 ne sont pas anodines à l'amélioration des performances LDI-MS. Nous le constaterons en particulier au chapitre 3 pour la LDI-MS sur nanofils de silicium, technique que nous avons optimisée au cours de cette thèse.

6. Bibliographie

- ¹³ Barber, M.; Jolles, P.; Vilkas, E.; Lederer, E. "Determination of amino acid sequence in oligopeptides by mass spectrometry. The structure of fortuitine, an acyl-nonapeptide methyl ester" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, 18, 469-473.
- ¹⁴ Beckey, H. D. "Field desorption mass spectrometry" *Research/Development.* **1969**, 20, 11, 26.
- ¹⁵ Macfarlane, R.D.; Torgerson, D.F. "Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy". *Science*, **1976**, 191, 920-925.
- ¹⁶ Barber, M.; Bordoli, R.S.; Elliot, G.J.; Sedgwick, R.D.; Tyler, A.N.; Green, B.N. "Fast Atom Bombardment of Solids (F.A.B.) : A New Ion Source for Mass Spectrometer". *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 936-938.
- ¹⁷ Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. "Molecular beam of macolons", *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 2240-2249.
- ¹⁸ Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. "Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers". *Anal. Chem.* **1985**, 57, 675-679.
- ¹⁹ Fenn, J. B. "Electrospray wings for molecular elephants", *Ang. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3871-3894.
- ²⁰ Blakley, C. R.; Mcadams, M. J.; and Vestal, M. L. "Crossed-Beam Liquid Chromatographe-Mass Spectrometer". *J. Chrom.* **1978**, 158, 261.
- ²¹ Blakley, C. R.; Carmody, J. J.; Vestal, M. L. "Combined liquid chromatograph/mass spectrometer for involatile biological samples" *Clin. Chem.* **1980**, 26, 1467
- ²² Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. "On the evaporation of small ions from charged droplets". *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2287-2294.
- ²³ Karas, M.; Hillenkamp, F. "Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons" *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299-2301
- ²⁴ Lemaire, R. "Nouveaux développements pour l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI - Applications aux problèmes biologiques et à la recherche de biomarqueurs dans le cancer de l'ovaire". Thèse de l'Université Paris 6. **2006**
- ²⁵ Cavusoglu N. "Apport de la spectrométrie de masse à l'étude de modifications post-traductionnelles et à la protéomique". Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg. **2002**.
- ²⁶ Glückmann, M.; Karas, M. "The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization". *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 467.
- ²⁷ De Hoffmann, E.; Stroobant, V. ; Charrette, J.J. ; "In Mass Spectrometry - Principles and Applications", *Wiley*, **2001**.
- ²⁸ Wei, J.; Buriak, J. M.; Siuzdak, G. "Desorption/Ionization Mass Spectrometry on Porous Silicon" *Nature* **1999**, 399, 243-246.

- ²⁹ Yala-Aithammouda, M. "*Etude et réalisation de microcapteurs de flux thermique en technologie silicium*", Thèse de l'université des sciences et technologies de Lille, **2007**.
- ³⁰ Siuzdak, G. "*The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*", Paperback, 2nd edition **2006**.
- ³¹ De Hoffmann, E. ; Charrette, J.; Stroobant, V. "*Spectrométrie de masse*" **1994**.
- ³² Domon, B.; Aebersold, R. "*Mass Spectrometry and Protein Analysis*". *Science*, **2006**, 312, 212-217.
- ³³ Paul, W.; Steinwedel, H. "*Ein neues massenspektrometer ohne magnetfeld*". *Zeitschrift fur Naturforschung* **1953**, 8a, 448.
- ³⁴ Hoffmann, D.E.; Charette, J.; Stroobant, V. 2^{ème} édition. *Dunod*, **1999**.
- ³⁵ Asamoto, B. "*FT-ICR/MS: Analytical applications of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*", VCH Publisher, Inc, New York, **1991**.
- ³⁶ Amster, I. J. "*Fourier Transform mass spectrometry*". *J. Mass Spectrom.* **1996**. 31, 1325-37.
- ³⁷ Wiley W.C.; McLaren I.H. "*Time-of-flight mass spectrometry with improved resolution*". *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, 26, 1150-1157.
- ³⁸ Tabet, J.C.; Cotter, R.J.; "*laser desorption time-of-flight mass spectrometry of high mass molecules*". *Anal Chem.* **1984**, 56, 9, 1662-1667.
- ³⁹ Li, Y.; Hunter, R.L.; McIver Jr, R.T. "*High resolution mass spectrometer for protein chemistry*". *Nature*, **1994**, 370, 393-395.
- ⁴⁰ Jonscher, K.R.; Yates, J.R. "*P protein (polymerase-associated phosphoprotein)*". *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 1735-1741.
- ⁴¹ Bordoli, R. S.; Howes, K.; Vickers, R. G.; Bateman, R. H.; Harvey, D. J. "*Matrix-assisted laser desorption mass spectrometer on a magnetic sector instrument fitted with an array detector*". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 585-589.
- ⁴² Fenselau, C. "*MALDI MS and strategies for protein analysis*". *Anal. Chem.* **1997**. 69, 21, 661A-665A.
- ⁴³ Vestal, M.C.; Juhasz, P.; Martin S.A. "*Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry*". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**. 9, 1044-1050.
- ⁴⁴ Mamyrin, B.A.; Karataev, V.I.; Shmikk, D.V.; Zagulin, V.A. "*Mass reflectron. New nonmagnetic time-of-flight high-resolution mass spectrometer*". *Zh. Eksp. Theor. Fiz.* **1973**, 64, 82-89.
- ⁴⁵ Dreisewerd, K. "*The Desorption Process in MALDI*" *Chem. Rev.* **2003**, 103, 395-425
- ⁴⁶ Alves, S.; Fournier, F.; Afonso, C.; Wind, F.; Tabet, J. C. "*Gas-phase production/desolvation processes and their effect on protein charge state distribution under matrix-assisted laser desorption/ionization conditions*". *Eur J Mass Spectrom.* **2006**, 12.

- ⁴⁷ Horneffer, V.; Reichelt, R.; Strupat, K. "Protein incorporation into MALDI-matrix crystals investigated by high resolution field emission scanning electron microscopy". *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 226, 1, 117-131
- ⁴⁸ Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. "Influence of the wavelength in high-spectrometry of organic molecules". *Anal. Chem.* **1985**, 57, 2935-2939.
- ⁴⁹ Beavis, R.C.; Chait, B.T. "Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, 3, 432-435.
- ⁵⁰ Horneffer, V.; Dreisewerd, K.; Luedemann, H. C.; Hillenkamp, F.; Laege, M.; Strupat, K. "Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid". *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, 185, 857-868.
- ⁵¹ Chen, X.; Carroll, J. A.; Beavis, R. C. "Near-ultraviolet-induced matrix assisted laser desorption ionization as a function of wavelength". *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, 9, 885-891.
- ⁵² Ingendoh, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Giessmann, U. "Factors affecting the resolution in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry" *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1994**, 131, 345-354
- ⁵³ Dreisewerd, K.; Schurenberg, M.; Karas, M.; Hillenkamp, F. "Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption ionization with a uniform beam profile" *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1994**, 141, 127-148.
- ⁵⁴ Zhigilei, L.V.; Garrison, B.J. "Garrison, Microscopic Mechanisms of Laser Ablation of Organic Solids in the Thermal and Stress Confinement Irradiation Regimes". *J. Appl. Phys.* **2000**, 88, 1281.
- ⁵⁵ Westmacott, G.; Ens, W.; Hillenkamp, F.; Dreisewerd, K.; Schurenberg, M. "The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry" *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, 221, 67-81.
- ⁵⁶ Vertes, A.; Gijbels, R.; Levine, R. D. "Homogeneous Bottleneck Model of Matrix-Assisted Ultraviolet- Laser Desorption of Large Molecules". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1990**, 4, 228.
- ⁵⁷ Bencsura, A.; Navale, V.; Sadeghi, M.; Vertes, A. "Matrix-Guest Energy Transfer in Matrix-assisted Laser Desorption" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, 11, 679.
- ⁵⁸ Zhigilei, L.; Kodali, P.; Garrison, B. "On the Threshold Behavior in Laser Ablation of Organic Solids". *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 276, 269-273
- ⁵⁹ Knochenmuss, R. "A bipolar rate equation model of MALDI primary and secondary ionization processes, with application to positive/negative analyte ion ratios and suppression effects". *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, 285, 3, 105-113.
- ⁶⁰ Zhigilei, L. V.; Garrison, B. J. "Velocity distributions of analyte molecules in matrix-assisted laser desorption from computer simulations". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 12, 1273.

- ⁶¹ Harrison, A. G. "The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides". *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, 16, 201.
- ⁶² Gross, J.; Leisner, A.; Hillenkamp, F.; Hahner, S.; Karas, M.; Schäfer, J.; Lützenkirchen, F.; Nordhoff, E. "Investigations of the metastable decay of DNA under ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization conditions with post-source-decay analysis and hydrogen/deuterium exchange". *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, 9, 866.
- ⁶³ Jespersen, S.; Niessen, W. M.; Tjaden, U. R.; van der Greef J. "Basic matrices in the analysis of non-covalent complexes by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry". *J. Mass Spectrom.* **1998**, 33, 1088-1093.
- ⁶⁴ Simmons, T.A.; Limbach, P.A. "Influence of Co-matrix Proton Affinity on Oligonucleotide Ion Stability in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry" *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, 9, 668.
- ⁶⁵ Richert, S. "De l'identification à la caractérisation de protéines : Développement de la spectrométrie de masse dans le cadre de l'approche protéomique" Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg. **2003**.
- ⁶⁶ Budimir, N.; Blais, J.C.; Fournier, F.; Tabet, J.C. "The use of desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry for the detection of fatty acids". *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2006**, 20, 680-684.
- ⁶⁷ Northen, T. R.; Yaner, O.; Northen, M. T.; Marrinucci, D.; Uritboonthai, Winnie.; Apon, J.; Gollidge, S. L.; Nordström, A.; Siuzdak, G. "Clathrate nanostructures for mass spectrometry". *Nature*, **2007**, 449, 1033-1036.
- ⁶⁸ Cui, Y.; Wie, Q.; Park, H.; Lieber, C. M. "Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species". *Science*, **2001**, 293, 1289-1292.

Chapitre 2
Synthèse/Fabrication de
nanostructures de silicium et
propriétés.

1. Introduction

La lithographie optique est une méthode qui permet la fabrication de systèmes composés de structures de tailles micrométriques mais ne permet pas de réaliser des structures de tailles nanométriques. De nouvelles techniques sont donc apparues pour relever les défis de nanofabrication :

- Des techniques descendantes (top-down) de lithographie à faisceau électronique suivies de procédés de nanoimpression,⁶⁹ de gravures ou de dépôts localisés.
- Des techniques ascendantes (bottom-up) de synthèse ou d'auto-assemblage de nanostructures.

Nous présentons dans ce chapitre quelques méthodes de réalisation de nanostructures de silicium réparties sur de larges surfaces. Dans un second temps, nous voyons la chimie de surface classique qu'on peut appliquer à ces nanostructures.

Les réseaux de nanostructures étendues sur de larges surfaces ne sont pas que le fruit ou l'objet de procédés technologiques ; ils existent déjà à l'état naturel. Ils confèrent d'ailleurs des propriétés pour le moins étonnantes aux êtres qui en sont composés : capacité autonettoyante de la feuille de lotus, adhésion du gecko au plafond, couleurs des ailes des lépidoptères par diffraction de la lumière et non par pigmentation, ...

Effectivement, nanostructurer un matériau implique la modification de ses propriétés : optiques, thermiques, de tension de surface liquide/solide, ... Les études théoriques et empiriques de ces propriétés sont en évolution constante de nos jours. Pour le moment, les deux approches sont assez éloignées : la théorie développe des modèles simplifiés du comportement de très petits objets de quelques atomes alors que les mesures et observations empiriques sont encore très complexes à modéliser. Nous établirons un résumé des avancées théoriques et expérimentales sur les différentes propriétés des nanostructures de silicium. Ce point sera très utile par la suite et permettra de discuter des résultats présentés aux chapitres suivants.

2. Synthèse de nanostructures de silicium.

Il est possible de synthétiser différentes formes de nanostructures de silicium et le choix de la méthode de synthèse est fonction des applications ou études envisagés. Au cours de cette thèse, nous avons principalement utilisé les synthèses de nanofils de silicium par attaque chimique du silicium par le mélange HF/AgNO₃ et par procédé Vapeur-Liquide-Solide (VLS). Nous avons également synthétisé des nanofils de silice par voie Solide-Liquide-Solide (SLS).

2.1. Croissance de nanofils de silicium par voie Vapeur-Liquide-Solide (VLS)

La méthode Vapeur-Liquide-Solide⁷⁰ (VLS) utilise des nanoparticules métalliques qui jouent le rôle de catalyseurs pour la croissance de nanofils semi-conducteurs. Des nanoparticules catalyseurs d'or sont généralement employées car la température de fusion de l'alliage or-silicium est faible (point eutectique à 363°C). Elles sont déposées sur la surface avant croissance soit par :

- évaporation thermique d'une fine couche métallique (10 à 40 Å) à l'aide d'un bâti de métallisation. La couche métallique est trop fine pour être continue : elle est sous forme de nanoparticules métalliques en surface.
- Soit par adsorption de colloïdes métalliques (de 10 à 50 nm).

Un traitement à l'acide fluorhydrique ainsi qu'un recuit sont ensuite appliqués à ces surfaces avant la croissance des nanofils de manière à améliorer la qualité de l'interface or/silicium. La croissance de nanofils de silicium par voie VLS consiste ensuite en la décomposition d'un gaz de silane SiH_4 catalysée par les particules d'or à haute température ($>363^\circ\text{C}$). En effet, l'or a un large coefficient d'accommodation et s'avère un site préférentiel pour l'adsorption du silane. Le mélange silicium/or dans la « gouttelette catalyseur » forme alors un alliage liquide à des températures supérieures au point eutectique (363°C). La saturation de la phase liquide par le silicium provoque ensuite la précipitation du silicium sur la surface et la création d'un cristal (nucléation) de silicium. L'apport constant en silane permet l'élongation du cristal et la formation des nanofils de silicium (Figure 2.1).

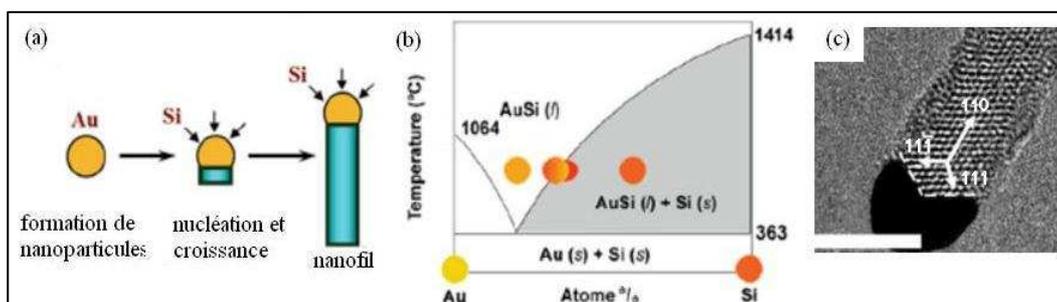


Figure 2.1. (a) Processus de croissance VLS d'un nanofils de Si, (b) Diagramme de phase Si, (c) Image de microscopie électronique en transmission à haute résolution (HRTEM) d'un nanofil de silicium avec son catalyseur, la barre d'échelle vaut 5 nm.⁷¹

Le diamètre des nanofils peut varier d'une dizaine à une centaine de nanomètres et leur longueur d'une centaine de nanomètres à plusieurs micromètres. La Figure 2.2 illustre

quelques surfaces de nanofils de silicium que l'on peut obtenir en variant les conditions de synthèse (pression, flux de silane, présence d'autres gaz, température, temps), caractérisées ici par microscopie à balayage électronique (MEB).

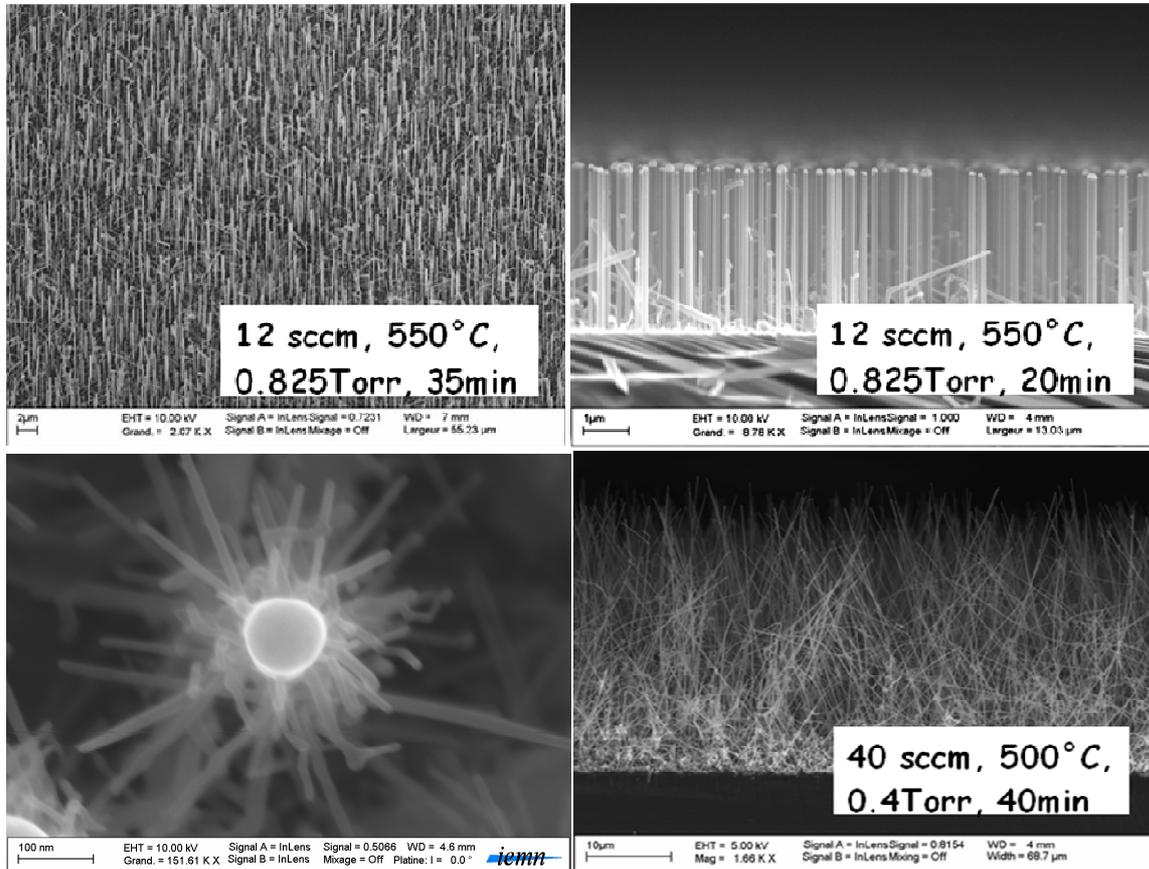


Figure 2.2. Images de microscopie à balayage électronique (MEB) de nanofils de silicium synthétisés par VLS au laboratoire IEMN.

De récentes observations *in situ* de la croissance ont éclairci quelques points du mécanisme VLS.⁷² Le diamètre des nanofils est sensiblement le même que le diamètre des gouttes d'alliage or/silicium. Néanmoins, selon les conditions de synthèse, le volume de la goutte d'or situé à la pointe du nanofil en croissance diminue, l'or mouille les parois du nanofil et l'on peut ainsi aboutir à la formation de nanofils en forme d'arbre (Figure 2.2) ou de pyramides.⁷³

Quatre types de morphologies de nanofils VLS ont été testés comme support pour la LDI-MS sans matrice. Nous verrons au Chapitre 3 que la morphologie des nanofils est un facteur déterminant pour la performance des analyses LDI-MS. Les croissances suivantes sont réalisées dans un four CVD (Société MPA industries, Saint-jean Bonnefonds, France) :

- (a) : Silicium $\langle 111 \rangle$ + 20 Å d'or, recuit à 700°C sous H₂ puis croissance à 1.1mBar, 150sccm H₂, 12sccm SiH₄, 550°C, 25 minutes
- (b) : Silicium $\langle 111 \rangle$ + 20 Å d'or, recuit à 700°C sous H₂ puis croissance à 1.1mBar, 150sccm H₂, 1sccm SiH₄, 550°C, 100 minutes
- (c) : Silicium $\langle 111 \rangle$ + 40 Å d'or 1^{ère} croissance à 0.532mBar, 40sccm SiH₄, 500°C, 60 minutes. Dépôt de 20 Å d'or, recuit à 700°C sous H₂ puis 2^{ème} croissance à 1.1mBar, 150sccm H₂, 12sccm SiH₄, 550°C, 60 minutes
- (d) : Silicium $\langle 111 \rangle$ + 20 Å d'or, recuit à 700°C puis croissance à 2 températures 1.1mBar, 150sccm H₂, 12sccm SiH₄, 550°C (5 min) puis 390°C pendant 35 minutes.

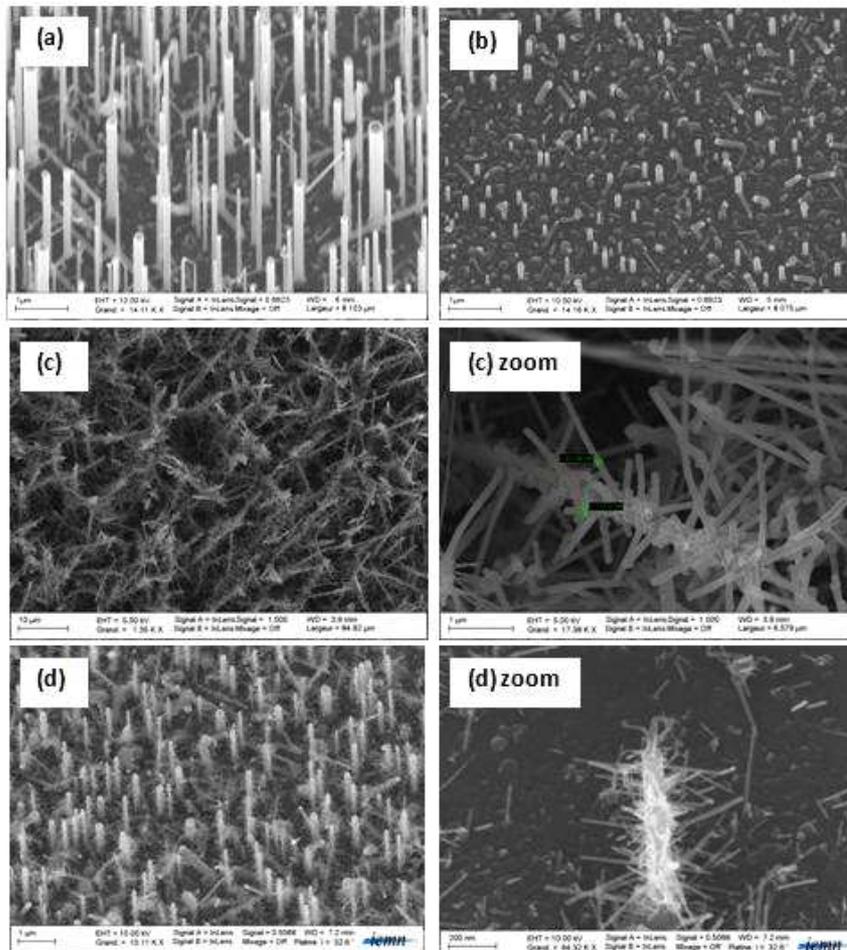
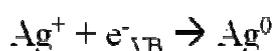


Figure 2.3. Images MEB : vues inclinées des nanofils de silicium synthétisés par VLS selon différents paramètres avec pour grossissements a) 15KX (barre d'échelle 1µm), b) 15KX (barre d'échelle 1µm) c) 1.3KX (barre d'échelle 12µm), zoom 17KX (barre d'échelle 1µm), d) 10KX (barre d'échelle 1µm), zoom 64KX (barre d'échelle 200nm).

2.2. Fabrication de nanofils de silicium par gravure chimique sans électrode

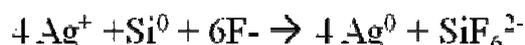
Peng et al ont montré en 2003 que le mélange chimique HF/AgNO₃ permet à la fois le dépôt d'argent sur la surface de silicium sans électrode et la gravure de silicium aboutissant à la formation de nanofils de silicium.⁷⁴ En effet, deux phénomènes se déroulent simultanément : une réduction des ions argent Ag⁺ (réaction cathodique) et une oxydation du silicium (réaction anodique). Le mécanisme consiste, dans un premier temps, à la capture d'électrons de la bande de valence du silicium par les cations Ag⁺. La réduction des ions d'argent en nanoparticules d'argent a alors lieu et ces nanoparticules jouent le rôle de cathode :



Quant à lui, le substrat de silicium joue le rôle de l'anode où a lieu la dissolution de l'oxyde de silicium par le HF²:



La réaction globale est alors la suivante :



Un schéma de principe est présenté en Figure 2.4. Les nanoparticules d'argent étant plus électronégatives que le silicium, les ions Ag⁺ vont préférentiellement être attirés par les particules d'argent déposées à la surface plutôt que par le silicium. Les particules d'argent assurent donc le transfert localisé des électrons de la bande de valence du silicium. Ce transfert est d'autant plus favorisé par la faible barrière d'énergie à l'interface Ag/Si et on aboutit rapidement à un excès de transfert d'électrons sous la particule d'argent. Cela conduit à l'oxydation excessive du silicium. Le SiO₂ est immédiatement gravé par le HF² présent en solution et la particule d'argent descend dans l'ouverture ainsi formée.

² Attention : L'acide fluorhydrique (HF) est un acide extrêmement toxique qui doit être manipulé avec des précautions particulières (cf sa feuille de sécurité).

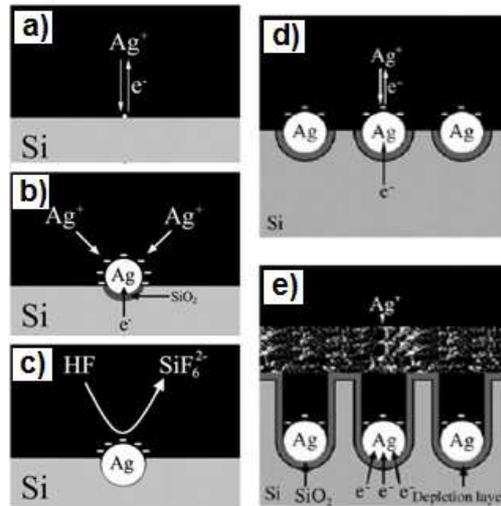


Figure 2.4. Schéma de principe de la réalisation de nanofils de silicium par gravure chimique HF/AgNO₃.⁷⁵

Il y a aussi le phénomène parallèle du dépôt de métal sur métal, menant à l'apparition de particules de taille plus importante : il se forme un dépôt épais d'argent et des structures dendritiques d'argent comme on peut le voir sur l'image MEB de la Figure 2.5. Selon le rapport cinétique de la formation de nanoparticules d'argent et de la gravure de l'oxyde de silicium, il est plus ou moins possible pour les plus grosses particules d'argent (ou dendrites) de rentrer dans les trous formés. Ce rapport dépend de la concentration relative entre l'HF et l'AgNO₃.

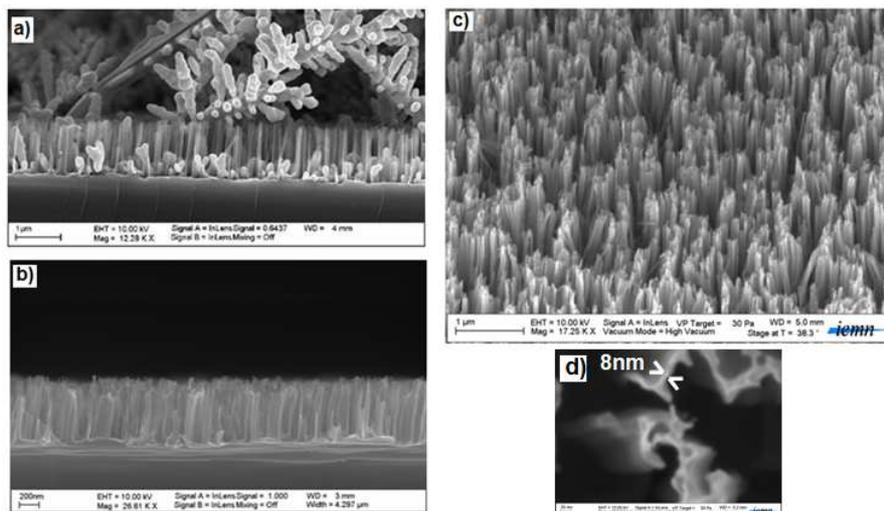


Figure 2.5. Images MEB de nanofils de silicium réalisés par gravure chimique HF/AgNO₃ : a) avant dissolution de l'argent, b) après dissolution de l'argent (vue en coupe), c) après dissolution de l'argent (vue tiltée), d) zoom sur les nanofils de silicium (vue de dessus).

Concrètement, l'échantillon de silicium est préalablement nettoyé par attaque piranha $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$ (1:1 v/v) pendant 10 minutes puis rincé abondamment à l'EDI et placé dans l'EDI pendant 10 minutes aux ultrasons avant séchage à l'azote. L'échantillon est ensuite directement introduit dans le mélange HF/AgNO_3 pendant quelques minutes à 50°C , suivi d'un rinçage EDI et d'un séchage à l'azote. Pour retirer intégralement l'argent déposé en surface, l'échantillon est immergé pendant 8h dans un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}:\text{HNO}_3$ (1:1:1 v/v/v), suivi à nouveau d'un rinçage EDI et d'un séchage à l'azote.

Les nanofils obtenus (exemple en Figure 2.5) ont une longueur comprise entre 500nm et $15\mu\text{m}$ selon les concentrations et temps d'attaque. Cette longueur est homogène sur un même substrat quelque soit la taille de l'échantillon. Les diamètres sont compris entre 10nm et 100nm et selon les conditions de synthèse les nanofils peuvent être « liés » entre eux et plutôt former des 'nanofeuillets' ou des 'nanoparois' (Figure 2.5.d).

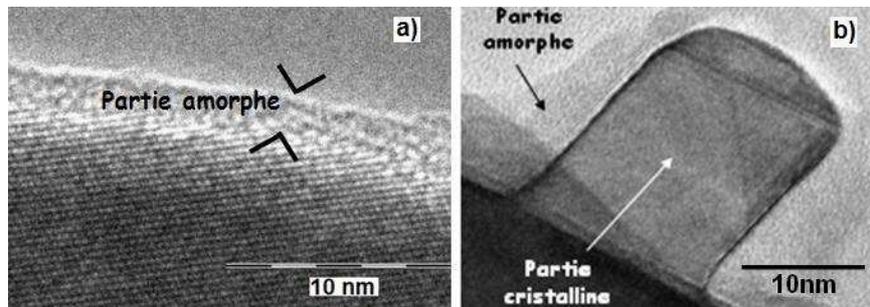


Figure 2.6. Images TEM de nanofils de silicium a) réalisés par gravure chimique HF/AgNO_3 , b) synthétisés par VLS.

Cette méthode présente l'avantage que les nanofils soient cristallins et recouverts d'une couche de silicium amorphe souvent beaucoup plus fine que celle des nanofils synthétisés par voie VLS, c'est le cas sur la Figure 2.6. Par ailleurs, la méthode n'est pas limitée par l'orientation cristallographique, le type ou la concentration du dopant, ou encore la cristallinité du substrat. Les nanofils de silicium sont formés perpendiculairement à la surface pour les orientations $\langle 100 \rangle$ et à 45° pour les orientations $\langle 111 \rangle$. Les inconvénients de cette technique sont cependant le manque de contrôle sur la densité et la dispersion des diamètres sur un même substrat. Cependant, les morphologies de ces nanofils sont reproductibles et complémentaires (car différentes) de celles des nanofils obtenus par la technique VLS ou du silicium macroporeux.

Il est en effet possible de varier l'organisation, la densité et la longueur des nanofils de silicium en fonction du temps d'attaque en gardant des concentrations fixes en HF/AgNO_3

(5,25M/0.02M) à 55°C (Figure 2.7). La morphologie des nanofils de silicium ne dépend pas du type de dopage du substrat de silicium utilisé. Les vues en coupe des images MEB permettent de constater l'évolution croissante de la longueur des nanofils en fonction du temps tandis que les vues de dessus mettent en évidence une organisation des nanofils différentes pour chaque temps d'attaque. Plus la réaction est longue, plus le phénomène parallèle de coalescence des nanoparticules d'argent est important. Ceci peut entraîner la gravure du silicium sous des macroparticules d'argent et expliquer l'espacement plus important entre les paquets de nanofils.

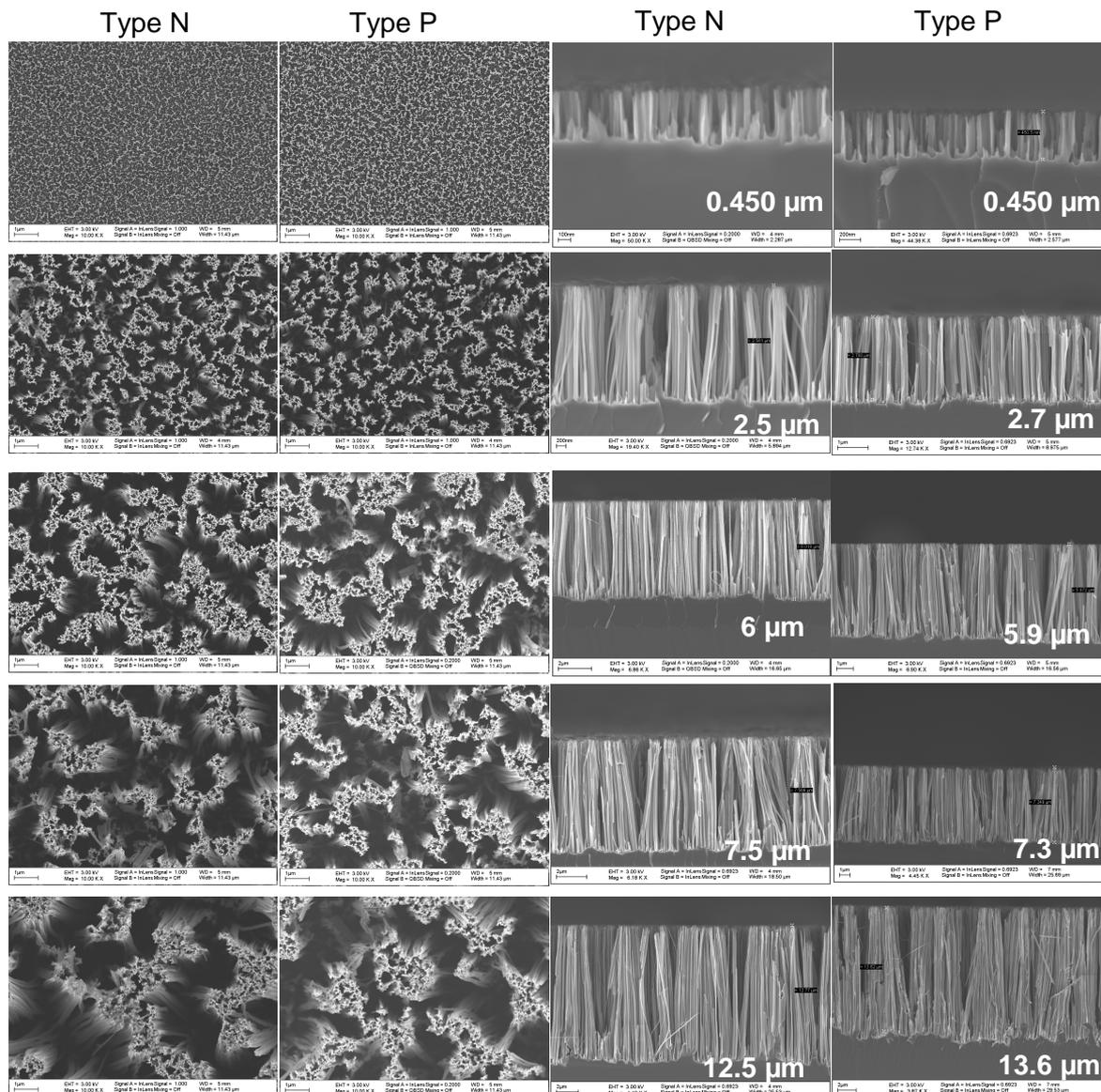


Figure 2.7. Images MEB : Vues de dessus (grossissement 10KX) et en coupe des nanofils de silicium synthétisés par voie chimique en fonction du temps de la réaction (de haut en bas : 5, 10, 30, 60 et 120 minutes) et du type de dopage (N ou P, resistivité 1-10 Ω.CM) du substrat de silicium attaqué (orientation <100>).

Nous avons sélectionné le temps d'attaque donnant les meilleurs résultats en LDI-MS (soit 10min), puis nous avons varié les concentrations en HF/AgNO₃. Ci-dessous, les images MEB en vue de dessus à deux grossissements (10KX et 2.22KX) et en vue de coupe exposent des morphologies encore différentes de celles obtenues en variant le temps d'attaque.

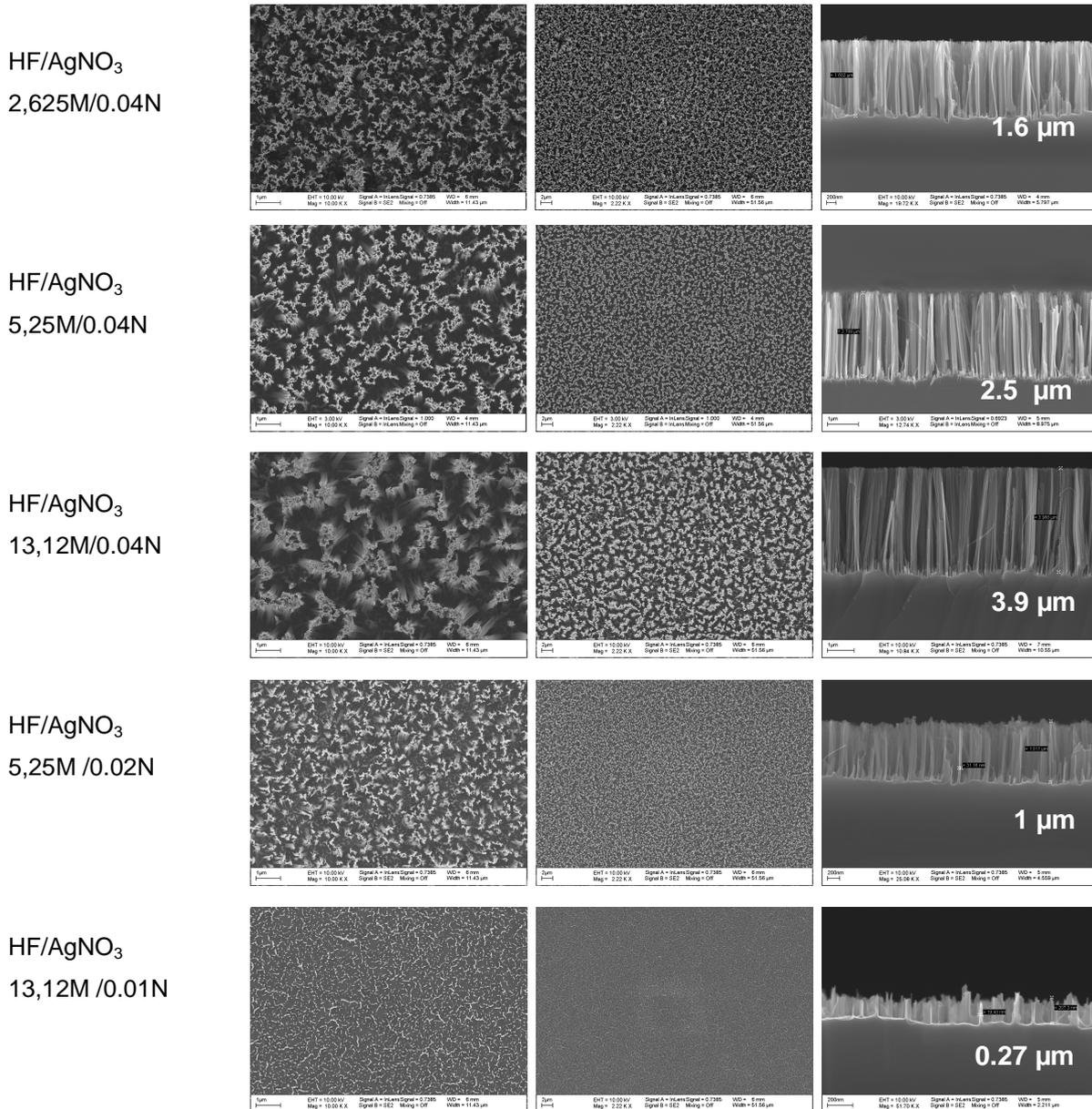


Figure 2.8. Images MEB : Vues de dessus (grossissement 10KX à gauche et 2,22KX au centre) et en coupe des nanofils de silicium synthétisés par voie chimique en fonction de plusieurs concentrations en HF/AgNO₃ de la solution d'attaque.

2.3. Formation de nanofils de silicium par procédé Solide-Liquide-Solide (SLS)

La technique Solide-Liquide-Solide (SLS) n'utilise pas de gaz SiH_4 contrairement à la technique Vapeur-Liquide-Solide : le silicium qui constitue le nanofil vient du substrat. Dans un premier temps, la surface de silicium recouverte d'un film d'or (100 Å) est placée dans un four où la température est supérieure à la température de fusion du métal. Le film d'or forme alors des nanoparticules de catalyseur à la surface du substrat de silicium par démouillage. Une interface solide/liquide (substrat de silicium/catalyseur or-silicium) est alors créée sur le substrat. Tandis que la température du four est de 1100°C, un gaz neutre (azote) refroidit l'interface solide/liquide. Selon Wong et al, les collisions continues des molécules de gaz induisent une instabilité de la nanoparticule catalyseur et font précipiter le silicium.^{76,77} Ce silicium solide s'arrange sous forme de fil et la seconde interface solide (nanofil de silicium) liquide (catalyseur or/silicium) est ainsi formée : une surface de nanofils de silicium (ou plutôt majoritairement d'oxyde de silicium) présentée en Figure 2.9 est alors obtenue.

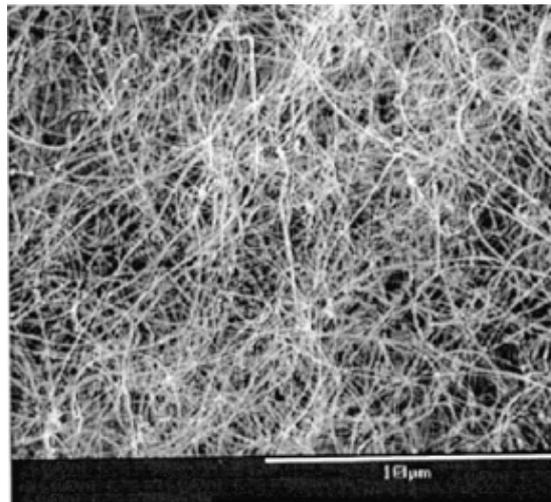


Figure 2.9. Nanofils de silicium synthétisés par voie SLS.⁷⁸

Le mécanisme de croissance pour les nanofils SLS n'est pas encore bien connu. Certains groupes soupçonnent que la croissance de nanofils soit également favorisée par des contraintes mécaniques.^{79,80,81}

3. Chimie de surface.

Les principales réactions de greffages de molécules chimiques sur une surface plane s'appliquent à des surfaces micro/nanostructurées. Nous rappelons donc ici les principaux procédés et contrôles de modification chimique des surfaces. Nous montrons également que suite au type de procédé employé, la surface peut réagir de manière spécifique, ou encore être impliquée dans des interactions covalentes ou non-covalentes : elle est donc potentiellement active vis-à-vis de composés chimiques ou biologiques.

3.1. Modification chimique des surfaces par silanisation

Les monocouches auto-assemblées (SAM pour *Self Assembled Monolayer*) se forment sur deux types de surfaces : les surfaces oxydées (verre, silicium oxydé, surfaces recouvertes d'une couche nanométrique d'oxyde déposée au préalable...) et les surfaces métalliques. Les réactions sur ces deux types de surfaces portent l'appellation respective de silanisation et de thiolation. Nous utilisons donc pour nos surfaces la silanisation.

3.1.1. Les organosilanes

Les organosilanes, molécules de type $R-Si(\Sigma)_3$, comportent une partie silane $Si(\Sigma)_3$ qui réagit avec la surface et d'une partie organique R selon l'activité chimique ou biologique désirée.^{82,83} Les organosilanes les plus communs sont l'aminopropyltriméthoxysilane, où les groupements R sont des amines ($-NH_2$), et le mercaptosilane, où les groupements R sont des thiols ($-SH$). Les organosilanes utilisés au cours de cette thèse sont présentés en Figure 2.10.

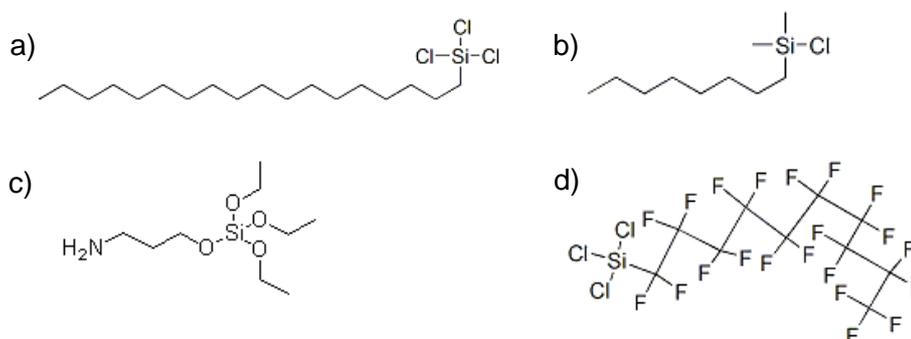


Figure 2.10. Silanes : a) Octadécyltrichlorosilane (OTS), b) Octyldiméthylchlorosilane (ODMCS), c) Aminopropyltriéthoxysilane (APTES), d) Perfluorodécyltrichlorosilane (PFTS).

3.1.2. Principe de la silanisation

Pour réaliser la réaction de silanisation, une étape préalable essentielle est l'activation des groupements silanols (Si-OH) à la surface de l'échantillon. Cette étape peut être réalisée de plusieurs façons (plasma O_2 , ozonolyse...). La plus simple que nous avons le plus souvent employée est celle de l'ozonolyse. Basée sur la capacité des UV à transformer de l'oxygène en ozone, cette technique permet non seulement d'activer les surfaces mais également de détruire toute trace organique à la surface de l'échantillon. Ainsi, après 15 minutes d'ozonolyse sous une lampe de longueur d'onde 183nm, l'échantillon est immergé dans un mélange³ silane/hexane (100 μL /50mL) sous atmosphère azote inerte d'une boîte à gants. La réaction de silanisation se fait en trois étapes :

- L'hydrolyse qui correspond au départ du groupe ΣH de la Figure 2.11
- La création de liaisons hydrogènes (pointillés entre O et H sur la Figure 2.11) entre les silanols présents à la surface de la silice et les groupements silanols des molécules issues de l'hydrolyse.
- La condensation qui permet la formation de la liaison siloxane (Si-O-Si).

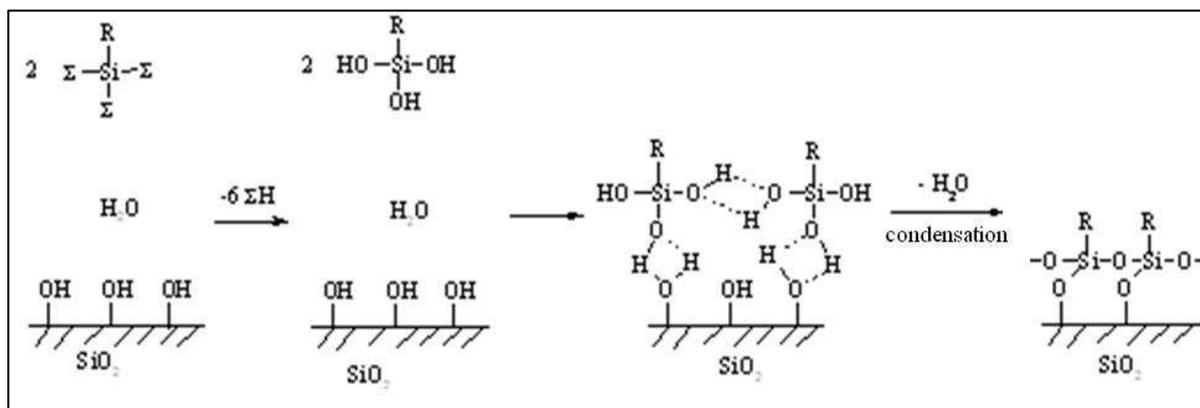


Figure 2.11. Réaction de silanisation selon Sagiv.⁸⁴

Si l'auto-organisation des chaînes a lieu rapidement, ce n'est qu'au bout de 3 heures que la surface est entièrement « recouverte » de molécules. Plusieurs rinçages d'une dizaine de minutes au dichlorométhane puis à l'isopropanol sont alors nécessaires pour éliminer les molécules d'OTS en excès surnageantes ou adsorbées non spécifiquement par interactions apolaires (Chapitre 2 .3.2.4).

³ Sauf pour l'APTES où le mélange est du silane/éthanol (1mL/19mL). La silanisation dure 45 minutes et on effectue des rinçages d'une dizaine de minutes à l'éthanol puis à l'isopropanol.

3.2. Les liaisons non-covalentes

3.2.1. La liaison ionique

Lorsque deux ions de charges opposées s'attirent, plus la différence d'électronégativité (définie au Chapitre 1 .2.2) est grande entre les atomes, plus la liaison entre atomes est polarisée ou possède un caractère « ionique ». Les liaisons covalentes sont plus communes entre non-métaux, tandis que les liaisons ioniques sont plus fréquentes lorsqu'un ou les deux atomes sont des métaux.

Si la liaison est covalente, les deux atomes mettent en commun un électron d'une de leurs couches externes afin de former un doublet d'électrons. Les liaisons covalentes sont directionnelles et impliquent des angles de liaisons spécifiques et définissent la forme caractéristique des molécules. A contrario, les liaisons ioniques lient les atomes par attraction électrostatique coulombienne non-directionnelle.

On peut citer comme exemple la liaison ionique du sel métallique Chlorure de Sodium (Na-Cl). Egalement, les ions du sel Na-Cl peuvent établir des interactions ion-dipôle avec les molécules d'eau (Figure 2.12).

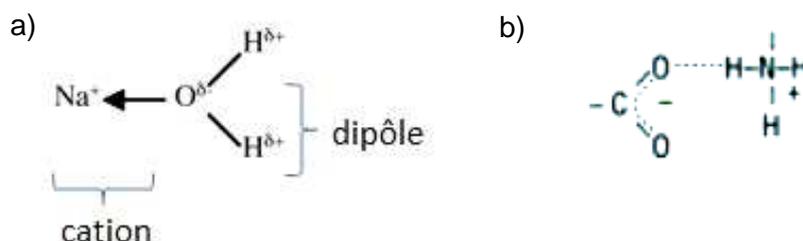


Figure 2.12. a) Interaction ion-dipôle, b) Interaction ion-ion (pont salin).

3.2.2. La liaison hydrogène (interactions polaires)

L'électronégativité des atomes permet d'attribuer des charges partielles sur les atomes constituants d'une molécule. La liaison hydrogène est en fait l'attraction entre la charge partielle positive d'une molécule et la charge partielle négative d'une autre molécule. La Figure 2.13 illustre les liaisons hydrogènes des molécules d'eau telles qu'elles sont couramment représentées.

