

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE 1

THÈSE

présentée en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

discipline : **Sciences des Matériaux**

par **Vincent HAGUET**

Détection électronique d'une interaction biomoléculaire entre des électrodes nanostructurées

Soutenue le lundi 2 décembre 2002 devant la commission d'examen

<i>Présidente du jury :</i>	Ghislaine COULON
<i>Rapporteurs :</i>	Nicole JAFFREZIC-RENAULT Christophe VIEU
<i>Examineurs :</i>	Nathalie PICOLLET-D'HAHAN Oleg MELNYK
<i>Directeur de thèse :</i>	Didier STIÉVENARD

Remerciements

Je tiens à remercier ici toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser cette thèse et ont fortement contribué à son bon déroulement.

Cette thèse a été effectuée à l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN), dirigé par Alain CAPPY, dans l'équipe Physique du département de l'Institut Supérieur d'Electronique du Nord (ISEN).

Je tiens à exprimer en premier lieu ma reconnaissance à Didier STIÉVENARD pour avoir encadré ce travail et m'avoir fait partager ses connaissances et son enthousiasme. Je le remercie également pour sa confiance et l'autonomie qu'il m'a accordée au quotidien dans l'organisation de mon travail.

Une partie importante de cette thèse a été réalisée à Tokyo dans le laboratoire du Pr. Hiroyuki FUJITA, que je remercie pour son invitation dans le cadre du Laboratory for Integrated MicroMechatronic Systems (LIMMS), à l'Institute of Industrial Science (IIS), dirigé par Masao SAKAUCHI, à l'Université de Tokyo.

Je remercie Ghislaine COULON de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je suis très reconnaissant à Nicole JAFFREZIC-RENAULT et Christophe VIEU d'avoir accepté le rôle de rapporteurs, ainsi qu'à Nathalie PICOLLET-D'HAHAN et Oleg MELNYK qui ont accepté de participer au jury.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans la collaboration de Christophe OLIVIER, Rémi DESMET et Oleg MELNYK, que je remercie à nouveau. Merci pour leur accueil aux membres de l'Institut de Biologie de Lille (IBL) et de Sedac Therapeutics que j'ai eu l'occasion de fréquenter, en particulier à Ouafâa EL-MADHI pour les spectres HPLC, à Dominique BONNET, Olivier CARION, Xavier DUBURCQ, Hélène GRAS, Nathalie OLLIVIER.

Je tiens à saluer les personnes rencontrées à Tokyo au LIMMS et qui ont participé à rendre ce séjour particulièrement instructif et formateur : tout d'abord à Kuniyuki KAKUSHIMA et à Tarik BOUROUINA pour les expériences réalisées côte à côte et de nombreuses discussions constructives, Makoto ARAI, Manabu ATAKA, Ali BEN MOUSSA, Gonzalo CABODEVILA, Jean-Philippe GOUY, Laurent GRISCOM, Philippe HÉLIN, Lionel HOULET, Tetsuhiko IIZUKA, Eric LEBRASSEUR, Bruno LE PIOUFLE, Makoto MITA, Yoshio MITA, Ryoichi OHIGASHI, Satoshi OSHIMA, Jean-Bernard POURCIEL, Gilbert REYNE, Tadashi SONOBE, Patrick SURBLED, Yoshifumi TAKAHASHI, Agnès TIXIER, ainsi que Daisuke SAYA actuellement à Toulouse, et bien sûr Yumi HIRANO et Yoko INOUE.

Un grand merci à Vincent FERREIRO pour les observations à l'AFM qu'il a réalisées pour moi au Laboratoire de Structure et Propriétés de l'Etat Solide (LSPES).

Je remercie l'équipe de la centrale de technologie de l'IEMN pour les masques optiques et électroniques, évaporations, gravures plasma et autres observations MEB, ainsi que Pierre ARMANT pour ses nombreuses interventions à point nommé.

Merci à Thomas HEIM pour l'avancée qu'il m'a permis d'effectuer grâce à ses travaux de greffage de couches organiques sur des lames de verre, et pour les discussions de tous types lors des soirées et des week-ends passés au labo ; Davy MARTIN pour ses explications de biologie et ses précieux commentaires lors de la rédaction de ce manuscrit (ainsi que pour les concerts fraudés à l'ONL) ; Olivier CHUNGUE pour son aide lors de

l'installation du picoampèremètre et avec qui j'ai réalisé les toutes premières mesures de détection.

J'aimerais adresser mes remerciements aux membres de l'équipe Physique : tout d'abord mon voisin de bureau Thierry MÉLIN, Jean-Philippe NYS pour les mesures en spectroscopie Auger, Guy ALLAN, Dominique DERESMES, Christophe DELERUE, Bruno GRANDIDIER, Isabelle LEFEVRE, Catherine PRIESTER, Dominique VUILLAUME. Merci à Florence SENEZ et Marie SÉNA pour leur bonne humeur au secrétariat.

Sans oublier le groupe des thésards et post-docs de l'IEMN, et en particulier Stéphane LENFANT, Laurent BREUIL, Christophe KRZEMINSKI, Maxime LASSALLE, Yann-Michel NIQUET, Thomas HEIM (bis), Davy MARTIN (bis), Heinrich DIESINGER, Gautier MAHIEU, Mathieu DUBOIS, Séverine LE GAC (ma fournisseuse officielle en publications), Vivek RANJAN, Guilhem LARRIEU, Eric LEFEBVRE, toute l'équipe de μ systèmes, pour l'ambiance chaleureuse entretenue durant ces trois années.

Je salue Jacques BOURGOIN et Guo-Cai SUN à l'Université Pierre et Marie Curie, et leur souhaite un bon courage dans leur entreprise.

Merci enfin à ma famille pour son soutien pendant toutes ces longues années.

Ce travail a bénéficié d'une bourse du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT), et d'un financement par le laboratoire du Pr. FUJITA pendant mon déplacement au Japon.

Sommaire

Abréviations	
Introduction.....	1
1. Les techniques de détection de molécules biologiques.....	5
1.1 Vers un rapprochement des disciplines scientifiques.....	5
1.1.1 <i>Emergence d'un nouveau concept</i>	5
1.1.2 <i>Les techniques de fabrication</i>	6
1.1.3 <i>Expansion de la chimie</i>	7
1.1.4 <i>Biologie moléculaire</i>	7
1.1.5 <i>Les forces à l'échelle des molécules</i>	8
1.1.6 <i>Vers les nanosciences</i>	8
1.1.7 <i>Les microsystemes</i>	9
1.2 Les biocapteurs.....	10
1.2.1 <i>Définition</i>	10
1.2.2 <i>Détection optique</i>	11
1.2.3 <i>Capteurs de chaleur</i>	13
1.2.4 <i>Résonateurs</i>	13
1.2.5 <i>Capteurs électrochimiques</i>	15
1.3 Microsystemes appliqués à la biologie.....	16
1.3.1 <i>Les biomicrosystemes</i>	16
1.3.2 <i>Applications à la génomique et à la protéomique</i>	18
1.4 Puces à ADN, puces à protéines.....	20
1.4.1 <i>Principe des puces à ADN</i>	20
1.4.2 <i>Puces à peptides, puces à protéines</i>	21
1.4.3 <i>Techniques de détection</i>	22
1.5 Nanobiotechnologies.....	23
1.5.1 <i>Visualisation et manipulation de molécules biologiques</i>	23
1.5.2 <i>L'apport de la biologie</i>	27
1.6 Vers la molécule unique : de nouveaux axes de recherche.....	29
1.7 La détection électrique.....	30
1.7.1 <i>De nouvelles perspectives</i>	30
1.7.2 <i>Le transfert électronique</i>	31
1.7.3 <i>Un nouveau concept pour la biologie : la détection électrique</i>	35
1.8 Description du projet.....	38
Bibliographie.....	40
2. Techniques de fabrication et d'analyse.....	49
2.1 Microfabrication.....	49
2.1.1 <i>Définition des motifs</i>	49
2.1.2 <i>Les techniques de gravure</i>	50
a) <i>Gravures humides</i>	52
b) <i>Gravures sèches</i>	52
2.1.3 <i>Les dépôts métalliques</i>	54
2.1.4 <i>Oxydation et recuit thermique</i>	56
2.1.5 <i>Les lithographies</i>	57
a) <i>Photolithographie</i>	57
b) <i>Lithographie électronique</i>	58

2.2 Films auto-assemblés.....	60
2.2.1 Description.....	60
2.2.2 Protocoles de silanisation.....	64
a) Silanisation des OTS.....	64
b) Silanisation amine.....	65
2.3 Techniques de caractérisation.....	68
2.3.1 Angles de contact.....	68
2.3.2 Scanner à fluorescence.....	71
2.3.3 Microscopie à force atomique.....	73
a) La microscopie à sonde locale.....	73
b) Le microscope à force atomique (AFM) en mode tapping.....	76
c) Autres techniques d'imagerie en mode tapping.....	79
2.3.4 Caractérisation électrique.....	80
Bibliographie.....	84

3. Méthodes de fabrication des puces..... 89

3.1 Stratégie adoptée.....	89
3.1.1 Méthode de fabrication des électrodes.....	89
3.1.2 Greffage des sondes.....	90
a) Description de la réaction d'accrochage.....	90
b) Fonctionnalisation de la biotine.....	94
c) Test de la chimiosélectivité de l'ancrage.....	95
d) Description de l'interaction entre la biotine et la streptavidine.....	95
3.1.3 Passivation du substrat.....	97
3.2 Fabrication des électrodes.....	98
3.2.1 Procédé technologique.....	98
3.2.2 Calcul de l'épaisseur théorique de l'assemblage moléculaire, choix de l'épaisseur de métal.....	101
3.2.3 Observations et discussion.....	102
a) Aspect des électrodes.....	102
b) Electrodes en court-circuit, taux d'échec.....	103
c) Rendement de fabrication de nanoélectrodes opérationnelles.....	106
3.3 Passivation et fonctionnalisation de la surface.....	106
3.3.1 Objectif.....	106
3.3.2 Méthodes de fabrication envisagées.....	107
3.3.3 Masque utilisé pour délimiter les zones sur la surface.....	108
3.3.4 Surfaces de passivation envisagées.....	109
3.3.5 Molécule biologique employée.....	110
3.3.6 Observations et discussion.....	111
a) Dépôt de la résine optique.....	111
b) Classement des niveaux d'adsorption.....	111
c) Dégradation du film d'ancrage par la résine optique.....	112
d) Etude de la première méthode de passivation.....	113
e) Etude de la seconde méthode de passivation.....	114
f) Choix de la surface de passivation.....	116
3.3.7 Protocole adopté.....	117
3.3.8 Passivation et fonctionnalisation de plaquettes de silicium.....	119
a) Principe de la démarche.....	119
b) Observations.....	120
c) Origine de l'atténuation des signaux.....	121
3.4 Conclusion.....	123
Bibliographie.....	124

4. Etude de l'interaction biotine / streptavidine.....	125
4.1 Validation de l'interaction sur support solide, détermination des conditions de dépôt.....	125
4.1.1 <i>Objectif et description des expériences</i>	125
4.1.2 <i>Observations et choix du couple de concentrations</i>	127
4.2 Etude de l'interaction en microscopies optique et à force atomique.....	128
4.2.1 <i>Plaquette de silicium oxydé</i>	129
4.2.2 <i>Film de 3-aminopropyltriméthoxysilane (APTMS)</i>	129
4.2.3 <i>Film de semicarbazide</i>	130
4.2.4 <i>Incubation de la biotine</i>	131
a) Protocole de dépôt de la biotine.....	131
b) Observations en microscopie optique.....	131
Etat de la surface, traces de biotine.....	131
Gouttes de Tween 20.....	132
c) Observations en AFM.....	132
Biotine-NH ₂	134
Biotine-COCHO.....	134
Observation en HPLC d'une agrégation de la biotine-COCHO.....	134
Hypothèse d'une fixation covalente des agrégats de biotine-COCHO.....	136
Conclusion.....	136
4.2.5 <i>Incubation de la streptavidine</i>	137
a) Protocole de dépôt de la streptavidine marquée à l'or colloïdal.....	137
b) Observations en microscopie optique.....	137
Etat de la surface, agrégation des colloïdes d'or.....	137
Mécanisme supposé d'agrégation des colloïdes d'or.....	138
c) Observations en AFM.....	138
Streptavidine déposée sur un échantillon « biotine-NH ₂ ».....	140
Streptavidine déposée sur un échantillon « biotine-COCHO ».....	141
Discussion.....	141
Expériences de désorption de la streptavidine.....	141
Conclusion.....	142
4.3 Caractérisation électrique de l'ancrage de la biotine.....	143
4.3.1 <i>Passivation et fonctionnalisation de la surface</i>	143
4.3.2 <i>Incubation de la biotine</i>	145
a) Protocole de dépôt de la biotine.....	145
b) Observations en microscopie optique.....	145
Etat de la surface.....	145
Lavages supplémentaires de la surface.....	146
c) Observations en AFM.....	147
Passivation par le film d'OTS.....	147
Agrégats sur le film de semicarbazide (cas du dépôt de biotine-NH ₂)	147
Agrégats sur le film d'OTS (cas du dépôt de biotine-NH ₂)	149
Agrégats sur le film de semicarbazide (cas du dépôt de biotine-COCHO)	149
Agrégats sur les structures en or (cas du dépôt de biotine-COCHO)	150
4.3.3 <i>Détection électrique</i>	150
a) Protocole de mesure.....	150
b) Mesures électriques.....	151
Biotine-COCHO.....	151
Biotine-NH ₂	152
Stabilité des mesures.....	152
Influence de la géométrie des électrodes.....	153
Dispersion des intensités mesurées.....	153
Influence du film de semicarbazide.....	154
Ordre de grandeur des conductances et des conductivités.....	154

c) Interprétation.....	156
Modélisation du système.....	156
Calcul de l'aire de contact.....	156
Conséquence de l'aire de contact sur la densité de courant et la conductivité.....	157
d) Nature du transport.....	157
Conductivité électrique de l'eau.....	157
Un transport électronique par effet tunnel ?.....	159
Influence des sels.....	159
Modification du pH.....	161
e) Conclusion, sélection d'un critère de détection.....	162
4.4 Caractérisation électrique de la streptavidine marquée à l'or colloïdal.....	163
4.4.1 <i>Incubation de la streptavidine</i>	163
a) Protocole de dépôt de la streptavidine.....	163
b) Observations en microscopie optique.....	163
c) Observations en AFM.....	163
Passivation par le film d'OTS.....	163
Agrégats sur le film de semicarbazide.....	165
Nanoparticules d'or.....	165
4.4.2 <i>Détection électrique</i>	166
a) Mesures électriques.....	166
Résultats.....	166
Biotine-COCHO.....	167
Biotine-NH ₂	167
b) Discussion.....	168
Séparation des deux échantillons.....	168
influence des billes d'or.....	168
4.4.3 <i>Spectroscopie Auger</i>	169
a) Mesures sur le film d'OTS.....	169
b) Mesures sur les pistes électriques.....	170
c) Cas du phosphore, du chlore et du sodium.....	171
4.5 Conclusion.....	172
Bibliographie.....	174

5. Etude de l'interaction antigène / anticorps..... 175

5.1 Stratégie de dépôt.....	175
5.2 Réalisation de l'interaction sur lames de verre.....	176
5.2.1 <i>Objectif et description des expériences</i>	176
5.2.2 <i>Observations et choix du couple de concentrations</i>	177
5.3 Caractérisations électriques.....	178
5.3.1 <i>Procédure de dépôt et observation en microscopie optique</i>	178
a) Incubation de la biotine-COCHO.....	178
b) Incubation des anticorps.....	180
5.3.2 <i>Caractérisation électrique de l'interaction</i>	180
a) Mesures électriques.....	180
b) Diminution de la conductivité après l'incubation de l'anticorps.....	182
c) Origine du faible nombre de détections.....	182
d) Etude du taux de couverture.....	183
e) Importance de la passivation.....	185
5.4 Conclusion et perspectives.....	185

6. Fabrication de nanoélectrodes par voie chimique.....	187
6.1 Différentes techniques de fabrication de nanoélectrodes.....	187
6.2 De nouvelles techniques pour produire des nanoélectrodes.....	188
6.2.1 <i>La problématique</i>	188
6.2.2 <i>Principe de la gravure chimique</i>	189
6.3 Nanofils produits à angle droit.....	191
6.3.1 <i>Réalisation de nanofils de silicium</i>	191
a) Principe.....	191
b) Procédé technologique.....	191
c) Critère de fin de gravure.....	194
d) Aspect des nanofils.....	194
Section des nanofils.....	194
Épaisseur d'oxyde.....	195
Résultat.....	195
6.3.2 <i>Application à la réalisation de nanoélectrodes</i>	196
a) Principe.....	196
b) Niveaux de masquage.....	196
c) Procédé technologique.....	198
d) Métallisation.....	204
e) Observations et discussion.....	205
Influence du temps de gravure.....	206
Mécanisme supposé de formation du gap.....	207
Destruction des structures isolées de SiO ₂	208
Déplacements verticaux des nanofils.....	208
6.3.3 <i>Modification du procédé de formation du gap : utilisation de la gravure sèche</i>	209
6.4 Electrodes à doubles contacts ponctuels.....	212
6.4.1 <i>Principe et niveaux de masquage</i>	212
6.4.2 <i>Procédé technologique</i>	213
6.4.3 <i>Observations et discussion</i>	216
a) Difficulté d'alignement du deuxième masque optique.....	216
b) Formation de contacts ponctuels.....	217
c) Nécessité d'un repère visuel pendant la gravure.....	217
d) Coupure des électrodes.....	218
e) Métallisation.....	218
6.5 Nanopointes en vis-à-vis.....	219
6.5.1 <i>Principe</i>	219
6.5.2 <i>Procédé technologique</i>	219
6.5.3 <i>Aspect des électrodes</i>	223
6.5.4 <i>Observations et discussion</i>	223
a) Rendement.....	223
b) Rayon de courbure.....	224
c) Mécanisme supposé de formation du gap.....	225
6.6 Conclusion et perspectives.....	226
Bibliographie.....	228
 Conclusion générale de la thèse.....	 231

Abréviations

μTAS : micro total analysis system

A, C, G, T : adénine, cytosine, guanine, thymine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AFM : Atomic Force Microscopy, microscope à force atomique

Ala ou A : alanine (acide aminé)

APTMS : 3-aminopropyltriméthoxysilane ($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{Si}(\text{O}-\text{CH}_3)_3$)

Arg ou R : arginine (acide aminé)

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

BioMEMS : Bio-micro-electromechanical systems, microsystèmes appliqués à la biologie

BHF : Buffered HF

BOE : Buffered Oxide Etch, pour désigner le mélange $\text{NH}_4\text{F}:\text{HF}:\text{H}_2\text{O}$

BOX : Buried Oxide, oxyde enterré sous une couche de silicium

BSA : Bovine Serum Albumin, sérum albumine bovine

C-AFM : Conducting Atomic Force Microscopy

CCD : Charge-Coupled Device (caméras digitales)

CFM : Chemical Force Microscopy

CMOS Transistor : Complementary Metal-Oxide-Semiconductor Transistor, transistor à effet de champ métal-oxyde-semiconducteur

COPO : copolymère de méthyl méthacrylate et de polyméthylméthacrylate (PMMA)

CVD : Chemical Vapor Deposition, dépôt chimique en phase vapeur

DBU : 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène

DIEA : diisopropyléthylamine

DMF : diméthylformamide

Eau DI : eau déionisée

Eau milliQ : eau déionisée

EFM : Electrostatic Force Microscopy

ENFET : transistor à effet de champ enzymatique

Fmoc : 9-fluorénylméthoxycarbonyl

FPW : Flexure Plate Waves, dispositifs à ondes de plaque flexionnelle

Gly ou G : glycine (acide aminé)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography, chromatographie liquide à haute performance

ICP-RIE : Inductively Coupled Plasma Reactive Ion Etching, gravure ionique réactive par plasma inductif (aussi appelé « gravure profonde »)

IPA : alcool isopropylique

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ISFET : Ion-Sensitive Field Effect Transistor, transistor à effet de champ sensible aux ions

k_B : constante de Boltzmann ($k_B = 1,3805 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

lab-on-a-chip : laboratoire sur puce

Leu ou L : leucine (acide aminé)

Abréviations

LFM : Lateral Force Microscopy

LPCVD : Low Pressure Chemical Vapor Deposition, dépôt chimique en phase vapeur à basse pression

Lys ou K : lysine (acide aminé)

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MEMS : Micro-ElectroMechanical Systems, systèmes microélectromécaniques ou microsystèmes

MIBK : methylisobutylketone, méthylisobutylcétone

MFM : Magnetic Force Microscopy

ODN : Oligodéoxynucléotide (séquence courte d'ADN)

OTS : Octadécyltrichlorosilane ($H_3C-(CH_2)_{17}-SiCl_3$)

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne

PECVD : Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition, dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma

PFM : Photonic Force Microscopy

PMMA : Polyméthylméthacrylate

RIE : Reactive Ion Etching, gravure ionique réactive

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SAM : Self-Assembled Monolayer, monocouche auto-assemblée

SAW : Surface Acoustic Wave, dispositifs à onde acoustique de surface

SNOM : Scanning Near-field Optical Microscopy

SOI : Silicon On Insulator, substrat de silicium déposé sur une couche isolante

SPR : Surface Plasmon Resonance, résonance du plasmon de surface

STM : Scanning Tunneling Microscopy, microscope à effet tunnel

SThM : Scanning Thermal Microscopy

TEM : Transmission Electron Microscopy, microscope électronique à transmission

TMAH : hydroxyde de tétraméthyl ammonium

Tris : Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane

Tween 20 : polyoxyéthylène(20) sorbitan monolaurate

Tyr ou Y : tyrosine (acide aminé)

Val ou V : valine (acide aminé)

Introduction

Le développement des microtechnologies a été à la base de la réduction spectaculaire des dimensions des composants électroniques. Ainsi, l'intégration des différents éléments en concentration croissante sur un même support a permis d'augmenter les performances des circuits électroniques, tout en réduisant leurs coûts de production. Récemment, cette stratégie a été transférée à d'autres domaines d'étude, qui cherchent à tirer profit de la même évolution.

Dans les années 1990, les premières applications des microtechnologies à la biologie ont été présentées. En effet, la miniaturisation des différents systèmes d'analyse biologique représente un potentiel d'avenir en matière de diagnostic. Les bénéfices potentiels sont nombreux. La réduction de la taille des dispositifs traditionnels d'analyse pourrait constituer une réponse sérieuse à la demande de diminution des coûts des systèmes d'analyse biomédical avec la mise au point de véritables laboratoires miniaturisés, hautement sensibles et aptes à manipuler de très petits volumes de produits. Certains procédés réalisés aujourd'hui de façon manuelle pourraient également être automatisés grâce à l'intégration d'un grand nombre de briques élémentaires permettant d'effectuer successivement plusieurs opérations complexes.

Ce mouvement s'accompagne de l'élaboration de nouveaux systèmes à l'échelle du nanomètre, qui pourraient représenter de nouveaux outils appliqués à l'étude et à la manipulation d'un nombre très faible de molécules biologiques. Cette démarche pourrait engendrer des dispositifs aux architectures originales basés sur la détection des interactions de quelques molécules avec leur environnement. De nouvelles techniques de détection pourraient ainsi être fondées sur l'enregistrement des modifications physico-chimiques générées localement lors de la reconnaissance moléculaire entre des sondes biologiques immobilisées sur un nano-biocapteur et des récepteurs issus d'un milieu biologique à analyser. C'est dans ce cadre que se situe le travail mené au cours de cette thèse.

Une voie de recherche encore relativement peu exploitée concerne la possibilité de détecter des interactions biomoléculaires par des méthodes électriques. Dans cette étude, nous cherchons à développer un nouveau type de capteur capable de déceler la réalisation d'une interaction spécifique entre des molécules biologiques par l'intermédiaire de mesures de la conductivité dans un nanogap. Notre approche consiste à greffer plusieurs sondes biologiques entre des électrodes très rapprochées, typiquement d'une distance inférieure à 100 nm, et à effectuer une série de mesures électriques afin d'établir un signal de référence. Puis, ce signal est comparé à celui obtenu après le dépôt sur les échantillons des molécules complémentaires marquées avec un colloïde d'or de dimension nanométrique. Les membres du couple sonde/récepteur ont d'abord été choisis pour leur faculté à interagir de manière très forte et

très sélective (interaction biotine/streptavidine). Puis, une interaction de type antigène/anticorps a été étudiée.

Le premier chapitre de cette thèse correspond à une étude bibliographique des différents dispositifs permettant de détecter et de manipuler des molécules biologiques. Les biocapteurs constituent ainsi une très grande famille de dispositifs destinés à la détection de certaines biomolécules présentes dans un milieu biologique. Puis, nous présentons le domaine des microsystèmes, dont l'objectif est de miniaturiser et de rassembler sur un même support les différents procédés d'analyse et de manipulation de molécules biologiques ou de cellules. Le principe des puces à ADN repose sur l'identification de courts ADN simple brin par le biais d'une hybridation avec des sondes nucléotidiques immobilisées et adressées sur une surface. Nous décrivons ensuite différentes approches originales, s'appuyant sur le concept récent de nanotechnologies, dédiées à visualiser et à opérer à l'échelle de la molécule unique. Parmi ces travaux, la détection par des méthodes électroniques de quelques molécules biologiques semble une voie prometteuse. Enfin, nous présentons le schéma de principe du dispositif de détection électrique d'une interaction biomoléculaire développé dans cette thèse.

Au chapitre 2, nous décrivons tout d'abord l'ensemble des techniques mises en œuvre pour fabriquer des électrodes séparées d'une distance inférieure à 100 nm. Les techniques de microfabrication disponibles en salle blanche comprennent des procédés de gravure, de dépôt de métaux, d'oxydation, de recuit thermique et de lithographie. Puis, les méthodes de greffage de films moléculaires auto-assemblés sur des substrats oxydés sont présentées. Ces couches organiques nous serviront principalement à séparer les propriétés de surface sur les échantillons. Enfin, plusieurs techniques de caractérisation de la surface et de l'interaction biomoléculaire sont présentées. La mesure des angles de contact formés par une goutte d'un liquide déposé sur une surface est une méthode macroscopique de contrôle de l'état d'une couche moléculaire. D'autre part, une première étude de la réalisation de la reconnaissance biomoléculaire peut être réalisée en marquant une des molécules biologiques avec un fluorophore et en observant le résultat du couplage à l'aide d'un scanner à fluorescence. La microscopie à force atomique permet d'analyser la topographie de la surface à l'échelle du nanomètre. Enfin, nous décrivons la méthode employée pour caractériser électriquement les interactions biomoléculaires réalisées entre les nanoélectrodes.

Ces procédés sont appliqués au chapitre 3 pour fabriquer les électrodes et greffer le film moléculaire d'ancrage des sondes biologiques. Nous présentons tout d'abord la méthode générale d'élaboration des biopuces, fondée sur une lithographie à haute résolution des nanoélectrodes et sur une fonctionnalisation sélective de la surface des échantillons. La fabrication des électrodes est ensuite mise en œuvre, et des travaux sont réalisés afin de greffer de façon contrôlée différents films organiques sur un même substrat.

Au chapitre 4, nous étudions la possibilité de détecter électriquement la réalisation de l'interaction modèle biotine/streptavidine. Pour commencer, les conditions d'incubation des biomolécules sont déterminées en fluorescence sur des lames de verre. Puis, les différentes étapes de la réalisation de l'assemblage moléculaire sont analysées en microscopies optique et à force atomique. La validité du concept proposé de détection électrique d'une interaction est ensuite testée. Pour cela, des caractérisations électriques sont effectuées après les dépôts successifs, entre les nanoélectrodes, de la biotine et de molécules de streptavidine marquées à l'or colloïdal. Des variations de courant sur plusieurs décades, associées à l'interaction biotine/streptavidine, sont observées. Les mesures de conductivité obtenues sont analysées, et des descriptions des mécanismes de transport du courant à travers l'assemblage moléculaire sont proposées.

Puis, ce nouveau concept est appliqué à une interaction du type antigène/anticorps. Le transfert du concept à une reconnaissance spécifique entre la biotine et un anticorps anti-biotine marqué avec une nanoparticule d'or, fait l'objet du chapitre 5. Des techniques permettant de réduire le niveau d'adsorption non-spécifique des récepteurs en solution sont également mises en œuvre.

Enfin, nous nous appliquons au chapitre 6 à lever le principal facteur limitant de cette technique de détection, à savoir le coût induit lors de la fabrication d'électrodes séparées de quelques dizaines de nanomètres. Pour cela, différents processus de fabrication de nanoélectrodes sont développés, basés uniquement sur des attaques chimiques anisotropes, dans l'objectif de produire des électrodes à grande échelle et à bas coût. Ces procédés ont été mis au point lors d'un séjour d'un an au Japon, au laboratoire LIMMS (Laboratory for Integrated MicroMechatronic Systems), dans l'équipe du Professeur Fujita.

Chapitre 1. Les techniques de détection de molécules biologiques

Commencée depuis 40 ans, la logique de la miniaturisation des composants électroniques déborde depuis quelques années sur d'autres domaines. En effet, la stratégie de réduction de la taille des composants présente quelques atouts : un accroissement de la concentration des blocs fonctionnels permettant une démultiplication des performances, un fonctionnement plus rapide dû à une diminution des tailles et donc des temps nécessaires au transport de l'information, des coûts de production peu élevés, et un produit final de dimensions raisonnables qui le rendent souvent transportable. Aussi l'idée d'accroître les performances d'un système en réduisant les échelles de ses sous-composants s'est-elle imposée avec force. C'est même devenu une des principales caractéristiques de l'industrie des semi-conducteurs. Ce mouvement de fond a été théorisé en 1965 par G. Moore, co-fondateur de la société *Intel*, dans sa célèbre proposition dite « loi de Moore ». Celle-ci prédit le doublement du nombre de transistors sur une puce tous les 18 à 24 mois, grâce à la réduction de plus en plus poussée des dimensions des transistors. Cette « loi » a toujours été vérifiée depuis, et actuellement une longueur de grille de 130 nm est devenue la référence pour les fabricants de microprocesseurs. Le résultat est impressionnant et se poursuit encore : les progrès sur la résolution de la gravure des transistors devraient permettre d'atteindre des longueurs de grille de 90 nm en 2003, passant ainsi le seuil psychologique des 100 nm en dessous duquel on parle de nanotechnologies.

La stratégie de la miniaturisation a donc largement démontré son potentiel et a inspiré d'autres domaines. Bien sûr, le concept est bien antérieur à la microélectronique. Auparavant, les ingénieurs s'efforçaient autant que possible de réduire la taille et la puissance de leurs machines pour les amener à des proportions raisonnables, tout en augmentant leurs performances. Cependant, si l'objectif était autrefois de rapprocher les dimensions des dispositifs vers des tailles humainement acceptables, le but est aujourd'hui de surpasser ces réductions d'échelle et de créer des objets de taille moindre que ceux que nous manipulons usuellement. Diminuer les dimensions de dispositifs est devenu un objectif en soi, la plus grande densité possible garantissant de bénéficier *a priori* d'une démultiplication des performances de ces systèmes.

1.1 Vers un rapprochement des disciplines scientifiques

1.1.1 *Emergence d'un nouveau concept*

Un des premiers à avoir entrevu le gigantesque potentiel permis par la miniaturisation est Richard Feynman, prix Nobel de physique en 1965. Dans son célèbre discours [1], il prédit la possibilité de « *manipuler et contrôler les choses sur une petite échelle* », c'est-à-dire « *au*

niveau des atomes individuels ». Dans son esprit, la miniaturisation ne se réduit pas à une simple réduction d'échelle d'objets déjà existants aux échelles macroscopiques, mais bien de « réarranger les atomes » pour créer par exemple « des fils de 10 ou 100 atomes de diamètre et des circuits de quelques milliers d'angströms de large ». L'objectif est très ambitieux, et a longtemps paru irréalisable. Ce n'est que récemment que les avancées technologiques ont permis d'explorer et de construire des objets à l'échelle du nanomètre, et de mettre en œuvre les premières expériences sur des molécules individuelles.

Feynman souligne de plus une particularité propre à ces très petites échelles : lorsque l'on réduit les dimensions des objets, les lois de la physique changent. A l'échelle du micromètre, l'importance relative des forces est modifiée [2, 3] : les forces de friction et de stiction prennent de l'importance, tandis que la gravité et l'inertie, qui sont essentielles dans le monde macroscopique, deviennent ici négligeables. Les propriétés des matériaux sont différentes sous la forme de films minces comparées à celles des matériaux massifs. Dans les systèmes microscopiques, les fluides ne peuvent presque circuler que sous le mode laminaire. Quant aux porteurs de charge (électrons ou trous), si l'on réduit encore les dimensions pour arriver dans le domaine des nanotechnologies, leur comportement commence à suivre les lois de la mécanique quantique. A titre d'exemples, signalons : les propriétés électriques particulières des systèmes mésoscopiques, c'est-à-dire des objets dont la taille est comprise entre le libre parcours moyen statistique des électrons (la moyenne des distances parcourues par les électrons entre deux collisions) et la longueur de cohérence de phase (la distance moyenne que parcourt un électron entre deux chocs inélastiques) ; les transferts électroniques par effet tunnel entre deux dispositifs séparés de quelques angströms ; les déplacements des lignes de dislocation ; les inhomogénéités de surface ; le mouvement brownien,...

1.1.2 Les techniques de fabrication

Compte tenu de leurs dimensions micrométriques ou même nanométriques, la manipulation de ces dispositifs requiert une attention particulière, tant dans la précision qui doit être apportée pendant la fabrication que dans le soin à éviter tout risque de pollution d'origine extérieure. Ainsi, pour éviter les poussières, on peut être amené à travailler en atmosphère contrôlée, en salle blanche par exemple. Les microtechnologies ont apporté un ensemble de techniques et de procédés pour produire des dispositifs de taille très réduite avec une grande précision [4]. Aujourd'hui des techniques sophistiquées permettent de construire des structures à l'échelle du nanomètre [5]. Un point important est la possibilité de déposer des matériaux spécifiques en couches minces, dont la forme peut être redessinée en surface par des méthodes de lithographie (photolithographie, lithographie électronique [*e-beam lithography*]) pour servir de masque et produire des structures en trois dimensions grâce à des

techniques de gravure (gravure humide, gravure plasma). De manière générale, chaque spécialité de la physique a vu l'apparition de nouveaux outils développés pour l'étude des phénomènes fondamentaux régissant le comportement de la matière. Les physiciens ont donc appris à fabriquer et manipuler des objets de plus en plus petits pour rechercher l'origine des propriétés mécaniques, optiques, électroniques,... de leurs matériaux.

1.1.3 Expansion de la chimie

Parallèlement à ces recherches, des progrès considérables ont été réalisés par les chimistes qui savent maintenant synthétiser des molécules de plus en plus grosses et de plus en plus complexes mesurant jusqu'à plusieurs nanomètres. De plus, des films d'épaisseur moléculaire peuvent être constitués, en contrôlant le dépôt plan par plan de molécules amphiphiles par la technique de Langmuir-Blodgett [6-8], ou en greffant des monocouches auto-assemblées sur une surface [8]. D'autre part, la *chimie supramoléculaire* s'emploie à réaliser des assemblages moléculaires complexes en utilisant des liaisons non-covalentes entre les molécules [9]. Elle s'appuie sur une reconnaissance des groupements moléculaires en mettant en jeu des mécanismes très sélectifs de fixation, de réaction, de transport,... Le savoir-faire est sans cesse croissant : des « machines moléculaires » simples permettent de réaliser des translations et des rotations d'une molécule par rapport à une autre [10]. Les chimistes tentent de réaliser des assemblages plus complexes encore en s'inspirant des principes d'auto-organisation à l'œuvre dans les organismes vivants, pour former spontanément de grandes architectures à partir de blocs moléculaires de base [11].

1.1.4 Biologie moléculaire

Les expressions « microtechnologies » et « nanotechnologies » désignent habituellement les techniques de manipulation d'objets dont la dimension est, respectivement, comprise entre 1 mm et 100 nm, et inférieure à 100 nm. A ce titre, presque tout ce qui se rapporte à la biologie peut être classé sous ces deux termes, puisque les cellules mesurent quelques dizaines de microns, les bactéries quelques microns, les virus quelques dizaines ou centaines de nanomètres, et qu'une « grosse » protéine comme le ribosome mesure 25 nm de diamètre. Cependant, par convention, les microtechnologies et les nanotechnologies ne désignent que les constructions artificielles à ces dimensions. Depuis une cinquantaine d'années, la compréhension de plus en plus fine du fonctionnement des structures biologiques a permis d'agir directement sur les processus biologiques. L'ingénierie génétique en est le meilleur exemple. Elle a pris comme postulat le fait que l'on puisse considérer la molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique) comme un matériau sur lequel on peut appliquer les

procédés et les outils de la chimie pour en modifier la structure. De manière générale, la richesse des interactions en biologie est une source quasi-infinie d'inspiration dont la complexité peut servir de modèle pour l'édification de nanodispositifs [12-14].

1.1.5 Les forces à l'échelle des molécules

De nouveaux outils de visualisation et d'analyse, voire de manipulation, de molécules isolées ont émergé ces dernières années. Ces techniques, très sensibles, interagissent avec la matière dans le même ordre de grandeur que les forces mises en jeu dans les phénomènes chimiques et biologiques [15, 16]. Par exemple, le microscope à force atomique (*Atomic Force Microscopy, AFM*), sensible aux forces attractives ou répulsives d'une surface sur une pointe agissant comme une sonde locale, peut mesurer des variations de hauteur de l'ordre du nanomètre correspondant à des forces de quelques dizaines de piconewtons (10^{-12} N). Les pinces optiques (*optical tweezers*), qui permettent de piéger et de déplacer des microbilles diélectriques dans un gradient de champ électromagnétique, génèrent des forces de l'ordre du piconewton et des déplacements nanométriques. Avec des pinces magnétiques, la même expérience permet d'exercer des forces très faibles allant jusqu'au femtonewton (10^{-15} N).

La sensibilité de ces techniques est suffisante pour sonder les liaisons intramoléculaires qui soudent les atomes les uns aux autres dans une molécule. Les liaisons covalentes, liaisons fortes au niveau moléculaire et qui assurent par exemple la cohésion de l'ossature d'une protéine, sont de l'ordre de 1 nN. Les liaisons non-covalentes, responsables du repliement des protéines dans leur conformation optimale, valent quelques dizaines de piconewtons. Ainsi, une force de 14 pN rompt les liaisons hydrogène liant une paire de bases dans l'ADN [17]. De même, au niveau le plus élémentaire de la biologie, les forces impliquées sont de quelques piconewtons : grâce à l'énergie libérée lors de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (adénosine triphosphate), la myosine, l'enzyme qui entraîne les microfilaments d'actine lors de la contraction des muscles, se déplace par des bonds de 5,5 à 27,5 nm générés par des forces de 4 pN [18] ; la kinésine, responsable du mouvement de protéines à l'intérieur des cellules, effectue des pas de 8 nm le long de microtubules avec l'énergie libérée par une molécule d'ATP ($14 k_B T$, soit $5,6 \times 10^{-20}$ J) [19],...

1.1.6 Vers les nanosciences

On s'aperçoit ainsi que les trois disciplines des sciences expérimentales, la physique, la chimie et la biologie, évoluent désormais vers une même direction, c'est-à-dire l'agencement de structures nanométriques (Figure 1.1). La réunion de nombreux travaux, forcément interdisciplinaires, derrière le concept récent de nanotechnologies est considérée

aujourd'hui comme une révolution scientifique et technologique majeure, au même titre que l'informatique dans les années 1980 ou les biotechnologies dans les années 1990.

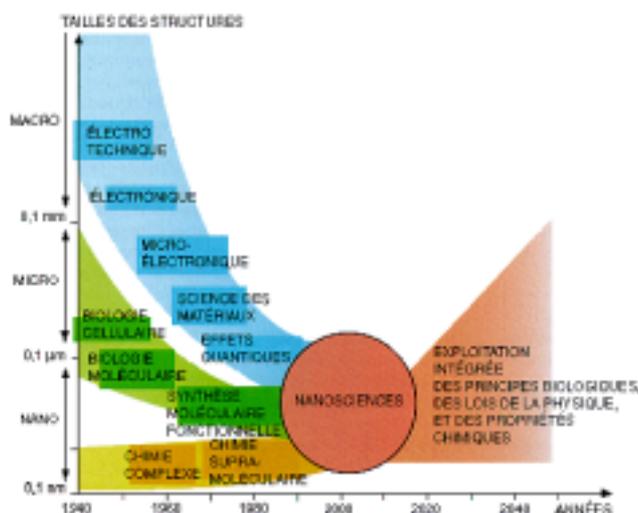


Figure 1.1: Convergence et fusion de la physique, de la biologie et de la chimie en une nouvelle discipline dédiée à la fabrication et l'étude de dispositifs nanométriques.

1.1.7 Les microsystèmes

L'essor des nanotechnologies ne se réalisera qu'à l'aide de structures intermédiaires faisant office de relai d'informations entre le monde macroscopique auquel se situe l'observateur et le monde des nanostructures que l'on cherche à piloter. La connexion des échelles nanoscopiques et macroscopiques peut être réalisée grâce à des structures de tailles intermédiaires telles que des machines micrométriques. Le domaine des *microsystèmes*, ou en anglais *micro-electromechanical systems (MEMS)*, est directement issu des techniques et des procédés initialement développés pour la microélectronique, bénéficiant en particulier des outils de gravure de structures sub-millimétriques.

Les MEMS sont des objets de dimensions généralement comprises entre 1 micron et 1 millimètre, construits pour remplir une fonction particulière. Ils sont présentés comme un moyen de rassembler des fonctionnalités très diverses sur un même support, à l'instar de ce qui a été réalisé pour les différents composants électroniques sur les circuits intégrés. L'originalité des microsystèmes est de ne pas porter sur une discipline scientifique particulière, mais au contraire d'être développés pour un grand nombre de secteurs [2, 3, 20]. Le plus souvent, comme l'indique le terme en anglais, ils s'appliquent dans des domaines associant des structures mécaniques couplées à des dispositifs électriques. Des poutres suspendues, des roues dentées, des micro-actionneurs pilotés par des « peignes »

électrostatiques, des micromoteurs, des capteurs sensibles à la pression, à l'accélération, à la contrainte... peuvent être fabriqués pour un grand nombre d'applications. Cependant, les microsystèmes ne se limitent pas seulement à des systèmes alliant la mécanique et l'électronique. Presque tous les domaines sont concernés : l'optique (filtres, commutateurs, cavités Fabry-Perrot,...), le magnétisme (magnétomètres, capteurs magnétorésistifs,...), la thermique (micro-actionneurs et capteurs thermiques), les télécommunications (filtres radiofréquence ou antennes pour les téléphones portables, commutateurs ou atténuateurs pour les télécommunications optiques...). Les efforts actuels portent sur le développement de microsystèmes pour des applications en biologie, telles que des capteurs biologiques miniaturisés pour détecter des substances biologiques dans un milieu ou des laboratoires-sur-puce qui permettent de manipuler et d'analyser rapidement divers composés biologiques.

1.2 Les biocapteurs

1.2.1 Définition

Les capteurs sont des dispositifs sensibles à leur environnement qui transforment une grandeur physique à mesurer en un autre type de signal. Celui-ci est généralement un signal électrique, ce qui permet d'effectuer facilement des opérations sur la grandeur mesurée : amplification du signal électrique, correction des données si nécessaire, stockage des informations,... Un capteur est caractérisé par sa sensibilité, sa sélectivité, son temps de réponse, ses conditions maximales d'utilisation (résistance aux environnements extrêmes, fréquence d'utilisation,...), l'influence des autres grandeurs telles que la température,...

Depuis une dizaine d'années, on peut remarquer une montée en puissance de travaux destinés à la mise au point de détecteurs de molécules biologiques. Pour un grand nombre d'entre eux, ils ont été développés originellement pour des applications en chimie et font aujourd'hui l'objet de perfectionnements pour y intégrer des composés biologiques. C'est le domaine des *capteurs biologiques* [21]. Cependant, les milieux biologiques, plus complexes que les environnements purement chimiques, nécessitent habituellement des adaptations pour s'assurer de la viabilité des objets manipulés. Un *biocapteur* est donc un capteur qui intègre dans sa structure de détection un élément biologique qui, idéalement, lui fournira sa sensibilité.

Les capteurs biologiques mettent en jeu des mécanismes de reconnaissance moléculaire du type « clef-serrure » entre des sondes moléculaires fixées sur une surface solide et des récepteurs à déceler dans un milieu. Ils permettent de quantifier des concentrations moléculaires d'une espèce bien définie grâce à des mécanismes de transduction, c'est-à-dire qui transforment la reconnaissance chimique d'une substance ciblée

en une autre grandeur plus évidente à nos yeux. Citons par exemple les techniques de détection optique, électrochimique (transformation de la reconnaissance en une grandeur électrique), de changement de phase (grandeur mécanique), de combustion (grandeur thermique),...

La stratégie des capteurs biologiques est basée sur la modification de leurs propriétés en présence de leurs molécules cibles : les propriétés « à vide » du capteur sont mesurées et enregistrées avant l'expérience, puis si un changement des propriétés mécaniques, thermiques, magnétiques, etc... du capteur est détecté, il est traduit en signal électrique récupéré par l'opérateur. L'utilisation de capteurs miniaturisés présente de nombreux avantages tels qu'une sensibilité accrue, une plus grande fiabilité, un meilleur temps de réponse, une consommation moindre en énergie et en produits de réaction. Du fait de leur petite taille, ils perturbent moins par leur présence l'environnement qu'ils étudient ; on s'attend donc à des mesures plus fidèles à la réalité. Ils peuvent être installés en plus grand nombre pour une description plus précise et plus localisée des phénomènes. Les capteurs biologiques miniaturisés visent à remplacer les installations déjà existantes dans des secteurs variés, parmi lesquels les instruments de diagnostic *in vitro*, les capteurs implantables, le tri à haut débit (*screening*) de molécules, ou la recherche de produits dans l'environnement.

1.2.2 Détection optique

Les capteurs les plus utilisés en biologie sont ceux fondés sur une détection optique des molécules biologiques. La technique principale consiste à intégrer un marqueur fluorescent à une molécule biologique pour suivre son évolution dans un milieu [22, 23]. Cette méthode, très sensible, permet au besoin d'étudier une molécule isolée dans un environnement, ou de mettre en compétition des populations de molécules portant des fluorophores différents qui émettent à des longueurs d'onde distinctes. L'avantage est de pouvoir déterminer la position du marqueur, et donc de la molécule, en temps réel. L'analyse en fluorescence permet de mettre en évidence l'évolution des populations marquées, par exemple leurs interactions avec d'autres protéines ou avec un substrat, leur dilution dans un milieu, leurs dégradations par des enzymes,... L'excitation des marqueurs est réalisée par un faisceau laser et les signaux lumineux émis en retour sont collectés par des photodiodes. On distingue les espèces fluorescentes avec différentes brillances caractéristiques en comptant le nombre de photons reçus par unité de temps. L'amplitude du signal est proportionnelle à la concentration de molécules en un endroit donné. Plusieurs marqueurs sont disponibles, les cytochromes et les rhodamines étant parmi les plus courants ¹. Cependant, cette méthode nécessite une étape de synthèse chimique pour fixer le fluorophore à la molécule. Pour tenter

¹ Une liste des fluorophores peut être trouvée sur le site <http://pingu.salk.edu/fcm/fluo.html>

de s'en affranchir, une méthode a été proposée qui consiste à insérer la séquence ADN codant une protéine « marqueur » dans le gène codant la protéine étudiée. Les protéines correspondantes sont alors « naturellement » marquées lorsqu'elles sont produites dans la cellule [24, 25].

Les autres méthodes de détection optique de composés biologiques reposent soit sur les propriétés intrinsèques de molécules étudiées (mesure du spectre d'absorption, bioluminescence), soit sur une modification des propriétés optiques de surfaces ou de guides d'onde lorsqu'une reconnaissance biomoléculaire est réalisée [26]. Dans le deuxième cas, une lumière monochromatique, projetée sur un substrat recouvert de sondes biologiques, est réfléchiée et analysée. La fixation de la molécule recherchée se traduit par un changement des propriétés réfléchissantes de la surface (indice de réfraction, absorbance, ondes évanescentes).

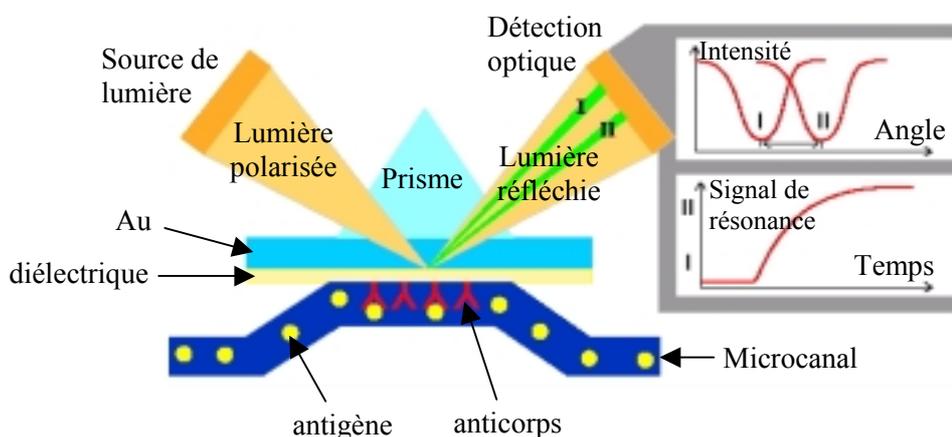


Figure 1.2: Schéma d'un dispositif de Résonance du Plasmon de Surface (SPR). Une lumière polarisée, projetée sur une interface métal-diélectrique, est partiellement affectée par l'onde de surface, elle-même sensible aux modifications des propriétés optiques lors de la liaison antigène-anticorps à la surface du diélectrique. La lumière réfléchiée est décomposée à travers un prisme, puis analysée afin de déterminer les concentrations d'antigène circulant dans le microcanal (schéma extrait du site de la société BIAcore AB : <http://www.biacore.com>).

Reposant sur ce principe, la résonance du plasmon de surface, ou en anglais *Surface Plasmon Resonance (SPR)*, est une oscillation de la densité de charge apparaissant à l'interface d'un métal et d'un diélectrique [27]. Les oscillations de la densité de charge, associées à une onde électromagnétique, se propagent parallèlement à l'interface et y restent confinées : l'intensité du champ décroît exponentiellement dans la direction normale à l'interface. La détection d'une reconnaissance biomoléculaire est possible grâce à deux propriétés des ondes de surface : la propagation du plasmon de surface est très sensible aux propriétés optiques du diélectrique ; et lorsqu'une onde optique est projetée sur l'interface, un

transfert résonant d'énergie s'effectue de l'onde optique vers l'onde de surface. Par conséquent, les variations des paramètres optiques du diélectrique dues à la présence de biomolécules se manifestent par une modification du spectre d'absorption de l'onde optique [28]. Un dispositif utilisant un prisme pour décomposer et analyser la lumière réfléchie est présenté à la figure 1.2. La technique SPR, appliquée à la détection d'interactions antigène-anticorps [29], protéine-protéine et protéine-ADN [30], permet de mesurer les concentrations de récepteurs en solution sans que l'addition d'un marqueur aux molécules cibles ne soit nécessaire.

1.2.3 Capteurs de chaleur

Les capteurs de chaleur peuvent être utiles dans le cas de réactions chimiques ou biologiques exothermiques. Les capteurs thermiques sont capables de détecter des variations infimes de température dans une enceinte. Des résistances sensibles à la température, appelées thermistances, peuvent être employées pour détecter rapidement des changements de température. Des thermistances sur lesquelles des enzymes ont été immobilisées peuvent être intéressantes pour quantifier une réaction enzymatique. Puisque toutes les réactions enzymatiques s'accompagnent d'une libération de chaleur et que le changement de température d'une réaction enzymatique est fonction de la concentration en réactifs, les « thermistances enzymatiques » sont capables d'estimer la quantité de produits impliqués dans la réaction [31]. Cependant, si les réactifs sont fortement dilués en solution, la chaleur produite est très faible et ne peut être détectée que par des capteurs thermiques miniaturisés et très sensibles [32].

1.2.4 Résonateurs

Utilisées comme capteurs de masse, les microbalances à quartz sont des résonateurs constitués d'un cristal de quartz piézoélectrique vibrant à sa fréquence de résonance (Figure 1.3). La fréquence de résonance d'un cristal piézoélectrique dépend de la masse de la substance adsorbée à sa surface. Ainsi, si la masse du produit à détecter est très inférieure à la masse du piézoélectrique, l'apport d'une substance, c'est-à-dire l'ajout d'une masse Δm , décale la fréquence de résonance du cristal d'une grandeur Δf . La diminution de la fréquence de résonance renseigne sur la masse donc sur la quantité de substance qui s'est déposée.