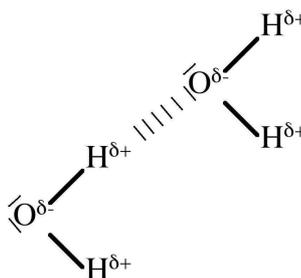


Figure 2.13. Liaison hydrogène entre deux molécules d'eau.

Les forces d'interactions de la liaison d'hydrogène ne valent que 5% des forces d'une liaison covalente. Pourtant, les liaisons hydrogènes permettent de relier les deux hélices de l'ADN, ou encore de lier un anticorps et son antigène. La liaison hydrogène est aussi impliquée dans la conformation spatiale secondaire et tertiaire d'une protéine alors que ces structures définissent la nature de la protéine et donc sa fonction au sein des cellules⁸⁵ : récepteurs des messagers hormonaux, hémoglobine transporteur du dioxygène, enzymes biocatalyseurs des réactions cellulaires... Les forces d'interaction faibles de la liaison hydrogène expliquent donc qu'une modeste variation de température ou de pH puisse dénaturer une protéine.

3.2.3. Les forces de Van Der Waals

Les forces de Van Der Waals sont les forces d'interactions les plus faibles en énergie. Comme la liaison hydrogène, les forces de Van Der Waals font intervenir des interactions entre dipôles. La différence est qu'il s'agit des plus faibles interactions qui puissent exister entre dipôles. Si cette liaison est très faible, le nombre élevé de molécules impliquées peut produire une force globale importante. Ainsi, le gecko possède des pattes nanostructurées qui utilisent des forces nanomécaniques ainsi que ce type d'interactions pour coller à tout type de surface et se déplacer en défiant les lois de la gravité.^{86,87}

3.2.4. Les interactions hydrophobes (ou interactions apolaires)

Les interactions hydrophobes sont en réalité des conséquences directes des liaisons polaires : les molécules polaires s'attirent et repoussent en conséquence les molécules apolaires qui interagissent alors entre elles.

Les molécules uniquement apolaires (hydrocarbures principalement) sont rares dans la nature alors que de nombreuses molécules sont amphiphiles (elles possèdent un pôle polaire et un pôle apolaire). La conformation spatiale la plus stable pour ces molécules est alors de se positionner en forme de micelles ou de « membranes » (Figure 2.14). Les micelles sont souvent utilisées pour faciliter la dissolution des molécules apolaires.

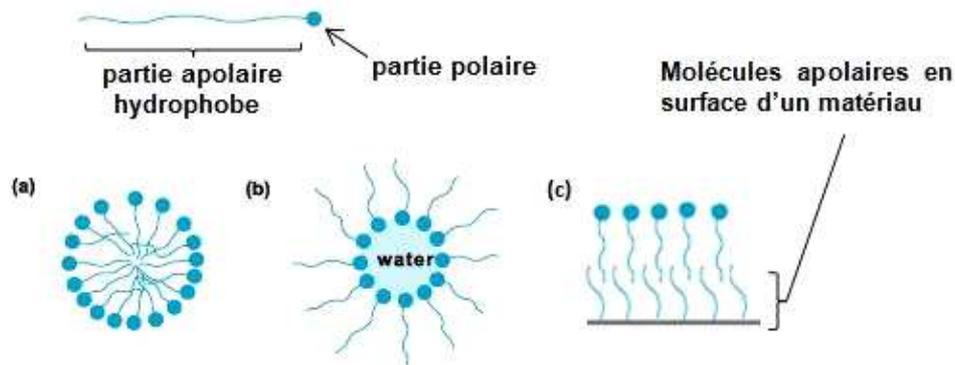


Figure 2.14. Schéma d'une micelle formée par des molécules amphiphiles a) dans un milieu polaire, b) dans un milieu apolaire et c) schéma de l'adsorption de molécules amphiphiles par interactions hydrophobes avec les molécules apolaires en surface d'un matériau.

L'adsorption de molécules amphiphiles sur des surfaces apolaires est utilisée par exemple pour des techniques de chromatographie dites « inverses ».

Au niveau biologique, les interactions ioniques et interactions hydrophobes sont comme la liaison hydrogène impliquées dans la structure tertiaire d'une protéine. Lorsque des protéines sont mises en contact avec une surface recouverte de molécules apolaires et sous certaines conditions, la phase apolaire de la surface peut interagir avec les phases apolaires des protéines et il est probable que celles-ci se dénaturent.⁸⁸

Finalement, afin de ne pas perdre les fonctions biologiques de la protéine et d'obtenir une biointerface efficace et active, il est primordial de contrôler l'adsorption des biomolécules afin de ne pas les dénaturer ou de ne pas modifier leur conformation spatiale pendant l'immobilisation.

4. Propriétés de mouillage des nanofils de silicium

4.1. Angle de contact

On définit une surface comme mouillable ou non mouillable en fonction de l'angle θ que forme une goutte avec la surface au niveau de la ligne triple (interface air, liquide, solide).

Une surface est considérée comme mouillable lorsque l'angle de contact que forme une goutte avec celle-ci est inférieur à 90° et comme non mouillable dans le cas contraire (Figure 2.15). Si le liquide en contact avec la surface est de l'eau, on parle respectivement de surfaces hydrophile et hydrophobe.

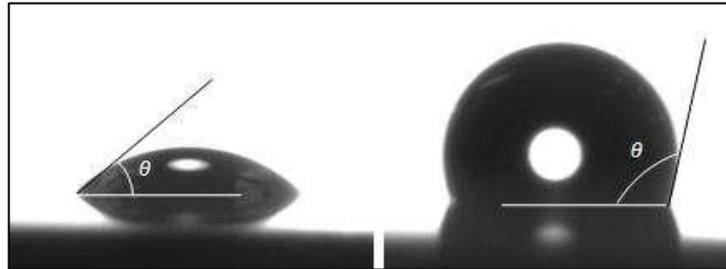


Figure 2.15 - Goutte d'eau déposée sur deux surfaces d'énergies différentes : a) surface mouillable ($\theta < 90^\circ$), b) surface non-mouillable ($\theta > 90^\circ$).

L'angle de contact d'un liquide sur une surface dépend des tensions superficielles (solide/liquide, liquide/liquide, solide/gaz)⁸⁹ qui entrent en jeu. La tension superficielle (encore appelée énergie d'interface ou énergie de surface), notée γ , est la tension qui existe à l'interface de deux milieux. Elle s'exprime en énergie par unité de surface (mJ.m^{-2}) mais peut être également considérée comme une force par unité de longueur (mN.m^{-1}). A partir de cette définition, il est possible d'identifier trois forces (Figure 2.16) agissant sur la ligne triple :

γ_{LG} ou γ (tension de surface liquide/gaz), γ_{LS} (tension de surface liquide/solide) et γ_{SG} (tension de surface solide/gaz).

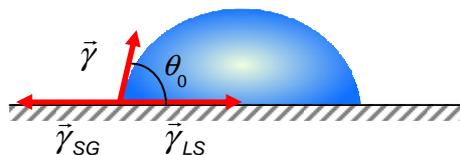


Figure 2.16 - Tensions superficielles agissant sur la ligne triple d'une goutte de liquide déposée sur un substrat.

A l'équilibre on a la relation suivante : $\vec{\gamma}_{LS} + \vec{\gamma} + \vec{\gamma}_{SG} = 0$
 et par projection sur le solide, on obtient la relation de Young⁹⁰ : $\gamma_{LS} = \gamma_{SG} - \gamma \cos \theta_0$
 Il est également possible de remonter à l'équation par calcul de la variation d'énergie de surface dE liée à un déplacement dx de la ligne triple : $dE = (\gamma_{LS} - \gamma_{SG})dx + \gamma dx \cos \theta$
 A l'équilibre, l'énergie est minimum ($dE=0$) et on retrouve bien la relation de Young.

Une manière non suffisante mais simple de vérifier le greffage de molécules chimiques sur une surface (Figure 2.17) est donc de mesurer dans un premier temps son angle de contact. Celui-ci dépend effectivement de l'énergie de surface du matériau qui peut varier suivant les molécules greffées en surface du matériau.

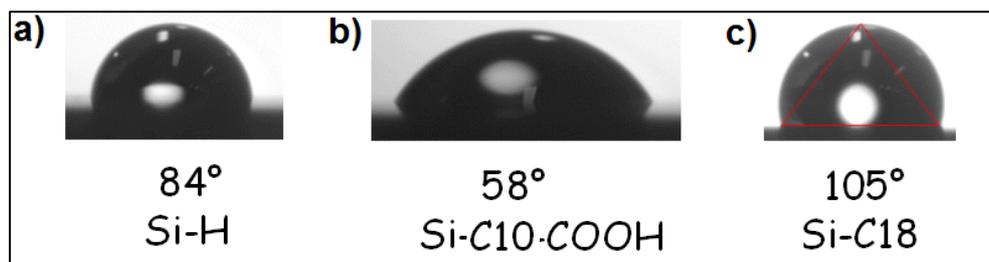


Figure 2.17. Angles de contact d'une goutte d'eau d'1 μ l sur des surfaces de silicium : a) après traitement à l'acide fluorhydrique, b) après hydrosililation de l'acide décanoïque et c) après hydrosililation de l'octadécène.

Concrètement, en suivant la règle de Zisman⁹¹⁻⁹², les surfaces mouillables sont des surfaces de haute énergie (~ 500 à 5000 mN.m^{-1}) tels que les oxydes ou les métaux. A l'inverse, les surfaces non mouillables sont des surfaces de basse énergie (~ 10 à 50 mN.m^{-1}), il s'agit par exemple des polymères.⁸⁹ Dans le cas où le liquide en contact avec la surface est de l'eau, les valeurs d'angles de contact et d'énergies de surface dépendent fortement de l'aptitude des atomes ou molécules en surface du matériau à créer des liaisons hydrogènes avec les molécules de l'eau. Ici, plus il y a de liaisons hydrogènes envisageables entre l'eau et la surface, plus γ_{LS} est faible. La valeur de γ est alors plus grande et celle de l'angle de contact plus faible. Ici, l'acide comporte des atomes d'oxygènes favorables à la formation de liaisons hydrogènes de part les doublets non-liants qu'ils possèdent. Les deux autres surfaces sont dans le cas contraire ce qui explique que la surface fonctionnalisée avec l'acide ait l'angle de contact le plus faible. La valeur de γ_{LS} dépend donc fortement des liaisons chimiques envisageables entre le liquide et la surface, mais pas seulement, nous le voyons dans le paragraphe qui suit.

4.2. L'effet de superhydrophobicité : nanostructures et chimie de surface

La superhydrophobicité est un phénomène naturel : la feuille de lotus repousse la moindre goutte d'eau à sa surface, entraînant de fait toute poussière ou parasite. La feuille de lotus s'auto-nettoie !



Figure 2.18. Photo d'une goutte d'eau sur une surface superhydrophobe.

Ce phénomène d'entraînement de la goutte est aussi appelé «effet rolling ball» (étant donné la forme adoptée par la goutte - Figure 2.18) est présent dans la nature non seulement chez la feuille de lotus mais également chez près de 200 autres espèces, végétales et animales. Par exemple, les surfaces de la feuille de magnolia ou de la feuille d'oreille d'éléphant possèdent des textures à l'échelle de la dizaine de microns couvertes de fibrilles nanométriques qui leurs confèrent un caractère superhydrophobe.

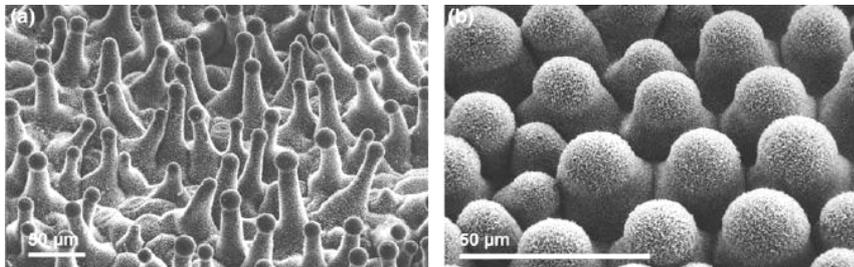


Figure 2.19. Images MEB de surfaces naturellement super-hydrophobes : (a) feuille de magnolia ou (b) feuille d'oreille d'éléphant colocasia esculenta (clichés Peter Wagner et Christoph Neinhuis).

Le point commun entre toutes ces surfaces superhydrophobes est leur rugosité et leur chimie de surface. Leur double structure micrométrique et nanométrique limite l'infiltration du liquide et repousse la goutte qui, afin de minimiser son énergie, forme une perle liquide à la surface (Figure 2.18). Le terme de superhydrophobicité s'emploie donc lorsque l'angle de contact apparent d'une goutte d'eau sur une surface approche 160°.

La chimie de surface reste néanmoins très importante. Le tableau ci-dessous résume quelques angles de contact selon la rugosité et la chimie de surface du silicium. On observe des différences de l'angle de contact selon l'échelle de la rugosité (le silicium poreux étant

moins rugueux que les nanofils de silicium). Mais surtout, on voit bien que malgré la rugosité de surface des nanofils de silicium, il n'y a pas d'effet de superhydrophobicité lorsque la terminaison chimique de surface est SiO_2 .

	Terminaison SiO_2	Terminaison Si-H	Terminaison Si-C ₁₀ - COOH	Terminaison Si-C ₁₈
Silicium plat	10°	84°	58°	105°
Silicium poreux	5°	104°	60°	122°
Nanofils de silicium	Près de 0°	137°	124°	160°

Tableau 2.1. Angle de contact selon différentes rugosités et terminaisons chimiques de surface du silicium. La terminaison SiO_2 correspond à l'oxyde de silicium natif. La terminaison Si-H résulte du retrait de l'oxyde de silicium de surface du silicium par de l'acide fluorhydrique⁴. Les terminaisons Si-C₁₀-COOH et Si-C₁₈ correspondent respectivement au greffage de l'acide undécylénique et de l'octadécène à la surface du silicium par hydrosylation.

5. Propriétés optiques et thermique des nanostructures de silicium

5.1. Introduction

En physique du solide, lorsqu'on considère un cristal infini, on est capable de prévoir assez bien les propriétés optiques ou thermiques du matériau. Dans le cas de nanocristaux, l'hypothèse n'est plus tenable et les dimensions finies du cristal doivent être prises en compte tout comme la composition de la surface. En effet, l'espace dans lequel évoluent les ondes/corpuscules (électrons, trous, photons, phonons, ...) modélisées par la mécanique quantique est réduit.

Lorsque les matériaux sont de tailles nanométriques, deux effets principaux sont donc susceptibles de se manifester : des effets de confinement et des effets de surface. Ces effets ont déjà été observés dans les métaux et dans les semi-conducteurs.

Etant donné que les applications visées du travail de thèse portent sur les nanofils de silicium pour la désorption/ionisation laser en spectrométrie de masse, nous présentons

⁴ Attention : L'acide fluorhydrique (HF) est un acide extrêmement toxique qui doit être manipulé avec des précautions particulières (cf sa feuille de sécurité).

dans ce paragraphe le comportement des ondes/corpuscules dans les nanostructures de silicium suite à leur exposition à un faisceau laser.

Un matériau exposé à un faisceau laser conduit à la transmission, la réflexion, la diffusion ou encore l'absorption optique du faisceau. L'absorption des photons mène ensuite à quatre mécanismes de désexcitations :

- L'émission radiative ou photoluminescence (émission de photons par recombinaisons de paires électron-trou)
- L'effet photoélectrique (transport de l'électron dans le matériau ou éjection de l'électron du matériau)
- Les réactions photochimiques (selon les espèces chimiques réactives du milieu, l'énergie des photons peut entraîner ou catalyser un processus chimique souvent par réaction radicalaire)
- Les recombinaisons non-radiatives par effet photothermique (excitation des phonons par conservation de l'énergie et de la quantité de mouvement)

Nous présentons donc ici le comportement des électrons, des photons et des phonons associés aux nanostructures de silicium.

5.2. Les électrons et les photons à l'échelle d'un nanofil.

5.2.1. La masse effective des électrons.

Un électron de la bande de conduction d'un semi-conducteur est caractérisé par une fonction d'onde de vecteur d'onde k et d'énergie E , ou en terme corpusculaire, par une particule dans un potentiel cristallin. La masse de l'électron lorsqu'il n'est soumis à aucun potentiel vaut $m_0=9,1.10^{-31}$ kg. Plutôt que de décrire des électrons de masse fixée évoluant dans un potentiel donné, on les décrit comme des électrons libres dont la masse varie et cette masse est appelée masse effective. Pour le silicium massif, la valeur de la masse effective varie selon l'orientation cristallographique du substrat. Par exemple pour une orientation $\langle 100 \rangle$, les masses effectives sont $m^*=0,21 m_0$ pour les électrons de la bande de conduction, $m^*=0,276 m_0$ pour les trous lourds de la bande de valence et $m^*=0,214 m_0$ pour les trous légers de la bande de valence.⁹³

Y. Zheng et al ont étudié le comportement des électrons dans les nanofils et ont mis en évidence la dépendance de la masse effective avec l'épaisseur du nanofil, pour une structure carrée, orientée $\langle 100 \rangle$.

5.2.2. Confinement quantique des électrons dans un nanofil

Le fil quantique peut être modélisé en ajoutant un confinement supplémentaire dans la direction perpendiculaire à celle du confinement dans le cas du puits de potentiel infini. Le mouvement des électrons est alors limité dans deux directions.

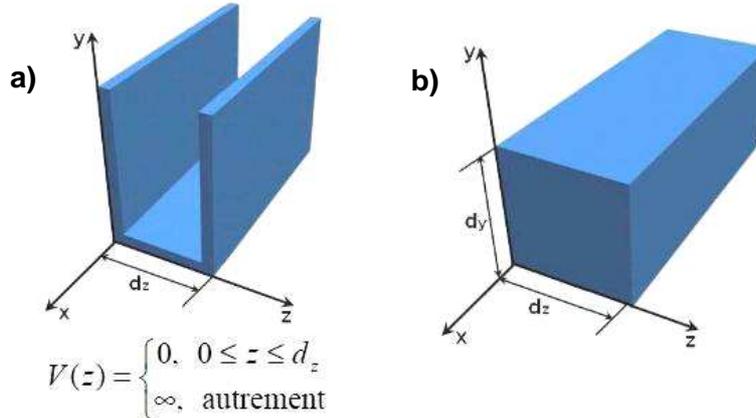


Figure 2.20. a) Modèle d'un puits quantique infini: l'électron est confiné dans la direction z, sur une épaisseur de largeur d_z . b) Modèle de fil quantique infini: l'électron est confiné dans les directions z et y).⁹⁴

Le modèle le plus simple, décrivant le fil quantique, est basé sur le confinement de gaz d'électrons bidimensionnel idéal. On suppose que la masse effective des électrons est isotrope dans les trois directions cristallographiques et l'énergie totale de l'électron dans ce fil quantique peut s'écrire comme la somme de l'énergie quantifiée dans les deux directions de confinement et de l'énergie cinétique due au mouvement libre de l'électron dans la troisième direction :

$$E = \frac{\hbar^2 \pi^2}{2m^*} \left[\left(\frac{n_y}{d_y} \right)^2 + \left(\frac{n_z}{d_z} \right)^2 \right] + \frac{\hbar^2 k_x^2}{2m^*}$$

où n_i et d_i sont respectivement le nombre quantique et la dimension de la barrière potentielle pour les directions correspondantes.

Pour que le modèle soit plus réaliste et pour obtenir une meilleure approximation des différences entre les niveaux d'énergie, la hauteur de barrière infinie dans la direction x doit être remplacée par une hauteur de barrière finie dans le modèle.⁹⁵

5.3. Structure de bande d'un nanofil de silicium et photoluminescence.

A l'état massif, le silicium présente un gap indirect et égal à 1eV. Il en est tout à fait autrement dans le nanofil : la structure de bande est modifiée par l'effet de confinement des électrons/trous et elle possède un gap direct.

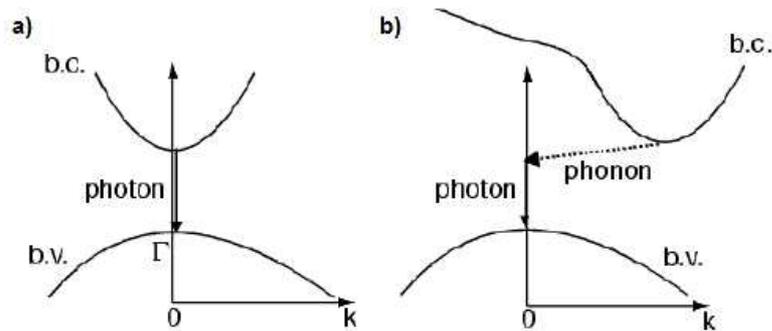


Figure 2.21. Schéma a) d'un gap direct et b) d'un gap indirect.

La Figure 2.22 présente la structure de bande pour un nanofil de section carrée (de 1,54nm de côté) et de longueur infinie.⁹³

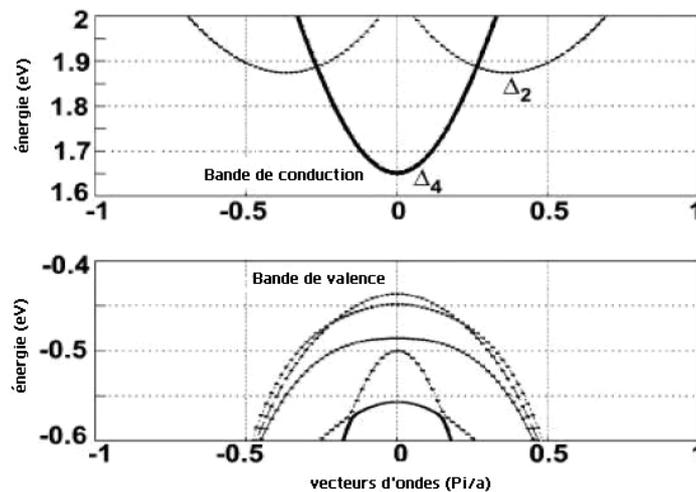


Figure 2.22. Structure de bande d'un nanofil de silicium section carrée de 1,54nm de côté, calculée avec le modèle $sp^3d^5s^*$.

X. Zhao et al ainsi que Y. Zheng et al ont montré une dépendance de la valeur de gap direct en fonction de l'orientation cristallographique et du diamètre du nanofil.⁹⁶ En effet, comme dans le modèle du puits quantique où la taille du gap augmente lorsque la largeur du

puits diminue, ici le gap augmente lorsque le diamètre du nanofil diminue.⁹⁷ Cette variation de la valeur du gap induit la possibilité d'émission de photon dans une large gamme de longueur d'onde notamment dans l'ultraviolet pour des fils de diamètres inférieurs à une quinzaine de nanomètre.^{98,99}

5.3.1. Mesures de photoluminescence d'échantillons de silicium poreux et de nanofils de silicium.

Le principe d'une mesure de photoluminescence est relativement simple. L'échantillon à étudier est éclairée par un faisceau laser avec des photons d'énergie supérieure à la taille du gap. Les photons absorbés génèrent des paires électrons/trous qui, en se recombinant de manière radiative, émettent de la lumière à une longueur d'onde correspondant à l'énergie fournie selon le type de recombinaison (recombinaison bande à bande, excitonique, ect...). La lumière émise est alors focalisée vers le spectromètre qui associe l'intensité de photoluminescence à chaque longueur d'onde d'émission. Finalement, l'intensité de la photoluminescence étant généralement faible, il faut donc utiliser un détecteur performant tel que le photomultiplicateur pour la mesure de cette intensité.

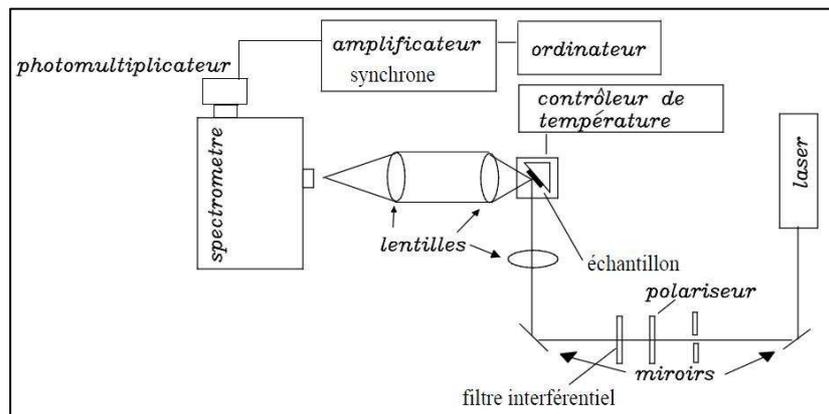


Figure 2.23. Schéma d'un montage optique pour des mesures de photoluminescence.

En 1990, Canham fut le premier à découvrir la photoluminescence à température ambiante du silicium poreux après différents temps d'anodisation (Figure 2.24.).¹⁰⁰ Si ces premiers spectres de photoluminescence ont révélé une luminescence dans le bleu, plus tard on a pu constater une luminescence intense dans le rouge (visible à l'œil nu sous excitation UV), puis dans tout le visible selon la longueur d'onde d'excitation.^{101,102}

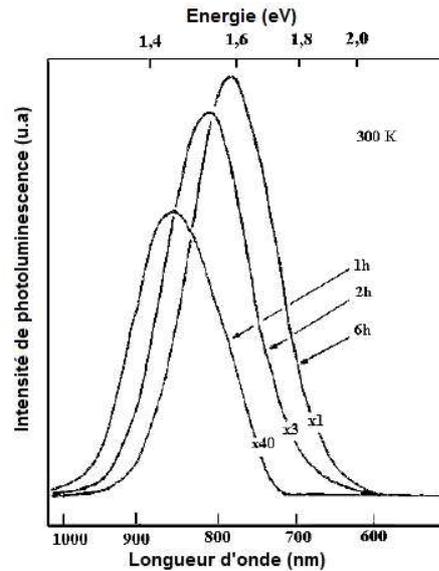


Figure 2.24. Spectres de photoluminescence du silicium poreux après différents temps d'anodisation.¹⁰⁰

Cette propriété a donné lieu à beaucoup de travaux pour des applications en optoélectronique¹⁰¹ mais a surtout suscité et suscite encore l'intérêt de la communauté scientifique ; de nombreuses hypothèses ont été proposées pour l'expliquer. L'hypothèse la plus fréquente est celle selon laquelle le gap du silicium poreux est direct par effet de confinement quantique dans les nanocristallites de silicium constituant la couche poreuse.¹⁰³ Le décalage de la longueur d'onde d'émission dans le rouge vers les plus hautes énergies (effet blue-shift) serait attribué à l'augmentation du gap lorsque les nanocristallites ont une plus petite taille.^{100,104,105} Cependant, la controverse la plus répandue sur l'origine de la photoluminescence du silicium poreux met en avant des effets de surface. Il peut s'agir de défauts de surface dans la couche d'oxyde de silicium ou à l'interface du silicium/oxyde de silicium dont quelques-uns sont résumés dans le Tableau 2.2.^{106,107,108,109,110,111} Cette hypothèse est majoritairement estimée suite à la variation de la photoluminescence du silicium poreux après des traitements d'oxydation thermique ou de divers recuits.

Désignation	Domaine de luminescence
O neutre vacant : $\equiv\text{Si}-\text{Si}\equiv$	459nm
Radical peroxy : $\text{Si}-\text{O}-\text{O}\cdot$	563nm
NBOHC : $\text{Si}-\text{O}\cdot$	653nm
Molécules polymères Si/H/O	?
SiH_x	?

Tableau 2.2. Liste de quelques défauts rencontrés dans les couches de SiO_2 riches en silicium (NBOHC pour non-bridging oxygen hole center).

En ce qui concerne les mesures effectuées sur des nanofils de silicium, de nombreux groupes ont reporté des caractéristiques différentes de photoluminescence suivant les types de synthèse. Comme pour la luminescence du silicium poreux, celle des nanofils fait l'objet de nombreuses interprétations.^{112,113,114, 115,116,117,118} Bai et al ont montré que des nanofils de silicium de 13nm diamètre présentent un spectre de photoluminescence avec trois domaines d'émission centrés autour de 420nm, 500 et 790nm.¹¹⁹ Certains attribuent la photoluminescence dans le rouge à l'effet de confinement quantique, tandis qu'ils considèrent que la PL dans le vert et bleu est due aux défauts de l'oxyde de silicium en surface du silicium.^{113,114} D'autres groupes montrent justement que des nanofils d'oxyde de silicium émettent uniquement dans le bleu, avec une luminescence deux fois plus intense que celle observée habituellement pour le silicium poreux pour des diamètres de 15nm.¹¹⁵ Par ailleurs, Guichard et al ont montré le phénomène du blue-shift pour ce même domaine d'émission dans le bleu en affinant le diamètre des nanofils de silicium de 20nm à moins de 5nm.¹¹²

5.4. Les phonons et les propriétés thermiques des nanofils de silicium.

5.4.1. Le rôle des phonons.

Un phonon désigne un quantum de vibration dans un solide cristallin, c'est à dire « un paquet élémentaire de vibration » ou « un paquet élémentaire de son ». Les phonons jouent un rôle important dans un grand nombre de propriétés physiques des solides dont :

- La conductivité électrique ou la capacité à conduire le courant électrique (interaction électrons/phonons)
- La capacité à propager le son
- La conductivité thermique ou la capacité à conduire la chaleur.
- La capacité calorifique ou la capacité à échanger la chaleur ou dissiper la chaleur.

Dans le silicium, le transport de chaleur est assisté uniquement par les phonons et non pas par les électrons et les phonons comme dans d'autres matériaux.

5.4.2. Conductivité thermique des nanofils de silicium.

A l'échelle macroscopique, le transport de la chaleur est précisément décrit par la loi de Fourier :

$$q = -k \cdot \nabla T$$

où q est le flux de chaleur en W/m, k est la conductivité thermique du matériau en W/m.°C et ∇T est le gradient de température local. Pourtant, cette loi ne s'applique qu'aux objets dont la taille est beaucoup plus importante que le libre parcours moyen des phonons, c'est-à-dire

la longueur moyenne qu'ils peuvent parcourir dans le matériau sans subir de collisions. Le libre parcours moyen des phonons dans le silicium massif (10nm à 100nm à 300K) est supérieur à taille caractéristique (épaisseur, diamètre) des objets nanométriques. La conductivité thermique des nanoobjets ne peut donc pas s'expliquer par la loi classique de conduction thermique et un nouveau concept de mécanisme de conduction thermique dans les matériaux nanostructurés doit alors être développé.

En fait, la comparaison entre le libre parcours moyen et les dimensions du système étudié donne lieu à plusieurs régimes de fonctionnement :

- Un transport diffusif si les dimensions du système sont beaucoup plus grandes que le libre parcours moyen.
- Un transport balistique si les dimensions du système sont beaucoup plus petites que le libre parcours moyen.

En 1993, Majumdar décrit une théorie de conduction de la chaleur pour les films de diamant.¹²⁰ Les années qui suivent des modèles appliqués aux nanoparticules se développent.^{121,122} Brièvement, ils postulent que le transport des phonons se fait de manière balistique entre les frontières du nanoobjet et que la diffusion de porteurs de chaleur ne s'effectue qu'à ces frontières. Ils introduisent la notion de conductivité thermique effective et de longueur effective de diffusion des phonons dans les nanoobjets.

Dans le cas des nanoobjets de silicium, la littérature décrit un phénomène de confinement des phonons.^{123,124} En conséquence, la conductivité thermique d'un nanofil de silicium est considérablement réduite par rapport à la conductivité thermique du silicium massif (148W.m⁻¹.K⁻¹).¹²⁵ La Figure 2.25 montre l'évolution de la conductivité thermique de nanofils de silicium de différents diamètres en fonction de la température mais également selon le type de synthèse des nanofils de silicium.

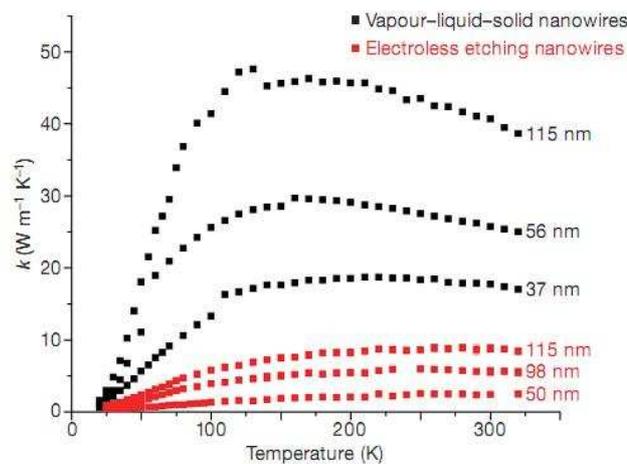


Figure 2.25. Valeurs de la conductivité thermique de nanofils de silicium en fonction de la température, du diamètre des nanofils pour des nanofils synthétisés par voie VLS et par gravure chimique sans électrode.¹²⁶

Les résultats obtenus avec les nanofils synthétisés par voie VLS sont en accord avec les modélisations réalisées avec la méthode de Monte-Carlo⁵ avec l'hypothèse que les propriétés vibratoires du réseau atomique dans les nanostructures de silicium sont les mêmes que dans le silicium massif^{125,127} Le fait que la conductivité thermique des nanofils de silicium synthétisés par gravure chimique sans électrode (Chapitre 2 .2.2) soit plus faible que celle des nanofils synthétisés par voie VLS s'expliquerait par des effets de rugosité de surface des nanofils.¹²⁸

5.4.3. Dissipation de la chaleur.

Cette baisse de la conductivité thermique du nanofil est favorable à la thermoélectricité¹²⁶ et augmente les possibilités en termes de rechargement de batteries à partir de sources de chaleurs. Aussi, puisque les phonons contribuent peu à la conduction de la chaleur, ils doivent se relaxer et certains groupes supposent qu'ils diffusent leur énergie depuis des points chauds d'échelle nanométrique.^{129,130} Pour le moment ce phénomène de dissipation reste peu connu. Il apparaît quelques travaux de modélisations sur la résistance de contact nanofil/substrat¹³¹ ou sur la chaleur locale élevée des nanofils (effets électrothermiques) dans les dispositifs électroniques submicroniques (Systèmes microélectromécaniques MEMS, nanotransistors).^{129,132} Les phénomènes de convection de l'air par dissipation de la chaleur ne sont pas exclus et sont pris en considération selon les cas à modéliser.¹³³

6. Conclusion

Nous avons donc exposé dans cette partie différentes méthodes physiques et chimiques de nanostructuration du silicium ainsi que les principes de fonctionnalisation chimique du silicium. Nous avons vu que certains protocoles de modification de la chimie de surface sont les mêmes pour une surface de silicium micro/nanostructurée que pour une surface plane de silicium. Nous avons aussi souligné que cette chimie de surface entraîne des propriétés de tension de surface solide/liquide complètement dissemblantes qu'il ne faut pas négliger. Ces propriétés sont très intéressantes pour l'amélioration de systèmes de déplacement fluide ou en termes de localisation sélective de protéines ou de cellules biologiques comme nous le verrons aux chapitres 4 et 5. Finalement, nous avons présenté les propriétés optiques et thermiques des nanofils de silicium, propriétés qui seront discutées au chapitre 3 en regard

⁵ La méthode de Monte-Carlo vise à calculer une valeur numérique en utilisant des techniques probabilistes.

des performances de l'analyse de biomolécules par LDI-MS sur support de nanofils de silicium.

7. Bibliographie

- ⁶⁹ Jung, G. Y.; Johnston-Halperin, E.; Wu, W.; Yu, Z. "Circuit fabrication at 17nm half-pitch by nanoimprint lithography" *Nanoletters*. **2006**, 6, 351.
- ⁷⁰ Wu, Y. Y.; Yang, P. D. "Direct Observation of Vapor-Liquid-Solid Nanowire Growth" *J.Amer.Chem.Soc*, **2001**, 123, 3165-3166.
- ⁷¹ Vaurette, F. "Fabrication top-down, caractérisation et applications de nanofils de silicium", *Thèse de l'Université des Sciences et Technologies de Lille*, **2008**
- ⁷² Hannon, J.B.; Kodambaka, S.; Ross, F.M.; Tromp, R.M. "the influence of the surface migration of gold on the growth of silicon nanowires", *Nature*. **2006**, 04574.
- ⁷³ Oehler, F.; Gentile, P.; Baron, T.; Den Hertog, M.; Rouvière, J.; Ferret, P. "The morphology of silicon nanowires grown in the presence of trimethylaluminium". *Nanotechnology*. **2009**, 20, 245602.
- ⁷⁴ Peng, K.; Yan, Y.; Gao, S.; Zhu, J. "Dendrite-assisted growth of silicon nanowires in electroless metal deposition", *Advanced functional materials*. **2003**, 13, 127-132
- ⁷⁵ Peng, K.; Hu, J.; Yan, Y.; Wu, Y.; Fang, H.; Xu, Y.; Lee, S.T. ; Zhu, j. "Fabrication of single-crystalline silicon nanowires by scratching a silicon surface with catalytic metal particles", *advanced functional materials*. **2006**, 16, 387-394
- ⁷⁶ Wong, Y. Y.; Yahaya, M.; Mat Salleh, M.; Yeop Majlis, B. "controlled growth of silicon nanowires synthesized via solid liquid solid mechanism", *Science and technology of advanced materials*. **2005**, 6, 330-334
- ⁷⁷ Y.J. Xing, D.P. Yu, Z.H. Xi, Z.Q. Xue, "Silicon nanowires grown from Au-coated Si substrate", *Applied physics A*. **2003**, 76, 551-553
- ⁷⁸ Yan, H. F.; Xing, Y. J.; Hang, Q. L.; Yu, D. P.; Wang, Y.P.; Xu, J.; Xi, Z. H.; Feng, S. Q. "Growth of amorphous silicon nanowires via a solid liquid solid mechanism", *Chem. Phys. Lett*. **2000**, 323, 224-228.
- ⁷⁹ Prokes, S. M.; Stephen A. "Stress-driven formation of Si nanowires". *Applied Physics Letters*. **2005**, 86, 193105
- ⁸⁰ Wang, X.; Zhang, J.; Wang, Q. "Metal-Free Growth of Si Nanowires by Annealing SiOx (x<2) Films Deposited by PECVD". *Material Research society*. **2005**, 832.
- ⁸¹ Wang, N.; Tang, Y. H.; Zhang, Y. F.; Lee, C. S.; Bello, I.; Lee, S. T. "Si nanowires grown from silicon oxide". *Chemical Physics Letters* **1999**. 299, 237-242.
- ⁸² Schena, M. *Microarray analysis, First edition Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York* **2003**.
- ⁸³ Vainrub, A. and Pettitt, B. M. "Surface electrostatic effects in oligonucleotide Biopolymers., microarrays: control and optimization of binding thermodynamics". **2003**, 68, 265-270
- ⁸⁴ Sagiv, J. "Organized Monolayers by Adsorption. 1. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid Surfaces". *J Am Soc*. **1980**, 102, 92-98.

- ⁸⁵ Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. *"Molecular Biology of the cell"*, 3rd ed. Garland Publishing, New York, N.Y. **1994**
- ⁸⁶ Autumn, K.; Sitti, M.; Liang, Y.A.; Peattie, A. M.; Hansen, W.R.; Sponberg, S.; Kenny, T.W.; Fearing, R.; Israelachvili, J.N.; Full. R.J. *"Evidence for van der Waals adhesion in gecko setae."* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **2002**, 99, 12252–12256.
- ⁸⁷ Huber, G.; Mantz, H.; Spolenak, R.; Mecke, K.; Jacobs, K.; Gorb, S.N.; Arzt. E. *"Evidence for capillarity contributions to gecko adhesion from single spatula nanomechanical measurements"*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **2005**, 102, 16293–16296
- ⁸⁸ Wu, Y. ; Simonovsky, F. I. ; Buddy, D.R. ; Horbett, T. A. *"The role of adsorbed fibrinogen in platelet adhesion to polyurethane surfaces : A comparison of surface hydrophobicity, protein adsorption, monoclonal antibody binding and platelet adhesion"*, *Journal of biomedical materials research*. **2005**, 74A, 4, 722-738.
- ⁸⁹ De Gennes, P.G ; Brochard-Wyart, F. ; Quéré, D. *"Gouttes, bulles, perles et ondes"*, Ed. Belin, **2002**.
- ⁹⁰ Young, T. *"An essay on the cohesion of fluids"*, *Philos. Trans. R. Soc. London*. **1805**, 95, 65.
- ⁹¹ Fox, J.; Zisman, W. *"The spreading of liquid on low energy surfaces. I. Polytetrafluoroéthylène"*, *J. of Colloid Interface Sci*. **1950**, 5, 514.
- ⁹² Zisman, W. *"Contact angle wettability and adhesion"*, *Chemical series*. **1964**, 43
- ⁹³ Zheng, Y.; Rivas, C.; Lake, R.; Alam, K.; Boykin, T.; Klimeck, G. *"electronic properties of silicon nanowires"*, *IEEE transactions on electronic devices*, **2005**, 52, 6, 1097-1103.
- ⁹⁴ Nychyporuk, T. *"Nouvelles Morphologies du silicium nanostructuré issues de l'anodisation électrochimique : élaboration, propriétés physico-chimiques et applications"* Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, **2006**
- ⁹⁵ Palun, L. *"Etude prospective sur les dispositifs silicium à blocage de coulomb dans une perspective d'application à la microélectronique"*, Thèse de l'université Joseph Fourier-Grenoble I. **2000**
- ⁹⁶ Zhao, X.; Wei, C.M.; Yang, L.; Chou, M.Y. *"quantum confinement and electronic properties of silicon nanowires"*, *Physical review letters*, **2004**, 92, 23.
- ⁹⁷ Bhattacharya, S.; Banerjee, D.; Adu, K.W.; Samui, S.; Bhattacharya, S. *"Confinement in silicon nanowires: Optical properties"*, *Applied Physics Letters*. **2004**, 85, 11, 2008-2010.
- ⁹⁸ Takagahara, T.; Takeda, K. *"Theory of the quantum confinement effect on excitons in quantum dots of indirect-gap materials"*. *Physical Review B* **1992**, 46, 15578-15581
- ⁹⁹ Busseret, C. *"Etude optique et électrique des propriétés électroniques de nanocristaux de silicium pour composant monoélectronique"*, Thèse de l'INSA de Lyon, **2001**.
- ¹⁰⁰ Canham, L. T. *"Silicon quantum wire array fabrication by electromechanical and chemical dissolution of wafers"* *Applied Physics Letters*. **1990**, 57, 10, 1046-1048

- ¹⁰¹ Koshida, N and Koyama, H. "Visible electroluminescence from porous silicon", *Applied Physics Letters*. **1992**, 60, 3, 347-349.
- ¹⁰² Wolford, D.J.; Scott, B.A. ; Reimer, J.A. ; Bradley, J.A. "Efficient visible luminescence from hydrogenated porous silicon", *Physica B*, **1983**, 117, pp 920-922
- ¹⁰³ Lehmann, V. ; Gosele, U. "Porous silicon formation : a quantum wire effect" *Applied Physics Letters*. **1991**, 58, 25, 856-858.
- ¹⁰⁴ Berhane, S.; Kauslarich, S.M.; Nishimura, K.; Smith, R.L.; Davis, J.E.; Lee, M.H.W.; Olsin, M.L.S.; Chase, L.L. "Investigation of colloidal Si prepared from porous silicon", *Mat Res Soc Symp Proc*, **1993**, 298, 99-102
- ¹⁰⁵ Solomon, I.; Wehrspohn, B.; Chazalviel, J.-N.; Ozanam, F. "Spatial and quantum confinement in crystalline and amorphous porous silicon", *Journal of non-crystalline solids*, **1998**, 227, 230, 248-253
- ¹⁰⁶ Shu-Tsun, C.; Jen-Hwan, T.; Bor-Chiou S. "The photoluminescence in Si⁺-implanted SiO₂ films with rapid thermal anneal". *J. Appl. Phys*, **1998**, vol 83, 10, 5394-5398.
- ¹⁰⁷ Inokuma, T.; Kurata, Y.; Hasegawa, S. "Cathodoluminescence properties of silicon nanocrystallites embedded in silicon oxide thin films". *Journal of luminescence*, **1998**, vol 80, 1-4, 247-251.
- ¹⁰⁸ Xu, Z.Y.; Gal, M.; Gross, M. "Photoluminescence study on porous silicon", *Appl. Phys. Lett*, **1992**, 60, 11, 1375-1377.
- ¹⁰⁹ Prokes, S. M.; Glembocky, O. J.; Bermudez, V. M.; Kaplan, R.; Friedersdorf L.E.; Searson, P.C. "SiH_x excitation : an alternate mechanism for porous Si photoluminescence". *Physical Review B, condensed Matter*, **1992**, 45, 23, 13788-13791.
- ¹¹⁰ Prokes, S.M.; Carlos. W.E. "Oxygen defect center red room temperature photoluminescence from freshly etched and oxidized porous silicon" *J. Appl. Phys.* **1995**, 78, 2671-2674
- ¹¹¹ Gelloz, B.; Kojima, A.; Koshida, N. "Highly efficient and stable luminescence of nanocrystalline porous silicon treated by high-pressure water vapor annealing", *Applied Physics Letters*. **2005**, 87, 031107
- ¹¹² Guichard, A.R.; Barsic, D.N.; Sharma, S.; Kamins, T.I.; Brongersma, M.L. "Tunable light emission from quantum-confined excitons in TiSi₂-catalyzed silicon nanowires"
- ¹¹³ Qi, J.; White, J.M.; Belcher, A.M.; Masumoto, Y. "optical spectroscopy of silicon nanowires", *Chemical Physics Letters*. **2003**, 372, 763-766.
- ¹¹⁴ Feng, S.Q.; Yu, D.P.; Zhang, H.Z. Zhang, Bai, Z.G.; Ding, Y. "The growth mechanism of silicon nanowires and their quantum confinement effect", *Journal of Crystal Growth*. **2000**, 209, 513-517
- ¹¹⁵ Yu, D.P.; Hang, Q.L.; Ding, Y.; Zhang, H.Z.; Bai, Z.G.; Wang, J.J.; Zou, Y.H.; Qian, W.; Xiong, G.C.; Feng, S.Q. "amorphous silica nanowires : intensive blue light emitters" *Appl. Phys. Lett*. **1998**, 73, 3076-3078

- ¹¹⁶ Nassiopoulos, A.G.; Grogopoulos, S.; Papadimitriou, D. "Electroluminescent solid state devices based on silicon nanowires fabricated by using lithography and etching techniques", *Thin Solid Films*. **1997**, 297, 176-178.
- ¹¹⁷ Salhi, B.; Gelloz, B.; Koshida, N.; Patriarche, G.; Boukherroub, R. "Synthesis and photoluminescence properties of silicon nanowires treated by high-pressure water vapor annealing", *Phys. Stat. Sol.* **2007**, 5, 204
- ¹¹⁸ B. Gelloz, Y. Coffinier, B. Salhi, N. Koshida, G. Patriarche, R. Boukherroub "Synthesis and Optical Properties of Silicon Oxide Nanowires" *Mater. Res. Soc. Proc.* **2007**, 958, L05-10
- ¹¹⁹ Bai, Z.G.; Yu, D.P.; Wang, J.J.; Zou, Y. H.; Qian, W.; Fu, J.S.; Feng, S.G.; Xu, J.; You, L.P. "Synthesis and photoluminescence properties of semi-conductor nanowires" *Mater. Sci.Eng. B.* **2000**, 72, 117
- ¹²⁰ Majumdar A. "Micro scale heat conduction in dielectric thin films", *J. Heat Transfer* **1993**, 115, 7-12.
- ¹²¹ Tien, C. L.; Chen G. "Challenges in micro scale conductive and radiative heat transfer", *J. Heat Transfer* **1994**, 116, 799-807
- ¹²² Chen G. "Non local and non equilibrium heat conduction in the vicinity of nanoparticules", *J. Heat Transfer* **1996**, 118, 539-545
- ¹²³ Sungtaek, J. "Phonon heat transport in silicon nanostructures" *Applied Physics Letters*. **2005**, 87, 153106
- ¹²⁴ Adu, K.W.; Gutierrez, H.R.; Kim, U.J.; Sumanasekera, G.U.; Eklund, P.C. "Confined phonons in Si nanowires", *Nanoletters* **2005**, 5, 409-414
- ¹²⁵ Li, D.; Wu, Y.; Kim, P.; Shi, L.; Yang, P.; Majumdar, A. "Thermal conductivity of individual silicon nanowires," *Applied Physics Letters* **2003**, 83, 14, 2934-2936
- ¹²⁶ Hochbaum, A.I.; Chen, R.; Delgado, R.D.; Liang, W.; Garnett, E.C.; Najarian, M.; Majumdar, A.; Yang, P. "Enhanced thermoelectric performance of rough silicon nanowires", *nature*. **2008**, 451, 163-167.
- ¹²⁷ Lacroix, D.; Joulain, K.; Terris, D.; Lemonnier, D. "Monte Carlo simulation of phonon confinement in silicon nanostructures: Application to the determination of the thermal conductivity of silicon nanowires "
- ¹²⁸ Murphy, P.G.; Moore, J.E. "Coherent phonon scattering effects on thermal transport in thin semiconductor nanowires", *Physical Review B.* **2007**, 76, 155313
- ¹²⁹ Sinha, S.; Schelling, P.K.; Phillpot, S.R.; Goodson, K.E. "Scattering of g-process longitudinal optical phonons at hotspots in silicon", *Journal of Applied Physics* **2005**, 97, 023702.
- ¹³⁰ Konstantinovic, M.J. "Interplay between phonon confinement effect and anharmonicity in silicon nanowires", *Physica E.* **2007**, 38, 109-111.
- ¹³¹ Chalopin, Y.; Gillet, J.N.; Volz, S. "Predominance of thermal contact resistance in a silicon nanowire on a planar substrate", *Physical Review B.* **2008**, 77, 233309

¹³² Ha, S-S.; You, C-Y. "Effect of the thermal conductivity of substrate on the temperature of nanowire for current induced domain wall motion", *Phys Stat Sol (a)*. **2007**, 3966-3969.

¹³³ Jungen, A.; Pfenninger, M.; Tonteling, M.; Stampfer, C.; Hierold, C. "Electrothermal effects at the microscale and their consequences on system design", *J. Micromech. Microeng.* **2006**, 16, 1633-1638.

Chapitre 3

**Spectrométrie de masse par
désorption/ionisation laser sur
nanofils de silicium et nanotubes
d'oxyde de titane.**

1. Introduction

Nous avons introduit au Chapitre 1 les techniques de spectrométrie de masse dédiées à l'analyse de biomolécules et plus particulièrement la spectrométrie de masse par désorption ionisation laser assistée par matrice (MALDI). La matrice organique absorbe l'énergie des photons du laser, s'ionise, se dissocie, se sublime et subit une expansion en phase gazeuse dans laquelle elle entraîne les analytes qui ont co-cristallisé avec les cristaux de la matrice. Le MALDI est donc une méthode d'ionisation douce pour la spectrométrie de masse est très utilisée pour l'analyse d'une large variété de composés tels que les polymères, les biopolymères et les protéines. Cependant, l'inconvénient principal de cette technique d'analyse est la difficulté à analyser de petites masses moléculaires ($<700m/z$) étant donné que les ions de la matrice organique interfèrent dans cette gamme de masse. Par conséquent le rapport signal sur bruit (S/N) est faible : le signal correspondant aux analytes de petite masse est très atténué et moindre comparé au bruit créé par les pics de masse provenant de la matrice.

Ces dernières années, l'intérêt pour l'analyse de ces petites masses s'est accru et de nombreuses techniques de spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser (LDI-MS) sans matrice organique ont vu le jour.¹³⁴ Parmi elles, la désorption ionisation laser sur silicium poreux (DIOS, Chapitre 1 .4.3.1) s'est démarquée en présentant de très hautes sensibilités d'analyse pour des molécules de faible poids moléculaire.¹³⁵ Il est toutefois suspecté que certains analytes soient infiltrés dans le fond des pores et soient donc difficilement accessibles au faisceau laser. La totalité des analytes ne serait donc pas détectée par la technique DIOS.

Plusieurs autres types de nanostructures autres que le silicium poreux se sont révélées efficaces pour la désorption/ionisation laser sans matrice organique : nanoparticules d'or,^{136,137,138} d'argent,^{139,140} de germanium,¹⁴¹ nanotubes de carbone,^{142,143} nanofleurs de platine,¹⁴⁴ nanofils d'oxyde de zinc,¹⁴⁵ alumine poreux,¹⁴⁶ diamant nanostructuré.¹⁴⁷ Le point commun de tous ces nanomatériaux est leur propriété optique acquise par l'effet de confinement nanométrique (Chapitre 2. 5) qui leur permet d'absorber à la longueur d'excitation du laser du spectromètre de masse. D'autres facteurs se sont révélés expérimentalement importants pour permettre une désorption/ionisation laser efficace de biomolécules mais leurs implications dans la performance de LDI-MS sur nanostructures restent difficiles à déterminer et globalement incertains.

Dans ce chapitre, nous optimisons la LDI-MS sur nanofils de silicium en variant plusieurs facteurs tels que la morphologie, la mouillabilité, ou les propriétés optiques ou thermiques des nanofils de silicium. Nous étudions l'influence de ces paramètres en évaluant l'efficacité des nanofils de silicium pour les analyses LDI-MS en fonction des valeurs de S/N et de la

sensibilité limite de détection de peptides standards. Cette étude nous amène à dégager les facteurs qui nous semblent nécessaires à l'optimisation de LDI-MS sur nanofils de silicium et à discuter un mécanisme plausible de désorption/ionisation.

Nous montrons ensuite que le support de nanofils de silicium ainsi optimisé pour la LDI-MS permet une détection fine de petites molécules, et d'un échantillon protéique (peptides issus de la digestion enzymatique d'une protéine). La validation des performances de ce support pour ces analyses est essentielle aux applications envisagées par la suite dans le Chapitre 4.

Finalement, nous présentons l'étude menée sur les performances des nanotubes de TiO_2 en tant que support pour la LDI-MS. En biologie le TiO_2 est surtout connu pour être un matériau biocompatible. En spectrométrie de masse, c'est sa capacité à s'enrichir spécifiquement de peptides phosphorilés qui est utilisée pour extraire ces derniers d'un échantillon protéique avant de les analyser en MALDI. Détecter ces peptides phosphorilés est un enjeu majeur pour l'identification des mutations de protéines à l'origine de cancers et autres maladies. Ici, nous explorerons la faisabilité de sa double utilisation comme support sélectif des phospho-peptides et comme support pour la LDI-MS.

2. Optimisation de la LDI-MS sur nanofils de silicium.

2.1. Mouillabilité de surface.

Il ressort dans la littérature l'importance de concentrer un maximum d'analytes sous le faisceau laser. Pour cela, Siuzdak et al. ont utilisé la fonctionnalisation de surface pour rendre le silicium poreux hydrophobe et limiter l'infiltration des analytes dans les pores.¹³⁵ En effet, les analytes restent majoritairement en surface et sont plus accessibles au faisceau laser. Par la suite, ce même groupe a élaboré une technique consistant à la fois à optimiser l'adsorption des analytes à la surface et à diminuer l'adsorption de contaminants. Il suffit pour cela de retirer la goutte contenant les analytes après l'avoir mise en contact avec le silicium poreux hydrophobe (Figure 3.1).

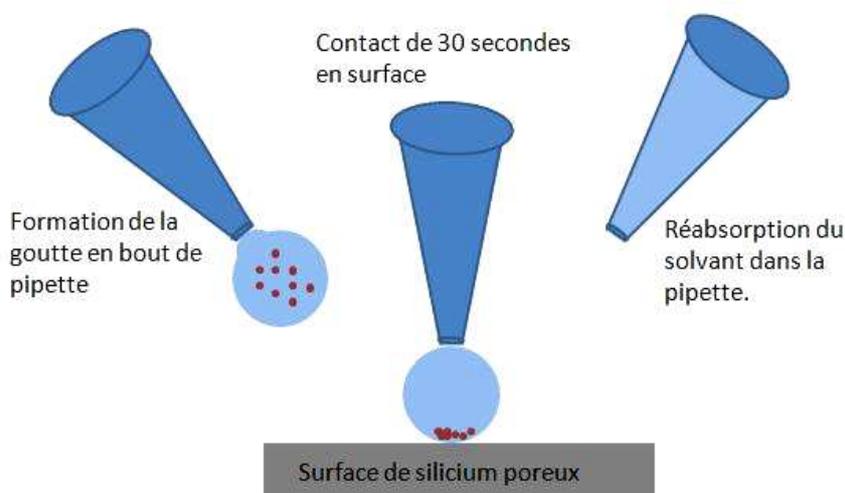


Figure 3.1 Illustration de la méthode de dépôt des analytes par contact de la goutte avec la surface de silicium poreux.

Cela permet de récupérer le solvant ainsi que tous les contaminants hydrophiles tels que les sels (sodium, potassium, ...) et de ne laisser quasiment que les analytes en surface du silicium poreux. Les analytes sont retenus par le silicium poreux hydrophobe grâce à leur partie apolaire (Figure 2.14). Ils ont finalement montré qu'avec cette technique, l'amination ou l'alkylation de la surface augmentent l'adsorption suivant la spécificité des analytes, et par conséquent la sensibilité de détection.

Les conditions de dépôt et l'infiltration de la solution d'analytes dans une surface poreuse paraissent donc critiques pendant l'étape de l'irradiation laser. Les récents travaux de Tsao et al.¹⁴⁸ appuient cet argument car ils montrent que le S/N augmente lorsque le dépôt des analytes est réalisé par électromouillage (le principe de l'électromouillage est présenté au Chapitre 4.3.1 de cette thèse). Le S/N augmente même en fonction de la

tension appliquée durant l'électromouillage. Selon eux, cela est dû au nombre d'analytes déposés qui est plus conséquent lorsqu'une tension plus élevée est utilisée. Ils notent toute fois que la morphologie de la surface peut limiter ou amplifier cet effet.

La mouillabilité doit permettre la concentration des analytes dans une petite zone et favoriser leur accessibilité au faisceau laser. La mouillabilité simple (sans électromouillage) dépend à la fois de la terminaison chimique et de la morphologie de la surface. Nous avons essayé de déterminer lequel de ces deux paramètres est le plus impliqué dans l'efficacité des analyses LDI-MS.

2.2. Influence de la fonctionnalisation chimique des nanofils de silicium.

2.2.1. Terminaison chimique et tension de surface.

Sans modification chimique de surface, les nanofils de silicium s'oxydent à l'air. La présence d'une couche d'oxyde de silicium natif combinée à la structure de nanofils rend le support superhydrophile: l'eau infiltre et mouille entièrement les nanofils de silicium, provoquant l'étalement d'une goutte d'eau d' $1\mu\text{l}$ sur un disque de 4 à 5 millimètres.

Le faisceau laser du spectromètre de masse irradiant sur un disque de diamètre de 180 micromètres, il convient de confiner un maximum d'analytes dans cette région. De cette manière, un nombre plus important d'analytes arrivent au même instant au détecteur, et par conséquent le signal correspondant aux analytes est maximisé.

Comme nous l'avons vu au Chapitre 2 .4, l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée sur les nanostructures change suivant la propension des atomes de la surface à se lier ou non avec des molécules d'eau. En greffant des molécules dont on contrôle la terminaison chimique à la surface des nanostructures, on peut alors varier l'énergie de surface et angles de contact. Pour donner quelques valeurs : la tension de surface à l'interface eau/air est de 70 m N.m^{-1} ; à l'interface eau/silicium plat, la tension de surface est de $23,9\text{ mN.m}^{-1}$ pour le silicium silanisé (Chapitre 2 .3.1) par de l'octadécyltrichlorosilane, ou encore de $24,7\text{ mN.m}^{-1}$ pour le silicium modifié par une chaîne plus courte avec l'octyltrichlorosilane.

Ici, plus l'angle de contact de la goutte contenant les analytes est grand, plus les analytes seront restreints dans un petit diamètre lors du séchage de la goutte. Cependant, pour un angle de contact supérieur à 150° , la goutte aura tendance à rouler (rolling boll effect – Annexe 1). Au niveau pratique, cela pose des difficultés à déposer la goutte et conduit à un dépôt des analytes non uniforme.

Il faut donc trouver une situation intermédiaire qui permette à la fois de restreindre les analytes dans une petite zone et de les répartir uniformément dans celle-ci. Plusieurs solutions de fonctionnalisation chimique des nanofils de silicium sont possibles pour cela.

Nous avons étudié l'effet de différentes terminaisons chimiques de surface (Si-OH, CH₃, CF₃). Les surfaces qui ont donc été testées et qui ont finalement toutes abouti à des résultats similaires en sensibilité et qualité d'analyses LDI-MS sont les suivantes :

- Nanofils de silicium silanisés par l'octadécyl-trichlorosilane (OTS), conférant un angle de contact de 160° à la surface de nanofils de silicium. Nous avons testé la méthode de dépôt des analytes par un contact de 30 secondes (pas d'allers-retours de la goutte dans la pipette, Figure 3.1) entre la goutte contenant les analytes et les nanofils de silicium ainsi modifiés par l'OTS. Les analytes se déposent alors en surface par interaction hydrophobes (liaisons non-covalentes, Chapitre 2 .3.2).
- Nanofils de silicium silanisés par l'OTS. Celui-ci confère un angle de contact de 160° à la surface des nanofils de silicium, nous avons exposé la surface ainsi silanisée à l'UV/ozone. Cela permet de dégrader la couche hydrophobe et de réduire l'angle de contact de 160° à 120° (Figure 3.2).



Figure 3.2. Angle de contact des nanofils de silicium fonctionnalisés par l'OTS avant (gauche) et après exposition à l'UV/ozone (droite).

- Nanofils de silicium silanisés par l'octyl-diméthylchlorosilane (ODMCS). Celui-ci confère un angle de contact de 105° à la surface de s nanofils de silicium.

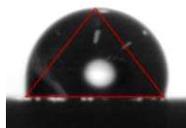


Figure 3.3. Angle de contact (105°) des nanofils de silicium fonctionnalisés par l'ODMCS.

- Nanofils de silicium silanisés par le perfluorodecyl-trichlorosilane (PFTS). Celui-ci confère un angle de contact de 150° à la surface de s nanofils de silicium. Nous avons choisi de ne pas dégrader la couche obtenue par UV/ozone car nous avons souhaité étudié l'influence de la tension de surface créée par les groupements CF_3 et l'effet chimique des atomes de fluor sur l'efficacité en désorption/ionisation. Il est en effet possible que l'UV/ozone altère la nature des groupements CF_3 . Nous avons donc procédé à un dépôt des analytes par un contact de 30 secondes (pas d'allers-retours de la goutte dans la pipette) entre la goutte contenant les analytes et les nanofils de silicium ainsi modifiés par le perfluorotrichlorosilane. Les analytes se déposent alors en surface par interaction hydrophobes (liaisons non-covalentes, Chapitre 2 .3.2).

2.2.2. Résultats et discussion

Notre étude montre qu'il n'y a pas de réelle différence d'efficacité pour les analyses LDI-MS de peptides standards selon les différents « revêtements hydrophobes » : terminaisons de surface CF_3 ou CH_3 , différentes tensions de surfaces et angle de contacts (superhydrophobe à hydrophobe), différentes longueurs des chaînes carbonées, application ou non d'un traitement UV/ozone aux chaînes $C_{18}H_{37}$.

Ces résultats laissent supposer que les analytes sont accessibles au faisceau laser quelque soit la méthode de dépôt ou les différents revêtements hydrophobes testés. Il semble donc que l'infiltration des analytes soit limitée pour chacun de ces cas.

Par ailleurs, Vertes et al. ont mis en évidence l'existence d'une énergie d'activation nécessaire à la désorption des analytes et le fait qu'elle augmente avec la polarité de la surface.¹⁴⁹ Dans notre cas, il n'y a pas d'influence notable entre les différentes surfaces testées. Cela reste admissible si on considère que les forces de polarité entrant en jeu sont faibles pour nos surfaces.

Pourtant, les forces d'interaction liant les analytes à la surface ne sont pas négligeables. Par exemple, il n'est pas possible de détecter en LDI-MS des peptides greffés de manière covalente à la surface des nanofils de silicium Les liaisons covalentes nécessiteraient une intensité laser trop élevée qui finirait par cliver certaines des autres liaisons covalentes des peptides, compromettant le principe même de l'ionisation douce. Nous avons remarqué que des biomolécules de masses supérieures à 3000 Da sont plus difficilement détectées, probablement parce qu'elles sont plus fortement liées à la surface et nécessitent une énergie d'activation plus grande pour se désorber. La

Figure 3.4 illustre bien le fait que la qualité des pics diminue lorsque les masses à détecter sont plus importantes.

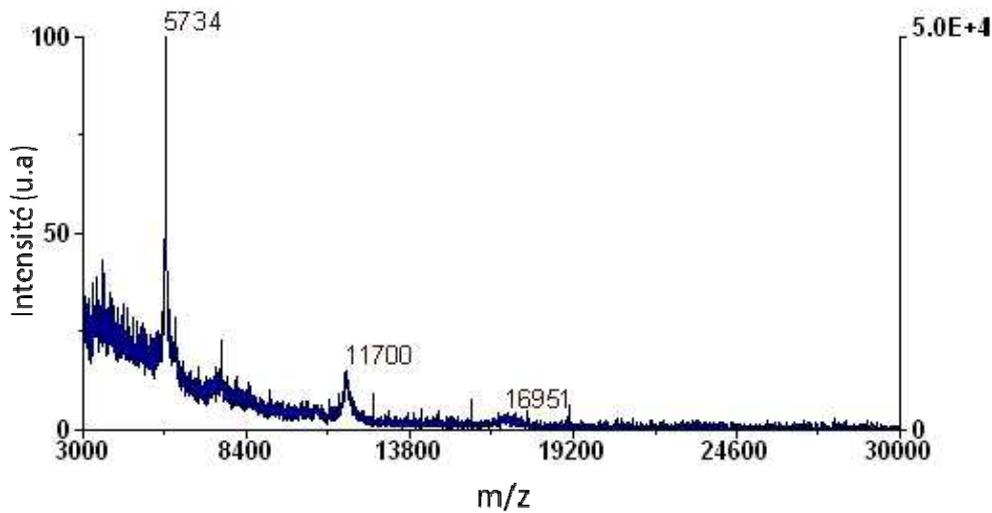


Figure 3.4. Spectre d'analyse du mélange de l'insulin bovine (5734 Da), la thioredoxin (protéine de *Escherichia coli*, 11700 Da), et l'apomyoglobin (16952 Da) par LDI-MS sur nanofils de silicium silanisés par OTS puis exposés à l'UV/ozone.

2.3. Influence de la morphologie des nanofils de silicium.

2.3.1. Etat de l'art.

Dans la littérature les paramètres d'organisation, de forme et d'espacement des nanostructures semblent déterminer la qualité des résultats d'analyses de biomolécules par LDI-MS.^{156,150,148,149} Parmi les nombreux supports de silicium micro/nanostructurés^{151,152,153} utilisés pour la LDI-MS les plus performants, on retrouve :

- Le silicium poreux commercialisé par Waters (Siuzdack et al, Tsao et al, Figure 3.5.a)
- Des nanofilaments de silicium (Tsao et al, Figure 3.5.b)
- Des nanofils de silicium synthétisés par le mécanisme VLS (Go et al, Figure 3.5.d)

Comme on peut le constater sur la Figure 3.5, les nanofils que l'on synthétise par voie chimique au sein du laboratoire (Figure 3.5.c) ont une morphologie différente des trois supports de silicium cités plus haut (Figure 3.5.a, b et c). Par ailleurs, en variant les conditions de synthèses VLS (pression, flux de silane et des autres gaz, température, temps) ou chimique (concentrations en HF et AgNO₃, temps), il est possible de varier l'organisation des nanofils, de leur taille, leur espacement (Annexe). Puisqu'il est possible de varier leur morphologie, les nanofils synthétisés par voie VLS et les nanofils synthétisés par voie chimie présentent donc un grand potentiel en tant que support pour la LDI-MS.

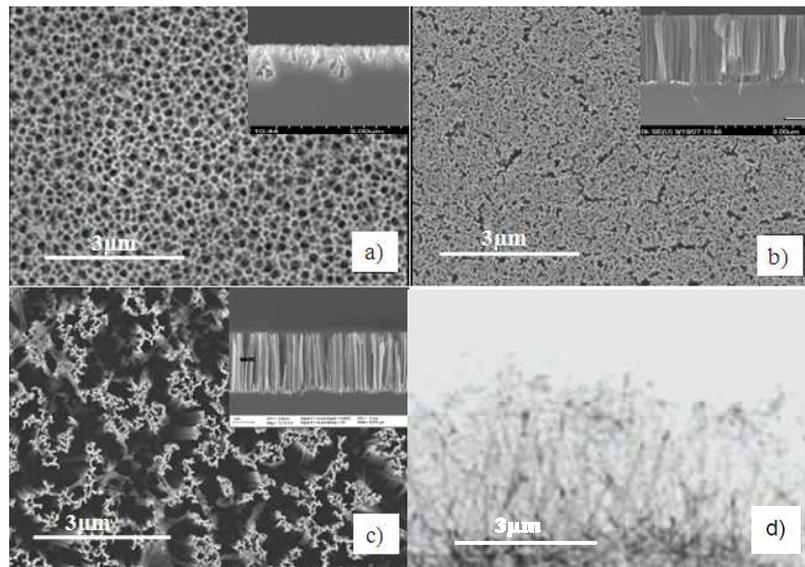


Figure 3.5. Images MEB de a) silicium poreux, b) nanofilaments de silicium utilisés en DIOS par Tsao et al., et de nanofils de silicium c) synthétisés par voie chimique au sein du laboratoire (vues de dessus et en coupe), d) synthétisés par voie VLS par Go et al. (vue en coupe).

Dans le but d'optimiser la LDI-MS sur le support de nanofils de silicium, les deux méthodes de préparation des nanofils de silicium au sein du laboratoire ont été envisagées : la préparation via le mécanisme vapeur-liquide-solide (VLS - Chapitre 2 .2.1), et la préparation par voie chimique (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Chaque technique possède ses avantages et inconvénients que nous résumons dans le Tableau 1.3 ci-dessous.

	Synthèse VLS	Synthèse chimique
Coût de fabrication	--	++
Facilité de fabrication	--	++
Variabilité du substrat (dopage, orientation)	-	++
Orientation des nanofils	+	+
Densité des nanofils	++	+
Diamètre des nanofils	+ (Faible dispersion des diamètres)	- (Forte dispersion des diamètres)
Longueur des nanofils	++	++
Localisation des nanofils dans des plots de dizaines de micromètres	++	++
Dopage des nanofils	++	+

Tableau 3.1. Tableau résumant avantages (+) et inconvénients (-) des synthèses de nanofils de silicium par voie VLS et chimique.

Afin d'étudier l'influence de la morphologie des nanofils de silicium sur l'efficacité en LDI-MS, nous avons testé tous les supports présentés au Chapitre 2 .2. Nous ne présentons ici que les supports qui nous permettront de discuter l'influence de la morphologie des nanofils de silicium sur la qualité des analyses LDI-MS.

Les échantillons de silicium (d'orientation $\langle 100 \rangle$, de type N et de résistivité 5 à 10 $\Omega \cdot \text{cm}$) sont attaqués chimiquement par la solution de HF/AgNO_3 en concentration 5.25/0.02M (v/v) et pour des temps d'attaque de 5, 10 et 30 minutes à 55°C. Cette attaque chimique donne lieu à la formation de nanofils de silicium de longueurs respectives de 0.45, 2.5 et 6 μm (Figure 3.6). Le diamètre des nanofils varie entre 10 et 100 nm pour les trois types de supports synthétisés.

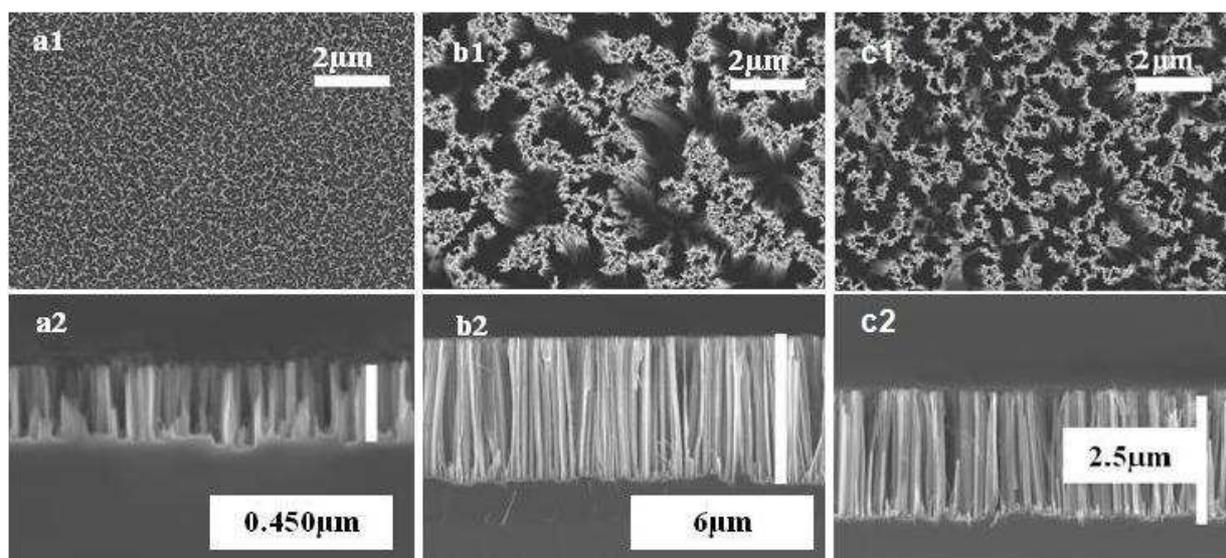


Figure 3.6. Images MEB (vues de dessus pour a1, b1, et c1 et vues en coupe pour a2, b2, c2) de supports de nanofils de silicium de longueurs et de densités différentes.

Ces nanofils de silicium ont ensuite été fonctionnalisés par l'octadécyl-trichlorosilane (OTS). Ce revêtement chimique confère un angle de contact de 150° aux supports de nanofils de silicium. La surface est ensuite exposée à l'UV/ozone. Ce traitement permet de dégrader la couche organique, et de réduire ainsi l'angle de contact de 150° à 120° (Figure 3.2), et d'obtenir ainsi un dépôt homogène des analytes.

Nous avons évalué les performances de ces supports en LDI-MS sans ajout de matrice organique pour la détection d'un mélange de peptides standards (kit de chez Applied Biosystems) : des-arg¹-Bradykinin (M = 904.5 Da, point isoélectrique pI = 10.0), Angiotensin I

(M = 1295.7 Da, pI = 7.4), glu¹-Fibrinopeptide b (M = 1570.0 Da, pI = 4.0) and Neurotensin (M = 1672.9 Da, pI = 8.7) dissous dans un solvant de citrate d'ammonium à 1mM en solution aqueuse, et en concentration de 50 femtomol/ μ l (sauf la Neurotensin qui est 5 fois plus diluée dans le mélange peptidique).

Le spectromètre de masse MALDI utilisé est un Voyager-DE-STR de la compagnie Applied Biosystem, équipé d'un laser à azote de longueur d'onde 337nm et de pulsation 3ns (Chapitre 1 .4.1).

Le citrate d'ammonium évite la formation des ions adduits de sodium et de potassium. De plus, Kruse et al. ont montré qu'en variant le pH de l'échantillon à analyser, la formation d'ions positifs ou négatifs est favorisée et augmente l'intensité du signal pour le mode de détection respectivement des ions positifs ou négatifs.¹⁵⁶ Les valeurs de point isoélectrique (pI) données entre parenthèses pour chaque peptide correspondent au pH pour lequel les peptides ne sont pas chargés. Si le pI d'un peptide est supérieur ou inférieur au pH du solvant, alors le peptide est respectivement chargé positivement et négativement en solution. Le pH du citrate d'ammonium étant égal à 6, les peptides (excepté le Glu1-Fibrinopeptide B) ont de fortes chances d'être ionisés positivement étant donné leur pI. Nous réalisons les acquisitions des spectres avec le mode de détection des ions positifs.

2.3.2. Résultats.

Comparé au support de nanofils de longueur 2.5 μ m, les S/N de tous les supports testés ont été inférieurs. En particulier pour les supports présentés en Figure 3.6 les S/N sont respectivement réduit de 15% et 30% pour les temps d'attaque de 5 minutes et 30 minutes.

Pour estimer l'efficacité des analyses de ces peptides standards par LDI-MS sur le support de nanofils optimal, nous avons comparé celles-ci aux analyses MALDI. Le mélange de peptides en même concentration a été analysé avec un ratio analytes/matrice de 1 pour 1000 en utilisant la matrice α -cyano-4-hydroxy- cinnamic acid (HCCA, 10 mg/ml 50% acetonitrile dans du TFA 0.1%). La Figure 3.7 montre les spectres de masse résultant des deux techniques LDI-MS sur nanofils de silicium et MALDI-MS. Comme attendu, le bruit de fond venant de la matrice diminue l'intensité des signaux des peptides. On note également un bruit de fond sur le spectre obtenu en LDI-MS, mais nettement moins intense (Figure 3.7, a1 et b1).

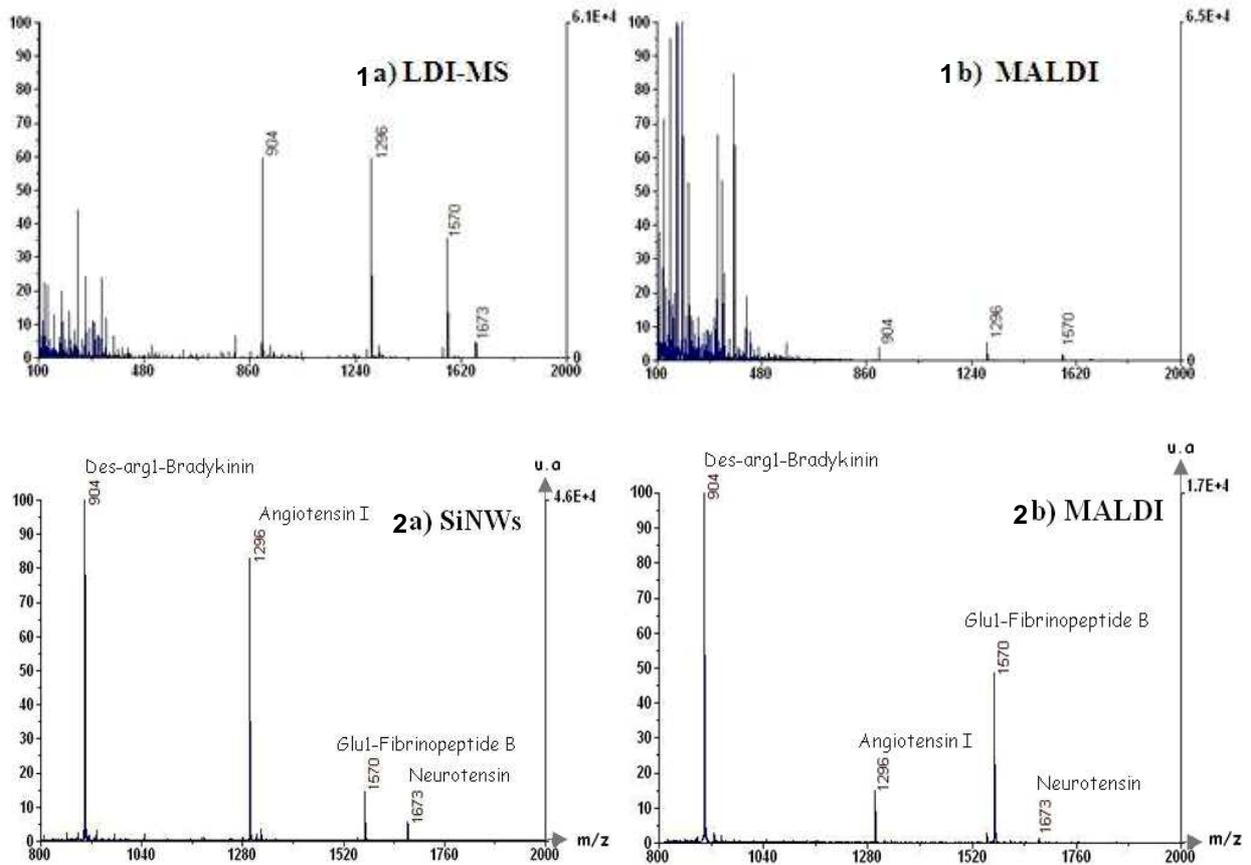


Figure 3.7. Spectres obtenus en filtrant les ions de masses inférieures à 800m/z (2a et 2b) ou non (1a et 1b) avec les techniques a) LDI-MS b) MALDI sur nanofils de silicium pour l'analyse de peptides standards dilués à 50 femtomol/ μ l (sauf la neurotensin à 10 femtomol/ μ l) dans une solution aqueuse de citrate d'ammonium à 1mM.

Les valeurs de ratio S/N reportées dans le Tableau 3.2 correspondent aux spectres a2 et b2 de la Figure 3.7, obtenus lorsque le spectromètre de masse est paramétré de façon à dévier les ions de masses inférieures à 800m/z, permettant de maximiser les signaux des peptides. Les valeurs de S/N sont plus importantes lors de l'utilisation des nanofils de silicium, à l'exception du S/N pour le Glu1-Fibrinopeptide B. Nous supposons que cela est dû à la valeur du pI de ce dernier.

Peptides	S/N ratio	
	LDI-MS	MALDI
Des-arg1-Bradikinin	641	395
Angiotensine I	532	68
Glu1-Fibrinopeptide B	100	234
Neurotensin	40	10

Tableau 3.2. Valeurs des ratios du signal sur bruit (S/N) des pics de la Figure 3.7.

Concernant la sensibilité de détection du support de nanofils⁶, nous avons validé la détection du mélange de peptides pour des concentrations de 25 et 10 femtomol/μl. Les valeurs de S/N sont présentées dans le dans le Tableau 3.3 ci-dessous.

Peptides	S/N ratio	
	25 fmol/μl	10 fmol/μl
Des-arg1-Bradikinin	318	239
Angiotensine I	73	203
Glu1-Fibrinopeptide B	35	28
Neurotensin	8	13

Tableau 3.3. Valeurs des ratios de signal sur bruit (S/N) pour le mélange de peptides à 25 et 10 femtomol/μl, la neurotensin étant encore 5 fois moins concentrée que les autres peptides du mélange.

2.3.3. Discussion.

La densité et la longueur sont les paramètres qui distinguent morphologiquement les trois supports. Ces deux facteurs corrélés s'avèrent donc déterminants pour l'efficacité du support pour la LDI-MS.

En augmentant le temps de l'attaque chimique lors de la synthèse, la longueur augmente mais aussi l'espace entre les 'paquets' de nanofils de silicium. La densité donc est plus faible pour un temps d'attaque de 30 minutes (Figure 3.6) que pour celle de 10 minutes. Pour le plus petit temps d'attaque de 5 minutes, il n'y a pas de formation de 'paquets' de nanofils, par contre il est visible sur la vue en coupe réalisé au MEB que les nanofils de silicium sont plus espacés que ceux obtenus pour un temps d'attaque de 10 minutes.

Nous avons calculé la densité de nanofils pour les temps d'attaque de 5,10 et 30 minutes avec le logiciel image J. Le contraste des images MEB (vue de dessus) est augmenté pour définir les parties avec nanofils et les parties sans nanofils. Nous choisissons ensuite un seuil qui nous permet d'obtenir une image « binaire » avec uniquement les deux couleurs noir et blanc, et donc d'obtenir le pourcentage de nanofils de silicium les plus en surface. Nous obtenons des densités respectives de 25.4, 26.6 et 20% avec une erreur de 2%.

⁶ Silicium (<100>, type n, résistivité 5 a 10 Ω.cm) attaqué chimiquement par la solution de HF/AgNO₃ en concentration 5.25/0.02M (v/v) pendant 10 minutes a 55°C, silanisation OTS et traitement UV/ozone (Angle de contact de 120°pour une goutte d'eau d'1μl).

Les meilleurs résultats en LDI-MS correspondent au support avec les nanofils de silicium les plus denses et de longueur intermédiaire. Les nanofils synthétisés par attaque chimique du silicium (<100>, dopé N, de résistivité 5-10 Ω .cm) pendant 5 et 30 minutes sont moins efficaces de 15 et 30% respectivement. Le paramètre de densité des nanofils de silicium, et non celui de la longueur, semble donc avoir un rôle déterminant pour la qualité du support utilisé en LDI-MS.

Il est possible que la densité joue un rôle majeur comparé à la longueur. En effet, si on considère l'absorption et la réflexion optique du silicium à la longueur d'onde utilisée 337nm, *on peut estimer que la profondeur maximale de pénétration du laser dans un nanofil de silicium est d'une valeur inférieure à 100nm.*^{154,155} Cette profondeur est inférieure aux longueurs des nanofils étudiées ici. De plus, nous utilisons des surfaces de nanofils de silicium « hydrophobes », ce qui permet aux analytes de se positionner plutôt sur les hauts des nanofils.

En conclusion, il y a un effet non négligeable de la morphologie des nanofils sur la qualité des spectres LDI-MS, en accord avec les observations reportées dans la littérature.^{148,149,150,156} Ici, nous supposons de plus que la longueur des nanofils a un effet limité lorsque les surfaces de nanofils de silicium sont hydrophobes. Augmenter la surface spécifique en augmentant la longueur serait donc inutile. Nous discutons au paragraphe 2.5.2 plus en détails l'effet de la densité des nanofils en regard de la répartition des analytes sur les nanofils et de la capacité des nanofils à transférer l'énergie aux analytes pour se désorber/ioniser.

2.4. Désorption/Ionisation, transfert d'énergie aux analytes.

De nombreux groupes ont essayé d'optimiser et de comprendre l'ionisation et la désorption des analytes.

Concernant l'ionisation, Kruse et al. ont montré qu'en variant le pH de l'échantillon à analyser, la formation d'ions positifs ou négatifs est favorisée et augmente l'intensité du signal pour le mode de détection respectivement des ions positifs ou négatifs.¹⁵⁶ Il n'est cependant pas exclu que des analytes non chargés capturent des électrons dû à un effet photoélectrique ou capturent des protons venant des terminaisons Si-H et Si-OH en surface du silicium poreux.¹⁴⁹ Il est probable que l'ionisation ait lieu avant la désorption et qu'elle aide à la désorption. Il n'est pas exclu que l'ionisation ait lieu après et que la désorption soit le résultat d'un transfert d'énergie aux analytes.

Luo et al.¹⁵⁷ ont étudié le transfert d'énergie interne en LDI-MS sur nanofils de silicium et suggèrent que ce transfert d'énergie est d'origine thermique. Ils ont mesuré l'énergie interne nécessaire pour la désorption d'ions (la mesure est possible car la nature de ces ions leur permet de jouer le rôle de thermomètres) à partir : de nanofils de silicium synthétisés par voie VLS (Figure 3.8) de diamètre moyen de 40nm, de silicium poreux classiquement utilisé en DIOS, et de la matrice HCCA utilisée en MALDI. Les ions thermomètres étant pré-ionisés, l'énergie mesurée ne correspond qu'à l'énergie utile à leur désorption.

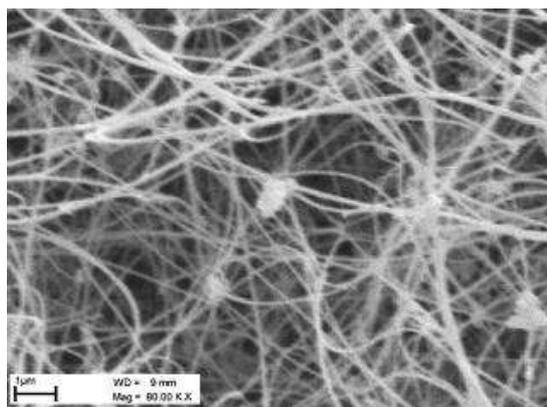


Figure 3.8. Image MEB des nanofils de silicium étudiés par Luo et al.¹⁵⁷ pour mesurer l'énergie interne nécessaire à la désorption d'ions thermomètres.

Leur étude montre que l'énergie nécessaire à la désorption à partir des nanofils est de l'ordre de celle impliquée dans le cas du MALDI, alors que celle dans le cas du DIOS est diminuée par 2. A contrario, les nanofils de silicium requièrent 6 fois moins de puissance laser que le silicium poreux ou la matrice pour la désorption de ces ions thermomètres. Ils concluent en soulignant, une fois de plus, que la morphologie des nanostructures de silicium influence fortement les conditions de désorption/ionisation des analytes. Ils présumant notamment que la morphologie des nanostructures ait un effet sur le volume d'expansion des analytes en phase gazeuse (plume d'analytes) suite à leur désorption.

Dans ce paragraphe, nous présentons les caractérisations optiques et autres observations concernant les différentes morphologies de nanofils de silicium que nous avons testées.

2.4.1. Propriétés optiques des nanofils de silicium.

Suite à l'exposition d'un matériau à un faisceau laser, trois phénomènes sont mis en jeu : la transmission, la réflexion et l'absorption des photons.

Nous avons réalisé des mesures de spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (Spectrophotomètre UV-vis Hitachi model U-3010, équipé d'une sphère d'intégration Hitachi-

60 mm DIA) pour déterminer la réflectivité des surfaces de nanofils de silicium synthétisés par attaque chimique du silicium (<100>, dopé N, de résistivité 5-10 Ω .cm) dans une solution d' HF/AgNO_3 à 5.25/0.02 M pour 5, 10, 30, 60 et 120 minutes. On peut constater sur les spectres de la Figure 3.9 que les surfaces sont toutes antiréfléctives à la longueur d'onde du laser du spectromètre de masse (337nm). La majorité des photons est donc absorbée.

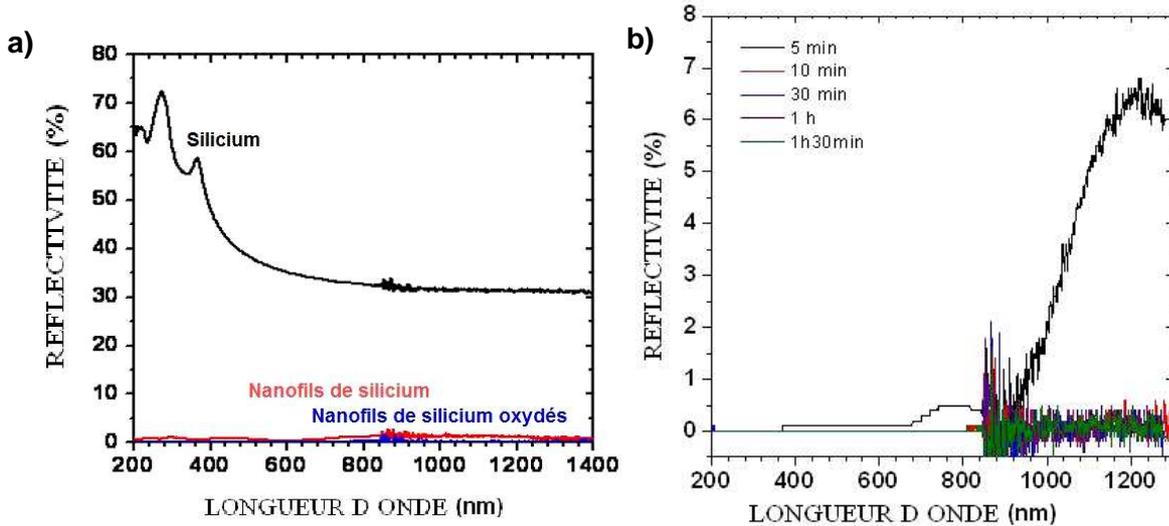


Figure 3.9. a) Spectre de réflectivité du silicium, des nanofils de silicium synthétisés par voie chimique (HF/AgNO_3 à 5.25/0.02M) et des nanofils de silicium oxydés synthétisés par voie SLS. B) Spectre de réflectivité des nanofils de silicium synthétisés par voie chimique (HF/AgNO_3 à 5.25/0.02M) avec différents temps d'attaque (5, 10, 30, 60, 120 min).

Suite à l'absorption des photons, quatre mécanismes de désexcitations sont possibles :

- L'émission radiative (photoluminescence)
- L'effet photoélectrique (transport de l'électron dans le matériau ou éjection de l'électron du matériau)
- Les réactions photochimiques
- Les recombinaisons non radiatives ou excitation phononique (effet photothermique)

Comme nous l'avons décrit dans le Chapitre 2 .5, le silicium cristallin possède un gap indirect et il n'est pas photoluminescent alors que sous sa forme nanostructurée, le silicium peut émettre une lumière intense dans le visible grâce aux effets de confinement quantique.

Nous avons étudié la photoluminescence des surfaces de nanofils de silicium avant et après oxydation thermique complète du silicium des nanofils (Figure 3.10). On constate une très faible intensité de photoluminescence et un large spectre centrée autour de la longueur d'onde de 600 nm environ.

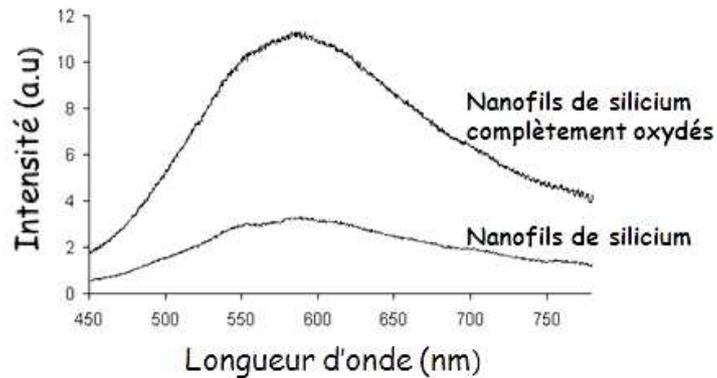


Figure 3.10. Spectre de photoluminescence des nanofils de silicium, fabriqués par voie chimique, avant et après oxydation thermique (mesure à température ambiante avec une source d'excitation laser He-Cd à 325 nm).

Selon la théorie de la masse effective, des nanofils de silicium dont les diamètres du cœur cristallin sont de 4 et 10nm devraient donner de la luminescence aux longueurs d'onde de 620nm et de 950nm respectivement.¹⁵⁸ Un nanofil de silicium ayant un cœur cristallin de diamètre plus grand que 15nm est supposé avoir des propriétés optiques similaires à celles du silicium massif.¹⁵⁸ Or le diamètre de nos nanofils étant de l'ordre de 20 à 100nm, l'hypothèse que la photoluminescence soit due aux défauts de surfaces paraît la plus plausible. Il peut s'agir des défauts observés dans le cas du silicium poreux que nous avons résumés dans le Chapitre 2 .5.3.1.

Après oxydation thermique, la photoluminescence est quatre fois plus intense alors que le maximum du pic reste quasiment centré sur la même longueur d'onde. Ceci conforte le fait que la photoluminescence des nanofils de silicium non oxydés résulte plutôt des défauts de l'oxyde de silicium (le silicium s'oxyde à l'air sur une épaisseur de 1 à 2 nm) que d'effets de confinement quantique. De plus, la photoluminescence liée à l'oxygène est souvent observé dans la région spectrale de l'orange ou du bleu.¹⁵⁹

Dans tous les cas, la photoluminescence des supports n'est pas liée à la qualité des analyses LDI-MS. En effet, tous les nanofils de silicium synthétisés par voie chimique ont donné le même spectre de photoluminescence, alors qu'un seul type de support de nanofils de silicium est efficace en LDI-MS. Enfin, les nanofils de silicium entièrement oxydés présentent une photoluminescence plus intense (4x) mais sont inefficaces pour la LDI-MS.

En définitive, si l'énergie absorbée ne se dissipe pas par l'émission de lumière, il y a d'autant plus de chance qu'elle se dissipe sous forme de chaleur par recombinaisons non radiative, c'est à dire par un effet d'excitation des phonons.

2.4.2. Propriétés thermiques des nanofils de silicium.

Les propriétés thermiques des nanofils de silicium ont été explorées dans la littérature.^{160,164} Il en ressort que la conductivité thermique des nanofils de silicium est plus faible que celle du silicium massif.¹⁶⁰ Pour donner une valeur, la conductivité thermique du silicium poreux est déjà au moins 100 fois plus faible que celle du silicium massif,¹⁶¹ et cela suffit pour que le silicium poreux soit utilisé comme isolant thermique.^{162,163} En fait, plus l'aire de contact entre les micro/nanostructures diminue, plus la conductance de chaleur de micro/nanostructures en micro/nanostructures est faible. Lorsque la porosité (fraction de volume inoccupé au sein d'une couche de silicium poreux) ou l'espace entre les nanofils augmente, on aboutit à une moins bonne conduction de la chaleur dans le matériau.¹⁶⁴

A l'échelle d'un nanofil, des études récentes en spectroscopie Raman ont montré qu'un nanofil de silicium chauffe et conserve beaucoup plus la chaleur que le silicium à l'état massif. Un faisceau laser de puissance élevée (supérieure à 8 mW) a même complètement modifié et en partie détruit la structure du nanofil de silicium.¹⁶⁵ Le décalage et l'élargissement des pics des spectres Raman en fonction de l'intensité laser ont permis d'identifier ces effets thermiques, effets renforcés lorsque les nanofils de silicium étaient dopés. Un nanofil de silicium dopé p créerait plus de chaleur sous irradiation laser qu'un nanofil non dopé.

Par ailleurs, notre groupe a supposé l'existence de « points chauds » présents aux aires de contact de deux ou plusieurs nanofils de silicium¹⁶⁶ lors d'une étude réalisée sur les nanofils de silicium recouverts de particules d'argent pour la détection de biomolécules par la technique de « Surface-Enhanced-Raman-Spectroscopy » SERS.

Luo et al. considèrent le transport de chaleur balistique dans les nanofils VLS de diamètre moyen de 40 nm et présume que la chaleur se concentre en surface avant d'être diffusée de manière radiale.¹⁵⁷

En ce qui concerne les différents supports de nanofils de la Figure 3.6 nous estimons que la dispersion des diamètres de nanofils de silicium est quasi-identique ainsi qu'une intensité de photoluminescence comparable. En faisant cette approximation, nous pourrions supposer que les propriétés de conductivité thermique des différents supports sont quasi-similaires. Cependant cette déduction manque de valeurs concrètes et de mesures directes ; il est donc difficile de tirer une conclusion.

Pour déterminer si l'effet thermique a une importance lors de la désorption/ionisation laser sur nanofils de silicium, nous avons oxydé les nanofils de silicium. Les nanofils de silicium ont été oxydés thermiquement selon le procédé de la Figure 3.11 sur une profondeur de 200 nm. La nature de l'oxyde est un oxyde sec.

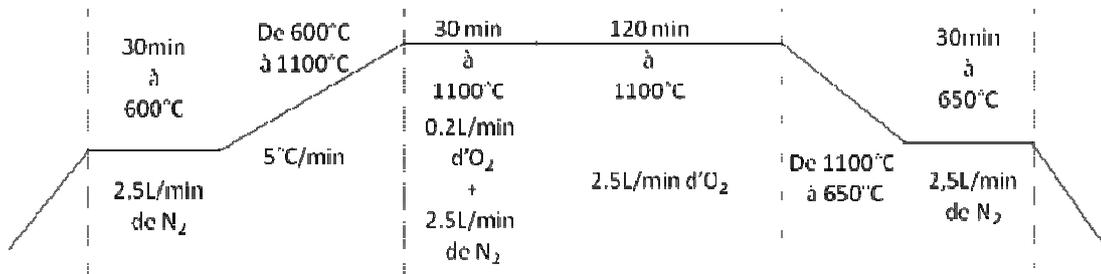


Figure 3.11. Procédé d'oxydation thermique exposant les différentes étapes de montées en température, de paliers et de recuits successifs.

La Figure 3.12 les images MEB des nanofils de silicium avant et après oxydation. Le diamètre des nanofils de silicium a augmenté après oxydation, ce qui correspond à une expansion du volume due à la formation de liaison Si-O-Si. On estime que pour l'oxydation d'une profondeur de 100 nm de silicium, on forme 227 nm de SiO₂. L'oxydation complète des nanofils de silicium est vérifiée en plaçant le support dans une solution aqueuse de HF à 50% pendant 1 minute : les nanofils sont complètement dissous (Figure 3.12.c).

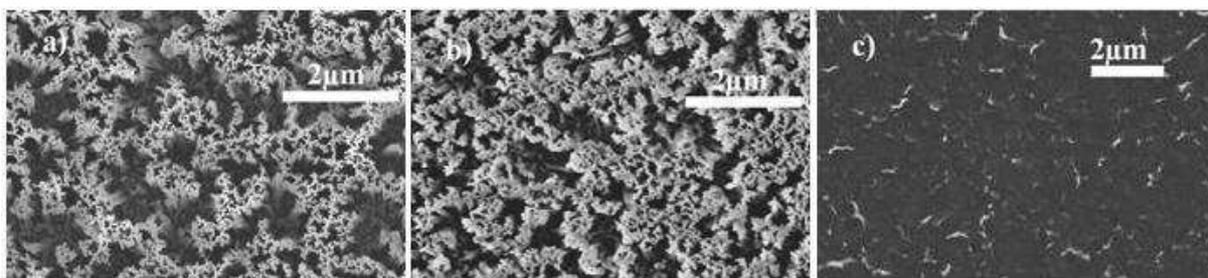


Figure 3.12. Image MEB du support de nanofils de silicium optimisé pour les analyses LDI-MS avant oxydation a), après oxydation oxydation thermique complète des nanofils de silicium b), et après oxydation et attaque HF c).

On constate alors que l'oxydation totale des nanofils les rend inefficaces pour la LDI-MS aucun pic de masse n'est détecté. Les résultats sont corroborés par l'absence de désorption/ionisation de peptides sur les nanofils de silice préparés par la technique Solide-Liquide-Solide (SLS) (Chapitre 2 .2.3). L'oxyde de silicium possède une faible conductivité thermique (au moins quatre fois inférieure à celle du silicium) et une structure interne

amorphe qui limite la propagation des phonons. *Ceci nous amène à considérer que le phénomène de confinement de la chaleur et le caractère cristallin existant dans les nanofils de silicium permet aux analytes de récupérer une énergie sous forme thermique jusqu'à atteindre l'énergie d'activation nécessaire à leur désorption.*^{66,151} Si l'on suppose toutefois qu'il y ait un confinement de la chaleur dans les nanofils d'oxyde de silicium, la faible conductivité de l'oxyde de silicium expliquerait qu'il n'y ait pas une énergie thermique suffisante à la désorption/ionisation des biomolécules. Les études de Chen et al. ont examiné la désorption/ionisation de biomolécules sur du métal non nanostructuré. Ils exposent la faible reproductibilité de la technique, ainsi qu'une fragmentation des biomolécules.¹⁶⁷ Il est fort probable que la réflectivité du métal ainsi que la répartition de la chaleur dans tout le volume métallique compromette un confinement de la chaleur : cela expliquerait un transfert d'énergie aux analytes moins efficace. A contrario, des nanoparticules d'or ont été utilisées avec succès pour la LDI-MS sans matrice (laser azote 337 nm), ce qui va dans le sens de notre hypothèse reposant sur le phénomène de confinement de la chaleur.

2.5. Confinement de la chaleur dans les nanofils.

Compte tenu de notre hypothèse, il serait intéressant de pouvoir augmenter le confinement de la chaleur dans les nanofils. Cela pourrait en effet diminuer le seuil de la puissance laser nécessaire pour atteindre l'énergie d'activation nécessaire à la désorption des biomolécules. En diminuant le seuil de la puissance laser, il est possible que la sensibilité de détection des analyses LDI-MS soit augmentée.

2.5.1. Réduction de la taille du cœur de silicium : oxydation partielle

Tout d'abord, nous avons pensé observer l'effet de la réduction du cœur de silicium des nanofils, par exemple en les oxydant partiellement. Il est probable que la réduction du cœur cristallin des nanofils modifie les propriétés thermiques de ces derniers puisque le diamètre du nanofil joue sur sa conductivité thermique comme nous l'avons vu au Chapitre 2 .5.4.2.