Les microbalances à quartz ont vu leur utilisation se généraliser lorsqu'il a été nécessaire d'estimer en temps réel les épaisseurs de matériaux déposés en films minces sur des substrats, par exemple lors de dépôt de métaux sous vide [33]. Certains biocapteurs exploitent la haute sensibilité des microbalances à quartz pour déceler des éléments

biologiques dans un environnement. Par exemple, des immunocapteurs reposent sur ce principe : il s'agit de détecteurs sur lesquels on a greffé des anticorps dans le but de reconnaître un antigène bien spécifique. Les immunocapteurs piézoélectriques peuvent être suffisamment sensibles pour enregistrer les faibles variations de masse, de l'ordre du nanogramme/cm², consécutives à la fixation de l'antigène sur l'anticorps [34]. Plus récemment, des extensions de ce principe ont été proposées pour la reconnaissance d'oligonucléotides (séquences courtes d'ADN) [35], de protéines en solution [36], de cellules [37]...

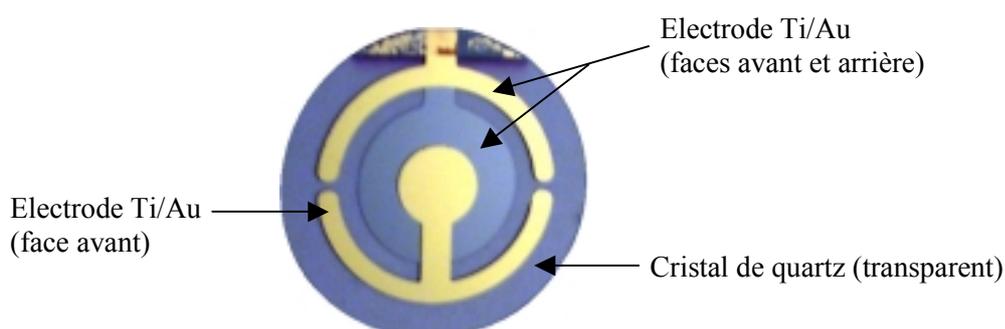


Figure 1.3: Photographie d'une microbalance à quartz.

Les dispositifs à onde acoustique de surface, ou *Surface Acoustic Wave (SAW) devices*, sont un autre type de résonateurs. Ils sont également basés sur un changement du comportement vibratoire d'un cristal piézoélectrique par la présence d'une substance à détecter [38]. Les systèmes SAW sont composés de deux parties : un émetteur envoie des oscillations mécaniques à haute fréquence dans un substrat piézoélectrique, et un récepteur capte l'onde de surface et la compare avec une vibration de référence. Là encore, la fréquence de vibration sera dépendante de la masse, donc de la quantité, de produit déposé. Si la surface est préalablement traitée, une forte discrimination peut être réalisée en faveur d'un composé bien défini, et sa présence se traduira par un retard, c'est-à-dire un changement de phase, de l'onde de surface. Les circuits SAW ont été appliqués comme biocapteurs, particulièrement en tant qu'immunocapteurs [39, 40], pour la reconnaissance spécifique d'antigènes, mais aussi pour mettre en évidence une réaction enzymatique [41]. Les dispositifs dits à ondes de plaque flexionnelle (*Flexure Plate Waves, FPW*) sont basés sur le même principe, mais le substrat est ici une plaque fine ; ils ont déjà été employés dans la détection d'antigènes du cancer du sein [42]. Le problème majeur des capteurs piézoélectriques est que l'adsorption de toute molécule sur le capteur entraîne la production d'un signal. Ces détecteurs sont donc fortement sujets aux interférences. Les challenges dans l'élaboration de capteurs résonants incluent également la réversibilité de la liaison, et la prise en compte des déformations mécaniques dues à la température.

1.2.5 Capteurs électrochimiques

L'oxydation ou la réduction, en solution, d'espèces chimiques sur une électrode est à la base de l'électrochimie. Les propriétés rédox d'une molécule peuvent être modifiées lors de sa fixation à un substrat conducteur, ce qui produit une reconnaissance moléculaire grâce à un transfert d'électron entre la molécule et l'électrode. Des molécules biologiques immobilisées sur les électrodes jouent la fonction de sondes moléculaires. Parmi les capteurs électrochimiques, citons en particulier les électrodes enzymatiques : des enzymes fixées à la surface de l'électrode servent de catalyseur à une réaction, à la suite de quoi les électrons extraits ou transférés dans les molécules biologiques créent un courant électrique. D'autres systèmes plus complexes utilisent des corps intermédiaires : les enzymes génèrent un produit chimique différent, un acide par exemple, qui est ensuite détecté par une autre électrode (électrode à pH). Il existe deux types de réaction électrochimique : ampérométrique et potentiométrique [43]. Dans le premier cas, l'électrode est soumise à un potentiel aussi proche de zéro que possible, et lorsque l'enzyme entre en réaction, les électrons sont transférés dans l'électrode et créent un courant [44]. Dans le cas de la détection potentiométrique, le signal mesuré est le potentiel qu'il faut appliquer à l'électrode pour compenser la tension créée par l'action des enzymes, et maintenir ainsi le courant nul.

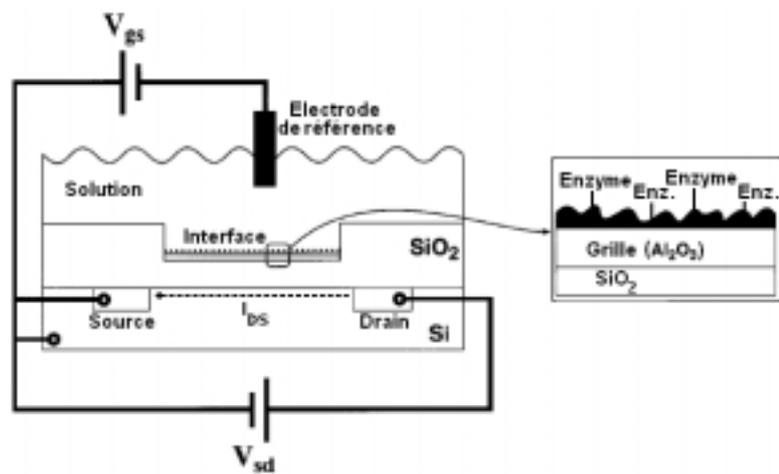


Figure 1.4: Schéma d'un transistor à effet de champ enzymatique (ENFET). Les enzymes influent localement sur le pH, ce qui se traduit par une variation de charge sur la grille contrôlant le courant entre la source et le drain.

Le transistor à effet de champ sensible aux ions (*Ion-Sensitive Field Effect Transistor*, *ISFET*) est une évolution des capteurs potentiométriques [45, 46]. Des transistors à effet de champ enzymatiques ont été développés, sur lesquels des enzymes recouvrant la grille altèrent localement le pH de la solution et modifient ainsi le potentiel appliqué sur la grille. Le courant

entre la source et le drain est donc la conséquence directe de l'action des enzymes (Figure 1.4). Des dispositifs ISFET ont été développés pour détecter des substances biologiques, tels que des neurotransmetteurs [47] ou la péniciline [48]. Cependant, dans la plupart des cas, la fiabilité des ISFETs est mise en défaut par des problèmes de dérive et de reproductibilité.

Des biocapteurs à ADN dont le principe de base est l'oxydation électrochimique de la molécule, ont été proposés récemment [49-51]. Lorsque des sondes oligonucléotidiques sont fixées sur une électrode, une hybridation de l'ADN, c'est-à-dire l'appariement de deux brins d'ADN complémentaires, modifie le potentiel de l'électrode et produit un courant. Cette technique permet de détecter des séquences nucléiques spécifiques d'ADN simple brin.

Une autre configuration, plus universelle, met en évidence la présence aussi bien de l'ADN simple brin que de l'ADN double brin ou de l'ARN dans une solution, et ceci sans contact physique entre les séquences nucléiques et l'électrode. Cette méthode, dite de détection électrocatalytique, repose sur le fait qu'un acide nucléique en particulier, la guanine, est relativement facile à oxyder [49]. La présence de guanine, et donc d'ADN, est détectée grâce à un médiateur qui subit une oxydation au contact de l'électrode et une réduction sur la guanine, ce qui entretient un courant tant que les guanines sont en position de donner des électrons. Puisque chaque brin d'ADN comporte un nombre particulier de guanines, la variation de charge de l'électrode sera proportionnelle au nombre de guanines dans la séquence, ce qui permet de reconnaître des séquences ADN bien distinctes, provenant de virus différents par exemple [52]. Cette technique est suffisamment sensible pour permettre la détection d'une erreur d'appariement de la guanine ; des tests de révélation des défauts dans les séquences ADN pourraient ainsi être fondés sur l'analyse de leurs propriétés électrochimiques [51].

1.3 Microsystèmes appliqués à la biologie

1.3.1 Les biomicrosystèmes

En 1990, A. Manz a présenté un nouveau concept [53] : plutôt que de développer des dispositifs destinés à la détection d'une unique espèce chimique ou biologique, il propose des systèmes d'analyse miniaturisés et regroupés sur une même « puce ». A l'inverse des biocapteurs, ces systèmes polyvalents seraient aptes à traiter un grand nombre de substances. Manz a baptisé ces dispositifs *micro total analysis systems* (μ TAS). D'autres dénominations sont couramment employées : laboratoires sur puce, lab-on-a-chip, labopuces, bioMEMS... Les briques de base de ces futurs « laboratoires miniaturisés » sont essentiellement des procédés usuels d'analyse chimique, mais aussi de nouvelles techniques développées pour

l'occasion, dont les dimensions sont réduites afin que soient présents sur un même support tous les outils nécessaires à la manipulation de molécules biologiques ou de cellules. A ce jour, faute d'une intégration véritablement effective à ce niveau, aucun microsystème ne répond encore vraiment à la définition de plateformes pour l'analyse d'un grand nombre de corps biologiques, même si plusieurs blocs fonctionnels ont démontré individuellement leur efficacité.

Des microcanaux, dans lesquels circulent des volumes très faibles de fluides, relient les différents sous-composants d'un microsystème complexe et réalisent le transport des molécules biologiques. L'avantage majeur lors de l'utilisation de *systèmes microfluidiques* est la possibilité de manipuler de très petites quantités de fluide, ce qui permet d'économiser les produits de réaction et de réduire les déchets [54]. Les déplacements des fluides sont assurés par un champ électrique (transport électro-osmotique) [55], par des forces centrifuges [56] ou par une différence de pression sous l'action d'une micropompe [57, 58] (Figure 1.5). Cependant, à ces petites dimensions, les écoulements sont presque exclusivement laminaires, et l'absence de turbulences perturbe le mélange de produits différents. De même, les fonctions de séparation ou d'injection des fluides sont encore imparfaitement réalisées, notamment par des microfiltres [59] et des microvalves [57]. Des microréacteurs procurant des conditions physiques et chimiques adéquates (refroidissement, incubation, pH,...) fournissent des enceintes opérationnelles dans lesquelles peuvent se dérouler des réactions biologiques. Des applications importantes en biologie moléculaire supposent en particulier la capacité de séparer et d'analyser les brins d'ADN et les protéines.

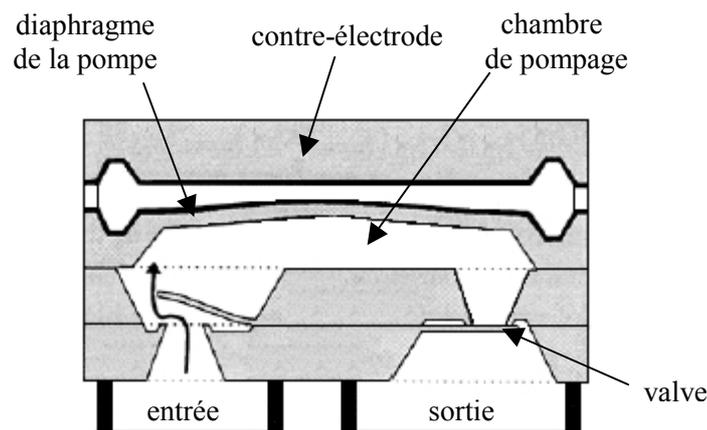


Figure 1.5: Micropompe électrostatique, avec deux valves de contrôle à sens unique. Dans la chambre de pompage, les mouvements de haut en bas de la membrane déformable attirent le fluide en entrée puis le repoussent vers la cavité de sortie [57].

1.3.2 Applications à la génomique et à la protéomique

Compte tenu de la très forte demande pour des outils de séquençage et des tests de diagnostic génétique rapides, fonctionnant à haut débit et peu coûteux, toutes les techniques usuelles de manipulation de l'ADN ont déjà trouvé une transposition en microtechnologies [60, 61]. L'amplification d'un échantillon d'ADN, c'est-à-dire la réplication artificielle de l'ADN, permet d'accroître les populations à des millions d'exemplaires grâce à l'utilisation d'enzymes. Cette étape essentielle est à la base du génie génétique. La méthode la plus connue et la plus utilisée est la réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction, PCR*). Elle implique des cycles de température à trois étapes : séparation des 2 brins dans un bioréacteur stabilisé à 95°C, hybridation à environ 60°C des amorces (oligonucléotides synthétiques complémentaires) aux extrémités des 2 simples brins, et enfin synthèse de 2 nouveaux brins sous l'action d'une enzyme *ADN polymérase* à environ 77°C. Chaque cycle thermique double donc le nombre de molécules d'ADN. Puisqu'il faut une trentaine de cycles pour obtenir 1 milliard de brins à partir d'un seul ADN, cette technique peut bénéficier de la miniaturisation. Des cycles d'amplification plus rapides résultant d'un meilleur transfert d'énergie vers de plus faibles volumes, peuvent être obtenus grâce à l'utilisation de microréacteurs [62] (Figure 1.6) ou d'un dispositif microfluidique dans lequel les microcanaux passent périodiquement à travers trois zones à température fixée [63].

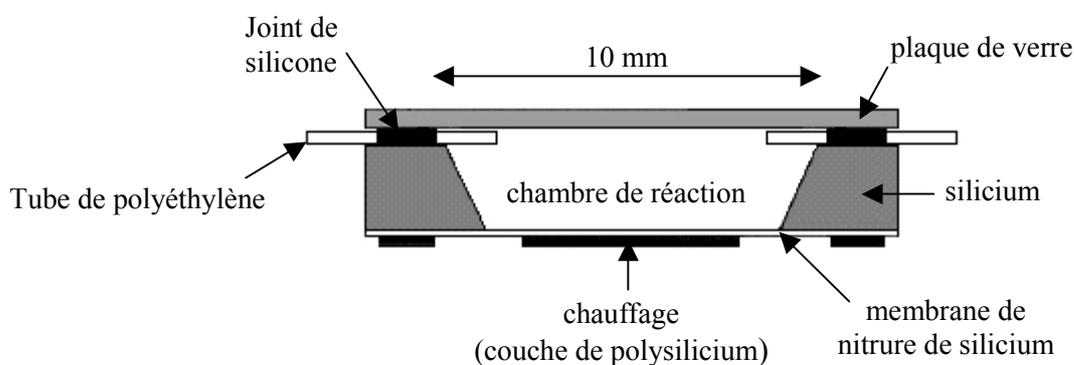


Figure 1.6: Microréacteur en silicium pour une réaction PCR [62].

L'électrophorèse est une technique de séparation de molécules biologiques à partir d'un mélange. Les molécules d'ADN en solution sont chargées négativement. Un champ électrique provoque la migration des molécules, et leur mobilité dépend principalement de leur taille et de leur charge. Un capillaire de quelques dizaines de millimètres peut séparer un grand nombre de fragments d'ADN [64] (Figure 1.7-a). La rapidité et la résolution de la séparation par l'électrophorèse capillaire sur puce, laissent envisager son utilisation pour le séquençage à haut débit de l'ADN [65]. Les procédés de séparation chromatographique, basés sur la distribution de masse moléculaire dans une petite quantité d'échantillon, accèdent

également à des différences de vitesse de migration suffisantes pour distinguer efficacement les molécules [66] (Figure 1.7-b). Enfin, une approche récente permet de trier de longs brins d'ADN repliés sur eux-mêmes, en fonction de leur taille grâce à un microcanal dont l'épaisseur est réduite par endroits à moins de 100 nanomètres [67]. Les molécules d'ADN sont attirées vers une anode, et la possibilité de glisser à travers les régions d'épaisseur réduite dépend directement du volume du brin d'ADN (Figure 1.8). La progression des plus grands brins d'ADN peut aussi être ralentie par des colonnes créées par auto-assemblage de nanoparticules magnétiques [68].

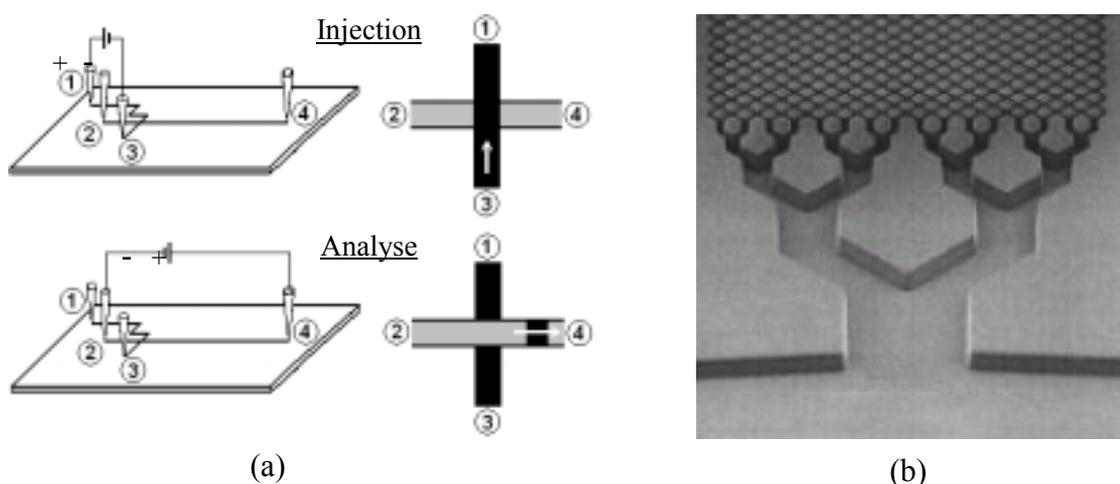


Figure 1.7: Miniaturisation des techniques de séparation usuelles. a) Electrophorèse capillaire réalisée par des microcanaux croisés permettant le chargement et la séparation de molécules biologiques. Un échantillon contenant plus de 400 fragments d'ADN peut être séparé en appliquant des champs électriques de 200 V/cm sur un capillaire de 3,5 cm (d'après [64]). b) Colonne chromatographique, composée de structures de support de $5 \times 5 \times 10 \mu\text{m}^3$ et de canaux de largeur $1,5 \mu\text{m}$ [66].

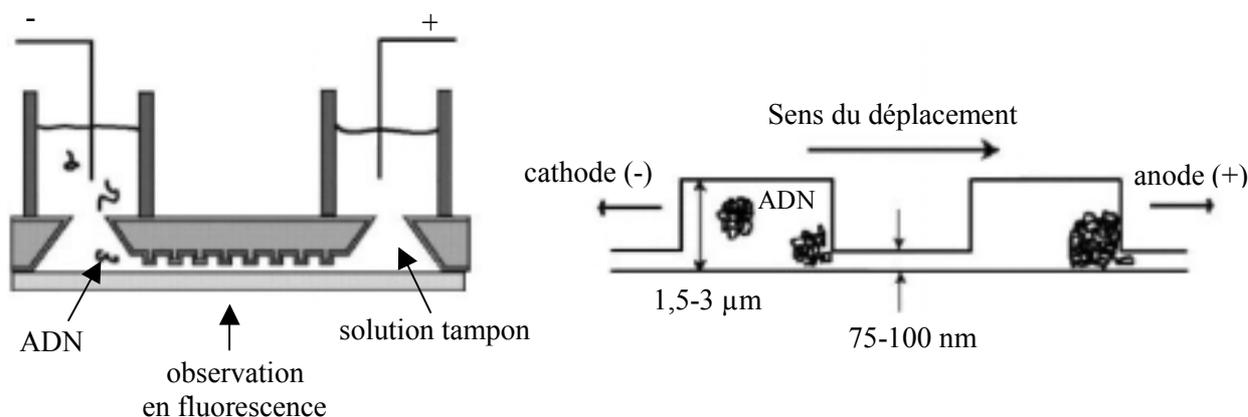


Figure 1.8: Dispositif de séparation nanofluidique. De longues molécules d'ADN repliées en paquets sont piégées entre des régions dont l'épaisseur est inférieure à 100 nm. Leur probabilité de s'en échapper est proportionnelle à leur capacité à s'étaler dans le plan horizontal. Les plus grandes molécules, qui possèdent un volume plus malléable, traversent plus rapidement le dispositif [67].

Autre technique d'analyse très courante en biochimie et en biologie moléculaire, la spectrométrie de masse est particulièrement adaptée aux composés biologiques [69]. Elle renseigne sur la masse des espèces et permet d'accéder éventuellement à des données structurales. Un spectromètre de masse est constitué de trois blocs : un système d'ionisation des espèces neutres, un analyseur qui sépare les différentes espèces ionisées en fonction du rapport masse/charge, et enfin un détecteur. La fabrication d'un spectromètre de masse sur une puce est rendue possible en utilisant une technique d'ionisation compatible avec les systèmes fluidiques, telle que l'électronébullition, ce qui laisse envisager l'intégration d'un spectromètre de masse directement en sortie d'un dispositif de séparation [70].

1.4 Puces à ADN, puces à protéines

1.4.1 Principe des puces à ADN

Les puces à ADN, encore appelées *DNA microarrays*, sont fondées sur la grande sélectivité des réactions d'hybridation entre les brins d'ADN. Des sondes oligonucléotidiques sont immobilisées sous la forme de spots à la surface de la puce. A chaque spot correspond une sonde particulière dont la nature est archivée dans une base de données. Ainsi, lorsqu'un fragment d'ADN, précédemment marqué par un fluorophore, s'hybride à son complémentaire sur la puce, la position de la fluorescence révèle la séquence du fragment d'ADN (Figure 1.9). Les puces à ADN sont donc des supports d'hybridation destinés aux tests de séquençage [71]. Une application est la *mesure différentielle des niveaux d'expression des gènes* en vue de déterminer des différences entre deux génomes proches [72]. Pour cela, les deux séquences que l'on cherche à comparer sont marquées par un fluorochrome différent. Les deux lots sont ensuite mélangés dans les mêmes proportions et hybridés sur la puce. Après réaction, les intensités relatives des signaux mettent en évidence les différences, par exemple les mutations, dans les séquences ADN (Figure 1.9).

La surface totale utile d'une puce à ADN est souvent inférieure à un centimètre carré, où se concentrent quelques dizaines à des centaines de milliers de sondes différentes. La taille des sondes, c'est-à-dire leur nombre de bases, et la densité des spots sont déterminantes. Un élément crucial est également la mise au point d'une chimie de surface adaptée, fiable et facile à mettre en œuvre [73].

La fabrication *in situ* des sondes exploite les techniques de photolithographie et de synthèse de l'ADN en phase solide [74, 75]. Le principe est le suivant : des groupements chimiques photolabiles sont fixés aux extrémités 3' des nucléotides ; grâce à des masques optiques qui protègent certaines zones de la puce et qui en exposent d'autres à une lumière directe, les groupements photolabiles peuvent être retirés à volonté sur les spots où l'on

souhaite ajouter l'un ou l'autre des quatre nucléotides (A, T, C, G). Les sondes, dont la longueur peut atteindre jusqu'à une vingtaine de *mers*, sont donc construites par addition successive des nucléotides. L'accroissement de toutes les sondes de la puce d'une seule base nécessite un jeu de quatre masques optiques (un masque par nucléotide). Pour s'affranchir du coût élevé des masques optiques, une technique voisine a été proposée mettant en jeu une matrice de micromiroirs jouant le rôle de « masques virtuels » [76].

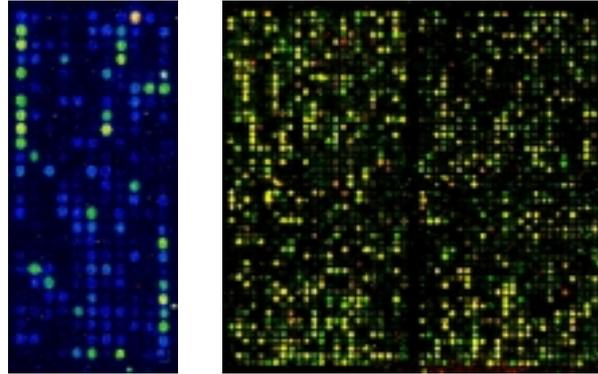


Figure 1.9: Une puce à ADN comporte plusieurs dizaines de milliers d'ADN simple brin. La nature des sondes sur chaque spot est enregistrée très précisément avant l'expérience. La réaction d'hybridation d'un ADN ou d'un ARN marqué par un fluorophore avec les sondes d'un spot est détectée par fluorescence. Si deux séquences ARN provenant d'une souche saine et d'une souche malade et portant un marqueur différent sont déposées simultanément sur la puce, on réalise alors une mesure différentielle de l'expression des gènes.

Une autre voie d'élaboration des puces consiste à synthétiser au préalable les sondes de manière classique, par amplification PCR par exemple, puis à les fixer sur la surface par greffage chimique. Les sondes peuvent dans ce cas être composées de centaines de bases. Les spots sont préparés en déposant sur la surface, à l'aide d'un « spotter à aiguilles » [72] ou de têtes d'imprimantes [77], des microgouttes contenant les sondes à immobiliser. Il est aussi possible de fixer les oligonucléotides présynthétisés en attirant les sondes par électrochimie sur des plots métalliques [78].

1.4.2 Puces à peptides, puces à protéines

Le concept de microarray a été étendu récemment à l'étude des protéines [79, 80]. Les puces à protéines sont des outils appropriés pour la caractérisation d'interactions biomoléculaires, telles que des interactions protéine/protéine, protéine/ligand, antigène/anticorps [24]... Contrairement à l'hybridation de l'ADN qui repose sur un mécanisme universel, les protéines ont des comportements individuels très variables, ce qui implique une

grande diversité d'interactions entre les protéines. Cela suppose donc, pour la conception d'un équivalent protéomique aux puces à ADN, de connaître au préalable le degré de spécificité de l'interaction entre deux protéines, leur degré d'affinité à créer une liaison et la géométrie des surfaces mises en contact.

Les puces à protéines, développées pour des applications plus spécialisées que les puces à ADN, pour diagnostiquer l'existence d'un corps biologique particulier dans un organisme par exemple, reposent sur la fixation sur la surface de ligands (voire de protéines immobilisées par des ligands) faisant office de sondes et sur l'action d'une deuxième protéine apportée *a posteriori* par l'opérateur. Cette deuxième protéine, marquée en fluorescence, joue la fonction de détection, car sa présence sur la surface est tributaire de celle de la protéine recherchée. La révélation est donc effectuée en maintenant la molécule étudiée en « sandwich » entre la sonde et la protéine marquée, grâce à deux interactions spécifiques qui ciblent cette molécule en particulier.

Un des choix les plus évidents pour réaliser les interactions requises, est l'emploi d'anticorps monoclonaux. En effet, les anticorps sont capables de se fixer très fortement à un antigène spécifique, et il existe un anticorps pour presque tous les composants biologiques. C'est pourquoi les anticorps peuvent être utilisés à la fois comme sondes fixées sur la surface et comme détecteurs. Il suffit pour cela que les deux anticorps ciblent deux régions différentes de l'antigène.

1.4.3 Techniques de détection

Un enjeu important pour l'avenir des puces à ADN et à protéines est la capacité à traiter de manière automatique le nombre gigantesque de données extraites de ces dispositifs. Ceci peut être réalisé par des programmes de bioinformatique. De même, des améliorations sont nécessaires pour disposer de systèmes de lecture meilleurs marchés que les microscopes et les scanners à fluorescence employés actuellement. Ainsi, pour éliminer l'appareillage coûteux de détection optique, une solution pourrait être d'utiliser des marqueurs radioactifs qui peuvent être détectés en plaçant les microarrays directement contre une puce CCD conventionnelle [81]. Une autre méthode est de marquer l'un des partenaires de la reconnaissance biomoléculaire par un colloïde d'or. Des modifications locales des propriétés de réflexion de la surface de la puce, détectées par une simple caméra ou à l'aide d'un microscope optique, révèlent les spots qui ont été recouverts de nanoparticules d'or, c'est-à-dire ceux pour lesquels les molécules ciblées marquées avec les colloïdes d'or ont été capturées [82]. Pour améliorer la visibilité des spots, il est également possible de les recouvrir par un « miroir d'argent » (précipité d'argent), en réduisant des particules d'argent contre les nanoparticules d'or [83, 84].

1.5 Nanobiotechnologies

L'objectif des nanotechnologies est de créer et d'exploiter des matériaux et des dispositifs à l'échelle des atomes et des molécules. Grâce aux nanotechnologies, des perfectionnements sont attendus dans les outils utilisés pour la recherche biomédicale. En particulier, la visualisation et la manipulation d'objets individuels permet déjà d'étudier les interactions entre quelques molécules, par opposition aux mesures statistiques moyennées sur de grands ensembles de particules.

1.5.1 Visualisation et manipulation de molécules biologiques

Depuis quelques années, plusieurs équipes se sont lancées dans des expériences de micromanipulation de molécules uniques. Ainsi, la résistance mécanique d'un brin d'ADN peut être mesurée en accrochant une extrémité du brin sur une surface et l'autre extrémité à une microbille magnétique. Par l'intermédiaire de la microbille, une force peut être exercée sur la molécule en appliquant un gradient de champ magnétique (Figure 1.10). Des mesures en traction ont par exemple montré l'apparition d'une déformation inélastique de la structure de l'ADN pour des forces supérieures à 70 pN ; des contraintes de torsion peuvent modifier le pas hélicoïdal et être à l'origine d'une structure originale de la molécule d'ADN [15, 16].

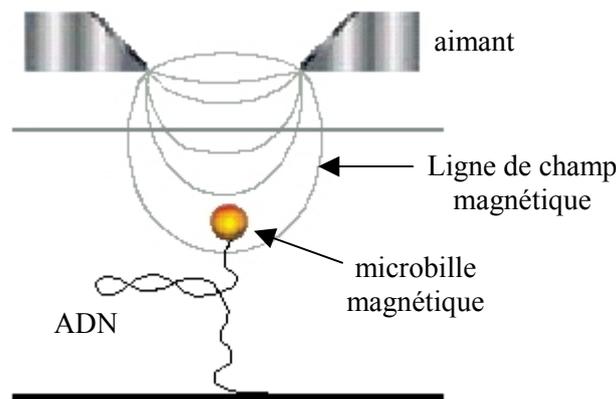


Figure 1.10: Un brin d'ADN, dont l'extrémité est fixée à une microbille dans un champ magnétique, subit des contraintes de traction et de torsion. Les forces exercées permettent de mesurer les contraintes internes dans la molécule d'ADN.

Le déplacement de la kinésine (protéine musculaire) sur un microtubule a été étudié par une méthode similaire impliquant une bille de silice dans un champ électromagnétique [19]. Les « pinces optiques » (*optical tweezers*), ou « piègeage laser » (*laser trapping*), permettent de manipuler individuellement de petits objets en solution, tels que des cellules,

des bactéries, des microbilles,... Dans un tel système, ces objets micrométriques sont « piégés » dans le champ électromagnétique créé par un laser, et peuvent ainsi être sélectionnés et déplacés à volonté. Des microélectrodes génèrent également des champs alternatifs à haute fréquence qui modifient les trajectoires des particules et peuvent les attraper dans des « cages de champ diélectrophorétique » composées de 8 électrodes orientées dans le même sens (Figure 1.11-a).

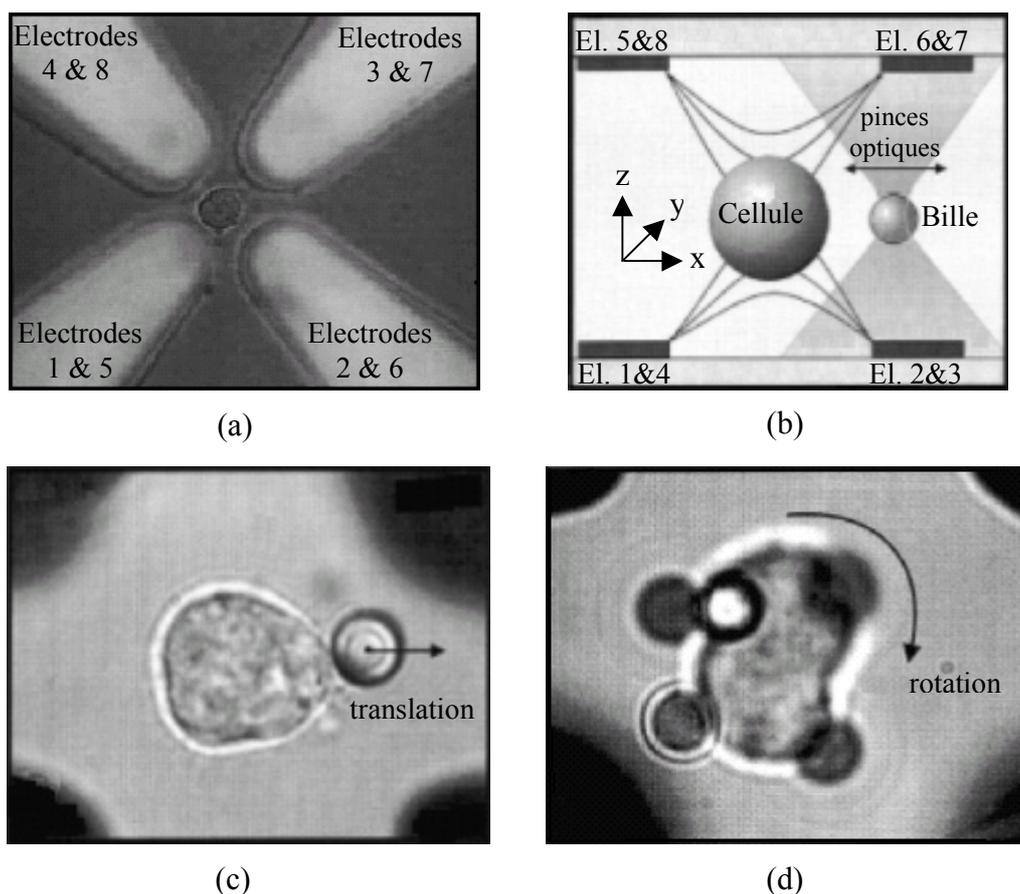


Figure 1.11: Combinaison d'une cage de champ diélectrophorétique et de pinces optiques pour des mesures d'adhésion microbille-cellule. a) Cellule piégée dans une cage constituée de 8 microélectrodes entre lesquelles est appliquée une tension alternative de 10 V à 5 MHz. b) Représentation schématique du système. La cellule est fixée dans la cage, tandis que la bille suit la position de la focale du faisceau laser. c) Une particule de polystyrène de 4,1 μm en contact avec une cellule de 15 μm de diamètre pour une expérience de traction. d) Rotation induite par l'action de cinq billes attachées à une seule cellule [87, 88].

Ainsi, le champ appliqué entre les électrodes permet de mesurer les caractéristiques du moteur de propulsion d'une bactérie [85] ou de faire fusionner des cellules vivantes [86]. La combinaison des piègeages optique et diélectrophorétique est à la base de mesures d'adhésion entre une microbille et une cellule : la bille est pilotée par les pinces optiques et amenée en

contact avec une cellule isolée dans une cage de champ diélectrophorétique (Figure 1.11) [87]. Cette technique, adaptée à des mesures d'interactions entre deux protéines [88], est appliquée au tri à grande vitesse de cellules ou de microorganismes [89].

Une autre voie pour visualiser et manipuler des molécules biologiques est le microscope à force atomique (AFM ; voir la description au chapitre 2) qui permet d'observer des structures biologiques directement dans leur environnement [90] et, depuis peu, de quantifier des forces d'interaction individuelle entre des protéines [91] : en fixant des biomolécules sur l'extrémité d'une pointe AFM, celles-ci peuvent interagir avec d'autres molécules disposées sur la surface. Pour minimiser la surface de contact à une seule interaction ligand/récepteur, un nanotube de carbone peut aussi être employé comme sonde [92]. La force de rupture du couple biotine/streptavidine a été mesurée par cette méthode [92, 93]. De même, il a été démontré la possibilité d'étudier la cinétique de dénaturation et de repliement d'une protéine lorsqu'elle est soumise à une force de traction exercée par la pointe AFM [94].

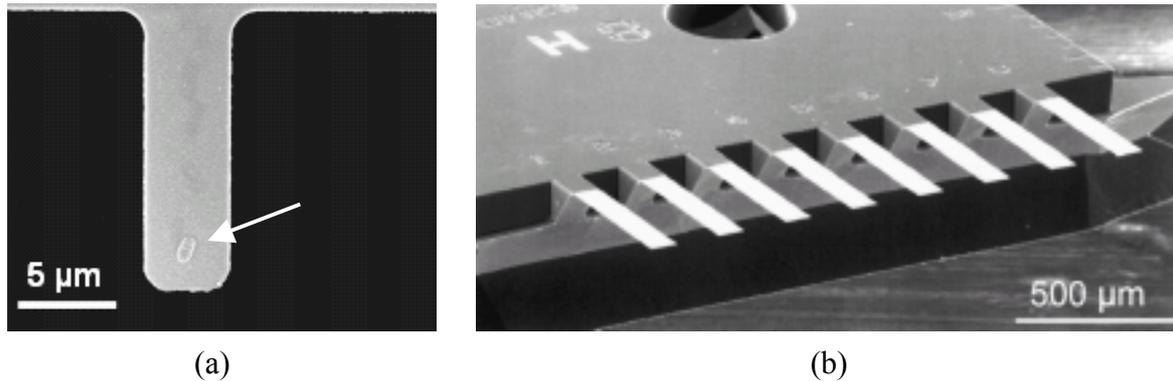


Figure 1.12: a) Image par microscopie électronique à balayage d'une bactérie *Escherichia coli* fixée sur un cantilever recouvert d'une couche d'anticorps dirigés contre cette bactérie [95]. b) Image par microscopie électronique à balayage d'une rangée de 8 cantilevers avant leur fonctionnalisation par dépôt de sondes ou de films de polymères sur leur face supérieure [96].

Les techniques mises en œuvre en microscopie à force atomique trouvent également une application inattendue dans des tests de reconnaissance biologique. Une piste nouvelle pour améliorer la sensibilité et la fiabilité des biocapteurs résonants, consiste à utiliser des cantilevers comme structure vibrante. En effet, ces oscillateurs nanomécaniques peuvent détecter des masses déposées sur leur surface jusqu'à environ 1 pg, c'est-à-dire la masse d'une bactérie, grâce à une variation de la fréquence de résonance du cantilever, à la manière des microbalances à quartz (Figure 1.12-a) [95]. Pour déceler la présence de protéines

spécifiques ou de séquences génétiques particulières en milieu liquide, la surface d'une rangée de cantilevers est recouverte de sondes sur leur face supérieure (Figure 1.12-b) [96, 97]. Lorsqu'une séquence complémentaire se fixe aux brins attachés, le cantilever courbe de quelques nanomètres sous l'influence d'interactions stériques, hydrophobes ou électrostatiques nouvelles sur sa surface. La mesure de la déflexion du cantilever est obtenue en retirant la composante vibratoire du signal pour ne conserver que sa composante continue.

Les nanostructures semi-conductrices, qui présentent un rapport surface/volume élevé, sont très sensibles aux variations de charge sur leur surface. A ce titre, elles peuvent constituer un nouveau type de capteurs d'espèces biologiques. La fonctionnalisation de la surface de nanofils de silicium permet la détection électronique en temps réel d'une interaction biomoléculaire. Une modification de la conductance d'un nanofil recouvert de ligands, est mesurée lorsque la molécule complémentaire est introduite dans la solution [98].

Les marqueurs les plus utilisés en biologie sont des molécules organiques fluorescentes. Cependant, ces molécules tendent à se décomposer rapidement et supportent un nombre limité de cycles d'excitation et d'émission de lumière. Les nanocristaux de semi-conducteur, tels que des nanoparticules à base de CdSe, peuvent fournir une alternative intéressante aux marqueurs fluorescents usuels [99, 100]. En effet, outre leur plus grande durée de vie, ils sont plus adaptés pour des expériences impliquant simultanément plusieurs marqueurs différents. Contrairement aux molécules organiques dont chaque espèce est excitée à sa propre longueur d'onde, une seule source lumineuse suffit pour exciter toutes les boîtes quantiques, tandis que leur longueur d'onde d'émission est fonction de la taille du nanocristal. Le suivi simultané de l'évolution d'un grand nombre de molécules biologiques est rendu possible en disposant d'une gamme quasi-infinie de marqueurs fluorescents tous distincts, par exemple des microbilles constituées de combinaisons de nanoparticules [101].

La déshybridation contrôlée de l'ADN peut être réalisée en lui attachant un nanocristal d'or de 1,4 nm de diamètre. Celui-ci, placé dans un champ magnétique radio-fréquence, est le siège de courants induits qui élèvent sa température et provoquent la dénaturation locale de la molécule [102]. Cette méthode, qui permet de contrôler des parties de protéine ou d'ADN sans affecter le reste de la molécule, pourrait être employée dans le traitement des tumeurs, dont la croissance est arrêtée grâce à la chaleur dégagée par des particules magnétiques microscopiques [103].

La présence d'une séquence génétique particulière dans une solution peut être déterminée, via l'observation par voie optique d'un changement de phase dû à l'agrégation de nanoparticules d'or d'une dizaine de nanomètres de diamètre [104]. L'auto-assemblage de nanoparticules en réseaux est effectué en divisant les particules en 2 lots et en fixant sur

chaque lot une des extrémités de la séquence ADN complémentaire de la séquence génétique que l'on recherche. Les sondes portées par les nanoparticules s'hybrident aux extrémités de la séquence ciblée lorsque celle-ci est présente. Les particules, qui portent plusieurs brins, s'agglutinent et forment de proche en proche un amas qui modifie les propriétés optiques de la solution. La reconnaissance de protéines peut aussi être réalisée de cette manière pour fonder des tests de détection spécifiques et qui ne nécessitent pas de système de lecture particulier [105].

1.5.2 L'apport de la biologie

Les avancées dans la compréhension du fonctionnement interne des molécules à l'œuvre dans les phénomènes biologiques peuvent constituer une source d'inspiration pour le développement de nanostructures artificielles. En effet, les capacités d'organisation et la précision à laquelle les molécules remplissent leur fonction sont saisissantes. L'ingénierie de nouveaux dispositifs pour des applications biologiques et médicales peut donc tirer parti de l'intégration de procédés biologiques sophistiqués. Une première idée est de détourner les molécules de leur fonction initiale dans le but de leur faire manipuler des substances biologiques hors de leur milieu naturel.

La description de plus en plus précise du mécanisme d'action des protéines a révélé que certaines d'entre elles sont très complexes et agissent comme de véritables « machines » à l'échelle des molécules. Sous cette optique, on peut présenter la biologie moléculaire comme une collection de machines extrêmement sophistiquées. L'ATPase constitue un exemple de ces « moteurs moléculaires » [13]. Cette enzyme convertit l'énergie électrique d'un flux de protons (ions H^+) à travers une membrane, en énergie chimique par le biais de la synthèse de l'ATP (adénosine triphosphate). L'ATPase est constituée de 2 parties : l'une, mobile, est semblable à un rotor qui, entraîné par le courant ionique, tourne dans un stator. La rotation est responsable de la liaison d'un phosphate à une molécule d'ADP (adénosine diphosphate). C'est également un moteur rotatif qui est à la base des battements des flagelles. D'autres moteurs, qualifiés de *moteurs browniens*, mettent à profit l'agitation thermique à ces échelles en favorisant, grâce à des mécanismes de cliquet, les mouvements des molécules dans une direction particulière [106]. Des protéines intramembranaires sont ainsi capables de pomper des particules chargées contre le gradient électrochimique. Un autre exemple est fourni par les déplacements de la myosine [18], ou ceux de la kinésine [19].

De nouveaux outils peuvent être développés en incorporant les protéines dont le fonctionnement est bien compris. Ainsi, la détection et l'identification de l'ADN est réalisée avec un « détecteur à nanopores », constitué d'une protéine membranaire, l' α -hémolysine, qui

forme un pore de 2 nm de diamètre dans une bicouche lipidique (Figure 1.13) [107]. Une tension appliquée à travers la membrane attire vers le nanopore les brins d'ADN chargés négativement. Une variation caractéristique du courant au passage de l'ADN dans le nanopore permet de distinguer individuellement les molécules et indique les proportions de chaque type d'ADN dans l'échantillon. Ce dispositif est suffisamment sensible pour détecter la signature particulière de chaque acide nucléique passant dans le pore [108].

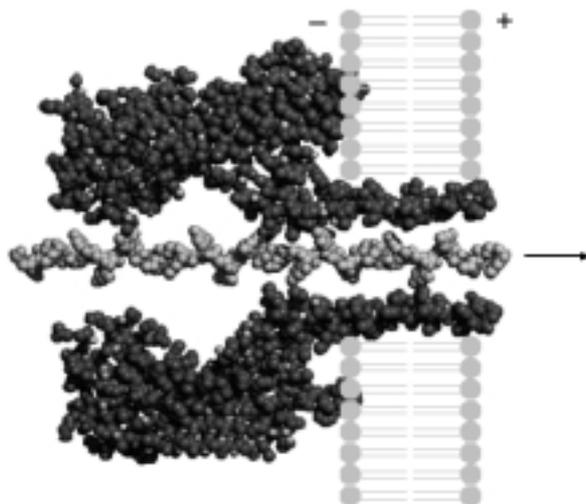


Figure 1.13: L' α -hémolysine forme un pore de 2 nm de diamètre dans une bicouche lipidique. Lorsqu'une molécule d'ADN est attirée par une tension positive appliquée de l'autre côté de la membrane, une variation du courant indique son passage à travers le nanopore [107].

On peut également imaginer l'auto-assemblage de structures artificielles sur le modèle des mécanismes d'organisation du vivant. Un exemple d'auto-assemblage spontané est la formation de l'enveloppe extérieure du virus de la mosaïque du tabac, pour laquelle des anneaux s'empilent en colonne sont maintenus dans leur position par des liaisons faibles. Des méthodes de fabrication d'agrégats de nanoparticules exploitant les capacités d'hybridation de l'ADN ont été proposées [82, 104, 109, 110]. Dans son principe, des brins d'ADN, auxquels sont attachées des nanoparticules d'or, s'hybrident avec leurs séquences complémentaires et forment l'ossature du réseau de particules. La figure 1.14 montre un assemblage à deux dimensions de nanoparticules d'or réalisé en disposant sur une surface les brins d'ADN à la base du réseau [110]. La fabrication de nanofils métalliques ou semi-conducteurs peut en outre bénéficier de la migration des atomes métalliques ou semi-conducteurs sur une surface lors de leur dépôt, pour s'agglomérer sur des brins d'ADN et former des chapelets ou des fils continus [111, 112].

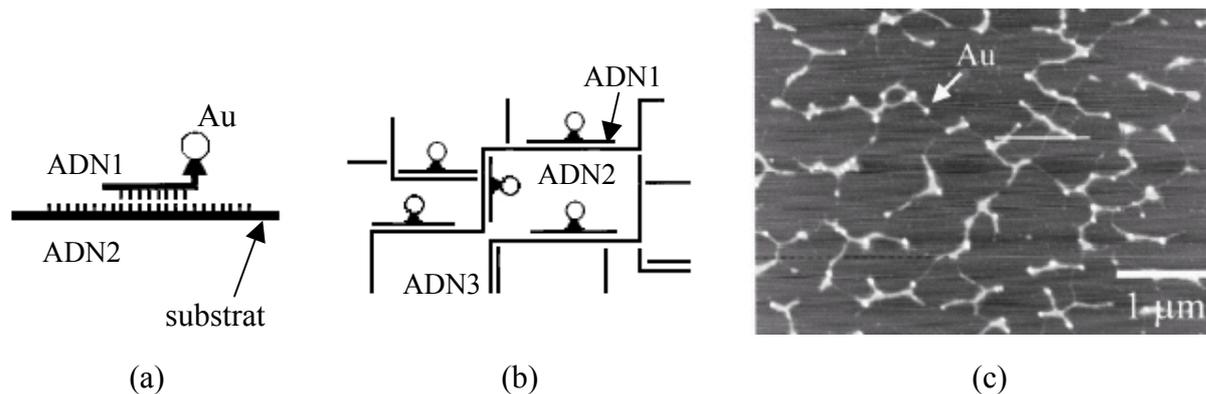


Figure 1.14: Méthode d'assemblage d'un réseau à deux dimensions de nanoparticules d'or, par hybridation de brins d'ADN sur une surface. a) Un brin d'ADN portant une nanoparticule d'or s'hybride avec sa séquence complémentaire sur une surface. b) Les brins déposés préalablement sur la surface forment l'ossature pour la construction d'un réseau à deux dimensions. Les particules sont positionnées avec précision et alignées le long des brins d'ADN. c) Image AFM de la structure à deux dimensions obtenue [110].

1.6 Vers la molécule unique : de nouveaux axes de recherche

Le développement de nouveaux outils dédiés à l'étude d'objets de dimensions micrométriques ou nanométriques, devrait profiter à la recherche biomédicale. Une compréhension plus fine des processus biologiques fondamentaux pourrait être à la base de procédés et de matériaux artificiels nouveaux, et permettre d'élaborer de nouvelles techniques de manipulation à l'échelle des molécules [113]. Quelques pistes sont proposées ici :

a) Développement d'outils de caractérisation : amélioration des outils existants (RMN, IRM, cristallographie rayons X, AFM, STM, électrophorèses capillaire et sur gel, spectrométrie de masse) ; étude de la structure et de la fonction des protéines (protéomique) ; études *in vivo* et en temps réel des processus cellulaires (interactions protéine-protéine, protéine-ADN et expression des gènes *in situ*) ; biocapteurs ; cristaux inorganiques servant d'agents de contraste en imagerie ; nouveaux types de marqueurs moléculaires ; observation simultanée d'un grand nombre de molécules individuelles

b) Outils de diagnostic : détection précoce des maladies (identification des signatures moléculaires des maladies) ; examen prénatal ; mesures en temps réel du fonctionnement des cellules pendant les opérations chirurgicales ; dispositifs de criblage rapide de séquences ADN (tests génétiques des mutations ou de prédisposition individuelle à différentes maladies)

c) Elaboration de nouvelles molécules : découverte et production de médicaments (chimie combinatoire)

d) Manipulation : isoler et manipuler des cellules individuelles ; diriger des molécules dans un organisme ; vecteurs de distribution de protéines, de gènes et de médicaments (sondes intramembranaires, nanoparticules) ; filtres sélectifs

e) Ingénierie des interfaces organique/inorganique : amélioration des biomatériaux existants ; croissance dirigée de cellules sur des supports artificiels (nanopores) ; réparation et régénération des tissus (substrats « favorables ») ; prothèses ; propriétés des interfaces biomatériau/tissus à toutes les échelles (adhésion, reconnaissance et performances mécaniques aux échelles ionique, moléculaire, cellulaire, tissulaire et anatomique) ; biotolérance et processus de fabrication biocompatibles ; matériaux synthétiques « biomimétiques »

f) Conception de nouveaux matériaux : compréhension des méthodes d'auto-organisation ; assemblage/désassemblage de blocs de construction moléculaires ; fabrication de nanostructures inorganiques par assemblage biologique ; intégration de machines biologiques (moteurs moléculaires, récepteurs) dans des microsystèmes et des nanomatériaux.

1.7 La détection électrique

1.7.1 De nouvelles perspectives

La reconnaissance d'un composant biologique est souvent réalisée en mettant en œuvre une interaction moléculaire spécifique qui identifie la molécule que l'on recherche dans un échantillon. Les principales techniques utilisées pour détecter une interaction moléculaire entre deux protéines sont la spectroscopie de masse, l'analyse en fluorescence, la résonance du plasmon de surface et la microscopie à force atomique. Cependant, ces techniques nécessitent un appareillage sophistiqué et coûteux, et les mesures doivent être réalisées sur un nombre suffisant de molécules pour que les signaux obtenus soient validés.

Pour éviter ces inconvénients, une technique alternative pour détecter une interaction biomoléculaire spécifique sur un support physique pourrait être de mesurer une variation d'un signal électronique lorsque l'interaction s'est formée. Cette forme de détection présente de nombreux avantages, car elle ne nécessite pas d'équipement compliqué. Ainsi, on peut imaginer à terme un bloc de mesures, couplé à un circuit d'amplification et de traitement de signal, intégrés sur une puce électronique. Un tel système, aisément transportable, pourrait également permettre de concentrer les mesures sur un nombre plus réduit de molécules, à l'aide de sondes électroniques très miniaturisées.

Une première méthode, déjà présentée au paragraphe 1.5, utilise des nanofils de silicium sur lesquels des molécules de biotine ont été fixées. Lorsque la streptavidine,

molécule complémentaire de la biotine, est introduite dans la solution, leur interaction est détectée par une augmentation de la conductance à travers le fil [98]. Ces nanofils agissent donc comme des biocapteurs capables de déceler la présence de la streptavidine dans un échantillon.

1.7.2 Le transfert électronique

Le transfert de charges intra- ou intermoléculaires est un phénomène omniprésent dans les sciences de la vie. Par exemple, les réactions de transfert électronique sont fondamentales dans les processus de respiration ou de photosynthèse, et les protéines impliquées sont qualifiées d'*oxydoréductases*. Le mécanisme de transport dans une protéine repose sur le passage des électrons par effet tunnel entre deux centres d'oxydo-réduction à travers la protéine isolante [114-116]. Bien que le couplage des groupements donneur et accepteur d'électrons soient relativement faible, les réactions sont très rapides et hautement spécifiques.

Dans les protéines, les deux centres rédox sont habituellement séparés d'une distance inférieure à 14 Å [115]. Au-delà de 14 Å, les taux de transfert baissent fortement et les trajectoires électroniques intramoléculaires sont moins bien définies. Le transport des électrons sur de plus grandes échelles de longueur est accompli par une série de sauts (*hopping*) entre des centres rédox intermédiaires individuellement disposés dans la limite des 14 Å. Ainsi, la conductivité à travers des molécules d'ADN est décrite par une succession de sauts entre les paires de base guanine-cytosine [112, 117, 118].

Depuis la découverte du premier polymère conducteur [119], l'idée que des molécules synthétiques puissent également avoir des propriétés conductrices exploitables s'est imposée. La description des mécanismes du transport électronique à travers des molécules uniques [120-122] s'est appuyée sur les efforts effectués par des chimistes pour synthétiser de nouvelles molécules qui, à l'image des molécules biologiques, disposent d'un donneur et d'un accepteur d'électrons séparés d'une distance fixée [9, 120, 123].

Cependant, aux difficultés de synthétiser ces molécules, s'ajoutent celles de mesurer leurs caractéristiques électriques individuelles. Aussi, les premières expériences de caractérisations électriques ont porté sur un nombre important de molécules. Les potentiels d'oxydo-réduction et d'excitation de molécules plongées en solution peuvent être déterminées par des mesures de voltamétrie et d'absorption optique respectivement. Une autre approche consiste à étudier les propriétés de conduction de couches moléculaires auto-organisées par la technique de Langmuir-Blodgett [124] ou de monocouches auto-assemblées greffées sur une surface conductrice [125, 126]. Toutefois, les mesures enregistrées par ces méthodes

traduisent l'expression d'un comportement collectif, et ne permettent pas d'accéder aux phénomènes à l'œuvre au niveau d'une molécule individuelle.

La connexion entre deux électrodes d'une unique molécule, ou d'un très petit nombre de molécules, a d'abord été effectuée en posant la pointe d'un microscope à effet tunnel (*Scanning Tunneling Microscope, STM*) au-dessus de molécules déposées sur un substrat métallique ou semi-conducteur, fournissant ainsi les premières caractéristiques I-V de molécules individuelles (Figure 1.15-a) [127-129]. Des mesures très localisées de la conductivité de monocouches formées sur une surface conductrice permettent de sonder les propriétés électroniques d'un nombre très faible de molécules [130-132]. En outre, malgré la difficulté à réaliser des électrodes co-planaires séparées de quelques nanomètres et de greffer une simple molécule entre les deux électrodes, quelques mesures ont été réalisées par ce moyen [133-137], en particulier sur des brins courts d'ADN poly(dG)-poly(dC) pour lesquels des courants de 1 nA ont été mesurés entre des électrodes séparées de 8 à 20 nm (Figure 1.15-b) [136, 137]. Quelques mesures de caractéristiques I-V de molécules uniques sont présentées sur le tableau 1.1.

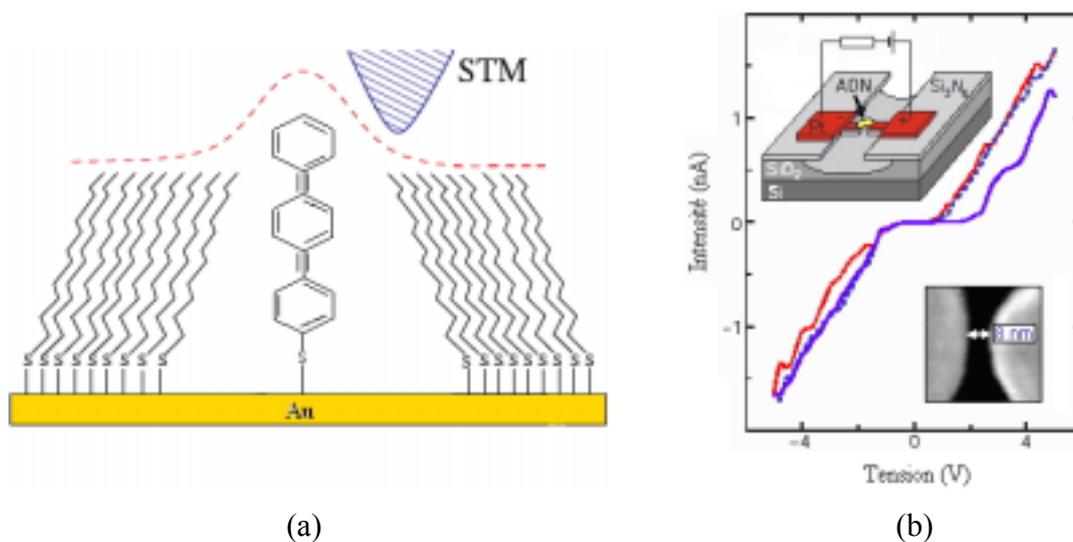
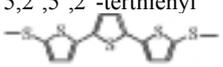
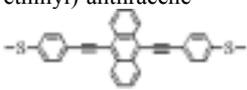
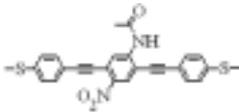


Figure 1.15: Techniques utilisées pour mesurer la conductivité à travers une molécule individuelle. a) Représentation schématique de l'étude par une pointe STM des propriétés électriques d'une molécule maintenue dans sa position verticale par une monocouche d'alcanethiols [127]. b) Caractéristiques I-V d'une molécule d'ADN poly(dG)-poly(dC) de 10,4 nm de long entre des électrodes séparées de 8 nm [136].

	Longueur de la molécule (nm)	Tension appliquée (V)	Courant mesuré (nA)	Résistance (MΩ)	Taux de transfert électronique (s ⁻¹)	Référence
Molécules synthétiques conductrices :						
1,8-octanedithiol 	~ 1,1	0,1	0,11	900	7x10 ⁸	[131]
1,4-dithiol benzène 	0,85	5	225	22	1,4x10 ¹²	[133]
2,5''-bis (acétylthio)-5,2',5',2''-terthiényl 	~ 1,9	2	100	20	6,3x10 ¹¹	[134]
9,10-bis ((2'-para-mercaptophényl)-éthynyl)-anthracène 	~ 2,0	1	600	1,7	3,8x10 ¹²	[135]
1,4-bis ((2'-para-mercaptophényl)-éthynyl)-2-acétyl-amino-5-nitrobenzène 	~ 2,0	1	700	1,4	4,3x10 ¹²	[135]
Molécules biologiques :						
ADN poly(dG)-poly(dC)	10,4 †	4	1,3	~ 3000	8x10 ⁹	[136]
ADN poly(dG)-poly(dC)	1700 à 2900 ‡	0,01	7,7	1,3	4,8x10 ¹⁰	[137]
ADN poly(dA)-poly(dT)	500 à 1500 ‡	0,1	1,0	100	6,3x10 ⁹	[137]

† Brin d'ADN de 10,4 nm de longueur déposé entre des électrodes séparées de 8 nm (Figure 1.15-b).

‡ Brin d'ADN replié sur lui-même en une pelote de moins de 100 nm de diamètre et placé entre des électrodes séparées de 20 nm.

Tableau 1.1: Quelques mesures des propriétés électriques de molécules connectées individuellement entre des nanoélectrodes.

Le taux de transfert électronique à travers une molécule, que celle-ci soit biologique ou synthétique, est habituellement donné en première approximation par cette équation [138] :

$$k_{TE} = k_0 \cdot e^{-\beta \cdot d} \quad (1-1)$$

où k_{TE} exprime le nombre d'électrons par seconde qui traversent la molécule isolante par effet tunnel ; k_0 est un facteur préexponentiel qui dépend essentiellement du couplage

entre le groupe donneur et le groupe accepteur d'électrons ; β est un facteur d'atténuation, donné en \AA^{-1} , qui dépend de la molécule et qui décrit la décroissance du couplage électronique entre les groupements donneur et accepteur quand la distance d qui les sépare s'accroît.

Le nombre d'électrons traversant une molécule décroît donc avec la distance donneur-accepteur jusqu'à devenir quasiment nul pour une distance d'autant plus grande que β est petit. Le facteur β a émergé comme un paramètre caractéristique qui peut être utilisé pour classer les molécules conductrices. Quelques valeurs de β sont indiquées dans le tableau 1.2.

Molécules synthétiques :	β (\AA^{-1})	Référence	Molécules biologiques :	β (\AA^{-1})	Référence
monocouche d'acide gras	1,5	[124]	centre de réaction photosynthétique	1,4	[114]
monocouche d'alcanethiol	0,8 - 1,2	[132]	azurine semi-synthétique	1,1	[117]
oligophénylène	0,4 - 0,6	[139]	cytochrome c semi-synthétique	0,8 - 1,2	[141]
oligo(phénylèneacétylène)	0,4 - 0,5	[140]	ADN	0,1 - 1,4	[142]

Tableau 1.2: Valeur du facteur d'atténuation β de quelques molécules synthétiques et biologiques (d'après [132]).

La description du transfert électronique dans des monocouches organiques est plus complexe que celle du transport à travers une seule molécule, car, dans le cas d'une monocouche, il met en jeu à la fois un transfert intramoléculaire et un transfert entre les molécules fixées sur une surface. Pour chaque saut électronique, la distance séparant les groupes donneur et accepteur est aléatoire. C'est donc un paramètre difficile à évaluer qui est fonction de la densité et de la géométrie locales des molécules le long de la trajectoire électronique. Le taux de transfert électronique dans des groupes de molécules peut être estimé par la méthode de calcul du *Variable Range Hopping* qui se fonde sur la distribution statistique des distances donneur-accepteur [143].

Les acides aminés qui composent les protéines sont souvent présentés suivant leur propriété hydrophobe, polaire, acide ou basique [144]. Les acides aminés hydrophobes jouent un rôle important dans la formation et le maintien de la structure tridimensionnelle des protéines en se confinant « à l'intérieur de la protéine », c'est-à-dire dans des espaces dépourvus d'eau. Au contraire, les trois autres types d'acides aminés possèdent un caractère hydrophile qui tend à les placer sur le contour de la molécule et à former des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau ou des ions contenus dans la solution aqueuse. Ces molécules d'eau peuvent être à l'origine d'un autre type de transport électronique par *conduction ionique*. La diffusion des ions à travers une monocouche organique lorsqu'une tension est appliquée peut donc

représenter un mécanisme supplémentaire du transfert d'électrons, en complément au transfert par effet tunnel entre deux centres rédox.

1.7.3 Un nouveau concept pour la biologie : la détection électrique

Les propriétés électriques intrinsèques des cellules et des molécules biologiques peuvent fournir des opportunités pour développer de nouveaux outils de caractérisation. Cette piste de recherche, encore relativement peu exploitée, pourrait être à l'origine de nouvelles techniques de détection électronique, permettant l'identification rapide et précise d'un très petit nombre de protéines.

La spectroscopie diélectrique est une méthode de mesure de la permittivité électrique des matériaux. L'enregistrement des propriétés diélectriques de cellules biologiques est réalisé de la même manière en excitant les cellules par un champ électrique alternatif. La polarisation des membranes cellulaires renseigne ainsi sur les cycles de vie de populations de cellules, en particulier sur la division cellulaire de cultures synchronisées telles que celles de la levure [145]. De très petites quantités d'échantillons biologiques confinées dans un microcanal ou dans un micropuits peuvent être analysées en vue de différencier des cellules, des protéines et de longues séquences ADN entre des microélectrodes [146] ou dans un guide d'onde [147].

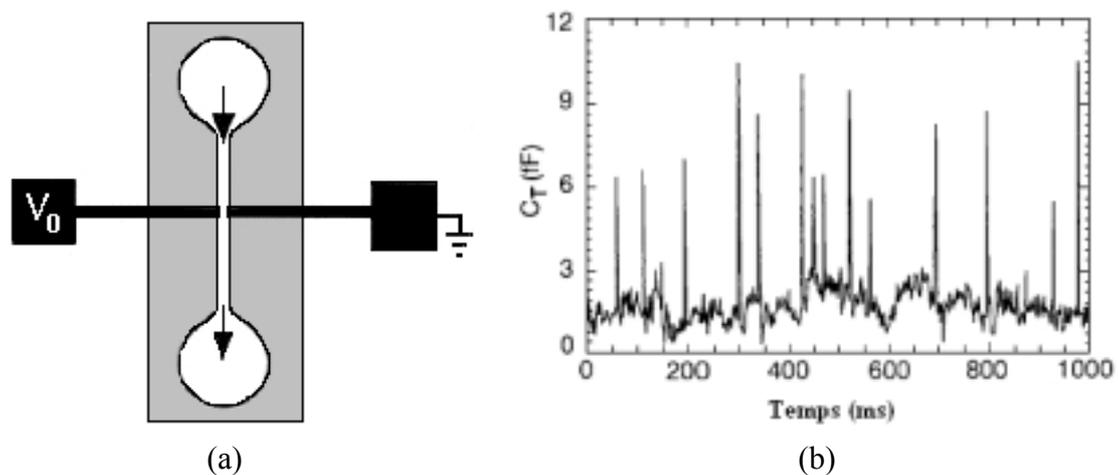


Figure 1.16: a) Schéma du dispositif de mesure de la polarisation, par un champ électrique alternatif, de l'ADN contenu dans le noyau de cellules. Les cellules emportées dans un microcanal passent une à une entre deux microélectrodes qui réalisent à la fois l'excitation et la mesure de la polarisation. b) Mesure en fonction du temps de la capacité entre les microélectrodes de cellules malignes de souris. Chaque pic correspond au passage d'une cellule entre les microélectrodes, et la hauteur moyenne des pics est fonction du type de cellules, c'est-à-dire de la quantité d'ADN contenue dans le noyau, ce qui permet de distinguer les espèces cellulaires dans un échantillon [148].

La détection de la polarisation de l'ADN dans le noyau de cellules eucaryotes en mouvement dans un système microfluidique a également été réalisée, démontrant que cette méthode est suffisamment sensible pour permettre l'étude des propriétés internes de cellules individuelles [148]. Ainsi, des mesures en capacité entre des microélectrodes permettent de sonder directement, sans préparation ni marquage préalable des échantillons, la quantité d'ADN contenue dans le noyau de cellules passant une à une dans le champ électrique alternatif (Figure 1.16).

Outre l'identification et la caractérisation de corps biologiques en solution, des interactions biomoléculaires spécifiques peuvent être mises en évidence par des méthodes électroniques. Ainsi, une technique de détection directe d'une interaction antigène-anticorps ou d'une hybridation de l'ADN consiste à fixer, par l'intermédiaire d'une monocouche, un des partenaires de la liaison à proximité ou sur un support conducteur et d'enregistrer la variation de l'impédance du système lors de l'appariement [149-151].

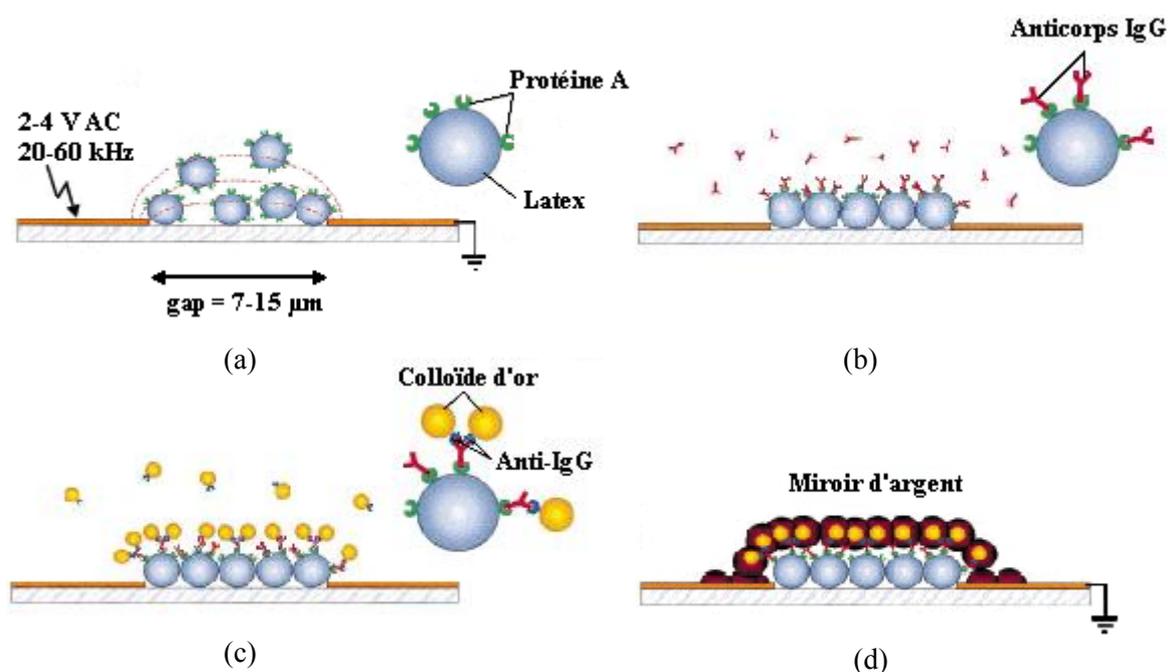


Figure 1.17: Schéma de principe d'un biocapteur fondé sur une détection électronique. a) Des microbilles de latex recouvertes d'une protéine A sont piégées entre deux microélectrodes sous un champ électrique alternatif non-uniforme. b) Des anticorps IgG réalisent une interaction du type antigène-anticorps sur les protéines A. c) Des anticorps anti-anticorps marqués avec des colloïdes d'or de 5 nm de diamètre se fixent sur les anticorps IgG. d) Un court-circuit entre les microélectrodes est réalisé en formant un miroir d'argent dans le gap, c'est-à-dire en créant un précipité d'argent par réduction de particules d'argent contre les nanoparticules d'or [152].

Des études de conductivité peuvent aussi être employées. Un premier exemple utilise des microbilles de latex recouvertes d'une protéine (Figure 1.17) [152]. Les billes sont collectées par diélectrophorèse dans le gap de microélectrodes co-planaires (Figure 1.17-a). Un anticorps IgG, dirigé spécifiquement contre cette protéine, est ensuite lui-même ciblé par un anticorps anti-IgG marqué avec une nanoparticule d'or de 5 nm (Figures 1.17-b et c). En dernière étape, un miroir d'argent est créé en réduisant des particules d'argent contre les colloïdes d'or. L'accumulation du précipité d'argent dans le gap tend à court-circuiter les électrodes, et une simple mesure de conductivité réalisée avec un multimètre suffit à caractériser la double reconnaissance antigène-anticorps (Figure 1.17-d).

La reconnaissance de séquences oligonucléotidiques avec une technique de détection similaire a été présentée récemment [153] (Figure 1.18). Cette méthode est très sensible car elle permet de discriminer un ADN possédant une seule base non-complémentaire. L'extrémité de longs ADN simple brin est tout d'abord capturée par des sondes oligonucléotidiques complémentaires immobilisées entre des microélectrodes (Figures 1.18-a et b). L'autre extrémité non-liée est ensuite ciblée par une séquence ADN marquée avec une nanoparticule d'or de 13 nm (Figure 1.18-c). La détection électrique au multimètre des deux hybridations complémentaires est effectuée grâce au court-circuit créé par un miroir d'argent sur les nanoparticules d'or (Figure 1.18-d).

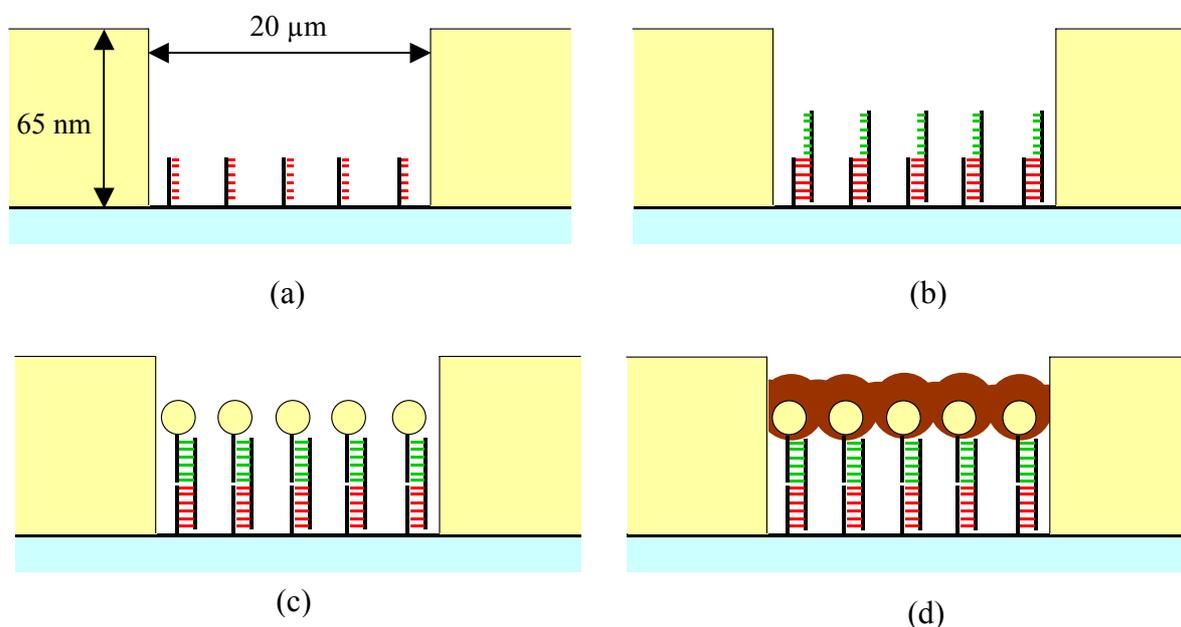


Figure 1.18: Principe de la détection électrique d'une séquence ADN spécifique, selon la technique de Park et al. [153]. a) Des sondes d'oligonucléotides sont greffées sur une surface de SiO₂ entre des microélectrodes d'or. b) La séquence ADN étudiée est fixée à une extrémité à la sonde. c) L'autre extrémité est hybridée avec la séquence oligonucléotidique complémentaire marquée par une nanoparticule d'or. d) Un miroir d'argent formé sur les billes d'or réalise le court-circuit des électrodes.

1.8 Description du projet

Dans cette thèse, nous tenterons d'initier une nouvelle méthode de caractérisation d'une interaction biomoléculaire. L'objectif est de développer un nouveau type de capteur capable de réaliser la détection d'une interaction spécifique entre des biomolécules via un signal électronique. Notre approche, présentée à la figure 1.19, repose sur la fabrication sur un substrat isolant d'électrodes très rapprochées, avec un gap typiquement inférieur à 100 nm (Figure 1.19-a). Une première série de mesures électriques doit fournir les caractéristiques de départ du système, c'est-à-dire avant tout dépôt biologique, et constituer nos courbes de référence. On s'attend avec une telle configuration à obtenir des résultats typiques d'un matériau isolant.

Afin de greffer sur l'échantillon une protéine A qui nous servira de sonde, l'espace inter-électrodes est d'abord fonctionnalisé avec un film organique auto-assemblé sur la surface de SiO₂. Une molécule organique avec une terminaison silane est couramment employée dans la littérature pour former un tel film, qui nous servira de film d'ancrage [8, 126]. La protéine A sera alors fixée au film par l'intermédiaire d'une liaison covalente (Figure 1.19-b). Les propriétés électriques nouvelles de la surface, *a priori* différentes de celles mesurées lors des électrodes à vide, seront enregistrées et comparées aux précédentes.

Une reconnaissance spécifique du type protéine-protéine est mise en œuvre lors de la troisième étape (Figure 1.19-c). Elle met en jeu une protéine B qui interagit de façon spécifique avec la protéine A. Idéalement, la surface entre les nanoélectrodes est désormais recouverte par la protéine B en forte densité. Lors de la nouvelle série de caractérisations électriques, nous pouvons imaginer qu'un décalage supplémentaire apparaisse par simple apport de la protéine B. Cependant, dans le but d'accroître la sensibilité du dispositif, la protéine B est marquée, avant son dépôt sur la surface, avec une nanoparticule d'or. La réponse électrique du système devrait donc être modifiée de manière significative en présence des particules d'or colloïdal dans le gap inter-électrodes.

Le postulat de départ à l'origine de ces travaux est donc l'hypothèse d'acquiescer via ce système une « signature » électronique distincte à chaque étape du montage. L'obtention en dernière étape d'un signal électrique élevé ou bien relativement faible devrait être corrélé à la présence ou non de colloïdes d'or dans le gap, validant l'existence ou non de l'interaction protéine A/protéine B que l'on cherche à caractériser.

Des contrôles négatifs seront effectués en parallèle, en modifiant un des étages moléculaires pour que le montage complet ne puisse être réalisé. Toutes les conditions de dépôt (température, concentrations de produits, temps d'incubation,...) seront identiques pour tous les échantillons d'une même série. Nous nous attendons alors à ce que la conductivité à travers la monocouche soit sensiblement moindre pour l'échantillon de contrôle par rapport à celle mesurée pour l'échantillon principal.

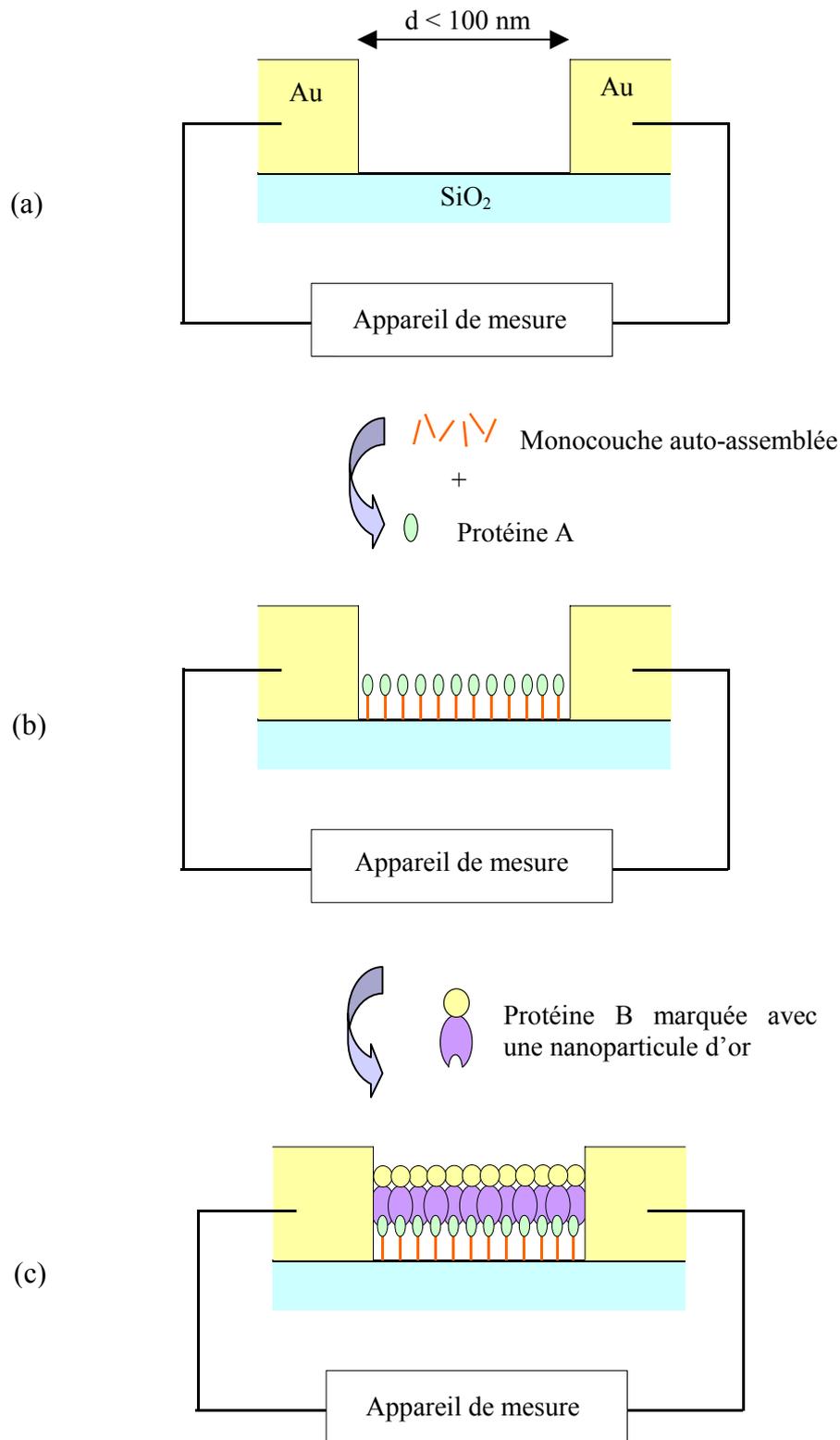


Figure 1.19: Technique développée dans cette thèse pour réaliser la détection électrique d'une reconnaissance protéine-protéine spécifique. a) Fabrication d'électrodes séparées de quelques dizaines de nanomètres. b) Fonctionnalisation de l'espace inter-électrodes avec une monocouche sur laquelle une protéine A peut se lier de manière covalente. On s'attend à ce que les propriétés électriques entre les électrodes soient modifiées par la présence du film d'ancrage et de la protéine A. c) Dépôt d'une protéine B connue pour interagir de manière forte et spécifique avec la protéine A. La présence de la protéine B, marquée à l'or colloïdal, devrait à nouveau modifier les propriétés électriques dans l'espace inter-électrodes.

Bibliographie

- [1] R. Feynman, *APS annual meeting, dec 1959*, Caltech's Engineering and Science (1960).
<http://nano.xerox.com/nanotech/feynman.html>
There's plenty of room at the bottom
- [2] D. Bishop, P. Gammel et C.R. Giles, *Physics Today*, **54**, 38 (octobre 2001).
The little machines that are making it big
- [3] J.W. Judy, *Smart Mater. Struct.*, **10**, 1115 (2001).
Microelectromechanical systems (MEMS) : fabrication, design and applications
- [4] M. Madou, *Fundamentals of microfabrication*, **CRC** (1997).
- [5] Y. Chen et A. Pépin, *Electrophoresis*, **22**, 187 (2001).
Nanofabrication : conventional and nonconventional methods
- [6] I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.*, **39**, 1848 (1917).
The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids
- [7] K.B. Blodgett et I. Langmuir, *Phys. Rev.*, **51**, 964 (1937).
Built-up films of barium stearate and their optical properties
- [8] A. Ulman, *An introduction to ultrathin organic films, from Langmuir-Blodgett to self-assembly*, **Academic Press** (1991).
- [9] J.-M. Lehn, *La chimie supramoléculaire, concepts et perspectives*, **De Boeck Université** (1997).
- [10] J.-P. Sauvage, *Molecular machines & motors*, Structure and Bonding n° 99, **Springer** (2001).
- [11] M. Gomez-Lopez, J.A. Preece et J.F. Stoddart, *Nanotechnology*, **7**, 183 (1996).
The art and science of self-assembling molecular machines
- [12] I. Hirao, T. Ohtsuki, T. Fujiwara, T. Mitsui, T. Yokogawa, T. Okuni, H. Nakayama, K. Takio, T. Yabuki, T. Kigawa, K. Kodama, T. Yokogawa, K. Nishikawa et S. Yokoyama, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 177 (2002).
An unnatural base pair for incorporating amino acid analogs into proteins
- [13] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida et K. Kinosita, *Nature*, **386**, 299 (1997).
Direct observation of the rotation of F1-ATPase
- [14] R.D. Vale et R.A. Milligan, *Science*, **288**, 88 (2000).
The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins
- [15] T. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon et V. Croquette, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**, 523 (2000).
Stress-induced structural transitions in DNA and proteins
- [16] T. Strick, J.-F. Allemand, V. Croquette et D. Bensimon, *Physics Today*, **54**, 46 (octobre 2001).
The manipulation of single biomolecules
- [17] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann et F. Heslot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 11935 (1997).
Mechanical separation of the complementary strands of DNA
- [18] K. Kitamura, M. Tokunaga, A. Iwane et T. Yanagida, *Nature*, **397**, 129 (1999).
A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres
- [19] K. Svoboda et S. Block, *Cell*, **77**, 773 (1994).
Force and velocity measured for single kinesin molecules
- [20] Dossier de *MRS Bulletin : Microelectromechanical systems : technology and applications*, **vol. 26** (Avril 2001).
- [21] W. Göpel, J. Hesse et J.N. Zemel (Ed.), *Sensors, a comprehensive survey*, volume 3 : Chemical and biochemical sensors - Part II, **VCH** (1992).
- [22] P. Kask, K. Palo, D. Ullmann et K. Gall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 13756 (1999).
Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology

- [23] S. Weiss, *Science*, **283**, 1676 (1999).
Fluorescence spectroscopy of single biomolecules
- [24] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, L. Ning, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R.A. Dean, M. Gerstein et M. Snyder, *Science*, **293**, 2101 (2001).
Global analysis of protein activities using proteome chips
- [25] M. Sato, T. Ozawa, K. Inukai, T. Asano et Y. Umezawa, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 287 (2002).
Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells
- [26] O.S. Wolfbeis, G. Boisdé et G. Gauglitz, in *Sensors, a comprehensive survey*, volume 2 : Chemical and biochemical sensors - Part I (Editeurs : W. Göpel, J. Hesse, J.N. Zemel), **VCH**, pp. 573-645 (1992).
Optochemical sensors
- [27] J. Homola, S.S. Yee et G. Gauglitz, *Sens. Actuators B*, **54**, 3 (1999).
Surface plasmon resonance sensors : review
- [28] B. Liedberg, C. Nylander et I. Lundstrom, *Sens. Actuators*, **4**, 299 (1983).
Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing
- [29] M.T. Flanagan et R.H. Pantell, *Electron. Lett.*, **20**, 968 (1984).
Surface plasmon resonance and immunosensors
- [30] D.R. Mernagh, P. Janscak, K. Firman et G.G. Kneale, *Biol. Chem.*, **379**, 497 (1998).
Protein – protein and protein – DNA interactions in the Type I restriction endonuclease R.EcoR124I
- [31] B. Danielsson, K. Mosbach, F. Winqvist et I. Lundstrom, *Sens. Actuators*, **13**, 139 (1988).
Biosensors based on thermistors and semiconductors and their bioanalytical applications
- [32] M. Faccio, G. Ferri, P.P. Ponti, G. Savelli et A. d'Amico, *Sens. Actuators B*, **7**, 677 (1992).
Hydrogen chloride detection by LiTaO₃
- [33] C. Lu et A.W. Czanderna, *Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances*, **Elsevier** (1984).
- [34] A.A. Suleiman et G.G. Guilbault, *Analyst*, **119**, 2279 (1994).
Recent developments in piezoelectric immunosensors. A review.
- [35] G. Bidan, M. Billon, K. Galasso, T. Livache, G. Mathis, A. Roget, L.M. Torres-Rodriguez et E. Vieil, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **89**, 183 (2000).
Electropolymerization as a versatile route for immobilizing biological species onto surfaces. Application to DNA biochips.
- [36] F. Aberl, H. Wolf, C. Kößlinger, S. Drost, P. Woias et S. Koch, *Sens. Actuators B*, **18**, 271 (1994).
HIV serology using piezoelectric immunosensors
- [37] C. Fredriksson, S. Kihlman, M. Rodahl et B. Kasemo, *Langmuir*, **14**, 248 (1998).
The piezoelectric quartz crystal mass and dissipation sensor: a means of studying cell adhesion
- [38] A.W. Snow, W.R. Barger, M. Klusty, H. Wohltjen et N.L. Jarvis, *Langmuir*, **2**, 513 (1986).
Simultaneous electrical-conductivity and piezoelectric mass measurements on iodine-doped phthalocyanine Langmuir-Blodgett films
- [39] W. Welsch, C. Klein, M. von Schickfus et S. Hunklinger, *Anal. Chem.*, **68**, 2000 (1996).
Development of a surface acoustic wave immunosensor
- [40] N. Barié et M. Rapp, *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 979 (2001).
Covalent bound sensing layers on surface acoustic wave (SAW) biosensors
- [41] J. Kondoha, Y. Matsui, S. Shiokawa et W.B. Wlodarskic, *Sens. Actuators B*, **20**, 199 (1994).
Enzyme-immobilized SH-SAW biosensor
- [42] A.W. Wang, R. Kiwan, R.M. White et R.L. Ceriani, *Sens. Actuators B*, **49**, 13 (1998).
A silicon-based ultrasonic immunoassay for detection of breast cancer antigens
- [43] W. Göpel, G. Reinhardt et M. Rösch, *Solid State Ionics, Diffusion and Reactions*, **136-137**, 519 (2000).
Trends in the development of solid state amperometric and potentiometric high temperature sensors

- [44] P.-C. Pandey, S. Upadhyay et B. Upadhyay, *Anal. Biochem.*, **252**, 136 (1997).
Peroxide biosensors and mediated electrochemical regeneration of redox enzymes
- [45] P. Bergveld, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **17**, 70 (1970).
Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements
- [46] J. Janata, *Analyst*, **119**, 2275 (1994).
Twenty years of Ion-Selective Field-Effect Transistors
- [47] A.B. Kharitonov, A.N. Shipway et I. Willner, *Anal. Chem.*, **71**, 5441 (1999).
An Au nanoparticle/bisbipyridinium cyclophane-functionalized ion-sensitive field-effect transistor for the sensing of adrenaline
- [48] J. Liu, L. Liang, G. Li, R. Han et K. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 1023 (1998).
H⁺ISFET-based biosensor for determination of penicillin G
- [49] H.H. Thorp, *Trends Biotechnol.*, **16**, 117 (1998).
Cutting out the middleman : DNA biosensors based on electrochemical oxidation
- [50] E. Paleček, M. Fojta, M. Tomschik et J. Wang, *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 621 (1998).
Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage
- [51] E. Paleček et M. Fojta, *Anal. Chem.*, **73**, 75A (2001).
Detecting DNA hybridization and damage
- [52] M.E. Napier, C.R. Loomis, M.F. Sistare, J. Kim et H.H. Thorp, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 906 (1997).
Probing biomolecule recognition with electron transfer: electrochemical sensors for DNA hybridization
- [53] A. Manz, N. Graber et H.M. Widmer, *Sens. Actuators B*, **1**, 244 (1990).
Miniaturized total chemical analysis systems : a novel concept for chemical sensing
- [54] N.A. Polson et M.A. Hayes, *Anal. Chem.*, **73**, 312A (2001).
Microfluidics : controlling fluids in small places
- [55] D.J. Harrison, A. Manz et P.G. Glavina, *Transducers '91, Digest of technical papers IEEE International Conference on Solid-State Sensors and Actuators*, New York, USA, p. 792 (1991).
Electroosmotic pumping within a chemical sensor system integrated on silicon
- [56] G.J. Kellogg, D. Duffy et A. Pelta, brevet international WO 01 87485 (2001) ; B. Carvalho, N.F. Sheppard Jr., C. Feakes et G.J. Kellogg, brevet international WO 01 87486 (2001) ; G.J. Kellogg et B. Carvalho, brevet international WO 01 87487 (2001).
Microfluidics devices and methods for high throughput screening
Microfluidics devices and methods for performing cell based assays
Bidirectional flow centrifugal microfluidic devices
- [57] R. Zengerle, J. Ulrich, S. Kluge, M. Richter et A. Richter, *Sens. Actuators A*, **50**, 81 (1995).
A bi-directional silicon micropump
- [58] T. Bourouina, A. Bosseboeuf et J.-P. Grandchamp, *J. Micromech. Microeng.*, **7**, 186 (1997).
Design and simulation of an electrostatic micropump for drug-delivery applications
- [59] W.-H. Chu, R. Chin, T. Huen et M. Ferrari, *J. Microelectro-Mech. Syst.*, **8**, 34 (1999).
Silicon membrane nanofilters from sacrificial oxide removal
- [60] C.H. Mastrangelo, M.A. Burns et D.T. Burke, *Proceed. IEEE*, **86**, 1769 (1998).
Microfabricated devices for genetic diagnostics
- [61] J. Khandurina et A. Guttman, *J. Chromatogr. A*, **943**, 159 (2002).
Bioanalysis in microfluidic devices
- [62] M.A. Northrup, M.T. Ching, R.M. White et R.T. Lawton, *Transducers '93, Digest of technical papers IEEE International Conference on Solid-State Sensors and Actuators*, Yokohama, Japon, p. 924 (1993).
DNA amplification with a microfabricated reaction chamber
- [63] M.U. Kopp, A.J. de Mello et A. Manz, *Science*, **280**, 1046 (1998).
Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip

- [64] A.T. Woolley et R.A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 11348 (1994).
Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips
- [65] S. Liu, Y. Shi, W.W. Ja et R.A. Mathies, *Anal. Chem.*, **71**, 566 (1999).
Optimization of high-speed DNA sequencing on microfabricated capillary electrophoresis channels
- [66] B. He, N. Tait et F. Regnier, *Anal. Chem.*, **70**, 3790 (1998).
Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography
- [67] J. Han et H.G. Craighead, *Science*, **288**, 1026 (2000).
Separation of long DNA molecules in a microfabricated entropic trap array
- [68] P.S. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud et J.-L. Viovy, *Science*, **295**, 2237 (2002).
Self-assembled magnetic matrices for DNA separation chips
- [69] R. Aebersold et D.R. Goodlett, *Chem. Rev.*, **101**, 269 (2001).
Mass spectrometry in proteomics
- [70] L. Licklider, X.-Q. Wang, A. Desai, Y.-C. Tai et T.D. Lee, *Anal. Chem.*, **72**, 367 (2000).
A micromachined chip-based electrospray source for mass spectrometry
- [71] K.R. Khrapko, Y.P. Lysov, A.A. Khorlyn, V.V. Shick, V.L. Florentiev et A.D. Mirzabekov, *FEBS Lett.*, **256**, 118 (1989).
An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing
- [72] M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis et P.O. Brown, *Science*, **270**, 467 (1995).
Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray
- [73] N. Zammateo, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi et J. Remacle, *Anal. Biochem.*, **280**, 143 (2000).
Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays
- [74] S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A. Stai Lu et D. Solas, *Science*, **251**, 767 (1991).
Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis
- [75] R.J. Lipshutz, S.P.A. Fodor, T.R. Gingeras et D.J. Lockhart, *Nature Genetics Suppl.*, **21**, 20 (1999).
High density synthetic oligonucleotide arrays
- [76] S. Singh-Gasson, R.D. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner et M.R. Sussman, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 974 (1999).
Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array
- [77] A.P. Blanchard, R.J. Kaiser et L.E. Hood, *Biosens. Bioelectron.*, **11**, 687 (1996).
High-density oligonucleotide arrays
- [78] T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan et R. Teoule, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2915 (1994).
Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group
- [79] A.Q. Emili et G. Cagney, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 393 (2000).
Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays
- [80] D.C. Cahill, *J. Immunol. Meth.*, **250**, 81 (2001).
Protein and antibody arrays and their medical applications
- [81] J.B. Lamture, K.L. Beattie, B.E. Burke, M.D. Eggers, D.J. Ehrlich, R. Fowler, M.A. Hollis, B.B. Kosicki et R.K. Reich, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2121 (1994).
Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device
- [82] J.M. Köhler, A. Csáki, J. Reichert, R. Möller, W. Straube et W. Fritzsche, *Sens. Actuators B*, **76**, 166 (2001).
Selective labeling of oligonucleotide monolayers by metallic nanobeads for fast optical readout of DNA-chips
- [83] J. Remacle, J. Demarteau, N. Zammateo, I. Alexandre, S. Hamels, Y. Houbion et F. de Longueville, brevet international WO 00 72018 (2000).
Method for the identification and/or the quantification of a target compound

- [84] I. Alexandre, S. Hamels, S. Dufour, J. Collet, N. Zammateo, F. De Longueville, J.-L. Gala et J. Remacle, *Anal. Biochem.*, **295**, 1 (2001).
Colorimetric silver detection of DNA microarrays
- [85] M. Washizu, Y. Kurahashi, H. Iochi, O. Kurosawa, S. Aizawa, S. Kudo, Y. Magariyama et H. Hotani, *IEEE Trans. Ind. Appl.*, **29**, 286 (1993).
Dielectrophoretic measurement of bacterial motor characteristics
- [86] S. Masuda, M. Washizu et T. Nanba, *IEEE Trans. Ind. Appl.*, **25**, 732 (1989).
Novel method of cell fusion in field constriction area in fluid integration circuit
- [87] S. Fiedler, S.G. Shirley, T. Schnelle et G. Fuhr, *Anal. Chem.*, **70**, 1909 (1998).
Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem
- [88] C. Reichle, K. Sparbier, T. Muller, T. Schnelle, P. Walden et G. Fuhr, *Electrophoresis*, **22**, 272 (2001).
Combined laser tweezers and dielectric field cage for the analysis of receptor-ligand interactions on single cells
- [89] F. Arai, A. Ichikawa, M. Ogawa, T. Fukuda, K. Horio et K. Itoigawa, *Electrophoresis*, **22**, 283 (2001).
High-speed separation system of randomly suspended single living cells by laser trap and dielectrophoresis
- [90] E.P. Henderson, P.G. Haydon et D.S. Sakaguchi, *Science*, **257**, 1944 (1992).
Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy
- [91] O.H. Willemsen, M.M.E. Snel, A. Cambi, J. Greve, B.G. De Grooth et C.G. Figdor, *Biophys. J.*, **79**, 3267 (2000).
Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy
- [92] S.W. Wong, E. Joselevich, A.T. Woolley, C.L. Cheung et C.M. Lieber, *Nature*, **394**, 52 (1998).
Covalently functionalized nanotubes as nanometre-sized probes in chemistry and biology
- [93] E.L. Florin, V.T. Moy et H.E. Gaub, *Science*, **264**, 415 (1994).
Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs
- [94] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez et H.E. Gaub, *Science*, **276**, 1109 (1997).
Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM
- [95] B. Ilic, D. Czaplewski, H. G. Craighead, P. Neuzil, C. Campagnolo et C. Batt, *Appl. Phys. Lett.*, **77**, 450 (2000).
Mechanical resonant immunospecific biological detector
- [96] M.K. Baller, H.P. Lang, J. Fritz, Ch. Gerber, J.K. Gimzewski, U. Drechsler, H. Rothuizen, M. Despont, P. Vettiger, F.M. Battiston, J.P. Ramseyer, P. Fornaro, E. Meyer et H.-J. Güntherodt, *Ultramicroscopy*, **82**, 1 (2000).
A cantilever array-based artificial nose
- [97] J. Fritz, M.K. Baller, H.P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.-J. Güntherodt, Ch. Gerber et J.K. Gimzewski, *Science*, **288**, 316 (2000).
Translating biomolecular recognition into nanomechanics
- [98] Y. Cui, Q. Wei, H. Park et C.M. Lieber, *Science*, **293**, 1289 (2001).
Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species
- [99] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss et A.P. Alivisatos, *Science*, **281**, 2013 (1998).
Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels
- [100] W.C.W. Chan et S. Nie, *Science*, **281**, 2016 (1998).
Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection
- [101] M. Han, X. Gao, J.Z. Su et S. Nie, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 631 (2001).
Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules
- [102] K. Hamad-Schifferli, J.J. Schwartz, A.T. Santos, S. Zhang et J.M. Jacobson, *Nature*, **415**, 152 (2002).
Remote electronic control of DNA hybridization through inductive coupling to an attached metal nanocrystal antenna
- [103] R. Hergt, W. Andra, C.G. d'Ambly, I. Hilger, W.A. Kaiser, U. Richter et H.G. Schmidt, *IEEE Trans. Magn.*, **34**, 3745 (1998).
Physical limits of hyperthermia using magnetite fine particles
- [104] C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic et J.J. Storhoff, *Nature*, **382**, 607 (1996).
A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials

- [105] S. Mann, W. Shenton, M. Li, S. Connoly et D. Fitzmaurice, *Adv. Mater.*, **12**, 147 (2000).
Biologically programmed nanoparticle assembly
- [106] D. Astumian, *Science*, **276**, 917 (1997).
Thermodynamics and kinetics of a brownian motor
- [107] D.W. Deamer et M. Akeson, *Trends Biotechnol.*, **18**, 147 (2000).
Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing
- [108] W. Vercoutere, S. Winters-Hilt, H. Olsen, D. Deamer, D. Haussler et M. Akeson, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 248 (2001).
Rapid discrimination among individual DNA hairpin molecules at single-nucleotide resolution using an ion channel
- [109] P. Alivisatos, K.P. Johnsson, X. Peng, T.E. Wilson, C.J. Loweth, M. Bruchez et P.G. Schultz, *Nature*, **382**, 609 (1996).
Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA
- [110] Y. Maeda, H. Tabata et T. Kawai, *Appl. Phys. Lett.*, **79**, 1181 (2001).
Two-dimensional assembly of gold nanoparticles with a DNA network template
- [111] J. Richter, M. Mertig, W. Pompe, I. Mönch et H.K. Schackert, *Appl. Phys. Lett.*, **78**, 536 (2001).
Construction of highly conductive nanowires on a DNA template
- [112] T. Heim, *Thèse*, Université de Lille 1 (2002).
Transport électronique dans l'ADN
- [113] Rapports des National Institutes of Health Bioengineering Consortium (BECON), Bethesda (USA), 1998, 1999 et 2000.
<http://www.becon1.nih.gov/>
- [114] C.C. Moser, J.M. Keske, K. Warncke, R.S. Farid et P.L. Dutton, *Nature*, **355**, 796 (1992).
Nature of biological electron transfer
- [115] C.C. Page, C.C. Moser, X. Chen et P.L. Dutton, *Nature*, **402**, 47 (1999).
Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction
- [116] J.R. Winkler, A.J. Di Bilio, N.A. Farrow, J.H. Richards et H.B. Gray, *Pure Appl. Chem.*, **71**, 1753 (1999).
Electron tunneling in biological molecules
- [117] C. Dekker et M.A. Ratner, *Physics World*, **14**, 29 (août 2001).
Electronic properties of DNA
- [118] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann et S. Wessely, *Nature*, **412**, 318 (2001).
Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunnelling
- [119] H. Shirakawa, E.J. Louis, A.G. MacDiarmid, C.K. Chiang, A.J. Heeger, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, p.579 (1977).
Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene (CH)_x
- [120] A. Aviram et M.A. Ratner, *Chem. Phys. Lett.*, **29**, 277 (1974).
Molecular rectifiers
- [121] M. Di Ventra, S.T. Pantelides et N.D. Lang, *Phys. Rev. Lett.*, **84**, 979 (2000).
First-principles calculation of transport properties of a molecular device
- [122] C. Krzeminski, *Thèse*, Université de Lille 1 (2001).
Structure électronique et transport dans une jonction moléculaire
- [123] H. Taube, *Science*, **226**, 1028 (1984).
Electron transfer between metal complexes: retrospective
- [124] B. Mann et H. Kuhn, *J. Appl. Phys.*, **42**, 4398 (1971).
Tunneling through fatty acid salt monolayers
- [125] C. Boulas, J.V. Davidovits, F. Rondelez et D. Vuillaume, *Phys. Rev. Lett.*, **76**, 4797 (1996).
Suppression of charge carrier tunneling through organic self-assembled monolayers
- [126] S. Lenfant, *Thèse*, Université de Lille 1 (2001).
Monocouches organiques auto-assemblées pour la réalisation de diodes moléculaires

- [127] L.A. Bumm, J.J. Arnold, M.T. Cygan, T.D. Dunbar, T.P. Burgin, L. Jones II, D.L. Allara, J.M. Tour et P.S. Weiss, *Science*, **271**, 1705 (1996).
Are single molecular wires conducting?
- [128] C. Joachim, J.K. Gimzewski, R.R. Schlitter et C. Chavy, *Phys. Rev. Lett.*, **74**, 2102 (1995).
Electronic transparency of a single C₆₀ molecule
- [129] D. Porath, Y. Levi, M. Tarabiah et O. Millo, *Phys. Rev. B*, **56**, 9829 (1997).
Tunneling spectroscopy of isolated C₆₀ molecules in the presence of charging effects
- [130] C. Zhou, M.R. Deshpande, M.A. Reed, L. Jones II et J.M. Tour, *Appl. Phys. Lett.*, **71**, 611 (1997).
Nanoscale metal/self-assembled monolayer/metal heterostructures
- [131] X.D. Cui, A. Primak, X. Zarate, J. Tomfohr, O.F. Sankey, A.L. Moore, T.A. Moore, D. Gust, G. Harris et S.M. Lindsay, *Science*, **294**, 571 (2001).
Reproducible measurement of single-molecule conductivity
- [132] R.E. Holmlin, R. Haag, M.L. Chabinyc, R.F. Ismagilov, A.E. Cohen, A. Terfort, M.A. Rampi et G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5075 (2001).
Electron transport through thin organic films in metal-insulator-metal junctions based on self-assembled monolayers
- [133] M.A. Reed, C. Zhou, C.J. Muller, T.P. Burgin et J.M. Tour, *Science*, **278**, 252 (1997).
Conductance of a molecular junction
- [134] C. Kergueris, J.-P. Bourgoin, S. Palacin, D. Esteve, C. Urbina, M. Magoga et C. Joachim, *Phys. Rev. B*, **59**, 12505 (1999).
Electron transport through a metal-molecule-metal junction
- [135] J. Reichert, R. Ochs, D. Beckmann, H.B. Weber, M. Mayor et H. von Löhneysen, *Phys. Rev. Lett.*, **88**, 176804 (2002).
Driving current through single organic molecules
- [136] D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries et C. Dekker, *Nature*, **403**, 635 (2000).
Direct measurement of electrical transport through DNA molecules
- [137] K.-H. Yoo, D.H. Ha, J.-O. Lee, J.W. Park, J. Kim, J.J. Kim, H.-Y. Lee, T. Kawai et H.Y. Choi, *Phys. Rev. Lett.*, **87**, 198102 (2001).
Electrical conduction through Poly(dA)-Poly(dT) and Poly(dG)-Poly(dC) DNA molecules
- [138] R.A. Marcus et N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 265 (1985).
Electron transfer in chemistry and biology
- [139] A. Helms, D. Heiler et G. McLendon, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6227 (1992).
Electron transfer in bis-porphyrin donor-acceptor compounds with polyphenylene spacers shows a weak distance dependence
- [140] S. Creager, C.J. Yu, C. Bamdad, S. O'Connor, T. MacLean, E. Lam, Y. Chong, G.T. Olsen, J. Luo, M. Gozin et J.F. Kayyem, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1059 (1999).
Electron transfer at electrodes through conjugated "molecular wire" bridges
- [141] D.S. Wuttke, M.J. Bjerrum, J.R. Winkler et H.B. Gray, *Science*, **256**, 1007 (1992).
Electron-tunneling pathways in cytochrome c
- [142] S.O. Kelley et J.K. Barton, *Science*, **283**, 375 (1999).
Electron transfer between bases in double helical DNA
- [143] N.F. Mott et E.A. Davis, *Electronic processes in non-crystalline solids*, **Oxford University** (1971).
- [144] J.D. Rawn, *Biochemistry*, **Neil Patterson publishers** (1989).
- [145] K. Asami, E. Gheorghiu et T. Yonezawa, *Biophys. J.*, **76**, 3345 (1999).
Real-time monitoring of yeast cell division by dielectric spectroscopy
- [146] H.E. Ayliffe, A.B. Frazier et R.D. Rabbitt, *IEEE J. Microelectromech. Syst.*, **8**, 50 (1999).
Electric impedance spectroscopy using microchannels with integrated metal electrodes
- [147] G.R. Facer, D.A. Notterman et L.L. Sohn, *Appl. Phys. Lett.*, **78**, 996 (2001).
Dielectric spectroscopy for bioanalysis : from 40 Hz to 26.5 GHz in a microfabricated wave guide

[148] L.L. Sohn, O.A. Saleh, G.R. Facer, A.J. Beavis, R.S. Allan et D.A. Notterman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 10687 (2000).