Nous avons réduit le corps de silicium en oxydant partiellement les nanofils de silicium (préparés par voie chimique) de 15, 65 et 120 nanomètres. L'épaisseur est déterminée à partir de l'épaisseur d'oxydation d'un wafer de silicium plat oxydé en référence dans le même four. L'oxydation partielle de 15 nm ne diminue ni la qualité, ni la valeur du signal sur bruit lors des analyses LDI-MS alors que celle de 65 et 120nm rend les nanofils inefficaces pour la LDI-MS. Nos résultats indiquent donc qu'il existe une épaisseur d'oxyde (> 15 nm) à partir de laquelle le mécanisme de désorption/ionisation est compromis. Ceci peut se justifier par la faible conductivité thermique de l'oxyde de silicium. Nous avons ensuite retiré l'oxyde de

silicium par une attaque HF ; les résultats en LDI-MS ont été identiques à ceux obtenus sur les nanofils de silicium non oxydés thermiquement.

En fait, nos supports de nanofils présentant des diamètres variant de 20 à 200 nm, ces résultats ne sont pas réellement exploitables. En optimisant la synthèse par voie VLS, nous avons récemment obtenu une distribution de diamètre très étroite. Il serait intéressant de faire cette étude à partir de nanofils de silicium de diamètre quasi-identiques.

2.5.2. Densité des nanofils de silicium, infiltration des peptides et transfert d'énergie.

Nous discutons dans un premier temps le cas où la surface des nanofils de silicium n'est pas modifiée chimiquement par des silanes hydrophobes. Dans ce cas, la goutte contenant les peptides infiltre les nanofils de silicium et les peptides se déposent tout le long des nanofils (angle de contact d'une goutte d'eau d' $1\mu\text{L}\sim 0^\circ$). La Figure 3.13 schématise trois types de densité de nanofils de silicium (a1, b1, c1). En terme d'accessibilité des analytes au faisceau laser, il est clair que les cas b1 et c1 sont les plus avantageux. Cependant, en considérant que le transfert d'énergie thermique se fait au niveau des nanofils, les analytes déposés entre les nanofils au contact du silicium massif ne bénéficient pas de ce transfert et leur désorption est donc compromise. Nous pouvons donc supposer qu'un support avec une densité moyenne de nanofils serait le plus efficace. Aussi, une longueur trop importante des nanofils de silicium limiterait leur accessibilité au faisceau laser (étant donné de plus que le laser de longueur d'onde 337 nm n'est absorbé que sur une longueur de 100 nm dans le silicium).

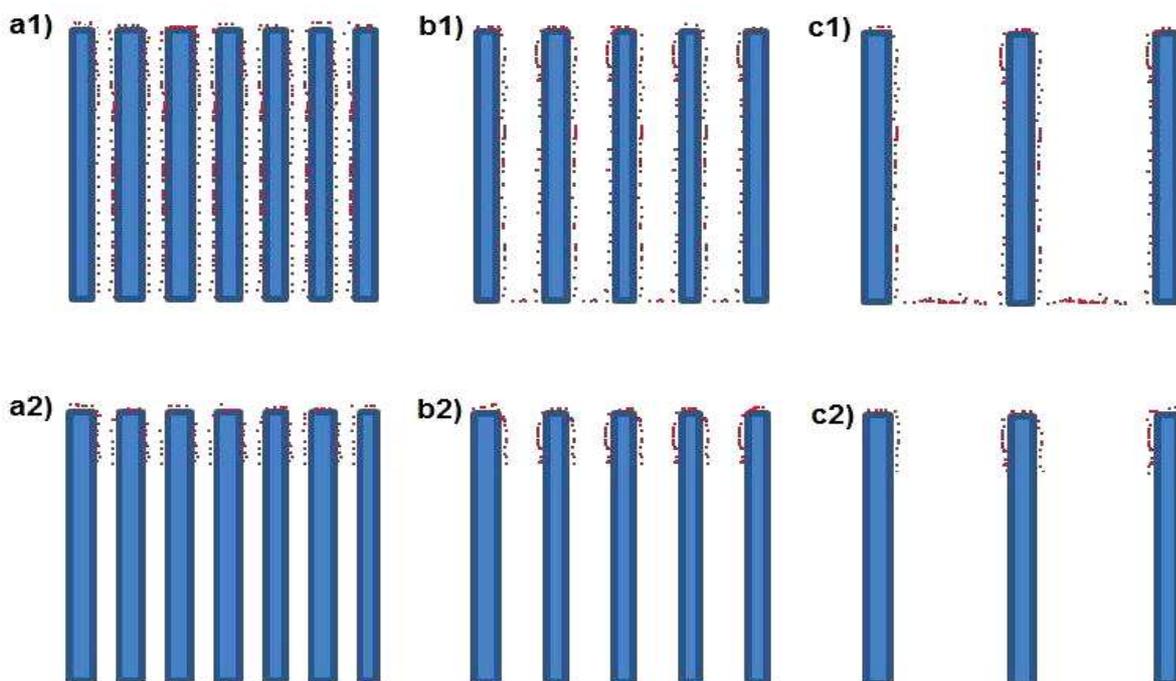


Figure 3.13. Schéma de différentes densités de nanofils de silicium (a, espacement des fils de 10 à 30 nm ; b, espacement des fils de 30 à 50 nm ; c, espacement des fils de 50 nm à 2 µm) et de l'infiltration des peptides selon que les nanofils sont modifiés avec un silane hydrophobe (2) ou non (1).

Dans le cas où les nanofils de silicium sont modifiés par un silane hydrophobe, nous pouvons considérer que les peptides se déposent plutôt en surface de la structure (Annexe 1). L'interdépendance entre la densité des nanofils de silicium et l'accessibilité des analytes au faisceau laser n'est alors pas évident et il est difficile d'interpréter l'effet de densité sur l'efficacité des analyses LDI-MS.

De plus, nous n'avons pas d'information sur leur position exacte sur le haut des nanofils et nous ne savons pas si cette position varie ou non selon la densité de nanofils de silicium. Tsao et al.¹⁴⁸ ont montré qu'il est possible de jouer sur l'infiltration des peptides en utilisant le principe de l'électromouillage, et ils ont observé une amélioration du ratio S/N lorsque la tension appliquée durant l'électromouillage est plus élevée.

Une étude sur le procédé d'infiltration des analytes dans les trois types de surfaces, ici totalement arbitrairement représenté en Figure 3.13 (a2, b2, c2), serait donc nécessaire. Il pourrait s'agir par exemple de profils de Spectroscopie de Photoélectrons à rayons X (XPS) à plusieurs niveaux de longueur des nanofils.

En supposant tout de même qu'il n'y ait pas de différence d'infiltration des analytes selon les trois types de surface, et en considérant un angle de contact identique, les analytes seraient plus accessibles au laser dans les cas b1 et c1. En effet, une densité trop élevée ramènerait au cas du silicium poreux hydrophobe : les espaces séparant les nanofils étant trop étroits, les analytes ne seraient moins facilement accessibles au faisceau laser. Nos observations montrent une moins bonne efficacité pour des supports de type c2 par rapport à des supports de type b2. Puisque pour b2 et c2, le même taux d'analytes serait désorbés, la densité aurait plutôt un effet sur le mode d'expansion des analytes en phase gazeuse, comme le présume Luo et al.¹⁵⁷

Il serait intéressant de pouvoir modéliser le mode de diffusion de la chaleur à l'interface des nanofils de silicium selon leur taille, diamètre, espacement... Il n'est pas exclu que la diffusion de la chaleur entraîne des mouvements de convection de la phase gazeuse.

Aussi, il serait intéressant aussi de tester l'efficacité des supports de nanofils de silicium dans le cas où le faisceau laser incident du spectromètre de masse arrive perpendiculairement à la surface (modèle MALDI 800, Applied Biosystem) car il se peut que

le volume d'expansion des analytes soit différent. Dans le cas des analyses MALDI avec un laser incident à 45°, il a été observé que les analytes repartent un peu vers le laser alors qu'avec un laser incident à 90°, les analytes se dirigent plus facilement vers la grille d'extraction.

2.5.3. Nature du substrat des nanofils de silicium.

L'oxyde de silicium est une barrière à la conduction thermique plus efficace que le silicium massif en contact à la base des nanofils de silicium.¹⁶⁸ Afin de favoriser le confinement de la chaleur dans les nanofils, nous avons donc réalisé la croissance de nanofils de silicium par voie VLS sur une surface de silicium recouverte de 200 nm d'oxyde de silicium. Les valeurs de S/N et la sensibilité de détection sont cependant restés sensiblement les mêmes.

Nous avons aussi regardé l'effet de dopage du substrat des nanofils mais la résistivité et le type de dopage du substrat sur lequel les nanofils de silicium ont été synthétisés par voie chimique, n'ont pas non plus démontré d'influence sur la qualité de la désorption/ionisation. Le Tableau 3.4 résume les substrats testés, sachant que les nanofils de silicium présentaient pour chacun les caractéristiques géométriques identiques. En effet, la synthèse des nanofils de silicium par attaque chimique HF/AgNO₃ de substrats de différents types ou valeurs de dopage aboutit à la formation de nanofils de même morphologie.¹⁶⁹

Epaisseur	Orientation	Type de dopage	Resistivité
380 ± 25 µm	<100>	P-Boron	Intrinsèque
380 ± 25 µm	<100>	P-Boron	5-10 Ω.cm
380 ± 25 µm	<100>	P-Boron	>1 Ω.cm
380 ± 25 µm	<100>	P-Boron	0.01 Ω.cm
380 ± 25 µm	<100>	N-Phosphore	5-10 Ω.cm

Tableau 3.4. Résumé des types et des valeurs de résistivité des substrats de nanofils de silicium testés pour les analyses LDI-MS.

2.5.4. Dopage et cristallinité des nanofils de silicium

Brioude et al. ont démontré que la chaleur des nanofils dopés est supérieure à celle des nanofils non dopés.¹⁶⁵ Notre groupe travaille actuellement sur le contrôle du dopage des nanofils VLS pendant la croissance¹⁷⁰ et sera prochainement en mesure d'étudier l'effet du

dopage des nanofils sur les résultats LDI-MS. Nous pensons par ailleurs atténuer les défauts cristallins des nanofils VLS par des recuits car le transport des phonons augmente avec la cristallinité.

2.6. Conclusion et perspectives.

Nous avons regardé de plus près le mécanisme de LDI-MS sur les nanofils de silicium en examinant l'effet de plusieurs paramètres : la morphologie des nanofils de silicium, leur chimie de surface, leur propriétés optique et thermique. Nous avons ensuite commenté nos résultats et les avons comparés aux observations et hypothèses décrites dans la littérature.

De cette étude il ressort tout d'abord l'importance de maximiser le nombre d'analytes accessibles au faisceau laser lors du procédé de désorption/ionisation. La modification des nanofils de silicium par des silanes hydrophobes a clairement permis de limiter l'infiltration des analytes et a favorisé leur distribution sur le haut des nanofils.

Aussi, nos résultats rejoignent la littérature sur le fait que la morphologie des nanofils de silicium est un paramètre critique. Nous supposons par ailleurs un rôle prédominant du facteur de densité des nanofils.

Lors de cette étude nous aussi avons constaté les caractéristiques de réflectivité et de photoluminescence quasi-nulles des nanofils de silicium. Ces résultats nous ont amené à considérer le mécanisme photothermique de transfert d'énergie des nanofils de silicium aux analytes. Le confinement des phonons dans les nanofils de silicium (récemment décrit dans la littérature)¹⁷¹ autoriserait un transfert de chaleur efficace aux analytes leur permettant d'acquérir l'énergie d'activation suffisante pour générer leur désorption.

En supposant qu'un meilleur confinement des phonons permet de diminuer la puissance laser nécessaire à la désorption, il est possible que la qualité des analyses LDI-MS soit plus élevée. Nous avons décrit quelques études qui pourraient éclaircir un peu plus cette hypothèse. *En effet, une autre supposition de mécanisme pourrait être orientée vers la désorption par un effet de champs à la pointe des nanofils.* Nous avons décrit quelques perspectives pour l'amélioration des performances du support (sensibilité, détection de masses supérieures à 3000 Da) et/ou pour avancer vers la compréhension du mécanisme.

Finalement, le groupe de Vertes a réalisé des mesures de puissance laser utilisée et d'énergie nécessaire pour la désorption d'ions thermomètres.¹⁵⁷ Il serait intéressant de les effectuer pour les études que nous avons décrites pour différentes densité de nanofils VLS de diamètre identique ou encore pour d'autres types de matériaux nanostructurés.

3. Nanofils de silicium et performances en LDI-MS

En définitive, le phénomène de LDI-MS sur nanofils de silicium n'a pas été totalement élucidé mais l'étude nous a permis de déterminer un support optimal⁷ pour les analyses LDI-MS sur des peptides standards. Les applications de la LDI-MS sans matrice sont de plus en plus nombreuses et avantageuses. Nous présentons ici les potentialités du support de nanofils de silicium optimal.

3.1. Haute sensibilité de détection pour des composés de petites masses

De plus en plus de petites biomolécules de masse inférieure à 600 Da se dévoilent comme essentielles à la régulation des fonctions cellulaires.^{172,173,174,175} L'analyse MALDI de ces petites biomolécules a pris du retard étant donné le bruit des pics caractéristiques de la matrice intervenant dans cette gamme de masse. De nombreux types de matrices ont été testées pour réduire ce bruit.¹⁷⁶ En 1988, Takana et al. ont réussi pour la première fois à détecter des lysozymes de protéines avec une poudre inorganique de cobalt mélangée à du glycérol.¹⁷⁷ Par la suite en 1999, le DIOS est reconnue comme la technique réellement complémentaire au MALDI, et minimisant assez souvent les pics parasites dans cette gamme de masse.

Certains biomarqueurs de cancer, inhibiteurs enzymatiques, explosifs, médicaments, certaines toxines ou drogues, sont autant de petites molécules dont l'identification est essentielle, que ce soit pour déterminer leurs implications dans des processus biologiques naturels, pour la mise en place de traitements médicaux, ou encore pour faire avancer les enquêtes policières (analyse des forensics).

Avant d'adapter notre support de nanofils de silicium à des dispositifs tels que les biopuces ou les laboratoires sur puces que nous introduisons au chapitre suivant, nous avons validé son efficacité pour des analyses de petites biomolécules.

Le support de nanofils de silicium identifié comme le plus performant⁷ en S/N pour les peptides standards, a démontré une sensibilité de détection du sutent (MW 399) 50 fois plus élevée (de 10 femtomol/ μ L) comparé à la technique MALDI classique (de 500 femtomol/ μ L). Le sutent est une petite molécule inhibitrice de la Tyrosine kinase. Elle permet de bloquer l'action de ce récepteur d'enzyme situé en surface de cellules cancéreuses de l'estomac, de

⁷ Silicium (<100>, type n, résistivité 5 à 10 Ω .cm) attaqué chimiquement par la solution de HF/AgNO₃ en concentration 5.25/0.02M (v/v) pendant 10 minutes à 55°C, silanisation OTS et traitement UV/ozone (Angle de contact de 120° pour une goutte d'eau d'1 μ l).

l'intestin ou du rein, et diminue ainsi la croissance et la dissémination du cancer. Le suturent analysé ici a été synthétisé selon le protocole décrit par Manley et al.¹⁷⁸

L'intensité du signal est 10 fois plus élevée que celle observée lors de l'utilisation de la DHB, matrice couramment utilisée en MALDI pour la détection de petites molécules. (Figure 3.14).

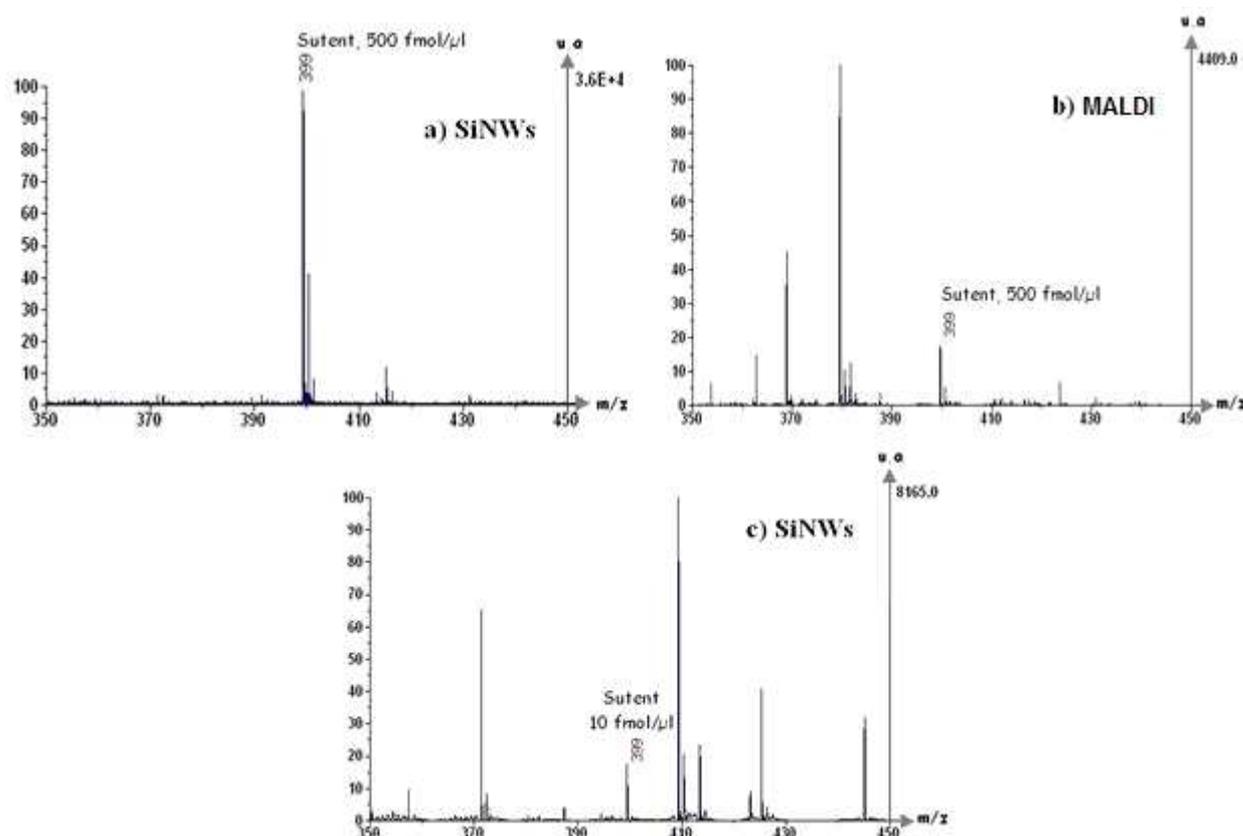


Figure 3.14. Spectre LDI-MS sur nanofils de silicium en a), et MALDI (matrice DHB) en b) pour l'analyse du suturent dilué à 500 femtomol/μL dans du citrate d'ammonium 1mM.

Il est clairement visible sur la Figure 3.14 que les pics parasites limitent la détection du suturent à 500 femtomol/μL (S/N =38) par MALDI. A contrario, peu de pics parasites sont présents sur le spectre du suturent en concentration 500 femtomol/μL (S/N =555) réalisé en LDI-MS sur nanofils de silicium. Nous avons déterminé la limite de détection du suturent à 10 femtomol/μL (S/N=27), qui nous paraît là aussi être la conséquence de pics parasites. Comme nous avons utilisé la même intensité laser pour la désorption/ionisation du suturent en concentration 500 et 10 femtomol/μL, nous supposons que les pics parasites viennent de polluants organiques atmosphériques.

Nous avons essayé plusieurs rinçages (acétonitrile puis éthanol, incubation de la surface dans l'éthanol plusieurs jours) avant le dépôt des petites molécules, mais le bruit de fond est resté identique.

Le même constat est établi pour l'analyse d'autres petites molécules. Bien que la sensibilité de détection du verapamil soit 100 fois plus élevée avec le support de nanofils de silicium (limite de sensibilité à 5 femtomol/ μ L) qu'avec la matrice (limite de sensibilité à 500 femtomol/ μ L), des pics parasites apparaissent pour la détection de ce dernier à partir de 25 femtomol/ μ L (Figure 3.15).

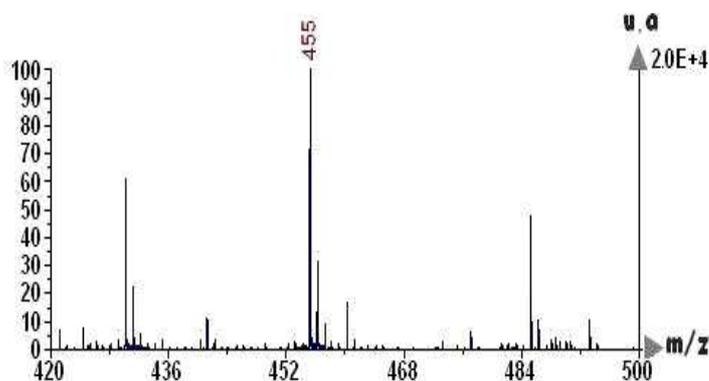


Figure 3.15. Spectre du verapamil à 25 femtomol/ μ L réalisé par LDI-MS sur nanofils de silicium.

Finalement, nos résultats confirment que la LDI-MS sur nos supports de nanofils de silicium permet de gagner en sensibilité de détection de molécules de faible poids moléculaire comparée au MALDI. Ceci est notamment lié à l'avantage de s'affranchir des pics parasites de la matrice qui est en fort ratio molaire par rapport aux analytes lors des analyses MALDI. Ici des pics parasites sont aussi présents mais en faibles concentrations. Ces pics sont également détectés lorsque la LDI-MS est réalisée sur une zone de nanofils de silicium sans dépôt d'analytes et les valeurs des pics peuvent varier, ce qui nous amène à penser qu'ils proviennent de divers contaminants atmosphériques. Toutefois, ils compromettent la détection de petites molécules en faibles concentrations et sont certainement une des causes principales de la limite de détection.

3.2. Validation à l'analyse protéomique

3.2.1. Introduction à la protéomique.

La protéomique est en fait l'étude des protéines d'une cellule, de tissu organique, d'organisme ou d'organe, ou encore de fluides biologiques. Le taux d'expression ou les fonctions biologiques des protéines peuvent changer suivant l'environnement, et donc donner beaucoup d'indices sur la réaction de notre corps à des agressions extérieures. Aussi, les résultats du séquençage nucléotidique du génome humain révèlent qu'il contient

beaucoup moins de gènes que prédits. Cela place les protéines au cœur de l'action des processus biologiques gouvernant les fonctionnalités du corps humain.

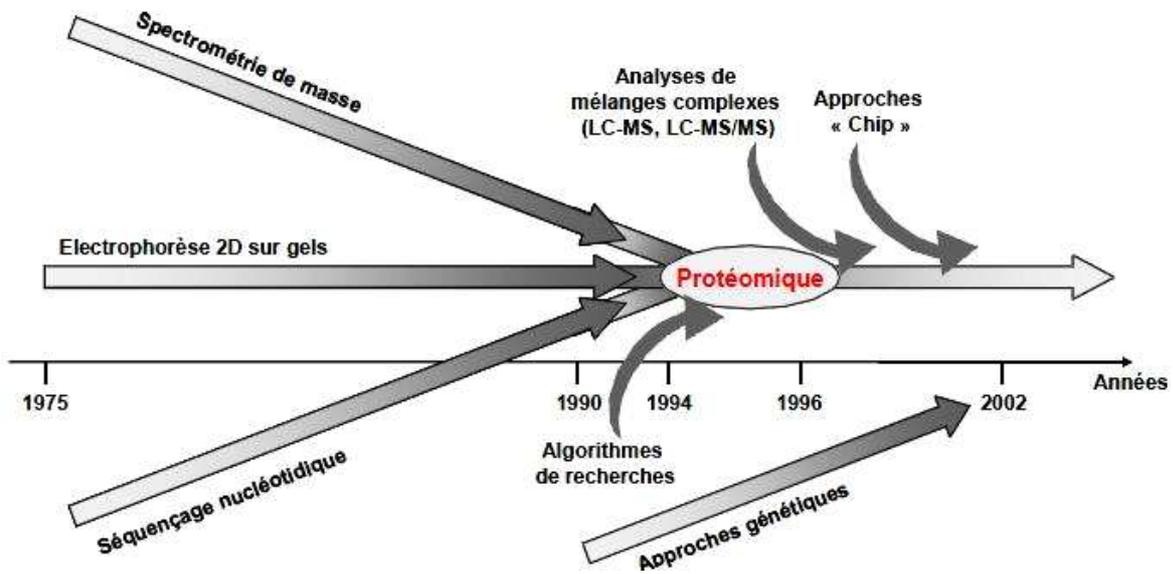


Figure 3.16. Evolutions instrumentales depuis 1975 ayant contribué à l'émergence de l'analyse protéomique.¹⁷⁹

Aujourd'hui de nombreuses recherches en bioinformatique sont mises en place. Au niveau pratique, ce sont les techniques d'imagerie (cartographie de coupes de tissus par MALDI - Chapitre 1 .4.3.1) ou de séparation de protéines (électrophorèse 2D sur gels, Chromatographie liquide) suivies d'analyses MALDI. L'électrophorèse 2D sur gels dissocie les protéines grâce à un dispositif d'électrophorèse bidimensionnelle : les protéines migrent le long du gel 2D et se positionnent à différents emplacements selon leur charge, et leur taille (Figure 3.17).

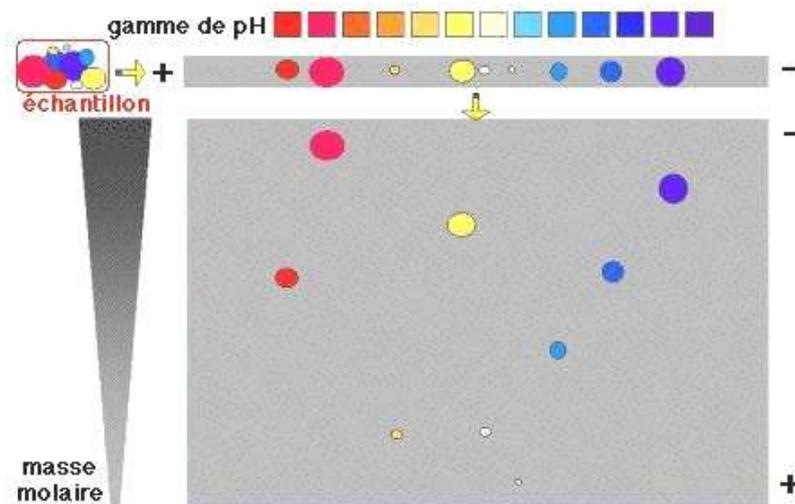


Figure 3.17. Schéma de la technique de séparation de protéines d'un échantillon par gel 2D.¹⁸⁰

Finalement le MALDI peut identifier une protéine en analysant leur masse réelle ou en analysant les peptides issus de sa digestion par une enzyme. Le fait que les protéines soient récupérées à partir du gel 2D (digestion de la protéine à l'intérieur du gel puis le gel est éliminé avec un mélange d'acétonitrile et d'acide trifluoroacétique), puis l'ajout de la matrice présente le désavantage de diluer les analytes et rend difficile, par exemple, l'analyse de protéines sous-exprimée. Ces dernières sont pourtant celles le plus souvent impliquées dans les dysfonctionnements d'un organisme.

Nous avons donc souhaité valider l'emploi du support de nanofils de silicium pour des études protéomiques. Nous avons pour cela testé la détection de peptides issus de la digestion de la protéine Bovin Serum Albumin (BSA).

La BSA est dissoute dans une solution aqueuse à pH~7 (75 mM de carbonate d'ammonium) pour permettre la réduction des ponts dissulfures (liaisons S-S \rightarrow S-H + S-H) de la BSA par le DiThioThreitol (DTT, de la société Fluka et traité par la trypsin chez Wothington), puis l'alkylation des liaisons thiols (S-H \rightarrow S-C_nH_{2n+1}) de la BSA avec de l'Iodoacétamide (de la société Sigma-Aldrich), et la digestion par la trypsine qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide amine basique (lysine (lys), arginine (arg)) engage sa fonction acide. La trypsine est à 1% (v/v) et la réaction dure 3 h à 37°C.



Figure 3.18. La trypsine coupe la liaison peptidique après l'arginine (Arg) et la lysine (Lys) sauf si ces acides aminés sont suivis par la proline (Pro).¹⁸¹

L'arrêt de la digestion est ensuite obtenu par ajout de 0.1% d'acide trifluoroacétique. L'échantillon de BSA est ensuite dessalé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse (système LC Prep 400 de la société Waters, colonne phase C₁₈ hyperprep hypersil-thermoscientific). Finalement, l'échantillon de BSA est lyophilisé. Des solutions de 0.5 mg/mL sont stockées à -20°C dans des aliquots de 20 µL. La solution à 0.5 mg/mL est ensuite diluée à 700 femtomol/µL dans une solution de citrate d'ammonium à 1 mM.

Au final, le recouvrement de la séquence (ou du nombre de peptides générés par la digestion typique de la BSA) obtenu est de 37% pour une concentration de ces peptides de 700 femtomol/µL (Figure 3.19) en utilisant la banques de données d'ExpASY (Figure 3.20)

ou de Mascot (MatrixScience). Ces 37% de recouvrement permettent une haute fiabilité de reconnaissance de la protéine estimée à 99%, et ce résultat est comparable aux performances obtenues dans la littérature.^{148,182}

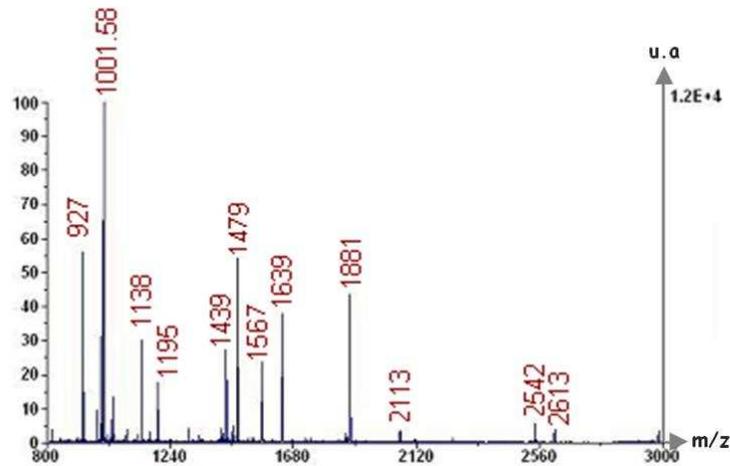


Figure 3.19. Spectre d'analyse de la BSA digérée et diluée à 700 femtomol/μL dans du citrate d'ammonium à 1mM, par LDI-MS sans matrice sur support de nanofils de silicium.

ExPASy Home page Site Map Search ExPASy Contact us Swiss-Prot Proteomics tools

Search for

Aldente version 11/02/2008 [Parameters](#) [Spectrum](#) [Help](#)

Spectrum Peaks 28 / Mass [927.50; 3000.49] / Intensity [1; 1] / pI - / Mw -

Release UniProtKB/Swiss-Prot - Release 56.3 of 14-Oct-2008

Proteins -In range 14738 / After digestion 2264
-First Analysis on 2264 sequences : After alignment 553
-Second Analysis on best 30 of first analysis : After alignment 30 / Displayed 15

Peptides Generated 4516606 / Matching a peak 28566 / Average per protein 306

Statistics Threshold 14.20

Graphical visualisation of the results : [Biograph](#)

Rank	Score	Hits	AC	ID	DE	Mw	pI	Cov	TaxId
					40 first characters	kDa		%	
1	167.14	19	P02769	ALBU_BOVIN (C_1)	Serum albumin.	66	5.6	37	9913
2	10.31	8	P14639	ALBU_SHEEP (C_1)	Serum albumin.	66	5.6	15	9940
3	8.20	7	Q6IMF1	K2C80_RAT (C_1)	Keratin, type II cytoskeletal 80.	51	5.9	25	10116
4	7.17	6	P08835	ALBU_PIG (C_1)	Serum albumin.	67	5.8	13	9823
5	6.57	6	P49064	ALBU_FELCA (C_1)	Serum albumin.	66	5.3	11	9685
6	6.30	5	Q61655	DD19A_MOUSE (C_1)	ATP-dependent RNA helicase DDX19A.	54	6.3	15	10090
7	5.98	6	Q60989	BIRC4_MOUSE (C_1)	Baculoviral IAP repeat-containing protei...	56	5.7	13	10090
8	5.91	6	P35240-8	MERL_HUMAN (V_8)	Isoform 8 of Merlin OS=Homo sapiens GN=N...	65	6.2	14	9606
9	5.70	6	Q9ERD6	RGPS2_MOUSE (C_1)	Ras-specific guanine nucleotide-releasin...	66	8.8	13	10090
10	5.64	6	Q9QZL6	UBP21_MOUSE (C_1)	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 21...	63	9.9	12	10090
11	4.71	5	Q7L945	ZN627_HUMAN (C_1)	Zinc finger protein 627.	53	9.2	13	9606
12	4.62	5	Q6DTY7-6	F264_MOUSE (V_6)	Isoform 6 of 6-phosphofructo-2-kinase/fr...	50	5.6	11	10090
13	4.62	5	Q70342	NPY5R_MOUSE (C_1)	Neuropeptide Y receptor type 5.	53	9.2	17	10090
14	4.15	7	Q8C4J0	CCD60_MOUSE (C_1)	Coiled-coil domain-containing protein 60...	63	9.7	14	10090
15	4.04	6	Q49A17-2	GLT17_HUMAN (V_2)	Isoform 2 of Putative polypeptide N-acet...	68	6.8	12	9606

P02769 ALBU_BOVIN (C_1) Up

Serum albumin.

UniProtKB/Swiss-Prot : [9913](#)

Score Mw pI Hits Coverage Shift (Da) Slope (ppm)
 167.14 66433 5.59 19 37% -0.035 29

Exp	Theo	Intensity	Delta	Dev	MC	Modifs	Position	Sequence
Da	Da	% rank	Da ppm	ppm		CAM MSO PTM	start end	
927.504	927.493	1 100 1	0.01 11	18	-	- - -	161 - 167	YLYEIIAR
975.524	975.540	1 100 1	-0.02 -16	-11	1	1/1 -	221 - 228	LRCASIQK
1001.571	1001.589	1 100 1	-0.02 -17	-13	1	- -	233 - 241	ALKAWSVAR
1072.498	1072.509	1 100 1	-0.01 -10	-7	-	1/1 -	310 - 318	SHCIAEVEK
* 1138.505	1138.498	1 100 1	0.01 6	6	-	2/2 -	499 - 507	CCTESLVNR
1195.600	1195.589	1 100 1	0.01 9	8	1	1/1 -	223 - 232	CASIQKFGER
1305.730	1305.716	1 100 1	0.01 11	7	-	- - -	402 - 412	HLVDEPQNLIK
1419.693	1419.694	1 100 1	-0.00 0	-5	-	1/1 -	89 - 100	SLHTLFGDELCK
1439.804	1439.812	1 100 1	-0.01 -5	-10	1	- -	360 - 371	RHPEYAVSVLLR
1443.673	1443.642	1 100 1	0.03 21	15	-	1/1 -	286 - 297	YICDNQDTISSK
1468.774	1468.766	1 100 1	0.01 6	0	2	- -	25 - 36	DTHKSEIAHRFK
1479.789	1479.795	1 100 1	-0.01 -3	-10	-	- - -	421 - 433	LGEYGFQNALIVR
1532.776	1532.781	1 100 1	-0.00 -2	-9	1	2/2 -	298 - 309	LKECCDKPLEEK
1567.791	1567.743	1 100 1	0.05 31	23	-	- - -	347 - 359	DAFLGSLFLYEYSR
1639.946	1639.938	1 100 1	0.01 5	-3	1	- -	437 - 451	KVPOVSTPTLVEVSR
1880.919	1880.921	1 100 1	-0.00 0	-12	-	1/1 -	508 - 523	RPCFSALTPDETYVPK
2541.225	2541.167	1 100 1	0.06 23	6	2	1/1 -	118 - 138	QEPERNECFLSHKDDSPDLFK
2612.187	2612.165	1 100 1	0.02 8	-7	2	3/3 -	264 - 285	VHKECCHGDLLECADDRADLAK
3000.485	3000.401	1 100 1	0.08 28	10	1	3/3 -	499 - 523	CCTESLVNRRRPCFSALTPDETYVPK

```

1 -----DTHKSE IAHRFKdlge ehfkgvlvia fsqylqqcpf dehvklvnel tefaktcvad
81 eshagcekSL HTLFGDELCK vaslretygd madccekQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKlk pdpntLcdef kadekktwgk
161 YLYEIIARrhpyfyapellly ankynqvfqecqqaedkgac llpkietmre kvlassarqr LRCASIQKFG ERALKAWSYA
241 Rlsqkfpkaefvevtklvtd ltkVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE CCDKPLEKES HCIAEVEKda
321 ipenlplpta dfaedkdvck nyqeakDAFL GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL Rlakeyeatl eeccakDDPH ACYSTVFDKL
401 kHLVDEPQNL IKqncdqfek LGEYGFQNAL IVRYtrKVPQ VSTPTLVEVS Rslgkvgrtc ctkpesermp ctedylslil
481 nrlcvlhekt pvsekvtkCC TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKafdekif tfhadictlp dtekqikkqt alvellkhhp
561 kateeqlktv menfvafvdk ccaaddkeac favegpklvv stqtal
    
```

Link to other ExPASy tools

Original spectrum [FindMod](#) [GlycoMod](#) [FindPept](#) [PeptideMass](#)
 Recalibrated spectrum [FindMod](#) [GlycoMod](#) [FindPept](#)

Figure 3.20. Résultats de comparaison des valeurs des pics du spectre de la BSA digérée et diluée à 700 femtomol/μL dans du citrate d'ammonium à 1 mM, avec les valeurs des pics de la banque de données d'ExPASy.

3.3. Conclusion

Nous avons donc optimisé un support de nanofils de silicium pour des analyses LDI-MS et testé ces performances en terme de détection de petites molécules et d'échantillons protéomiques. Par ailleurs, la synthèse de ce support est rapide, simple et peu couteuse. Par la suite, nous avons tenté d'optimiser les analyses LDI-MS en testant un autre type de support : des nanotubes de TiO₂.

4. Analyses LDI-MS sur nanotubes de TiO₂ sans matrice.

4.1. TiO₂ et MALDI.

La chimie de surface de TiO₂ a fait l'objet d'une très vaste revue écrite par Diebold en 2003.¹⁸³ Le TiO₂ trouve des applications dans un grand nombre de domaines, comme la catalyse hétérogène, la photocatalyse (réduction de l'eau par le TiO₂), la microélectronique (superconductivité du TiO₂), la pigmentation des matériaux, ou encore dans l'industrie agroalimentaire (en tant que pigment blanc).

En spectrométrie de masse MALDI, le TiO₂ est un matériau qui présente un grand potentiel, surtout utilisé pour capter spécifiquement les phosphopeptides d'un échantillon biologique. Cette propriété est très intéressante puisque la phosphorylation est un processus biochimique régulant l'activité d'une protéine, pouvant impliquer des modifications post-traductionnelles, et différentes cascades de réactions biochimiques (enzyme de réaction). Ce procédé permet donc de détecter les phosphopeptides d'une protéine exprimée et suivant le type et la quantité de phosphopeptides détectés, il est possible de déterminer si la protéine est saine ou non. Le principe de la sélectivité des phosphopeptides par le TiO₂ repose sur le principe de la chromatographie par affinité métallique (IMAC).^{184,185}

Par ailleurs, Bi et al.¹⁹³ ont montré que des nanotubes de TiO₂ peuvent être utilisés comme supports pour la LDI-MS sans matrice. La propriété de sélectivité du TiO₂ peut donc permettre d'immobiliser les phosphopeptides d'un mélange de peptides d'une protéine digérée sur les nanotubes de TiO₂ et après rinçage des peptides non phosphorylés, les peptides phosphorylés pourraient ainsi être directement observés en LDI-MS sans matrice.¹⁸⁶ Il reste néanmoins difficile de désorber ces phosphopeptides en LDI-MS sans matrice. Bi et al.¹⁹³ ont simplement récupéré les phosphopeptides immobilisés sur TiO₂ en solution basique, puis ils ont redéposé les phosphopeptides avec la matrice pour une analyse MALDI. Ces étapes pourraient entraîner la perte de certains peptides, c'est pourquoi il serait intéressant de trouver un moyen de diminuer l'énergie d'interaction entre le TiO₂ et les phosphopeptides (après l'étape de rinçage des autres peptides) de manière à réaliser une analyse directe en LDI-MS sans matrice.

Dans un premier temps, nous avons évalué les performances d'un support de nanotubes de TiO₂ pour l'analyse de biomolécules en LDI-MS sans matrice.

4.2. Optimisation et performances de la LDI-MS sur nanotubes de TiO₂ sans matrice

Les analyses LDI-MS sans matrice sur nanotubes de TiO₂ ne sont pas nombreuses et la sensibilité de détection reportée dans la littérature est limitée à 700 femtomol/μL.¹⁹³ Nous avons voulu optimiser les analyses LDI-MS sur des nanotubes de TiO₂. De la même manière que l'étude réalisée sur les nanofils de silicium, nous avons varié les diamètres et les longueurs des nanotubes de TiO₂. Nous avons testé leur efficacité en LDI-MS et déterminé la limite de détection de biomolécules standards avec le meilleur des supports.

4.2.1. Préparation des nanotubes de TiO₂

Les supports de nanotubes de TiO₂ sont préparés par anodisation électrochimique (potentiostat de haut voltage, Jaissle IMP 88 PC, configuration conventionnelle de 3 électrodes avec une jauge de platine comme contre électrode et une électrode de référence Haber-Luggin capillaire avec Ag/AgCl, 1 M KCl) d'une feuille de titane (125 μm d'épaisseur, pureté 99.6%, Advent). La feuille de titane est d'abord nettoyée à l'acétone, rincée à l'isopropanol, le méthanol, puis l'eau déionisée, et finalement séchée sous flux d'azote. Les conditions d'anodisation permettant d'obtenir différentes morphologies de nanotubes de TiO₂ sont présentées dans le Tableau 3.5.

Echantillon	Anodisation	Recuit
longueur 0.5 μm – Amorphe ¹⁸⁷	20 V for 2 h in 1 M H ₃ PO ₄ + 0.3 wt% HF	-
longueur 0.5 μm – Anatase ¹⁸⁸		450°C for 1h
longueur 1 μm – Amorphe ¹⁸⁹	20 V for 2 h in 1 M NaH ₂ PO ₄ + 0.3 wt% HF	-
longueur 1 μm – Anatase ¹⁸⁹		450°C for 1h
longueur 2 μm – Amorphe ¹⁹⁰	20 V for 6 h in Glycerol + Water (50:50 vol. %) + 0.27 M NH ₄ F	-
longueur 2 μm – Anatase ¹⁹¹		450°C for 1h

Tableau 3.5. Conditions d'anodisations d'une feuille de titane pour obtenir des nanotubes de TiO₂ de différentes morphologies.

Après anodisation, les échantillons sont rincés à l'eau déionisée et séchés sous flux d'azote. Pour obtenir les nanotubes de TiO₂ sous la forme cristalline anatase, il faut effectuer un recuit à 450°C durant 1 heure avec une montée et une descente en température de

30°C/min (Four Rapid Thermal Annealer – Jipelec Jet First 100).¹⁹² Les images MEB des trois types de morphologie de nanotubes de TiO₂ obtenues sont présentées en Figure 3.21.

Les nanotubes ont tous un diamètre de l'ordre de 100 nm (\pm 10 nm) avec une taille des parois de 10 nm (\pm 2 nm) et trois longueurs différentes sont obtenues selon les conditions d'anodisation.

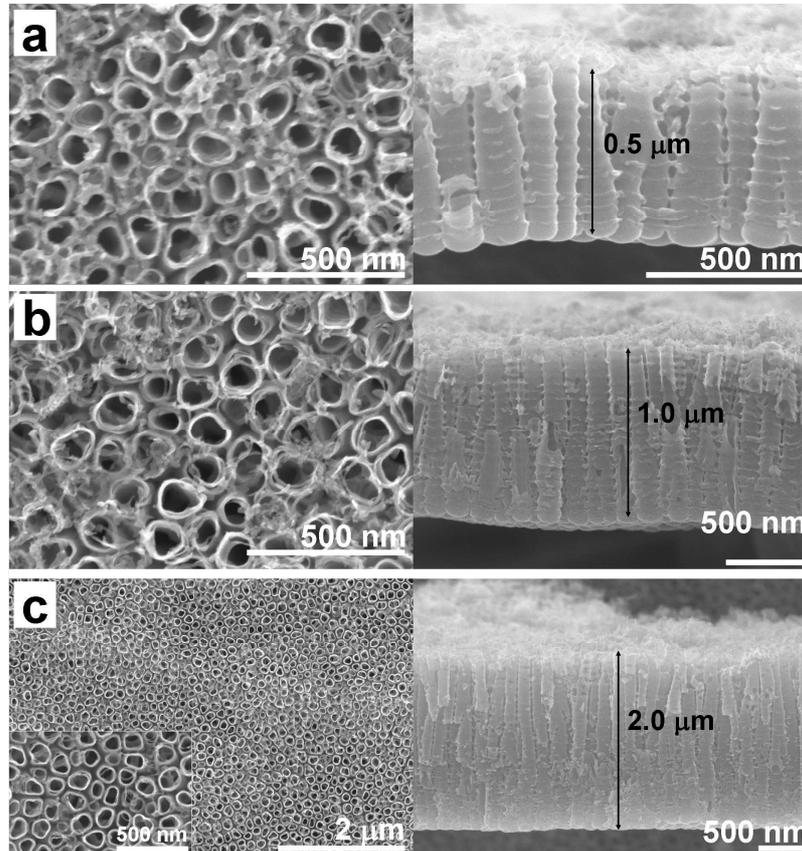


Figure 3.21. Images MEB des différents supports de nanotubes de TiO₂ testés pour les analyses LDI-MS.

Les nanotubes de TiO₂ ainsi synthétisés sont superhydrophiles et une goutte d'1 μ L de biomolécules s'étale sur 4mm. Nous avons donc fonctionnalisé les nanotubes de TiO₂ avec l'OTS ; la surface présente alors un angle de contact de 160°. Pour un dépôt homogène des biomolécules, nous réduisons ensuite l'angle de contact jusqu'à 120° en exposant la surface 5 minutes à l'UV/ozone.

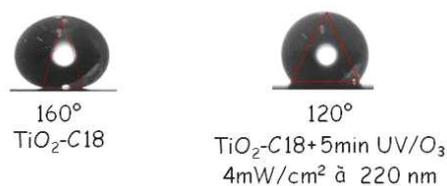


Figure 3.22. Angle de contact d'une goutte d'1 μ l d'eau sur une surface de nanotubes de TiO₂ silanisée par OTS avant (gauche) et après irradiation UV/ozone (droite).

4.2.2. Résultats en LDI-MS sur nanotubes de TiO₂.

Avant tout, les feuilles de titane n'ayant qu'une épaisseur de 125 µm, nous avons dû fixer celles-ci à la plaque MALDI à l'aide de deux épaisseurs de scotch ((Standard Carbon Adhesive Tabs, 25 mm, Electron Microscopy Science) afin d'obtenir un signal de désorption/ionisation. La plaque est ensuite insérée dans la source et il est nécessaire d'effectuer une petite calibration pour la précision des masses détectées lors des analyses.

Par ailleurs, nous avons remarqué que contrairement au support des nanofils de silicium qui nécessitent une intensité laser de l'ordre de celle utilisée pour la matrice dans le cas du MALDI, le support des nanotubes de TiO₂ requiert une intensité laser plus élevée pour la désorption/ionisation laser de biomolécules. Luo et al. ont montré que selon la morphologie des supports, l'intensité laser requise est plus ou moins importante et supposent qu'elle peut changer selon le type de matériau utilisé.¹⁵⁷ Ici, les trois supports de morphologies différentes ont nécessité une intensité du même ordre pour un signal optimal.

Les meilleurs résultats en termes de reproductibilité et de sensibilité ont été obtenus pour les nanotubes de plus petite longueur (0.5 µm) de la Figure 3.21.

La limite de détection pour l'analyse du mélange des peptides (dans 1mM de citrate d'ammonium, pH=6, mode de détection des ions positifs) standards suivants : des-arg¹-bradykinin (MW 904.5), angiotensin I (MW 1295.7), glu¹-fibrinopeptide B (MW 1570), et neurotensin (MW 1672.9) est de 25 femtomol/µL (Figure 3.23), ce qui est 28 fois plus sensible que les analyses réalisées dans la littérature jusqu'à maintenant.¹⁹³

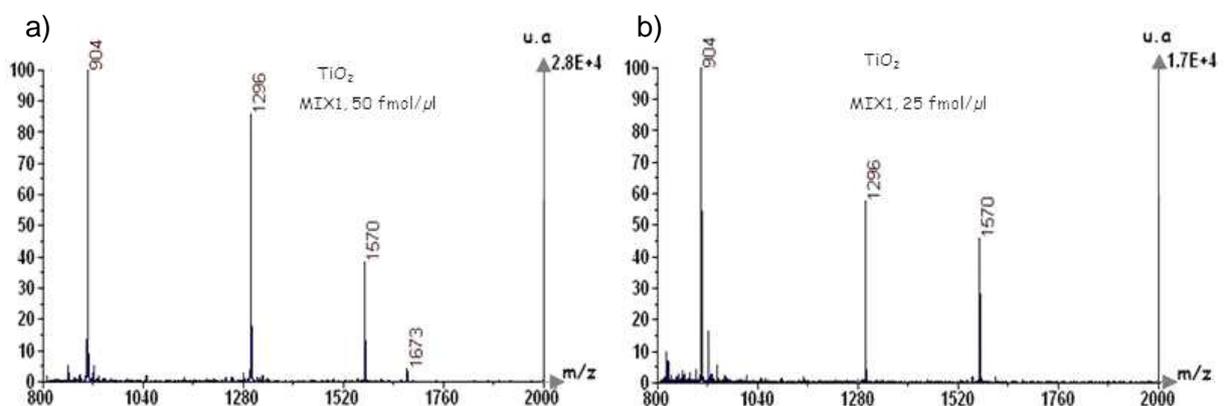


Figure 3.23. Spectres obtenus en LDI-MS avec le support de nanotubes de TiO₂ optimal pour l'analyse de peptides standards dilués à 50 femtomol/µL en a) et à 25 femtomol/µL en b) dans une solution aqueuse de citrate d'ammonium à 1mM. NB : La neurotensin est 5 fois plus diluée dans le mélange, sa limite de détection sur le spectre de gauche est donc de 10 femtomol/µL.

Les nanotubes de TiO_2 permettent aussi une détection sensible des molécules de petite masse. La Figure 3.25 montre le spectre de masse du verapamil en concentration 500 fmol/ μL obtenu en analyse LDI-MS sur nanotubes de TiO_2 et en MALDI (matrice DHB, 10 mg/ml 50% acetonitrile dans 0.1% de TFA). L'intensité du signal est nettement plus importante et il y a peu de pics parasites lorsqu'on utilise les nanotubes de TiO_2 sans matrice qu'avec la méthode classique MALDI. Il en est de même pour la détection du sutent ($m/z=399$).