Capacitance cytometry : measuring biological cells one by one

[149] V.M. Mirsky, M. Riepl et O.S. Wolfbeis, *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 977 (1997).

Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen–antibody reactions on monomolecular alkythiol films on gold electrodes

[150] H. Berney, J. West, E. Haeefele, J. Alderman, W. Lane et J.K. Collins, *Sens. Actuators B*, **68**, 100 (2000).

DNA diagnostic biosensor: development, characterisation and performance

[151] S.C. Pak, W. Penrose et P.J. Hesketh, *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 371 (2001).

An ultrathin platinum film sensor to measure biomolecular binding

[152] O.D. Velev et E.W. Kaler, *Langmuir*, **15**, 3693 (1999).

In situ assembly of colloidal particles into miniaturized biosensors

[153] S.-J. Park, T.A. Taton et C.A. Mirkin, *Science*, **295**, 1503 (2002).

Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes

Chapitre 2. Techniques de fabrication et d'analyse

Pour réaliser des électrodes séparées de quelques dizaines de nanomètres, nous disposons de plusieurs procédés de fabrication sub-micrométrique issus des technologies de la microélectronique. Ceux-ci sont décrits dans une première partie. Puis, un film organique devant être greffé sur la surface isolante afin de permettre l'ancrage du peptide sur le substrat, les procédés d'assemblage de couches moléculaires sur oxyde de silicium sont présentés. La technique de mesure des angles de contact, une méthode physico-chimique simple et rapide employée pour déterminer la qualité des monocouches formées, est ensuite décrite. Enfin, nous présentons les principaux équipements utilisés pour caractériser les différentes étapes du dépôt des molécules : le scanner à fluorescence, la microscopie à sonde locale, et les méthodes de mesure électrique.

2.1 **Microfabrication**

2.1.1 *Définitions des motifs*

Les procédés de fabrication de la microélectronique reposent sur le transfert de motifs de dimensions micrométriques ou sub-micrométriques dans un film mince recouvrant l'échantillon. Ce film mince sert de masque qui est redessiné selon les contours des structures que l'on désire construire sur la surface. Les ouvertures effectuées dans ce masque par l'opérateur permettent de délimiter des zones sur la surface de l'échantillon sur lesquelles des opérations technologiques peuvent être réalisées, telles que la gravure des zones découvertes ou le dépôt d'un métal.

La technique de masquage la plus simple est de déposer de façon uniforme sur le substrat une résine sensible à un certain type d'énergie (lumière ou électrons), puis de définir les zones où seront effectuées les ouvertures en exposant sélectivement la résine à la source d'énergie (Figure 2.1). L'exposition peut être accomplie en utilisant de la lumière ultraviolette (photolithographie) ou un faisceau électronique (lithographie électronique).

Le film de résine subit ensuite un processus de développement qui aboutit à détruire, selon le type de résine, les portions de la résine qui ont été exposées au traitement énergétique ou celles qui ne l'ont pas été. Dans le premier cas, on parle de *résine positive*, et dans le second de *résine négative*. Le résultat de cette opération est la redéfinition du film de résine en motifs qui protègent partiellement la surface de l'échantillon. Les zones découvertes, qui ont la forme des structures que l'on souhaite fabriquer, peuvent alors être l'objet d'un nombre varié d'étapes technologiques.

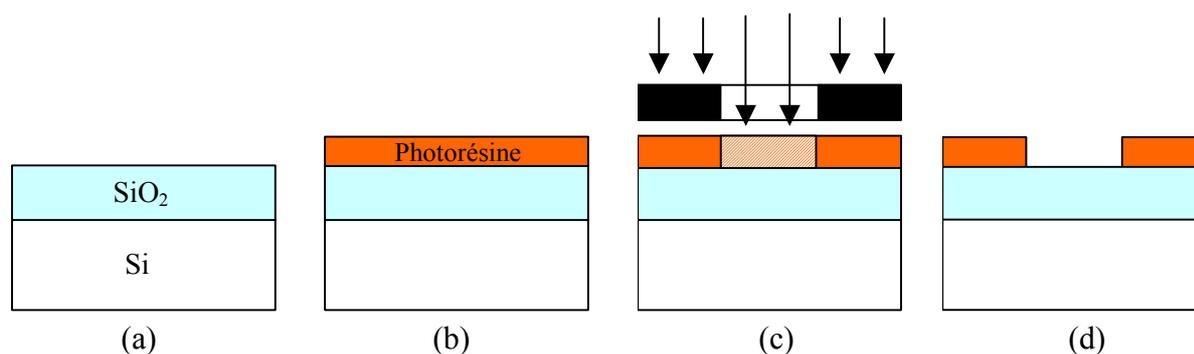


Figure 2.1: Technique de base du transfert d'un motif sur la surface d'un échantillon. a) L'échantillon est un wafer de silicium oxydé. b) Un film de résine est déposé sur le substrat. On suppose dans cet exemple que la résine est positive et sensible aux UV (cas de la photolithographie). c) La résine est exposée sélectivement grâce à une plaque de verre comportant des portions noires et des zones claires. Les zones claires, qui laissent passer les rayons UV, sont à l'origine de modifications chimiques dans la résine exposée. d) Les portions exposées sont retirées grâce à une solution de développement. Le motif est maintenant imprimé dans le masque de résine. Les zones du substrat découvertes peuvent faire l'objet d'une opération technologique (gravure du substrat, dépôt de métal, implantation ionique, ...).

Il peut arriver que les résines disponibles soient chimiquement incompatibles avec les opérations à réaliser. Un autre type de masquage est alors employé. Il s'agit d'un matériau déposé en couche fine et de manière très contrôlée par la technique de dépôt chimique en phase vapeur (*Chemical Vapor Deposition, CVD*) [1-3]. Le masque peut être un film mince de nitrure de silicium (Si_3N_4) ou d'oxyde de silicium (SiO_2), par exemple. Le dépôt en phase vapeur consiste à introduire deux gaz simultanément dans une chambre de dépôt. Lorsqu'une excitation électrique radiofréquence est appliquée et sous les conditions de température et de pression adéquates, un plasma est généré à partir de la cassure des liaisons moléculaires des deux gaz. La réaction chimique des espèces dans le plasma permet de faire croître un matériau sur le substrat. L'épaisseur du matériau déposé est très uniforme et proportionnelle au temps de réaction des espèces chimiques. Pour qu'il puisse servir de masque, le film est ensuite redessiné par l'intermédiaire d'un résinage et d'une lithographie selon la technique décrite précédemment. Le masque réalisé est identique à celui que l'on obtiendrait avec une résine, mais il possède l'avantage d'être constitué d'un matériau inerte aux étapes technologiques suivantes.

2.1.2 Les techniques de gravure

Une opération couramment réalisée consiste à graver les zones non-protégées du substrat, afin de produire des structures à trois dimensions sur la surface. La gravure peut être

totale ou partielle, selon que l'on désire atteindre le matériau placé sous celui qui est attaqué ou si l'on souhaite seulement obtenir un certain rapport d'aspect dans le matériau de surface (Figure 2.2).

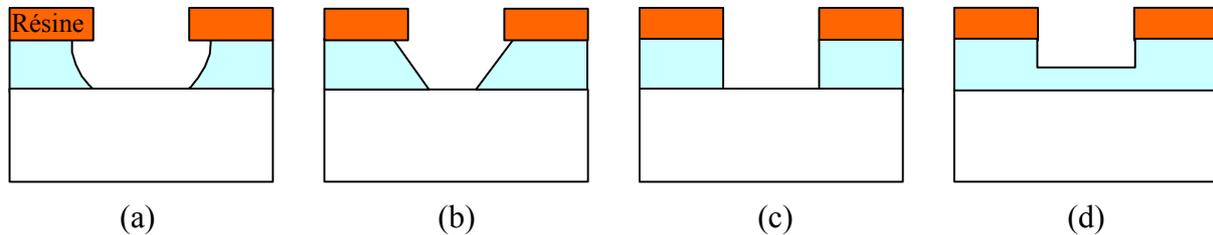


Figure 2.2: Différents profils de gravure. a) Gravure isotrope. b) Gravure anisotrope révélant des plans cristallins particuliers (typique d'une gravure humide). c) Gravure anisotrope verticale (typique d'une gravure sèche). d) Gravure partielle du substrat.

Une caractéristique fondamentale pour décrire l'attaque d'un matériau est sa vitesse de gravure. Celle-ci est bien évidemment particulière pour chaque type de gravure et dépend des espèces réactives mises en jeu, des concentrations, de la température, de la pression, de l'agitation apportée par l'opérateur, du niveau énergétique des molécules,...

Le choix du procédé de gravure doit également tenir compte de l'attaque éventuelle des autres matériaux présents sur la surface de l'échantillon. En général, les autres matériaux sont aussi gravés en même temps que le matériau ciblé, à des vitesses plus ou moins grandes. La faisabilité d'une étape de gravure dépend des épaisseurs et du rapport des vitesses de gravure des différents matériaux. Dans le meilleur des cas, la gravure sélectionnée est très spécifique pour un certain substrat et donc hautement sélective vis-à-vis des autres matériaux.

Une gravure est également définie en fonction de son caractère isotrope ou anisotrope sur un certain substrat, c'est-à-dire en fonction du rapport des vitesses de gravure dans les différentes directions de l'espace. Pour les gravures isotropes, le matériau est attaqué à la même vitesse dans toutes les directions. Dans ce cas, l'épaisseur du matériau retiré dans une direction donnée dépend du temps de gravure (Figure 2.2-a). Pour les gravures anisotropes, certaines directions sont gravées préférentiellement. L'anisotropie peut résulter des contraintes structurelles du matériau attaqué lorsque certains plans cristallographiques exposés à la gravure sont constitués d'atomes ou de molécules liés ensemble par des énergies de liaison chimique différentes. Les plans dont la cohésion atomique est la plus grande subissent les vitesses d'attaque les plus faibles et tendent à être préservés en fin de gravure (Figure 2.2-b). Ce type de gravure est en général le résultat d'une gravure humide (en phase liquide). Une autre manière de créer une anisotropie est d'orienter préférentiellement le

mouvement des particules réactives dans une des directions (Figure 2.2-c). Une telle gravure est habituellement réalisée par l'intermédiaire d'une gravure sèche (en phase gazeuse).

a) Gravures humides

Les gravures humides (en anglais *wet etchings*) se réfèrent à l'emploi de liquides pour retirer un matériau. Les molécules de la solution de gravure réagissent avec les atomes de la surface et les produits formés sont emportés dans la solution. A titre d'exemple, une couche d'oxyde de silicium (SiO_2) est gravée de façon isotrope avec de l'acide fluorhydrique (HF). La réaction forme les complexes $[\text{SiF}_6]^{2-}$ et H_3O^+ [4]. La vitesse de gravure du SiO_2 dépend de la dilution de l'acide par de l'eau, c'est-à-dire de la facilité d'accès du HF à la surface.

La vitesse d'une gravure humide est ainsi limitée par deux types de mécanisme : les vitesses auxquelles les espèces réactives peuvent atteindre la surface et les produits obtenus s'en éloigner (limites de diffusion), et la vitesse des réactions chimiques elles-mêmes (limite de réaction).

La plus ou moins grande sensibilité à un des deux types de limitations est fonction de la composition chimique des produits mis en jeu, et de la température. Le caractère homogène ou inhomogène de la gravure est défini par le mécanisme dominant. Les solutions limitées par la diffusion des réactifs et des produits tendent à réaliser des gravures isotropes, tandis que celles fortement limitées par la vitesse de réaction sont hautement anisotropes [5]. Les gravures isotropes sont donc très sensibles au degré d'agitation dans la solution. En revanche, la vitesse d'une gravure anisotrope, qui diffère selon les plans cristallins du matériau attaqué, est fortement dépendante de la température.

b) Gravures sèches

Les gravures plasma, classées parmi les méthodes de gravure sèche (*dry etching*), se réfèrent à l'utilisation d'un plasma pour attaquer la couche de matériau découverte dans l'ouverture de résine. Comme dans le cas du dépôt en phase vapeur (CVD), les espèces réactives sont produites à partir d'un gaz introduit dans une chambre de gravure. Cependant, plutôt que de faire réagir les espèces du gaz pour déposer un matériau, les réactions chimiques ont ici lieu entre les espèces issues du gaz et la surface solide dans le but d'attaquer le substrat de l'échantillon. La surface gravée est retirée sous la forme de composés volatiles évacués hors de la chambre par le flux de gaz.

Les gravures sèches offrent plusieurs avantages par rapport aux gravures humides [4, 5]. Elles fournissent habituellement un meilleur contrôle, car les composants chimiques du plasma sont en densité moindre que ceux en phase liquide, spécialement si l'opérateur travaille à basse pression.

De même, tandis que dans une solution les molécules placées dans un état électronique excité relaxent rapidement en raison des collisions permanentes, la faible concentration de particules dans un plasma permet à une part considérable des espèces présentes d'exister durablement sous la forme de radicaux fortement énergétiques. Ces particules possèdent une plus grande probabilité de réaction lorsqu'elles entrent en contact avec la surface solide, ce qui explique que des vitesses de gravure importantes puissent être obtenues en dépit de la faible densité du volume du gaz.

Le mécanisme de transport des réactifs est également plus efficace en phase gazeuse, les particules de gravure étant apportées vers la surface par l'intermédiaire d'un mouvement dirigé, alors que les gravures humides doivent compter sur une diffusion aléatoire des réactifs au voisinage de la surface de l'échantillon.

Un point supplémentaire et très important est la possibilité d'accélérer très fortement les particules du gaz jusqu'à ce que les énergies cinétiques qui leur sont conférées dépassent les énergies des liaisons chimiques du matériau à graver. Le profil de gravure obtenu, qui résulte du bombardement des ions contre le substrat, est alors fortement anisotrope en faveur de la direction verticale (Figure 2.2-c). On parle dans ce cas de gravure *physique*, quand le terme de gravure *chimique* se rapporte à des particules gazeuses peu accélérées pouvant réagir chimiquement avec le substrat de manière équivalente dans toutes les directions. Lorsque les conditions de gravure sont ajustées au point que la gravure latérale (horizontale) soit très minorée devant l'attaque verticale, la gravure hautement directionnelle réalisée est désignée sous le terme de gravure ionique réactive (*Reactive Ion Etching, RIE*).

Les bâtis RIE possèdent des caractéristiques techniques particulières, destinées à favoriser l'anisotropie de la gravure, qui les distinguent de la gravure plasma usuelle [4, 5]. La directionnalité de l'attaque est obtenue en plaçant les échantillons devant une électrode plate de taille moyenne reliée au générateur radiofréquence, tandis que l'ensemble de la chambre, métallisée et utilisée comme seconde électrode, est reliée à la terre. Avec cette configuration, les potentiels appliqués en RIE pour produire le bombardement ionique vertical sont 1000 fois plus élevés qu'en gravure plasma.

Outre la grandeur de l'énergie cinétique transférée aux espèces gazeuses, un autre paramètre intervient dans le processus de sélection du type de gravure : la pression du gaz dans la chambre. En effet, celle-ci définit le libre parcours moyen des particules. Les

pressions dans un bâti RIE sont comprises entre 0,01 et 0,1 Torr, celles des gravures plasma entre 0,1 et 5 Torrs. Pour une gravure RIE, si la pression est élevée, les collisions sont plus fréquentes, et les ions tendent à perdre leur énergie cinétique et à être déviés de la direction verticale. Ce cas correspond à une gravure plutôt chimique. *A contrario*, une gravure physique est mieux réalisée lorsque la pression exercée dans la chambre est faible.

Signalons que les techniques de gravure plasma sont parfois utilisées pour le nettoyage des échantillons. Un plasma oxygène peut être employé pour enlever les matières organiques sur la surface (*ashing*). Les atomes d'oxygène provenant de la dissociation des molécules de O₂ réagissent avec les atomes de carbone, d'hydrogène et d'azote des matériaux organiques disposés sur la surface pour produire des composants volatiles (CO, CO₂, H₂O, N₂, NH₃, NO₂, N₂O, N₂O₂) [4]. La gravure plasma O₂ permet de retirer de la résine, quelquefois avec plus de succès qu'avec les solvants liquides usuels ; c'est également une technique générale utilisée pour détruire des traces de pollution organique. En revanche, les plasmas oxygène tendent à former un oxyde sur la surface des matériaux.

2.1.3 Les dépôts métalliques

Les deux principales techniques de dépôt métallique sont l'évaporation sous vide [3] et la pulvérisation cathodique [3, 6]. Dans un bâti d'évaporation, maintenu en permanence sous un vide poussé (10⁻⁸ Torr), des particules métalliques sont sublimées par chauffage à partir d'un creuset vers l'échantillon. L'épaisseur de métal déposée est connue avec précision grâce à la mesure en temps réel de la vitesse de dépôt à l'aide d'une microbalance à quartz. Dans le cas de la pulvérisation cathodique, le métal à déposer placé sur une plaque reliée à une anode est bombardé par un gaz ionisé d'argon ; les particules éjectées et elles-mêmes ionisées positivement se déposent alors sur l'échantillon placé devant la cathode. L'évaporation sous vide est plutôt adaptée à la fabrication de structures métalliques sur une surface, tandis que la pulvérisation cathodique réalise des films uniformes (« pleine plaque ») et de qualité moyenne (présence de contamination).

L'évaporation sous vide est la technique la plus utilisée dans nos travaux car elle permet de réaliser des structures métalliques à partir des fenêtres d'ouverture dans une couche de résine (Figures 2.3-a et 2.1-d). Si l'épaisseur de métal évaporé est inférieure à celle de la résine, le film métallique n'est pas continu sur la surface ; il admet des ruptures en bordure des ouvertures (Figure 2.3-b). Un solvant, généralement l'acétone, dissout la résine située sous la couche métallique, en commençant l'attaque par les bords latéraux de la résine dans les ouvertures, qui sont les seules parties de la résine immédiatement accessibles par la solution. Cette étape est appelée *lift-off* en anglais. Le métal situé au-dessus de la résine est

emporté avec la résine vers le solvant. Le résultat est la fabrication du motif recherché sur la surface (Figure 2.3-c).

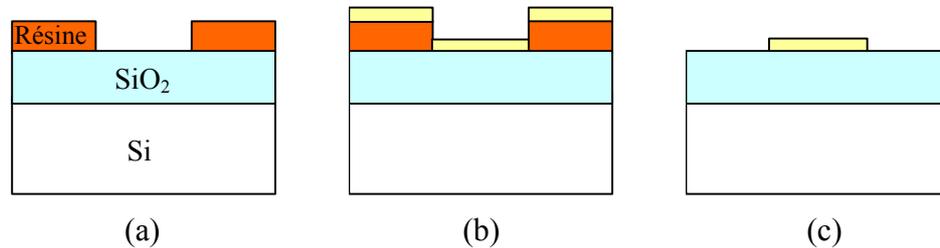


Figure 2.3: Schéma de principe d'un dépôt métallique. a) Une ouverture est fabriquée dans une résine (Figure 2.1). b) La couche métallique est déposée uniformément sur l'ensemble de la surface. c) Le métal qui s'était déposé sur la résine est emporté lors de la destruction de la résine (lift-off). Seule demeure la structure métallique que l'on désirait réaliser.

Pour faciliter la dissolution de la résine par l'acétone, un *profil en casquette* de la résine au bord des fenêtres d'ouvertures est préférable (Figure 2.4). Le processus de lift-off est plus efficace et plus rapide à amorcer quand le dépôt métallique à l'intérieur du motif d'ouverture ne recouvre pas toute la surface découverte.

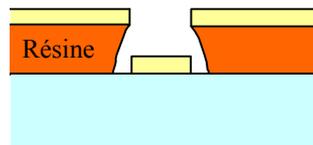


Figure 2.4: Exposition de la résine selon un profil en casquette. Ce type de section favorise la rupture du film métallique sur les bords de l'ouverture.

L'origine de l'exposition différentielle de la résine dans la direction verticale dépend de la source d'énergie. Pour la photolithographie, la lumière, partiellement absorbée pendant son trajet optique, est réfléchiée à l'interface du film de résine et du substrat, puis à nouveau en partie à l'interface supérieure de la résine et de l'air. Dans le cas de la lithographie électronique, le profil en casquette résulte de la formation d'électrons secondaires dans la résine et sur la surface du substrat (voir la partie 2.1.5). Puisque l'attaque de la résine est accomplie latéralement à partir des ouvertures, le profil en casquette minimise le risque de déposer un film continu de métal sur la surface qui recouvrirait les parois de la résine dans les ouvertures.

2.1.4 Oxydation et recuit thermique

L'oxydation thermique de la couche superficielle d'un matériau ou de structures construites sur une surface peut être effectuée dans un four d'oxydation. Le silicium est ainsi oxydé en surface à des températures comprises entre 800 et 1200°C (Figure 2.5). On parle respectivement d'*oxydation sèche* ou *humide* lorsqu'un flux gazeux de O₂ ou de H₂O traverse en continu le four. Ces agents oxydants créent sur la surface exposée du matériau une couche fine d'oxyde. Celle-ci croît ensuite par diffusion des atomes d'oxygène à travers la couche [7, 8]. L'intégration des atomes d'oxygène dans le matériau implique une modification de la maille du réseau ; ainsi la formation de liaisons Si-O augmente typiquement le volume du matériau d'un rapport 2,25.

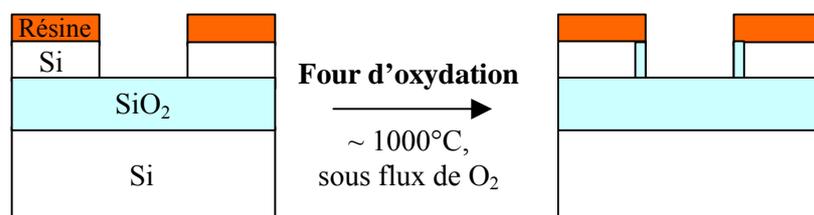


Figure 2.5: Procédé d'oxydation du silicium. Une couche fine de SiO₂ est formée en surface du silicium non-protégé.

La formation d'un alliage à l'interface de deux couches métalliques ou à l'interface d'un métal et d'une couche de silicium est souvent réalisée en microélectronique par l'intermédiaire d'un recuit thermique (*annealing*). L'objectif peut être d'augmenter l'adhésion entre les deux matériaux, de connecter deux régions proches bonnes conductrices ou d'abaisser la résistance du matériau le moins conducteur [9]. Le procédé de fabrication d'un siliciure est présenté à la figure 2.6 [10]. La structure de silicium que l'on souhaite métalliser repose sur une couche de SiO₂ (Figure 2.6-a). Un film fin de métal est déposé uniformément sur le substrat par évaporation sous vide ou pulvérisation cathodique (Figure 2.6-b). Le recuit thermique se déroule habituellement en deux étapes et forme successivement la phase transitoire et la phase finale du siliciure : la première phase est créée par diffusion du métal dans le silicium ; puis la phase finale du siliciure résulte d'une migration d'une partie du silicium restant vers la couche d'alliage nouvellement créée [11]. Le métal déposé sur la surface est ensuite retiré par un mélange HCl:HNO₃ (*eau régale*), solution usuelle qui permet de graver tous les types de métaux. Puisque les atomes du dépôt métallique ne peuvent diffuser à travers une couche de SiO₂, le substrat n'est pas modifié par le recuit (Figure 2.6-c).

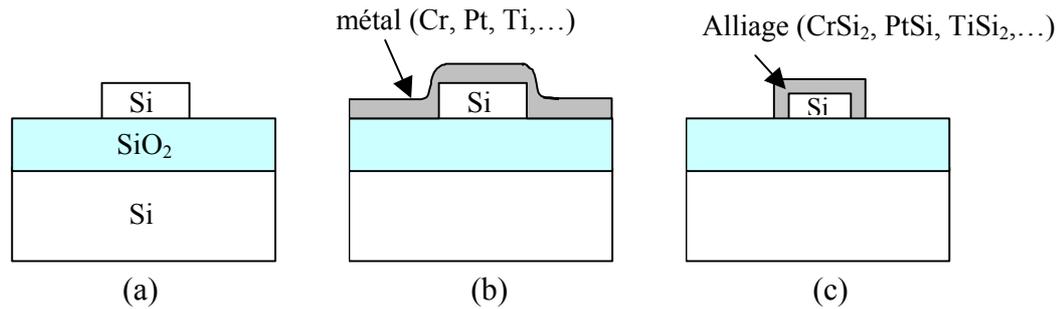


Figure 2.6: Formation d'un siliciure par recuit thermique. a) Une structure de silicium repose sur un substrat de SiO₂. b) Une couche fine de métal est déposée sur l'ensemble de la surface. c) Un recuit thermique forme le siliciure à l'interface entre les deux matériaux. Le film de métal est ensuite retiré par une gravure à l'eau régale.

2.1.5 Les lithographies

La lithographie est la technique à la base du transfert des motifs dans une résine déposée sur la surface d'un échantillon. Suite à une exposition, la résine est retirée sélectivement dans les endroits où le matériau doit être modifié. Une étape de lithographie est donc classiquement constituée de trois opérations : le dépôt uniforme d'une résine, l'exposition à la source d'énergie et la révélation des motifs réalisés par une solution de développement. Plusieurs types de résine sont disponibles, en fonction du type d'exposition employé. Le choix de la méthode de lithographie est fondé sur les dimensions du plus petit motif que l'on désire réaliser.

a) Photolithographie

Pour des structures supérieures à 2 μm , la technique la plus courante est la photolithographie. Elle est basée sur l'illumination de la résine par une exposition à de la lumière ultraviolette. Des plaques de verre, appelées *masques optiques* ou *photomasques*, sur lesquelles les motifs à réaliser sont dessinés dans un film de chrome déposé sur une des faces, sont placées en contact avec l'échantillon devant la source lumineuse (Figure 2.1-c). La résine exposée est l'objet de modifications chimiques (rupture de liaisons dans le cas de la résine positive, formation de nouvelles liaisons dans le cas de la résine négative) qui changent sa solubilité en présence de la solution de développement [5, 12]. Les ouvertures obtenues peuvent être l'objet d'une des opérations décrites précédemment (gravure, évaporation d'un métal, oxydation, ...). Les avantages de cette méthode sont sa rapidité de mise en œuvre, son coût raisonnable et le fait que tous les motifs sont produits en même temps sur l'ensemble de l'échantillon. En revanche, l'utilisation de masques « physiques » (par opposition à des

instructions stockées dans un ordinateur) est relativement rigide car un nouveau masque doit être construit si on souhaite effectuer le moindre changement dans le dessin des structures. De plus, les défauts du masque sont également retranscrits sur la surface.

b) Lithographie électronique

La lithographie électronique (*Electron-beam lithography*, ou *e-beam lithography*) est employée lorsque la résolution des masques optiques est insuffisante. Sa résolution maximale dépend du modèle de la machine et est typiquement inférieure à 10 nm. La lithographie e-beam permet de dessiner les motifs dans le film de chrome lors de la fabrication des masques optiques utilisés pour la photolithographie, ou de dessiner des motifs directement sur la surface dans une résine électrosensible. Dans le second cas, on parle d'« écriture directe ».

Dans son principe, la lithographie e-beam est similaire à la lithographie optique, mis à part que la résine est exposée à un faisceau d'électrons de grande énergie à la place de la lumière [5, 12]. Quand un électron pénètre dans la résine, il subit des interactions avec les atomes de la résine, et perd rapidement de l'énergie. Cette énergie transférée à la résine permet là encore de rompre des liaisons chimiques (cas de la résine positive) ou d'en former de nouvelles (résine négative), ce qui se traduit par un changement de la solubilité du polymère de la résine. Comme c'est le cas avec la photolithographie, les résines positives ont habituellement une résolution plus grande et de meilleures caractéristiques chimiques. Cependant, contrairement à la photolithographie, une grande flexibilité de design est permise car aucun masque physique n'est utilisé. Le faisceau électronique, dirigé par un programme informatique, balaye la surface de l'échantillon et dessine les motifs un à un. Les instructions sont préparées à l'aide de logiciels de dessin de masques [13, 14].

Cependant, si la lithographie électronique permet de produire relativement aisément des structures de dimensions nanométriques, elle présente également plusieurs désavantages qui limitent son expansion. Le coût élevé des machines (~ 3 M€ pour un Leica 5000 plus, résolution < 10 nm) est un obstacle majeur, ainsi que celui de leur fonctionnement (coût du faisceau : ~ 300 € / heure). L'équipement est très complexe et requiert un personnel hautement qualifié. De plus, comme le faisceau électronique doit balayer la surface de l'échantillon avec une très bonne résolution, c'est-à-dire avec une largeur de faisceau très petite, la vitesse d'écriture est relativement lente et le nombre d'échantillons traités dans une journée est faible. Ces inconvénients expliquent pourquoi cet équipement est peu répandu (moins d'une vingtaine de machines en Europe) et utilisé essentiellement dans des laboratoires de recherche.

La largeur du motif obtenu est typiquement plus grande que celle du spot du faisceau électronique, car il faut également compter sur la dispersion des électrons dans la résine et surtout sur la production d'électrons secondaires dans la résine et en provenance du substrat (Figure 2.7-a). Ces *effets de proximité* sont bien connus et anticipés à l'aide d'un logiciel. Celui-ci découpe les motifs à réaliser en pixels de dimension appropriée et module l'énergie et la dose délivrées par le faisceau à la résine en fonction des recouvrements des dispersions électroniques en bordure de deux pixels (Figure 2.7-b).

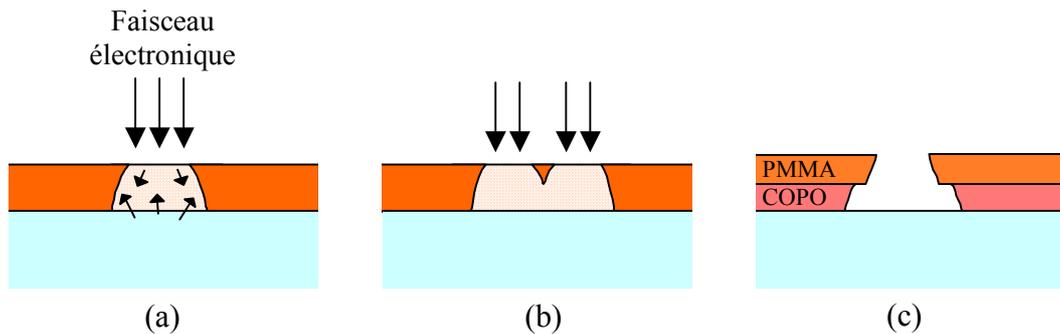


Figure 2.7: Exposition d'une résine à un faisceau électronique. a) La formation d'électrons secondaires dans la résine et en provenance du substrat tend à élargir la surface exposée. b) Un algorithme de correction des effets de proximité découpe les motifs à réaliser en pixels recevant chacun un niveau de dose particulier en fonction des recouvrements en bordure de pixel. c) Développement d'une résine bi-couche COPO/PMMA.

Les électrons secondaires en provenance du substrat dominent sur ceux créés dans la résine. Cet effet est à l'origine d'une exposition plus grande en bas de la résine qu'en haut. Le profil en casquette obtenu est appréciable pendant l'opération ultérieure de développement (partie 2.1.3). Le phénomène peut être amplifié en utilisant une résine bi-couche constituée de deux films de résine déposés l'un sur l'autre et qui possèdent une sensibilité différente au faisceau électronique. Le film supérieur, une couche de résine positive polyméthyl méthacrylate (PMMA 3 % 495 K) dans notre cas, est un peu moins sensible à l'exposition que le film inférieur, un copolymère à base de méthyl méthacrylate (COPO 4 % MMA 8.5)². Le développement est réalisé par une solution de MIBK (methylisobutylketone) et est illustré à la figure 2.7-c.

Un autre avantage lié à l'utilisation d'une résine bi-couche est la réduction des effets de proximité. Comme le niveau inférieur de la résine joue le rôle du substrat pour le niveau supérieur, la dispersion des électrons secondaires est réalisée sur des épaisseurs plus fines. Il

² PMMA 3% 495K : 3% en masse de PMMA (polyméthylméthacrylate) de poids moléculaire 495000 (longueur de la chaîne) dans un solvant d'anisole.

COPO 4% MMA 8.5 : copolymère issu d'un mélange de 4% en masse de PMMA et de ~8,5 % de MMA (méthyl méthacrylate) dans un solvant d'éthyl lactate.

en résulte un accroissement sensible de la résolution. Pour dessiner les motifs les plus petits, on utilisera de préférence des résines peu épaisses, ainsi qu'une énergie et un courant de faisceau faibles. Le temps de développement affecte également le profil des ouvertures dans la résine. Pour une même exposition, des développements trop courts ne permettent pas à la partie basse de la résine de se dissoudre entièrement ; les développements plus longs forment le profil en casquette recherché mais élargissent progressivement les motifs dans la résine.

Les épaisseurs des différentes couches de la résine, les conditions d'exposition (énergie et dose du faisceau, vitesse de balayage et résolution du spot) et le temps de révélation en présence de la solution de MIBK forment donc une combinaison très sensible qui doit faire l'objet d'une mise au point avant la réalisation de motifs de dimensions inférieures à 100 nm. Nous avons effectué des tests préliminaires de dosage en vue de déterminer les paramètres corrects d'exposition pour une épaisseur de résine donnée. Les épaisseurs sélectionnées sont 500 Å de COPO 4 % et 450 Å de PMMA 3 %. Après une expérience de variation de la dose du faisceau, la dose de base retenue est de 220 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ pour une énergie de faisceau de 50 keV. Le temps de révélation des motifs est de 50 sec. Ce protocole sera celui utilisé lors de la fabrication des nanoélectrodes au chapitre 3.

2.2 Films auto-assemblés

2.2.1 Description

Une monocouche auto-assemblée (*Self-Assembled Monolayer, SAM*) est un assemblage moléculaire qui se forme spontanément sur un substrat immergé dans un solvant organique ou une phase vapeur contenant des molécules susceptibles de réagir avec la surface du solide [15-18]. Le film greffé forme idéalement un réseau bidimensionnel dense de molécules en position quasi-verticale sur le substrat. Le dépôt commence généralement sous la forme d'*îlots*, c'est-à-dire de rassemblements de molécules, dont la taille croît à mesure que de nouvelles molécules se greffent sur la surface [17, 19, 20]. Les applications de ces films concernent la maîtrise des propriétés de surface d'un échantillon. Ils permettent ainsi de modifier la mouillabilité d'une surface en la rendant hydrophobe ou hydrophile [21], de contrôler ses propriétés électriques [16, 18, 22], de servir de précurseur pour le dépôt d'un polymère [23], ou d'immobiliser des molécules biologiques sur un support solide lors de la fabrication de biopuces (voir la partie 1.4) [24, 25].

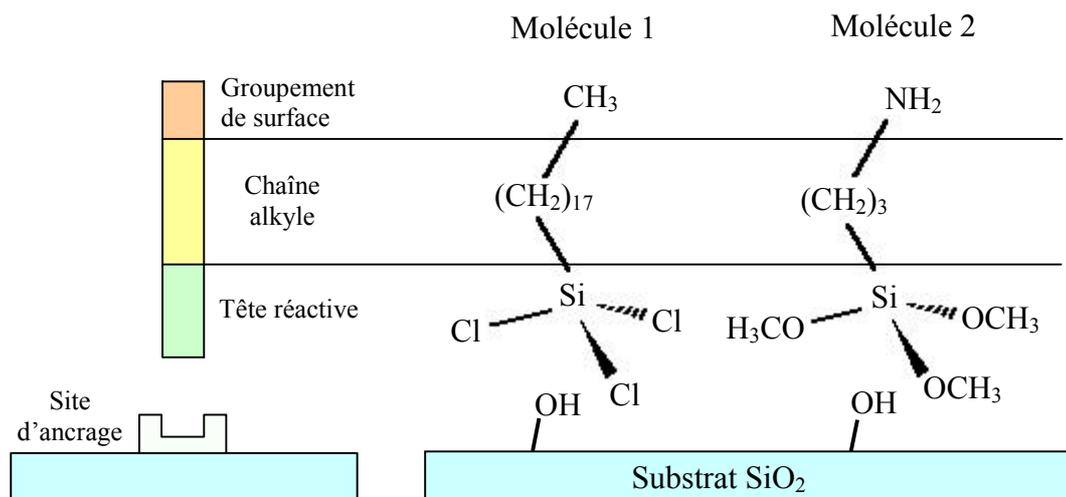


Figure 2.8: Représentation schématique des molécules formant un film organique sur le substrat de SiO_2 .

Les molécules sont généralement constituées de trois parties distinctes (Figure 2.8) [15]. Le groupement réactif (ou tête réactive) permet à la molécule de s'ancrer sur la surface ; le groupement de surface porte la fonctionnalité que l'on désire greffer sur le substrat et qui lui confère ses nouvelles propriétés ; le corps de la molécule, souvent une chaîne alkyle, relie ces deux groupements terminaux. D'un point de vue énergétique, la fixation est un processus exothermique (environ 1 à 2 eV libéré par molécule). Les molécules cherchent donc à occuper le maximum de sites d'accrochage disponibles. Des interactions de Van der Waals entre les chaînes alkyles, et éventuellement des interactions électrostatiques si les molécules possèdent des groupements polaires, peuvent contribuer à l'élaboration d'un assemblage dense et ordonné. Les groupements de surface, étant placés à l'interface entre le film et l'air, subissent peu les effets dus aux interactions de Van der Waals entre les chaînes. Par conséquent, un certain désordre dans la conformation des molécules au niveau du groupement de surface est introduit par l'agitation à température ambiante. Lorsque l'objectif du greffage est de déposer un groupement de surface particulier afin de modifier ensuite ce groupement grâce à une synthèse *in situ*, le désordre des groupements terminaux peut fortement influencer le rendement de la réaction. En effet, si la terminaison se présente au réactif sous une orientation défavorable, la transformation chimique du groupement de surface n'est pas réalisée.

Le processus de greffage de composés organo-silanes sur une surface terminée hydroxyle (-OH), telle qu'un substrat de SiO_2 , est appelé *silanisation*. Les silanols (-SiOH) de la surface réagissent avec des molécules terminées trichlorosilane (-SiCl₃), triméthoxysilane (-Si(O-CH₃)₃) ou triéthoxysilane (-Si(O-C₂H₅)₃). La figure 2.8 présente deux molécules, qui seront utilisées par la suite, susceptibles de former des films d'alkylsilanes sur une surface de

SiO₂. La molécule 1, l'octadécyltrichlorosilane (OTS), est constituée d'un groupement greffant trichlorosilane (-SiCl₃), d'une longue chaîne alkyle (-CH₂)₁₇- et d'un groupement méthyl (-CH₃). Le greffage par trichlorosilane est efficace et produit une monocouche dense et ordonnée en un réseau hexagonal [26]. Les propriétés structurales de la monocouche d'OTS étant bien connues, celle-ci est souvent utilisée dans la littérature comme monocouche de référence.

La molécule 2, le 3-aminopropyltriméthoxysilane (APTMS), est constituée d'un groupement greffant triméthoxysilane (-Si(O-CH₃)₃) et d'un groupement de surface amine (-NH₂). Le corps de la molécule est une chaîne propyle (-CH₂)₃-. Dans les chapitres 4 et 5, cette molécule nous servira de couche de départ pour construire le film d'ancrage sur lequel la première molécule biologique pourra être greffée.

Quelques travaux se sont intéressés au détail du processus de formation de monocouches à partir du greffage de molécules terminées trichlorosilane, triméthoxysilane ou triéthoxysilane sur des terminaisons silanols. Mais, d'une manière générale, la structure des films réalisés demeure mal comprise [18]. Selon la description de Brzoska et coauteurs, la silanisation des octadécyltrichlorosilanes (molécules 1) sur une surface hydroxylée se décompose en 4 étapes [27] (Figure 2.9).

Un substrat de SiO₂ est naturellement très hydrophile en raison des groupements hydroxyles présents sur sa surface. Les molécules introduites en proportions micromolaires dans une solution organique viennent spontanément se physisorber dans la fine couche d'eau présente sur la surface de l'échantillon. L'orientation des têtes greffantes vers le substrat est automatique dans le cas de molécules amphiphiles telles que les OTS : la tête hydrophile -SiCl₃ se place dans la couche d'eau tandis que la chaîne alkyle hydrophobe demeure dans la solution organique (Figure 2.9-a).

Les trichlorosilanes sont ensuite hydrolysés en trihydroxysilane (-Si(OH)₃). L'hydrolyse libère de l'acide chlorhydrique (HCl) qui joue un rôle de catalyseur de la silanisation. De plus, les molécules sont à ce stade encore très mobiles et peuvent diffuser sur la surface grâce au rôle de lubrifiant joué par la couche d'eau. Les molécules se rapprochent et s'organisent sous l'influence des interactions de Van der Waals entre les chaînes alkyles (Figure 2.9-b).

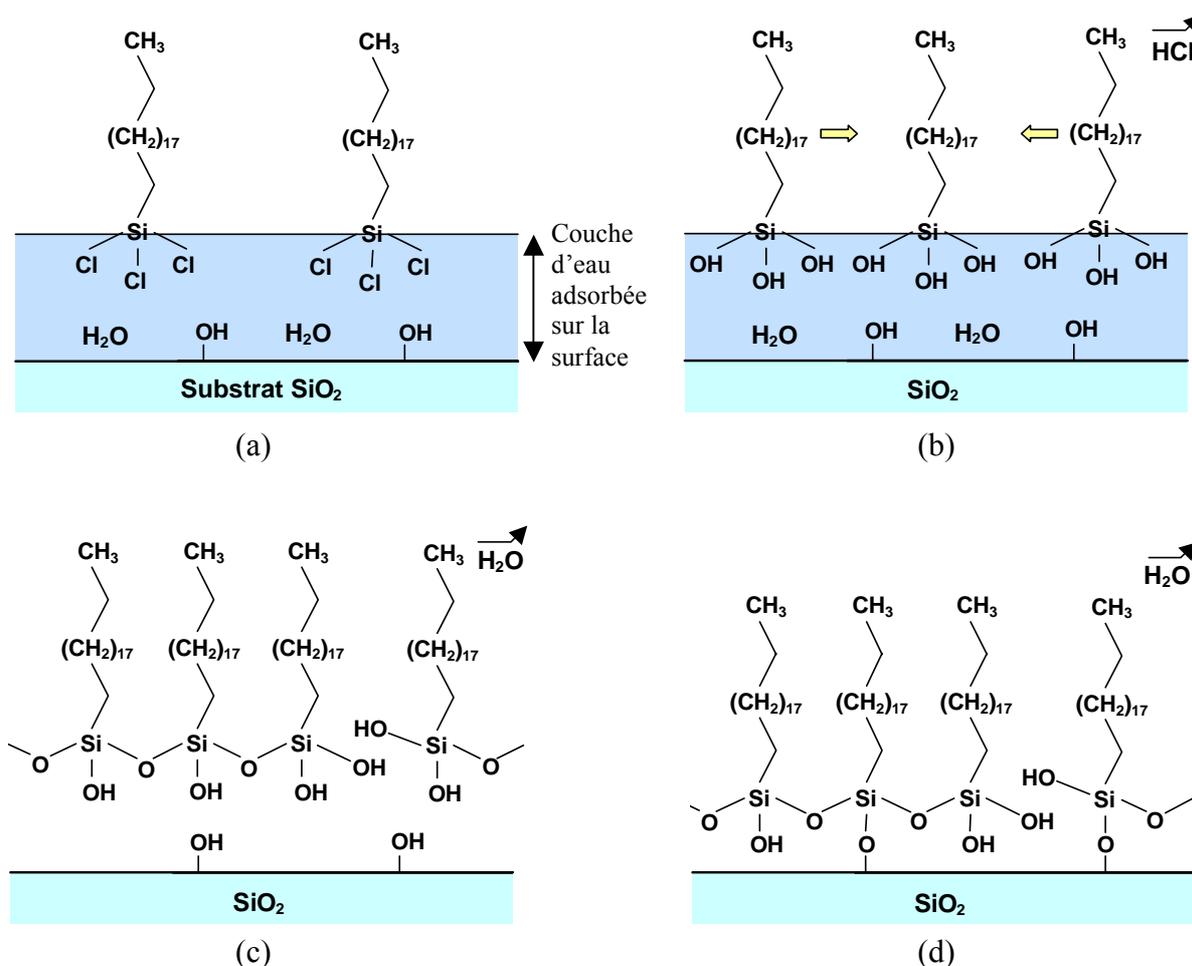


Figure 2.9: Etapes du processus de silanisation, selon Brzoska [27] : a) physisorption des molécules sur le substrat, b) hydrolyse des groupements greffants et organisation des molécules en réseau, c) réticulation, d) greffage covalent sur le substrat.

Le rapprochement des molécules permet des réactions de condensation entre molécules voisines, selon un processus de type sol-gel. La formation de liaisons siloxanes Si-O-Si crée un réseau bidimensionnel au-dessus de la surface (Figure 2.9-c). D'autres liaisons covalentes siloxanes entre groupements $-\text{OH}$ de la molécule et du substrat greffent le film moléculaire sur la surface (Figure 2.9-d). La séparation des étapes c et d est artificielle car on s'attend à ce que la réticulation et le greffage sur le substrat se déroulent plus ou moins simultanément. En outre, comme le montre la figure 2.9-d, tous les groupes hydroxyles des molécules ne réagissent pas avec les sites du substrat ou avec les molécules voisines. En effet, des terminaisons $-\text{OH}$ ne sont pas toujours disponibles sur la surface car la répartition des groupements hydroxyles sur le substrat est aléatoire. De plus, des contraintes dans le réseau bidimensionnel dues à un conflit entre la longueur de la liaison Si-O-Si ($\sim 4,25 \text{ \AA}$) et la largeur d'une chaîne alkyle ($4,8 \text{ \AA}$) imposent de laisser certains groupements hydroxyles non-liés.

2.2.2 Protocoles de silanisation

Afin d'éviter au maximum la contamination de la monocouche à réaliser, la verrerie utilisée est spécialement réservée à un type donné de silanisation et rincée deux fois avec le solvant organique employé pendant la réaction. Le chloroforme (pureté > 99,8 %) est fourni par la société Scharlau Chemie et le méthanol (pureté de 97 %) par SDS. Les octadécyltrichlorosilanes sont obtenus de la société Gelest avec une pureté de 95 % et un taux d'isomères de position compris entre 5 % et 10 %. Les autres produits chimiques proviennent de la société Sigma-Aldrich, en particulier les 3-aminopropyltriméthoxysilanes dont la pureté est de 97 %.

a) Silanisation des OTS

La formation de la monocouche d'octadécyltrichlorosilanes (OTS, molécules 1) est effectuée dans un solvant hydrocarboné sans introduction d'eau. Si de l'eau était ajoutée, l'hydrolyse et la réticulation des molécules seraient réalisées directement dans la solution, et non dans la fine couche d'eau adsorbée sur la surface de l'échantillon. Pour éviter la polymérisation des molécules, la silanisation est effectuée dans une boîte à gants sous atmosphère d'azote sec. Le solvant employé est un mélange d'hexadécane et de tétrachlorure de carbone (CCl_4) en proportions 2:1. Le rôle de l'hexadécane est de solubiliser les chaînes carbonées des OTS et celui du tétrachlorure de carbone de solubiliser les groupements $-\text{SiCl}_3$, évitant ainsi que les molécules ne se regroupent et forment des micelles dans la solution.

Le mode opératoire pour former la monocouche d'OTS est adapté de celui décrit par Brzoska et coauteurs [27] et comporte une première étape de nettoyage du substrat de SiO_2 destiné à préparer le maximum de groupements hydroxyles sur la surface, et une seconde étape de dépôt de la monocouche. Lors de notre phase de nettoyage, le substrat est tout d'abord dégraissé dans un bain de chloroforme agité par ultrasons pendant 5 minutes. Puis les traces de pollution organique restantes sont détruites grâce à un bref plasma oxygène ; ce type de nettoyage est très efficace et bien adapté à un matériau oxydé tel qu'un substrat de SiO_2 (voir la partie 2.1.2-b).

Le substrat est ensuite plongé dans le solvant ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}:\text{CCl}_4 = 2:1$) dans lequel des molécules d'OTS ont été précédemment introduites à la concentration $1,3 \times 10^{-6}$ M. Sous atmosphère d'azote et avec une concentration micromolaire d'OTS, la silanisation est habituellement réalisée en 1h30 environ. Toutefois, il est préférable de laisser l'échantillon immergé dans le bain de silanisation pendant une durée longue afin d'être assuré que la monocouche soit bien formée de manière dense et ordonnée sur l'ensemble de la surface. Lors

des dépôts décrits aux chapitres 3 et 4, nous ajouterons un temps supplémentaire de sécurité de 5 à 6 heures.

L'échantillon est ensuite récupéré et rincé pendant 5 minutes dans un bain de chloroforme agité par ultrasons. Cette étape permet de retirer les molécules physisorbées sur la surface (film formé pendant le temps de silanisation supplémentaire) en ne laissant que le film greffé (chimisorbé) sur le substrat. Enfin, l'échantillon est séché en quelques secondes sous un flux d'azote sec propulsé par pistolet.