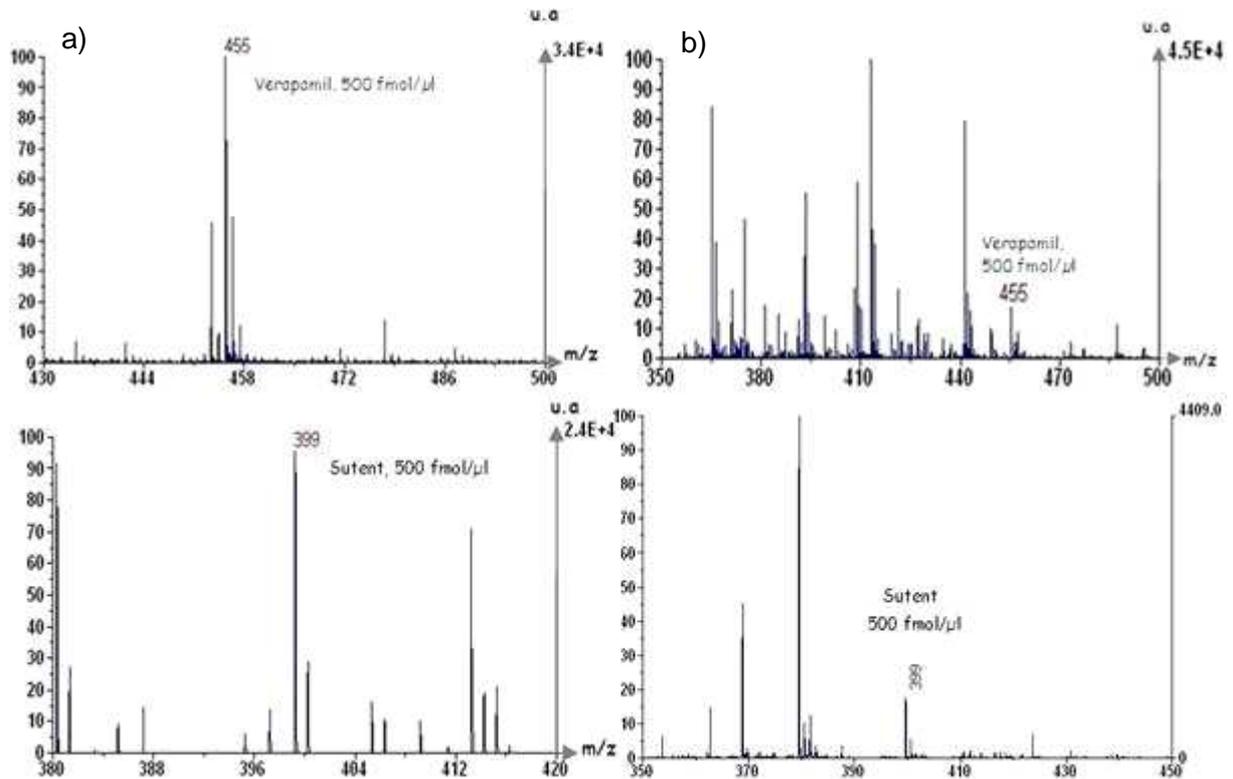


Figure 3.24. Spectres de masse obtenus a) en LDI-MS sur nanotubes de TiO_2 , b) en MALDI pour la détection du verapamil ($m/z = 455$) et du sutent ($m/z=399$) à 500 fmol/ μL .

La limite de détection du verapamil peut atteindre 50 fmol/ μL (Figure 3.25) en LDI-MS sur nanotubes de TiO_2 alors qu'elle est de 500 fmol/ μL pour le MALDI (Figure 3.24).

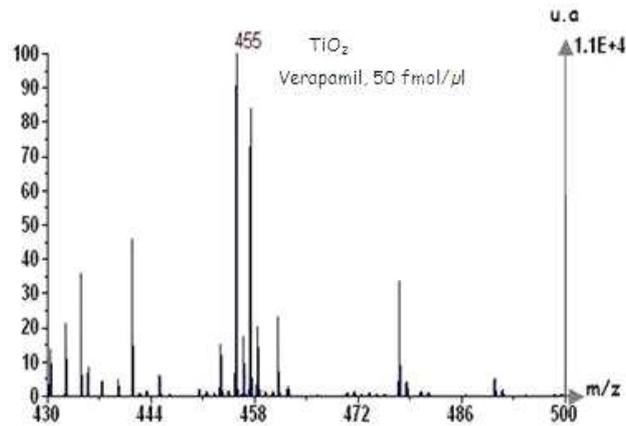


Figure 3.25. Spectres de masse obtenus en LDI-MS sur nanotubes de TiO_2 pour la détection du Verapamil ($m/z = 455$) à $50 \text{ fmol}/\mu\text{l}$.

Les pics parasites observés lorsque l'on diminue la concentration du verapamil semble provenir de pollutions atmosphériques, comme c'est le cas en LDI-MS sur nanofils de silicium. La sensibilité de détection du support de nanotubes de TiO_2 optimal est cependant inférieure à celle du support de nanofils de silicium optimal.

Comme pour les nanofils de silicium, il est possible qu'il y ait un effet de confinement des phonons dans les nanotubes de TiO_2 car Choi et al. ont montré que la diminution de la taille de nanoparticules de TiO_2 entraîne la modification des spectres Raman correspondants.¹⁹⁴

Nous aurions pu penser que le support de nanotubes de TiO_2 sous forme cristalline anatase serait plus efficace pour les analyses LDI-MS puisque les phonons se propagent plus facilement dans une structure cristalline que dans une structure amorphe, mais les supports de nanotubes de TiO_2 amorphe et cristallins ont présenté des performances similaires.

5. Conclusion

Depuis la mise en place du MALDI, son mécanisme fait l'objet de nombreuses controverses (Chapitre 1 .4.2) et demeure assez complexe. De même, les performances des analyses LDI-MS sur supports de silicium micro/nanostructurés sont difficilement interprétables.

Nous avons regardé de plus près le mécanisme de LDI-MS sur les nanofils de silicium en examinant l'effet de plusieurs paramètres : la morphologie des nanofils de silicium, leur chimie de surface, leur propriétés optique et thermique. Il en ressort tout d'abord l'importance de maximiser le nombre d'analytes accessibles au faisceau laser lors du procédé de désorption/ionisation. La modification des nanofils de silicium par des silanes hydrophobes a

clairement permis de limiter l'infiltration des analytes et favorisé leur distribution sur le haut des nanofils. Nos résultats montrent que plusieurs types de revêtements « hydrophobes » conviennent alors que varier la morphologie nous a permis de déterminer un support optimal pour les analyses LDI-MS. Effectivement, nos résultats rejoignent la littérature sur le fait que la morphologie des nanofils de silicium est un paramètre critique et semblent indiquer, de plus, un rôle prédominant du facteur de densité des nanofils.

Par ailleurs, les caractéristiques de réflectivité et de photoluminescence quasi-nulles des nanofils de silicium nous amènent à considérer le mécanisme photothermique de transfert d'énergie des nanofils de silicium aux analytes, celui-ci étant potentiellement induit par le confinement des phonons dans les nanofils de silicium. Nous avons décrit quelques études qui pourraient étayer un peu plus cet effet, ainsi que des perspectives pour avancer vers la compréhension de l'effet de la morphologie des nanofils de silicium sur l'efficacité des analyses LDI-MS.

Les applications de la LDI-MS sans matrice sont de plus en plus nombreuses et avantageuses. Le support de nanofils de silicium optimal est issu d'une synthèse de nanofils par voie chimique, qui a l'avantage d'être très simple, peu couteuse et rapide. Ce support présente de plus une sensibilité de détection LDI-MS de molécules de faibles poids moléculaire de l'ordre de 5 femtomol/ μ L, et de l'ordre de 700 femtomol/ μ L pour un mélange de peptides issues de la digestion d'une protéine, avec une reconnaissance de la protéine de 99%.

Enfin, nous avons testé des nanotubes de TiO_2 comme support pour la LDI-MS. Il présente un potentiel pour la détection fine de phosphopeptides. Le support optimal s'est révélé légèrement moins performant que le support de nanofils de silicium et il serait intéressant d'étudier d'autres types de morphologies de nanotubes.

Finalement, il faut évaluer les capacités et limitations de chaque structure pour choisir la meilleure combinaison des outils pour des analyses rapides et de qualité. Nous allons voir que dans notre cas, le support de nanofils de silicium optimal pour les analyses LDI-MS est avantageux car sa fabrication est simple, rapide et peu couteuse et il ouvre des perspectives dans le développement de laboratoires sur puce.

6. Bibliographie

- ¹³⁴ Afonso, C.; Budimir, N.; Fournier, F.; Tabet, J.C. "Activated Surfaces for Laser Desorption Mass Spectrometry: Application for peptides and protein analysis". *Current Pharmaceutical Design*. **2004**, 10.
- ¹³⁵ Trauger, S. A.; Go, E. P.; Shen, Z.; Apon, J. V.; Compton, B. J.; Bouvier, E. S. P.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. "High sensitivity and analyte capture with desorption/ionization on silylated porous silicon". *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4484-4489.
- ¹³⁶ Castellana, E.T.; Russell, D.H. "Tailoring Nanoparticle Surface Chemistry to Enhance Laser Desorption Ionization of Peptides and Proteins". *NanoLett.* **2007**, 7, 3023-3025.
- ¹³⁷ Huang, Y.F.; Chang, H.T. "Analysis of Adenosine Triphosphate and Glutathione through Gold Nanoparticles Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry" *Anal.Chem.* **2007**, 79, 4852-4859.
- ¹³⁸ Su, C.L.; Tseng, W.L. "Gold Nanoparticles as Assisted Matrix for Determining Neutral Small Carbohydrates through Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry" *Anal.Chem.* **2007**, 79, 1626-1633.
- ¹³⁹ Hua, L.; Information, C.; Chen, J.; Ge, L.; Tan, S.N. "Silver nanoparticles as matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides". *J.Nanopart.Res.* **2007**, 9, 1133-1138.
- ¹⁴⁰ Sherrod, S.D.; Diaz, A.J.; Russell, W.K.; Cremer, P.S.; Russell, D.H. "Silver Nanoparticles as Selective Ionization Probes for Analysis of Olefins by Mass Spectrometry". *Anal.Chem.* **2008**, 80, 6796-6799.
- ¹⁴¹ Seino, T.; Sato, H.; Yamamoto, A.; Nemoto, A.; Torimura, M.; Tao, H. "Matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry using self-assembled germanium nanodots" *Anal.Chem.* **2007**, 79, 4827-4832.
- ¹⁴² Hu, L.; Xu, S.; Pan, C.; Yuan, C.; Zou, H.; Jiang, G. "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry with a Matrix of Carbon Nanotubes for the Analysis of Low-Mass Compounds in Environmental Samples" *Environ.Sci.Technol.* **2005**, 39, 8442-8447.
- ¹⁴³ Xu, S.; Li, Y.; Zou, H.; Qiu, J.; Guo, Z.; Guo, B. "Carbon Nanotubes as Assisted Matrix for Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry" *Anal.Chem.* **2003**, 75, 6191-6195.
- ¹⁴⁴ Kawasaki, H.; Yonezawa, T.; Watanabe, T.; Arakawa, R. "Platinum Nanoflowers for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules" *J.Phys.Chem.C* **2007**, 111, 16278-16283.
- ¹⁴⁵ Kang, M. J.; Pyun, J. C.; Lee, J. C.; Choi, Y. J.; Park, J. H.; Park, J. G.; Lee, J. G.; Choi, H. J. "Nanowire-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry for quantitative analysis of small molecules" *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2005**, 19, 3166-3170.
- ¹⁴⁶ Nayak, R.; Knapp, D.R. "Effects of Thin-Film Structural Parameters on Laser Desorption/Ionization from Porous Alumina" *Anal.Chem.* **2007**, 79, 4950-4956.

- ¹⁴⁷ Najam-ul-Haq, M.; Rainer, M.; Huck, C.W.; Hausberger, P.; Kraushaar, H.; Bonn, G.n.K. "Nanostructured Diamond-Like Carbon on Digital Versatile Disc as a Matrix-Free Target for Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* **2008**, 80, 7467–7472.
- ¹⁴⁸ Tsao, C.-W.; Kumar, P.; Liu, J.; DeVoe, D. L. "Dynamic electrowetting on nanofilament silicon for matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry". *Anal. Chem.* **2008**, 80, 2973-2981.
- ¹⁴⁹ Luo, G.; Chen, Y.; Siuzdak, G.; Vertes, A. "Surface Modification and Laser Pulse Length Effects on Internal Energy Transfer in DIOS". *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 24450-24456
- ¹⁵⁰ Shen, Z.; Thomas, J. J.; Averbuj, C.; Broo, K. M.; Engelhard, M.; Crowell, J. E.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. "Porous Silicon as a Versatile Platform for Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* **2001**, 73, 612-619
- ¹⁵¹ Li, X.; Bohn, P. W. "Metal-Assisted Chemical Etching in HF/H₂O₂ Produces Porous Silicon". *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 77, 2572-2574
- ¹⁵² Chen, Y.; Vertes, A. "Adjustable Fragmentation in Laser Desorption Ionization from Laser-Induced Silicon Microcolumn Arrays". *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5835-5844
- ¹⁵³ Finkel, N. H.; Prevo, B. G.; Velez, O. D.; He, L. "Ordered Silicon Nanocavity Arrays in Mass Spectrometry". *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1088-1095
- ¹⁵⁴ Street, R. A.; Qi, P.; Lujan, R.; Wong, W. S. "Reflectivity of disordered silicon nanowires". *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93, 163109
- ¹⁵⁵ Alimpiev, S.; Nikiforov, S.; Karavanskii, V.; Minton, T.; Sunner, J. "On the mechanism of laser-induced desorption–ionization of organic compounds from etched silicon and carbon surfaces" *J.Chem.Phys.* **2001**, 115,1891-1901.
- ¹⁵⁶ Kruse, R. A.; Li, X.; Bohn, P. W.; Sweedler, J. V. "Experimental Factors Determining the Efficiency of Analyte Ion Generation in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry on Porous Silicon". *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3639-3645.
- ¹⁵⁷ Luo, G.; Chen, Y.; Daniels, H.; Subrow, R.; Vertes, A. "Energy transfer in laser desorption/ionization from silicon nanowires". *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 13381-13386.
- ¹⁵⁸ Takagahara, T.; Takeda, K. "Theory of the quantum confinement effect on excitons in quantum dots of indirect-gap materials". *Phys. Rev. B* **1992**, 46, 15578-15581
- ¹⁵⁹ Gelloz, B.; Coffinier, Y.; Salhi, B.; Koshida, N.; Patriarche, G.; Boukherroub, R. "Synthesis and Optical Properties of Silicon Oxide Nanowires". *Mater. Res. Soc. Proc.* **2007**, 958, L05-10
- ¹⁶⁰ Scheel, H.; Reich, S.; Ferrari, A. C.; Cantoro, M.; Colli, A.; Thomsen, C. "Raman scattering on silicon nanowires: The thermal conductivity of the environment determines the optical phonon frequency". *Appl. Phys. Lett.* **2006**, 88, 233114-233113.
- ¹⁶¹ Roussel, P.; Lysenko, V.; Remaki, B.; Delhomme, G.; Dittmar, A.; Barbier, D. "Thick oxidized porous silicon layers for the design of a biomedical thermal conductivity microsensor". *Sensors and actuators A.* **1999**, 74, 100-103

- ¹⁶² Maccagnani, P.; Angelucci, R.; Pozzi, P.; Dori, L.; Parisini, A.; Bianconi, M.; Benedetto G. "Thick porous silicon thermo-insulating membranes". *Sensors and Materials*. **1999**, 11, 131-147
- ¹⁶³ Benedetto, G.; Boarino, L.; Brunetto, N.; Rossi, A.; Spagnolo, R.; Amato, G. "Thermal properties of porous silicon layers". *Philosophical Magazine B*. **1997**, 76, 383-393
- ¹⁶⁴ Hochbaum, A. I.; Chen, R.; Delgado, R. D.; Liang, W.; Garnett, E. C.; Najarian, M.; Majumdar, A.; Yang, P. "Enhanced Thermoelectric Performance of Rough Silicon Nanowires". *Nature*. **2008**, 451, 163-167
- ¹⁶⁵ Brioude, A.; Cornu, D.; Miele, P.; Mouchet, C.; Simonato, J. P.; Rouviere, E. "Effects of p-doping on the thermal sensitivity of individual Si nanowires". *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93, 193105-193103
- ¹⁶⁶ Galopin, E. ; Barbillat, J. ; Coffinier, Y. ; Szunerits, S. ; Patriarche, G. ; Boukherroub, R. "Silicon nanowires coated with silver nanostructures as ultrasensitive interfaces for surface-enhanced Raman spectroscopy". *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2009**, 1 , 7, 1396–1403
- ¹⁶⁷ Hsu, N.Y.; Tseng, S.Y.; Wu, C.Y.; Ren, C.T.; Lee, Y.C.; Wong, C.H. ; Chen, C.H. "Desorption Ionization of Biomolecules on Metals". *Anal Chem*, **2008**, 80, 5203-5210
- ¹⁶⁸ Chalopin, Y.; Gillet, J-N.; Volz, S. "Predominance of thermal contact resistance in a silicon nanowire on a planar substrate". *Physical Review B*. **2008**, 77, 233309.
- ¹⁶⁹ Peng, K.; Yan, Y.; Gao, S.; Zhu, J. "Dendrite-assisted growth of silicon nanowires in electroless metal deposition", *Advanced functional materials*. **2003**, 13, 127-132
- ¹⁷⁰ Xu, T. ; Nys, J.P. ; Grandidier, B. ; Stiévenard, D. ; Coffinier, Y. ; Boukherroub, R. ; Larde, R. ; Cadel, E. ; Pareige, P. "Size and density control of Au-Si islands for the growth of Si nanowires studied by atom probe tomography". *J. Vac. Sci. Technol. B*, 26, 6, **2008**, 1960-1963
- ¹⁷¹ Adu, K.W.; Gutierrez, H.R.; Kim, U.J.; Sumanasekera, G.U.; Eklund, P.C. "Confined phonons in Si nanowires", *Nanoletters* **2005**, 5, 409-414
- ¹⁷² Rivkin, A.; Chou, T.-C.; Danishefsky, S. J. *Angew.* "On the Remarkable Antitumor Properties of Fludelone: How We Got There". *Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2838-2850
- ¹⁷³ Rochfort, S. "Metabolomics reviewed: A new "Omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research". *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1813-1820.
- ¹⁷⁴ Smith, C. A.; Maille, G. O.; Want, E. J.; Qin, C.; Trauger, S. A.; Brandon, T. R.; Custodio, D. E.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. "METLIN: A metabolite mass spectral database". *Therap. Drug Monit.* **2005**, 27, 747-751.
- ¹⁷⁵ Want, E. J.; O'Maille, G.; Smith, C. A.; Brandon, T. R.; Uritboonthai, W.; Qin, C.; Trauger, S. A.; Siuzdak, G. "Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry". *Anal. Chem.* **2006**, 78, 743-752
- ¹⁷⁶ Cohen, L.H.; Gusev, A.I. "Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **2002**, 373, 571-586

- ¹⁷⁷ Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Yoshida, T. "Protein and Polymer Analyses up to m/z 100000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry". *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1988**, 2, 151-153
- ¹⁷⁸ Manley, J. M.; Kalman, M. J.; Conway, B. G.; Ball, C. C.; Havens, J. L.; Vaidyanathan, R. "Early amidation approach to 3-[(4-Amido)pyrrol-2-yl]-2-indolinones". *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6447-6450.
- ¹⁷⁹ Patterson, S.D.; Aebersold, R.H. "Proteomics: the first decade and beyond." *Nat Genet.* **2003**, 33, 311-323.
- ¹⁸⁰ Source de l'image : Humboldt, *Université de Berlin*.
- ¹⁸¹ Jaspard, E.; Wei, L.; Alhenc-Gelas, F. "Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides". *J Biol Chem.* **1993**, 268, 9496-503.
- ¹⁸² Go, E. P.; Apon, J. V.; Luo, G.; Saghatelian, A.; Daniels, R. H.; Sahi, V.; Dubrow, R.; Cravatt, B. F.; Vertes, A.; Siuzdak, G. "Desorption Ionization on Silicon Nanowires". *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1641-1646
- ¹⁸³ Diebold, U. "The Surface Science of TiO_2 ". *Surface Science Reports.* **2003**, 48, 53-229.
- ¹⁸⁴ Larsen, M. R.; Thingholm, T. E.; Jensen, O.N.; Roepstorff, P.; Jorgensen, T. J. "Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns". *Mol Cell Proteomics.* **2005**, 4, 873-86
- ¹⁸⁵ Reinders, J.; Sickmann, A. "State-of-the-art in phosphoproteomics". *Proteomics.* **2005**, 5, 4052-4061
- ¹⁸⁶ Lo, C. Y.; Lin, J. Y.; Chen, W. Y.; Chen, C. T.; Chen, Y. C. "Surface-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry on Titania Nanotube Arrays". *American Society for Mass Spectrometry.* **2008**.
- ¹⁸⁷ Beranek, R; Hildebrand, H; Schmuki, P. *Electrochem.* "Self-Organized Porous Titanium Oxide Prepared in H_2SO_4/HF Electrolytes." *Solid-State Lett.* **2003**, 6, B12
- ¹⁸⁸ Bauer, S.; Kleber, S.; Schmuki, P. "TiO₂ nanotube: tailoring the geometry". *Electrochem. Commun.* **2006**, 8, 1321.
- ¹⁸⁹ Ghicov, A.; Tsuchiya, H.; Macak, J. M.; Schmuki, P. "Titanium oxide nanotubes prepared in phosphate electrolytes." *Electrochem. Commun.* **2005**, 7, 505.
- ¹⁹⁰ Macak, J. M.; Tsuchiya, H.; Taveira, L. Aldabergerova S, Schmuki P. "Smooth anodic TiO₂ nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7463-7465.
- ¹⁹¹ Kim, D.; Schmidt-Stein, F.; Hahn, R.; Schmuki, P. "Gravity assisted growth of self-organized anodic oxide nanotubes on titanium" *Electrochem. Commun.* **2008**, 10, 1082.
- ¹⁹² Beranek, R.; Tsuchiya, H.; Sugishima, T.; Macak, J.M.; Taveira, L.; Fujimoto, S.; Kisch, H.; Schmuki, P. "Visible Light Photoelectrochemical Response of Carbon-Doped TiO₂ Thin Films Prepared by DC Reactive Magnetron Sputtering" *Appl. Phys. Lett.* **2005**, 87, 243114.

¹⁹³ Bi, H.; Qiao, L.; Busnel, J.M.; Devaud, V.; Girault, H.H. "*TiO₂ Printed Aluminum Foil: Single-Use Film for a Laser Desorption/Ionization Target Plate*". *Anal Chem*, **2009**, 81,3, 1177-1183.

¹⁹⁴ Choi, H, C.; Jung, Y. M.; Kim, S.B. "Size effects in the Raman spectra of TiO₂ nanoparticles". *Vibrational Spectroscopy*. **2004**, 37, 1, 33-38.

Chapitre 4

**Analyses LDI-MS sur nanofils de
silicium pour des applications
biopuce et laboratoire sur puce**

1. Introduction

L'objectif de la conception d'un laboratoire sur puce est d'intégrer sur une puce de quelques cm² des composants ayant les mêmes fonctions qu'un laboratoire traditionnel. La réduction d'échelle permet d'améliorer les temps et les sensibilités d'analyse. Ceci offre, en plus de ces améliorations analytiques attendues, une diminution des volumes d'analyse, une automatisation des mesures, ainsi qu'une réduction des coûts de production. Depuis que Manz a imaginé le concept de laboratoire sur puce en 1990,¹⁹⁵ la miniaturisation des instruments d'analyse en biologie et en chimie connaît un réel essor scientifique et les enjeux sont à la mesure des attentes : diagnostics précoces, allègement des traitements et des analyses, puces intégrées, ou encore compréhension de mécanismes biologiques encore mal connus...

D'un autre côté, les biopuces, issues de la rencontre des techniques de la microélectronique et de la biologie se sont aussi rapidement développées à la fin des années 1990. Il s'agit de dispositifs substrats solides sur lesquels on peut déposer de nombreuses molécules et étudier en parallèle leur réactivité vis-à-vis de différents composés chimiques ou biologiques. Grâce aux évolutions de la génomique et des puces à ADN, il est maintenant possible d'analyser en parallèle des milliers d'ARNm et de déterminer si leur expression est corrélée à une maladie. Cependant, alors que ce sont les protéines qui sont les acteurs majeurs impliqués dans les processus physiologiques, l'étude du génome ne reflète pas nécessairement son expression en protéines dans les cellules. Cela a incité les chercheurs à développer d'autres puces telles que :

- Les puces à peptides impliquées dans l'identification des zones d'interaction protéine-protéine ou anticorps-antigènes.¹⁹⁶
- Les puces à sucres pour la détection et la caractérisation des spécificités d'interaction entre protéines et sucres en prenant pour exemple des molécules d'intérêt médical.¹⁹⁷
- Les puces à protéines pour l'étude des interactions protéines-protéines,¹⁹⁸ protéines-peptides,¹⁹⁹ protéines-phospholipides,²⁰⁰ protéines-cellules.²⁰¹
- Les puces à cellules pour lesquelles les études portent le plus souvent sur un seul type cellulaire dédiées à une analyse fonctionnelle.²⁰²

Ces types de biopuces, en permettant la détection et/ou l'analyse rapide et multiparamétriques ont de nombreuses applications comme les diagnostics d'allergies, de maladies auto-immunes, d'infections ou encore le développement de vaccins. Cependant, la réalisation de ces biopuces demeure plus complexe que celle de puces à ADN : la cellule comprend plus d'un million de protéines différentes, dont certaines en très faibles quantités.

De plus, la nature chimique et la conformation spatiale des protéines les rendent très fragiles et délicates à manipuler.

Les progrès majeurs dans le domaine de la microfluidique, qui ont notamment permis d'intégrer sur puce de nombreuses fonctionnalités des laboratoires (lyse de cellules, hybridation, chromatographie, amplification d'ADN) continuent leur déploiement. Récemment un laboratoire sur puce gérant plus de 1 000 réactions en parallèle a été développé (Figure 4.1).²⁰³

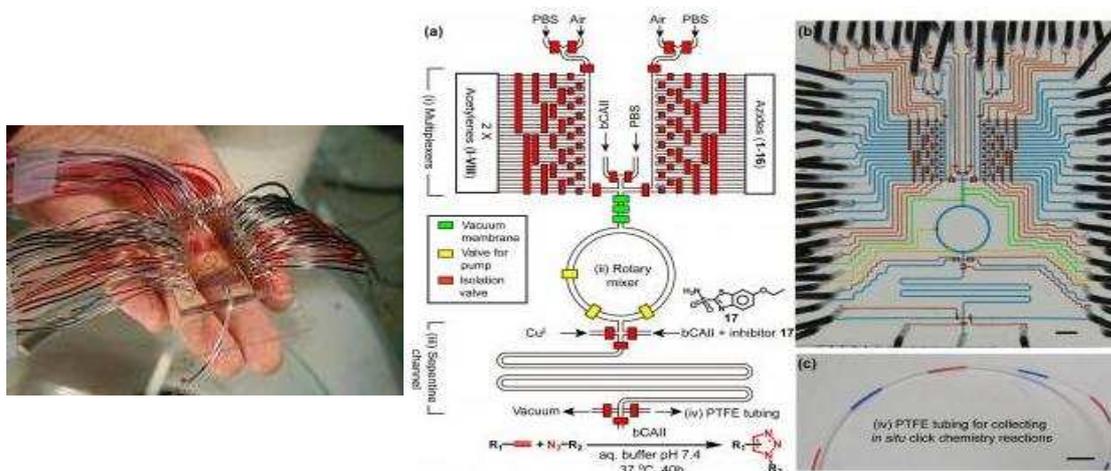


Figure 4.1. Dispositif microfluidique d'un laboratoire sur puce : photo et design.²⁰³

Mise à part leur efficacité pour de nombreux diagnostics, l'enjeu du développement de ces dispositifs est aussi la compréhension du rôle des modifications post-traductionnelles (PTMs) ou des mutations pour ne citer que quelques exemples.

En première partie de ce chapitre, nous montrons comment le support de nanofils de silicium peut être adapté au développement d'une biopuce à peptides. Le support permet plus particulièrement le suivi de la cinétique de la méthylation (qui fait partie des PTMs) de peptides immobilisés sur les nanofils de silicium par analyse LDI-MS. Ce projet a été réalisé en collaboration avec le groupe de chimie des biomolécules dirigé par Oleg Melnyk, de l'Institut de Biologie de Lille.

En seconde partie, nous verrons que le support de nanofils de silicium optimisé pour la désorption/ionisation laser, peut être incorporé comme 'capot' dans un laboratoire sur puce, basé sur la microfluidique par électromouillage sur diélectrique (EWOD). Ce travail a été mené en collaboration avec le groupe BIOMEMS de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN).

2. Suivi de la méthylation de peptides « in situ » sur nanofils de silicium pour le développement d'une biopuce à peptides.

2.1. Principe de la biopuce.

Une biopuce (Figure 4.2) est constituée d'un support sur lequel sont déposées des molécules sondes (fragment d'ADN, protéines, ...). Le signal de l'interaction de molécules cibles (fragment de gène complémentaire, ligand spécifique, ...) avec les molécules sondes peut alors être détecté par différentes méthodes (fluorescence, résonance plasmonique,...).

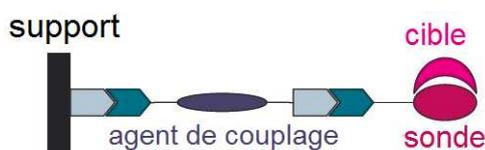


Figure 4.2. Schéma d'une biopuce

L'utilisation de biopuces nécessite donc le contrôle de 3 étapes majeures : leur préparation, l'immobilisation des molécules cibles, puis la qualité de détection des signaux. Nous optimisons ici la préparation de biopuces à peptides méthylés.

2.2. La méthylation.

La méthylation est la substitution d'un proton par un groupement méthyle. Dans ce travail, nous nous intéressons en particulier à la méthylation des résidus « lysine », et pour être plus précis à la méthylation de la fonction amine epsilon de la lysine présente à l'extrémité de la chaîne latérale de cet acide aminé. Lorsque les chaînes des lysines au sein d'une protéine sont méthylées (Figure 4.3), cela change la plupart du temps les propriétés de la protéine (activité biologique, immunogénicité, stabilité...). Cette PTM des protéines peut donc être à l'origine de divers maladies et cancers.

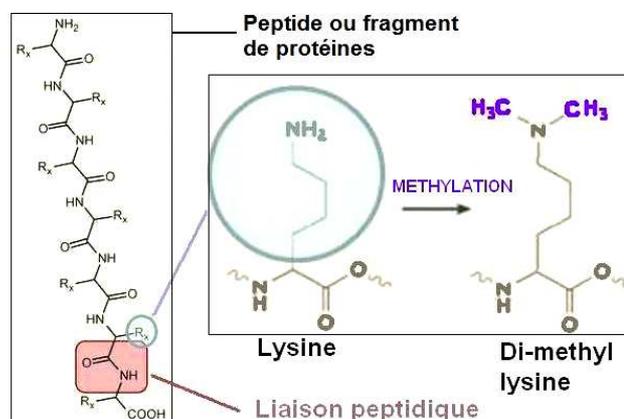


Figure 4.3. Méthylation des chaînes lysines d'un peptide ou d'un fragment de protéine.

2.3. Biopuces à peptides méthylés.

2.3.1. Principe des biopuces à peptides méthylés

La préparation de biopuces à peptides méthylés sur les lysines est un outil intéressant pour les diagnostics médicaux (réponse immunitaire, etc) et pour étudier le rôle de la méthylation dans de nombreux processus biologiques.

Ici, la molécule sonde de la biopuce est le peptide méthylé, qui est aussi en l'occurrence un antigène méthylé. Le fonctionnement de la biopuce est basé sur la reconnaissance antigènes méthylés - anticorps, les anticorps étant les molécules cibles. Il est alors possible de détecter l'interaction antigènes-anticorps grâce à un marqueur fluorescent associé aux anticorps spécifiques. Les anticorps spécifiques aux antigènes méthylés peuvent être obtenus, par exemple, du sérum de souris ayant démontré une réponse immunitaire uniquement à l'antigène méthylé.

Plus précisément dans notre cas, l'antigène qu'on utilise est en fait un fragment de la protéine heparin-binding haemagglutinin²⁰⁴ (HBHA), protéine d'adhérence de la *Mycobacterium tuberculosis*. Cette protéine est donc impliquée dans la dissémination initiale de cette bactérie, mais elle est aussi candidate pour le développement de vaccin contre la tuberculose. La réponse immunitaire à cet antigène est donc est donc étroitement lié à la surface, et convient bien aux études que nous désirons mener avec les biopuces à peptides méthylés.

2.3.2. Préparation des biopuces à peptides méthylés.

Pour la fabrication de cette biopuce, on peut procéder de deux manières : i) dépôt de peptides méthylés sur la biopuce, ii) dépôt de peptides non méthylés puis méthylation in situ sur le support (Figure 4.2) de ces peptides.

Dans ce travail, nous avons retenu la deuxième approche car elle est plus intéressante. Il est en effet nettement plus avantageux et moins coûteux de partir d'une biopuce classique. De plus au niveau pratique, plusieurs modifications autres que la méthylation telles que l'acétylation,²⁰⁵ la formylation,²⁰⁶ la formation de méthylène imine, la biotinylation, la lipoylation ou encore la carboxyméthylation pourront être effectuées à partir d'une même biopuce « mère ».²⁰⁷

2.4. Suivi de la méthylation de peptides adsorbés sur nanofils de silicium par LDI-MS.

Dans le contexte de l'utilisation d'une biopuce « mère », il est primordial de développer une méthode analytique qui permet de caractériser, d'optimiser et de contrôler les modifications chimiques in situ de peptides adsorbés à la surface du substrat. Les nanofils de silicium ont comblé cette attente puisqu'ils permettent à la fois l'immobilisation des peptides à leur surface, leur méthylation in situ, ainsi que l'étude par spectrométrie de masse de la cinétique de la réaction de méthylation (Figure 4.4).

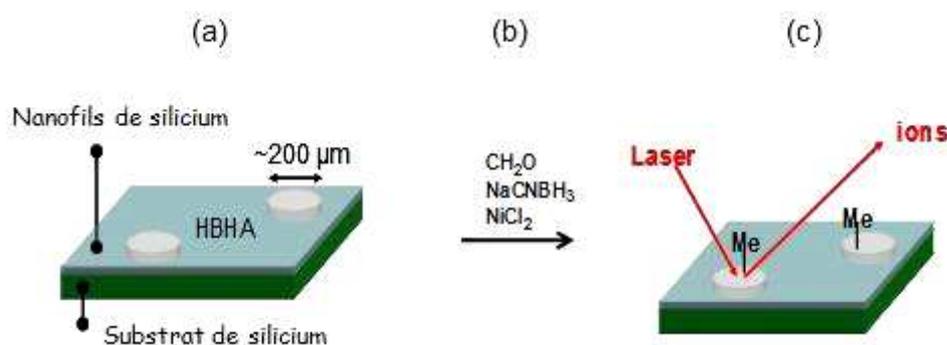


Figure 4.4. (a) Immobilisation des peptides dérivés de la protéine 'HBHA' sur une surface de nanofils de silicium, (b) réaction des peptides avec les agents de méthylation, (c) analyse des peptides méthylés par spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser.

2.4.1. Immobilisation des peptides sur les nanofils de silicium.

Des biopuces à peptides, dérivés de la protéine HBHA, ont déjà été préparées à l'IBL. Pour cela, les peptides ont été immobilisés sur lame de verre par physisorption (lame de verre silanisée par de l'aminopropyltriéthoxysilane, APTES, Chapitre 2 .3.1).^{208,209,210}

Nous avons souhaité immobiliser les peptides sur les nanofils de silicium silanisés par de l'APTES, dans les mêmes conditions. Cependant, les nanofils de silicium ainsi fonctionnalisés par des amines ont présenté une force d'interaction insuffisante avec les peptides : un simple rinçage suffit alors à détacher les peptides de la surface. Bien que le succès de la fonctionnalisation des nanofils par l'APTES soit confirmé par mesures XPS, nous avons vu que les effets de rugosité de surface peuvent influencer les tensions de surface liquide/solide (Chapitre 2 .4). Il n'est pas impossible que cela altère les forces d'interaction entre les molécules chimiques greffées en surface des nanofils de silicium et les peptides adsorbés. Nous verrons par ailleurs au Chapitre 5 .2.2.3 que quelques auteurs ont observé, par exemple, une variation du nombre de protéines adhérees selon la rugosité de la

surface. Ils montrent aussi que les protéines adhérentes sur surfaces rugueuses se décollent plus facilement sous un flux dynamique que les protéines adhérentes sur surface plane.^{251,256}

En conséquence, nous avons développé une autre stratégie d'immobilisation des peptides. Pour cela, la surface de nanofils de silicium a été fonctionnalisée par un octyldiméthylchlorosilane (ODMCS) (Chapitre 2 .3.1). On mesure alors en surface un angle de contact de $105 \pm 2^\circ$ pour une goutte d'eau déionisée d'un microlitre. Nous supposons que l'immobilisation des peptides se fait principalement par interactions apolaires entre les peptides et les chaînes carbonées en surface des nanofils de silicium (forces apolaires - Chapitre 2 .3.2.4). Cette technique d'immobilisation permet de réaliser les étapes de rinçage suite à la réaction de méthylation. Les peptides en concentration 10^{-3} M (solvant aqueux de citrate d'ammonium à 1mM) sont déposés sur la surface sans contact grâce à un appareil piézo-électrique (BCA1, Perkin Elmer, MA, USA). L'espacement entre chaque dépôt de goutte de 333 pL est de 1200 μm . L'avantage de fonctionnaliser les nanofils avec un ODMCS plutôt qu'un APTES est aussi d'améliorer l'efficacité des analyses LDI-MS en limitant l'étalement des gouttes déposées.

2.4.2. Méthylation des peptides in situ: protocole expérimental.

On procède à la méthylation²¹¹ in situ en présence de formaldéhyde (36% w/v solution aqueuse, ACROS Organics), de cyanoborohydrure (NaCNBH_3 , Sigma-Aldrich) et de chlorure de nickel (NiCl_2 , Fluka) :

- Le NiCl_2 est d'abord dilué à 16mg/mL dans une solution de tampon HEPES 0,1 M de pH 7.5 (solution 1). Le NaCNBH_3 est ensuite dilué à 15mg/mL dans la solution 1 (solution 2).
- Le formaldéhyde est dilué 1000 fois dans une solution de tampon HEPES 0,1 M de pH 7.5 (solution 3).

Le support de nanofils de silicium est placé sur une lame de microscope en verre, elle-même insérée dans la base d'une chambre à incubation (Corning Incubation chamber, ref 732-5503, VWR). Les solutions 2 et 3 sont ensuite mélangées en volume 9:1 et ce mélange est directement déposé sur le support de nanofils de silicium, puis recouvert par le capot de la chambre à incubation (Figure 4.5).

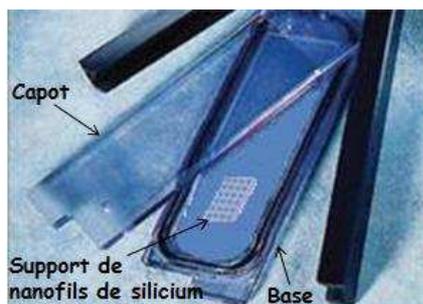


Figure 4.5. Image de la chambre à incubation. Le mélange de méthylation est 'piégé' entre le support de nanofils de silicium et le capot.

Après différents temps de réaction, le support de nanofils de silicium est retiré de la chambre d'incubation, rincé 3 fois dans une solution aqueuse de citrate d'ammonium à 1 mM, puis séché sous un flux d'air.

Au cours de ce traitement chimique, les lysines K du peptide HBHA (séquence H-LPKKAAPAKKAA-NH₂) sont transformées en mono ou di-méthyl lysines, symbolisées par K(Me) ou K(Me₂) respectivement.

Le rôle des ions nickel(II) est de capturer les ions cyanure libérés dans le mélange de méthylation. Cela empêche la formation de sous-produits de cyanométhylation. Ici la concentration en chlorure de nickel ne doit cependant pas être trop élevée car elle peut affecter le S/N des analyses LDI-MS.

2.4.3. Analyse par spectrométrie de masse de la cinétique de méthylation des peptides.

La Figure 4.6 montre que le support de nanofils de silicium permet le suivi de la méthylation des peptides déposés en réseau par des analyses LDI-MS sans matrice.

Le pic correspondant au peptide HBHA perméthylé apparaît au bout de 30 minutes de réaction pour une concentration en formaldéhyde de 0.036 mg/mL dans le mélange de méthylation. Le peptide HBHA perméthylé est l'espèce principale détectée après 120 minutes de réaction. Le degré de méthylation des lysines dépend du temps de réaction mais aussi de la concentration des agents de méthylation. Lorsque la concentration du formaldéhyde est de 0.36 mg/mL dans le mélange de méthylation, le peptide HBHA perméthylé apparaît déjà au bout de 5 minutes de réaction et il devient l'espèce majoritaire après 15 minutes de réaction. La réaction de méthylation des peptides in situ sur les nanofils de silicium est donc réalisée avec succès.

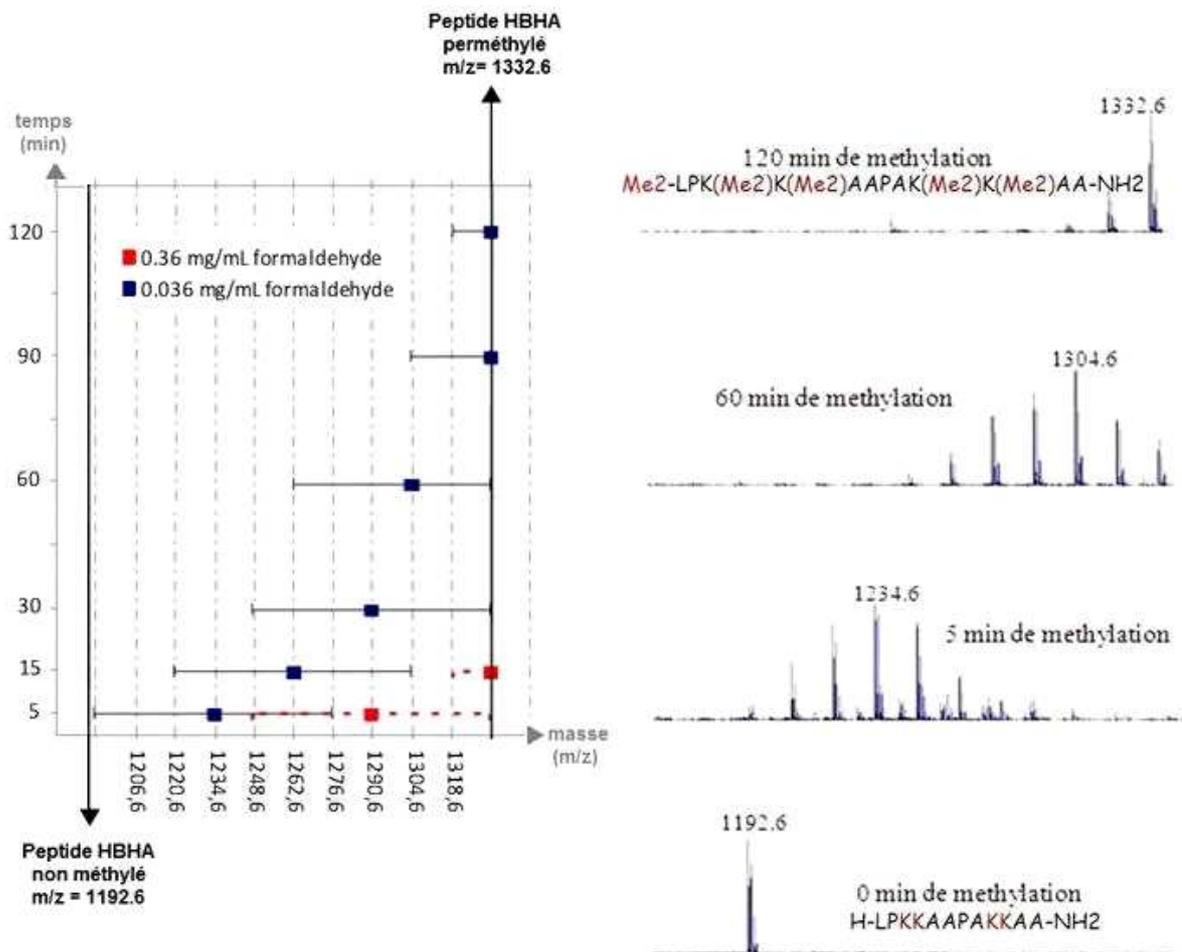


Figure 4.6. Analyses LDI-MS après 5, 15, 30, 60, 90 et 120 minutes de méthylation in situ des peptides HBHA. Le carré indique le pic de plus grande intensité tandis que la barre indique le domaine des ions détectés. Le mode de détection des ions est positif, en mode réflecteur. (Tension d'accélération 20KV, grille d'extraction à 73%, délai d'extraction de 200 ns). Chaque spectre correspond à une moyenne de 50 pulses laser.

2.5. Conclusion

Le support de nanofils de silicium permet de suivre les étapes de méthylation des peptides par analyses LDI-MS. Ce contrôle assure la qualité de conception de cette biopuce à peptides. Une des perspectives de ce travail serait de pouvoir contrôler, grâce à une chimie de méthylation appropriée, le degré (mono ou di) de la méthylation de chaque lysine du peptide. En effet les peptides présentent naturellement des lysines avec différents degrés de méthylation. Il serait donc intéressant de vérifier les étapes de cette chimie par LDI-MS.

3. Laboratoire sur puce pour un déplacement de liquides biologiques par EWOD et une analyse par LDI-MS

Le laboratoire sur puce présenté ici est conçu dans le but de simplifier et de réduire le coût des opérations de prétraitement (digestion trypsique, dessalage, pré-concentration) d'un échantillon brut, contenant des protéines, pour son analyse en spectrométrie de masse. En effet, toutes ces opérations sont, à l'heure actuelle, manuelles ou dans le meilleur des cas gérées par des automates de biochimie, dont le coût est relativement élevé.

L'objectif est donc de pouvoir réaliser toutes ces opérations sur un laboratoire sur puce et de coupler ce dernier à une analyse par spectrométrie de masse. La thèse de François Caron réalisée au sein du groupe BIOMEMS de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie a permis l'élaboration de dispositifs de déplacement de goutte par électromouillage sur diélectrique (EWOD) pour l'analyse de protéines par MALDI.²¹² Ce travail a fait l'objet de deux dépôts de brevet (contrat Biochip Lab en collaboration avec Sanofi Aventis et le CEA).^{213,214} Le dispositif de déplacement de goutte que nous utilisons a été mis en place, caractérisé et optimisé au cours de la thèse de Nicolas Verplanck. L'avantage d'intégrer le support de nanofils de silicium au dispositif est de pouvoir coupler le laboratoire sur puce à des analyses LDI-MS et de s'affranchir du déplacement microfluidique de la matrice, qui se trouve particulièrement ardu étant donné la viscosité des matrices utilisées en MALDI.

3.1. Déplacement de goutte par électromouillage sur diélectrique : EWOD.

Deux domaines constituent la microfluidique : la microfluidique continue et la microfluidique discrète.

La microfluidique continue met en œuvre une architecture fluide basée sur des microcanaux.²¹⁵ Sa technologie et son instrumentation sont bien maîtrisées et elle est sans doute la plus répandue à l'heure actuelle. Cependant, pour de faibles dimensions (< 1 mm), les écoulements au sein de ces microcanaux sont laminaires. La seule diffusion ne permet pas le mélange de deux liquides si ce n'est au bout de temps de réaction longs. D'autre part, la réalisation d'opérations séquencées (par exemple succession de prétraitements par mise en contact avec des surfaces bio-actives) est difficilement envisageable dans ce cadre.

La microfluidique discrète, quant à elle, permet le déplacement de volumes calibrés, sous forme de gouttes dans un environnement d'air ou d'huile. Le principal intérêt de cette technique est la reconfiguration dynamique du trajet des gouttes (cela indépendamment de

la structure du microsysteme) ainsi que la parallélisation de nombreuses opérations à partir d'un seul échantillon scindé en plusieurs gouttes. Des opérations microfluidiques élémentaires telles que l'apport d'analytes ou la scission d'une partie du volume (pour analyse ou pour mise en contact avec un volume voisin) ainsi que des micro brassages pour accélérer le transport de masse en font un véritable micro-laboratoire biologique sur puce (encore appelé *Lab-on-chip*).

Dans le cadre de cette microfluidique discrète, nous employons l'électromouillage sur diélectrique (EWOD). L'effet d'électromouillage sur diélectrique (EWOD) s'observe pour une goutte de liquide conducteur, placée sur une électrode recouverte d'une couche isolante et d'un revêtement hydrophobe. La couche isolante sert à éviter le phénomène d'électrolyse.²¹⁶ L'application d'une tension électrique sur l'électrode entraîne une diminution de l'angle de contact de la goutte (Figure 4.7). Une fois la tension coupée, la goutte reprend sa configuration initiale.

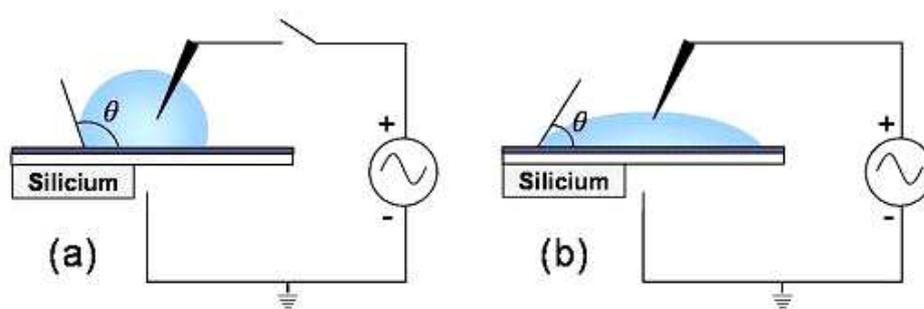


Figure 4.7. Principe de l'EWOD : (a) $V = 0V$, $\theta \sim 115^\circ$ (b) $V \sim 100V$ (à 1kHz), $\theta \sim 70^\circ$.

Lorsqu'une série d'électrodes sont mises successivement sous tension, la goutte se déplace d'électrode en électrode, menant ainsi au principe du déplacement de goutte par électromouillage.^{217,218} Il est possible de manipuler de très faibles volumes de liquides (de l'ordre du nanolitre). La goutte suit le parcours défini par la série d'électrodes et de nombreuses architectures de laboratoire sur puce ont déjà été testées.^{218,219} L'architecture dépend des applications envisagées. On peut citer l'analyse par spectrométrie de masse,^{220,221} la détection par SPR,²²² l'utilisation de liquides ioniques,²²³ les réactions enzymatiques²²⁴ ou les réactions de Polymérase Chain Reaction (PCR).²²⁵

3.2. Le microsystème EWOD.

3.2.1. Capot de nanofils de silicium pour analyses LDI-MS.

Compte tenu de l'application envisagée, le microsystème EWOD comprend deux plans : en plus d'une base sur laquelle est réalisé le réseau d'électrodes, un capot qui sert de contre-électrode (Figure 4.8).

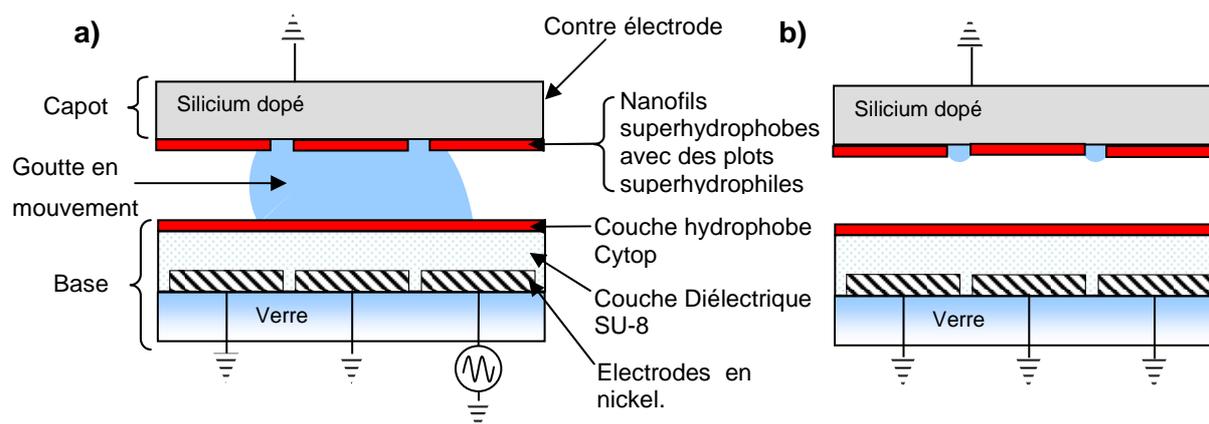


Figure 4.8. Schéma du microsystème EWOD pour le déplacement de microgouttes : a) déplacement d'une goutte (1 μL) entre la base et le capot, b) dépôt de gouttelettes contenant les analytes dans les plots superhydrophiles du capot pour une analyse LDI-MS.

La réalisation de la base consiste en des étapes de lithographie optique, de gravure, et de métallisation.²²⁶

Le capot du microsystème usuel, sans nanofils de silicium, consiste lui, en un substrat de silicium dopé recouvert d'une couche hydrophobe.

La FIGURE 4.8 schématise l'intégration des nanofils de silicium au microsystème : le capot est composé de nanofils de silicium superhydrophobes (termination de surface des nanofils $\text{Si-C}_{18}\text{H}_{37}$) et comporte des plots superhydrophiles (termination de surface des nanofils Si-OH), la taille des plots étant définie lors de l'étape de lithographie optique (Annexe 2-A).

Le principe est de récupérer, après chaque passage de la microgoutte, des gouttelettes contenant les analytes dans ces plots superhydrophiles (Figure 4.8.b). Ceci favorise notamment un dépôt localisé et un confinement des analytes dans les plots ($< 250 \mu\text{m}$) de nanofils de silicium superhydrophiles où seront effectuées les analyses LDI-MS.

Nous choisissons dans un premier temps la morphologie des nanofils de silicium déterminée optimale pour les analyses LDI-MS du Chapitre 3 (Figure 3.6.c).

Les étapes de retrait de la résine optique, de nettoyage et de renouvellement de la base sont essentielles à la qualité et la sensibilité des analyses LDI-MS.

3.2.2. Instrumentation

Le banc de contrôle des électrodes comprend quatre éléments principaux. Un générateur de fonctions basses fréquences CENTRAD GF 265 (ELC, France) délivrant des signaux de 180 mHz à 5 MHz (Figure 4.9.1). Les niveaux de sortie étant trop faibles ($20 V_{cc}$ en circuit ouvert, $10 V_{cc}$ sur 50Ω) pour le déplacement EWOD, il est nécessaire d'ajouter un amplificateur haute tension (TEGAM, USA) de gain 50 (37 dB) (Figure 4.9.2). Ces éléments alimentent une carte 24 relais (hautes tensions et faibles courants) (Figure 4.9.3). Le dernier élément est l'interface PC permettant de contrôler cette carte relais via une carte E/S (μ DAQ 120A, Eagle Technology, Afrique du Sud) pilotée sous LabVIEW 8.2 (National Instruments, USA) (Figure 4.9.4).

Le capot de nanofils de silicium est placé sur un support en téflon spécifique (Figure 4.9.5). La distance entre la base et le capot est assurée selon l'épaisseur de la pièce où est disposé le capot et celle des deux barrettes conductrices qui maintiennent la base et alimentent le réseau d'électrode. La masse est assurée par un câble BNC relié au capot.

Finalement, une caméra (Figure 4.9.6) enregistre et contrôle le déplacement de goutte.

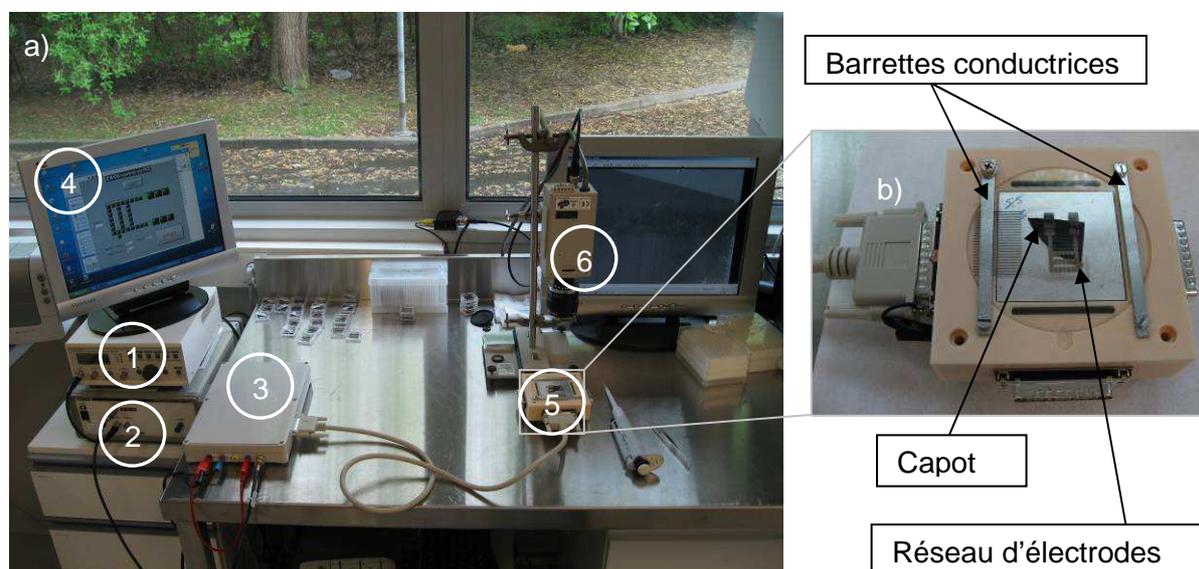


Figure 4.9. Instrumentation EWOD : a) Banc de contrôle des électrodes, b) Microsystème.

3.2.3. Déplacement de goutte et taille des plots.

Les travaux de thèse de Nicolas Verplanck ont montré que les deux microsystèmes dédiés aux applications MALDI et LDI-MS sur nanofils de silicium ont permis d'effectuer les opérations microfluidiques standard et également des déplacements de mélanges de peptides. En exemple, le mélange des peptides standard contenant l'angiotensine II ($M=1046,5$ Da), la bradykinine ($M=1060,5$ Da), la substance P ($M=1347,7$ Da), la ACTH 18-39 ($M=2465,1$ Da) en concentration 1 picomol/ μL dans un solvant d'eau à 0.1% de TFA est déplacé avec succès à vitesse maximale ou tension minimale (Tableau 4.1).

	Microsystème pour MALDI sur capot de silicium hydrophobe (sans plots hydrophiles)	Microsystème pour LDI-MS sur capot de nanofils de silicium superhydrophobes (sans plots superhydrophiles)
$V_{\min}@1\text{kHz et }17\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$	$70V_{\max}$	$62,5V_{\max}$
Vitesse maximale@ $100V_{\max}$	$121\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$	$121\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
Déplacement de matrice HCCA	Non	Non nécessaire
Déplacement de matrice DHB	Oui (à 10mg/mL)	Non nécessaire
Déplacement de mélanges de peptides (à 1picomol/ μL)	Oui	Oui

Tableau 4.1 - Microsystèmes MALDI et LDI-MS. Le gap entre base et capot est de 300 μm .

Le microsystème pour LDI-MS est plus avantageux en soi car il permet une analyse par spectrométrie de masse sans matrice au sein du microsystème. Aussi, dans le cas où les capots ne présentent pas de plots hydrophiles ou superhydrophiles, le microsystème pour LDI-MS nécessite une tension minimale V_{\min} légèrement plus faible pour déplacer une goutte que le microsystème pour MALDI.

Cependant, la conception des ouvertures superhydrophiles doit répondre à deux critères : la surface doit être suffisamment importante pour permettre l'analyse par LDI/MS (la limitation venant du diamètre du faisceau laser) et le rapport surface superhydrophile / surface superhydrophobe doit être compatible avec un déplacement par EWOD. En effet l'hystérésis développée par les plots superhydrophiles s'oppose à la force motrice d'électromouillage.

L'expérience a montré que le déplacement de goutte n'est pas possible lorsque la taille des plots superhydrophiles est supérieure ou égale à 250 μm pour le capot superhydrophobe.

3.2.4. Validation du dépôt spécifique dans les plots.

Nous avons utilisé deux types d'analyse pour évaluer et optimiser la qualité du dépôt de biomolécules (pureté, quantité déposée) dans les plots de nanofils de silicium superhydrophiles qui sont : la LDI-MS sur nanofils de silicium et la microscopie à fluorescence.

La Figure 4.10 présente l'analyse en fluorescence d'une zone de déplacement d'une goutte d'1 μL contenant le peptide Lysine-Arginine-Rhodamine (Lys-Arg-Rhodamine) dont la rhodamine est le marqueur fluorescent. Le peptide est dilué à 150 femtomol/ μL dans un solvant de citrate d'ammonium à 1 mM. Les plots sont de diamètre 150 μm et sont espacés de 400 μm . La goutte d'1 μL est déplacée sur 5 allers-retours à vitesse maximale avec une tension de 100 V_{max} appliquée aux électrodes.

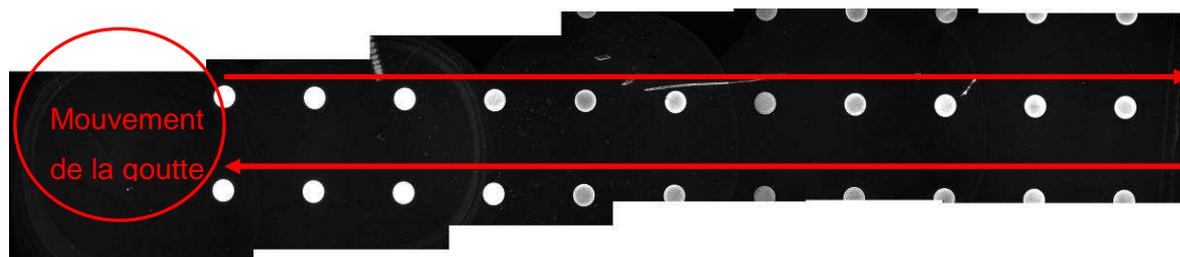


Figure 4.10. Acquisitions de microscopie à fluorescence sur nanofils de silicium superhydrophobes présentant des plots superhydrophiles de diamètres 150 μm et espacés de 400 μm après déplacement d'un peptide fluorescent.

Les plots fluorescents montrent le transfert efficace du peptide dans les régions superhydrophiles tandis que l'adsorption non spécifique semble très limitée sur la surface superhydrophobe. On distingue tout de même la trace de la ligne triple correspondant à la goutte lors du mouillage sous chaque électrode. Les analyses en LDI-MS menées dans et en dehors des plots (Figure 4.11) ont aussi confirmé l'adsorption du peptide Lys-Arg-Rhodamine ($M = 714.4 \text{ Da}$) dans les zones superhydrophiles. L'intensité du signal détectée dans ces zones correspond à une concentration de peptide au moins supérieure à 10 femtomol/ μL . Toutefois, on détecte aussi le peptide en LDI-MS sur les nanofils de silicium en dehors (régions superhydrophobes) des plots fluorescents. L'objectif est donc de réduire cette adsorption non-spécifique de manière à gagner en sensibilité dans les zones superhydrophiles.

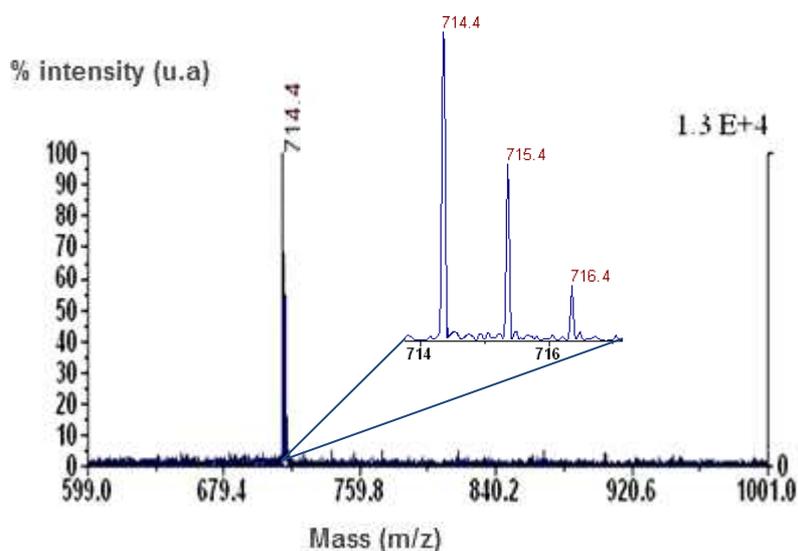


Figure 4.11. Spectre d'analyse LDI-MS sur un plot superhydrophile de nanofils de silicium où le peptide Lys-Arg-Rhodamine ($m/z=714.4$) est déposé par déplacement EWOD d'un microlitre à 150 femtomol dans 1mM de citrate d'ammonium.

3.3. Paramètres de réduction de l'adsorption non spécifique.

De manière à réduire l'adsorption non spécifique et optimiser la quantité d'analytes déposée dans les plots, nous avons varié plusieurs paramètres.

Nous avons tout d'abord réduit le nombre de plots à 1 sous une électrode, de manière à concentrer les analytes dans un minimum de plots. Pour la suite des analyses que nous présentons, le déplacement a donc été effectué sur une ligne de plots superhydrophiles de 100 μm espacés de 4 000 μm (Figure 4.12).

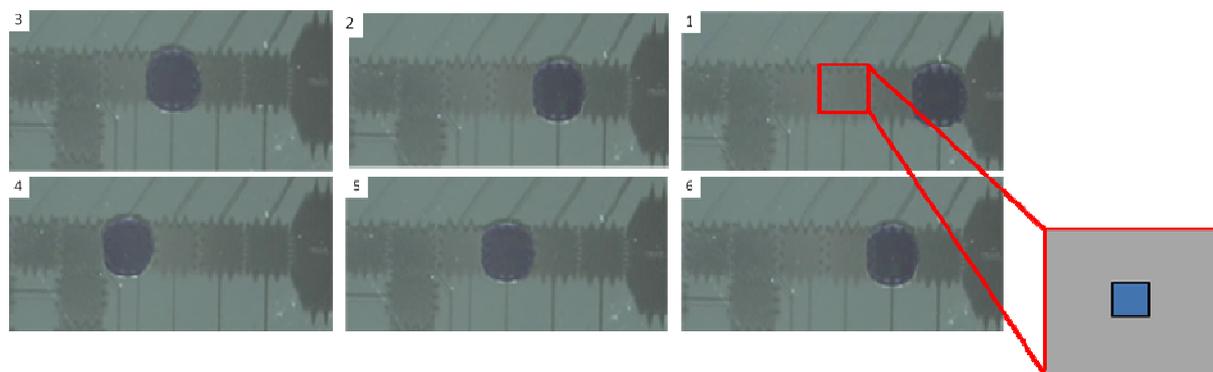


Figure 4.12. Photos d'un déplacement successif d'une goutte entre les électrodes et les nanofils de silicium. En dessous d'une électrode (1,7mm) se trouve un plot de nanofils (100 μm) superhydrophile défini dans le capot de nanofils superhydrophobes.

3.3.1. Analyse fluorescence

Nous avons ensuite testé deux vitesses de déplacement et changé le nombre d'allers-retour de la goutte pour différentes concentrations d'un mélange de peptides. Ce mélange est composé du Lys-Arg-Rhodamine ($M=714.4$ Da) et de deux autres peptides de masses $M=1077.6$ Da et $M=1475.8$ Da dans du citrate d'ammonium à 1 mM. La Figure 4.13 expose les images acquises avec un scanner à fluorescence (532 nm, Innopsys scanner, France, logiciel d'analyse d'image Mapix, Innopsys, France). La tendance est la même pour les deux concentrations à 50 et 150 femtomol/ μ l : le rapport du signal des plots sur le bruit de l'adsorption non-spécifique sous les électrodes est maximal pour 20 allers-retours à vitesse rapide de 98 mm.s^{-1} .

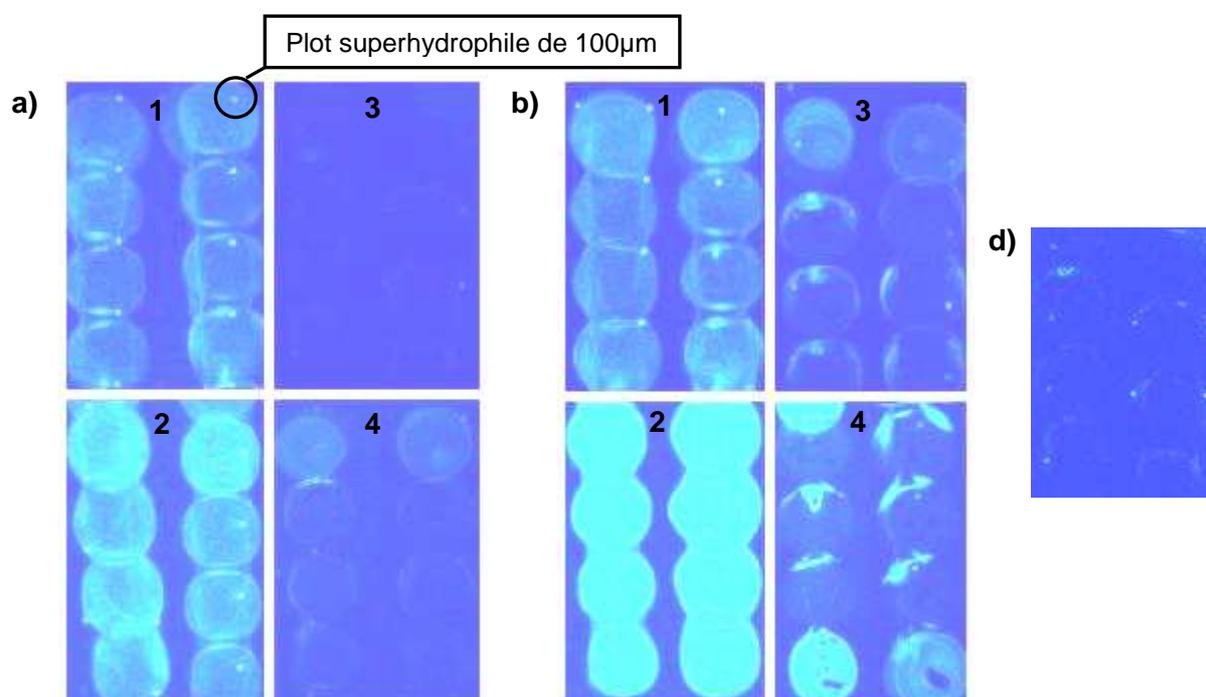


Figure 4.13. Images de fluorescence acquises suite au déplacement du mélange de peptide a) à 50 femtomol/ μ l et b) à 150 femtomol/ μ L pour 1) 20 allers-retours à 98 mm.s^{-1} , 2) 20 allers-retours à 17 mm.s^{-1} , 3) 1 aller à 17 mm.s^{-1} , 4) 1 aller à 98 mm.s^{-1} avec une tension moyenne de $65 V_{\text{max}}$. L'image en d) est la même que l'image a.3 mais le contraste est augmenté par rapport aux autres images.

A vitesse lente, l'adsorption non spécifique est raisonnable si l'on compare les images b.1 et b.3. De même, le signal de fluorescence des plots est inférieur pour l'image a.3 en comparaison à l'image a.1, mais en augmentant le contraste de l'image a.3, on constate que le signal sur bruit est de bonne qualité (Figure 4.13.d).

Comme l'adsorption non spécifique devient trop importante dès que l'on augmente le nombre de passages à vitesse lente, nous avons donc choisi de travailler à la vitesse maximale de 121 mm.s^{-1} et nous avons regardé l'évolution du signal sur bruit uniquement en fonction du nombre d'aller-retour pour le mélange de peptides à la concentration de 50 femtomol/ μL . En tenant compte des incertitudes, on constate dans un premier temps une augmentation du signal sur bruit en fonction du nombre d'aller-retour puis l'existence d'un seuil du nombre d'aller-retour (63 allers-retours) pour lequel l'adsorption non-spécifique augmente plus que l'adsorption dans les plots (Figure 4.14).

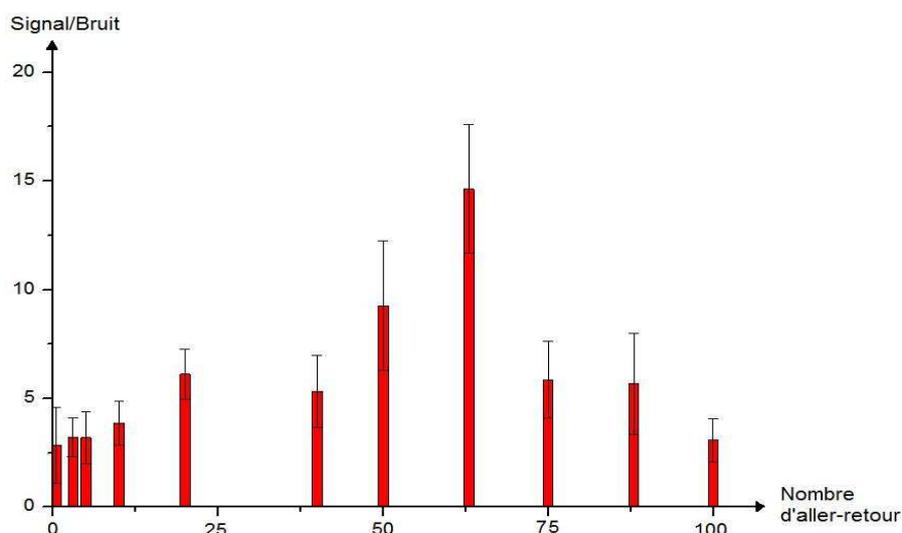


Figure 4.14. Graphe du signal sur bruit de la fluorescence dans les ouvertures en fonction du nombre de déplacement (1 aller puis 3, 5, 10, 20, 40, 50, 63, 75, 88, 100 allers-retours).

3.3.2. Résultats en LDI-MS sur nanofils de silicium.

Les surfaces scannées en fluorescence de la Figure 4.14 ont été analysées en LDI-MS. Le résultat n'est pas réellement conforme à celui attendu. En effet, la Figure 4.15 présente le type de spectre obtenu que ce soit dans les plots de nanofils superhydrophiles ou en dehors sur les nanofils de silicium modifiés par l'OTS.

Si la sensibilité de l'analyse est très satisfaisante, il n'est pas possible de distinguer le signal sur bruit que nous avons observé en fluorescence. Cela vaut aussi bien pour les surfaces présentant les meilleurs rapports signal sur bruit en fluorescence que pour les autres. Par ailleurs, la taille des plots de $100 \mu\text{m}$ est de l'ordre de celle du faisceau laser utilisé dans les expériences de LDI-MS. Après une dizaine de tirs lasers seulement le signal s'atténue, que l'on effectue l'analyse dans ou en dehors des plots.

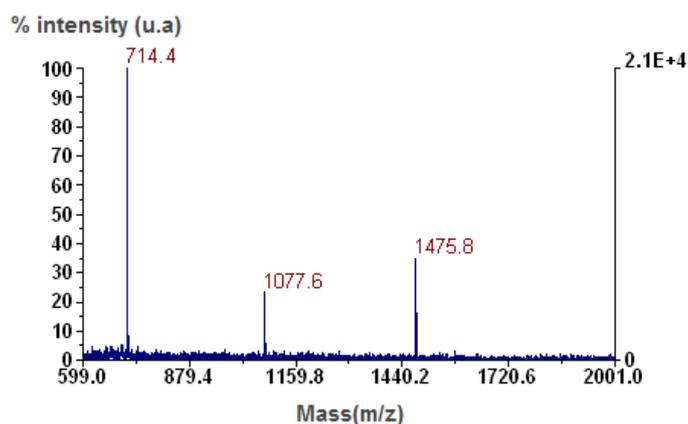


Figure 4.15. Spectre d'analyse (10 tirs laser en moyenne) LDI-MS du mélange de peptides Lys-Arg-Rhodamine ($m/z=714.4$), du peptide de séquence $\text{NH}_2\text{-SILKEPVHGV-NH}_2$ ($m/z=1077.6$), et du peptide de séquence $\text{Ac-GGIAQDFKTDLRGG-NH}_2$ ($m/z=1475.8$) déposés par déplacement EWOD d' $1\ \mu\text{L}$ à 50 femtomol dans 1 mM de citrate d'ammonium. Le spectre est identique qu'il soit réalisé dans ou en dehors des plots de nanofils de silicium superhydrophiles.

Finalement, nous avons déplacé à une vitesse plus lente de $60\ \text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (à $130\ V_{\text{max}}$) le mélange de peptides standard contenant la Des-arg¹-Bradykinin ($M=904.5\ \text{Da}$), l'Angiotensin I ($M=1295.7\ \text{Da}$), le Glu¹-Fibrinopeptide B, ($M=1570.0\ \text{Da}$) et la Neurotensin ($M=1672.9\ \text{Da}$) à la concentration de 50 femtomol/ μL dans du citrate d'ammonium à 1 mM. Pour 2 allers-retours, on observe un signal quasi uniquement dans les plots superhydrophiles (Figure 4.16).

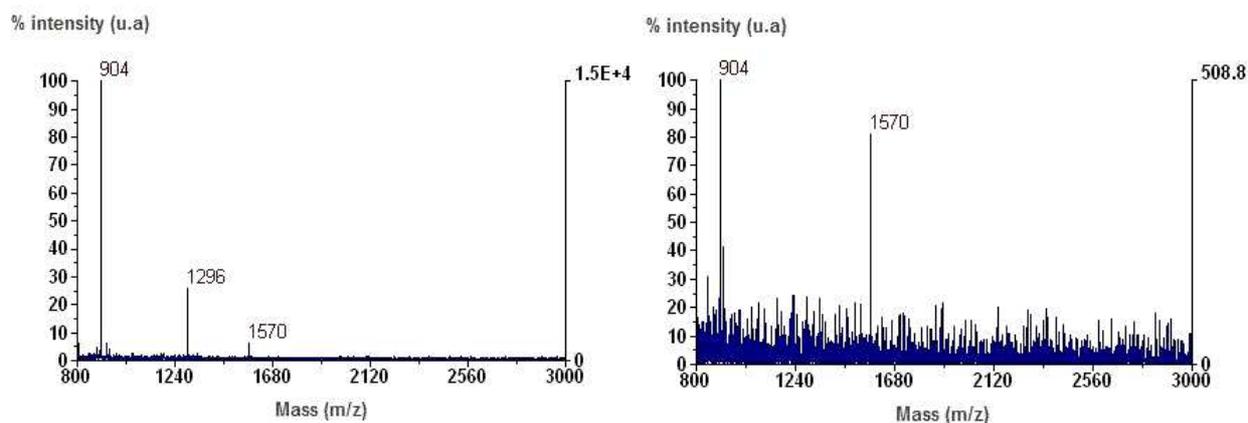


Figure 4.16. Spectre d'analyse (10 tirs laser en moyenne) LDI-MS du mélange de peptides déposé par déplacement EWOD d' $1\ \mu\text{L}$ à 50 femtomol dans 1 mM de citrate d'ammonium a) dans les plots de nanofils de silicium superhydrophiles, b) en dehors des plots.

Pour ce dernier résultat, deux points sont à mettre en valeur. Tout d'abord, il y a une réelle différence d'intensité du signal LDI-MS dans les plots et en dehors des plots.

Ensuite, la qualité de l'interaction et du dépôt spécifique des peptides dans les plots peut être liée à deux paramètres. En effet, cela peut être lié à la diminution de la vitesse qui, comme nous l'avons vu pour les résultats en fluorescence, permet un rapport signal sur bruit raisonnable, et surtout une adsorption non spécifique quasi-nulle pour un nombre d'allers-retours faible. L'autre explication peut être la nature des peptides qui n'est pas la même que pour le mélange de peptides (ces peptides possédant notamment la rhodamine comme marqueur fluorescent).

3.4. Conclusion et perspectives

Nous avons montré que la performance du laboratoire sur puce étudié est tout d'abord établie grâce à l'évolution de son architecture : le remplacement du capot de silicium par un capot de nanofils de silicium permet de s'affranchir du déplacement des matrices du MALDI. Ensuite, la chimie de surface de silanisation OTS du capot de nanofils de silicium permet d'effectuer des déplacements rapides et à une tension raisonnable de mélanges de peptides. Enfin, la lithographie optique réalisée sur le capot est utilisée pour définir des plots où l'on peut modifier la chimie de surface. Ici il s'agit de plots superhydrophiles (terminaison chimique des nanofils Si-O-H) afin d'y favoriser un dépôt spécifique de nanogouttelettes contenant les peptides.

Pour optimiser le dépôt, nous avons varié un bon nombre de paramètres comme le nombre de plots par électrode, la taille de ces plots (qui doit être inférieure à 250 μm pour que le déplacement soit possible), les caractéristiques de déplacement microfluidique (vitesse, nombre d'allers-retours sur les plots) et enfin, la quantité des peptides déplacés.

Finalement, bien que ce système nous permette de nous situer à l'état de l'art (sensibilité de détection, originalité des analyses LDI-MS sans l'utilisation de matrice), il reste à optimiser le dépôt spécifique des peptides et leur sélectivité vis-à-vis des chimies différentes (dans et hors plot).

Le dernier résultat semble prometteur et le travail se poursuit dans le cadre de la thèse de Florian Lapierre. En plus des paramètres que nous avons commencé à analyser, il est encore possible de varier l'homogénéité des peptides au sein de la goutte en effectuant un électromouillage sous l'électrode et de regarder l'impact sur la spécificité de l'adsorption dans le plot.

En perspective, on pourra envisager une chimie spécifique dans ces plots pour favoriser les interactions avec le type d'analytes que l'on souhaite détecter en LDI-MS, ou au contraire se séparer de constituants. Il peut s'agir d'une chromatographie sur surface de type IMAC

par exemple. Ce travail est en cours dans l'équipe, dans le cadre de la thèse de Nhung NGUYEN.

4. Conclusion

Dans la première partie de ce chapitre nous avons constaté qu'il est possible de méthyler des peptides, ceux-ci étant immobilisés sur le support de nanofils de silicium. Dans la deuxième partie, nous avons montré que le support de nanofils de silicium est adéquat pour des opérations microfluidiques et entre autres, il permet de déplacer des mélanges de peptides à une concentration de l'ordre de la picomole par microlitre.

De plus, la sensibilité du support de nanofils pour les analyses LDI-MS fait qu'il s'associe très bien à ces deux concepts. Il permet d'un côté un suivi de la méthylation, celle-ci réalisée in situ sur les nanofils. De l'autre côté, il permet de détecter des peptides déplacés en faible quantité (50 femtomol/ μ l) au sein du laboratoire sur puce utilisant un déplacement par EWOD.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives. En effet, si la technique d'adsorption des peptides sur les nanofils de silicium diffère de celle utilisée pour les biopuces, elle s'est montrée efficace dans le cas présent et il est possible qu'elle permette le suivi d'autres réactions in situ que celle de la méthylation. Par ailleurs, il est envisageable d'optimiser le laboratoire sur puce pour intégrer ce type de réactions chimiques de surface.

Nous voyons dans le chapitre 5 la souplesse des laboratoires sur puces qui s'adaptent aussi à des procédés de biologie cellulaire. Le laboratoire sur puce étudié au cours de cette thèse est d'ailleurs conçu pour analyser des échantillons protéomiques et à long terme pour la culture de cellules. Dans ce chapitre, nous avons établi le succès de son association aux analyses LDI-MS. Nous allons voir dans le chapitre 5 que les cellules adhèrent au capot de nanofils de silicium, et qu'il est même possible de contrôler la localisation de ces cellules sur ce capot.

5. Bibliographie

- ¹⁹⁵ Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H.M. "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing". *Sensors and Actuators B*. **1990** 1, 1-6, 244–248
- ¹⁹⁶ Kato, R.; Kunimatsu, M.; Fujimoto, S.; Kobayashi, T.; Honda, H. "Angiotensin II Inhibitory Peptide Found in the Receptor Sequence using Peptide Array". *Biochem Biophys. Res. Commun.* **2004**, 315, 22-29.
- ¹⁹⁷ Fukui, S.; Feizi, T.; Galustian, C.; Lawson, A. M.; Chai, W. "Oligosaccharide Microarrays for High-throughput Detection and Specificity Assignment of Carbohydrate-Protein Interaction". *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 1011-1017.
- ¹⁹⁸ Snapyan, M.; Lecocq, M.; Guevel, L.; Arnaud, M. C.; Ghochikyan, A.; Sakanyan, V. "Dissecting DNA-protein and Protein-protein Interactions Involved in Bacterial Transcriptional Regulation by a Sensitive Protein Array Method Combining a Near-Infrared". *Proteomics*, **2003**, 3, 647-657.
- ¹⁹⁹ Larkin, J. E.; Frank, B. C.; Gaspard, R. M.; Duka, I.; Gavras, H.; Quackenbush, J. Cardiac "Transcriptional Response to Acute and Chronic Angiotensin II Treatments". *Physiol. Genomics*, **2004**, 18, 152-166.
- ²⁰⁰ Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A.; Bertone, P.; Lau, N.; Jansen, R.; Bidlingmaier, S.; Houfek, T. "Global Analysis of Protein Activities using Proteome Chips." *Science*, **2001**, 293, 2101-2105.
- ²⁰¹ Belov, L.; de la Vega, O.; dos Remedios, C. G.; Mulligan, S. P.; Chritopherson, R. I. "Immunophenotyping of Leukemias using a Cluster of Differentiation Antibody Microarray". *Cancer Res.* **2001**, 61, 4483-4489.
- ²⁰² Belov, L.; de la Vega, O.; dos Remedios, C. G.; Mulligan, S. P.; Chritopherson, R. I. "Immunophenotyping of Leukemias using a Cluster of Differentiation Antibody Microarray." *Cancer Res.* **2001**, 61, 4483-4489.
- ²⁰³ <http://newsroom.ucla.edu/portal/ucla/new-microchip-technology-performs-97160.aspx>
- ²⁰⁴ Locht, C.; Raze, D.; Rouanet, C.; Genisset, C.; Segers, J.; and Mascart, F. "The mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, virulence factor and antigen useful for diagnostics and vaccine development, in *The Mycobacterial Cell Wall*" ASM Press, Washington DC. **2007**
- ²⁰⁵ Yang, X. J.; Seto, E. "Lysine acetylation: codified crosstalk with other post-translational modifications". *Mol Cell.* **2008**, 31, 449-61.
- ²⁰⁶ Wisniewski, J. R.; Zougman, A.; Mann, M. "Nepsilon-formylation of lysine is a widespread post-translational modification of nuclear proteins occurring at residues involved in regulation of chromatin function". *Nucleic Acids.* **2008**. 36, 570-7.

- ²⁰⁷ Floor, E.; Maples, A. M.; Rankin, C. A.; Yaganti, V. M.; Shank, S. S.; Nichols, G. S.; O'Laughlin, M.; Galeva, N. A.; Williams, T. D. "A one-carbon modification of protein lysine associated with elevated oxidative stress in human substantia nigra". *J Neurochem* **2006**, 97, 504-14.
- ²⁰⁸ Duburcq, X.; Olivier, C.; Desmet, R.; Halasa, M.; Carion, O.; Grandidier, B.; Heim, T.; Stievenard, D.; Auriault, C.; and Melnyk, O. "Polypeptide semicarbazide glass slide microarrays: characterization and comparison with amine slides in serodetection studies". *Bioconjug Chem.* **2004**, 15, 317-25.
- ²⁰⁹ Mezzasoma, L.; Bacarese-Hamilton, T.; Di Cristina, M.; Rossi, R.; Bistoni, F.; Crisanti, A. "Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases". *Clin Chem.* **2002**, 48, 121-30.
- ²¹⁰ Marcon, L.; Melnyk, O.; Stievenard, D. "Current based antibodies detection from human serum enhanced by secondary antibodies labelled with gold nanoparticles immobilized in a nanogap". *Biosens Bioelectron.* **2008**, 23, 1185-8.
- ²¹¹ Gidley, M. J.; Sanders, J. K. "Reductive methylation of proteins with sodium cyanoborohydride. Identification, suppression and possible uses of N-cyanomethyl by-products". *Biochem J.* **1982**, 203, 331-4.
- ²¹² Caron, F. "Développement de microsystèmes fluidiques à électromouillage pour l'analyse de protéines par spectrométrie de masse MALDI", Thèse de doctorat de l'Université de Lille1, **2007**.
- ²¹³ Fourier, J.C. ; Caron, F. ; Druon, C. ; Tabourier, P. ; Le Pesant, J.P.; Loyaux, D. ; Rolando, C. "Dispositif pour désorption par rayonnement laser incorporant une manipulation de l'échantillon liquide sous forme de gouttes individuelles permettant leur traitement chimique et biochimique", brevet FR20040006081, **2004**.
- ²¹⁴ Fourier, J.C. ; Caron, F. ; Druon, C. ; Tabourier, P. "Dispositif de manipulation de gouttes destiné à l'analyse chimique, procédé de fabrication du dispositif, et système d'analyse microfluidique", brevet FR20040006080, **2004**.
- ²¹⁵ Abgrall, P.; Gué, A.M. "Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review", *J. Micromech. Microeng.* **2007**, 17, R15-R49.
- ²¹⁶ Berge, B. "Electrocapillarité et mouillage de films minces par l'eau", *C. R. Acad. Sci. Paris série II.* **1993**, 317, 157-163.
- ²¹⁷ Lee, J.; Moon, H.; Fowler, J.; Kim, C. J.; Schoellerhammer, T. "Addressable micro liquid handling by electric control of surface tension", *Proc. 14th IEEE Int. Conf. Micro. Electro Mechanical Systems, MEMS, Interlaken, Suisse*, **2001**, 499-502.
- ²¹⁸ Pollack, M.; Fair, R.; Shenderov, A. "Electrowetting-based actuation of droplets for microfluidic applications", *App. Phys. Lett.* **2000**, 77, 11, 1725-1726.
- ²¹⁹ Fair, R. "Digital microfluidics: is a true lab-on-a-chip possible?", *Microfluidics and nanofluidics.* **2007**, 3, 3, 245-281.
- ²²⁰ Verplanck, N.; Coffinier, Y.; Wisztorski, M.; Piret, G.; Delhaye, C.; Thomy, V.; Fournier, I.; Camart, J.C.; Tabourier, P.; Boukherroub, R. "Nanostructured surface as EWOD counter electrode for matrix-free mass spectrometry analysis", *Proceed μ TAS, Tokyo.* **2006**, 771-773.

- ²²¹ Wheeler, A.; Moon, H.; Bird, C.; Ogorzalek Loo, R.; Kim, C.J.; Loo, J.; Garrell, R. "Digital microfluidics with in-line sample purification for proteomics analyses with MALDI-MS", *Anal.Chem.* **2005**, 77, 534-540.
- ²²² Malic, L.; Veres, T.; Tabrizian, M. "Biochip functionalization using electrowetting-on-dielectric digital microfluidics for surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization," *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 7, 2218–2224.
- ²²³ Chatterjee, D.; Hetayothin, B.; Wheeler, A.; King, D.; Garrell, R. "Droplet-based microfluidics with nonaqueous solvents and solutions", *Lab Chip*, **2006**, 6, 199-206.
- ²²⁴ Jary, D.; Chollat-Namy, A.; Fouillet, Y.; Boutet, J.; Chabrol, C.; Castellan, G.; Gasparutto, D.; Peponnet, C. "DNA repair enzyme analysis on EWOD fluidic microprocessor", *NSTI Nanotech* **2006**
- ²²⁵ Chang, Y.; Lee, G.; Huang, F.; Chen, Y.; Lin, J. "Integrated polymerase chain reaction chips utilizing digital microfluidics", *Biomedical Microdevices.* **2006**, 8, 3, 215-225.
- ²²⁶ Verplanck, N.; Galopin, E.; Camart, J.-C.; Thomy, V.; Coffinier, Y.; Boukherroub, R., "Reversible Electrowetting on Superhydrophobic Silicon Nanowires". *Nano Letters.* **2007**, 7, 3, 813-817.

Chapitre 5

Immobilisation localisée de cellules et de spores sur nanofils de silicium

1. Introduction

Beaucoup de mécanismes cellulaires demeurent encore aujourd'hui incompris alors que l'enjeu de détection des maladies à des stades précoces est crucial.

L'objectif de nombreuses études est de mieux cerner les phénomènes de l'activité interne d'une cellule, tels que la différenciation cellulaire (capacité de mêmes cellules souches à pouvoir se spécialiser en différents « types » cellulaire), les mutations, les réactions à des agents chimiques, ou à des stimuli extérieurs (optiques, mécaniques,...).

Par ailleurs, les cellules *in vivo* répondent à leur environnement en partie à travers la reconnaissance des protéines de la matrice extracellulaire par les récepteurs de la membrane cellulaire. Il est donc intéressant d'observer le comportement des cellules en milieu extérieur comme par exemple leur migration, leur prolifération et leurs forces d'adhésion en contact avec des surfaces de différentes structurations et/ou chimies de surface.

Pour cela, les laboratoires sur puce sont très adaptés car ils constituent à la fois des biocapteurs et ils permettent de contrôler l'environnement des cellules.

Dans ce chapitre, nous étudions le comportement des cellules lorsqu'elles sont mises en contact avec les surfaces de nanofils de silicium synthétisés par voie chimique ou par voie VLS. Nous développons aussi une méthode originale combinant la chimie et la topographie de surface des nanofils de silicium à des techniques de lithographie optique : des zones de différentes tensions de surface liquide/solide sont ainsi créées et sont favorables à l'adhésion localisée de cellules et de bactéries. Les perspectives consistent en l'intégration du support de nanofils de silicium à un laboratoire sur puce pour des analyses protéomiques en spectrométrie de masse ou encore à la réalisation de surfaces ayant des propriétés d'anti-adhésion cellulaire ou antibactérienne.

2. Immobilisation localisée de cellules sur nanofils de silicium et viabilité des cellules.

Le laboratoire sur puce présenté au Chapitre 4 .3, adapté à l'analyse de peptides, devrait permettre, à moyen terme, l'analyse d'un échantillon biologique brut contenant des protéines sécrétées par des cellules biologiques. L'idée est donc de concevoir un laboratoire sur puce intégrant à la fois la culture de cellules (aussi appelé « cell on chip ») et l'analyse protéomique.

Etant donné que sur une population de cellules cultivées dans les mêmes conditions, l'expression des protéines n'est pas nécessairement synchronisée, il est plus judicieux pour

les laboratoires sur puce, les biocapteurs et autres plateformes d'analyses (mesures terahertz, mesures d'impédance-métrie) d'isoler les cellules et d'examiner une cellule unique dans un premier temps. Il est ensuite possible d'étudier la communication entre deux cellules puis entre groupes de cellules²²⁷ qui est essentielle au développement et à la régulation des tissus et de l'organisme.^{228,229,230,231} Même si la littérature est abondante sur les observations des mécanismes de communication (principalement par transfert de marqueurs fluorescents entre deux cellules en contact membranaire²³²), les processus moléculaires responsables de la cancérisation n'ont pas encore été élucidés avec exactitude. Il est effectivement difficile de contrôler spatio-temporellement le contact entre deux cellules et quelques microsystèmes ont été réalisés récemment pour relever le défi.^{233, 234,235}

La réalisation d'un laboratoire sur puce intégrant la culture de cellules et l'isolation de ces cellules permettrait un réel contrôle de l'environnement cellulaire (isolement précis par rapport aux cellules voisines, apport de supports biologiques par l'intermédiaire de goutte déplacée par EWOD...) et aussi la mise en contact de milieux sécrétés permettant de déclencher une communication chimique entre les populations de cellules.

Nous nous sommes donc intéressés à l'immobilisation isolée des cellules dans le cas particulier du capot utilisé pour laboratoire sur puce présenté au Chapitre 4 .3. Il s'agit donc de la surface de nanofils de silicium synthétisés par voie chimique, superhydrophobes (silanisation par OTS) et présentant des plots superhydrophiles (réalisés par lithographie optique). Nous avons étudié l'adhésion et la viabilité de cellules mises en contact avec ces surfaces. Ce travail est réalisé en collaboration avec Dominique Legrand (culture cellulaire, microscopie à fluorescence) du Laboratoire de Glycobiologie Structurale de l'université Lille1, et avec Christian Slomianny (microscopie électronique en transmission) du Laboratoire de Physiologie Cellulaire de l'université Lille1.

2.1. Etat de l'art.

2.1.1. Les techniques d'immobilisation de cellules.

Différents BioMEMS (pour Micro Electro Mechanical System for Biology) permettent la manipulation mécanique d'une cellule : les micropinces²³⁶, les microfiltres (Figure 5.1)²³⁷ ou encore les micromembranes actionnées.²³⁸

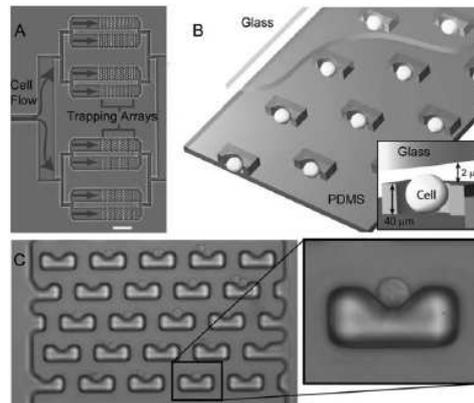


Figure 5.1 - Filtres en PDMS permettant l'immobilisation mécanique d'une cellule.²³⁷

La voie électrique permet aussi d'immobiliser des cellules (Figure 5.2). En créant un réseau d'électrodes fonctionnalisées au sein d'un microcanal, il est possible d'étudier plusieurs cellules en parallèle: une seule cellule en moyenne est placée sur une électrode (3 μm de large) pendant la durée de l'excitation électrique.²³⁹ Les conditions de viabilité sont assurées en maintenant des niveaux de tensions appliquées inférieures à 10 V (à 2 MHz) durant 30 minutes.

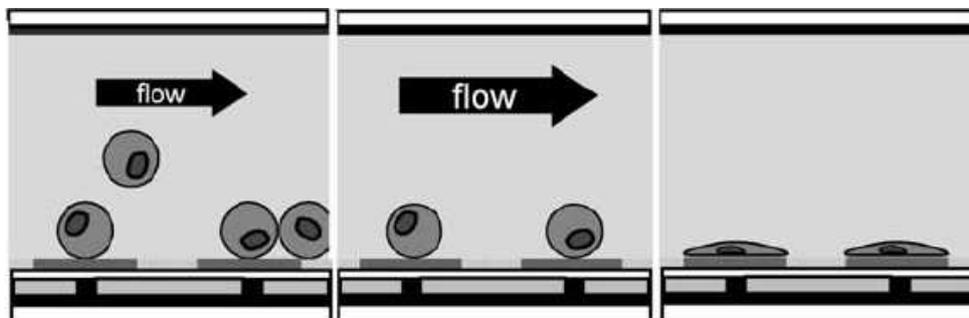


Figure 5.2 - Principe de l'immobilisation de cellules par diélectrophorèse :
a) activation des électrodes et mise en solution des cellules, b) rinçage des cellules non accrochées et c) étalement et culture des cellules.

Finalement, il est possible d'immobiliser chimiquement les cellules. Au sein de l'organisme les cellules adhèrent autres cellules ou à la matrice extracellulaire grâce à des protéines d'adhérence telles que la fibronectine ou le collagène. A partir d'une chimie de surface, il est possible d'immobiliser les cellules sur des plots fonctionnalisés par des protéines d'adhérence. L'équipe de Whitesides a été l'une des premières à étudier la viabilité de cellules sur plots fonctionnalisés par de la fibronectine²⁴⁰ alors que Théry et al. ont étudié en détail l'influence de la forme du plot sur le développement de la cellule.²⁴¹

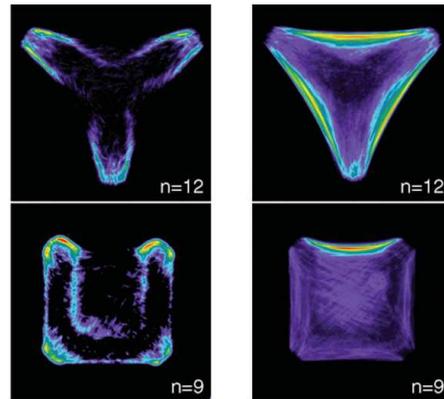


Figure 5.3 - Etude de l'orientation du cytosquelette de la cellule selon la forme du plot.²⁴¹

Veisheh et al., sur le même principe, utilisent des plots en or sur SiO₂ pour effectuer une chimie sélective. Les plots en or sont fonctionnalisés avec des thiols terminés par de la fibronectine.²⁴² Le SiO₂ est fonctionnalisé avec des PEG (PolyEthylèneGlycol) qui ont la particularité de limiter l'adsorption des protéines, et par conséquent, des cellules.

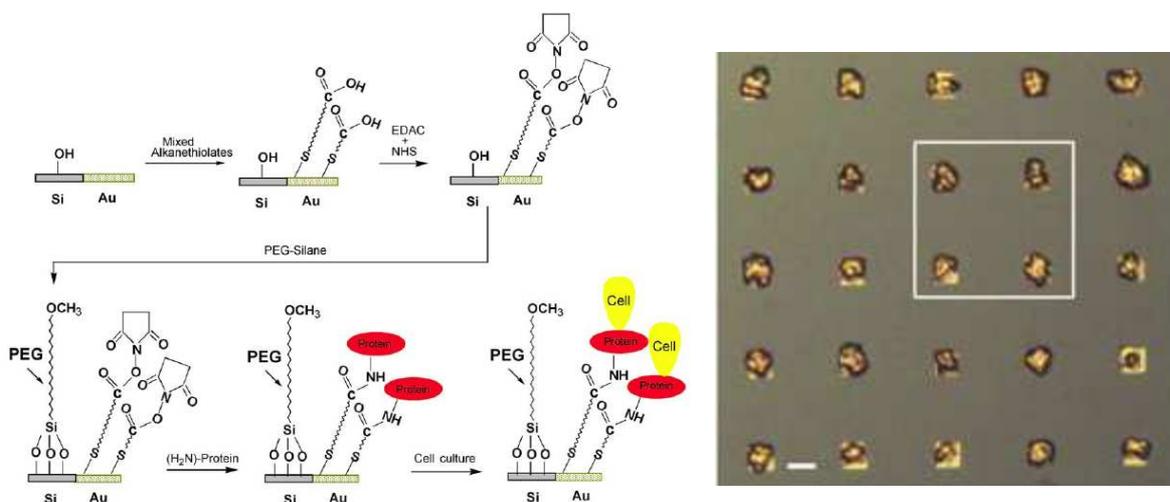


Figure 5.4 - a) Etapes de fonctionnalisation des plots en or par de la fibronectine sur SiO₂ pour l'accueil des cellules et b) culture de cellules sur plots de 20µmx20µm.

2.1.2. Interaction cellules/nanofils.

Les études sur les interactions des cellules vivantes avec différents types de nanostructures (taille, forme, matériau) présentent un grand intérêt puisqu'elles ouvrent de nombreuses perspectives pour le traitement de cancers, pour des implants biologiques, pour

des biocapteurs, pour l'adressage ciblée de molécules thérapeutiques, ou encore pour des interfaces neuro-électroniques.^{243,244,245,246}

Kim et al. ont montré que les nanofils de silicium permettent la différenciation de cellules souche d'embryons de souris.²⁴³ Le groupe de Jin a également prouvé que des cellules souches peuvent se différencier spécifiquement en cellules osseuses lorsqu'elles sont mises en contact avec des nanotubes de TiO₂ présentant un diamètre précis.²⁴⁷

Kwon et al. ont révélé la potentialité de nanofils de silice à constituer des vecteurs d'agents thérapeutiques dans des cellules eucaryotes.²⁴⁴ Brammer et al ont aussi montré que des nanofils de silicium peuvent diffuser des antibiotiques grâce à leur biodégradabilité dans une solution de tampon phosphate salin (PBS).²⁴⁸

Enfin, Prinz et al. ont réussi à guider des axones le long de rangées de nanofils de phosphore de gallium.²⁴⁹

2.2. Immobilisation localisée de cellules ovariennes d'hamster chinois sur nanofils de silicium.

2.2.1. Immobilisation par voie chimique des cellules sur nanofils de silicium.

Les cellules ovariennes d'hamster chinois CHO-K1 (compagnie ATCC, numéro CCL-61) ont été cultivées en atmosphère humide de 95% d'air et de 5% de CO₂ à 37°C dans un milieu de culture Ham's F12 (In Vitrogen) contenant 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (In Vitrogen, FCS). Les nanofils de silicium étant anti-réfléctifs, nous utilisons des cellules fluorescentes afin de les observer en microscopie optique. La protéine eGFP vecteur pEGFP-N2 (Clontech International) a été transfectée de manière permanente dans des cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO) en utilisant le système de transfection basé sur le DreamFect liposome (OZ Bioscience). Les cellules sont ensuite sélectionnées, 48h après la transfection, selon leur résistance à la neomycin en utilisant la Geneticin G418 (Clontech) à une dose de 1 mg/mL. Les clones CHO-K1-eGFP sont sélectionnés selon leur expression permanente eGFP, leur morphologie et leur taux de croissance similaire aux cellules CHO-K1 non transfectées. Les clones sont cultivés de manière identique aux cellules CHO-K1.