Puisque l'orientation des groupements greffants vers la couche d'eau est assurée par le caractère amphiphile des molécules et que le groupement trichlorosilane est rapidement hydrolysé (étape b sur la figure 2.9), la formation des monocouches d'OTS est très efficace et aboutit favorablement pour toutes les expériences réalisées. En revanche, pour d'autres molécules, en particulier pour celles portant d'autres groupements greffants, une variation dans les conditions expérimentales peut entraîner des problèmes de reproductibilité dans la formation de la monocouche. La compétition entre le phénomène de diffusion des molécules sur la couche d'eau et le greffage covalent sur le substrat (étapes b et d sur la figure 2.9) semble être à l'origine de ces difficultés [17].

b) Silanisation amine

Le groupement greffant de la molécule 2 est un triméthoxysilane (-Si(O-CH₃)₃). L'hydrolyse des groupes méthoxy est plus lente que celle du trichlorosilane. Elle est décrite par la réaction



où R désigne le corps de la molécule. Les temps de silanisation donnés dans la littérature pour former un film recouvrant toute la surface peuvent atteindre jusqu'à 2 jours [18, 20]. Beaucoup des dépôts présentés pour greffer un film d'aminopropyltriméthoxysilane ou d'une molécule comparable (telle qu'un aminopropyltriéthoxysilane ou une autre molécule organique portant la même tête greffante triméthoxysilane) utilisent un solvant organique anhydre (toluène [28-33], benzène [34], xylène [32, 34], acétone [32], chloroforme [32], trichloroéthylène [32], éthanol [32], mélange hexane:tétrachlorure de carbone [18]). Cependant, certains auteurs introduisent un faible pourcentage d'eau (< 10 % en volume) dans la solution, afin de favoriser et accélérer l'hydrolyse de la tête greffante triméthoxysilane (mélanges méthanol:eau [25, 35] ou éthanol:eau [36]). Dans ce cas, les temps de silanisation rapportés sont beaucoup plus courts, de l'ordre de la demi-heure pour former une couche complète sur la surface. Nous opterons ainsi pour un mélange de 95 % de méthanol et de 5 %

d'eau, agité par ultrasons pendant une demi-heure, selon un protocole adapté de celui présenté par Beier [35].

Le nettoyage de l'échantillon comporte une première étape de plasma oxygène (ashing), suivie d'un rinçage au méthanol pur. Une autre technique utilisée consiste à plonger le substrat dans un mélange piranha³ pendant une nuit, puis à rincer l'échantillon plusieurs fois avec de l'eau déionisée, suivi d'un rinçage au méthanol pur. Après une immersion de 30 minutes dans la solution de silanisation méthanol:eau = 95:5 agitée par ultrasons et comportant des APTMS à la concentration de $1,7 \times 10^{-4}$ M, le substrat est retiré et rincé au méthanol pur, puis 2 fois avec de l'eau milliQ, et enfin une dernière fois au méthanol. L'échantillon est alors séché pendant 15 minutes dans une étuve à 110°C.

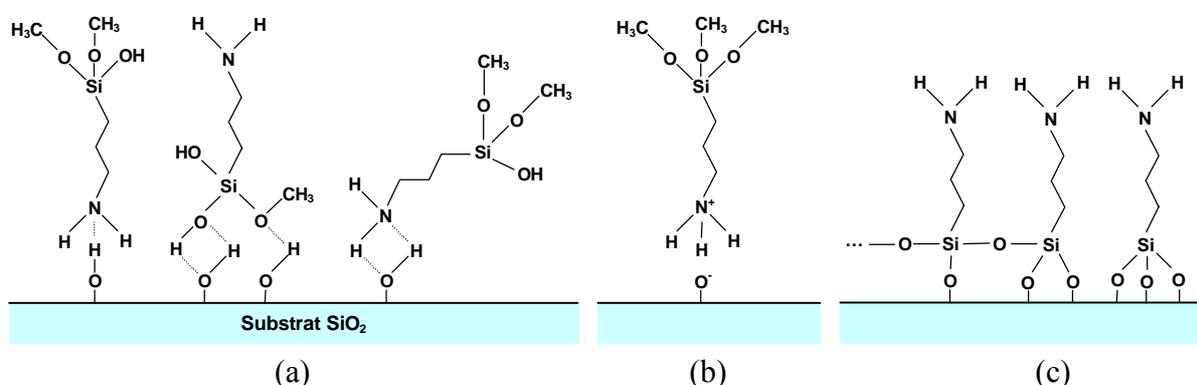


Figure 2.10: Différents types d'interactions entre la surface de SiO₂ et des aminosilanes (adapté de [29] et [32]). a) Ponts hydrogène entre les groupes -NH₂, -OH ou -O-CH₃ de la molécule et les silanols de la surface. b) Interaction ionique par transfert de proton du groupe silanol au groupe amine. c) Formation de liaisons siloxane par condensation entre molécules voisines ou entre les molécules et le substrat.

Cependant, comme les aminoalkyltriméthoxysilanes ne sont pas des molécules amphiphiles comme les OTS, les deux groupements terminaux (-NH₂ d'une part et -Si(O-CH₃)₃ ou -Si(OH)₃ après hydrolyse dans la solution d'autre part) sont tous deux attirés par la couche d'eau adsorbée sur le substrat. Donc contrairement aux OTS, l'orientation des molécules vis-à-vis de la surface n'est pas assurée et plusieurs types d'interactions sont possibles (Figure 2.10) : des ponts hydrogène entre les terminaisons des molécules et les groupes hydroxyles de la surface, des interactions ioniques suite à un transfert de proton entre un silanol et le groupe amine ou, selon le schéma décrit précédemment, des ponts siloxane entre molécules voisines et entre le substrat et les molécules [29, 32, 33]. Vrancken et

³ Mélange piranha : H₂SO₄:H₂O₂:H₂O = 3:1:2. Attention, un mélange piranha peut réagir violemment avec des composés organiques en trop grande quantité (projections d'acide). L'opérateur prendra garde à ne jamais introduire de produits organiques dans la solution, y compris à froid dans les bidons de récupération.

coauteurs ont estimé la répartition de ces types de liaisons à 10 %, 22 % et 68 % respectivement [33], mais il faut garder à l'esprit que ces chiffres sont essentiellement indicatifs car le greffage des aminoalkylsilanes est très sensible aux conditions de dépôt, c'est-à-dire au type de solvant, à la présence ou non d'eau, à la température et à la durée du processus de silanisation [32].

Les premières molécules déposées sur la surface par adsorption physique (Figures 2.10-a et b) ou par greffage chimique (Figure 2.10-c) jouent le rôle d'un précurseur sol-gel : les fonctions Si-O-R, R représentant un groupe méthyl ou éthyl, sont hydrolysées au contact de traces d'eau dans la solution ou près de la surface en groupements silanols Si-OH, et ces derniers se condensent spontanément pour conduire à un gel polymérique formé de ponts siloxanes (Si-O-Si) [32]. La structure du film greffé est donc très complexe et constituée de plusieurs couches superposées (Figure 2.11). Certains auteurs estiment même que les films moléculaires auto-assemblés sont générés par un empilement d'oligomères de polysiloxanes formés dans la solution [17, 37].

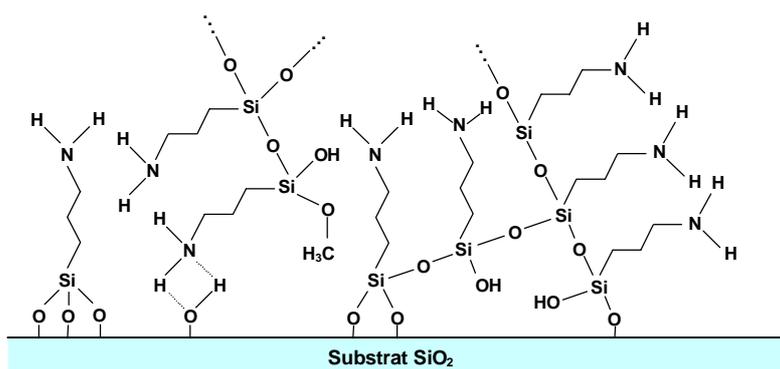


Figure 2.11: Représentation de la polymérisation à la surface du substrat de SiO_2 .

Pour plusieurs expériences de greffage de molécules APTMS répétées dans les mêmes conditions apparentes et pour un même temps de réaction, le film moléculaire formé n'est pas exactement reproductible. L'épaisseur de la couche organique déposée en phase liquide selon le protocole décrit précédemment, ainsi qu'en phase vapeur dans une atmosphère d'azote sec, a été mesurée au microscope à force atomique (AFM, voir la partie 2.3.3) en produisant une rayure dans le film par un objet tranchant et en observant le profil vertical au bord de cette ouverture. L'épaisseur du film polymérisé est comprise entre 1 et 3 nm [38]. La plus petite épaisseur mesurée (1 nm) correspond à l'obtention d'environ deux à trois couches moléculaires (longueur théorique de la molécule $\sim 6,6 \text{ \AA}$).

Nous pouvons remarquer sur la figure 2.11 que les groupements terminaux $-NH_2$ ne sont pas tous situés à la surface du film. Certains groupes amine sont inaccessibles, d'autres, bien que placés à la surface, sont mal orientés. Or, aux chapitres suivants, une synthèse *in situ* sur les groupements de surface permet de mettre en place le film d'ancrage destiné à immobiliser la première molécule biologique. On en conclut qu'il existe un certain rendement lors de la transformation chimique, dû en partie à la dynamique propre de la réaction et en partie à la difficulté d'accès aux groupements amines.

2.3 Techniques de caractérisation

2.3.1 Angles de contact

La mesure de l'angle formé par une goutte de solvant déposée sur un substrat est une méthode de caractérisation de l'état d'une surface. Cette technique rapide permet d'accéder, à partir d'une observation au niveau macroscopique, à des données sur l'arrangement structural des molécules dans un film organique. En particulier, les propriétés de mouillage de la surface renseignent sur la compacité et l'homogénéité du film.

L'interface entre deux milieux (liquide-solide, liquide-gaz, solide-gaz ou entre deux liquides non-miscibles) est caractérisée par une grandeur appelée *tension interfaciale* (ou *tension superficielle* dans le cas d'un couple liquide-gaz). En effet, les molécules placées sur une interface n'ont pas le même environnement que celles situées en volume. Les molécules entourées de voisins identiques subissent des attractions semblables dans toutes les directions, alors que celles proches de l'interface sont plus attirées par leur phase d'origine que par l'autre milieu [39]. Les interactions compensées en volume ne le sont donc plus pour les molécules à l'interface. Par conséquent, l'existence de l'interface induit une contribution spécifique à l'énergie libre du système : la forme de la goutte, liée en grande partie à l'énergie libre du liquide, est également affectée par l'énergie libre du solide sur lequel elle repose. Le travail d'adhésion W_{sl} entre un solide et un liquide est défini par [40]

$$W_{sl} = \gamma_{sg} + \gamma_{lg} - \gamma_{sl} \quad (2-2)$$

où sl , sg et lg désignent les interfaces solide-liquide, solide-gaz et liquide-gaz respectivement. γ_{ij} est la tension interfaciale entre les milieux i et j , et a la dimension d'une énergie par unité de surface (en mJ/m^2) ou, ce qui est équivalent, la dimension d'une force par unité de longueur (mN/m).

Une méthode simple pour estimer ces énergies interfaciales consiste à déposer une goutte de liquide sur un substrat (Figure 2.12). La forme que prend la goutte à l'équilibre est la résultante des trois tensions interfaciales. Au point de rencontre des trois phases, la projection sur la surface des trois tensions d'interface mène à l'équation de Young-Dupré :

$$\gamma_{sg} = \gamma_{sl} + \gamma_{lg} \cdot \cos \theta \quad (2-3)$$

où θ est l'angle de contact formé entre l'interface liquide-gaz et l'interface liquide-solide. C'est à cette donnée que nous avons concrètement accès pendant nos mesures.

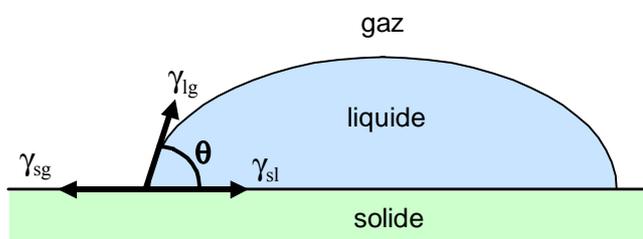


Figure 2.12: Bilan des tensions interfaciales d'une goutte déposée sur une surface.

Expérimentalement, une goutte de quelques microlitres déposée sur le substrat est éclairée sur le côté par un faisceau de lumière blanche (Figure 2.13-a). L'angle de contact est déterminé automatiquement, grâce à un logiciel de traitement d'image, à partir de l'ombre de la goutte enregistrée par une caméra CCD. Le dispositif employé pour nos mesures est un goniomètre Digidrop fourni par la société GBX.

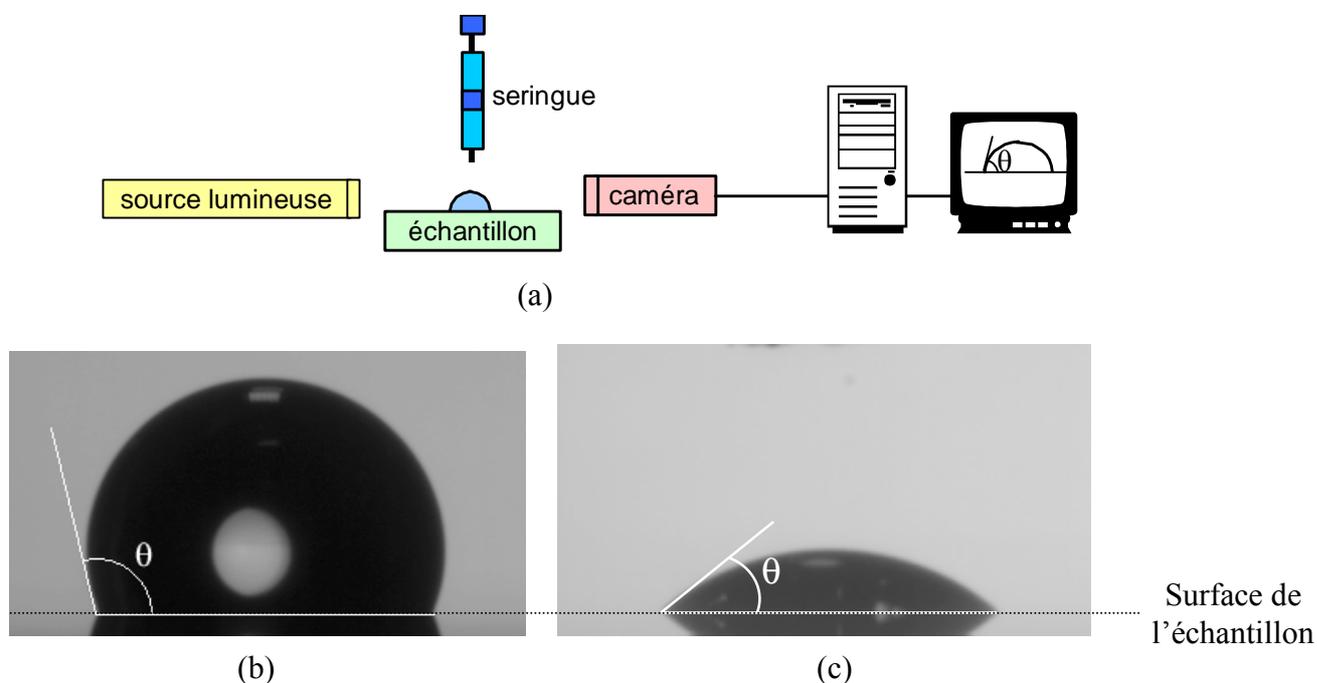


Figure 2.13: Mesure de l'angle formé par une goutte déposée sur la surface de l'échantillon à analyser. a) Dispositif expérimental de mesure des angles de contact. b) L'angle formé par une goutte d'eau déposée sur une monocouche d'octadécyltrichlorosilane (OTS) est de $108 \pm 2^\circ$ (surface hydrophobe). c) L'angle formé par une goutte d'hexadécane sur la même monocouche d'OTS est de $43 \pm 2^\circ$.

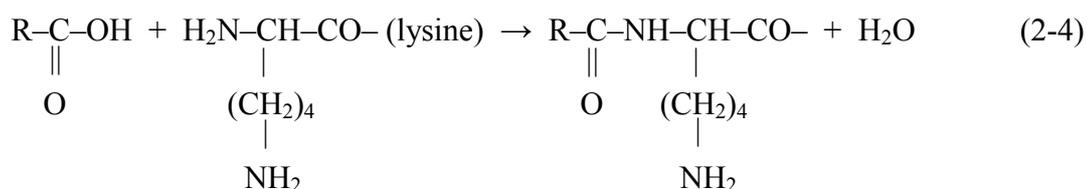
La mesure de l'angle de contact effectuée aussitôt après le dépôt d'un film moléculaire permet de déterminer la réussite ou non de la réaction de silanisation. Il suffit pour cela de comparer les angles obtenus après le greffage supposé avec les valeurs théoriques [15]. La mesure est réalisée en plusieurs points de la surface afin de tester l'homogénéité de la couche organique. L'angle théorique pour une monocouche hydrophobe d'octadécyltrichlorosilanes (OTS) est de $108 \pm 2^\circ$ pour une goutte d'eau déionisée (Figure 2.13-b) [30, 41], $43 \pm 2^\circ$ pour une goutte d'hexadécane (Figure 2.13-c) [41] et $17 \pm 2^\circ$ pour une goutte d'octane.

Plusieurs valeurs ont été proposées dans la littérature pour l'angle de contact d'une goutte d'eau lorsque le groupement de surface est une fonction amine : $21 \pm 5^\circ$ pour une monocouche d'aminopropyltriméthoxysilanes (APTMS) fraîchement préparée [28], $42 \pm 3^\circ$ pour une couche d'aminopropyltriéthoxysilanes [42], 63° ou 68° pour d'autres couches terminées amine [43]. En fait, le solvant employé et la méthode de préparation ont une influence cruciale sur la qualité des films, ce qui explique l'hétérogénéité des angles de contact mesurés [32, 43]. De plus, le groupement $-NH_2$ étant hydrophile, l'angle θ est très sensible à la qualité de la surface, en particulier à la présence éventuelle de contaminants. En effet, comme le montre une série de mesures systématiques des angles de contact sur un film d'APTMS exposé à l'air ambiant, le groupe amine tend à réagir très vite (< 3 h) avec les impuretés de l'air, ce qui se traduit par une augmentation progressive de l'angle de contact [28]. Les auteurs de cette étude concluent que la transformation du groupement amine lors d'une synthèse *in situ* doit être réalisée dès que le film est formé. Enfin, compte tenu de la difficulté à reproduire exactement le même film d'APTMS à cause de la polymérisation des aminosilanes en solution et près du substrat, la rugosité obtenue à la surface du film influe sur l'angle mesuré [44]. Pour les couches d'APTMS formées selon notre protocole, les angles de contact obtenus sont de $31 \pm 2^\circ$ avec une goutte de formamide, de $23 \pm 2^\circ$ avec de l'éthylèneglycol et de $47 \pm 2^\circ$ avec du diiodométhane.

L'angle θ dépend de la nature de l'interaction entre la goutte et les groupements situés sur la partie supérieure du film [17]. Les liquides qui possèdent une grande composante polaire, tels que l'eau, sont surtout sensibles à la nature chimique du groupement de surface. Des groupements hydrophobes comme la terminaison méthyle des OTS [41], ou des impuretés hydrophobes incorporées avec le temps sur la surface d'une couche d'APTMS [28], augmentent donc l'angle de contact formé par la goutte d'eau. Un liquide à faible composante polaire, tel qu'un alcane, peut pénétrer dans la couche organique sur quelques angströms. L'angle de contact ne dépend donc pas uniquement du groupement chimique terminal, mais aussi des deuxième et troisième groupements terminant la molécule greffée [45], ainsi que du degré d'ordre de la couche en surface (organisation éventuelle des molécules en un réseau bidimensionnel) [17].

2.3.2 Scanner à fluorescence

Le fluorophore employé est la tétraméthylrhodamine dont la formule semi-développée est donnée à la figure 2.14. Le groupe carboxy peut être placé en position 5 ou 6, et les deux isomères sont présents dans la solution. La rhodamine est couplée à un peptide par l'intermédiaire d'une réaction entre la fonction carboxy de la rhodamine et l' α -amino d'une lysine [46] :



Les fonctions amines situées sur le groupe xanthène de la rhodamine ont été bloquées par la fixation de groupes méthyls, afin d'empêcher la réaction de ces amines avec la fonction acide d'une autre rhodamine (Figure 2.14). La longueur d'onde d'excitation de la rhodamine est située dans la gamme 530-560 nm, la longueur d'onde d'émission à 572 nm.

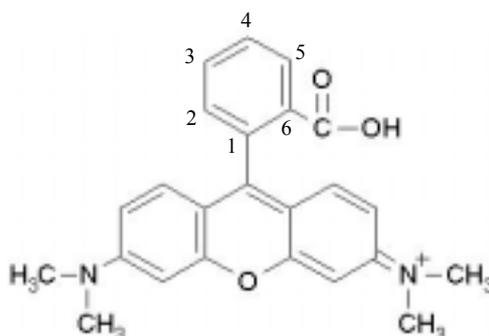


Figure 2.14: Molécule fluorescente 6-carboxytétraméthylrhodamine.

La fluorescence émise suite à une excitation est observée avec un scanner Affymetrix 418 Array (Figure 2.15). Ce scanner est spécifiquement conçu pour des échantillons de la forme standard des lames de verre (75 x 22 mm²). Un laser balayant la surface excite la rhodamine à la longueur d'onde de 532 nm. Le signal fluorescent émis en retour est collecté par un tube photomultiplicateur et converti en un niveau d'intensité (unités arbitraires). Une image en fausses couleurs codant les différentes intensités de fluorescence est obtenue. Les données sont ensuite analysées avec le logiciel ScanAlyse [47]. Par convention, la couleur noire correspond à une absence de signal, et le blanc à un signal maximal. La résolution spatiale du scanner est de 10 μm /pixel et la sensibilité pendant le balayage est inférieure à une molécule fluorescente par micron.

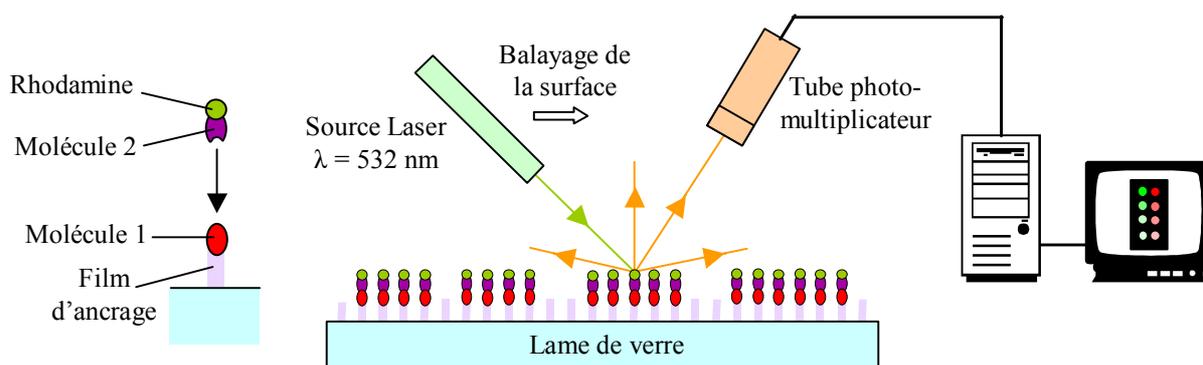


Figure 2.15: Principe du scanner à fluorescence.

Aux chapitres 4 et 5, avant de chercher à détecter une interaction entre deux molécules biologiques via la modification d'un signal électronique, des expériences préliminaires de validation de la reconnaissance spécifique sur un support solide seront effectuées. Celles-ci permettent de qualifier la reconnaissance entre les molécules 1 et 2, la molécule 2 étant la molécule marquée (Figure 2.15). Les mesures en fluorescence ont été réalisées à l'Institut Pasteur de Lille sur des lames de verre par Christophe Olivier, chercheur de la société *Sedac Therapeutics*, et Rémi Desmet, technicien biochimiste à l'Institut de Biologie de Lille.

Plusieurs informations sont relevées lors d'une observation en fluorescence. Tout d'abord, la localisation des molécules biologiques sur la lame de verre est observée ; si la reconnaissance biomoléculaire s'est réalisée correctement, les marqueurs se sont concentrés sur les molécules-sondes, c'est-à-dire sur les spots. Puis, si les conditions de dépôt des molécules biologiques sur l'ensemble de la lame ou d'une lame à une autre ne sont pas uniformes, des comparaisons entre les intensités de fluorescence obtenues permettent d'évaluer les facteurs favorables ou défavorables à la réalisation de la reconnaissance. Dans notre cas, le paramètre variable sera la concentration des biomolécules dans le solvant pendant le dépôt. Nous chercherons à minimiser le bruit de fond sur les images en fluorescence et à obtenir un bon rapport signal/bruit. Le signal désigne la fluorescence captée en provenance des spots et le bruit de fond est défini comme le signal de fluorescence entre les spots. Le signal est en principe dû à la fixation des molécules sur les sondes, tandis que le bruit correspond à l'adsorption physique d'une partie des molécules sur l'échantillon. Idéalement, le fond apparaît noir en fluorescence et les spots sont blancs (toutes les molécules sont concentrées sur les spots).

2.3.3 Microscopie à force atomique

a) La microscopie à sonde locale

Le microscope à force atomique (*Atomic Force Microscopy, AFM*) fait partie de la famille extrêmement riche des *microscopes à sonde locale* [48]. Ces instruments permettent d'étudier localement, c'est-à-dire avec une résolution de l'ordre de quelques nanomètres, voire parfois avec la résolution atomique, les propriétés de surface des matériaux. D'une manière générale, les microscopes à sonde locale sont des outils d'observation à l'échelle du nanomètre, mais ils peuvent aussi être employés pour déplacer des objets nanométriques (atomes, molécules, nanoparticules) [49, 50] ou construire des nanostructures sur la surface [51-55].

Le principe général d'un microscope à sonde locale est fondé sur le déplacement d'une sonde très fine au-dessus de la surface à analyser (Figure 2.16) [20]. Son fonctionnement consiste à former une image de la surface à partir de la mesure des interactions qui s'établissent entre la sonde et le substrat. En effet, lorsque la distance sonde-surface est inférieure à quelques dizaines de nanomètres, des interactions à courte et à longue portées apparaissent entre la sonde et la surface. Le mouvement de la sonde est modifié, en particulier son mouvement de vibration dans le cas du microscope à force atomique en mode oscillant (Figure 2.16). La distance moyenne entre la sonde et le substrat peut varier du contact permanent (cas de l'AFM en mode contact) à quelques angströms (cas du microscope à effet tunnel) ou à plusieurs nanomètres (cas de l'AFM en mode oscillant). Dans tous les cas, la sonde est placée dans le gradient de force dû à la présence de l'échantillon, ce qui explique le nom de *microscopie à champ proche* également donné à ce type d'imagerie.

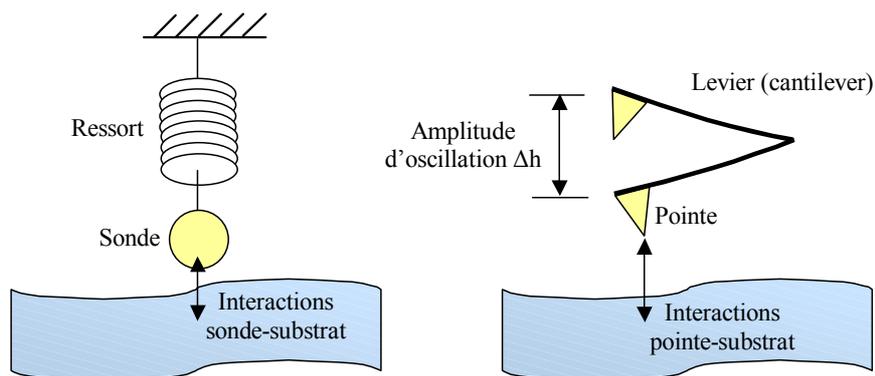


Figure 2.16: La pointe et le levier d'un microscope à force atomique sont analogues à une sonde attachée à un ressort. Le ressort vibre et déplace la sonde près de la surface. Lorsque la distance sonde-substrat est inférieure à quelques dizaines de nanomètres, la sonde devient sensible aux forces d'attraction et de répulsion de la surface, ce qui influe sur son mouvement oscillant. Les microscopes à sonde locale sont conçus pour enregistrer les modifications du mouvement de la sonde lorsqu'elle est placée dans le gradient de force près de la surface [20].

Le principe de fonctionnement d'un microscope à sonde locale est représenté à la figure 2.17. L'ordinateur pilote le déplacement de l'échantillon ligne par ligne sous la pointe par l'intermédiaire des actionneurs piézo-électriques X et Y. La pointe balaye donc l'échantillon et capte à tout instant un signal d'interaction entre la pointe et la surface. Ce signal est amplifié et comparé à la valeur de consigne choisie par l'opérateur. La différence entre les deux valeurs, appelée signal d'erreur, est appliquée sur l'actionneur Z afin de ramener le signal d'interaction à la valeur de consigne. La tension appliquée sur Z est enregistrée et le triplet de coordonnées {X;Y;Z} associées aux trois tubes piézo-électriques donne lieu à une image tridimensionnelle de l'échantillon. Les variations de hauteur sont traduites en une échelle de couleur, les couleurs claires représentant les objets élevés et les zones basses apparaissant en couleurs sombres. *Le principe général des microscopes à sonde locale est donc d'ajuster en permanence, via une électronique construite en une boucle de rétroaction, la distance pointe-surface afin de minimiser le signal d'erreur et de maintenir à tout instant le signal d'interaction à la valeur de consigne.* L'observateur a donc concrètement accès aux variations verticales de la surface sous la pointe imposées par la topographie ou les propriétés de surface de l'échantillon.

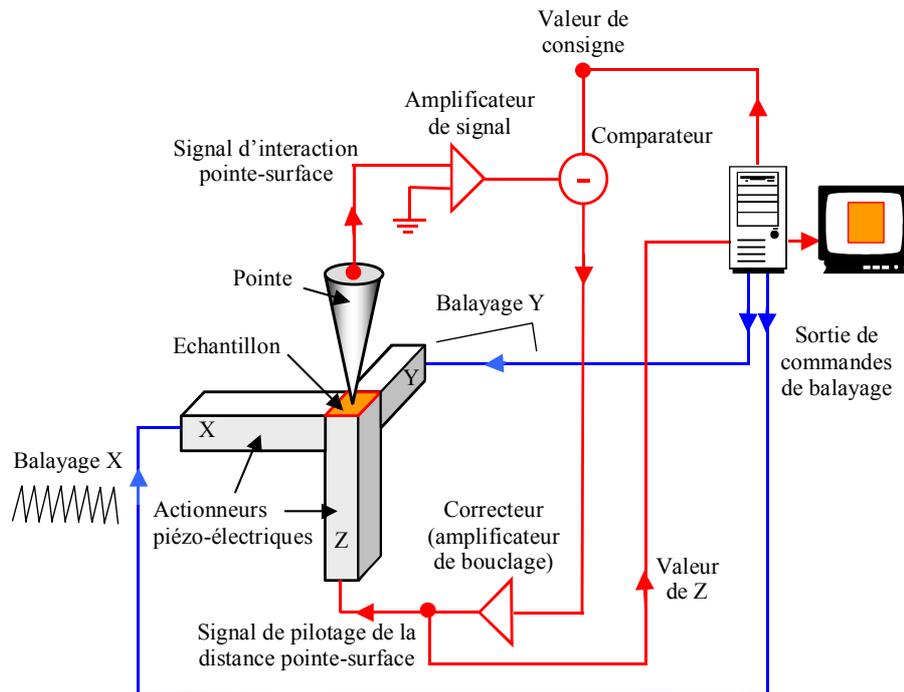


Figure 2.17: Schéma de principe d'un microscope à sonde locale (adapté de [18] et [55]).

Un grand nombre d'interactions peuvent exister entre la pointe et la surface [20]. Lorsque la pointe s'approche de la surface, elle ressent tout d'abord les forces à longue portée de nature attractive. Puis lorsque la distance pointe-substrat devient inférieure à quelques

angströms, les forces répulsives prédominent [38]. Les interactions pointe-surface se classent en deux catégories [18] :

Forces à longue portée (distance supérieure à 10 nm) :

- forces d'origine électromagnétique, en particulier les forces attractives de Van der Waals
- forces capillaires, dues à la présence d'un film d'eau sur la surface de l'échantillon, qui tendent à retenir la pointe lorsqu'elle s'éloigne de la surface

Forces à courte portée (distance inférieure à 10 nm) :

- forces répulsives d'origine quantique : la pointe ne peut pas pénétrer dans l'échantillon, d'après le principe d'exclusion de Pauli (force répulsive entre électrons)
- formation de liaisons chimiques entre la pointe et la surface lors du contact, notamment des liaisons hydrogène attractives
- forces d'adhésion s'établissant entre la surface et l'extrémité de la pointe lors du contact (adhérence due à une réduction des énergies de surface)
- force latérale de friction qui tend à tordre la pointe
- déformations élastique et plastique de l'échantillon et/ou de la pointe, suite aux fortes interactions qui peuvent s'établir à courte portée.

Toutes ces forces contribuent au signal d'interaction pointe-surface. A grande distance, la force principale est généralement l'interaction de Van der Waals, et c'est principalement sur cette force que s'appuie le microscope à force atomique lorsqu'il est utilisé en mode oscillant [56]. Cependant, plusieurs types de microscopes ont été développés qui exploitent la variété d'interactions possibles entre la pointe et la surface [48]. Le microscope à effet tunnel (*Scanning Tunneling Microscope, STM*), qui est historiquement le précurseur de tous les microscopes à champ proche, mesure le courant tunnel circulant entre la pointe et une surface conductrice [57]. Les domaines électrostatiques et magnétiques de la surface peuvent être visualisés grâce à l'emploi d'une pointe conductrice (*Electrostatic Force Microscopy, EFM* ou *Conducting-AFM, C-AFM*) [58] ou d'une pointe magnétique (*Magnetic Force Microscopy, MFM*) [59] respectivement. Le MFM est par exemple utilisé pour détecter les bits d'information enregistrés dans les média magnétiques, tandis que le C-AFM permet d'étudier la conductivité d'objets déposés sur une surface isolante [38].

Pour se faire une idée de la gamme des interactions possibles, citons encore le *Scanning Thermal Microscopy (SThM)* basé sur la conduction de la chaleur sans contact entre la pointe et l'échantillon via l'air [60] ; les propriétés optiques de la surface sont analysées par le *Scanning Near-field Optical Microscopy (SNOM)* [61] ; le *Lateral Force Microscopy*

(*LFM*) enregistre les caractéristiques de friction de la surface [62], celles-ci pouvant être dues à la formation de liaisons chimiques pendant le balayage entre le substrat et une pointe fonctionnalisée avec une espèce chimique (*Chemical Force Microscopy, CFM*) [63]. Il est également possible d’imaginer une sonde affranchie du dispositif mécanique macroscopique sur lequel elle repose habituellement : le *Photonic Force Microscopy (PFM)* consiste ainsi en une bille de diamètre sub-micrométrique piégée dans un champ de force électromagnétique (*optical tweezers*) venant « frapper » régulièrement la surface ; l’observation des mouvements verticaux permet de former une image tridimensionnelle de la membrane de cellules biologiques en milieu aqueux [64].

b) Le microscope à force atomique (AFM) en mode tapping

Le microscope à force atomique est constitué d’une pointe montée sur un microlevier appelé *cantilever* (Figure 2.18). Un actionneur piézo-électrique excite le cantilever pour l’animer d’un mouvement oscillant dans la direction verticale. Le levier peut donc être comparé à un ressort dont les caractéristiques mécaniques principales sont sa masse m et sa constante de raideur k (Figure 2.16) [65]. Les systèmes pointe-levier utilisés pour nos études possèdent une masse d’une dizaine de picogrammes et une constante de force de 50 N.m^{-1} environ [66]. La fréquence d’excitation du système pointe-cantilever est généralement autour de 300 kHz, c’est-à-dire à proximité de la fréquence de résonance du cantilever afin de bénéficier d’un mouvement d’oscillation très sensible aux forces extérieures (facteur de qualité $Q \sim 400$ dans l’air).

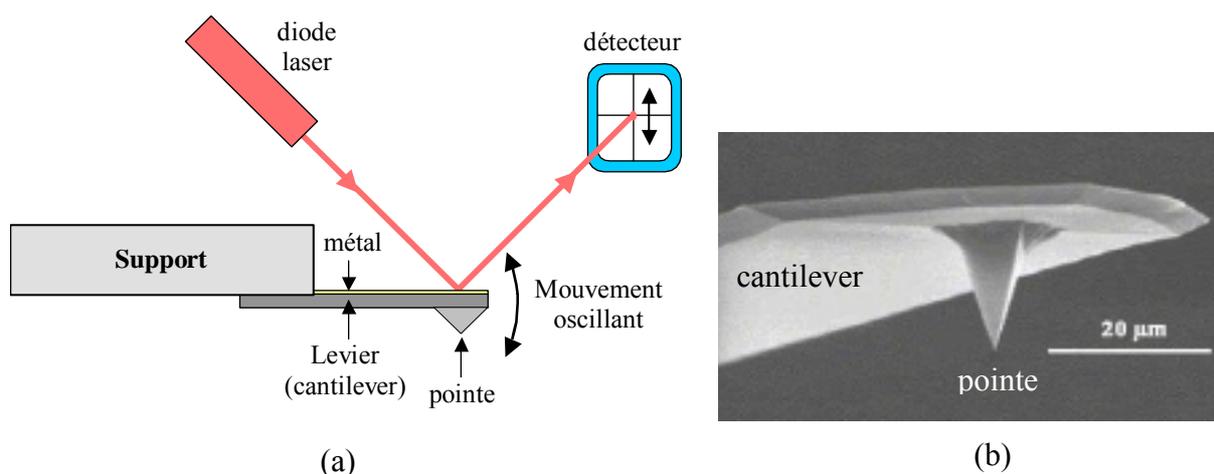


Figure 2.18: Pointe AFM utilisée en mode tapping. a) Schéma de l’ensemble support-pointe et de la technique de détection du mouvement oscillant. b) Observation de la pointe par microscopie électronique à balayage.

Puisque la résolution du microscope dépend du rayon de courbure de l'extrémité de la pointe, on choisira des pointes extrêmement fines, avec un rayon de courbure de l'ordre de 10 nm. La pointe et le cantilever sont fabriqués en silicium monocristallin grâce aux techniques de gravure chimique anisotrope [67]. La face supérieure du cantilever est parfois recouverte d'une fine couche de métal afin de la rendre réfléchissante. En effet, pour détecter les mouvements d'oscillation de la pointe, un faisceau laser est focalisé sur l'extrémité du levier et est ensuite recueilli par une photodiode à quatre cadrans. La déflexion du cantilever, et donc la position de la pointe, est connue à tout instant par le déplacement du spot sur le photodétecteur.

En début d'expérience, la pointe est placée plusieurs micromètres au-dessus de la surface afin de rechercher sa fréquence de résonance d'une part, et de fixer son amplitude d'oscillation d'autre part (Figure 2.19-a). Il n'y a à cette distance aucune interaction pointe-surface et donc l'amplitude d'oscillation est due à un équilibre entre l'excitation mécanique du cantilever par l'actionneur piézo-électrique et la force de rappel du ressort $F_{\text{cantilever}} = -k \cdot \Delta h/2$. On parle alors d'*amplitude libre d'oscillation* et cette amplitude nous sert ensuite à établir la valeur de consigne, sur le modèle présenté à la figure 2.17. La valeur de consigne vaut généralement entre 50 et 90 % de l'amplitude libre d'oscillation.

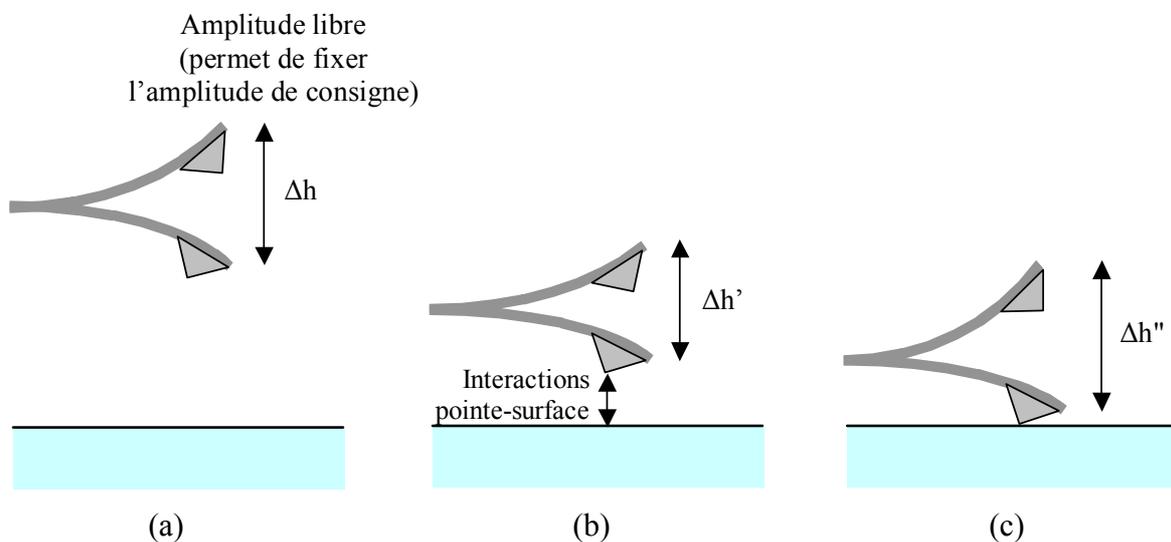


Figure 2.19: Utilisation du microscope à force atomique en mode oscillant. a) Oscillation libre du cantilever loin de la surface. b) Etude d'une surface avec un AFM en mode non-contact. c) Etude d'une surface avec un AFM en mode tapping.

Lorsque la pointe est abaissée et commence à ressentir les interactions de Van der Waals, la fréquence de résonance du cantilever tend à diminuer, ainsi que l'amplitude d'oscillation $\Delta h'$ (Figure 2.19-b). L'AFM est ici utilisé en *mode non-contact*, c'est-à-dire que

la pointe ne vient jamais toucher la surface au cours de l'observation. La pointe oscille simplement dans le gradient de force dû à la surface, à distance suffisante pour que les forces capillaires ne puissent jamais intervenir. En effet, la pointe ne doit pas atteindre la couche d'eau adsorbée sur la surface car le fluide risquerait de « retenir » la pointe lors de son mouvement d'ascension et ainsi de modifier fortement la qualité de l'image obtenue. L'amplitude d'oscillation choisie pour ce type d'imagerie est habituellement de quelques nanomètres (< 10 nm). Il est possible d'obtenir une image de la surface avec ce mode, cependant la résolution est souvent insatisfaisante en raison de la distance relativement grande séparant la pointe et le substrat. Son principe consiste à corriger en permanence l'amplitude d'oscillation jusqu'à sa valeur de consigne grâce à la boucle de rétroaction qui, pour chaque couple de coordonnées X et Y, déplace verticalement l'échantillon jusqu'à ce que l'amplitude d'oscillation $\Delta h'$ corresponde au signal de consigne. L'amplitude d'oscillation est maintenue constante pendant toute la durée du balayage, et les interventions sur la hauteur de l'échantillon permettent de former une image topographique de la surface. La vitesse de balayage de la surface doit être relativement faible puisqu'il faut éviter à tout instant que la pointe entre en contact avec le film d'eau. C'est pourquoi les applications de l'AFM en mode non-contact se sont révélées plutôt limitées.

Si le signal de consigne est tel que la pointe soit amenée à toucher la surface lors de son mouvement descendant, l'AFM fonctionne en *mode tapping* (Figure 2.19-c). C'est ce mode que nous avons utilisé pendant nos expériences. L'amplitude d'oscillation est typiquement comprise entre 20 et 100 nm. Par conséquent, pendant son mouvement de haut en bas, le nombre d'interactions entre la pointe et la surface augmente. En position haute, la pointe est dégagée de la surface et ne subit aucune interaction, tandis qu'au contact, toutes les forces interviennent. La somme des forces est d'abord attractive pendant son mouvement descendant, jusqu'à une distance pointe-surface d'environ quelques angströms où les forces à courte portée deviennent soudainement très répulsives [38]. L'amplitude typique de l'oscillation est suffisamment grande pour que, lors de son mouvement de remontée, la pointe puisse se libérer de la couche d'eau adsorbée sans rester collée à la surface.

Avec ce mode, la pointe vient donc « taper » légèrement la surface pendant le balayage. Lors du premier contact, l'amplitude d'oscillation $\Delta h''$ est inférieure à la valeur de consigne et, ici encore, le système d'asservissement agit sur la hauteur de l'échantillon afin de corriger $\Delta h''$ jusqu'à la valeur demandée. L'image de la surface est à nouveau construite à partir des déplacements verticaux de l'échantillon. Il est à noter qu'en conservant l'amplitude d'oscillation du système pointe-cantilever constante pendant le balayage, les interactions formées entre la pointe et l'échantillon sont également maintenues constantes. La résolution des images fournies en mode tapping est usuellement meilleure que celle obtenue en mode non-contact. Remarquons qu'en Tapping-AFM, les échantillons fragiles (échantillons

biologiques, polymères, films organiques) ne sont pas endommagés par la pointe car les forces exercées par la pointe sur la surface demeurent faibles, de l'ordre du piconewton [17].

c) Autres techniques d'imagerie en mode tapping

Une technique complémentaire à l'AFM en mode tapping, très courante pour observer des différences dans les propriétés viscoélastiques et/ou d'adhésion à la surface des matériaux, est l'*imagerie en phase*. Celle-ci est réalisée en même temps que la mesure de l'amplitude d'oscillation. Elle consiste à comparer le signal alternatif d'excitation exercé par l'actionneur piézo-électrique sur le cantilever et la réponse du cantilever à cette excitation (Figure 2.20). Parallèlement à l'image construite à partir de la conservation de l'amplitude d'oscillation, le déphasage permet de créer une seconde image de la surface, et parfois le contraste observé sur l'image en phase est meilleur que celui obtenu sur l'image topographique. En particulier, l'imagerie en phase tend à souligner les bords des objets et à bien séparer les matériaux de nature différente.

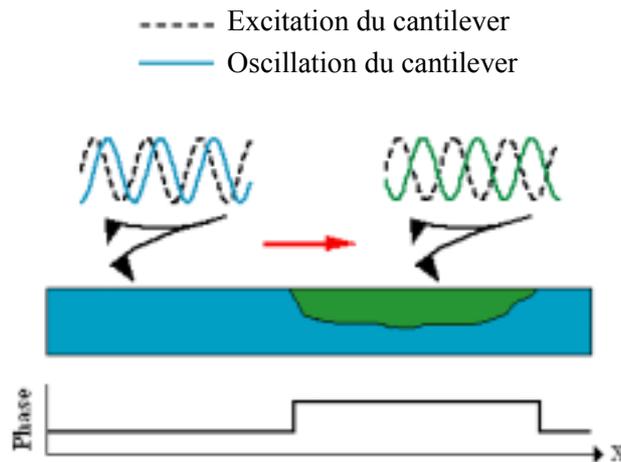


Figure 2.20: Détection de la phase d'oscillation du cantilever (adapté d'un schéma présenté sur le site de la société Digital Instruments : <http://www.di.com>).

De même, une *image en amplitude* (aussi appelée *image dérivée*) de la surface peut être produite pendant l'acquisition de l'image topographique. L'imagerie en mode amplitude est basée sur le caractère imparfait de la correction, par la boucle de rétroaction, de l'amplitude de vibration. Lors du balayage de la surface par la pointe, l'amplitude de vibration est rétablie à tout instant par le déplacement en hauteur de l'échantillon. Cependant, dans les faits, une légère différence peut subsister entre l'amplitude de consigne et l'amplitude réelle après la correction, et des images peuvent être créées à partir de ces très faibles variations.

Il est important de noter que l'interprétation des images obtenues en AFM est parfois délicate, car de nombreux artefacts peuvent intervenir pendant la prise de mesure. La convolution de la pointe et de la surface est un phénomène fréquent qui apparaît lorsque les objets visualisés sur la surface possèdent des dimensions plus petites que l'extrémité de la pointe (Figure 2.21). L'image de ces objets est alors dominée par la forme de la pointe, qui tend à « arrondir » leurs contours. Ce phénomène rappelle la nécessité d'utiliser des pointes possédant un très faible rayon de courbure afin de pouvoir imager avec la meilleure résolution possible. De plus, l'image peut apparaître distordue si des débris de la surface se sont accrochés au bout de la pointe pendant le balayage. Les dimensions de la pointe peuvent également gêner l'accès aux cavités dans la surface, et l'AFM se révèle insuffisant lorsque l'on désire imager les bords latéraux de structures verticales (Figure 2.21) [68]. D'autre part, le déplacement des actionneurs piézo-électriques peut être non-linéaire et présenter des effets d'hystérésis. Enfin, le microscope est très sensible aux variations de température, ainsi qu'aux vibrations mécaniques et acoustiques. Ces artefacts sont en partie minimisés en plaçant l'ensemble du dispositif sur un montage anti-vibrations dans un endroit clos.

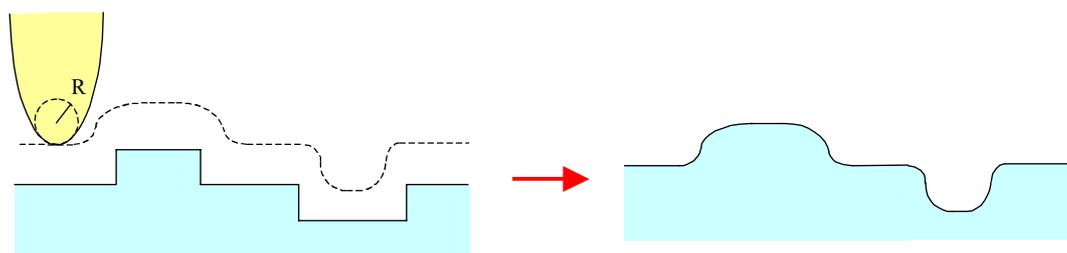


Figure 2.21: Influence de la forme de la pointe sur le contour des objets observés.

Deux types d'AFM sont utilisés pour notre étude, tous deux provenant de la société *Digital Instruments*. Le premier, plus adapté pour observer de petits échantillons (jusqu'à $1 \times 1 \text{ cm}^2$), est un *Nanoscope IIIa* opéré à l'Institut d'Electronique et de Microélectronique du Nord. D'autres observations ont été réalisées au Laboratoire de Structure et Propriétés de l'Etat Solide (LSPES), avec l'aide de Vincent Ferreiro, chercheur à l'Université Lille 1. Le microscope utilisé est un *AFM Dimension 3100*, qui possède un plateau porte-échantillon plus large, relié à un contrôleur *Nanoscope IIIa*.

2.3.4 Caractérisation électrique

Nous cherchons dans cette étude à détecter la réalisation d'une interaction spécifique entre deux molécules biologiques grâce à des méthodes de caractérisation électrique. Les

mesures électriques réalisées sont des caractéristiques courant-tension sur la gamme [-0,1 V ; +0,1 V]. L'information obtenue correspond au niveau de conductivité DC du système étudié.

D'après le schéma de principe présenté à la figure 1.19 du chapitre 1, les mesures électriques sont réalisées en 3 étapes. Tout d'abord (Figure 1.19-a), les électrodes sont testées après leur fabrication afin de trier celles qui sont court-circuitées dès le départ et les électrodes qui sont potentiellement intéressantes. En effet, puisqu'on s'attend à ce que les films organiques formés à partir du greffage des molécules biologiques sur la surface soient relativement peu conducteurs [16, 18, 38], et ceci sur une distance raisonnable, la sensibilité du système devrait être augmentée si la séparation entre les électrodes est faible. Lors de la fabrication des électrodes, le gap recherché est typiquement inférieur à 100 nm. Or les techniques de fabrication disponibles pour réaliser des structures à ces dimensions sont peu nombreuses et présentent des défauts de contrôle et donc de reproductibilité. Ceci introduit l'idée d'un certain rendement de structures correctement construites sur un échantillon. Un test est donc réalisé sur chaque électrode avant de fixer les molécules-sondes dans le gap (Figure 1.19-b), afin de repérer les électrodes court-circuitées à la fabrication.

Toutefois, il faut noter qu'un autre défaut de fabrication peut subsister parmi les électrodes sélectionnées, qui n'apparaît pas avec ces mesures de contrôle. En effet, les électrodes qui présentent une coupure le long de leur piste électrique ne peuvent pas être distinguées des électrodes opérationnelles car, dans les deux cas, les électrodes sont caractérisées par un courant nul. Les électrodes rompues sont repérées et écartées lors de la deuxième étape de mesure, qui correspond au greffage du film d'ancrage dans le gap inter-électrodes et à la fixation des molécules-sondes. Si, pour quelques électrodes, le courant obtenu à cette étape ne présente absolument aucun changement par rapport aux mesures enregistrées lors de la première étape, nous en déduisons que ces électrodes doivent être coupées et qu'elles fonctionnent alors en circuit ouvert. Par précaution, des mesures I-V sont à nouveau réalisées pendant la troisième série de mesures (voir figure 1.19-c) avant d'écartier définitivement ces électrodes ⁴.