Les surfaces sont stérilisées à l'éthanol 70% stérile, rincées à l'eau stérile, puis séchées dans une atmosphère stérile à température ambiante avant d'être placées durant une nuit dans une solution d'eau stérile dans les compartiments d'une boîte de Pétri spécifique à la culture de cellule. Avant la mise en contact avec les cellules, la solution d'eau stérile est remplacée par 4 mL de milieu de culture pour chaque surface de chaque compartiment. Les cellules sont récupérées avec une solution stérile EDTA/trypsin (In Vitrogen) à 37°C pendant

5 minutes lorsqu'elles sont à 90% de confluence, centrifugées puis placées dans 4 mL de milieu de culture frais. Cette suspension de 4 mL contenant les cellules est mélangée de manière à homogénéiser la dispersion des cellules puis 50 µl sont prélevés et ajoutés aux 4 mL de milieu de culture frais de chaque compartiment de la boîte de Pétri. On estime alors le nombre de cellules à 2500/cm².

Les cellules sont ensuite été incubées avec la surface de nanofils de silicium à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂. Après 3h d'incubation, les surfaces sont transférées dans de nouveaux compartiments contenant du milieu de culture frais, puis incubée de nouveau pendant 24 h et 48 h. Cette étape permet de récupérer les cellules non-adhérentes et d'assurer l'adhésion d'un nombre adéquat de cellules sur la surface.

La Figure 5.5 montre les résultats de fluorescence après 24 h d'incubation. Les surfaces sont placées entre une lame de verre standard et une lamelle de verre pour l'observation au microscope (Zeiss Axioplan 2, caméra Axiocam Hrc d'Axiophot, objectif Olympus Plan 10X/0.60, objectif Zeiss Nerofluor 20X/0.50).

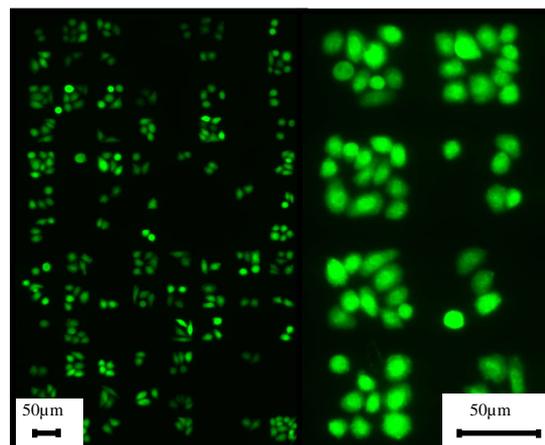


Figure 5.5. Image en fluorescence (logiciel Axiovision 40 v4.0) des cellules CHO K1 après 24 h d'incubation dans le milieu de culture Ham F12 avec les surfaces de nanofils de silicium présentant des zones carrées superhydrophiles, entourées de zones superhydrophobes.

On distingue nettement une forte attraction des cellules vers les plots de nanofils de silicium superhydrophiles et très peu de cellules sur les zones superhydrophobes. Quelques cellules s'étalent dans les plots superhydrophiles mais il y a globalement plus de cellules qui adoptent une forme ronde. Ce changement morphologique rejoint les observations décrites dans la littérature lorsque les cellules se trouvent sur des nanofils.^{250,243} Une image MEB⁸ d'une surface, réalisée lors d'une autre étude, montre une cellule à moitié positionnée sur

⁸ Les surfaces avec les cellules adhérentes sont préparées avec un protocole bien précis de fixation et de métallisation avant l'observation MEB présenté en Annexe 3.

une surface plane et sur des nanofils de silicium et illustre bien ce phénomène (Figure 5.6). Les cellules s'étalent beaucoup plus facilement sur une surface plane que sur une surface de nanofils de silicium.

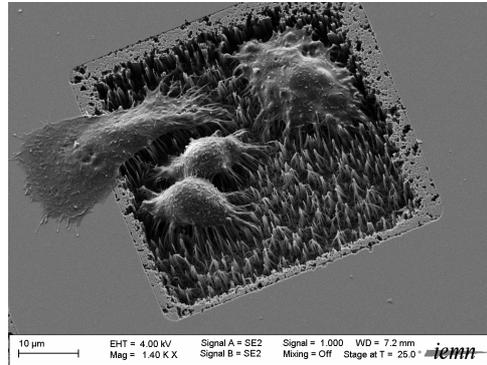


Figure 5.6. Image MEB illustrant la forme adoptée par une cellule CHO K1 suivant la structuration du silicium.

Après 48 h d'incubation (Figure 5.7), certains plots sont complètement remplis de cellules, ce qui montre qu'il y a bien eu des mitoses. On remarque aussi la présence de plots totalement inoccupés, laissant supposer que les cellules restent dans le premier plot occupé et ne se déplacent pas de plots en plots.

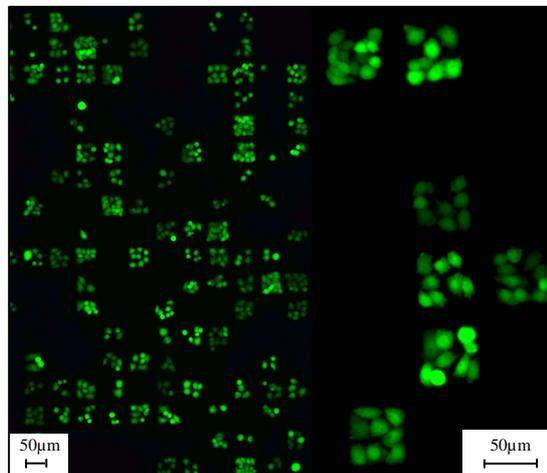


Figure 5.7. Cellules CHO K1 fluorescentes localisées dans les plots superhydrophiles d'une surface de nanofils de silicium, après 48 h d'incubation de cette surface dans le milieu de culture Ham F12.

Pour toutes les surfaces, des tests de viabilité ont été effectués pour les cellules. Les surfaces avec les cellules adhérentes sont placées dans 1 mL de milieu de culture frais auquel on ajoute 4 µL d'une solution d'iodure de propidium (IP) à 500 µL/mL. En supplément du

constat de leur taux de prolifération normal, on a observé très peu de luminescence dans le rouge correspondant à l'IP qui se fixe sur les noyaux de cellules mortes.

2.2.2. Interface cellules/ nanofils de silicium.

Pour évaluer plus précisément l'interaction entre les nanofils de silicium et les cellules, nous avons observé les surfaces avec les cellules adhérentes au MEB⁹ (Figure 5.8).

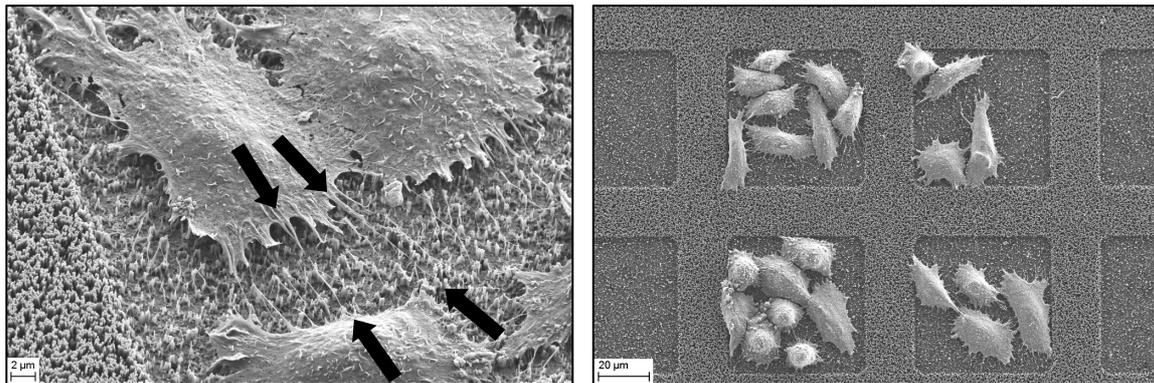


Figure 5.8. Images MEB des cellules piégées dans les plots superhydrophiles des nanofils de silicium.

Les images MEB révèlent que la topographie des nanofils de silicium des plots superhydrophiles a changé, alors que les nanofils de silicium hors des plots étant fonctionnalisés par l'OTS sont restés identiques. En fait, les nanofils de silicium dans les plots superhydrophiles ont été dégradés chimiquement par le milieu de culture. Des études ultérieures ont révélé que les composés salins (et non le pH) du PBS du milieu de culture est responsable de la gravure du silicium (la cinétique de la gravure augmente avec le temps et la température). Par contre, les nanofils de silicium à l'extérieur des plots et qui comportent des chaînes méthylées en surface, ont résisté à cette attaque chimique. On peut supposer que dans ce cas le contact avec le liquide du milieu de culture, riche en surfactants, peptides et protéines, est fortement réduit. En effet, on a créé des gradients de tensions de surface sur le milieu de culture cellulaire en utilisant les facteurs combinés de structuration de surface (nanofils de silicium) et de modification chimique de surface (Chapitre 2 .4).

En ce qui concerne l'interaction entre cellules et nanofils de silicium, les images MEB mettent en évidence le fait que les extensions cytoplasmiques des cellules (flèches noires - Figure 5.9) ont atteint et joignent le dessus des nanofils de silicium. Nous avons également

⁹ Les surfaces avec les cellules adhérentes sont préparées avec un protocole bien précis de fixation et de métallisation avant l'observation MEB présenté en Annexe 3.

réalisé des images de microscopie électronique en transmission (TEM).¹⁰ Celles-ci montrent que les extensions cytoplasmiques ne restent pas que sur le dessus des nanofils mais qu'elles s'étendent aussi le long des nanofils.

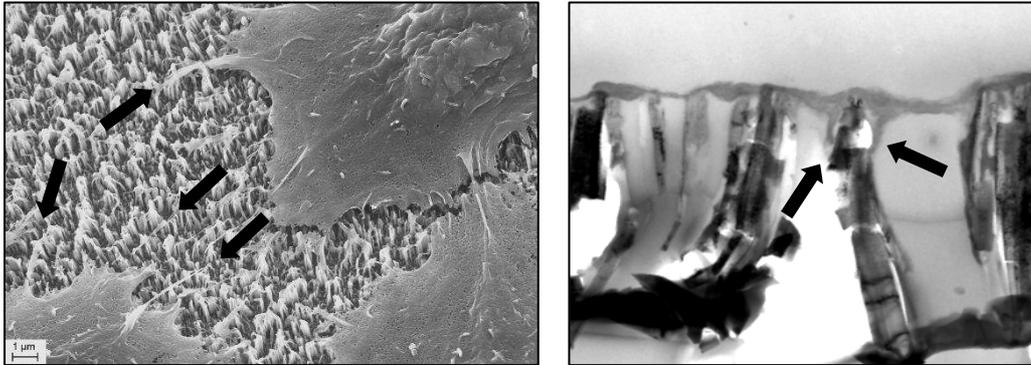


Figure 5.9. Images MEB (à gauche) et TEM (à droite) des cellules adhérentes sur nanofils de silicium superhydrophiles.

2.2.3. Discussion et interprétation des résultats

Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer l'immobilisation des cellules dans les plots de nanofils de silicium superhydrophiles.

Une première explication peut être que les cellules suivent les tensions de surfaces liquide/solide (Chapitre 2 .4.1). Dans la littérature des architectures particulières de structuration de surfaces superhydrophobes peuvent limiter l'aire de contact entre le liquide et la surface, et également empêcher l'adsorption de protéines.^{245,251,252} Les mêmes raisons empêcheraient l'adhésion de cellules dans le cas présent. Pour cela, il faut supposer que les cellules suivent les tensions de surface du liquide dès les premiers instants d'incubation de la surface dans le milieu de culture. En effet les tensions de surfaces peuvent s'atténuer au cours du temps : des protéines ou des surfactants du milieu de culture cellulaire peuvent se fixer sur les parties superhydrophobes des nanofils de silicium par forces d'interaction apolaire (Figure 2.14) et ainsi altérer la superhydrophobicité de ces derniers.

En suivant cette hypothèse, dès le départ les cellules arrivant vers une zone superhydrophobe sont soit dirigées vers une zone superhydrophile, soit expulsées hors de la surface au fond de la boîte de pétri. Les images MEB et TEM montrent bien que les cellules piégées dans les zones superhydrophiles se stabilisent et adhèrent sans problème aux nanofils de silicium grâce à leurs extensions cytoplasmiques.

¹⁰ Les surfaces avec les cellules adhérentes sont préparées avec un protocole bien précis de fixation avant l'observation en TEM présenté en Annexe 3.

Pour vérifier cette habilité des nanofils de silicium modifiés par l'octadecyltrichlorosilane à repousser les cellules, nous avons observé des surfaces sans zones superhydrophiles après 48 h d'incubation avec les cellules. Après une étape de rinçage, aucune cellule n'a effectivement été détectée en fluorescence. Les images TEM (Figure 5.10) effectuées sur les cellules présentes en surface des nanofils de silicium superhydrophobes avant rinçage (et avec des étapes très douces pour les rinçages des produits de fixation), dévoilent un contact très légers des extensions cytoplasmiques avec les nanofils, contact limité au dessus des nanofils.



Figure 5.10. Image TEM des cellules sur les nanofils de silicium superhydrophobes.

La deuxième hypothèse ne mettrait pas en jeu les tensions de surfaces liquide/solide mais impliquerait plutôt l'immobilisation des cellules là où les protéines du milieu auraient préférentiellement adhérees.

Cependant, l'anti-adhésion de protéines sur des surfaces superhydrophobes n'est pas si évidente. La littérature fait état d'une adsorption de protéines plus élevée pour des surfaces planes hydrophobes que pour des surfaces planes hydrophiles. Les surfaces hydrophiles seraient même utilisées pour éviter ou au moins réduire la contamination par des protéines.^{253,254} Par contre, il est reporté qu'à long terme, la saturation des protéines est plus importante dans le cas des surfaces hydrophiles.²⁵¹

Roach et al. ont nanostructuré des surfaces et gardé les mêmes protocoles de modifications chimiques hydrophobes-hydrophiles. Leurs résultats suggèrent que la structuration de surface diminue l'adsorption des molécules chimiques que ce soient sur des surfaces superhydrophobes ou des surfaces superhydrophiles.²⁵¹ Cet effet pourrait recouper des observations sur l'effet de courbure de la surface qui semble modifier la structure de peptides absorbés.²⁵⁵ Enfin, le nombre de molécules chimiques ou de protéines adsorbées sur des zones superhydrophiles ou superhydrophobes semble être le même.^{251,256} La seule différence entre les deux zones serait que le décrochage des protéines par un flux dynamique est plus facile sur surfaces superhydrophobes.²⁵⁶

En conclusion, ce dernier point, ainsi que l'effet de la tension de surface, nous semblent donc être les arguments les plus adaptés pour expliquer que les cellules adhèrent préférentiellement sur des nanofils de silicium superhydrophiles.

2.3. Viabilité des cellules et processus passif d'interaction avec les nanofils de silicium.

L'étude du paragraphe 2.2 précédent a également été menée sur des nanofils réalisés par voie VLS (Chapitre 2 .2.1). Les résultats ne sont pas aussi clairs que sur les nanofils de silicium réalisés par voie chimique. Les cellules sont moins repoussées par les nanofils superhydrophobes réalisés par voie VLS que par ceux réalisés par voie chimique et on ne distingue pas de position préférentielle des cellules dans les plots de nanofils superhydrophiles (Figure 5.11, image de gauche).

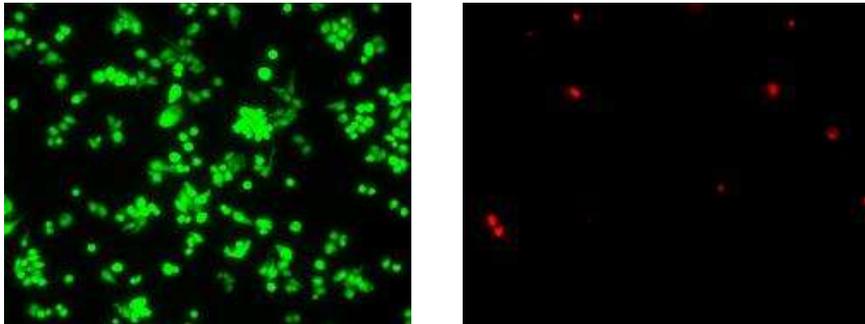


Figure 5.11. Image en fluorescence des cellules CHO K1 après 24 h d'incubation dans le milieu de culture Ham F12 avec les surfaces de nanofils de silicium synthétisés par voie VLS et présentant des zones carrées superhydrophiles, entourées de zones superhydrophobes.

Nous supposons alors que les cellules sont moins mobiles sur les nanofils VLS, images MEB à l'appui, révélant que la majorité des cellules sont comme 'transpercées' par les nanofils VLS (Figure 5.12). Cependant cela ne semble pas affecter leur viabilité : les cellules non-viables, qui ont donc réagi avec l'Iodure de Propidium (IP), fluorescent dans le rouge et sont en effet peu nombreuses (Figure 5.11, image de droite).

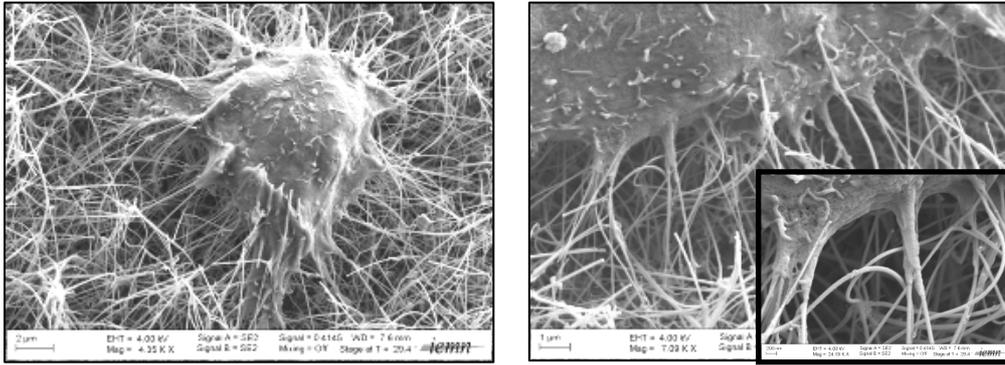


Figure 5.12. Images MEB des cellules CHO K1 sur les nanofils de silicium synthétisés par voie VLS.

On s'aperçoit sur les images MEB qu'il est difficile de distinguer les nanofils des extensions cytoplasmiques de type filopodes. Les images TEM réalisées (Figure 5.13) mènent aussi à la problématique suivante : y a-t-il un phénomène d'endocytose des nanofils de la part des cellules où alors sont-elles retenues et transpercées par les nanofils de manière mécanique?

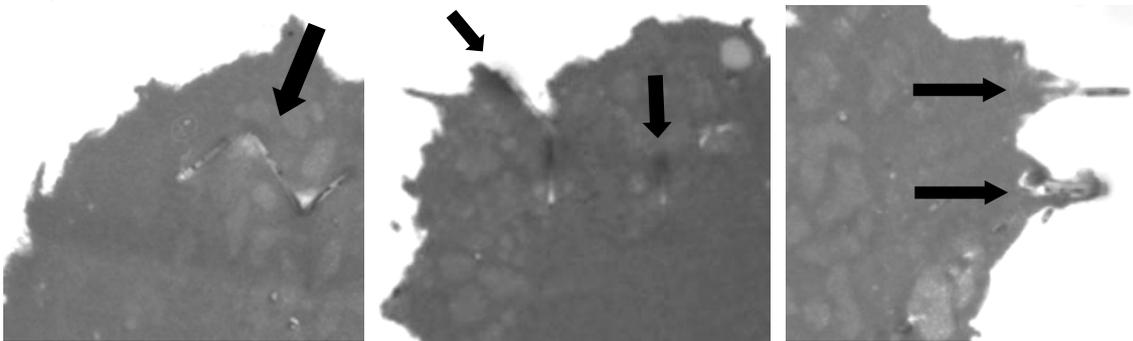


Figure 5.13. Images TEM des cellules CHO K1 incubées avec sur les surfaces de nanofils de silicium synthétisés par voie VLS.

Nous avons donc étudié le comportement des cellules (cellules HELA¹¹) vis-à-vis de nanofils de silicium d'une suspension directement diluée dans leur milieu de culture. Les nanofils de silicium sont de taille hétérogène : diamètres de 15 à 150 nm et longueurs de 300 nm à 5 µm. Les cellules HELA pré-confluentes d'une boîte de 25 cm² sont décollées par EDTA/trypsine, centrifugées et remises en suspension dans 10 mL de milieu DMEM/SVF.

¹¹ Les cellules HELA ont été utilisées pour cette étude car elles se décollent et se recollent plus facilement que les CHO et sont plus adéquates pour des mesures en cytofluorométrie de flux.

Un mL de suspension cellulaire est dilué dans 9 mL de DMEM/SVF. On place ensuite 1 mL de cette suspension cellulaire par puits. Les nanofils en suspension dans de l'eau déionisée sont placés 15 minutes à l'étuve pour stériliser la suspension. Avant la mise en contact avec les cellules, les nanofils sont placés 5 minutes aux ultrasons. On met ensuite 20 μ L de la suspension de nanofils par puits. Les cellules sont mises en culture 3 jours à 37°C.

Les observations en TEM révèlent qu'il y a plutôt un phénomène de reconnaissance et d'adhésion des cellules envers les nanofils de silicium et qu'il n'y a pas d'effet d'endocytose. (Aucun nanofil n'est observé dans les cellules en imagerie TEM). Nous avons également réalisé des études de cytofluorométrie de flux qui ont montré que le taux de croissance des cellules et le taux moyen de cellules non viables sont comparables qu'il y ait ou non la présence de la suspension de nanofils dans le milieu de culture à 3 jours comme à 4 jours et demi d'incubation.

Pour les mesures en cytofluorométrie de flux (prolifération et viabilité de cellules), le milieu des puits est remplacé par 1 mL de PBS/EDTA 10 mM qu'on laisse incuber 5 minutes pour décoller les cellules et les transférer dans des tubes Ependorff de 1,5 ml. Les puits sont rincés à nouveau avec 250 μ L de PBS/EDTA 10 mM qui sont aussi transférés dans les tubes Ependorff. Les cellules sont centrifugées 2 fois 1 minute à 1200 tours/minute puis remises en suspension dans 500 μ L de DMEM/SVF. Dans chaque tube Ependorff, on ajoute 0,5 μ g d'IP (1 μ L à 500 ng de PI/ μ L) et 25 μ L de diacétate de fluorescéine (DAF) à 5 μ g/mL de PBS. La suspension de cellules est ensuite mélangée puis transférée dans un tube pour les mesures en cytofluorométrie et injectée à vitesse médium pendant 1 minute.

2.4. Perspective : localisation de cellules sur surface plane à l'aide de nanofils de silicium.

Nous avons développé un type de support qui pourrait être adéquat pour la localisation des cellules sur des surfaces planes en tirant partie de la propriété des nanofils de silicium superhydrophobes à repousser des cellules. En effet, les cellules adhèrent parfaitement sur des surfaces planes, et nous le supposons, dans des conditions certainement plus naturelles que sur des nanofils de silicium superhydrophiles. Si les cellules sont viables au contact des nanofils de silicium, des études plus poussées (par exemple l'analyse de protéines de stress exprimées ou non) sont requises avant de conclure que les cellules y sont totalement indifférentes. Il est donc plus convenable pour des mesures sur cellule isolée ou même pour des applications de laboratoires sur puce, de piéger les cellules sur une surface plane. Nous avons donc réalisé, dans cette perspective, un support constitué de plots de silicium plat hydrophiles, entourés de nanofils de silicium superhydrophobes (Figure 5.14). Les étapes que nous avons optimisées pour la réalisation du support sont définies en Annexe 2-B.

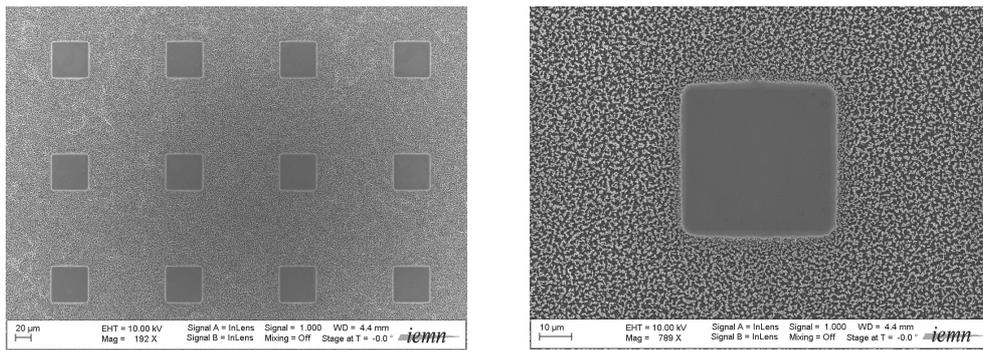


Figure 5.14. Image MEB d'un support dédié pour la localisation de cellules sur des plots de silicium plats hydrophiles, entourés de nanofils de silicium superhydrophobes.

3. Anti-adhésion de spores hydrophobes sur des nanofils de silicium superhydrophiles.

Nous avons étudié l'adhésion de spores sur des surfaces de silicium en variant la chimie et la structuration de surface. Les spores sont des bactéries « en dormance ». Dans cet état les bactéries adoptent une forme de résistance, elles ne se divisent pas et ne prolifèrent pas comme elles le feraient sous leur forme végétative. Nous avons choisi de commencer l'étude dans le cas simplifié des spores et nous avons regardé leur comportement d'adhérence.

Nous avons travaillé avec l'unité de génie et microbiologie des procédés alimentaires de l'INRA Institut National de Recherche Agronomique de Villeneuve d'Ascq, qui étudient entre autre les forces d'adhésions de divers types de spores (différentes lignées, variation de la chimie de surface d'une même lignée de spores) sur divers types d'aciers. En effet, l'acier est un matériau de choix pour la construction d'équipements de stockage alimentaire car il possède entre autre une grande résistance à la corrosion.

3.1. Adhésion de spores sur l'acier

La contamination des surfaces par des micro-organismes est une grande préoccupation de l'industrie agroalimentaire.^{257,258} Comme il existe une grande variété de types d'aciers, cela rend difficile l'étude des facteurs dominant l'interaction des bactéries avec la surface. En effet, différentes conclusions ont été tirées selon la topographie²⁵⁹ ou encore les propriétés physico-chimiques des échantillons d'acier.^{260,261}

La plupart des micro-organismes étant chargés négativement à pH neutre, on pourrait croire que les surfaces chargées négativement réduisent l'adhésion microbienne.²⁶²

Cependant, dû à la forte concentration en électrolytes dans le milieu, les répulsions électrostatiques deviennent négligeables lors de l'adhésion des bactéries.

D'un autre côté, l'influence de l'énergie de surface du matériau est aussi controversée. De nombreux articles tendent à souligner le rôle des interactions hydrophobes comme étant fortement déterminant.^{261,263} Mais les désaccords sur les observations sont très souvent liés aux hétérogénéités de surface telles que les grains de l'acier inoxydable qui sont des sites favorisant l'accrochage de bactéries. En effet, à part les propriétés physico-chimiques, la topographie de surface joue un rôle majeur, surtout dans la rétention des bactéries soumises à des conditions de flux dynamiques. En effet, la littérature montre que les irrégularités de surface peuvent aider les bactéries à résister à des forces d'arrachement,²⁶⁴ et la taille des irrégularités ressort comme un paramètre non négligeable.²⁵⁹ Les bactéries peuvent par exemple se fixer dans les crevasses (Figure 5.15), et la rétention bactérienne augmente alors nettement.²⁶⁵ Dans le cas contraire où les crevasses sont plus petites que les bactéries, le contact entre les bactéries et la surface est discontinu et la force d'interaction des bactéries avec la surface peut être diminuée.²⁶⁶

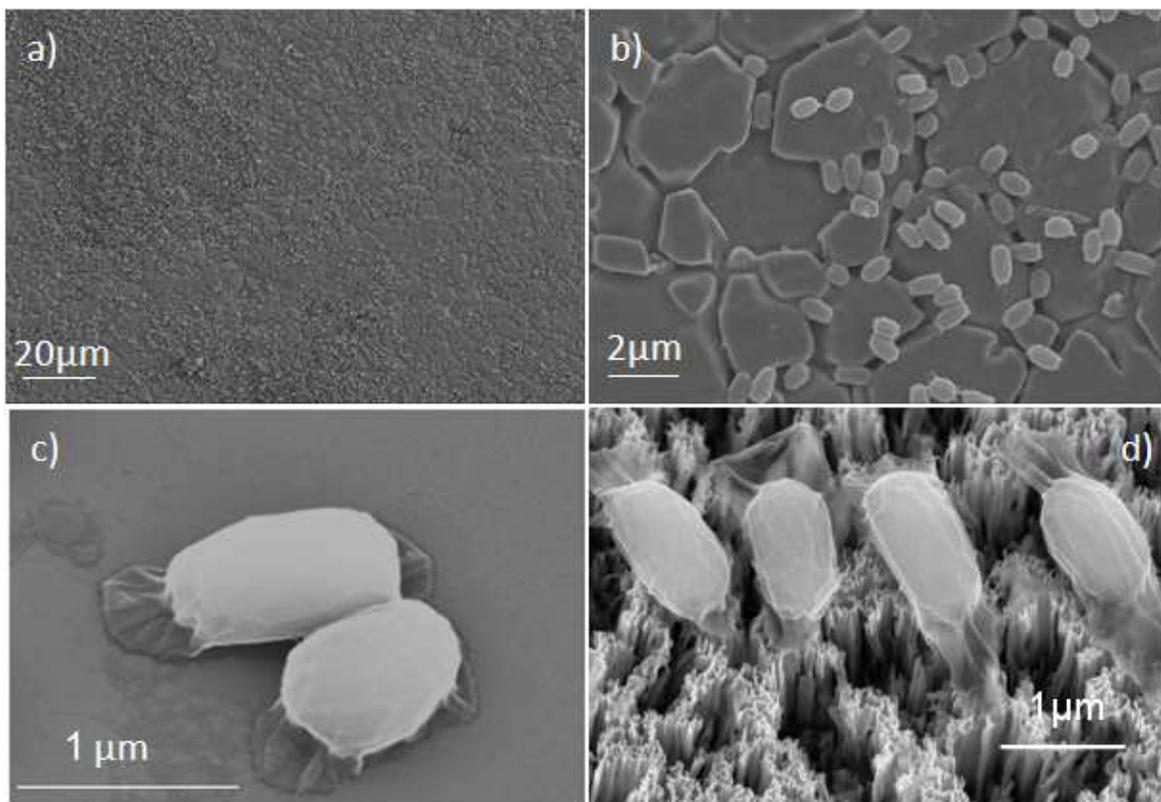


Figure 5.15. Images MEB¹² de spores sur de l'acier en a) et zoom montrant les spores dans les crevasses de l'acier en b) ; zoom sur deux spores déposées sur du silicium plat en c) et sur des nanofils de silicium en d).

¹² Les surfaces avec les spores adhérentes sont métallisées avant l'observation au MEB.

La contribution de chaque paramètre reste tout de même difficile à élucider. Pour avancer vers le développement de matériaux « anti-fouling » et pour essayer de mieux comprendre les rôles de la chimie du matériau, des tensions de surface ou encore de la topographie sur l'adhésion des spores, nous avons étudié l'adsorption de spores sur différents types de surfaces de silicium:

- Surface de silicium plat comportant des régions de $50 \mu\text{m}^2$ hydrophiles de terminaison Si-OH en surface, entourées de régions hydrophobes (schéma de gauche en Figure 5.16, protocole de préparation en Annexe 2. A).
- Surface de nanofils de silicium réalisés par voie chimique (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), comportant des régions de $50 \mu\text{m}^2$ superhydrophiles entourées de régions superhydrophobes (schéma de droite en Figure 5.16). Les nanofils ont un diamètre moyen de 20 à 80 nm, et une longueur de $2.5 \mu\text{m}$. L'espacement entre les nanofils est légèrement inférieure à la taille des spores comme on peut le voir en Figure 5.15.

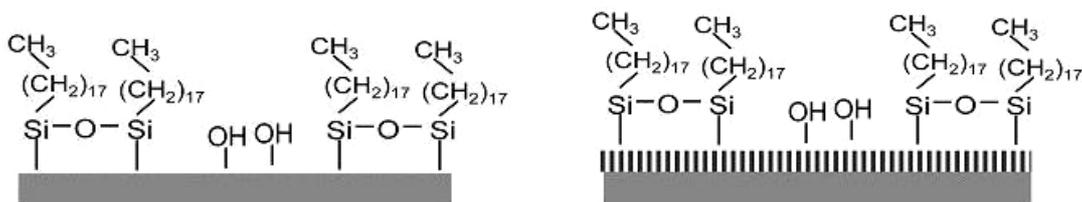


Figure 5.16. Schéma d'une surface plane de silicium avec des régions hydrophiles (terminaison OH) et des régions hydrophobes (terminaison $\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$) à gauche, et d'une surface de nanofils de silicium avec des régions superhydrophiles (terminaison OH) et des régions superhydrophobes (terminaison $\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$) à droite.

3.2. Adhésion sélective de spores *Bacillus Cereus* sur nanofils de silicium dans des zones hydrophobes et superhydrophobes.

Grâce aux deux surfaces de silicium présentées plus haut, nous pouvons étudier l'adhésion des spores *Bacillus Cereus* sur deux types de chimie de surface, et deux topographies, mais aussi suivant des zones de différentes tensions de surfaces : superhydrophiles, hydrophiles, hydrophobes ou encore superhydrophobes. On peut schématiser les deux surfaces comme ci-dessous (Figure 5.17) suivant les angles de contact du tableau.

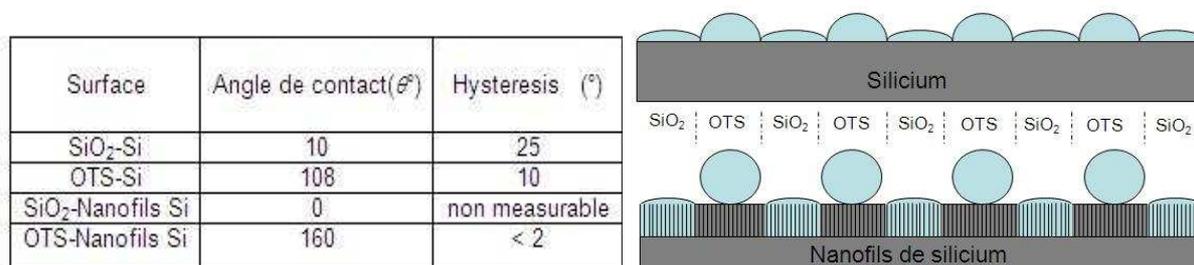


Figure 5.17. Schéma des surfaces de silicium et de nanofils de silicium avec les zones 'SiO₂/OTS' en coupe et tableau avec la valeur des angles de contact associés à chaque zone.

Pour évaluer l'interaction préférentielle des spores avec une zone, on observe le nombre de spores ayant adhéré sur chaque zone après incubation et un rinçage doux à l'eau. Les spores *Bacillus Cereus* (ATCC 14579^T) ont été marquées avec la GFP.¹³

Les spores sont produites à 30°C sur de la gélose (Spo8-agar) contenant 8 g.L⁻¹ de nutriments (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), 0.5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0.9 g.L⁻¹ KCl, 0.2 g.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O, 3.10⁻³ g.L⁻¹ MnCl₂.4H₂O, 0.55.10⁻³ g.L⁻¹ Fe₂SO₄.7H₂O, et 1,5% de gélose. A 95% de confluence, les spores sont récoltées en grattant la surface puis lavées 5 fois dans de l'eau fraîche. Une suspension aqueuse contenant 10⁶ spores/mL est préparée par dilution d'une solution de 10 mL contenant 10⁸ spores que l'on agite aux ultrasons (Deltasonic Meaux, France, 40 kHz) durant 1 minute pour éliminer les agrégats.

La suspension contenant 10⁶ spores/mL est bien agitée juste avant que les surfaces ne soient incubées verticalement pendant 30 minutes à température ambiante. Les surfaces sont ensuite rincées délicatement par trempage vertical dans une solution d'eau milliQ (5x) puis finalement séchées sous un flux d'air.

La Figure 5.18 montre les observations en fluorescence et au MEB après incubation et un doux rinçage pour les surfaces planes hydrophiles (zone carrée)/hydrophobes (zone autour du carré). Les spores se sont 'attachées' aux zones hydrophobes du silicium plat, tandis que très peu sont restées sur les zones hydrophiles. On observe aussi la surface après un rinçage plus drastique par agitation avec un vortex pendant 1 minute dans un tube de 35 mL d'eau milliQ. Malgré les turbulences lors de l'étape de rinçage par vortex, aucune

¹³ The spores were tagged with a GFP. A BamHI fragment from pPE28 containing the *gfp* gene under the control of *spoIIQ* promoter was cloned into BamHI restriction site of pHT315, yielding the pYL300 vector. The pYL300 vector was electroporated into ATCC 14579^T. Strain ATCC 14579^T pYL300 was used to produce fluorescent spores as previously described [Faille, C et al. J. Food Prot. 2007, 70, 2346-2353].

spore ayant adhéré à la surface ne se décroche quelque soit le type de zone, et que la surface soit plane ou structurée de nanofils de silicium.

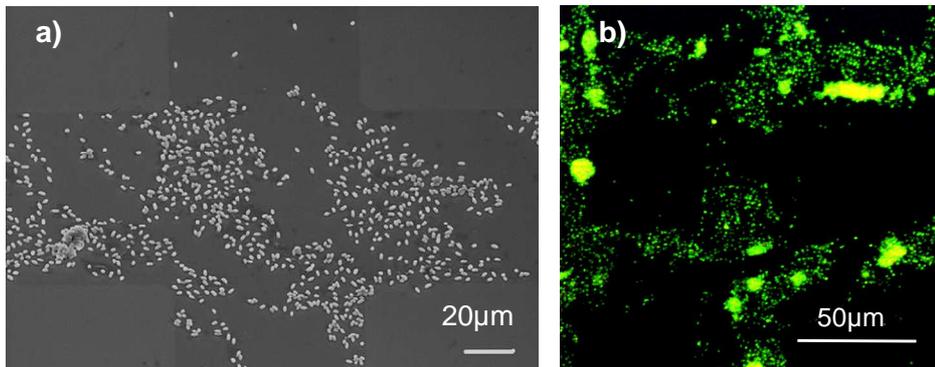


Figure 5.18. Image MEB¹⁴ (a) et en fluorescence (x1000) (b) des spores *Bacillus Cereus* après incubation avec les surfaces de silicium plat renfermant des zones carrées hydrophiles de 50 µm² entourées de zones hydrophobes.

En ce qui concerne la surface des nanofils de silicium, les spores ont également adhéré sur les régions superhydrophobes et quasiment pas sur les régions superhydrophiles (Figure 5.19).

La terminaison chimique du silicium semble avoir un rôle de grande importance puisqu'il n'y a presque pas de spores dans les régions au contact du liquide. Les forces de répulsion entre les surfaces de terminaison chimique Si-OH et les spores hydrophobes sont donc non négligeables. Les forces d'attraction entre les chaînes apolaires des spores et le silicium méthylé semblent assez conséquentes puisque le rinçage par vortex ne permet pas de détacher les spores des surfaces.

Par ailleurs, il y a globalement moins de population sur les zones superhydrophobes des nanofils de silicium que sur les zones hydrophobes du silicium plat. On peut supposer que cela est dû au contact discontinu entre les spores et la surface comme l'a déjà montré l'étude d'Emmerson et al.²⁶⁶ De plus, la taille des nanofils et leur espacement favorise un état Cassie-Baxter (Annexe 1) si on considère l'angle de contact observé et la faible hystérésis mesurée sur ces nanofils superhydrophobes (Figure 5.17). L'air piégé entre les nanofils augmente la force de répulsion appliquée sur l'eau contenant les spores, ce qui pourrait expliquer qu'il y ait une probabilité de contact avec les spores plus faible et donc globalement moins de spores sur les zones superhydrophobes que sur les zones hydrophobes.

¹⁴ Les surfaces avec les spores adhérentes sont métallisées avant l'observation au MEB.

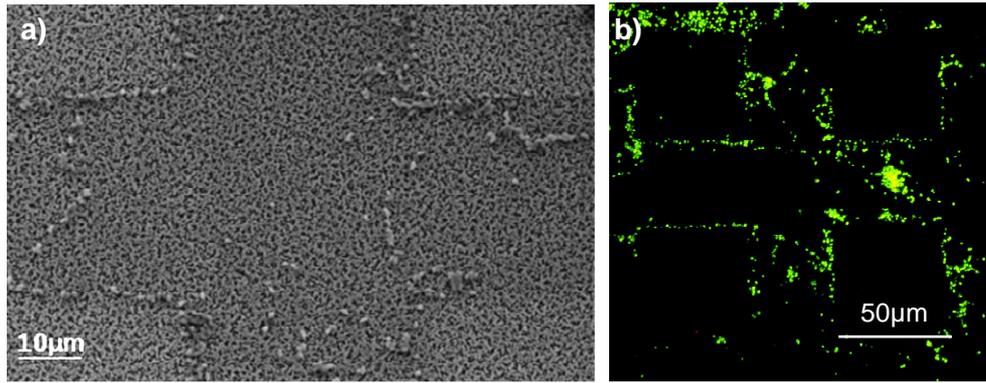


Figure 5.19. Image MEB¹⁵ (a) et en fluorescence (b) des spores *Bacillus Cereus* après incubation avec les surfaces de nanofils de silicium renfermant des zones superhydrophiles de 50 μm² entourées de zones superhydrophobes.

Sur la Figure 5.19, on remarque aussi une tendance des spores à se positionner et à s'aligner à l'interface superhydrophile/superhydrophobe. Lorsqu'on retire la surface de la suspension de spores, le liquide reste uniquement dans les zones superhydrophiles. Il est possible que les spores s'accumulent au bord de celles-ci étant donné leur peu d'affinité avec la terminaison chimique Si-OH, où aussi par effet donut.

En conclusion, la géométrie des nanofils de silicium (déterminant le caractère superhydrophobe Cassie-Baxter – Annexe 1) et la chimie de surface (interaction apolaire - Chapitre 2 .3.2.4) s'avèrent donc déterminants pour l'aspect anti-bactérien.

3.3. Influence de la micro/nano structuration de surface sur la rétention de spores soumises à la pression d'un flux microfluidique.

Le nombre de spores hydrophobes ayant adhéré dans les zones hydrophiles étant très faible ainsi que dans les zones superhydrophiles, une question demeure sur les forces d'adhésion des spores impliquées dans les deux cas. De même, on peut se demander si les forces d'adhésion entre des spores hydrophiles en surface sont moindres sur une surface hydrophobe ou superhydrophobe. Pour cela, on peut utiliser un dispositif microfluidique pour déterminer les forces d'adhésion selon la pression fluide qui permet de décrocher les spores ayant adhéré à une surface. Nous avons commencé la fabrication d'un dispositif permettant d'étudier ces forces sur nos échantillons de nanofils de silicium (Figure 5.20).

¹⁵ Les surfaces avec les spores adhérentes sont métallisées avant l'observation au MEB.

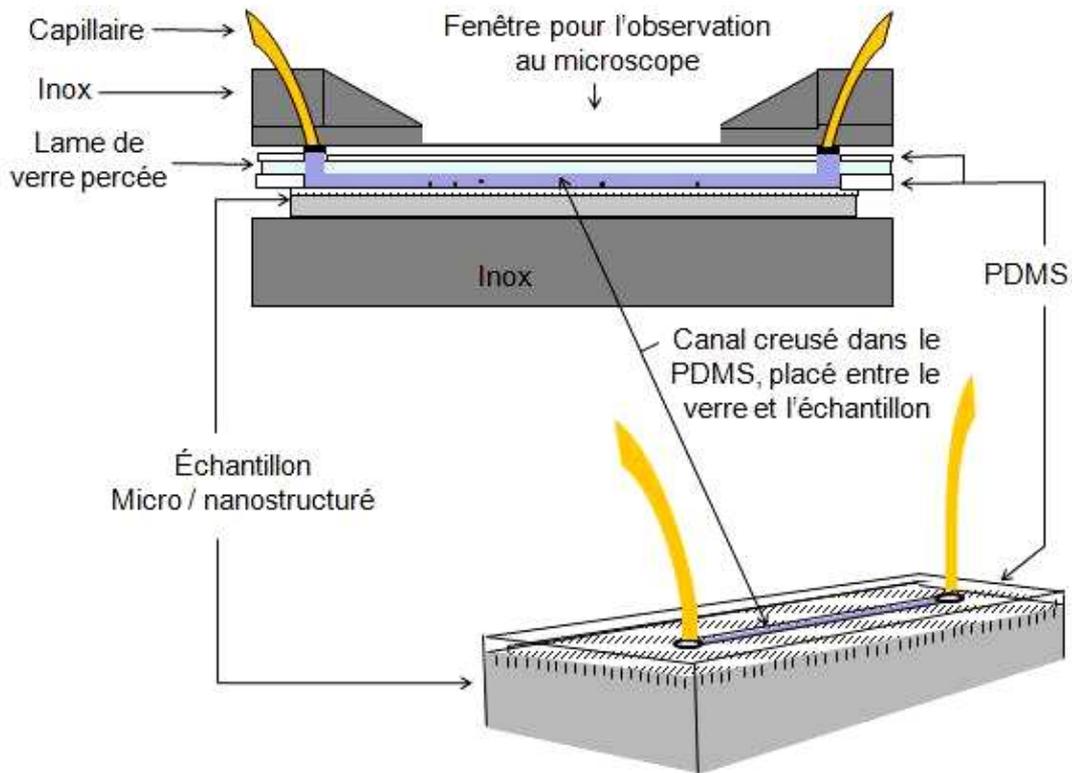


Figure 5.20. Dispositif microfluidique permettant de mesurer la pression fluïdique dans le canal nécessaire pour décrocher les spores de l'échantillon Micro/nanostructuré.

Les perspectives sont donc de déterminer l'influence de la micro/nanostructuration combinée à une chimie de surface contrôlée sur l'adhésion de spores. Une étude complète serait de varier la taille des micro/nanostructures, le type de chimie de surface de l'échantillon mais aussi celle des spores. Enfin, après l'étude du cas simplifié du silicium, il faudrait pouvoir à terme appliquer les meilleures conditions de structurations et de chimies sur les échantillons d'acier.

4. Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que l'on peut réaliser la culture et la localisation de cellules CHO sur des nanofils de silicium. Les cellules prolifèrent sur les zones de nanofils de silicium superhydrophiles de $50 \mu\text{m}^2$ (groupes silanols en surface des nanofils) et sont repoussées par les zones superhydrophobes (chaînes carbonées en surface des nanofils). Le résultat de cette adhésion localisée des cellules est largement influencé par la mouillabilité de la surface et/ou la pré-adsorption de protéines du milieu de culture. La compréhension des deux phénomènes constitue un intérêt grandissant pour des applications de laboratoire sur puce et puces à cellules. La variation de l'organisation géométrique des micro/nanostructures ou encore de leur chimie de surface peut mener à des propriétés uniques de répulsion de liquide, ou encore modifier les forces d'adhésion des protéines. Il y a donc de nombreux avantages à tirer des nanofils de silicium et de leur intégration dans divers dispositifs.

Nous avons montré que la viabilité et la prolifération des cellules n'est pas sensiblement affectée par la présence de nanofils de silicium en suspension dans leur milieu de culture. Nous n'avons pas observé de phénomène d'endocytose en MEB et TEM, le diamètre minimal et la longueur minimale des nanofils valant respectivement 15 et 300 nm.

Si la viabilité des cellules au contact des nanofils est satisfaisante, nous envisageons par ailleurs la possibilité d'immobiliser de manière précise des cellules sur des plots de silicium plat grâce à un procédé simple de lithographie optique et de croissance localisée de nanofils de silicium. Dans ce cas les cellules ne seraient pas en contact avec les nanofils de silicium pendant les mesures, aboutissant à des analyses plus authentiques.

Finalement, nous avons montré que la combinaison de la micro/nanostructuration et de la modification chimique de surface présente un impact non-négligeable sur l'adhésion de spores *Bacillus Cereus*. Les spores dont la surface est hydrophobe adhèrent sur des zones de silicium hydrophobes ou sur des zones de nanofils de silicium superhydrophobes. Cependant, les zones superhydrophobes repoussent fortement l'eau et il y a globalement moins de spores adhérentes que sur les zones hydrophobes. Le rinçage par vortex n'a pas permis de détacher les spores et les forces d'interactions des spores, que ce soit avec les surfaces hydrophobes ou superhydrophobes, semble assez conséquente. Très peu de spores ont adhéré sur les zones hydrophiles et encore moins sur les zones superhydrophiles. Des mesures de la pression fluide nécessaire à déplacer/décrocher les spores pourraient apporter de nouvelles informations sur ces forces d'interaction. En conclusion, là aussi le contrôle de la micro/nanostructuration et de la modification chimique des surfaces, que ce soit le silicium ou un autre matériau, est donc une piste très avantageuse pour des applications antibactériennes.

5. Bibliographie

- ²²⁷ Irish, J.; Kotecha, N.; Nolan, G. "Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell "proteomics"", *Nature Reviews Cancer* **2006**, 3, 6, 146-155.
- ²²⁸ Abercrombie, M. "Contact inhibition: the phenomenon and its biological implications", *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **1967**, 26, 249-277.
- ²²⁹ Borek, C.; Higashino, S.; Loewenstein, W.R. "Intercellular communication and tissue growth: conductance of membrane junctions of normal and cancerous cells in culture", *Journal of Membrane Biology.* **1969**, 1, 1, 274-293.
- ²³⁰ Mesnil, M. "Connexins and cancer", *Biology of the Cell.* **2002**, 94, 493-500.
- ²³¹ Bhatia, S.; Balis, U.; Yarmush, M.; Toner, M. "Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells", *FASEB J.* **1999**, 13, 1883-1900.
- ²³² Goldberg, G.; Lampe, P.; Nicholson, B. "Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins", *Nat. Cell Biol.* **1999**, 1, 457-459.
- ²³³ Genes, L.; Tolan, N.; Hulvey, M.; Martin, R.; Spence, D. "Addressing a vascular endothelium array with blood components using underlying microfluidic channels", *Lab Chip* **2007**, 7, 1256-1259.
- ²³⁴ Ali, J.; Sorger, P.; Jensen, K. "Cells on chips", *Nature.* **2006**, 442, 403-411.
- ²³⁵ Lee, P.; Shaw, P.; Luke, L. "Microfluidic application-specific integrated device for monitoring direct cell-cell communication via gap junctions between individual cell pairs", *Applied Physics Letters.* **2005**, 86, 223902.
- ²³⁶ Chronis, N.; Lee, L.P. "Electrothermally activated SU-8 microgripper for single cell manipulation in solution", *J. Microelec. Syst.* **2005**, 14, 857-863.
- ²³⁷ Di Carlo, D.; Wu, L.Y.; Lee, L.P. "Dynamic single cell culture array", *Lab Chip.* **2006**, 6, 1445-1449.
- ²³⁸ Irimia, D.; Toner, M. "Cell handling using microstructured membranes", *Lab Chip.* **2006**, 6, 345-352.
- ²³⁹ Gray, D.S.; Tan, J.L.; Voldman, J.; Chen, C.S. "Dielectrophoretic registration and living cells to a microelectrode array", *Biosensors and Bioelectronics.* **2004**, 19, 1765-1774.
- ²⁴⁰ Ostuni, E.; Kane, R.; Chen, C.S.; Ingber D.E.; Whitesides, G.M. "Patterning mammalian cells using elastomeric membranes", *Langmuir.* **2000**, 16, 7811-7819.
- ²⁴¹ They, M.; Pépin, A.; Dressaire, E.; Chen, Y.; Bornens, M. "Cell Distribution of Stress Fibres in Response to the Geometry of the Adhesive Environment", *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **2006**, 63, 341-355.
- ²⁴² Veisheh, M.; Wyckes, B.T.; Castner, D.G.; Zhang, M. "Guided cell patterning on gold-silicon dioxide substrates by surface molecular engineering", *Biomaterials* **2004**, 25, 3315-3324.

- ²⁴³ Kim, W.; Ng, J. K.; Kunitake, M. E.; Conklin, B. R.; Yang, P. “*Interfacing Silicon Nanowires with Mammalian Cells*”. *J.am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 7228-7229.
- ²⁴⁴ Kwon, N. H.; Beaux, M. F.; Ebert, C.; Wang, L.; Lassiter, B. E.; Park, Y. H.; McIlroy, D. N.; Hovde, C. J.; Bohach, G. A. “*Nanowire-Based Delivery of Escherichia coli O157 Shiga Toxin 1 A Subunit into Human and Bovine Cells*”. *Nano Letters.* **2007**, 7, 9, 2718-2723.
- ²⁴⁵ Sun, T.; Tan, H.; Han, D.; Fu, Q.; Jiang, L., “*No Platelet Can Adhere Largely Improved Blood Compatibility on Nanostructured Superhydrophobic Surfaces*”. *Small* **2005**, 10, 959 – 963.
- ²⁴⁶ Hallstrom, W.; Mårtensson, T.; Prinz, C.; Gustavsson, P.; Montelius, L.; Samuelson, L.; Kanje, M. “*Gallium Phosphide Nanowires as a Substrate for Cultured Neurons*”. *Nano Letters* **2007**, 7, 10, 2960-2965
- ²⁴⁷ Oh, S.; Brammer, K.S.; Julie Li, Y.S.; Teng, D.; Engler, A.J. ; Chien, S. ; Jin, S. “*Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension*”. *PNAS.* **2009**, 106, 7, 2130-2135.
- ²⁴⁸ Brammer, K.S.; Choi, C.C.; Oh, S., Cobb, C.J. ; Connelly, L.S. ; Loya, M. ; Kong, S.D.; Jin, S. “*Antibiofouling, sustained antibiotic release by Si Nanowire templates*” *Nanoletters.* **2009**, 9, 10, 3570-3574.
- ²⁴⁹ Prinz, C.; WaldemarHällström; Martensson, T.; Samuelson, L.; Montelius, L.; Kanje, M., “*Axonal guidance on patterned free-standing nanowire surfaces*”. *Nanotechnology* **2008**, 19, 345101-345106.
- ²⁵⁰ Lee, J.; Kang, B. S.; Hicks, B.; Jr., T. F. C.; Chu, B. H.; Wang, H.-T.; Keselowsky, B. G.; Ren, F.; Lele, T. P., “*The control of cell adhesion and viability by zinc oxide nanorods. Biomaterials*” **2008**, 29, 3743–3749.
- ²⁵¹ Roach, P.; Shirtcliffe, N. J.; Farrar, D.; Perry, C. C., “*Quantification of surface-bound proteins by fluorometric assay : Comparison with quartz crystal microbalance and amido black assay*”. *The journal of physical chemistry. B.* **2006**, 110, 41, 20572-20579
- ²⁵² Chen, P., *232nd ACS National Meeting* **2006**, COLL-556.
- ²⁵³ Beringer, J.; Terretaz, S.; Michel, R.; Tirelli, H.; Vogel, M.; Textor, M.; Hubbell, J. “*Chemisorbed poly(propylene sulphide)-based copolymers resist biomolecular interactions*”. *Nature materials.* **2003**, 2, 4, 259-264.
- ²⁵⁴ Huber, D.; Manginell, D.; Samara, M.; Kim, B.; Bunker, B. “*Programmed Adsorption and Release of Proteins in a Microfluidic Device*”. *Science.* **2003**, 301, 352-354.
- ²⁵⁵ Mandal, H. S.; Kraatz, H.-B. “*Effect of the Surface Curvature on the Secondary Structure of Peptides Adsorbed on Nanoparticles*”. *Journal of the American Chemical Society.* **2007**, 129, 20, 6356-6357.
- ²⁵⁶ Koc, Y.; Mello, A. J. d.; McHale, G.; Newton, M. I.; Roach, P.; Shirtcliffe, N. J. “*Nano-scale superhydrophobicity: suppression of protein adsorption and promotion of flow-induced detachment*”. *Lab on a Chip.* **2008**, 8, 582–586.
- ²⁵⁷ Haeghebaert, S.; Le Querrec, F.; Vaillant, V.; Delarocque Astagneau, E.; Bouvet, P. “*Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1998*”. *BEH* **2001**, 15, 1-12.

- ²⁵⁸ Storgårds, E.; Tapani, K.; Hartwall, P.; Saleva, R.; Suihko, M. L. “*Microbial Attachment and Biofilm Formation in Brewery Bottling Plants*” *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2006**, 64, 8-15.
- ²⁵⁹ Faille, C.; Membré, J. M.; Tissier, J. P.; Bellon-Fontaine, M. N.; Carpentier, B.; Laroche, M. A.; Bénézech, “*Influence of physicochemical properties on the hygienic status of stainless steel with various finishes*” *T. Biofouling* **2000**, 15, 261-274.
- ²⁶⁰ Flint, S. H.; Brooks, J. D.; Bremer, P. J. “*Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci*”. *J. Food Eng.* **2000**, 43, 235-242.
- ²⁶¹ Vadillo-Rodriguez, V.; Busscher, H. J.; van der Mei, H. C.; de Vries J.; Norde, W. “*Role of Lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength*”. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2005**, 41, 33-41.
- ²⁶² Mercier-Bonin, M.; Ouazzani, K.; Schmitz P.; Lorthois, S. “*Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system*”. *J. Colloid Interf. Sci.* **2004**, 271, 342-350.
- ²⁶³ Ong, Y. L.; Razatos, A.; Georgiou, G.; Sharma, M. M. “*Adhesion forces between E. coli bacteria and biomaterial surfaces*”. *Langmuir* **1999**, 15, 2719-2725.
- ²⁶⁴ Verran, J.; Rowe, D. L.; Boyd, R. D. “*The effect of nanometer dimension topographical features on the hygienic status of stainless steel*”. *J. Food Prot.* **2001**, 64, 1183-1187.
- ²⁶⁵ Whitehead, K. A.; Colligon, J., Verran, “*The production of surfaces of defined topography and chemistry, and their effects on microbial retention*”. *J. Colloids Surf. B Biointerfaces* **2005**, 41, 129-138.
- ²⁶⁶ Emerson, R. J.; Bergstrom, T. S.; Liu, Y.; Soto, E. R.; Brown, C. A.; McGimpsey, W. G.; Camesano, T. A. “*A microscale correlation among surface chemistry, texture and the adhesive strength of Staphylococcus epidermidis*”. *Langmuir* **2006**, 22, 11311-11321.

Conclusion Générale

Dans le premier chapitre, nous avons vu que la technique d'analyse MALDI est l'une des principales techniques employées pour l'analyse d'échantillons de biomolécules en spectrométrie de masse et qu'elle est très avantageuse pour l'analyse de mélanges complexes et d'échantillons à forte concentration en sels. Cependant le MALDI présente des limitations pour l'analyse de molécules de masses inférieures à 700 Da, alors que les défis des analyses sont majeurs en terme de compréhension des processus biologiques : caractérisation complète de toutes les séquences peptidiques pour la mise en évidence des phénomènes associés au cancer (modifications post-traductionnelles, mutations, liaisons intra- et intermoléculaires), analyse toujours plus sensible car les protéines responsables des maladies sont le plus souvent sous-exprimées (en faible quantité). Ceci justifie la nécessité de développer des techniques alternatives comme le DIOS ou la LDI-MS sur nanofils de silicium pour palier aux inconvénients du MALDI et améliorer les sensibilités de détection des biomolécules.

Afin de déterminer le support de nanofils de silicium optimal pour les analyses LDI-MS, nous avons regardé de plus près le mécanisme de cette technique en examinant l'effet de plusieurs paramètres : la morphologie des nanofils de silicium, leur chimie de surface, leurs propriétés optique et thermique. Nous avons montré qu'il existe diverses méthodes physiques et chimiques de fabrication de nanofils de silicium. Nous avons utilisé les méthodes de fabrication par voie VLS et par voie chimique (HF/AgNO_3) puis présenté les différentes morphologies de nanofils qu'il est possible d'obtenir grâce à ces deux méthodes. Les nanofils de silicium ont ensuite été fonctionnalisés chimiquement par des silanes hydrophobes et nous avons exposé les propriétés de mouillage de surface qui en résultent. Finalement, nous avons donné l'état de l'art concernant les propriétés optiques et thermiques des nanofils de silicium.

Les résultats obtenus sur les différents supports de nanofils de silicium en LDI-MS ont permis de discuter de l'importance des propriétés optiques et thermiques des nanofils de silicium, de la mouillabilité de surface des nanofils de silicium et de l'accessibilité des molécules (réparties sur les nanofils de silicium) au faisceau laser.

Dans un premier temps, la modification des nanofils de silicium par des silanes hydrophobes a clairement permis de limiter l'infiltration des analytes : nous supposons que cela favorise leur distribution sur le haut des nanofils et les rends plus accessibles au faisceau laser. Dans un deuxième temps, nos résultats rejoignent la littérature sur le fait que la morphologie des nanofils de silicium est un paramètre critique et semblent indiquer, de plus, un rôle prédominant du facteur de densité des nanofils. En ce qui concerne le phénomène de désorption, les caractéristiques de réflectivité et de photoluminescence

quasi-nulles des nanofils de silicium nous amènent à considérer des effets photothermiques et un transfert d'énergie thermique des nanofils de silicium aux analytes. Ce transfert d'énergie serait assuré d'une part par le confinement des phonons dans les nanofils de silicium et d'autre part par les propriétés de conductivité thermique du silicium.

Si nous avons déterminé un support de nanofils optimal pour les analyses LDI-MS, nous avons également décrit quelques études et perspectives pour avancer vers la compréhension de l'effet de la morphologie des nanofils de silicium (répartition des analytes en surface, meilleur confinement des phonons, rôle sur la dynamique de la « plume ») sur l'efficacité des analyses LDI-MS.

Le support de nanofils optimal présente une sensibilité de détection LDI-MS de molécules de faibles poids moléculaire de l'ordre de 5 femtomol/ μ l, et de l'ordre de 700 femtomol/ μ l pour un mélange de peptides issues de la digestion d'une protéine, avec une reconnaissance de la protéine de 99%. Nous avons également testé des nanotubes de TiO_2 comme support pour la LDI-MS qui présente un potentiel pour la détection fine de phosphopeptides. Le support optimal s'est révélé légèrement moins performant que le support de nanofils de silicium, la sensibilité de détection LDI-MS de molécules de faibles poids moléculaire étant de l'ordre de 50 femtomol/ μ l. Il serait intéressant d'étudier d'autres types de morphologies de nanotubes.

Le support de nanofils de silicium optimal pour les analyses LDI-MS est avantageux car sa fabrication est simple, rapide et peu coûteuse, et nous avons montré qu'il s'intègre aux dispositifs de biopuces et laboratoires sur puce.

La technique LDI-MS sur ce support a permis de suivre les étapes de la réaction de méthylation des peptides, ces derniers étant adsorbés sur les nanofils de silicium. Ce contrôle assure la qualité de conception d'une biopuce à peptides méthylés et ouvre des perspectives quand à la fabrication de biopuces à peptides modifiés de manière à détecter des modifications post-traductionnelles de protéines.

Nous avons montré, par ailleurs, que ce support de nanofils de silicium silanisé par un OTS s'intègre comme capot dans un laboratoire sur puce. Cela a permis d'effectuer des déplacements rapides et à une tension raisonnable de mélanges de peptides avec le microsystème EWOD. Une lithographie optique réalisée sur le capot pour définir des plots superhydrophiles (terminaison chimique des nanofils Si-O-H) a également permis un dépôt spécifique de gouttelettes dans ces plots après déplacement d'une goutte contenant un mélange peptidique en concentration 50 femtomol/ μ l. Le mélange peptidique a été analysé avec succès par LDI-MS dans ces plots. Ce système nous permet donc de nous situer à l'état de l'art (sensibilité de détection, originalité des analyses LDI-MS sans l'utilisation de

matrice). En perspective, on pourra envisager une chimie spécifique (IMAC par exemple) dans les plots pour favoriser les interactions avec le type d'analytes que l'on souhaite détecter en LDI-MS, ou au contraire se séparer de constituants. Ceci doit permettre de réaliser des opérations de prétraitement (digestion trypsique, dessalage, séparation ...) intégrées afin d'analyser un échantillon brut et d'atteindre des seuils de sensibilité ultimes.

Finalement, en parallèle à ces travaux, nous avons démontré que l'on peut réaliser la culture et la localisation de cellules CHO sur des nanofils de silicium. Les cellules sont viables, prolifèrent sur les zones de nanofils de silicium superhydrophiles de $50 \mu\text{m}^2$ (groupes silanol en surface des nanofils) et sont repoussées par les zones superhydrophobes (chaînes carbonées en surface des nanofils).

Nous avons également réalisé une autre étude montrant que la viabilité et la prolifération des cellules n'est pas sensiblement affectée par la présence de nanofils de silicium en suspension dans leur milieu de culture. Nous n'avons pas observé de phénomène d'endocytose au MEB et TEM, le diamètre minimal et la longueur minimale des nanofils valant respectivement 15 et 300 nm.

Par ailleurs, nous avons constaté que des spores *Bacillus Cereus* dont la surface est hydrophobe adhèrent préférentiellement sur des zones de silicium hydrophobes ou sur des zones de nanofils de silicium superhydrophobes vis-à-vis de zones hydrophiles ou superhydrophiles.

Le résultat de cette adhésion localisée des cellules ou des bactéries est donc largement influencé par les deux facteurs de micro/nanostructuration et de chimie de surfaces, et laisse le champ à des études futures pour des aspects d'auto-nettoyage, ou d'anti-adhésion cellulaire ou bactérienne.

- Annexes -

Annexe 1 – Hystérésis, superhydrophobicité, superoléophobicité.

Définition de l'hystérésis

La formule de Young considère qu'il n'existe qu'un angle de contact, l'angle de contact statique, noté θ_0 . Cependant, cette configuration n'existe que pour des surfaces physiquement et chimiquement parfaites. En réalité, les surfaces présentent le plus souvent des imperfections, liées à des défauts physiques (rugosité), ou des défauts chimiques (présence de molécules organiques à la surface). L'angle statique est donc compris entre deux valeurs que l'on appelle angle d'avancée, noté θ_A , et angle de reculée, noté θ_R . Ces angles sont obtenus lorsqu'une goutte est déposée sur une surface inclinée (Figure 1).

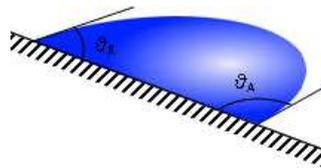


Figure 1. Angles d'avancée et de reculée d'une goutte sur un plan incliné.

L'hystérésis représente la force qui s'oppose au déplacement et correspond à la différence de ces deux angles ($\theta_a - \theta_r$). Si la valeur de l'hystérésis est faible, la goutte glisse alors plus facilement le long de la surface inclinée.

Etats superhydrophobes Wenzel et Cassie-Baxter.

Une goutte posée sur une surface rugueuse et hydrophobe peut adopter deux configurations : une configuration de type Wenzel^{16,17} (faible rugosité) et une configuration de type Cassie-Baxter¹⁸ (forte rugosité), comme présenté en Figure 3. La différence fondamentale entre les deux surfaces est en fait leur valeur d'hystérésis.

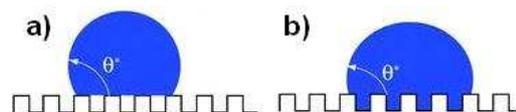


Figure 3. Représentation des deux types d'état superhydrophobe: a) modèle de Cassie-Baxter¹⁹, b) modèle de Wenzel.

¹⁶ Wenzel, R. N. "Resistance of solid surfaces to wetting by water", *Ind. Eng. Chem.* **1936** 28, 988-994.

¹⁷ Wenzel, R. N. "Surface roughness and contact angle", *J. Phys. Colloid Chem.* **1949**, 53, 1466-1467.

¹⁸ Cassie, A. B. D.; Baxter, S. "Wettability of porous surfaces", *Trans. Faraday Soc.* **1944**, 40, 546-551.

¹⁹ Callies, M.; Quéré, D. "On water repellency", *Soft Matter.* **2005**, 1, 55-61.

Le modèle proposé pour l'état Wenzel repose sur le fait que le liquide épouse la forme des micro/nanostructures. Ce modèle prédit que l'hydrophobie ou l'hydrophilie sont renforcés par la rugosité de surface selon l'équation :

$$\cos \theta^* = r \cos \theta$$

où θ^* est l'angle de contact apparent sur une surface rugueuse, θ est l'angle de contact sur une surface plane de terminaison chimique identique, et r est le facteur de rugosité ($0 < r < 1$).

Le modèle de l'état de Cassie-Baxter repose lui sur le piégeage de l'air entre les micro/nanostructures de la surface rugueuse et le liquide. Cassie et Baxter ont proposé l'équation suivante pour exprimer l'angle de contact :

$$\cos \theta^* = f_1 \cos \theta - f_2$$

où θ^* et θ sont les angles de contact respectifs d'une surface rugueuse et d'une surface plane de terminaison chimique identique, et f_1 et f_2 sont respectivement les fractions de surface de solide et d'air en contact avec l'eau.

L'instabilité de l'état Cassie-Baxter.

L'état de Cassie-Baxter est le seul à pouvoir assurer l'effet de « rolling ball ». Malheureusement cet état n'est pas stable et peut facilement passer en état Wenzel: Bico et al.²⁰ ont montré que le régime de Cassie-Baxter était thermodynamiquement stable sous une valeur seuil notée $\cos \theta_c$. En fait, lorsqu'on dépose une goutte sur une surface rugueuse, on se retrouve le plus souvent en configuration de Cassie-Baxter, même lorsque $\theta < \theta_c$ (pour l'eau, $\theta < 120^\circ$).^{21,22} Mais cet état est métastable : en appliquant une pression ou une tension sur la goutte par exemple, il est possible de passer en configuration de Wenzel stable et avec une hystérésis importante. La raison de l'instabilité de l'état de Cassie-Baxter n'est pas encore déterminée mais elle semble être fortement dépendante de la taille et de l'organisation des micro/nanostructures en surface, mais aussi de la nature du liquide.^{23,24}

²⁰ Bico, J.; Thiele, U.; Quéré, D. "Wetting of textured surfaces", *Colloids Surf.* **2002**, A 206, 41-46.

²¹ Shibuichi, S.; Onda, T.; Satoh, N.; Tsujii, K. "Super water-repellent surfaces resulting from fractal structure", *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 19512-19517.

²² Bico, J.; Marzolin, C.; Quéré, D. "Pearl drops", *Europhys. Lett.* **1999**, 47, 220-226.

²³ Verplanck, N.; Galopin, E.; Camart, J.-C.; Thomy, V.; Coffinier, Y.; Boukherroub, R., "Reversible Electrowetting on Superhydrophobic Silicon Nanowires". *Nano Letters.* **2007**, 7, 3, 813-817.

²⁴ Ainslie, K. M.; Sharma, G.; Dyer, M. A.; Grimes, C. A.; Pishko, M. V. "Attenuation of Protein Adsorption on Static and Oscillating Magnetostrictive Nanowires". *Nano Letters* **2005**, 5, 9, 1852-1856.

Superoléophobicité.

La propriété des surfaces à repousser les liquides mène à de nombreuses applications telles que la prévention de la formation du gel par temps froid, l'amélioration de la coagulation dans les vaisseaux sanguins artificiels,²⁵ ou encore l'auto-nettoyage des vitres, des textiles,²⁶ ou objets du quotidien. Cependant, la tension de surface de l'huile est par exemple beaucoup plus faible que celle de l'eau ; l'huile s'étale donc plus facilement sur des surfaces et cela explique pourquoi il est plus difficile encore de créer des surfaces superoléophobes. Tuteja et al.²⁷ ont tout de même réussi à designer de telles surfaces superoléophobes en combinant deux aspects. Ils ont tout d'abord déposé par « electrospin » sur la surface un polymère polyhedral oligomérique silsesquioxane (POSS) dont la terminaison de surface est un perfluorodecyltrichlorosilane. Ils ont de plus recouvert cette surface avec un réseau de structures présentant des courbures ré-entrante en forme de champignons comme illustré sur la Figure 4 : les valeurs de w , d et h ont été optimisées de manière à ce que le contact avec l'huile soit limité avec la partie bleue.

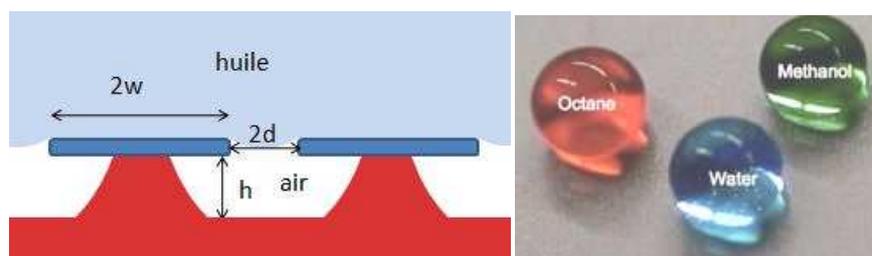


Figure 4. Surface superoléophobe présentant des courbures ré-entrantes favorisant un piégeage d'air efficace. Photo de goutte d'ocane, d'eau et de méthanol à droite sur une surface superoléophobe.²²

²⁵ Busscher, H. J. ; Stokroos, I. ; Van der Mei, H. C. ; Rouxhet, P. G. ; Schakenraad, J. M. "Preparation and characterization of superhydrophobic FEP-Teflon surfaces" *J. Adhes. Sci. Technol.* **1992**, 6, 347

²⁶ Kissa, E.; Lewin, M.; Sello, S.B. "Handbook of Fiber Science and Technology", Edition Marceland Dekker Inc, NewYork, **1984**; 143

²⁷ Tuteja, A.; Choi, W.; Ma, M.; Mabry, J.M.; Mazzella, S.A.; Rutledge, G. C.; McKinley, G.H.; Cohen, R.E. "Designing superoléophobic surfaces" *Science.* **2007**, 318, 5856, 1618 - 1622

Annexe 2 – Réalisation de motifs hydrophiles/hydrophobes ou de plots de nanofils de silicium sur une surface par lithographie optique.

Les résines sont généralement déposées par induction de la surface puis par centrifugation à la tournette (spin coating). La centrifugation permet d'homogénéiser la couche de résine déposée et de contrôler l'épaisseur de la couche selon les paramètres de vitesse (en tours par minute, rpm), d'accélération (en tours par minute par seconde, rpms) et de temps (en secondes) de centrifugation. La résine sensible aux UV est insolée à l'aide d'un aligneur double face modèle MA6 de la société Karlüss, à travers un masque optique en quartz recouvert de motifs de chrome.

A - Motifs Si-O-C₁₈H₃₇/Si-O-H sur une surface (de silicium ou de nanofils de silicium)

La première étape est de déposer une couche d'OTS sur la surface (Chapitre 2 .3.1). On réalise ensuite le protocole de lithographie optique suivant :

- Déshydratation de la surface à 110°C pendant 10 minutes
- Enduction de la surface avec la résine AZ 4562
- Centrifugation capot fermé $v = 3000\text{rpm}$, $a = 2000\text{rpms}$, $t = 40\text{s}$
- Recuit de la résine sur plaque chauffante à 110°C, 3 minutes
- Insolation (UV 365nm, $12\text{mW}/\text{cm}^2$) 3 secondes
- Révélation AZ351B : EDI (1 :1, v/v), 1 minute 30 secondes + rinçage EDI

On effectue ensuite un plasma O₂ (100 mTorr, 150W, 30 sccm, 1min). Ainsi, la partie de la couche d'OTS non protégée par la résine est enlevée au contact du plasma O₂. La résine est enlevée à l'acétone et la surface rincée à l'alcool puis à l'eau déionisée.

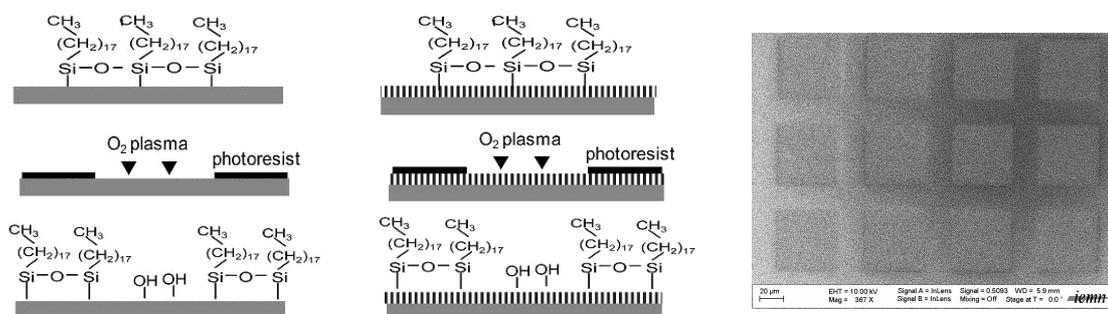


Figure 1. Schéma des étapes sur silicium (à gauche) et sur nanofils de silicium (au centre). Image MEB (à droite) du contraste chimique (effet de 'charge' de la couche d'OTS) des motifs réalisés sur nanofils de silicium.

B - Motifs de nanofils de silicium.

La première étape est de nettoyer la surface à l'acétone puis à l'alcool. On réalise ensuite le protocole suivant :

- Déshydratation de la surface à 110°C pendant 10 minutes
- Enduction de la surface avec de l'hexadiméthylsiloxane (HDMS) pour améliorer l'adhérence de la résine ensuite
- Centrifugation capot fermé $v = 500\text{rpm}$, $a = 500\text{rpms}$, $t = 120\text{s}$
- Enduction de la surface avec la résine AZ4562
- Centrifugation capot fermé $v = 2000\text{rpm}$, $a = 3000\text{rpms}$, $t = 30\text{s}$
- Recuit de la résine sur plaque chauffante à 100°C, 3 minutes
- Insolation (UV 365nm, $12\text{mW}/\text{Cm}^2$) 26 secondes
- Révélation AZ400 : EDI (1 :4, v/v), 1 minute 20 secondes
- Rinçage à l'EDI
- Recuit de la résine dans un four à 110°C, 30 minutes (nécessaire pour la résistance de la résine à l'HF)
- Plasma O_2 , 1 minute, 100 mTorr, 150W, 30 sccm (pour nettoyer les parties non recouvertes par la résine)

Deux types de nanofils de silicium peuvent être ensuite réalisés :

- Les nanofils de silicium par attaque chimique HF/AgNO₃ (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) de la surface dont les zones sont non protégées par la résine. On peut obtenir ainsi des plots de nanofils. (Il se peut qu'il y ait des phénomènes de bavure de silicium poreux autour des plots. Ceux-ci peuvent être évités en choisissant un wafer de silicium de résistivité $> 10 \Omega \cdot \text{Cm}$)

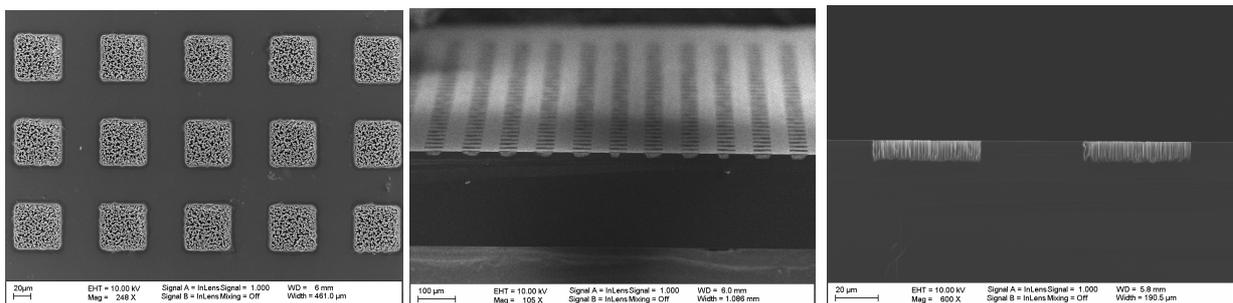


Figure 2. Image MEB de plots de nanofils de silicium réalisés par voie chimique.

- Les nanofils de silicium par croissance VLS (Chapitre 2 .2.1) sur la surface dont les zones sont non protégées par la résine. On peut obtenir ainsi des plots de nanofils.

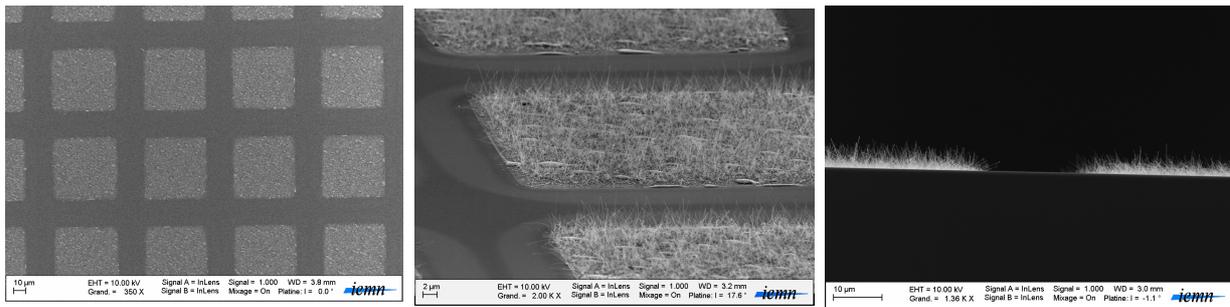


Figure 3. Image MEB de plots de nanofils de silicium réalisés par voie VLS.

Surfaces avec des zones hydrophobes / superhydrophiles ou des zones superhydrophobes / hydrophiles.

En suivant le protocole A de cette annexe sur une surface plane de silicium fonctionnalisée avec un OTS et après l'étape de plasma O_2 , on peut recuire la surface dans un four à $110^\circ C$ pendant 30 minutes pour durcir la résine puis réaliser des plots de nanofils de silicium. On peut ainsi obtenir une surface de mouillabilité hétérogène hydrophobes/superhydrophiles.

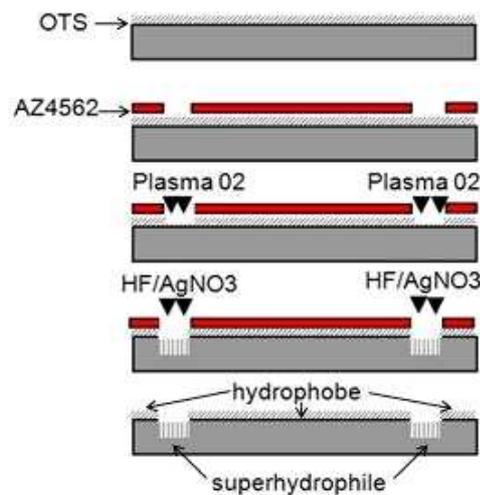


Figure 4. Etapes de préparation d'une surface superhydrophile/hydrophobe

Après l'étape de réalisation de nanofils par voie chimique du protocole B de cette annexe, il est possible de déposer une couche d'OTS uniquement sur les nanofils de silicium. Pour que la résine résiste à l'étape du retrait d'argent en solution $HCl/HNO_3/H_2O$, il faut recuire à nouveau la surface après l'attaque $HF/AgNO_3$ dans un four à $110^\circ C$ pendant 30 minutes pour durcir la résine (pas plus longtemps sinon la résine ne s'enlève plus à l'acétone ensuite). On réalise de cette manière des surfaces de mouillabilité hétérogène superhydrophobes/hydrophiles.

Annexe 3 - Protocole pour l'imagerie MEB/TEM de cellules adhérees sur surface.

Les surfaces avec les cellules adhérees pour l'observation MEB ou TEM sont préparées en parallèle des surfaces avec les cellules adhérees pour les observations au microscope à fluorescence.

Protocole pour imagerie MEB.

Avant l'imagerie au MEB, on procède à des étapes de fixation, de déshydratation (travailler impérativement sous la sorbonne pendant ces deux premières étapes) et de métallisation pour la surface avec les cellules adhérees.

Le milieu de culture est retiré (avec une pipette) du compartiment où se trouve la surface et on ajoute de l'eau ultrapure pour rincer la surface. On retire ensuite l'eau ultrapure et on ajoute la **solution de fixation** (2,5% de glutaraldehyde, tampon cacodylate de sodium à 0.1M de pH 7.4) qu'on laisse agir 30 minutes.

On rince ensuite plusieurs fois la surface avec une solution de cacodylate de sodium à 0.1M, puis avec de l'eau ultrapure.

La surface est ensuite placée dans de l'éthanol à 50% dans un nouveau cristalliseur en verre. On procède ensuite successivement à des **bains de déshydratation** :

- Ethanol 50%, 15 minutes
- Ethanol 75%, 15 minutes
- Ethanol 95%, 15 minutes (NB : il est possible de faire une pause à cette étape mais la suite du protocole doit être effectuée sans interruption)
- Ethanol absolu, 15 minutes x 2
- Acétate d'isoamyle, 15minutes (l'acétate d'isoamyle est soluble dans le CO₂ liquide contrairement à l'éthanol)

La surface est ensuite placée dans le dispositif prévu pour la déshydratation par contournement du point critique en atmosphère CO₂ liquide.

On récupère ensuite la surface que l'on colle avec du scotch double face à un support en acier pour l'étape de **métallisation** : la surface est recouverte de 15 Å (métalliseur evaporator from denton vaccuum, desk IV sputtering tool).

Protocole pour imagerie TEM.

Avant l'imagerie au TEM, on procède à des étapes de fixation, de déshydratation et d'enduction dans une résine de la surface avec les cellules adhérentes (travailler impérativement sous la sorbonne pendant ces étapes).

Le milieu de culture est retiré (avec une pipette) du compartiment où se trouve la surface et on ajoute de l'eau ultrapure pour rincer la surface. On retire ensuite l'eau ultrapure et on ajoute la **solution de fixation** (2,5% de glutaraldehyde, tampon cacodylate de sodium à 0.1M de pH 7.4) qu'on laisse agir 30 minutes à 4°C. On rince ensuite plusieurs fois la surface avec une solution de cacodylate de sodium à 0.1M (dans le noir). On procède ensuite à la **post-fixation** dans une solution à 1% d'osmium tetroxide (!! Acide osmique : fortes vapeurs !!), toujours dans le tampon cacodylate de sodium à 0.1M de pH 7.4, pendant 1 heure. On rince ensuite plusieurs fois la surface avec une solution de cacodylate de sodium à 0.1M, puis avec de l'eau ultrapure. On retire l'eau ultrapure du compartiment puis on ajoute une solution d'eau ultrapure contenant 2% d'acétate d'uranyle (colorant).

Les surfaces sont ensuite **déshydratées** dans de l'acetonitrile gradé puis **enduites dans de la résine** (Epon) qu'on laisse durcir.

On amincit ensuite l'épaisseur du substrat sous les nanofils de silicium avec un scalpel puis avec un couteau diamant, afin d'obtenir des coupes finales de 80 à 100nm d'épaisseur. Les coupes sont ensuite disposées sur des grilles TEM (150-mesh grids), colorées dans une solution d'éthanol absolu/eau (1 :1, v/v) à 2% d'acétate d'uranyle pendant 4 minutes dans le noir, puis recouvertes d'une solution de citrate de plomb pendant 4 minutes (Reynolds, E.S. "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy". *J Cell Biol.* **1963**, 17, 208-212).

- Index des sigles et abréviations -

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscope à forces atomiques
ATT	6-aza-2-thiothymine
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
ARNm	Acide ribonucléique messager
BSA	Protéine Bovin Serum Albumin
CI	Ionisation chimique
CHO-K1	Cellules ovariennes d'hamster chinois
D	Dimension
Da	Dalton
DE	Extraction Retardée
DIOS	Désorption/Ionisation laser sur silicium poreux
DHB	2,5-dihydroxybenzoïque
EDI	Eau Déionisée
EDTA	Acide éthylène diamine tetra acétique
EI	(Ionisation par) impact électronique
ESI	Ionisation électrospray
EWOD	Electromouillage sur diélectrique
FAB	Ionisation par bombardement rapide d'atomes
FFD	Méthode de dérivation du champ libre
FT-ICR	Cyclotron à ions transformée de Fourier
GC/MS	Chromatographie gaz pour la spectrométrie de masse
HBHA	Protéine heparin-binding haemagglutinin
HCCA	Acide a-cyano-4-hydroxycinnamique
HEPES	Tampon acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HF	Acide fluorhydrique
HPA	Acide 3-hydroxypicolinique
HPLC	High pressure liquid chromatography
HRTEM	Microscopie électronique en transmission à haute résolution
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IP	Iodure de propidium
IR	Infrarouge
IT	Analyseur à trappe ionique
LC/MS	Chromatographie liquide/ Spectrométrie de masse
LDI-MS	Spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser
LSIMS	Spectrométrie de masse à ionisation secondaire liquide
MALDI	Désorption/Ionisation laser assistée par matrice
MBE	Jet moléculaire
MEB	Microscope à balayage électronique
MEMS	Systèmes microélectromécaniques
MS	Spectrométrie de masse
NBOHC	Bob-bridging oxygen hole center
NIMS	Spectrométrie de masse initiée par nanostructures
OAG	Croissance assistée par oxyde
ODMCS	Octyldiméthylchlorosilane
OTS	Octadecyltrichlorosilane
PCR	Polymérase chain reaction
PBS	Tampon phosphate salin
PDMS	Spectrométrie de masse par désorption plasma
PFTS	Perfluorodecyltrichlorosilane
PL	Photoluminescence
PLD	Ablation laser pulsé
POSS	Polymère Polyhedral Oligomérique Silsesquioxane
PTM	Modification post-traductionnelle
Q	Quadripôle ou analyseur Quadripolaire

RIE	Reactive Ion Etching
SA	Acide 3,5-diméthoxybenzoïque ou acide sinapinique
SAM	Monocouches auto-assemblées
SERS	Surface-Enhanced-Raman-Spectroscopy
SIMS	Spectrométrie de masse à ionisation secondaire
SLS	Solide Liquide Solide
S/N	Signal sur bruit
SNOM	Microscope optique à champ proche
STM	Microscope à effet tunnel
TDC	Time to Digital Conversion
TEM	Microscopie en Transmission Electronique
TFA	acide trifluoroacétique
TIS	Sélecteur d'ions selon le temps
TOF	Analyseur à temps de vol
VLS	Vapeur Liquide Solide
UV	Ultraviolet
XPS	Xray Photoelectron Spectroscopy

- Publications et conférences -

Publications

G. Piret, Y. Coffinier, C. Roux, O. Melnyk, R. Boukherroub, "Biomolecule and Nanoparticle Transfer on Patterned and Heterogeneously Wetted Superhydrophobic Silicon Nanowire Surfaces", *Langmuir* 5 (2008) 1670.

V. G.Praig , **G. Piret**, M. Manesse , X. Castel , R. Boukherroub, S. Szunerits, "Seed-mediated electrochemical growth of gold nanostructures on indium tin oxide thin films", *Electrochimica Acta* 53 (2008) 7838.

F. Lapiere, B. Verbeke, N. Verplanck, V. Thomy, **G. Piret**, Y. Coffinier, R. Boukherroub, "EWOD displacement on patterned superhydrophobic silicon nanowires surface: Lab-on-chip for direct mass spectrometry analysis", proceedings of the 1st European Conference on Microfluidics - MicroFlu'08, Bologna, Italy, 2008, CDRom μ FLU08-135, ISBN 2-906831-76-X

N. Megouda , T. Hadjersi, **G. Piret**, R. Boukherroub, O. Elkechai, "Au-assisted electroless etching of silicon in aqueous HF/H₂O₂ solution", *Applied Surface Science* 255 (2009) 6210.

H. Liu, **G. Piret**, B. Sieber, J. Laureyns, W. Xu, R. Boukherroub, S. Szunerits, "Electrochemical Impedance Spectroscopy of ZnO nanostructures", *Electrochemistry Communications* 11 (2009) 945.

B. Sieber, H. Liu, **G. Piret**, J. Laureyns, P. Roussel, B. Gelloz, S. Szunerits and R. Boukherroub, "Synthesis and Luminescence Properties of (N-Doped) ZnO Nanostructures from a Dimethylformamide Aqueous Solution" , *J.Phys.Chem.C* 113 (2009) 13643

G. Piret, H.Drobecq, Y. Coffinier, O. Melnyk, R. Boukherroub, "Matrix-free Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry on Silicon Nanowire Arrays Prepared by Chemical Etching of Crystalline Silicon", *Langmuir* (2009)

G. Piret, H. Drobecq, R. Boukherroub, O. Melnyk, "In situ chemical modification of peptide microarrays. Characterization by desorption/ionization on silicon nanowires", chapter in *Methods in Molecular Biology* series, to be published by Humana Press/Springer in 2010, volume "Small Molecule Microarrays: Methods and Protocol"

E. Galopin, **G. Piret**, C. Faille, S. Szunerits and R. Boukherroub, "Selective adhesion of *Bacillus Cereus* spores on heterogeneously wetted silicon nanowires", *Langmuir* (2009).

En cours:

G. Piret, E. Galopin, D. Legrand, Y. Coffinier, R. Boukherroub, "Localization of Fibroblast on silicon nanowire arrays : antifouling effects of superhydrophobic surfaces", in submission to ACS Nano.

G. Piret, D. Kim, H.Drobecq, Y. Coffinier, O. Melnyk, Patrik Schmuki, R. Boukherroub, "Surface-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry on titanium dioxide (TiO₂) nanotube layers", in submission to Langmuir.

E. Galopin, **G. Piret**, J. Barbillat, S. Szunerits and R. Boukherroub, "Silicon nanowire patterns for plasmonic applications using Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)", under redaction.

N. Megouda, **G. Piret**, E. Galopin, T. Hadjersi, R. Boukherroub, O. Elkechai, "Formation of silicon nanowires patterns on silicon nanowires", under redaction.

Conférences avec actes

G. Piret, Y. Coffinier, J. Franck, M. Wisztorski, I. Fournier, M. Salzet, R. Boukherroub "Préparation de nanofils de silicium pour une analyse sensible de biomolécules par spectrométrie de masse", 10èmes Journées Nationales du Réseau Doctoral en Microélectronique (JNRDM 2007), Lille, France, Mai (2007). (Poster)

G. Piret, Y. Coffinier et R. Boukherroub, "Synthèse de nanofils de silicium par voie chimique", Workshop du GDR Nanofils et Nanotubes Semiconducteurs (GDR CNRS no 2974), Lyon, France, 9-11 Mai (2007). (Oral)

G. Piret, B. Gelloz, Y. Coffinier, N. Koshida, R. Boukherroub, "Synthesis of silicon and zinc oxide nanowires, optical properties, and Mass Spectrometry analysis", 7th France-Japan Workshop on Nanosciences and Nanomaterials, Bischoffsheim, France, October (2007). (Poster)

G. Piret, H. Drobecq, Y. Coffinier, O. Melnyk and R. Boukherroub, "Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry on silicon nanowires", Summer school on semiconductor nanowires (GDR CNRS no 2974), Roscoff, France, 15-20 Juin (2008).(Poster)

G. Piret, H. Drobeq, Y. Coffinier, O. Melnyk and R. Boukherroub, “Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry on silicon nanowires”, French Symposium on Emerging Technologies for Micro-nanofabrication, JNTE 08, Toulouse, France, 19 – 21 Novembre (2008). (Poster)

G. Piret, H. Drobeq, Y. Coffinier, O. Melnyk and R. Boukherroub, “Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry on silicon nanowires”, E-MRS 2009 symposium, Strasbourg, France, 8-12 Juin (2009). (Poster)

G. Piret, H. Drobeq, Y. Coffinier, O. Melnyk and R. Boukherroub, “Kinetics study of peptide methylation on silicon nanowires by laser desorption ionization mass spectrometry”, GDR semiconductor nanowires (GDR CNRS no 2974), Autrans, France, 30 Juin – 3 Juillet (2009).(Oral)

Conférences sans acte

R. Boukherroub, N. Verplanck, Y. Coffinier, **G. Piret**, V. Thomy, I. Fournier, M. Salzet and J. Camart, “Silicon Nanowires: A Novel Platform for EWOD Actuation and Matrix-Free Mass Spectrometry Analysis”, 210th ECS Meeting, Cancun, Mexico, October 29 – November 03 (2006). (Oral)

N. Verplanck, Y. Coffinier, M. Wisztorski, **G. Piret**, C. Delhaye, V. Thomy, I. Fournier, J.C. Camart, P. Tabourier, and R. Boukherroub, “Nanostructured Surface as EWOD counter electrode for matrix-free mass spectrometry analysis”, 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2006), Tokyo International Forum, Japan, November 5-9 (2006). (Poster)

Y. Coffinier, **G. Piret**, N. Verplanck, V. Thomy, I. Fournier, J.C. Camart, R. Boukherroub, “Silicon Nanowires for Mass Spectrometry Biomolecule Analysis”, NanoBiotech Symposium, Stockholm, Sweden, November 20-21 (2006). (Oral)

N. Verplanck, **G. Piret**, Y. Coffinier, E. Galopin, V. Thomy, I. Fournier, M. Salzet, J.-C. Camart and R. Boukherroub, “Silicon Nanowires as a New Platform in EWOD Microfluidic Devices”, TELECOM'2007 & 5èmes JFMMA, Fès, Maroc, Mars 14-16 (2007). (Oral)

G. Piret, Y. Coffinier, M. R. Das and R. Boukherroub, “Effect of surface roughness and composition on the wetting properties of silicon-based substrates”, 2ème Ecole d'été Franco-

Allemande sur l'Electrochimie et les Nanotechnologies, Lozari, Corse, France, September 2-7 (2007). (Poster)

Y. Coffinier, **G. Piret**, N. Verplanck, J.C. Camart, R. Boukherroub, R. Blossey, V. Thomy, 'Superhydrophobic Surface for a Total Reversible Electrowetting Effect', Cost meeting, Twente (The Netherlands), October (2007). (Poster)

R. Boukherroub, N. Verplanck, Y. Coffinier, **G. Piret** and V. Thomy, "Superhydrophobic Surface enabling reversible electrowetting and mass spectrometry analysis", First Shenyang International Colloquium on Microfluidics (SICOM I) 107-110, Shenyang, China, October 21-24 (2007). (Oral)

Y. Coffinier, **G. Piret**, R. Boukherroub, N. Verplanck, V. Thomy, M. Wisztorski, I. Fournier, M. Salzet, "Fonctionnalisation chimique de nanofils de silicium pour la réalisation d'une plateforme chromatographique et d'analyse en spectrométrie de masse de biomolécules", Workshop du GDR "Nanofils et Nanotubes Semiconducteurs"(GDR CNRS no 2974), Lyon, France, 9-11 Mai (2007). (Oral)

N. Verplanck, Y. Coffinier, M. Wisztorski, **G. Piret**, I. Fournier, J.C. Camart, R. Boukherroub and V. Thomy, "Utilisation de surfaces nanostructurées comme contre-électrode EWOD : Application à la spectrométrie de masse DIOS", 10èmes Journées Nationales du Réseau Doctoral en Microélectronique (JNRDM 2007), Lille, France, Mai (2007). (Poster)

R. Boukherroub, N. Verplanck, F. Lapierre, **G. Piret**, Y. Coffinier, V. Thomy, "Integration of porous silicon and silicon nanowires in microfluidic devices for Lab-on-Chip Applications", the 6th international conference "Porous Semiconductors Science and Technology", PSST2008, Mallorca, Spain, Mars 10-14 (2008). (Oral)

F. Lapierre, **G. Piret**, N. Verplanck, V. Thomy, R. Boukherroub, "Ewod displacement on patterned superhydrophobic silicon nanowires surface : lab-on-chip for direct mass spectrometry analysis", 12èmes Journées Nationales du Réseau Doctoral en Microélectronique (JNRDM 2009), Lyon, France, Mai (2009). (Poster)

Résumé

Ce travail porte sur la fabrication d'un support inorganique de nanofils de silicium dédié à la détection sensible de biomolécules par désorption/ionisation laser (LDI) en spectrométrie de masse (MS). Cette technique, contrairement à l'analyse LDI assistée par matrice (MALDI), permet de s'affranchir des ions parasites de la matrice organique qui interfèrent avec les molécules de masses inférieures à 700 Da. La littérature fait état de la difficulté à déterminer les paramètres liés à la performance de la technique : nous avons varié la morphologie, la composition, la chimie de surface des nanofils de silicium et nous avons discuté de l'importance des propriétés optiques et thermiques, de la mouillabilité de surface et de l'accessibilité des molécules au faisceau laser. Le support de nanofils optimal montre une haute sensibilité de détection des molécules de petites masses (50 fois supérieure au MALDI), il s'adapte à des analyses protéomiques et nous a permis d'instaurer un contrôle complémentaire au suivi de la réaction de méthylation pour la conception d'une biopuce à peptides. Nous avons finalement travaillé sur l'intégration de ce support dans un laboratoire sur puce. Une goutte d'1 μL d'un mélange de peptide ($50 \cdot 10^{-15}\text{M}$) a été déplacée par microfluidique discrète (électromouillage sur diélectrique) puis analysée avec succès par LDIMS. Finalement, nous avons développé une méthode originale combinant la chimie et la topographie de surface des nanofils de silicium à des techniques de lithographie optique : des zones de différentes tensions de surface liquide/solide sont ainsi créées et sont favorables à l'adhésion localisée de protéines, de cellules et de bactéries.

Mots-clés Nanofils de silicium, Spectrométrie de masse, « Biopuce à peptides », Laboratoire sur puce, Electromouillage, Microfluidique, Superhydrophobe, Culture de cellules.

Abstract

This work deals with the fabrication of an inorganic silicon nanowires substrate dedicated to the sensitive detection of biomolecules by laser desorption/ionisation mass spectrometry (LDI-MS). This technique, in contrast to the matrix-assisted LDI mass spectrometry (MALDI), allows low mass molecules' (<700Da) analysis without parasitic peaks from the organic matrix. The literature reports the difficulty to determine the parameters linked to the technique's performance. We varied the morphology, composition and surface chemistry of silicon nanowires, and discussed the importance of optical and thermal properties, wetting properties and accessibility of analytes to the laser beam on the silicon nanowires performance. The optimized nanowire's substrate shows a high sensitivity for the detection of low mass molecules (50 times higher than classical MALDI). Moreover, the silicon nanowires substrate was successfully used to follow the course of the methylation reaction of peptides in a biochip format. Furthermore, the substrate integration in a lab on chip was investigated. A 1 μL droplet of a peptide mixture ($50 \cdot 10^{-15}\text{M}$) was displaced by digital microfluidics (electrowetting on dielectric) and successfully analyzed by LDI-MS. Finally, we developed an original method combining the chemistry and topography of silicon nanowires surface using optical lithography technique: areas with different liquid/solid surface tensions are created this way, enabling localized adhesion of proteins, cells and bacteria.

Keywords Silicon nanowires, Mass spectrometry, Peptides biochip, Lab on chip, Electrowetting, Microfluidics, superhydrophobic, Cell culture.