La deuxième étape de mesure est effectuée lorsque les molécules-sondes ont été immobilisées sur la surface (Figure 1.19-b). La présence des molécules-sondes, en modifiant les propriétés de surface dans l'espace inter-électrodes, devrait idéalement fournir de

⁴ Une autre possibilité correspond au cas où, pendant la deuxième étape, le greffage du film d'ancrage et des molécules-sondes dans l'espace inter-électrodes n'a pas bien fonctionné. La surface entre les électrodes demeurant vierge, le courant mesuré reste donc nul. Cependant, il est possible de vérifier cette hypothèse en observant l'ensemble des résultats obtenus sur un même échantillon : puisqu'un échantillon comporte un grand nombre d'électrodes et que les conditions de greffage sont identiques sur l'ensemble de l'échantillon, si certaines électrodes se comportent « de manière attendue », c'est-à-dire en présentant une conductivité plus élevée, nous supposons que les molécules-sondes se sont fixées correctement sur l'ensemble de l'échantillon, et que si pour quelques électrodes le courant mesuré reste nul, c'est la continuité électrique de ces électrodes qui est en cause.

nouvelles caractéristiques courant-tension. Puis une troisième caractérisation électrique est réalisée quand les molécules biologiques complémentaires de l'interaction sont déposées sur l'échantillon (Figure 1.19-c). Ces molécules sont marquées avec un colloïde d'or. Le but est d'obtenir un signal électrique qui indiquerait clairement la réalisation de l'interaction, avec dans le meilleur des cas un court-circuit entre les nanoélectrodes.

Les échantillons étudiés sont constitués d'électrodes construites sur une couche isolante d'oxyde de silicium (SiO_2) reposant sur un substrat épais de silicium. On considère généralement en micro-électronique que, pour les tensions appliquées communément, des épaisseurs de SiO_2 supérieures à 35 Å sont suffisantes pour obtenir l'isolation électrique [16]. Par exemple, les oxydes de grille utilisés actuellement dans les transistors CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor) possèdent des épaisseurs de 20 Å et supportent des tensions de l'ordre du volt [69].

Dans notre cas, les tensions appliquées sur les électrodes n'excéderont pas 0,1 V, ce qui correspond à des champs électriques inférieurs à $2,5 \text{ MV.m}^{-1}$ dans l'espace inter-électrodes, compte tenu de la dimension des gaps. Un tel champ électrique ne devrait pas remettre en cause l'intégrité des molécules déposées sur la surface. Pour comparaison, des expériences de claquage de films auto-assemblés sur différents substrats ont été décrites dans la littérature [18, 70] : pour des monocouches formées avec des alkyltrichlorosilanes ou des alkylthiols, les champs électriques de claquage sont compris entre 400 et 530 MV.m^{-1} , suivant la longueur de la chaîne alkyle.

Les mesures des caractéristiques courant-tension sont effectuées avec un pico-ampèremètre *Hewlett-Packard* 4140B, relié à un banc de mesure sous pointes. Le générateur de tension et l'ampèremètre sont intégrés ensemble dans le HP4140B. Le plus petit pas disponible en tension est de 10 mV et la résolution maximale de l'ampèremètre est de 10^{-15} A. Le montage expérimental est représenté à la figure 2.22-a : la tension de polarisation est appliquée sur une des électrodes, l'autre électrode étant reliée à la masse du pico-ampèremètre. Sur chaque électrode, au moins deux cycles de mesures sont réalisés, allant de $-0,1 \text{ V}$ à $+0,1 \text{ V}$, puis de $+0,1 \text{ V}$ à $-0,1 \text{ V}$, avec un temps de relaxation d'une dizaine de secondes entre chaque série de mesures.

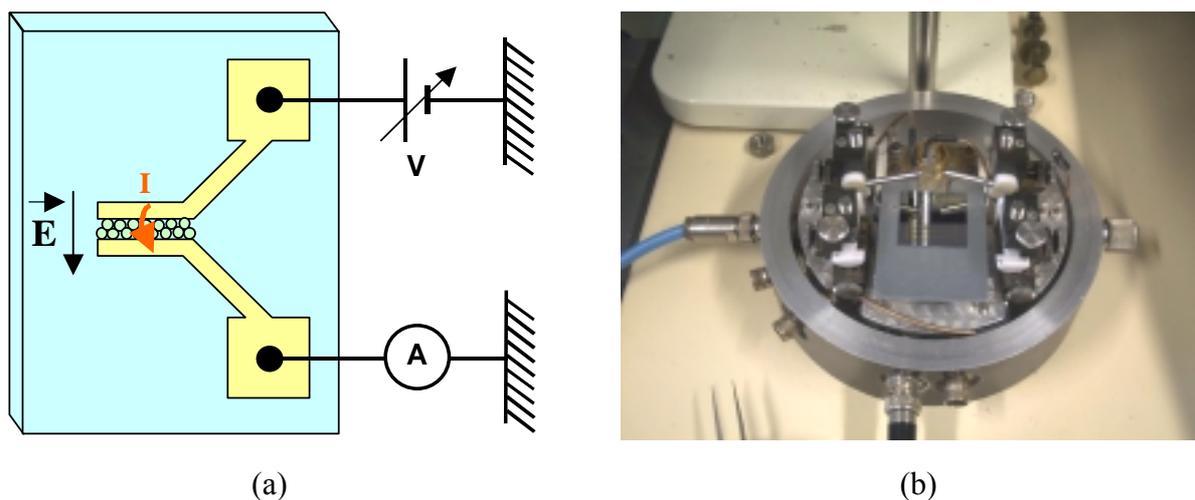


Figure 2.22: Principe de la mesure des caractéristiques courant-tension. a) La tension est appliquée sur une des électrodes, l'autre électrode étant reliée à la masse de l'appareil de mesure. Le courant qui passe à travers le film moléculaire greffé entre les électrodes est mesuré par le pico-ampèremètre. b) Photographie d'un échantillon installé dans le cryostat (couvercle ouvert). Les câbles bleu et noir sont reliés aux micropointes déposées sur deux électrodes.

Des micropointes placées dans un cryostat permettent de réaliser les contacts électriques avec les électrodes sur l'échantillon (Figure 2.22-b). Le cryostat n'est pas utilisé pour sa faculté à baisser la température de l'échantillon, mais pour sa capacité à produire un vide relatif. En effet, avant de réaliser les mesures électriques, l'air dans le cryostat est pompé pendant une quinzaine de minutes jusqu'à ce que la pression de la chambre soit de 0,2 mbar environ. L'objectif est de contrôler l'atmosphère et créer un vide relatif dans le cryostat afin de retirer le film d'eau qui, adsorbé sur l'échantillon, pourrait perturber les mesures électriques. Nous savons cependant qu'il est très difficile d'enlever cette couche d'eau car une fine épaisseur demeure toujours malgré un pompage prolongé. La seule méthode pour la retirer définitivement est d'étuver l'échantillon à plus de 100°C en ultra-vide. Cette technique ne peut bien sûr pas être appliquée au cas de molécules biologiques qui seraient détruites avec un tel traitement. Nous avons constaté qu'après un pompage d'une dizaine de minutes, *les mesures électriques deviennent stables et reproductibles*. On en déduit que ce temps de pompage correspond à la séparation de tout le film d'eau retirable avec cette technique. La fine pellicule d'eau qui subsiste ensuite est très résistante au retrait. De façon très vraisemblable, cette couche d'eau jouera un rôle dans le courant mesuré. De plus, les molécules biologiques, naturellement recouvertes par une couche d'hydratation, devraient amener elles-mêmes de l'eau sur la surface.

Bibliographie

- [1] R.F. Gould (Ed.), *Chemical reactions in electric discharges*, Advances in Chemistry Series No. 80, **American Chemical Society Publications** (1969).
- [2] J.R. Hollahan et A.T. Bell (Ed.), *Techniques and applications of plasma chemistry*, **Wiley Interscience** (1974).
- [3] J.-J. Bessot, *Surfaces*, **124-128**, 3-24 (1976).
Les nouvelles techniques de dépôts sous vide – Evolution et tendance
- [4] M. Köhler, *Etching in microsystem technology*, **Wiley-VCH** (1999).
- [5] R.E. Williams, *Gallium arsenide processing techniques*, **Artech House** (1984).
- [6] J.-J. Bessot, *Thin Solid Films*, **32**, 19 (1976).
Developments and trends in sputtering deposition techniques
- [7] B.E. Deal et S.S. Grove, *J. Appl. Phys.*, **36**, 3770 (1965).
General relationship for the thermal oxidation of Si
- [8] C. Ho Choi, D.-J. Liu, J.W. Evans et M.S. Gordon, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8730 (2002).
Passive and active oxidation of Si(100) by atomic oxygen : a theoretical study of possible reaction mechanisms
- [9] K. Maex, in *Properties of crystalline silicon* (Editeur : R. Hull), **INSPEC**, pp. 851-862 (1999).
Recent advances in silicide technologies
- [10] L. Miglio et F. d'Heurle (Ed.), *Silicides : Fundamentals and Applications*, **World Scientific** (2000).
- [11] G. Larrieu et E. Dubois, à paraître (2003).
- [12] M. Madou, *Fundamentals of microfabrication*, **CRC** (1997).
- [13] Logiciel Wavemaker édité par la société Barnard Microsystems.
<http://www.barnardmicrosystems.com/>
- [14] Logiciel Cadence édité par la société Cadence.
<http://www.cadence.com/>
- [15] A. Ulman, *An introduction to ultrathin organic films, from Langmuir-Blodgett to self-assembly*, **Academic Press** (1991).
- [16] J. Collet, *Thèse*, Université de Lille 1 (1997).
Monocouches organiques fonctionnalisées. Propriétés structurales et électriques ; composants électroniques à l'échelle du nanomètre
- [17] L. Breuil, *Thèse*, Université de Lille 1 (2000).
Formation de nano-domaines dans les monocouches mixtes d'alkylsilanes sur silicium
- [18] S. Lenfant, *Thèse*, Université de Lille 1 (2001).
Monocouches organiques auto-assemblées pour la réalisation de diodes moléculaires
- [19] J.V. Davidovits, V. Pho, P. Silberzan et M. Goldmann, *Surface Science*, **352-354**, 369 (1996).
Temperature influence on the formation of silanized monolayers on silica : an atomic force microscopy study
- [20] J.V. Davidovits, *Thèse*, Université Paris 6 (1998).
Détermination des conditions d'obtention de films monomoléculaires organisés : application aux silanes auto-assemblés sur silice
- [21] B. Zhao, N.O.L. Viernes, J.S. Moore et D.J. Beebe, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5284 (2002).
Control and applications of immiscible liquids in microchannels
- [22] B. Mann et H. Kuhn, *J. Appl. Phys.*, **42**, 4398 (1971).
Tunneling through fatty acid salt monolayers
- [23] Y.C. Chang et C.W. Frank, *Langmuir*, **14**, 326 (1998).
Vapor deposition-polymerization of α -amino acid N-carboxy anhydride on the silicon (100) native oxide surface

- [24] M.M.A. Sekar, P.D. Hampton, T. Buranda et G.P. López, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5135 (1999).
Multifunctional monolayer assemblies for reversible direct fluorescence transduction of protein-ligand interactions at surfaces
- [25] N. Zammateo, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi et J. Remacle, *Anal. Biochem.*, **280**, 143 (2000).
Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays
- [26] R. Maoz, J. Sagiv, D. Degenhardt, H. Möhwald et P. Quint, *Supramolecular Science*, **2**, 9 (1995).
Hydrogen-bonded multilayers of self-assembling silanes : structure elucidation by combined Fourier transform infra-red spectroscopy and X-ray scattering techniques
- [27] J.-B. Brzoska, I. Ben Azouz et F. Rondelez, *Langmuir*, **10**, 4367 (1994).
Silanization of solid substrates: a step toward reproducibility
- [28] D.F. Siqueira Petri, G. Wenz, P. Schunk et T. Schimmel, *Langmuir*, **15**, 4520 (1999).
An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO₂ and the vapor deposition of gold layers
- [29] Bernard Martel, *Thèse*, Université de Lille 1 (2000).
Textiles et matériaux polymères porteurs de cyclodextrines : nouvelles voies d'obtention et applications
- [30] J.D. Cox, M.S. Curry, S.K. Skirboll, P.L. Gourley et D.Y. Sasaki, *Biomaterials*, **23**, 929 (2002).
Surface passivation of a microfluidic device to glial cell adhesion : a comparison of hydrophobic and hydrophilic SAM coatings
- [31] K.C. Vrancken, P. Van Der Voort, I. Gillis-D'Hamers, E.F. Vansant et P. Grobet, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **88**, 3197 (1992).
Influence of water in the reaction of γ -aminopropyltriethoxysilane with silica gel
- [32] E.T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing et I. Lundström, *J. Colloid Interface Sci.*, **147**, 103 (1991).
Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon oxide
- [33] K.C. Vrancken, K. Possemiers, P. Van der Voort et E.F. Vansant, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **98**, 235 (1995).
Surface modification of silica gels with aminoorganosilanes
- [34] P.R. Moses, L.M. Wier, J.C. Lennox, H.O. Finklea, J.R. Lenhard et R.W. Murray, *Anal. Chem.*, **50**, 576 (1978).
X-ray photoelectron spectroscopy of alkylamine-silanes bound to metal oxide electrodes
- [35] M. Beier et J. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1970 (1999).
Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips
- [36] W. Laureyn, D. Nelis, P. Van Gerwen, K. Baert, L. Hermans, R. Magnée, J.-J. Pireaux et G. Maes, *Sens. Actuators B*, **68**, 360 (2000).
Nanoscaled interdigitated titanium electrodes for impedimetric biosensing
- [37] D.K. Schwarz, S. Steinberg, J. Israelachvili et J.A.N. Zasadzinski, *Phys. Rev. Lett.*, **69**, 3354 (1992).
Growth of a self-assembled monolayer by fractal aggregation
- [38] T. Heim, *Thèse*, Université de Lille 1 (2002).
Transport électronique dans l'ADN
- [39] J.-B. Brzoska, *Thèse*, Université de Paris 6 (1993).
Effet des gradients thermiques sur le mouillage de surfaces modèles
- [40] R.F. Gould (Ed.), *Contact angle, wettability, and adhesion*, Advances in Chemistry Series No. 43, **American Chemical Society Publications** (1964).
- [41] S.R. Wasserman, Y.-T. Tao et G.M. Whitesides, *Langmuir*, **5**, 1074 (1989).
Structure and reactivity of alkylsiloxane monolayers formed by reaction of alkyltrichlorosilanes on silicon substrates
- [42] V.V. Tsukruk et V.N. Bliznyuk, *Langmuir*, **14**, 446 (1998).
Adhesive and friction forces between chemically modified silicon and silicon nitride surfaces

- [43] A. Heise, H. Menzel, H. Yim, M.D. Foster, R.H. Wieringa, A.J. Schouten, V. Erb et M. Stamm, *Langmuir*, **13**, 723 (1997).
Grafting of polypeptides on solid substrates by initiation of N-carboxyanhydride polymerization by amino-terminated self-assembled monolayers
- [44] C. Della Volpe, A. Penati, R. Peruzzi, S. Siboni, L. Toniolo et C. Colombo, *Journal of adhesion science and technology*, **14**, 273 (2000).
The combined effect of roughness and heterogeneity on contact angles: the case of polymer coating for stone protection
- [45] C.D. Bain et G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5897 (1988).
Depth sensitivity of wetting : monolayers of ω -mercapto ethers on gold
- [46] C. Olivier, D. Hot, L. Huot, N. Ollivier, O. El-Madhi, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, H. Gras-Masse, Y. Lemoine et O. Melnyk, à paraître dans *Bioconjugate Chem.* (2003).
 α -oxo semicarbazone peptide or oligodeoxynucleotide microarrays
- [47] Logiciel ScanAnalyse (logiciel libre) de l'Université Stanford.
<http://rana.lbl.gov/>
- [48] <http://www.nanoworld.org/spmglossary/glossary/A.html>
- [49] J.K. Strosio et D.M. Eigler, *Science*, **254**, 1319 (1991).
Atomic and molecular manipulation with the scanning tunneling microscope
- [50] T. Junno, S.-B. Carlsson, H. Xu, L. Montelius et L. Samuelson, *Appl. Phys. Lett.*, **72**, 548 (1998).
Fabrication of quantum devices by Ångström-level manipulation of nanoparticles with an atomic force microscope
- [51] M.A. McCord, D.P. Kern et T.H.P. Chang, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **6**, 1877 (1988).
Direct deposition of 10-nm metallic features with the scanning tunneling microscope
- [52] J.A. Dagata, J. Schneir, H.H. Harary, C.J. Evans, M.T. Postek et J. Bennet, *Appl. Phys. Lett.*, **56**, 2001 (1990).
Modification of hydrogen-passivated silicon by a scanning tunneling microscope operating in air
- [53] C. Syrykh, J.P. Nys, B. Legrand et D. Stiévenard, *J. Appl. Phys.*, **85**, 3887 (1999).
Nanoscale desorption of H-passivated Si(100)-2x1 surfaces using an ultrahigh vacuum scanning tunneling microscope
- [54] K. Wiesauer et G. Springholz, *J. Appl. Phys.*, **88**, 7289 (2000).
Fabrication of semiconductor nanostructures by nanoindentation of photoresist layers using atomic force microscopy
- [55] B. Legrand, *Thèse*, Université de Lille 1 (2000).
Elaboration et caractérisation physique par microscopies à champ proche de nanostructures semi-conductrices
- [56] G. Binnig, C.F. Quate et Ch. Gerber, *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930 (1986).
Atomic force microscope
- [57] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber et E. Weibel, *Phys. Rev. Lett.*, **49**, 57 (1982).
Surface studies by scanning tunneling microscopy
- [58] R.A. Said, G.E. Bridges et D.J. Thomson, *Appl. Phys. Lett.*, **64**, 1442 (1994).
Scanned electrostatic force microscope for noninvasive high frequency potential measurement
- [59] Y. Martin et H.K. Wickramasinghe, *Appl. Phys. Lett.*, **50**, 1455 (1987).
Magnetic imaging by "force microscopy" with 1000 Å resolution
- [60] C.C. Williams et H. K. Wickramasinghe, *Appl. Phys. Lett.*, **49**, 1587 (1986).
Scanning thermal profiler
- [61] D.W. Pohl, W. Denk et M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.*, **44**, 651 (1984).
Optical stethoscopy : image recording with resolution $\lambda/20$
- [62] C.M. Mate, G.M. McClelland, R. Erlandsson et S. Chiang, *Phys. Rev. Lett.*, **59**, 1942 (1987).
Atomic-scale friction of a tungsten tip on a graphite surface
- [63] C.D. Frisbie, L.F. Rozsnyai, A. Noy, M.S. Wrighton et C.M. Lieber, *Science*, 265, 2071 (1994).
Functional group imaging by chemical force microscopy

- [64] E.-L. Florin, A. Pralle, J.K.H. Hörber et E.H.K. Stelzer, *J. Stru. Bio.*, **119**, 202 (1997).
Photonic force microscopy based on optical tweezers and two-photon excitation for biological applications
- [65] D. Rugar et P. Hansma, *Physics Today*, **10**, 23 (1990).
Atomic force microscopy
- [66] Pointes fournies par la société Nanosensors.
<http://www.nanosensors.com>
- [67] T.R. Albrecht, S. Akamine, T.E. Carver et C.F. Quate, *J. Vac. Sci. Technol. A*, **8**, 3386 (1990).
Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope
- [68] E. Lebrasseur, J.-B. Pourciel, T. Bourouina, T. Masuzawa et H. Fujita, *J. Micromech. Microeng.*, **12**, 280 (2002).
A new characterization tool for vertical profile measurement of high-aspect-ratio microstructures
- [69] M.L. Green, E.P. Gusey, R. Degraeve et E.L. Garfunkel, *J. Appl. Phys.*, **90**, 2057 (2001).
Ultrathin (<4 nm) SiO₂ and Si-O-N gate dielectric layers for silicon microelectronics : Understanding the processing, structure, and physical and electrical limits
- [70] R.E. Holmlin, R. Haag, M.L. Chabinyc, R.F. Ismagilov, A.E. Cohen, A. Terfort, M.A. Rampi et G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5075 (2001).
Electron transport through thin organic films in metal-insulator-metal junctions based on self-assembled monolayers

Nous nous proposons de détecter une interaction entre deux molécules biologiques par l'intermédiaire d'un signal électrique. La solution choisie consiste à placer les molécules entre deux électrodes et à mesurer un changement éventuel de la conductivité. Compte tenu de leur très forte affinité, l'interaction entre la biotine et la streptavidine nous servira d'interaction modèle pour cette étude (Chapitre 4). Nous appliquerons ensuite nos résultats à la reconnaissance entre la biotine et un anticorps anti-biotine (Chapitre 5). L'objectif du chapitre 3 est de décrire les procédés de fabrication des échantillons développés et utilisés aux chapitres suivants.

Le développement de ce projet nécessite tout d'abord d'élaborer des électrodes très rapprochées, puis de mettre en place les molécules de biotine entre ces électrodes par une fixation covalente au support. Ce dernier point est réalisé par l'intermédiaire du greffage d'un film moléculaire sur un substrat d'oxyde de silicium. Le dépôt de deux films organiques différents sur deux zones distinctes du substrat nous permettra de contrôler localement les propriétés de surface de l'échantillon, en particulier sa capacité à réduire l'adsorption indésirable des molécules biologiques hors de l'espace inter-électrodes.

Pour commencer, nous allons présenter le protocole adopté pour fabriquer les nanoélectrodes, fixer les molécules sondes dans le voisinage des électrodes et contrôler les propriétés d'adsorption sur le reste de la surface. Le processus de fabrication des électrodes est ensuite appliqué et discuté. Enfin, une étude en fluorescence est réalisée afin de développer un procédé technologique permettant de déposer successivement deux couches moléculaires différentes et discriminer ainsi les propriétés d'adsorption sur la surface.

3.1 Stratégie adoptée

3.1.1 Méthode de fabrication des électrodes

Nous souhaitons développer un dispositif de détection pour mesurer la conductivité dans le plan d'un assemblage moléculaire réalisé en plusieurs étapes. Cependant, les niveaux de courant attendus sont relativement faibles et le transport de charges ne devrait être possible que sur de petites distances [1-3]. C'est pourquoi nous avons cherché à construire des électrodes très rapprochées sur un substrat de silicium monocristallin oxydé en surface. Les distances inter-électrodes recherchées sont comprises typiquement entre 40 nm et 100 nm. Ces dimensions correspondent à la résolution obtenue avec l'ancien masqueur électronique de l'IEMN (mise en opération en septembre 2002 du nouveau masqueur Leica 5000 plus). Les

échantillons seront donc réalisés avec deux niveaux de masquage : les nanoélectrodes seront tout d'abord produites grâce à une lithographie électronique ; puis les pistes électriques reliant les électrodes à des plots de grande taille pour la connexion avec l'extérieur, seront définies par masquage optique (voir la partie 3.2).

3.1.2 Greffage des sondes

a) Description de la réaction d'accrochage

L'étape suivante consiste à disposer les molécules-sondes (la biotine) sur la surface. Nous nous appuyerons ici sur les méthodes de fixation développées pour les biopuces à ADN ou à peptides. Dans ces techniques, les molécules sont immobilisées sur le support par l'intermédiaire d'un film d'ancrage greffé sur la surface [4]. La fixation est généralement basée sur la réaction d'une terminaison chimique particulière portée par la sonde avec le groupement de surface d'un film organique.

L'ancrage des molécules-sondes doit être efficace pour disposer d'une densité élevée de sondes sur la surface. Pour cela, l'assemblage du film organique et la réaction d'immobilisation des sondes sur le groupement de surface doivent idéalement être caractérisés par un rendement élevé et une grande reproductibilité. Un contrôle élevé de la fixation des sondes peut être obtenu en employant une méthode de couplage chimiosélective pour laquelle le groupement de surface et la terminaison d'accrochage de la sonde se reconnaissent spécifiquement. De plus, il est préférable de limiter l'adsorption non-spécifique des sondes sur le film car ce type de dépôt est généralement aléatoire et non-homogène sur l'ensemble de la surface. En particulier, le traitement chimique doit être uniforme sur toute la puce, ainsi que pour tous les échantillons d'une même série.

Enfin, le montage sonde-film moléculaire-support obtenu doit être chimiquement stable dans le temps et pouvoir supporter les différents traitements chimiques et physiques nécessaires pendant toute la durée de l'étude. Par exemple, le lien ne doit pas être dégradé par les différents lavages habituellement effectués après le dépôt des sondes dans le but de retirer les biomolécules juste adsorbées sur la surface. Des lavages sont également réalisés après l'étape d'incubation avec le milieu contenant les récepteurs. La stabilité de l'assemblage moléculaire vis-à-vis de l'application d'un champ électrique doit également être obtenue.

Pour notre étude, nous nous sommes appuyés sur un mode d'immobilisation développé à l'Institut de Biologie de Lille (IBL) [5, 6]. Les sondes sont liées au support par une ligation semicarbazone issue d'une réaction entre une fonction semicarbazide et une terminaison α -oxo aldéhyde (Figure 3.1). Ces groupements présentent l'avantage de se

reconnaître mutuellement avec une grande sélectivité dans des conditions expérimentales simples à réaliser et reproductibles. Les fonctions réactives semicarbazide et aldéhyde sont stables chimiquement et, mises en présence, réagissent spontanément. Il n'est pas nécessaire de réduire la liaison C=N formée pour stabiliser le lien.

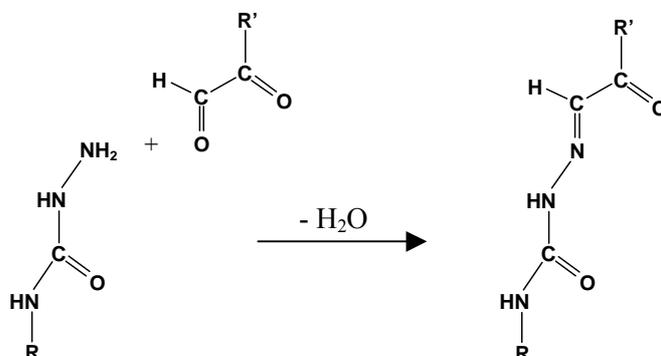


Figure 3.1: Réaction entre des fonctions semicarbazide (-NH-CO-NH-NH₂) et α -oxo aldéhyde (-CO-CHO) [5, 6].

Les molécules-sondes seront donc placées entre les électrodes par l'intermédiaire de cette technique d'ancrage. La fonction semicarbazide est greffée sur le support. Elle provient d'une synthèse *in situ* réalisée sur l'amine de surface d'un film de 3-aminopropyl triméthoxysilane (APTMS). Ce film est greffé sur le substrat d'oxyde de silicium selon le protocole décrit au chapitre 2 et rappelé dans le tableau 3.1. Pour installer les groupes semicarbazide [6], les amines de surface sont tout d'abord traitées par un mélange triphosgène/diisopropyléthylamine (DIEA), puis par une solution de H₂N-NH-Fmoc (Figure 3.2 et tableau 3.1). La déprotection du groupement semicarbazide est réalisée avec un mélange piperidine/1,8-diaza-bicyclo[5,4,0]undec-7-ène (DBU). Les échantillons sont ensuite rincés avec du diméthylformamide (DMF), de l'eau déionisée et du méthanol, puis séchés dans un dessiccateur (séchage par aspiration de l'air jusqu'à une pression de 0,08 mbar) et stockées à température ambiante à l'abri de la lumière.

Les angles de contact mesurés sur le film de semicarbazide, après un temps de stabilisation de 10 secondes, sont de $19 \pm 3^\circ$ avec une goutte d'éthylèneglycol, de $22 \pm 2^\circ$ avec une goutte de formamide et de $33 \pm 2^\circ$ avec une goutte de diiodométhane. En revanche, une goutte d'eau n'est pas stabilisée après 40 secondes sur un tel film : l'angle de contact formé avec l'eau est de 48° quand la goutte est déposée et décroît régulièrement au cours du temps (41° après 40 sec.), ce qui montre que la surface s'hydrate au cours du temps et devient de plus en plus polaire.

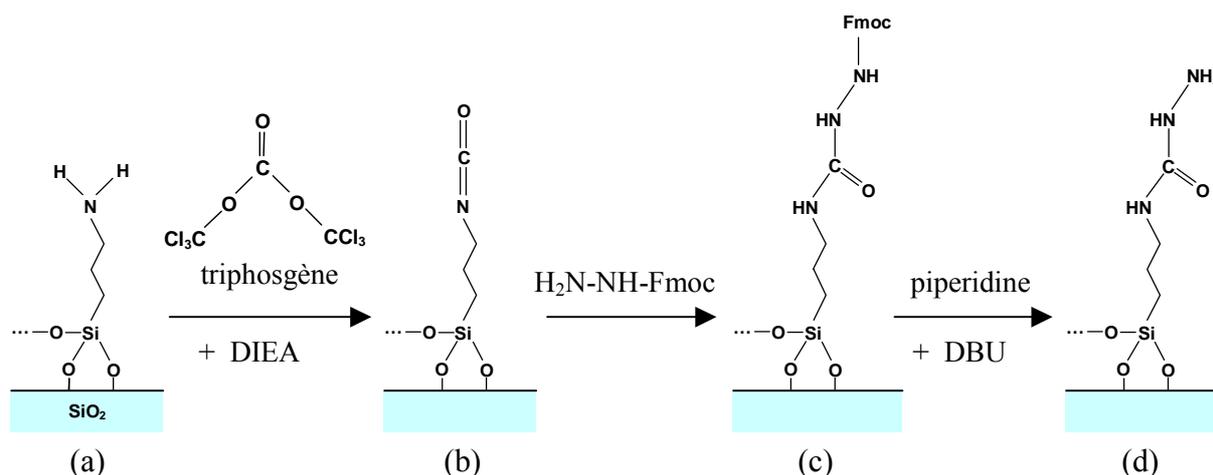


Figure 3.2: Synthèse de la terminaison semicarbazide (-NH-CO-NH-NH₂) à partir du groupement de surface amine d'une couche sol-gel de 3-aminopropyltriméthoxysilane (APTMS) [5, 6].

Etape	Opérations réalisées
Nettoyage du substrat	Ashering plasma O ₂ 180 nm/min : O ₂ = 20 sccm 0,1 Torr 100 W 20 sec, rinçage méthanol pur. ou Nettoyage piranha (H ₂ SO ₄ :H ₂ O ₂ :H ₂ O = 3:1:2 12 h) ¹ , rinçage eau milliQ, rinçage méthanol pur.
Greffage APTMS ² (Figure 3.2-a)	1,7 x 10 ⁻⁴ M APTMS dans mélange méthanol:eau = 95:5 ultrasons 30 min, rinçage méthanol pur, 2 rinçages eau milliQ, rinçage méthanol pur, séchage étuve 110°C 15 min.
Synthèse d'un groupement isocyanate (Figure 3.2-b)	0,1 M triphosgène / 0,8 M DIEA ³ dans 1,2-dichloroéthane ultrasons 2 h.
Synthèse semicarbazide (Figure 3.2-c)	22 mM H ₂ N-NH-Fmoc ⁴ dans DMF ⁵ ultrasons 2 h, 2 rinçages DMF.
Déprotection (Figure 3.2-d)	2,2 x 10 ⁻⁵ M piperidine / 1,4 x 10 ⁻⁴ M DBU ⁶ dans DMF 30 min, rinçage DMF, 2 rinçages eau milliQ, rinçage méthanol pur, séchage dans dessiccateur, stockage à l'abri de la lumière.

¹ Note : la réaction d'un mélange piranha sur des composés organiques en grande quantité peut être violente (réaction exothermique) et produire des projections d'acide. Cette technique de nettoyage n'est adaptée que pour des surfaces déjà relativement propres.

² APTMS : 3-aminopropyltriméthoxysilane.

³ DIEA : diisopropyléthylamine.

⁴ Fmoc : 9-fluorénylméthoxycarbonyl.

⁵ DMF : diméthylformamide.

⁶ DBU : 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène.

Tableau 3.1: Préparation du groupement de surface semicarbazide [6].

Un peptide peut être fixé sur le semicarbazide s'il est fonctionnalisé avec une terminaison aldéhyde ou cétone (Figure 3.3). La haute réactivité et la spécificité des deux fonctions mises en jeu permettent d'introduire les sondes en quantités relativement faibles pendant le dépôt. L'accessibilité du peptide immobilisé tend à être respectée car la liaison au support n'est réalisée qu'en un seul point d'ancrage.

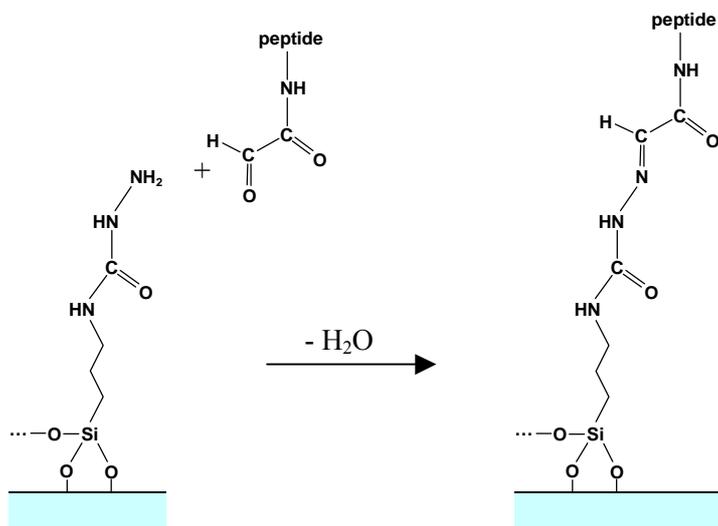


Figure 3.3: Immobilisation, sur le modèle de la figure 3.1, d'un peptide sur la surface par l'intermédiaire d'une réaction entre les terminaisons semicarbazide et α -oxo aldéhyde [5, 6].

La densité de molécules fixées sur la surface par ce biais a été mesurée avec des oligodéoxynucléotides (ODN de 18 acides nucléiques) liés à un marqueur radioactif [6]. La quantité d'ODN immobilisés est de l'ordre de 10^5 molécules/ μm^2 . Cette valeur est comparable aux densités présentées dans la littérature concernant les microarrays à ODN préparées par synthèse *in situ* sur substrat silicium [4, 6]. Elle est également relativement proche du nombre de silanols disponibles sur la couche de SiO_2 , qui est de 5×10^6 silanols/ μm^2 d'après les mesures réalisées par plusieurs auteurs [7-9]. Le rapport de 50 entre les deux valeurs est probablement dû au fait que les premiers ODN fixés tendent à masquer un grand nombre des terminaisons semicarbazides. Ce dernier point introduit l'idée que le nombre de peptides ancrés sur la surface est fonction du volume du peptide car celui-ci, une fois fixé sur un semicarbazide, peut recouvrir des semicarbazides voisins et empêcher leur accès par d'autres peptides.

b) Fonctionnalisation de la biotine

La sonde moléculaire que nous souhaitons déposer est la biotine, aussi appelée vitamine B₈ ou vitamine H (Figure 3.4). C'est un coenzyme naturel, c'est-à-dire une molécule utilisée par les enzymes pour effectuer des transformations. La biotine est souvent utilisée comme marqueur en biologie moléculaire en raison de sa grande stabilité : elle peut résister à des pH extrêmes, être portée à ébullition ou soumise à des radiations [10].

Pour nos expériences, le groupe α -oxo aldéhyde est relié à la biotine par l'intermédiaire d'un peptide et d'un espaceur 4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine (Figure 3.5). La seule fonction susceptible de réagir avec la terminaison semicarbazide est le groupement final $-\text{CO}-\text{CHO}$. Pour simplifier, cette molécule sera appelée « biotine-COCHO » par la suite, le peptide et l'espaceur jouant le rôle de bras espaceur étant sous-entendus.

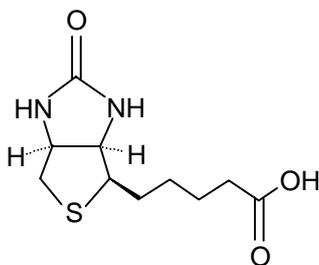


Figure 3.4: Représentation de la biotine.

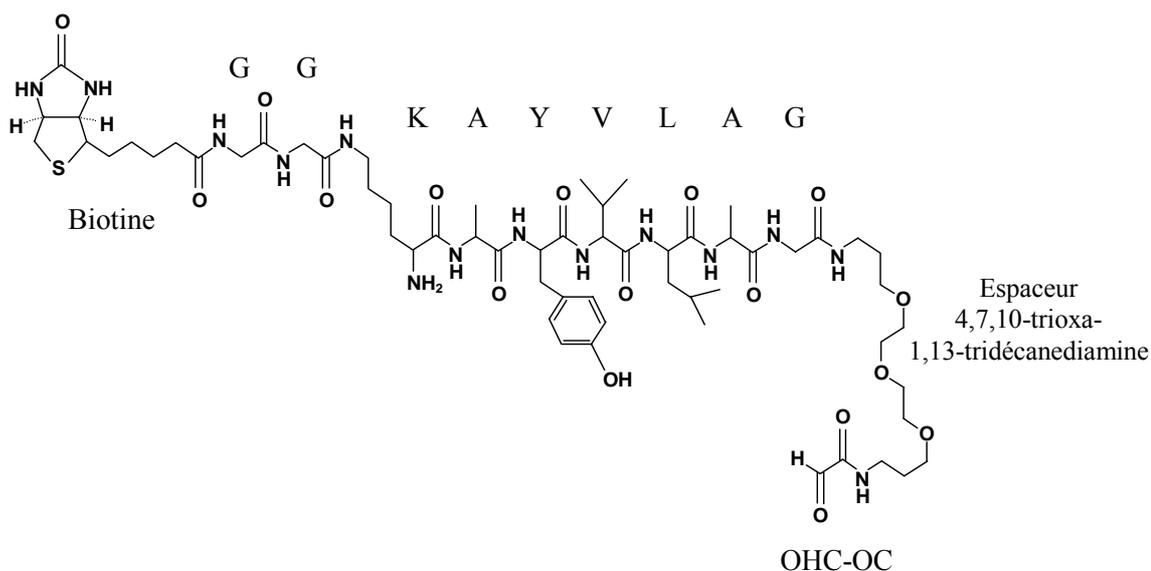


Figure 3.5: *H-Lys(Biotine-GlyGly)AlaTyrValLeuAlaGly-Espaceur-CO-CHO* (« Biotine-COCHO ») [6].

c) Test de la chimiosélectivité de l'ancrage

Lors des expériences de contrôle, nous utiliserons des échantillons incubés avec des molécules-sondes non-fonctionnalisées. Pour cela, une molécule construite sur le même modèle que la biotine-COCHO sera amenée en contact avec les groupements semicarbazide. Cependant, afin d'empêcher l'immobilisation covalente de la biotine, le groupe –CO–CHO de cette molécule aura été remplacé par une fonction –CO–(CHOH)₂–CO–Val–NH₂. Ces molécules seront nommées « biotine-NH₂ » par la suite. Ainsi, aucune chimisorption de la biotine ne sera possible sur les échantillons témoins, et les traces de biotine qui pourront éventuellement être présentes sur la surface seront des molécules physisorbées uniquement. Dans ce dernier cas, seules des molécules de biotine-NH₂ adsorbées sur l'échantillon ayant formé des interactions spécifiques avec la streptavidine (ou l'anticorps anti-biotine), ou des molécules de streptavidine (ou d'anticorps) déposées sans avoir réalisé l'interaction biomoléculaire recherchée, devraient *a priori* être à l'origine d'un signal électrique.

d) Description de l'interaction entre la biotine et la streptavidine

La biotine peut se fixer à la streptavidine, une protéine bactérienne, beaucoup plus fortement qu'un anticorps à son antigène. L'affinité exceptionnellement élevée entre ces deux molécules est décrite par une constante de dissociation ⁵ de 10⁻¹⁵ M [11, 12]. Cette caractéristique explique pourquoi ces deux molécules ont été très étudiées en tant que modèle théorique d'interaction impliquant une protéine et un ligand [12, 13], et utilisées à grande échelle en biologie moléculaire pour former des liaisons spécifiques et quasiment irréversibles entre des macromolécules biologiques [14]. La biotine et la streptavidine sont également plus faciles à produire et donc moins chères que des anticorps.

La streptavidine est une protéine tétramérique de grande taille : son poids moléculaire vaut 4 x 16475 daltons (g.mol⁻¹) (Figure 3.6). Elle peut être placée dans un parallélépipède rectangle de 46 x 56 x 54 Å³ [15]. Les dimensions du monomère de la streptavidine sont de 46 x 28 x 27 Å³ [16]. Une autre description de la streptavidine est celle de deux dimères stabilisés dans la molécule par l'intermédiaire d'interactions de Van der Waals [14].

⁵ La constante de dissociation K_d d'un complexe A:B représente le rapport entre les concentrations en produits A et B dissociés et la concentration en complexe A:B, dans les proportions stoechiométriques.

$$A_{\alpha} \cdot B_{\beta} \rightleftharpoons \alpha A + \beta B \quad K_d = [A]^{\alpha} \cdot [B]^{\beta} / [A_{\alpha} \cdot B_{\beta}] \quad (3-1)$$

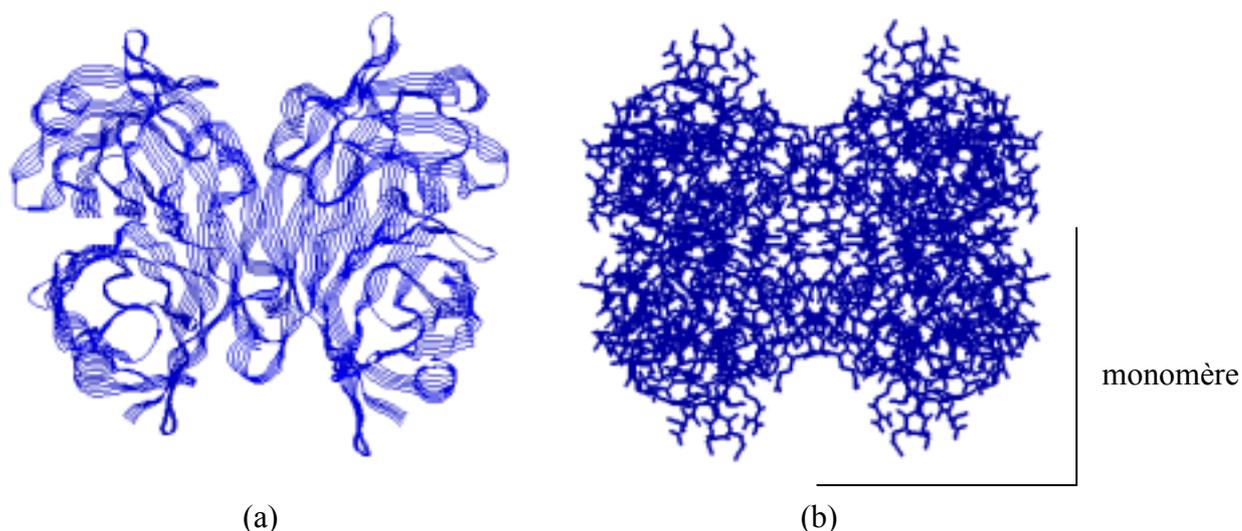


Figure 3.6: Représentation de la streptavidine sous forme tétramérique [15].
a) Représentation de type "rubans". b) Représentation de type "sticks".

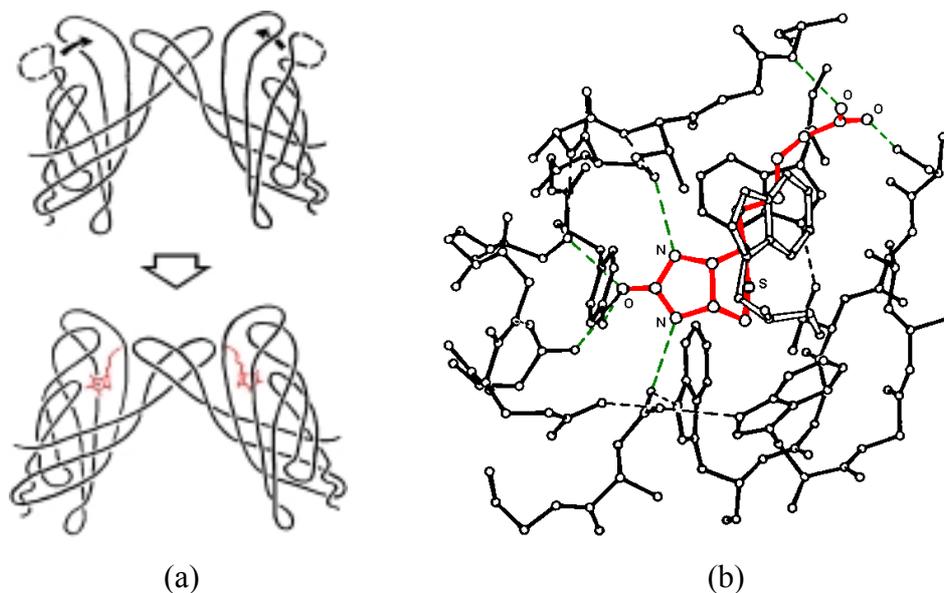


Figure 3.7: Mécanisme de formation du complexe biotine:streptavidine. a) Le repliement des boucles polypeptidiques autour des sites récepteurs enferme les molécules de biotine. Seules deux sous-unités de la streptavidine sont représentées sur ce schéma. b) Fixation d'une biotine par l'intermédiaire de plusieurs liaisons hydrogène (en pointillés). Par souci de clarté, les atomes d'hydrogène ont été omis (adapté de [14]).

Puisqu'elle dispose de 4 sous-unités peptidiques identiques, la streptavidine peut interagir en solution avec 4 molécules de biotine simultanément. La biotine est maintenue dans le site récepteur de la streptavidine par un très grand nombre de liaisons hydrogène qui, collectivement, produisent un lien extrêmement stable [14, 17] (Figure 3.7). Le site de fixation de la biotine est constitué d'acides aminés polaires et aromatiques. Avant l'interaction, la cavité formée par des boucles polypeptidiques est ouverte. Les acides aminés

impliqués dans l'immobilisation sont situés en surface de la molécule, en contact avec le solvant. Le site récepteur de la biotine est alors occupé par plusieurs molécules d'eau. La formation du complexe biotine:streptavidine implique le déplacement des molécules d'eau, l'agencement de multiples liaisons hydrogène entre les acides aminés et la biotine, et enfin le repliement des boucles polypeptidiques pour enfermer la biotine dans la streptavidine [14].

Si on considère le positionnement des atomes dans le complexe, nous pouvons voir sur la figure 3.7-b que le groupe carboxyl terminal de la biotine est légèrement décalé par rapport au site récepteur. Lorsque les liaisons hydrogène immobilisant la biotine sont établies, le groupe carboxyl demeure partiellement en contact avec le solvant. De plus, les liaisons hydrogène formées sur ce groupe jouent un rôle secondaire dans la fixation de la biotine à son récepteur, et peuvent être détournées de leur fonction sans dommage pour la formation du complexe. Par conséquent, le groupement carboxyl, en partie accessible, peut être utilisé comme site d'attache covalent de la biotine à d'autres biomolécules. C'est cette stratégie qui a été employée pour accrocher la terminaison α -oxo aldéhyde ($-\text{CO}-\text{CHO}$) à la biotine (Figure 3.5).

3.1.3 Passivation du substrat

Nous pouvons remarquer qu'il n'est pas nécessaire de disposer des sondes sur l'ensemble de la puce. En effet, il est peu probable que les interactions s'établissant sur le substrat au-delà d'une certaine distance des nanoélectrodes puissent être détectées. Aussi les signaux électriques mesurés devraient correspondre au transport de charges canalisé entre les électrodes. Autrement dit, la véritable « surface utile » où les sondes devraient en priorité être déposées est le gap inter-électrodes. En outre, il peut s'avérer judicieux de confiner les molécules biologiques dans le voisinage des électrodes uniquement, en isolant cette partie de l'échantillon du reste de la surface, afin de diminuer les risques de perturbation électrique en provenance de l'extérieur. Enfin, le dépôt sélectif des sondes sur le substrat devrait faire bénéficier le dispositif d'une sensibilité accrue. Théoriquement, de très faibles concentrations de récepteurs en solution pourraient être détectés s'ils se concentraient tous spontanément entre les électrodes, plutôt que de se disperser sur l'ensemble de l'échantillon.

Par ailleurs, l'adsorption non-spécifique des molécules biologiques sur le substrat peut potentiellement être à l'origine d'un signal électrique et donner lieu à une mauvaise interprétation (détection erronée d'une interaction biomoléculaire). Afin de limiter la physisorption incontrôlée des biomolécules sur la surface hors des électrodes, l'échantillon sera recouvert d'un film auto-assemblé capable d'empêcher l'adsorption non-spécifique des molécules ; celles-ci devraient alors interagir principalement avec les sondes installées autour

des électrodes (Figure 3.8). Des études portant sur l'adsorption de peptides sur différents films organiques greffés sur un substrat de SiO_2 seront réalisées et analysées en fluorescence (voir la partie 3.3). L'objectif est de mettre au point un protocole pour le dépôt successif des deux films organiques, et de sélectionner un groupement de surface **A** capable de minimiser la quantité des molécules biologiques physisorbées.

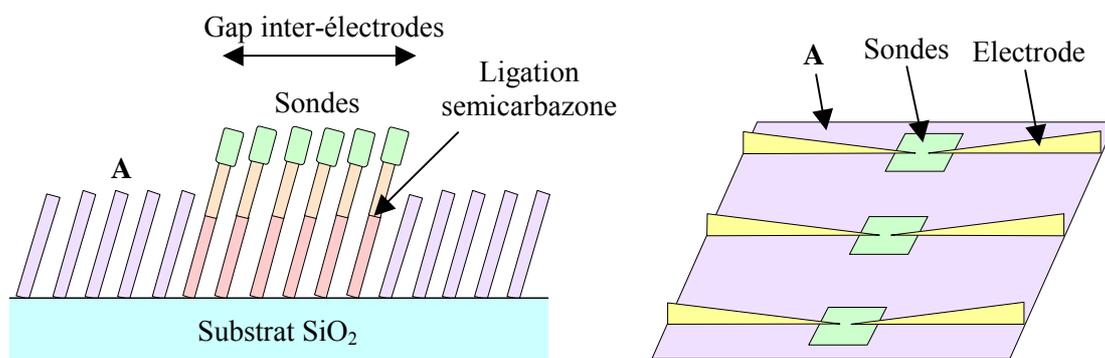


Figure 3.8: Stratégie envisagée pour discriminer les propriétés d'adhésion de la surface. Grâce à un film auto-assemblé de molécules **A**, l'adsorption non-spécifique des molécules biologiques sur la surface hors des électrodes devrait être minimisée. La surface inter-électrodes a été précédemment fonctionnalisée avec les sondes. Les biomolécules devraient donc être confinées dans le voisinage des électrodes.

3.2 Fabrication des électrodes

3.2.1 Procédé technologique

La solution retenue pour fabriquer les électrodes est la lithographie électronique. La résolution du faisceau étant d'une vingtaine de nanomètres, les gaps inter-électrodes envisagés sont compris entre 40 nm et 100 nm. Les motifs principaux sont des nanoélectrodes parallèles sur une longueur de 5 à 30 μm (Figure 3.9-c). Cette géométrie a été choisie dans le but de maximiser la probabilité de détection en augmentant le nombre d'interactions qui peuvent se réaliser entre les électrodes, tout en maintenant une séparation entre les électrodes suffisamment faible pour qu'un courant porté par des molécules fixées sur la surface puisse traverser une telle distance.

Remarquons cependant que, même avec un masqueur électronique, concevoir des motifs aussi rapprochés sur de telles longueurs reste un défi. Pour dessiner des structures possédant un tel rapport d'aspect, le balayage de la surface par le faisceau électronique doit être très lent et avec la meilleure résolution. L'insolation de la résine étant exécutée sur de petits éléments de surface, la définition de chaque pixel est abaissée à la largeur minimale

permise par le logiciel de pilotage du masqueur afin que la surface reçoive une dose extrêmement précise. Des tests préliminaires ont permis d'établir les paramètres adaptés à ces motifs particuliers (voir au chapitre 2 la partie 2.1.5-b). Toutefois, comme on le verra, la fabrication des nanoélectrodes n'atteint pas un taux de réussite de 100 %.

Le procédé de fabrication et les masques employés sont présentés au tableau 3.2 et à la figure 3.9. Les échantillons sont des couches d'oxyde de silicium de 70 Å construites sur substrat épais de silicium. Les nanoélectrodes sont tout d'abord définies dans une résine électrosensible positive et, après la révélation des motifs, un métal est déposé dans les ouvertures par évaporation sous vide (Figures 3.9-a, b et c). Un masque optique est ensuite aligné sur les nanoélectrodes dans le but de les relier à des plots d'or de 500 µm de côté situés sur les bords de la puce (Figures 3.9-d et e). Ces plots permettront d'établir le contact électrique à l'aide de micropointes lors des mesures électriques (Chapitre 2, figure 2.22).

Etape	Opérations réalisées
Nettoyage du substrat	<i>Nettoyage piranha</i> (H ₂ SO ₄ :H ₂ O ₂ = 3:1 10 min), rinçage eau DI, séchage azote sec.
Fabrication des nanoélectrodes (Figure 3.9-a, b et c)	<i>Résinage</i> 500 Å COPO ¹ 4 % MMA 8.5, recuit étuve 170°C 30 min. <i>Résinage</i> 450 Å PMMA ² 3 % 495 K, recuit étuve 170°C 30 min. <i>Lithographie électronique</i> 50 keV 220 µC/cm ² masque niveau 1. <i>Révélation</i> MIBK ³ : IPA ⁴ = 1:2 50 sec, rinçage IPA, séchage azote sec. <i>Evaporation sous vide</i> 50 Å Ti / 150 Å Au. <i>Destruction résine (lift-off)</i> acétone + ultrasons 5 h, rinçage IPA, séchage azote sec.
Deuxième masquage (Figure 3.9-d et e)	<i>Résinage</i> 1,25 µm S1813 ⁵ , recuit sur plaque 110°C 1 min. <i>Insolation UV</i> masque niveau 2. <i>Révélation</i> MF 319 ⁶ 30 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec. <i>Evaporation sous vide</i> 100 Å Ti / 400 Å Au. <i>Destruction résine (lift-off)</i> acétone + ultrasons 20 min, rinçage IPA, séchage azote sec.

¹ COPO : copolymère de méthyl méthacrylate. Résine électrosensible positive.

² PMMA : polyméthylméthacrylate. Résine électrosensible positive.

³ MIBK : méthylisobutylketone.

⁴ IPA : alcool isopropylique.

⁵ Résine S1813 : résine photosensible positive fournie par la société Shipley.

⁶ MF 319 : développeur associé à la résine S1813.

Tableau 3.2: Processus de fabrication des nanoélectrodes par lithographie électronique.

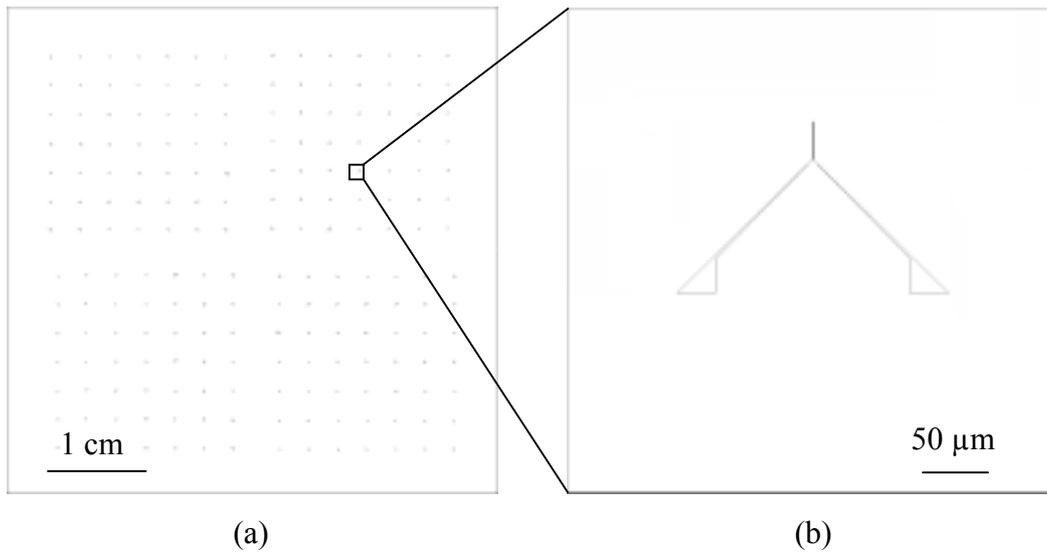
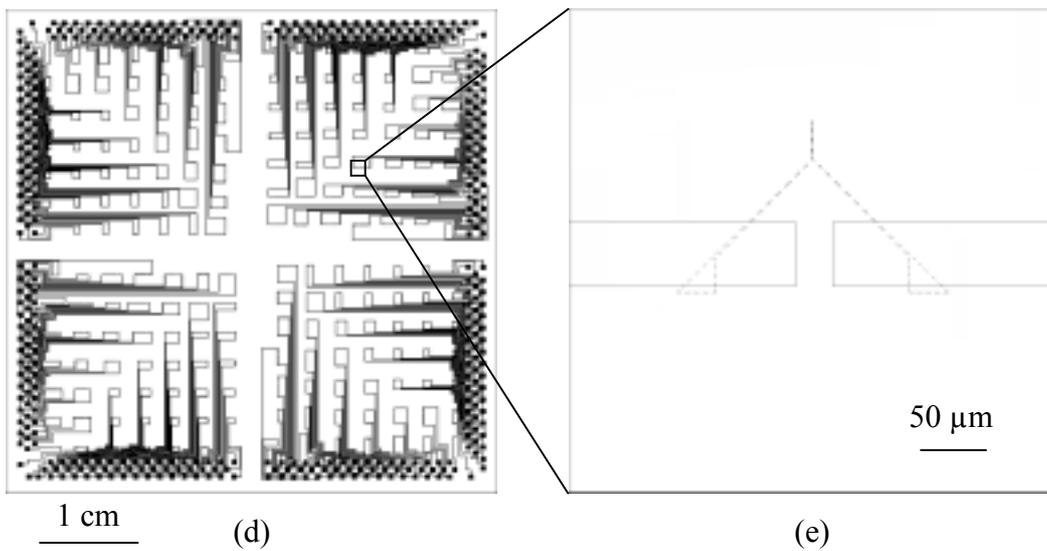
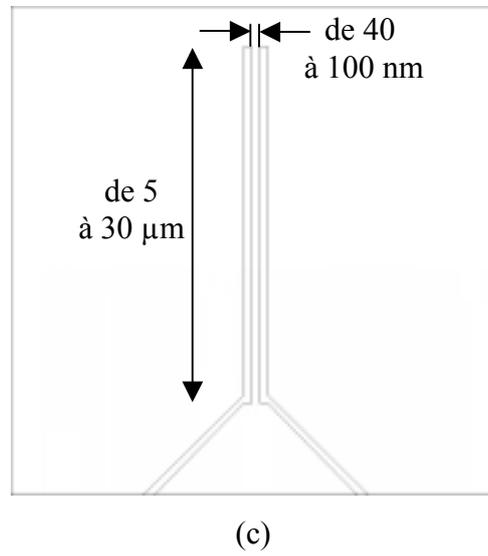


Figure 3.9: Niveaux de masque pour l'élaboration de nanoélectrodes parallèles sur plusieurs microns. a) 1^{er} niveau, b) détail d'un motif du 1^{er} niveau et c) zoom sur les nanoélectrodes. d) 2^{ème} niveau, destiné à connecter les nanoélectrodes à des plots électriques de grande taille, et e) détail montrant le recouvrement des deux motifs.



3.2.2 Calcul de l'épaisseur théorique de l'assemblage moléculaire, choix de l'épaisseur de métal

L'épaisseur du métal déposé pour les nanoélectrodes est de 200 Å, formée de 150 Å d'or sur 50 Å de titane (couche d'interface). Cette valeur a été choisie d'après une estimation des dimensions des molécules sur la surface.

La première couche est constituée du film de 3-aminopropyltriméthoxysilanes (APTMS). Son épaisseur, mesurée par AFM, varie de 10 à 30 Å après une silanisation de 30 minutes (Chapitre 2 partie 2.2.2-b) [3].

La transformation du groupement de surface amine en semicarbazide conduit théoriquement à un accroissement de la hauteur de quelques angströms, jusqu'à environ 3,7 Å (longueur du groupement semicarbazide). Il faut cependant garder à l'esprit que l'ajout d'un niveau dans le montage moléculaire ne conduit pas forcément à une augmentation de son épaisseur égale aux dimensions de l'objet. En effet, la molécule peut éventuellement « se coucher » sur le film inférieur, plutôt que de se dresser dans la direction normale à la surface. On voit d'ailleurs une tendance analogue lors de nombreux greffages de films auto-assemblés sur divers substrats : les molécules s'arrangent souvent en réseau selon un angle d'inclinaison avec la normale [2, 18]. Si la molécule est longue, comme c'est le cas de la biotine-COCHO, elle peut prendre diverses conformations, y compris se replier sur elle-même. En suivant ce principe, nous estimons que l'accrochage de la biotine sur le semicarbazide ne fait pas croître le film de 70 Å (longueur de la biotine-COCHO), mais plus probablement de quelques dizaines d'angströms.

La dernière couche est constituée de la streptavidine liée à un colloïde d'or. Le diamètre de la streptavidine est de 55 Å environ (partie 3.1.2-d). Celui de la bille d'or est de $10,0 \pm 0,7$ nm, et, selon les indications données par le fournisseur des produits (Sigma-Aldrich), sa surface est recouverte en moyenne de 7,7 streptavidines greffées en autant de points d'ancrage différents. Théoriquement, pour des raisons d'orientation des molécules, une à trois streptavidines devraient interagir avec la surface et former un point d'ancrage. Il est possible que l'établissement de l'interaction biotine:streptavidine modifie l'organisation des molécules dans le film et que le colloïde s'enfonce partiellement dans la couche organique sur laquelle il repose.

La hauteur finale de l'assemblage "film d'ancrage/biotine/streptavidine/colloïde d'or" est donc de $20 + 35 + 55 + 100$, soit de l'ordre de 210 ± 50 Å.

D'autre part, des contraintes sur l'épaisseur du métal déposé sont induites par la technique de fabrication. Pour dessiner des structures avec une résolution fine, l'épaisseur de

la résine doit être faible afin de limiter les effets de proximité (dispersion des électrons du faisceau et des électrons secondaires dans la résine ; voir la partie 2.1.5-b au chapitre 2). Les effets de proximité tendent à élargir les dimensions des motifs, ce qui risque de créer un contact entre les nanoélectrodes. La résine bi-couche COPO/PMMA employée possède une épaisseur de $950 \pm 100 \text{ \AA}$ (Tableau 3.2). Habituellement, après l'insolation et la révélation, l'épaisseur du métal déposé ne peut pas dépasser environ 50 % de l'épaisseur de la résine car, dans le cas contraire, la destruction de la résine (lift-off) devient très difficile à réaliser. Ce rapport entre les épaisseurs est un paramètre encore plus crucial pour des résines très fines. En effet, la section accessible à l'acétone pour dissoudre la résine est faible, puisque l'acétone attaque la résine à partir des bords verticaux des ouvertures. Le lift-off est probablement limité par le mécanisme de la diffusion de l'acétone vers la résine et du polymère dissous vers le solvant, ce qui explique les durées très longues qui doivent être appliquées pour détruire entièrement la résine (Tableau 3.2). Enfin il n'est pas réaliste d'envisager de construire sans défaut des structures de grande épaisseur séparées d'une cinquantaine de nanomètres sur plusieurs microns de long. Compte tenu de ces paramètres, nous avons choisi de déposer une hauteur de métal intermédiaire de 200 \AA .

3.2.3 Observations et discussion

a) Aspect des électrodes

Ce processus de fabrication permet de réaliser les nanoélectrodes parallèles sur plusieurs microns avec la résolution suffisante, comme le montre la figure 3.10. Nous pouvons voir que les bords des structures ne sont pas strictement linéaires mais ondulent légèrement. De plus, si le dépôt d'or est globalement uniforme et plat sur les électrodes, il est un peu plus important sur les bords. Ce phénomène est visible sur les images MEB où les bordures des motifs sont soulignées par un trait plus lumineux constitué de petites tâches blanches (Figures 3.10-b et 3.11-b). La hauteur des électrodes, mesurée avec la pointe AFM, est de $21,4 \pm 2,0 \text{ nm}$, ce qui est proche du résultat attendu (Figure 3.10-c et autres images non-présentées). Sur les bords, de l'or s'est accumulé sur une hauteur de 2 à 6 nm, voire jusqu'à 20 nm en certains endroits. Nous faisons l'hypothèse que ces petits paquets sont dus au métal qui, pendant l'évaporation sous vide, se dépose éventuellement sur les flancs de la résine dans les ouvertures, et que ces agglomérats de métal sont parfois mal arrachés lors de la destruction de la résine ; ils restent alors érigés sur le contour des motifs après le lift-off.

Nous constatons en outre que le gap obtenu au masqueur est fréquemment inférieur de 6 à 8 nm à celui demandé. Par exemple, dans le cas d'une distance de 40 nm, le gap formé est de 32 à 34 nm (Figures 3.10-b et 3.11-b).

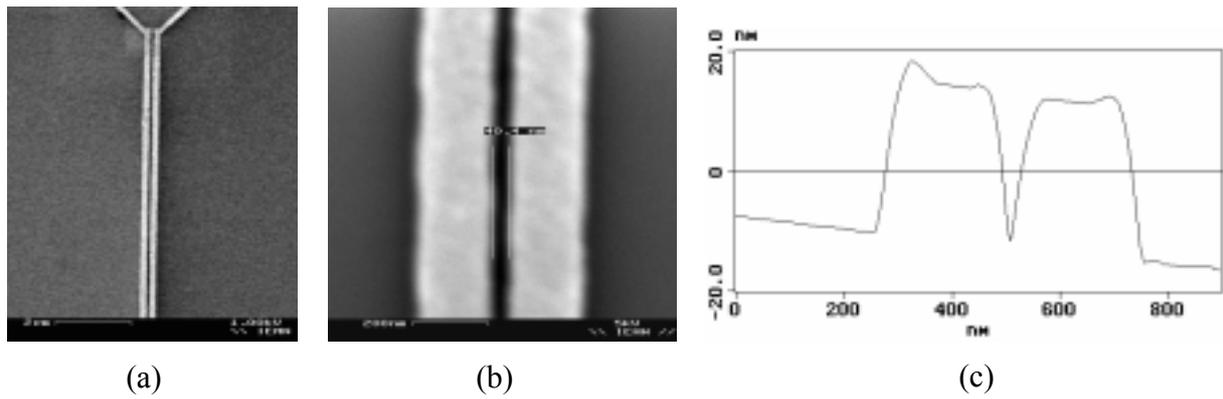


Figure 3.10: Nanoélectrodes parallèles sur plusieurs microns. a) Vue large au MEB de longues électrodes séparées de 70 nm. b) Gap inter-électrodes de 40 nm. c) Observation en AFM du profil vertical des électrodes. Le dépôt de métal est un peu plus important sur les bords des électrodes, surtout sur les bords extérieurs.

b) Electrodes en court-circuit, taux d'échec

Le premier niveau de masque comporte 196 électrodes (Figure 3.9-a). 98 d'entre elles (50 %) se révèlent court-circuitées à la fabrication. La figure 3.11 présente les deux types de causes identifiées.

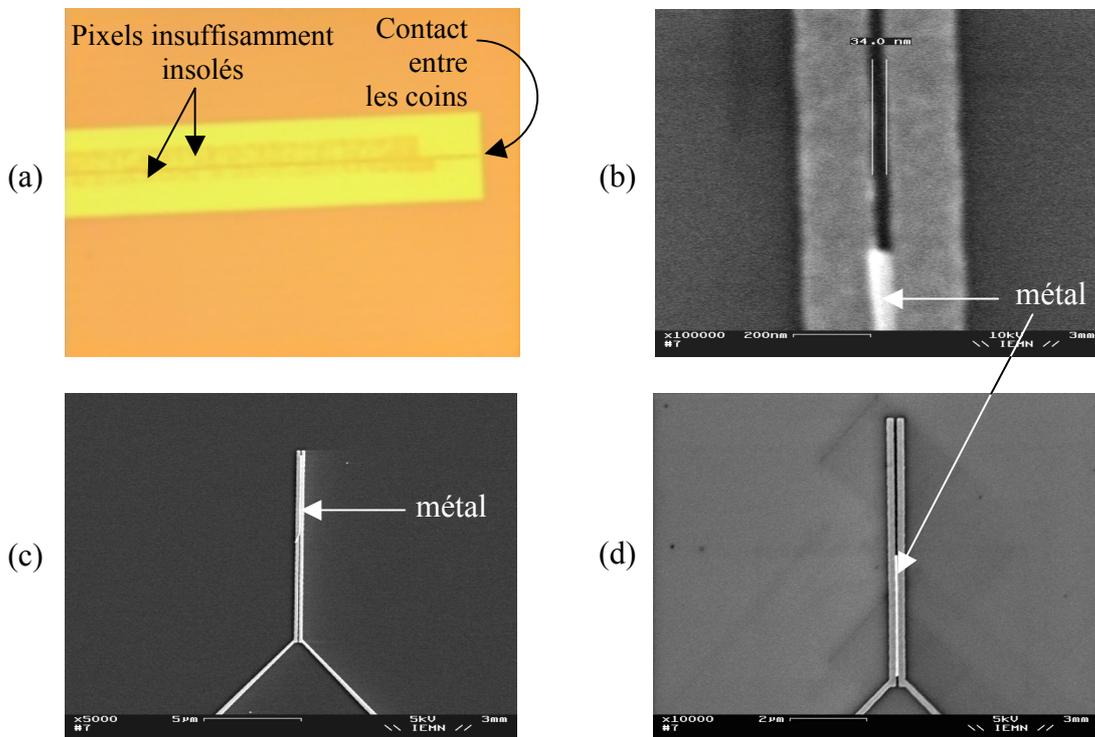


Figure 3.11: Court-circuits entre des nanoélectrodes. a) Une dose électronique trop importante dans les coins des électrodes a élargi le motif localement, et a permis un contact métallique entre les extrémités. b) Electrodes séparées de 34 nm connectées par du métal restant dans le gap après le lift-off. c) et d) Bandes de métal entre les électrodes.

Le premier cas possible est une inadaptation de la dose électronique appliquée à chaque pixel (Figure 3.11-a). Certains pixels reçoivent une dose insuffisante, tandis que les coins des électrodes sont sur-exposés. Le résultat est un court-circuit des électrodes aux extrémités (Figure 3.11-a). Une autre possibilité résulte de la difficulté à retirer la résine pendant le lift-off. La très faible épaisseur de polymère COPO/PMMA rend sa destruction difficile à opérer sur toute la surface, mais spécialement entre les électrodes où l'accès est particulièrement réduit : à cet endroit, la surface d'attaque du polymère par l'acétone est de 95 nm en hauteur x 40 à 100 nm de largeur (hauteur de la résine x largeur du gap inter-électrodes). Des bandes de métal déposées sur de la résine non-dissoute peuvent demeurer entre les électrodes et sont à l'origine de la grande majorité des court-circuits observés (Figures 3.11-b, c et d).

Comme attendu, les rendements de fabrication d'électrodes non court-circuitées sont croissants avec la taille du gap inter-électrodes (Figure 3.12 et tableau 3.3). Les taux sont relativement élevés au-delà de 80 nm ($> 80\%$), puis décroissent rapidement à partir de 70 nm ($< 60\%$). Par contre, la longueur des électrodes n'a aucune influence directe (Tableau 3.3). La longueur des électrodes est donc un paramètre secondaire, ceci probablement en raison de la répétitivité de la dose électronique appliquée d'un pixel à l'autre le long d'une électrode. En effet, excepté à proximité des extrémités des électrodes, la quantité d'électrons injectés dans la résine est la même sur toute une bande parallèle aux électrodes, comme on peut le voir sur la figure 3.11-a. Ainsi, lorsque cette dose est bien adaptée, elle convient pour toute l'électrode, quelque soit sa longueur (de 5 à 30 μm).

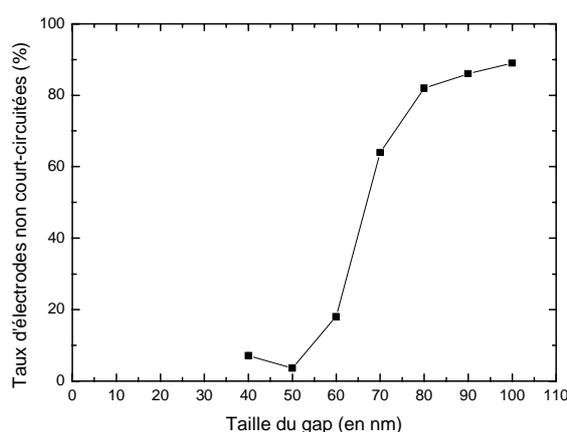


Figure 3.12: Taux d'électrodes non court-circuitées en fonction du gap inter-électrodes, pour toute longueur des électrodes.

Gap des électrodes / Longueur des électrodes	40 nm	50 nm	60 nm	70 nm	80 nm	90 nm	100 nm	Moyenne
5 µm	0	0	3	2	3	3	4	54 %
7 µm	1	0	2	4	4	3	3	61 %
10 µm	0	0	0	2	3	2	4	39 %
15 µm	0	0	0	3	3	4	3	46 %
20 µm	1	1	0	3	3	4	3	54 %
25 µm	0	0	0	1	3	4	4	43 %
30 µm	0	0	0	3	4	4	4	54 %
Moyenne	7,1 %	3,6 %	18 %	64 %	82 %	86 %	89 %	Moyenne = 50 % ⁽⁶⁾

Tableau 3.3: Taux d'électrodes formées sans court-circuit par masquage électronique en fonction de la dimension du gap et de la longueur des électrodes (résultats obtenus sur 196 électrodes ; 28 électrodes sur chaque ligne ou colonne ; 4 électrodes dans chaque catégorie).

Dans le même ordre d'idée, nous avons constaté que le nombre d'électrodes court-circuitées est un peu moindre lorsque le balayage du faisceau est réalisé dans la direction des électrodes (Figure 3.13). Les motifs sont mieux définis si la dose incidente est constante sur une ligne, plutôt qu'obligée de varier continuellement.

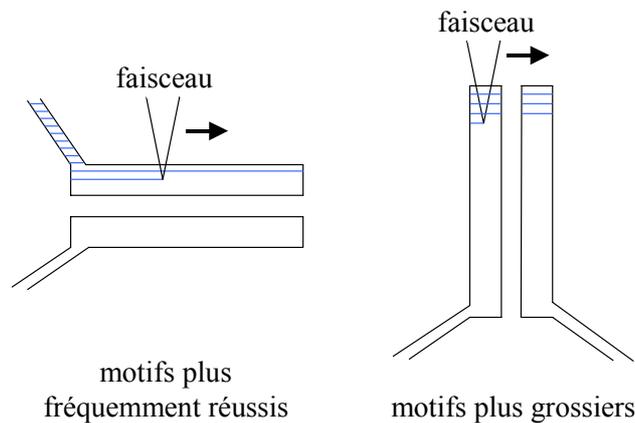


Figure 3.13: Qualité des électrodes réalisées en fonction du sens de balayage du faisceau.

⁶ Note : Des expériences récentes ont relevé la moyenne d'électrodes non court-circuitées à près de 75 % avec le Leica 5000 plus.

c) Rendement de fabrication de nanoélectrodes opérationnelles

L'étape cruciale dans la fabrication est donc le lift-off, responsable de la perte de près de la moitié des électrodes, le problème de répartition des doses électroniques entre pixels ayant une influence marginale sur le rendement. Cependant, comme il l'a été exposé au chapitre 2 (partie 2.3.4), cela ne veut pas dire que l'autre moitié des électrodes est opérationnelle. Parmi celles-ci, on s'aperçoit que 65 % présentent un autre défaut de fabrication. Ces observations sont réalisées pendant les mesures électriques effectuées après le dépôt des molécules-sondes. En effet, certaines électrodes sont mal connectées au niveau du masque optique, ou coupées pendant les manipulations, et fonctionnent en circuit ouvert ; d'autres sont victimes de claquage lors des mesures de contrôle. Ces mesures sont en général confirmées par une observation au microscope optique, où l'on peut voir une destruction physique d'une (ou des deux) nanoélectrode ou de la fine piste électrique reliant une nanoélectrode à la piste du deuxième niveau (en pointillés sur la figure 3.9-e). Par conséquent, nous estimons le taux de réussite à 17 % de la totalité des électrodes produites par lithographie e-beam (voir les parties 4.3 et 5.2).

3.3 Passivation et fonctionnalisation de la surface

3.3.1 Objectif

Afin de limiter l'adsorption non-spécifique des molécules biologiques sur la puce et de concentrer les protéines vers le gap, la surface va être recouverte de deux films moléculaires différents (partie 3.1.3). Le gap inter-électrodes doit être fonctionnalisé avec des groupements amines (qui feront par la suite l'objet d'une transformation en groupements semicarbazides), et le reste de la surface doit être passivé avec une molécule **A** (Figure 3.8). Cette molécule **A** est choisie en fonction de sa capacité à minimiser la physisorption des biomolécules. Ainsi, lors de l'immobilisation des sondes de biotine puis lors du dépôt de la streptavidine, les molécules biologiques devraient être confinées dans le voisinage des nanoélectrodes. Dans cette partie, nous décrivons les travaux réalisés pour mettre au point un protocole pour le greffage successif des deux films organiques, et pour sélectionner la terminaison **A**. Le résultat recherché est une séparation nette des propriétés de surface entre deux zones distinctes (Figure 3.14).

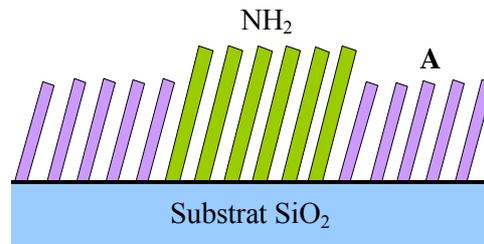


Figure 3.14: Greffage de deux films aux propriétés de surface différentes sur le substrat de SiO_2 . Le film A est sélectionné pour sa faculté à réduire l'adsorption non-spécifique des molécules biologiques. Des molécules d'APTMS constituent le second film organique. Les groupements amines, situés dans le voisinage des nanoélectrodes, seront transformés en fonctions semicarbazides pour permettre la fixation covalente des sondes biologiques.

3.3.2 Méthodes de fabrication envisagées

Deux procédés sont considérés pour déposer les deux films organiques (Figures 3.15 et 3.16). Dans les deux cas, un premier film est greffé sur l'ensemble du substrat. Puis une protection partielle du film est réalisée avec une résine. Des ouvertures effectuées dans la résine permettent de délimiter les zones sur la surface où le deuxième film doit être déposé [19]. Le premier film est alors détruit à l'aide d'une brève gravure plasma, et aussitôt remplacé par le second film organique. La figure 3.15 présente une première possibilité où les molécules d'APTMS constituent le premier film. La deuxième méthode débute avec une silanisation de la molécule A et utilise ensuite un masquage inverse pour arriver *a priori* au même résultat (Figure 3.16).

Méthode 1 :

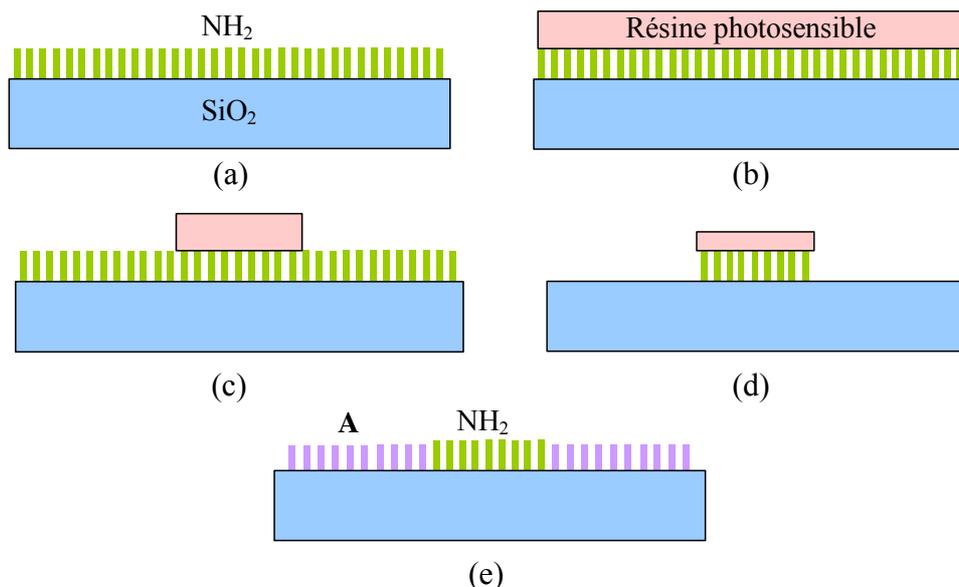


Figure 3.15: Première méthode envisagée pour déposer les deux films organiques. a) Dépôt du film d'APTMS. b) Dépôt d'une résine photosensible. c) Lithographie UV. d) Destruction du film découvert par plasma oxygène. e) Silanisation avec la molécule A et destruction de la résine.

Méthode 2 :

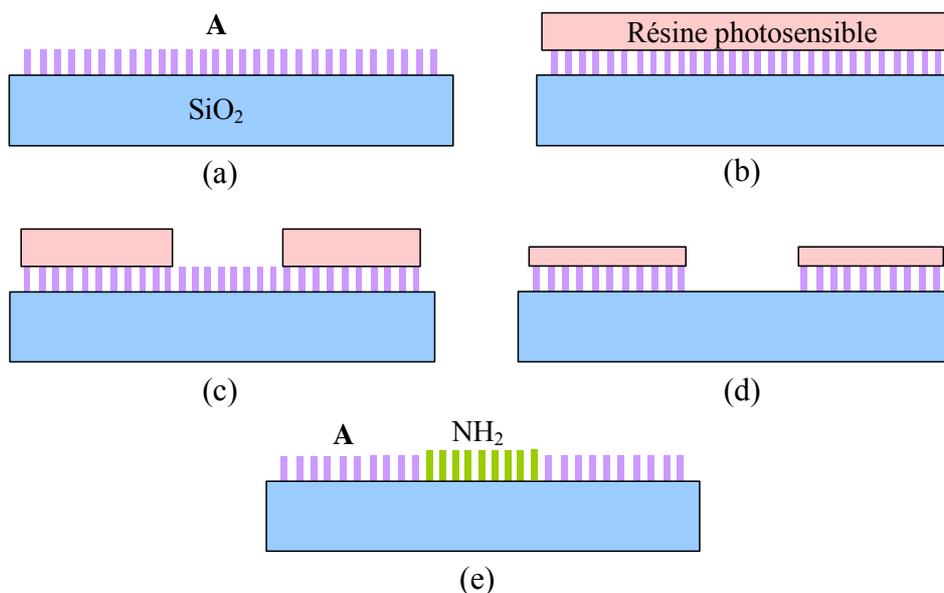


Figure 3.16: Seconde méthode envisagée pour déposer les deux films organiques. a) Silanisation de la molécule A. b) Dépôt d'une résine photosensible. c) Lithographie UV. d) Destruction du film découvert par plasma oxygène. e) Greffage des APTMS et destruction de la résine.

3.3.3 Masque utilisé pour délimiter les zones sur la surface

Une étude systématique a été réalisée avec un peptide marqué avec la rhodamine pour mettre au point le protocole de fabrication [3]. Le but était de retenir la méthode la plus efficace pour déposer les deux films organiques. Lorsque le greffage des deux films est réalisé, les fonctions semicarbazides sont, comme précédemment, mises en place par l'intermédiaire d'une synthèse *in situ* sur les groupements amines (Tableau 3.1). Puis la sonde peptidique est immobilisée, via la formation d'une liaison semicarbazone, pour vérifier la qualité du film de semicarbazide synthétisé.

L'observation en fluorescence des intensités obtenues sur les deux films permet de comparer le niveau de fluorescence sur les molécules A (quantité de molécules adsorbées) avec celui correspondant à l'ancrage covalent du peptide sur les terminaisons semicarbazides. Le masque optique employé pour cette étude est constitué d'ouvertures carrées en densité variable (Figure 3.17). Les dimensions des motifs sont décroissantes sur une ligne, de $100\ \mu\text{m}$ à $5\ \mu\text{m}$, afin de découvrir s'il existe une taille d'ouverture minimale en dessous de laquelle la silanisation et la fixation des sondes n'est plus possible, en raison de problèmes éventuels de mouillabilité dans de petites ouvertures.

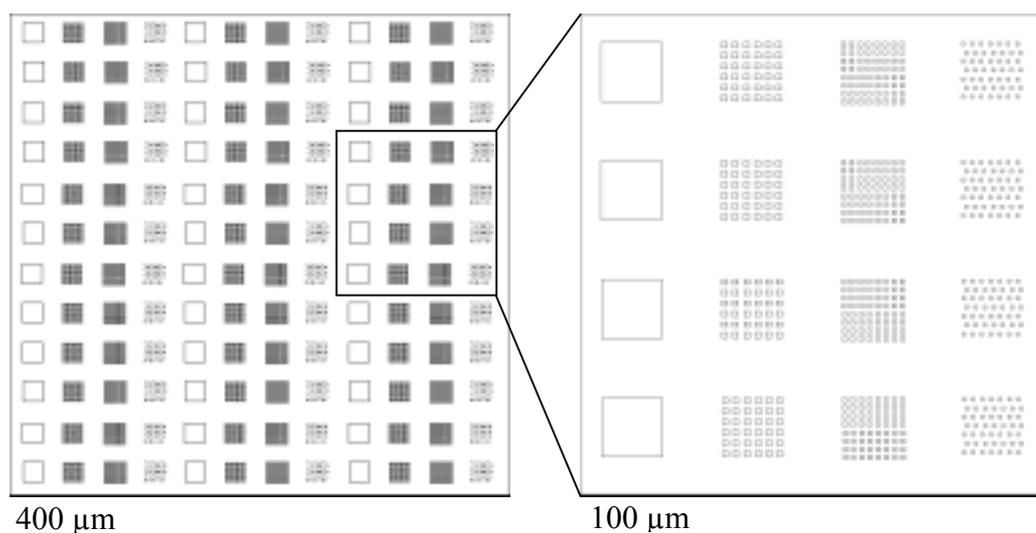


Figure 3.17: Masque optique employé pour l'étude de minimisation de l'adsorption des molécules biologiques. Les motifs sur une ligne sont successivement un carré de $100\ \mu\text{m}$ de côté, 6×6 carrés de $9\ \mu\text{m}$ de côté chacun, 8×8 carrés de $7\ \mu\text{m}$ de côté, et 7×7 carrés de $5\ \mu\text{m}$ de côté.

3.3.4 Surfaces de passivation envisagées

Les surfaces de passivation testées sont de plusieurs natures. Il y a d'une part des molécules auto-assemblées sur le substrat de SiO_2 , sur le modèle présenté à la figure 3.14. Mais des matériaux compacts ont également été envisagés : le substrat de SiO_2 lui-même, une fine couche de nitrure de silicium (épaisseur de $\text{Si}_3\text{N}_4 < 5\ \text{nm}$) issue d'un dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (*Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition, PECVD*) et un film amorphe de polystyrène.

En ce qui concerne les films moléculaires, trois groupements de surface ont été étudiés : méthyl, vinyl et fluor. Le premier groupe est porté par l'octadécyltrichlorosilane (OTS, $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{SiCl}_3$), préparé selon le protocole décrit au chapitre 2. Le film de vinyl est obtenu à partir du 7-octényltrichlorosilane ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{SiCl}_3$). La silanisation du « vinyl » est réalisée dans un mélange hexadécane:tétrachlorure de carbone en proportions 2:1 contenant $10^{-5}\ \text{M}$ de silane, pendant une nuit dans un bain thermostaté maintenu à 0°C . Les angles de contact mesurés sur ce groupement avec une goutte d'eau et d'hexadécane sont de $95 \pm 2^\circ$ et 0° respectivement. La terminaison fluor provient du 1H,1H,2H,2H-perfluorodécyl trichlorosilane ($\text{F}_3\text{C}-(\text{CF}_2)_7-(\text{CH}_2)_2-\text{SiCl}_3$). Le bain de silanisation est à nouveau un mélange hexadécane:tétrachlorure de carbone = 2:1 et contient $10^{-6}\ \text{M}$ de silane. La réaction est effectuée en deux heures à 0°C . L'angle de contact formé par une goutte d'eau DI est de $106 \pm 2^\circ$. Les silanes « vinyl » et « fluor » sont fournis par les sociétés Sigma-Aldrich et Gelest.

3.3.5 Molécule biologique employée

La qualité des terminaisons semicarbazides est testée après leur synthèse grâce à la fixation d'une sonde marquée avec la tétraméthylrhodamine. La molécule biologique utilisée est un dipeptide fonctionnalisé avec la terminaison α -oxo aldéhyde : le Rhodamine-Lys-Arg-NH-(CH₂)₃-NH-CO-CHO. L'emploi d'un peptide rhodaminé est simple et rapide, car la lecture en fluorescence des lames de verre est réalisée dès l'immobilisation de la sonde (soit un seul niveau de greffage, par opposition à des expériences qui seraient réalisées avec la streptavidine rhodaminée ou l'anticorps rhodaminé, comme dans les parties 4.1 et 5.1, qui nécessitent la fixation préalable de la biotine). Les conditions de dépôt du peptide sont décrites dans le tableau 3.4 [6].

Etape	Opérations réalisées
Incubation du peptide	10 ⁻⁴ M peptide avec rhodamine dans 0,1 M tampon acétate de sodium/acide acétique pH = 5,5 1 h 37°C agitation.
Lavages	Rinçage eau milliQ, lavage 5 % en masse d'hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄) dans eau (5 g dans 100 mL d'eau) 2 h ultrasons, 3 rinçages eau milliQ, lavage tampon Tris/acide acétique pH = 5,5 contenant 0,1 % Tween 20 30 min ultrasons, 2 rinçages eau milliQ, rinçage méthanol pur, séchage dans dessiccateur.

Tableau 3.4: Protocole de dépôt du peptide rhodaminé [6].

Les lames sont ensuite caractérisées au scanner à fluorescence Affymetrix 418 Array. Afin de pouvoir comparer les lames entre elles, les images sont toutes enregistrées avec le même niveau d'excitation et la même sensibilité d'acquisition (puissance du laser = L35, tube photo-multiplieur = PMT50). L'ordre des couleurs est, en niveaux croissants de fluorescence : noir, bleu, vert, jaune, rouge, blanc. Il est à noter que des expériences de contrôle sont effectuées en parallèle sur d'autres lames pour vérifier l'intégrité des produits chimiques utilisés. Pour cela, le peptide rhodaminé est déposé sous forme de spots sur un film organique fonctionnalisé semicarbazide sur l'ensemble de l'échantillon. Si les spots apparaissent avec le niveau de fluorescence attendu, le peptide rhodaminé et les produits chimiques sont considérés de bonne qualité. Les résultats obtenus sur les autres lames avec les mêmes produits sont donc considérés comme représentatifs.

3.3.6 Observations et discussion

a) Dépôt de la résine optique

La résine optique positive S1818 fournie par la société Shipley est utilisée pour réaliser les motifs de la figure 3.17. Cette résine peut être déposée sur toutes les surfaces testées, à l'exception de la monocouche d'OTS, par la méthode classique du dépôt de la résine en phase liquide, planarisation sur une tournette et durcissement par un recuit thermique rapide. Dans le cas du film d'OTS, la résine ne parvient pas à s'accrocher et est expulsée sur la tournette. Cette difficulté est probablement due à l'hydrophobicité du groupe terminal méthyl, qui empêche l'adhésion du polymère de la résine sur le film. Pour y remédier, on déposera une couche d'interface entre la résine S1818 et la monocouche d'OTS. Elle est réalisée avec du polystyrène (PS) dont la concentration est de l'ordre de 120 g/L. Cette couche de polystyrène étant elle aussi déposée sur tournette, nous avons pu constater qu'avec des concentrations de PS plus faibles (70 g/L), la continuité et l'homogénéité du film de PS n'est pas assurée en raison d'une viscosité insuffisante pendant la rotation (observation à l'œil nu).

b) Classement des niveaux d'adsorption

Les surfaces A potentielles ont tout d'abord été déposées de manière uniforme sur différentes lames de verre (« dépôt pleine plaque » d'une seule couche), et observées en fluorescence. L'intensité mesurée correspond à l'adsorption non-spécifique du dipeptide sur un type de surface particulier. Le greffage pleine plaque du peptide sur une lame fonctionnalisée semicarbazide a aussi été réalisé et sert de référence. Quelques résultats sont présentés sur la figure 3.18. Pour faciliter les comparaisons, toutes les images en fluorescence présentées dans cette partie ont été recadrées aux mêmes dimensions (Images 2,4 x 2,4 mm²).

Un premier classement entre les surfaces peut être proposé (Figure 3.18-d). Les surfaces pour lesquelles les peptides présentent une affinité minimale sont l'OTS (Figure 3.18-c) et le polystyrène. Dans les deux cas, l'adsorption constatée est quasiment nulle, les substrats apparaissant très sombres sur les images en fluorescence. En revanche, l'adsorption sur les substrats SiO₂ et Si₃N₄ est caractérisée par une fluorescence proche de l'ancrage du peptide sur semicarbazide (Figure 3.18-a). L'adsorption sur les groupements fluor et vinyl est supérieure à la fixation covalente sur semicarbazide (Figure 3.18-d). L'affinité du peptide est même très élevée dans le cas du groupement vinyl. Des interactions π - π entre les cycles de la rhodamine et les doubles liaisons des groupements de surface vinyls pourraient être à l'origine de cette très forte physisorption.

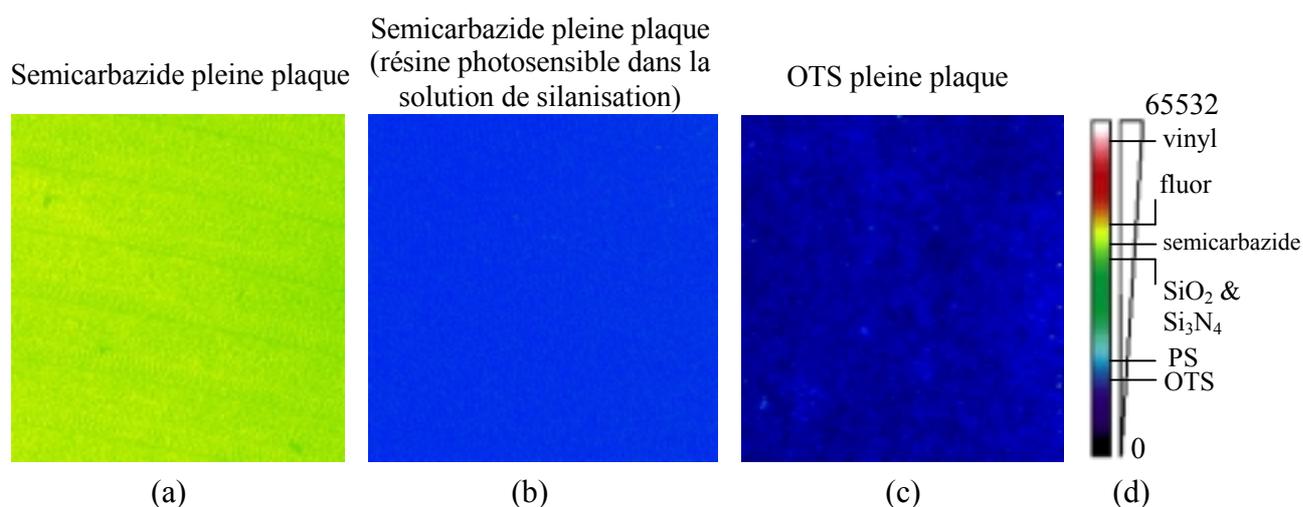


Figure 3.18: a, b et c) Observation en fluorescence des films organiques de semicarbazide et d'OTS greffés sur un substrat de SiO₂. Images 2,4 x 2,4 mm² ; niveau de fluorescence L35 PMT50. Dans le cas de la deuxième image, de la résine S1818 était présente en faible concentration dans la solution lors du greffage des APTMS. d) Classement des intensités obtenues après différents modes de passivation.

c) Dégradation du film d'ancrage par la résine optique

Nous avons constaté, lors du greffage des molécules d'APTMS, une très forte baisse de l'intensité de fluorescence lorsqu'un peu de résine optique S1818 est présente dans le bain de silanisation (Figures 3.18-a et b). La fluorescence obtenue devient même plus faible que celle correspondant au niveau d'adsorption du peptide sur le substrat de SiO₂ (Figures 3.18-b et d). Par conséquent, le nombre de terminaisons semicarbazides disponibles, à la fin de la synthèse, pour la fixation d'un peptide, est très bas quand de la résine est présente pendant l'assemblage des APTMS.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat. Une réaction chimique entre les têtes greffantes des APTMS et le polymère de la résine peut aboutir à l'inactivation d'une partie des molécules et empêcher ainsi leur greffage sur le substrat isolant. Une autre explication, non-exclusive de la première, est la réalisation d'une réaction chimique entre les groupements de surface amines des APTMS et la résine. Les terminaisons amines étant devenues massivement inaccessibles, les fonctions semicarbazides ne peuvent plus être synthétisées, ce qui entraîne l'impossibilité de fixer le peptide sur la surface. Remarquons que, d'après le niveau de fluorescence constaté sur la figure 3.18-b, les peptides s'adsorbent en très faibles quantités sur un tel film.

d) Etude de la première méthode de passivation

L'inactivation des groupements amines au contact de la résine optique a pour conséquence d'éliminer la première stratégie envisagée pour le dépôt successif des deux couches organiques, puisque, avec la méthode 1, un masque de résine doit être déposé au-dessus du film d'APTMS (Figure 3.15). Pour confirmer cette hypothèse, cette technique a été appliquée, en utilisant les molécules d'OTS en tant que molécules A (Figure 3.19). Pour cela, un film d'APTMS est assemblé sur la surface, puis recouvert de 1,5 μm de résine S1818. Une insolation UV est effectuée à travers le masque optique de la figure 3.17, suivie d'une révélation des motifs avec le développeur MF 319 et d'une destruction de la couche organique apparente avec une brève gravure plasma. L'échantillon est alors plongé dans un bain de silanisation d'OTS (Figure 3.19). Puis la résine est enlevée avec de l'acétone agitée par ultrasons. La lame est finalement rincée avec de l'eau DI et séchée avec un pistolet d'azote sec. Le protocole de synthèse de la terminaison semicarbazide est alors appliqué (Tableau 3.1) et le peptide rhodaminé est déposé sur l'échantillon (Tableau 3.4).

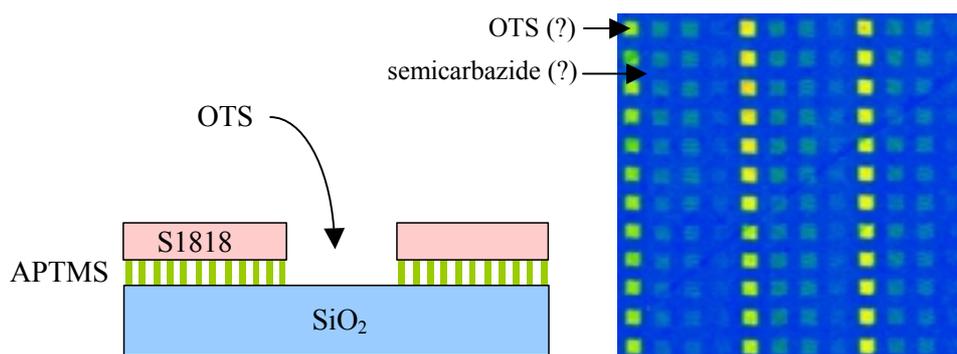


Figure 3.19: Observation en fluorescence d'une couche de semicarbazide (APTMS) avec des ouvertures d'OTS. La résine est retirée avant de réaliser l'image en fluorescence. Image 2,4 x 2,4 mm^2 ; niveau de fluorescence L35 PMT50.

L'observation de ces lames au scanner montre que, entre les ouvertures carrées, le niveau de fluorescence du fond de l'image est très bas (Figure 3.19) et comparable à celui mesuré sur la figure 3.18-b. Par conséquent, recouvrir le film d'APTMS d'une couche de résine rend celui-ci inutilisable pour la suite de la synthèse, les groupements amine ayant précédemment réagi avec le polymère de la résine. Ainsi, la densité de terminaisons semicarbazides opérationnelles pour l'ancrage du peptide est très faible, d'après la fluorescence dans le fond de l'image. Remarquons toutefois que la consommation des groupes $-\text{NH}_2$ est un peu moins importante si une résine électronique, de type COPO ou PMMA, est déposée à la place de la résine optique au-dessus du film d'APTMS (autres images non-présentées).

En revanche, le signal enregistré dans les fenêtres d'ouverture est plus élevé que celui obtenu sur la figure 3.18-c. L'intensité de fluorescence constatée dans les ouvertures carrées correspond au niveau d'adsorption du peptide sur le substrat de SiO₂ (Figure 3.18-d), ce qui indique que le groupe méthyl hydrophobe des OTS n'est pas présent sur la surface. Nous faisons l'hypothèse que, comme pour les APTMS, les têtes greffantes des OTS deviennent inopérantes au contact de la résine. Pour les OTS, la tête greffante est un groupe –SiCl₃, plus réactif à son environnement chimique que le groupement –Si(O–CH₃)₃ des APTMS. Il est donc probable que la quasi-totalité des têtes greffantes des molécules d'OTS ait réagi avec la résine déposée sur la surface, ou avec de la résine partiellement solubilisée dans la solution.

e) Etude de la seconde méthode de passivation

Dans la seconde stratégie, la silanisation amine est réalisée à la fin du procédé lorsque la première couche organique est détruite localement à l'aide d'une gravure plasma (Figures 3.16-d et e). Le contact des molécules d'APTMS avec la résine optique est donc plus bref que lors de la première méthode : la couche de résine n'est pas directement répandue sur les APTMS et le greffage est réalisé en 30 minutes (bain de 7 h dans le cas des OTS). L'inactivation des têtes greffantes et des groupes amines devrait donc être limitée, compte tenu de la grande quantité d'APTMS dans la solution par rapport au nombre de molécules pouvant se greffer dans les ouvertures (silanes en fort excès). Après le greffage, la résine est retirée avec de l'acétone, et les lames sont rincées à l'eau DI et séchées sous flux d'azote sec. Les groupements amine sont transformés en semicarbazides (Tableau 3.1) et le peptide marqué avec la rhodamine est incubé sur l'ensemble des lames (Tableau 3.4).

Cette seconde méthode a été appliquée avec les différents types de surface **A** envisagées. Trois exemples sont présentés à la figure 3.20. Concernant des comparaisons d'adsorption de peptides sur différents films organiques, des descriptions supplémentaires basées sur une étude systématique peuvent être trouvées dans la thèse de Thomas Heim [3]. Dans tous les cas, le greffage du dipeptide dans les ouvertures carrées est faible. Malgré des conditions de dépôt plus favorables, l'intensité de fluorescence se révèle identique à celles obtenues aux figures 3.18-b et 3.19. Ici encore les groupements de surface amines et les têtes greffantes des APTMS ont réagi avec la résine optique lors de la silanisation. Ce fait témoigne de l'impact important du polymère de la résine sur les molécules en solution.

D'une manière générale, l'adsorption observée sur les surfaces **A** est identique ou proche de celle mesurée sur les dépôts pleine plaque (Figures 3.20-a et c par rapport à la figure 3.18-d). Seule l'adsorption sur le groupement vinyl est moindre que celle obtenue précédemment, bien que toujours élevée (Figure 3.20-b). La monocouche d'OTS, caractérisée

par une faible fluorescence, est la seule surface pour laquelle la physisorption des dipeptides se révèle inférieure à la chimisorption des molécules biologiques sur les groupements semicarbazides (Figure 3.20-c), tandis que la couleur obtenue sur les films de PS est quasiment la même que celle sur semicarbazide (autre image non-présentée).

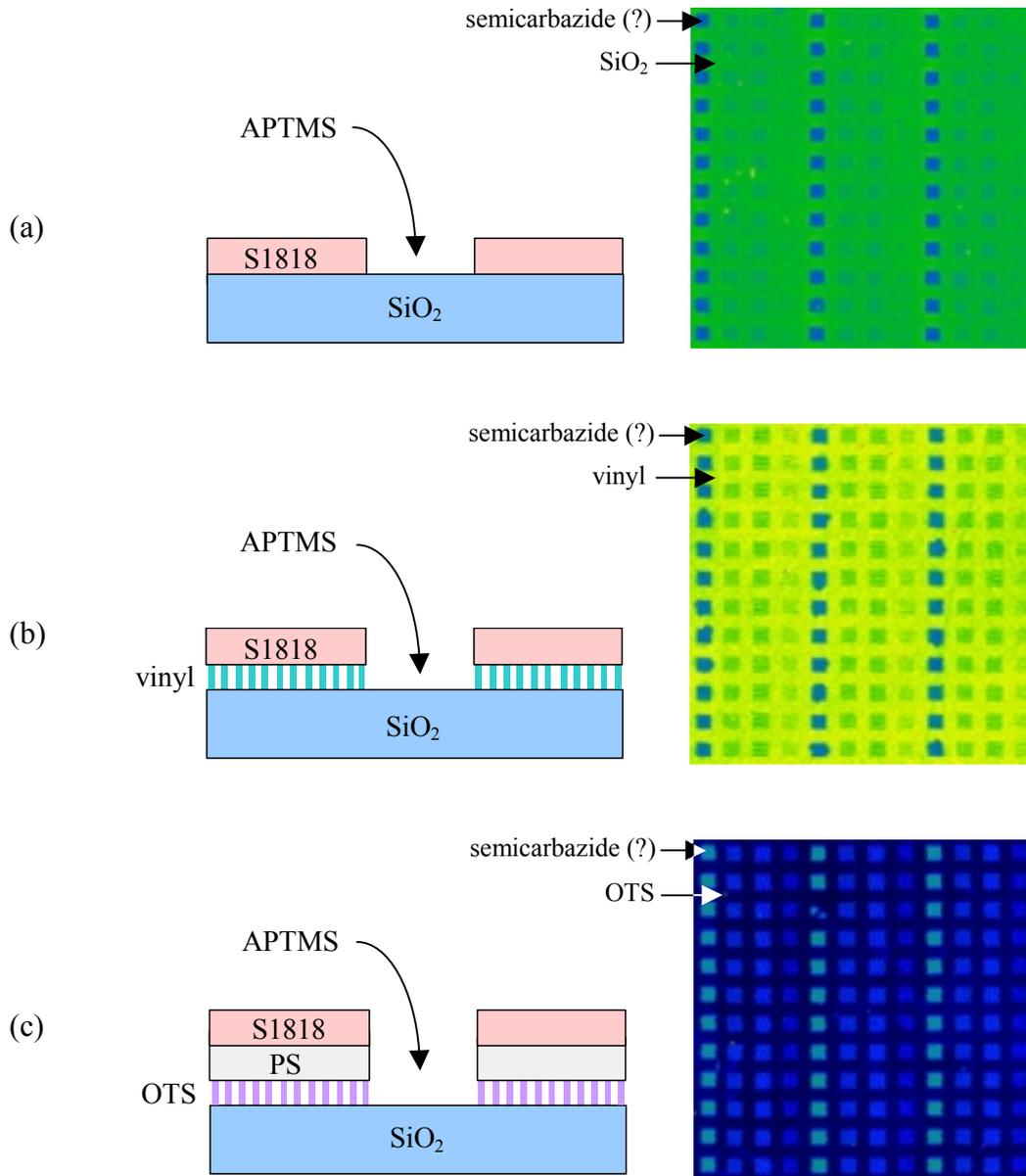


Figure 3.20: Exemples de discrimination des propriétés de surface réalisée selon le second protocole (Figure 3.16). La résine est retirée avant de réaliser les images en fluorescence. Images $2,4 \times 2,4 \text{ mm}^2$; niveau de fluorescence L35 PMT50. a) Greffage des APTMS dans les ouvertures, le reste de la surface de SiO_2 étant protégé par de la résine optique. b) Couche terminée vinyl avec des ouvertures de semicarbazide (greffage des APTMS dans des ouvertures réalisées dans la résine). c) Monocouche d'OTS avec des ouvertures de semicarbazide (greffage des APTMS dans des ouvertures réalisées dans la résine optique et la couche d'interface de polystyrène).

Une adaptation de la seconde méthode de dépôt permet d'améliorer le rapport de fluorescence recherché : un fond noir et des ouvertures de semicarbazide caractérisées par une couleur jaune-verte, ce qui correspond à une densité de peptides immobilisés identique à celle mesurée sur la figure 3.18-a. Pour cela, la résine et la couche de polystyrène sont retirées avant le greffage des APTMS. La pollution des groupements amines par la résine optique est ainsi évitée, et les fonctions semicarbazides opérationnelles sont construites en densité suffisante.

f) Choix de la surface de passivation

Les observations précédentes ont montré que deux types de surface permettent d'obtenir une faible adsorption non-spécifique des peptides hors de la surface fonctionnalisée : la monocouche d'OTS et le film de polystyrène (Figure 3.18-d). Parmi toutes les surfaces testées, le niveau de fluorescence le plus bas est obtenu avec les molécules d'OTS. De plus, la formation d'un film monomoléculaire d'OTS est relativement facile à réaliser avec un taux de succès de quasiment 100 %. Enfin, l'utilisation d'un film de PS déposé sur un substrat de SiO₂ présente deux défauts : le risque de créer des trous dans la couche si l'épaisseur de PS est trop fine, et celui de gêner la pénétration du liquide dans l'ouverture si son épaisseur est trop importante. L'assemblage sur les échantillons d'un groupement de surface -CH₃ hydrophobe permet en outre de confiner des microgouttes de solvant au-dessus de la zone des nanoélectrodes, comme nous avons pu l'observer à l'œil nu (voir la partie 4.3.1).

Le protocole de fonctionnalisation et de passivation des deux films a été établi avec un dipeptide composé d'acides aminés basiques (lysine et arginine). Cependant, bien que les résultats concernant les niveaux d'adsorption sur les différentes surfaces A ne sont pas directement transposables à d'autres molécules, en particulier à des protéines telles que la streptavidine ou un anticorps, notre choix s'est porté sur les molécules d'OTS. En effet, nous avons supposé que, en raison de l'hydrophobicité du groupement terminal, la monocouche d'OTS pouvait être appliquée pour empêcher l'adsorption de la biotine, de la streptavidine et de l'anticorps anti-biotine. Nous avons ainsi vérifié par la suite, sur des observations à l'AFM, qu'une diminution importante de la physisorption de la biotine et, dans une moindre mesure, de la streptavidine est bien constatée sur cette monocouche (Figures 4.14 et 4.20-c).

3.3.7 Protocole adopté

Le procédé retenu pour le dépôt successif des films d'OTS et d'APTMS est décrit dans son ensemble au tableau 3.5 et illustré à la figure 3.21. Tout d'abord, la passivation du substrat de SiO_2 vis-à-vis des molécules biologiques est réalisée grâce à l'auto-assemblage d'une monocouche hydrophobe d'OTS (Figure 3.21-a). Un film de PS (Figure 3.21-b), puis la résine optique S1818 (Figure 3.21-c), sont ensuite déposés. Une illumination UV de la résine à travers un masque optique, suivie de la révélation de la résine insolée dans une solution de MF 319, permet de définir les motifs où la couche d'APTMS doit être greffée (Figure 3.21-d). Les échantillons sont ensuite rincés à l'eau DI et séchés avec un pistolet d'azote sec. Remarquons cependant que la pression du flux d'azote doit être très faible, car dans le cas contraire la couche de PS tend à se décoller d'un seul coup (Tableau 3.5).

L'étape cruciale de ce procédé concerne la gravure plasma O_2 , dont le rôle est d'attaquer la couche découverte de PS et la monocouche d'OTS sous-jacente. En fin de gravure, le substrat de SiO_2 devient apparent dans les motifs, tandis que le reste de la puce demeure recouverte d'un film de protection. Afin d'éviter une étape de lift-off de la résine S1818 après la gravure, le rapport entre les épaisseurs de résine et de PS est ajusté pour que la gravure s'arrête dans la couche de PS, c'est-à-dire pour que la résine ait été détruite entièrement en fin de plasma (Figure 3.21-e). Pour cela, l'épaisseur du film de PS est choisie supérieure à celle de la résine, afin que la gravure du PS dans les motifs s'accompagne automatiquement de la destruction complète de la résine (Tableau 3.5).

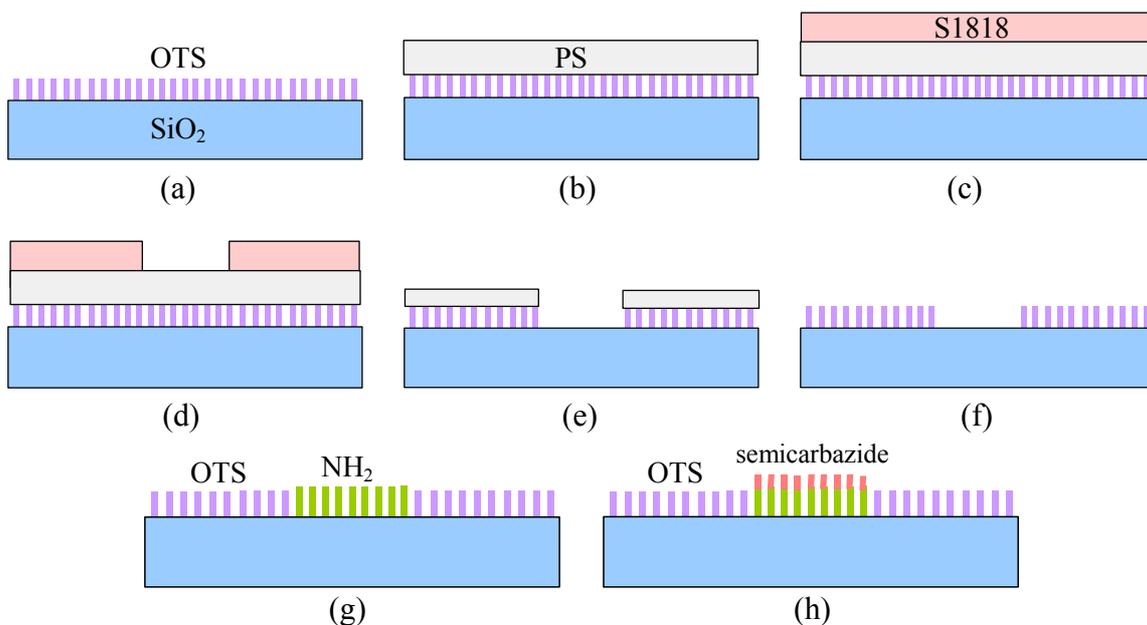


Figure 3.21: Méthode de dépôt des films d'OTS et d'APTMS. a) Silanisation des OTS sur un substrat de SiO_2 . b) Dépôt de la couche de polystyrène. c) Dépôt de la résine photosensible. d) Lithographie UV. e) Destruction du film découvert, ainsi que la résine optique, par plasma oxygène. Cette opération est arrêtée dans la couche de PS. f) Retrait de la couche de PS. g) Greffage des APTMS. h) Synthèse des fonctions semicarbazides.

Etape	Opérations réalisées
Nettoyage du substrat	<i>Dégraissage</i> chloroforme 5 min ultrasons, séchage azote sec. <i>Ashering</i> plasma O ₂ 180 nm/min : O ₂ = 20 sccm 0,1 Torr 100 W 20 sec.
Silanisation OTS ¹ (Figure 3.21-a)	1,3 x 10 ⁻⁶ M OTS dans mélange hexadécane:tétrachlorure de carbone = 2:1 7 h, rinçage chloroforme 5 min ultrasons, séchage azote sec.
Masquage	<i>Dépôt</i> 2,0 µm polystyrène 120 g/L dans toluène (Figure 3.21-b). <i>Résinage</i> 1,25 µm S1818 ² , recuit sur plaque 110°C 1 min (Figure 3.21-c). <i>Insolation UV</i> masque optique. <i>Révélation</i> MF 319 1 min, rinçage eau DI, séchage <u>très doux</u> azote sec (Figure 3.21-d).
Destruction locale de la monocouche d'OTS	<i>Gravure plasma</i> de la résine S1818 (180 nm/min), du PS (160 nm/min) et monocouche OTS (< 1 sec): O ₂ = 20 sccm 0,1 Torr 100 W 15 min, arrêt de la gravure dans PS (Figure 3.21-e). <i>Retrait PS</i> toluène + ultrasons 5 min, rinçage eau DI, séchage azote sec (Figure 3.21-f).
Greffage des APTMS (Figure 3.21-g) ³	Rinçage méthanol absolu, 1,7 x 10 ⁻⁴ M APTMS dans mélange méthanol:eau = 95:5 ultrasons 30 min, rinçage méthanol pur, 2 rinçages eau milliQ, rinçage méthanol pur, séchage étuve 110°C 15 min.
Synthèse groupement semicarbazide (Figure 3.21-h) ³	0,1 M triphosgène / 0,8 M DIEA dans 1,2-dichloroéthane ultrasons 2 h. 22 mM H ₂ N-NH-Fmoc dans DMF ultrasons 2 h, 2 rinçages DMF. 2,2 x 10 ⁻⁵ M piperidine / 1,4 x 10 ⁻⁴ M DBU dans DMF 30 min, rinçage DMF, 2 rinçages eau milliQ, rinçage méthanol pur, séchage dans dessiccateur, stockage à l'abri de la lumière.

¹ OTS : octadécyltrichlorosilane.

² Résine S1818 : résine photosensible positive fournie par la société Shipley.

³ Etapes décrites au tableau 3.1.

Tableau 3.5: Processus de dépôt des films d'OTS et d'APTMS.

Le polystyrène est alors dissous dans un bain de toluène agité par ultrasons (Figure 3.21-f). Le retrait du PS est quasi-automatique pour de faibles épaisseurs avec ce solvant, tandis que le décrochage s'avère très long dans une solution d'acétonitrile. Nous avons constaté au microscope optique que le PS peut être difficile à enlever si son épaisseur initiale

est trop grande ($> 5 \mu\text{m}$), des traces de polystyrène demeurant parfois en certains endroits. Ces marques sont évitées avec des épaisseurs de PS plus faibles. La figure 3.20-c montre ainsi en fluorescence une monocouche d'OTS après le retrait total du PS (fond uniformément noir, couleur bleu clair sur PS). En outre, la gravure plasma du PS s'avère inutilement longue avec de grandes épaisseurs.

Après cette étape, le greffage des APTMS est réalisé de manière classique dans un solvant de méthanol contenant 5 % d'eau (Tableaux 3.1 et 3.4, figure 3.21-g). Puis les groupements de surface amines sont transformés en fonctions semicarbazides (Figure 3.21-h).

3.3.8 *Passivation et fonctionnalisation de plaquettes de silicium*

a) Principe de la démarche

Les expériences en fluorescence réalisées précédemment ont été exécutées sur des lames de verre, car le scanner à fluorescence Affymetrix 418 Array est conçu pour ce type de support. Nous avons souhaité valider le protocole retenu sur des substrats de silicium monocristallin. En effet, les nanoélectrodes sont construites sur de tels échantillons. Or, la rugosité des plaquettes de silicium est très inférieure à celle des lames de verre, ce qui peut potentiellement modifier les rendements des réactions de greffage. De plus, il n'est pas certain que le nombre de silanols disponibles sur le substrat soit identique pour les deux types d'échantillon.

Les OTS et les APTMS sont donc greffés tour à tour sur l'oxyde natif de plaquettes de silicium en se conformant à la méthode de dépôt décrite plus haut. Les terminaisons semicarbazides ont ensuite été synthétisées, et une goutte d'un tampon acétate de sodium/acide acétique pH 5,5 contenant le dipeptide Rhodamine-Lys-Arg-NH-(CH₂)₃-NH-CO-CHO à la concentration de 10^{-4} M a été étalée sur une partie des échantillons (Tableau 3.4). Un second peptide marqué avec la rhodamine mais ne portant pas la fonction -CO-CHO, le Rhodamine-Lys-Arg-NH₂, a été incubé sur d'autres échantillons afin d'évaluer la quantité de molécules physisorbées [6].

Dans le scanner à fluorescence, la focale du laser est réglée sur une hauteur d'environ 1 mm par rapport au porte-échantillon, ce qui correspond à l'épaisseur d'une lame de verre ($0,970 \pm 0,008$ mm). Ainsi, pour que les plaquettes de silicium soient placées à la bonne hauteur, leur épaisseur plus faible a été compensée par de fines lames métalliques découpées selon les dimensions des lames de verre.

b) Observations

Les résultats sur des monocouches d'OTS comportant des ouvertures carrées de semicarbazide (Figure 3.17), ainsi que sur des monocouches d'OTS silanisées sur l'ensemble de la surface (« OTS pleine plaque »), sont présentés au tableau 3.6. Remarquons que pour les deux images en haut à gauche, la goutte n'est pas écrasée sur le substrat et qu'aucun lavage postérieur n'est réalisé après l'incubation ; ainsi, la trace des gouttes sur la surface devrait apparaître très intense en fluorescence, compte tenu de la densité extrêmement élevée de marqueurs adsorbés à cet endroit (expérience de contrôle des intensités de fluorescence mesurées).

Nous pouvons voir sur ce tableau que la fluorescence est moindre sur la monocouche d'OTS que celle dans les ouvertures de semicarbazide, ce qui semble confirmer le rôle de passivation du substrat obtenu avec le groupement de surface $-CH_3$. Comme attendu, la fluorescence dans les ouvertures de semicarbazide n'est constatée que dans le cas du peptide fonctionnalisé $-CO-CHO$. De plus, l'adsorption du dipeptide Lys-Arg-NH₂ n'est pas perceptible sur le film de semicarbazide.

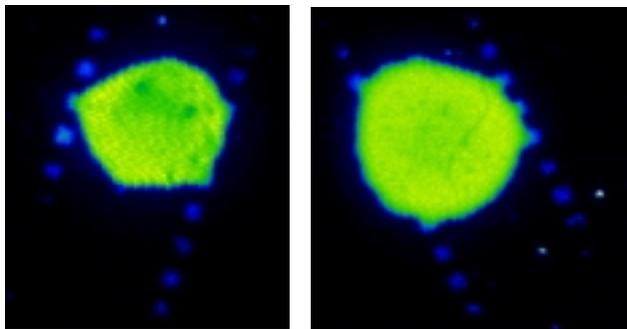
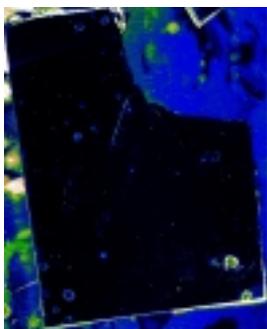
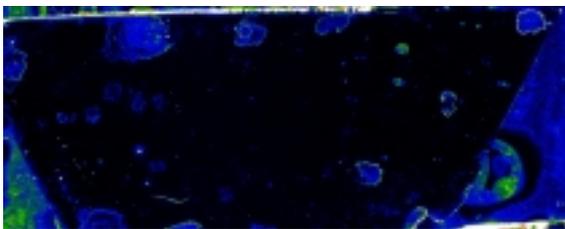
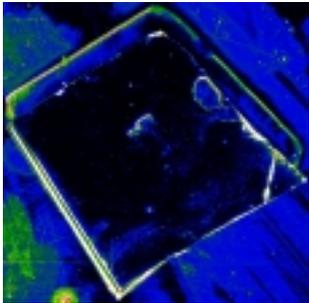
	OTS avec des ouvertures de semicarbazide	OTS pleine plaque
Rhodamine-Lys-Arg-NH- (CH ₂) ₃ -NH-CO-CHO		
Rhodamine-Lys-Arg-NH ₂		

Tableau 3.6: Fluorescence observée sur des plaquettes de silicium recouvertes d'un film d'OTS et mises en contact avec différents peptides rhodaminés. En haut à gauche, des gouttes du solvant contenant le peptide fonctionnalisé $-CO-CHO$ ont été séchées directement sur la surface sans effectuer de lavage postérieur (grandes traces vert-jaune).

On peut toutefois remarquer que l'intensité de fluorescence obtenue sur les traces des gouttes séchées ne correspond pas au maximum de l'échelle. En effet, les gouttes séchées, que l'on peut voir à l'œil nu, devraient apparaître blanches en fluorescence car la densité de rhodamines adsorbées dans cette zone est extrêmement élevée. Or, la couleur observée ne demeure qu'autour du vert-jaune, et ceci bien que le scanner ait été réglé à sa sensibilité maximale pour ces images. Cette diminution de l'intensité de fluorescence dans les traces est également constatée dans les ouvertures de semicarbazide (obtention d'une couleur bleue au lieu de verte).

c) Origine de l'atténuation des signaux

Le phénomène à l'origine de la réduction du signal fluorescent a été étudié par plusieurs auteurs [20, 21]. Il apparaît en effet que l'intensité d'excitation des marqueurs fluorescents dépend de l'épaisseur de la couche de SiO_2 [20]. Le faisceau lumineux incident pénètre partiellement dans la couche de SiO_2 , est réfléchi à l'interface $\text{SiO}_2\text{-Si}$, puis interfère avec le faisceau incident (Figure 3.22-a).

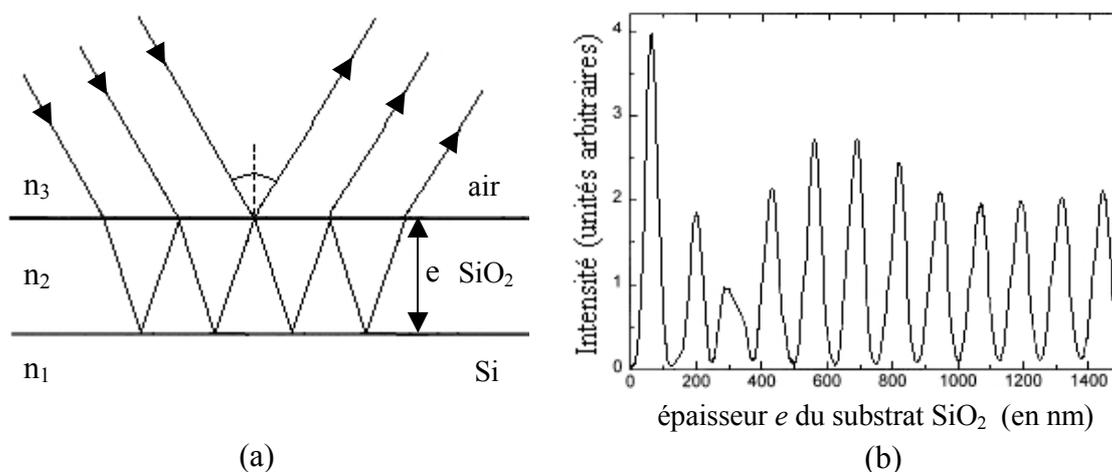


Figure 3.22: Formation d'interférences sur la surface en fonction de l'épaisseur de la couche de SiO_2 (d'après [20]). a) Schéma de principe des chemins optiques. b) Intensité de fluorescence en fonction de la distance e entre les fluorophores greffés sur la surface et l'interface $\text{SiO}_2\text{-Si}$. Les calculs sont réalisés ici pour le marqueur cyanine S9 excité à $\lambda_{exc.} = 366 \text{ nm}$, de longueur d'onde émise centrée sur $\lambda_{ém.} = 430 \text{ nm}$.

Suivant l'épaisseur du substrat de SiO_2 , des interférences destructives du faisceau laser au niveau de la surface peuvent être créées. De plus, ce phénomène se répète avec la lumière réémise par les marqueurs fluorescents, dont une partie est émise directement vers le capteur et l'autre se réfléchit d'abord sur l'interface $\text{SiO}_2\text{-Si}$, formant ainsi de nouvelles interférences

au niveau du capteur. Les interférences créées sur l'onde incidente empêchent alors l'excitation des marqueurs fluorescents sur la surface, tandis que les interférences créées sur l'onde émise modifient le signal au niveau du capteur. Par conséquent, l'intensité enregistrée par le tube photo-multiplieur est fortement atténuée, sans comparaison avec la quantité réelle de rhodamines présentes sur la surface.

Ce phénomène d'interférences destructives de la lumière incidente au niveau de la surface et de la lumière émise au niveau du capteur est modulé par l'épaisseur de la couche de SiO_2 . Ainsi l'intensité de fluorescence des marqueurs varie en fonction de l'épaisseur de la couche isolante suivant une série d'amplitudes gaussiennes (Figure 3.22-b). Dans notre cas, l'épaisseur du SiO_2 correspond à l'oxyde natif d'une plaquette de silicium (~ 1 nm). D'après Lambacher, cette hauteur coïncide avec un minimum de l'intensité d'excitation [20]. De plus, lorsque les molécules sont regroupées sur le substrat, des transferts électroniques intermoléculaires entre les rhodamines peuvent désexciter les marqueurs. Par conséquent, la fluorescence de la rhodamine sur la surface (dans les traces des gouttes de solvant séchées, et dans les ouvertures de semicarbazide où sont greffés les peptides) apparaît fortement atténuée par rapport au signal qui serait obtenu sur une lame de verre.

Cependant, la différence de signal entre les ouvertures de semicarbazide et la monocouche d'OTS tend à montrer que la passivation de plaquettes de silicium est réalisée de façon convenable avec les molécules d'OTS. Ce point sera vérifié au chapitre suivant par des observations en microscopie à force atomique (voir au chapitre 4 les figures 4.14 et 4.20). En revanche, le contrôle de la qualité des terminaisons semicarbazides dans les ouvertures n'a pas pu être réalisé. Cette validation doit encore être effectuée sur de nouveaux échantillons comportant une épaisseur d'oxyde plus adaptée (pics d'intensité sur le modèle de la figure 3.22-b).

3.4 Conclusion

Nous avons décrit dans ce chapitre la technique utilisée pour fabriquer des nanoélectrodes parallèles sur de grandes distances (de 5 à 30 μm) et séparées par un gap typiquement inférieur à 100 nm. Il est apparu que le rendement de production des électrodes dépend principalement de la distance entre les nanoélectrodes, mais pas de la longueur des électrodes. Une opération technologique cruciale, à l'origine de la majeure partie des courts-circuits constatés, est l'étape de destruction de la résine (lift-off) après l'évaporation du métal, en raison de la difficulté d'accès de la résine entre les électrodes.

Puis, le principe de fixation des sondes biologiques sur une surface d'oxyde de silicium a été présenté. L'immobilisation des sondes repose sur le greffage d'un film de 3-aminopropyltriméthoxysilane (APTMS), dont la terminaison amine est ensuite transformée en fonction semicarbazide. L'ancrage des molécules-sondes est alors effectué par l'intermédiaire d'une réaction entre les terminaisons semicarbazides et un groupement α -oxo aldéhyde (ligation semicarbazone). La sonde employée dans les chapitres 4 et 5 est une molécule de biotine fonctionnalisée avec le groupe $-\text{CO}-\text{CHO}$. L'interaction entre la biotine et la streptavidine, étudiée au prochain chapitre, a également été décrite.

Enfin, un procédé a été développé permettant de délimiter les propriétés de surface grâce au greffage successif de deux films organiques différents sur le substrat. L'objectif est de réduire l'adsorption non-spécifique des molécules biologiques sur l'échantillon et de confiner ainsi les biomolécules dans le voisinage immédiat des nanoélectrodes. La surface de passivation sélectionnée est une monocouche d'octadécyltrichlorosilane (OTS). Nous avons observé que l'ordre de dépôt des deux films moléculaires est imposé par l'inactivation des APTMS en présence de la résine optique. Par conséquent, la résine doit être détruite avant le greffage du deuxième film organique, afin d'éviter une réaction chimique entre les têtes greffantes des molécules et le polymère de la résine.

Bibliographie

- [1] J. Collet, *Thèse*, Université de Lille 1 (1997).
Monocouches organiques fonctionnalisées. Propriétés structurales et électriques ; composants électroniques à l'échelle du nanomètre
- [2] S. Lenfant, *Thèse*, Université de Lille 1 (2001).
Monocouches organiques auto-assemblées pour la réalisation de diodes moléculaires
- [3] T. Heim, *Thèse*, Université de Lille 1 (2002).
Transport électronique dans l'ADN
- [4] M.S. Shchepinov, S.C. Case-Green et E.M. Southern, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1155 (1997).
Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays
- [5] O. Melnyk, X. Duburcq, C. Olivier, F. Urbès, C. Aurialt et H. Gras-Masse, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 713 (2002).
Peptide arrays for highly sensitive and specific antibody-binding fluorescence assays
- [6] C. Olivier, D. Hot, L. Huot, N. Ollivier, O. El-Madhi, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, H. Gras-Masse, Y. Lemoine et O. Melnyk, à paraître dans *Bioconjugate Chem.* (2003).
 α -oxo semicarbazone peptide or oligodeoxynucleotide microarrays
- [7] R.K. Iler, *The Chemistry of Silica*, **John Willey & sons** (1979)
- [8] L.T. Zhuravlev, *Langmuir*, **3**, 316 (1987).
Concentration of hydroxyl groups on the surface of amorphous silicas
- [9] J.V. Davidovits, *Thèse*, Université Paris 6 (1998).
Détermination des conditions d'obtention de films monomoléculaires organisés : application aux silanes auto-assemblés sur silice
- [10] W. Bains, *Dictionnaire des biotechnologies*, **AFNOR** (1996).
- [11] L. Chalet et F.J. Wolf, *Arch. Biochem. Biophys.*, **106**, 1 (1964).
The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*
- [12] N.M. Green, *Methods Enzymol.*, **184**, 51 (1990).
Avidin and streptavidin
- [13] T. Lazaridis, A. Masunov et F. Gandolfo, *Proteins*, **47**, 194 (2002).
Contributions to the binding free energy of ligands to avidin and streptavidin
- [14] P.C. Weber, D.H. Ohlendorf, J.J. Wendoloski et F.R. Salemme, *Science*, **243**, 85 (1989).
Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin
- [15] La structure de la streptavidine (tétramère) est présentée sur le site de l'Université de New York.
<http://blakey.sci.cny.cuny.edu/biotin/>
- [16] La structure de la streptavidine (monomère) est présentée sur le site de la Protein Data Bank, du Brookhaven National Laboratory.
<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1stp>
- [17] W.A. Hendrickson, A. Pahler, J.L. Smith, Y. Satow, E.A. Merritt et R.P. Phizackerley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 2190 (1989).
Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation
- [18] L. Breuil, *Thèse*, Université de Lille 1 (2000).
Formation de nano-domaines dans les monocouches mixtes d'alkylsilanes sur silicium
- [19] K.H. Choi, J.P. Bourgoïn, S. Auvray, D. Esteve, G.S. Duesberg, S. Roth et M. Burghard, *Surface Science*, **462**, 195 (2000).
Controlled deposition of carbon nanotubes on a patterned substrate
- [20] A. Lambacher et P. Fromherz, *Appl. Phys. A*, **63**, 207 (1996).
Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer
- [21] A.P. Wong et J.T. Groves, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12414 (2001).
Topographical imaging of an intermembrane junction by combined fluorescence interference and energy transfer microscopies

Chapitre 4. Etude de l'interaction biotine / streptavidine

Le procédé de fabrication des nanoélectrodes, la méthode d'immobilisation des sondes moléculaires sur le substrat, et la technique utilisée pour passiver la surface de façon sélective, ont été décrits au chapitre précédent. Nous nous proposons dans ce chapitre d'étudier la possibilité de détecter l'interaction modèle biotine/streptavidine à travers des mesures de conductivité entre les nanoélectrodes.

Dans une première partie, les conditions optimales pour réaliser l'interaction étudiée seront déterminées en fluorescence sur des lames de verre. Puis, une caractérisation du substrat en microscopies optique et AFM sera réalisée pour examiner les modifications de la topographie locale à chaque niveau de l'assemblage moléculaire. Les dépôts successifs de la biotine et de la streptavidine seront alors caractérisés électriquement et analysés.

4.1 Validation de l'interaction sur support solide, détermination des conditions de dépôt

4.1.1 Objectif et description des expériences

La possibilité de réaliser une interaction entre la biotine-COCHO fixée sur un film de semicarbazide et la streptavidine est démontrée en fluorescence dans ce paragraphe. Les résultats décrits dans cette partie ont été produits par Christophe Olivier à l'IBL et sont présentés ici par souci de cohérence. Les concentrations de dépôt de la biotine et de la streptavidine pour lesquelles l'interaction est accomplie de façon optimale ont été déterminées. L'objectif est de déposer la streptavidine, marquée avec la tétraméthyl rhodamine, en concentration suffisamment élevée pour que les molécules interagissent en grand nombre avec la biotine immobilisée (signal fort en fluorescence sur les spots), et en concentration suffisamment basse pour que l'adsorption de la streptavidine sur la surface soit minimale (bruit de fond réduit).

Afin de déterminer un tel couple de concentrations de biotine et streptavidine, des tests de variation de concentration sont effectués sur des lames de verre. Les échantillons sont d'abord nettoyés afin de disposer de propriétés de surface quasi-homogènes sur l'ensemble de la surface. Pour cela, les lames sont plongées une nuit dans un mélange piranha, puis introduites simultanément dans le même bain de silanisation (Chapitre 3 tableau 3.1). La synthèse sur les groupements amine mène à des lames entièrement recouvertes de la terminaison semicarbazide (Tableau 3.1).

Les molécules de biotine sont diluées dans un tampon acétate de sodium/acide acétique à pH 5,5 (Tableau 4.1). Puis des spots de biotine-COCHO en concentration croissante de 10^{-6} à 10^{-3} M sont imprimés sur les lames par un spotter à aiguilles (Affymetrix 417 Arrayer). Chaque concentration est déposée 6 fois pour s'assurer de la reproductibilité des résultats. Les lames subissent alors une série de lavages destinés à retirer la biotine adsorbée, dont un lavage de 1 heure dans un mélange tampon Tris/acide acétique à pH 5,5 contenant 0,1 % de Tween 20 agité par ultrasons (Tableau 4.1).

Etape	Opérations réalisées
Incubation de la biotine	10^{-6} à 10^{-3} M biotine-COCHO ou biotine-NH ₂ dans 0,1 M tampon acétate de sodium/acide acétique pH = 5,5 1 nuit 37°C chambre humide.
Lavages	Rinçage tampon ¹ Tris ² / acide acétique pH = 5,5 contenant 0,1 % Tween 20 ³ , lavage tampon Tris/acide acétique pH = 5,5 contenant 0,1 % Tween 20 1 h avec agitation ultrasons, 3 rinçages PBS ⁴ pH = 7,2 contenant 0,1 % Tween 20, 5 rinçages eau milliQ, rinçage éthanol absolu, séchage dans dessiccateur.

¹ tampon Tris/acide acétique : (65 µL acide acétique + 121 mg Tris + 1 mL Tween 20) dans 1 L d'eau, à pH = 5,5.

² Tris : Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane.

³ Tween 20 : polyoxyéthylène(20) sorbitan monolaurate, surfactant non-ionique (tensioactif).

⁴ PBS : Phosphate Buffered Saline = 10 mM (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) à pH = 7,2 + 150 mM NaCl.

Tableau 4.1: Protocole de dépôt de la biotine [1].

La même expérience est effectuée en parallèle avec des molécules de biotine-NH₂ afin d'évaluer le nombre d'interactions formées à partir de la biotine physisorbée. En effet, cette deuxième série de spots permet de qualifier l'adsorption initiale de biotine sur les échantillons : la différence des niveaux de fluorescence entre ces spots et le bruit de fond résultera de la fixation de la streptavidine dans des complexes biotine:streptavidine issus de biotines immobilisées par adsorption.

La streptavidine marquée par de la tétraméthylrhodamine est fournie par la société Molecular Probes. Chaque lame de verre reçoit une concentration différente de streptavidine, variant de 10^{-4} à 10^{-1} mg/mL dans un tampon PBS (Tableau 4.2). L'incubation est réalisée sous une lamelle de microscope 24 x 60 mm² recouvrant les échantillons, pendant 2 heures à 37°C dans une chambre humide. Enfin les échantillons sont lavés successivement avec du PBS contenant 0,05 % de Tween 20, de l'eau déionisée et un mélange éthanol:eau = 95:5 (Tableau 4.2).

Etape	Opérations réalisées
Incubation de la streptavidine	10 ⁻⁴ à 10 ⁻¹ mg/mL streptavidine marquée avec rhodamine dans 0,01 M PBS pH = 7,2 2 h 37°C chambre humide.
Lavages	4 rinçages PBS pH = 7,2 contenant 0,05 % Tween 20, rinçage eau milliQ, rinçage éthanol:eau = 95:5, séchage dans dessiccateur.

Tableau 4.2: Protocole de dépôt de la streptavidine [1].

4.1.2 Observations et choix du couple de concentrations

Les résultats en fluorescence sur 4 lames sont présentés à la figure 4.1. Une interaction biotine/streptavidine est détectée pour tous les spots de biotine-COCHO, y compris pour des concentrations de 10⁻⁶ M (non-visible sur la figure 4.1) [1]. Les signaux sont en général bien perceptibles pour des dépôts de biotine-COCHO à 10⁻⁴ ou 10⁻³ M.

Pour une lame donnée, le bruit de fond est quasi-uniforme sur la majeure partie de la surface, ce qui témoigne d'une certaine homogénéité du film de semicarbazide sur de grandes aires d'échantillons puisque la surface des lames de verre est de 75 x 22 mm². Le nettoyage préliminaire des lames avec un mélange piranha pendant toute une nuit est supposé être à l'origine de ce résultat. En effet, lorsque ce nettoyage piranha n'est pas appliqué, l'adsorption de la streptavidine est très variable sur la surface, ce qui se traduit sur les images par de grandes variations de couleurs pour le bruit de fond.

L'adsorption de la streptavidine sur le semicarbazide est peu importante pour des concentrations de 10⁻⁴ à 10⁻³ mg/mL, et tend à augmenter au-delà. Par conséquent, les conditions de dépôt sélectionnées correspondent à une concentration de biotine de 10⁻⁴ M et une concentration de streptavidine de 10⁻³ mg/mL (spot mis en évidence sur la figure 4.1).

Pour ce couple de concentrations, le spot de biotine-NH₂ émerge à peine du bruit de fond (Figure 4.1). D'une manière générale, les intensités de fluorescence correspondant à la biotine physisorbée sont 10 fois plus faibles que celles de la biotine-COCHO. Cependant, la fluorescence dans les spots de biotine-NH₂ n'est pas nulle, ce qui indique que la biotine-NH₂ dispose de sites d'adsorption dans le film de semicarbazide où elle peut se fixer de manière non-covalente.

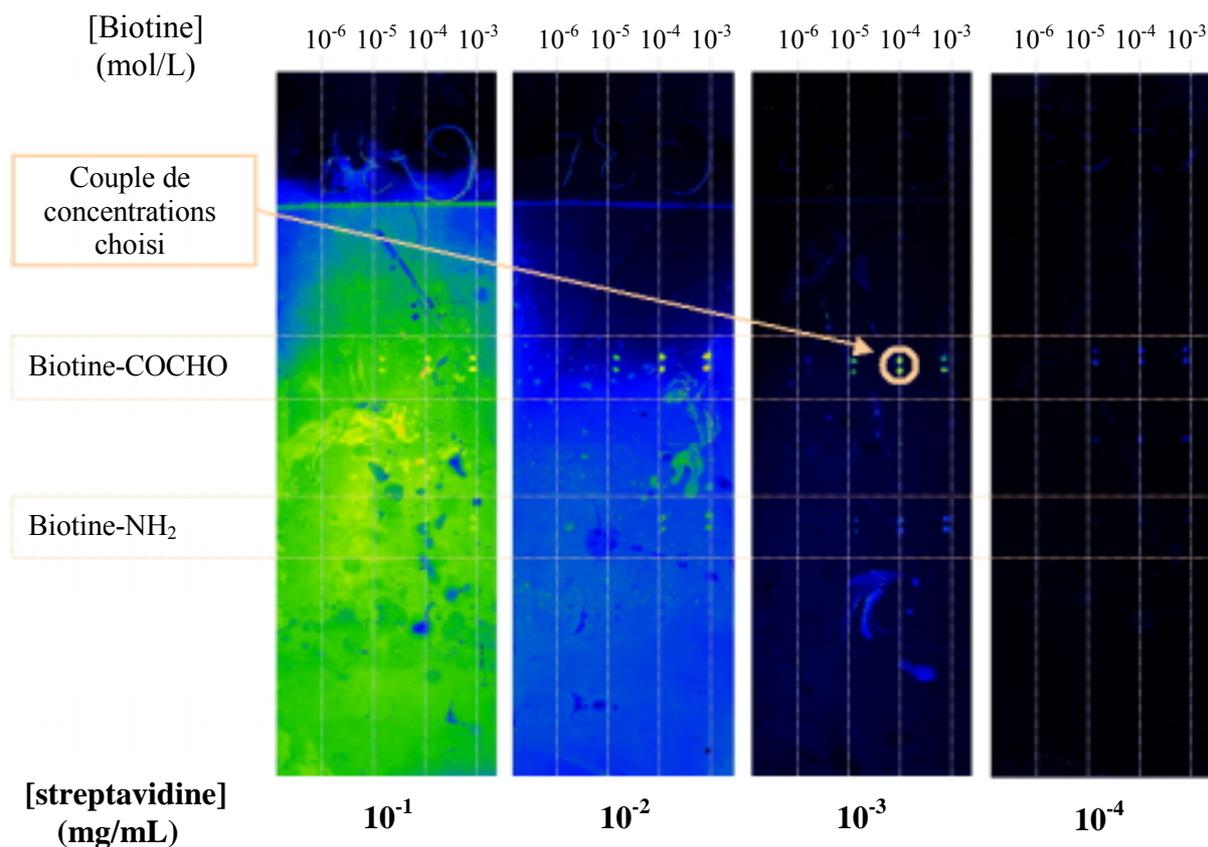


Figure 4.1: Détermination des concentrations optimales de dépôt de la biotine et de la streptavidine. La surface entière des lames est recouverte de semicarbazide. Des spots de biotine possédant ou non la fonction greffante α -oxo aldéhyde (-CO-CHO) sont déposés avec une concentration croissante sur une lame. Puis les lames sont incubées dans des solutions contenant de la streptavidine marquée avec la tétraméthylrhodamine, la concentration de streptavidine étant croissante entre les lames. L'analyse en fluorescence des spots permet de sélectionner un couple de concentrations de biotine et de streptavidine possédant un bon rapport signal/bruit.

4.2 Etude de l'interaction en microscopies optique et à force atomique

Dans cette partie, nous cherchons à réaliser l'interaction biotine/streptavidine sur des plaquettes de silicium oxydé (formation de l'interaction sur toute la surface des échantillons) et à caractériser l'état de la surface à chaque étape de la réalisation de l'assemblage moléculaire. Une étude en microscopies optique et AFM nous permettra de déterminer la topographie locale du substrat de SiO_2 , du film d'APTMS puis après sa fonctionnalisation en semicarbazide. Les échantillons seront ensuite séparés en 2 groupes, pour se conformer au protocole présenté à la partie 3.1.2-c à propos de la méthode de contrôle : sur les premiers échantillons, les sondes de biotine seront immobilisées via la fonction -CO-CHO, tandis que la biotine- NH_2 sera déposée sur le second lot afin d'évaluer la quantité de molécules adsorbées

sur la surface. Enfin, des colloïdes d'or de 10 nm recouverts de streptavidine seront déposés sur les échantillons. Une comparaison entre les 2 types d'échantillons sera réalisée afin d'apprécier, selon que la biotine a ou non été fixée sur le semicarbazide, la densité de billes d'or sur la surface.

4.2.1 Plaquette de silicium oxydé

Le substrat de départ est une plaquette de silicium monocristallin recouvert en surface d'une couche de 3000 Å de SiO₂. L'échantillon, nettoyé par plasma oxygène et observé en AFM, apparaît très plat (Figure 4.2). La rugosité moyenne ⁷ du substrat, calculée sur des images 900 x 900 nm², est de 1,5 Å (Tableau 4.3).

4.2.2 Film de 3-aminopropyltriméthoxysilane (APTMS)

La silanisation amine (greffage des APTMS) sur ce substrat est effectuée après un nouveau nettoyage au plasma O₂. Le protocole de greffage est décrit au tableau 3.1. *Notons qu'à chaque étape de cette étude, toutes les solutions sont préparées juste avant l'expérience et filtrées avec des filtres stériles de 0,22 µm de diamètre de pore (tampons acétate/acide acétique, Tris/acide acétique, PBS, eau, éthanol).* L'observation en AFM montre un film très plat couvrant *a priori* l'ensemble de la surface, avec par endroit de petits paquets de 55 à 70 nm de diamètre et de 2,3 à 6 nm de hauteur (Figure 4.2). Le dépôt du film tend à atténuer légèrement la rugosité du substrat (section sur la figure 4.2 et tableau 4.3). La densité des amas inclus dans le film varie de 3 à 30 paquets/µm². D'autre part, de tels agglomérats sont également visibles sur des structures en or présentes sur la surface (autres images non-présentées). Nous supposons donc qu'ils sont issus de petits amas d'APTMS polymérisés en solution et qui se sont ensuite déposés aléatoirement sur le substrat. Ces amas seraient par la suite intégrés dans le film au fur et à mesure de sa croissance par polymérisation.

⁷ La rugosité RMS (Root Mean Square) d'une section de la surface correspond à l'écart quadratique moyen des hauteurs par rapport à la hauteur moyenne.

$$\text{Rugosité RMS} = \left\{ \frac{\sum_{(x_i, y_i)} [z(x_i, y_i) - \langle z \rangle]^2}{N} \right\}^{1/2} \quad (4-1)$$

avec $z(x_i, y_i)$ la hauteur en un pixel (x_i, y_i) donné, $\langle z \rangle$ la hauteur moyenne sur l'ensemble des pixels de la ligne et N le nombre de pixels sur la ligne.

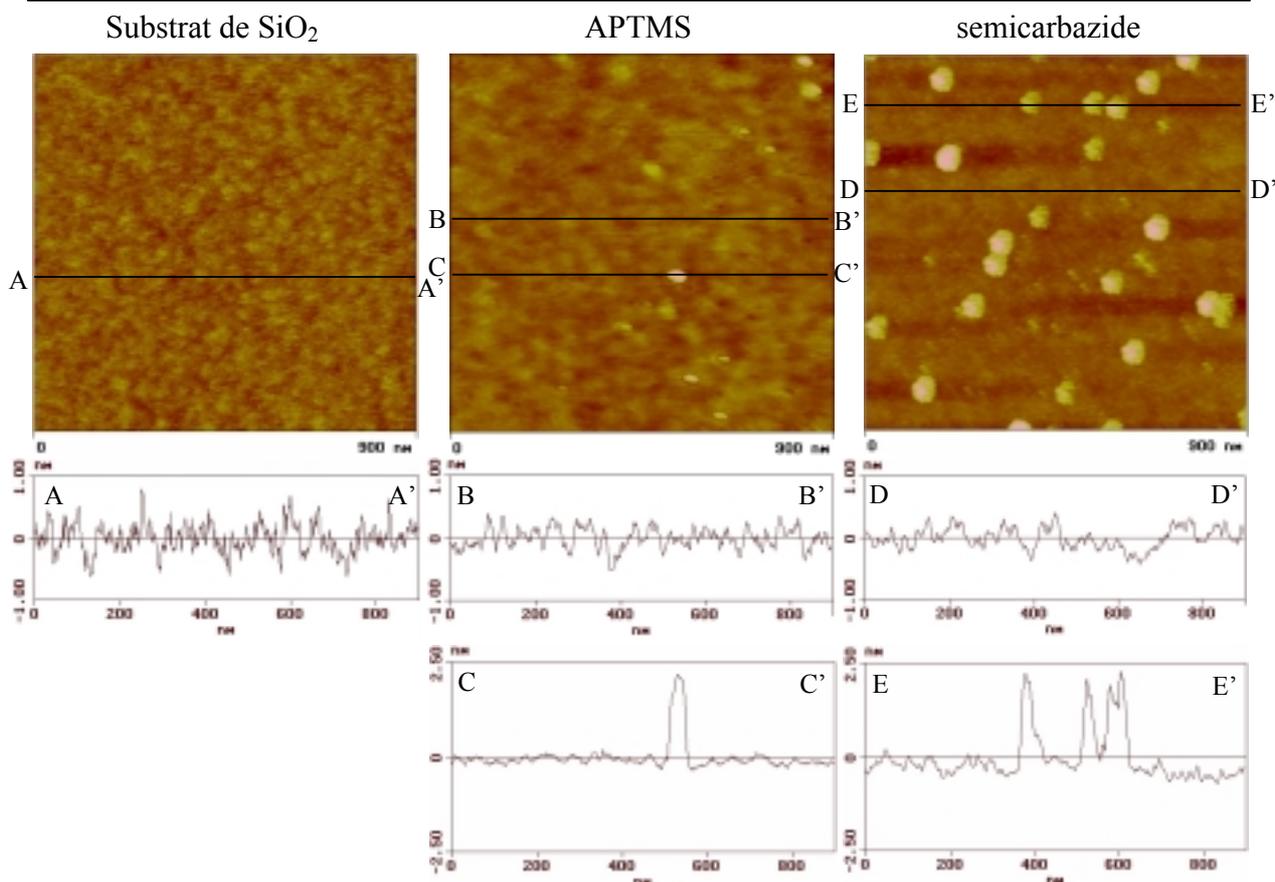


Figure 4.2: Images AFM $900 \times 900 \text{ nm}^2$ en mode hauteur d'un substrat de SiO_2 et des films d'APTMS et de semicarbazide. La densité de paquets d'APTMS varie de quelques unités (image du centre) à quelques dizaines (image de droite) par micron carré.

Surface	SiO_2	APTMS (sans les paquets)	semicarbazide (sans les paquets)	biotine- NH_2 (sans les paquets)	streptavidine- colloïde
Rugosité RMS (en Å)	$1,5 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,9$
				biotine- COCHO	streptavidine- colloïde
				$4,2 \pm 0,5$	$8,8 \pm 2,4$

Tableau 4.3: Comparaison des rugosités lors des différentes étapes de dépôt.

4.2.3 Film de semicarbazide

Sur les images AFM, la transformation du groupement de surface amine en fonction semicarbazide ne modifie pas les observations (Figure 4.2). La surface est globalement plane et la densité des amas demeure dans la même gamme. La rugosité reste proche, autour de 1,2 Å (Tableau 4.3).

4.2.4 Incubation de la biotine

a) Protocole de dépôt de la biotine

Lors de l'étape suivante, les échantillons sont séparés en deux groupes pour pouvoir qualifier l'impact de la biotine physisorbée. La biotine-COCHO est déposée sur les premiers échantillons, la biotine-NH₂ sur les seconds. Le protocole est proche de celui établi au tableau 4.1 : les lames sont incubées dans une solution de biotine-COCHO ou de biotine-NH₂ à 10⁻⁴ M (concentration sélectionnée) dans un tampon acétate de sodium/acide acétique à 0,1 M pH 5,5, pendant une nuit à 37°C en chambre humide. Les échantillons sont placés entre des lames et des lamelles pendant l'incubation. Les lavages sont identiques à ceux décrits dans le tableau 4.1, sauf les 5 lavages à l'eau déionisée qui sont réalisés dans un bac à ultrasons : 2 fois 10 minutes, puis 3 fois 5 minutes, l'eau étant changée entre chaque lavage.

b) Observations en microscopie optique

Etat de la surface, traces de biotine

L'observation des substrats au microscope optique montre une surface globalement propre à grande échelle. Cependant, quelques traces sont également visibles. Les structures en or sur la surface sont parfois recouvertes de biotines physisorbées en densité variable (Figure 4.3-a). En certains endroits, la biotine forme une couche relativement épaisse, tandis qu'en d'autres, aucune molécule n'est apparente. Cette couche de molécules adsorbées peut être écartée en grattant très légèrement l'or avec un objet pointu, ou plus simplement en projetant de l'eau déionisée sur les échantillons avec une pissette ou dans un bain d'eau DI d'une vingtaine de minutes agité par ultrasons.

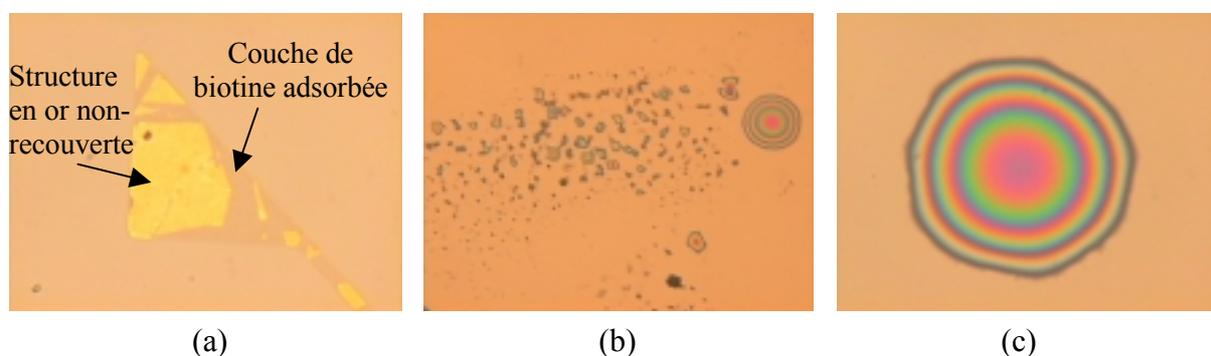


Figure 4.3: Observations au microscope optique de la surface des échantillons après le dépôt de biotine (indifféremment biotine-NH₂ ou biotine-COCHO). a) Adsorption partielle de biotine sur des structures en or. b) Gouttes de Tween 20. c) Goutte de Tween 20 isolée de grande dimension (60 microns de diamètre environ).

Gouttes de Tween 20

Nous pouvons également voir des structures formées d'anneaux concentriques, déposées sur la surface et occasionnellement sur les structures en or (Figures 4.3-b et c). Elles sont en général regroupées sur la surface, mais quelques grands objets isolés peuvent parfois être observés. Leur taille individuelle varie d'une centaine de nanomètres à quelques dizaines de microns.

L'observation des teintes de Newton, caractéristiques d'objets dont l'épaisseur est variable, nous indique qu'il s'agit de gouttes étalées sur la surface. Ces objets sont identifiés comme étant des gouttes de Tween 20, car ils ne sont pas présents lorsque le Tween 20 n'est pas utilisé (voir la partie 4.2.5-a). Le Tween 20 provient des lavages effectués après le dépôt de la biotine (Tableau 4.1). En effet, une petite quantité de Tween 20 est ajoutée dans les tampons Tris/acide acétique et PBS dans l'objectif d'utiliser ses propriétés de détergent pour décrocher les molécules adsorbées sur la surface : la molécule de Tween 20 possède une tête hydrophile due à la présence de polyéthylènes glycols (PEG, $-O-CH_2-CH_2-O-$), et une queue hydrophobe constituée d'une chaîne alkyle. Le traitement de surfaces par des PEG est souvent utilisé dans le domaine des biomatériaux pour réduire de manière considérable l'adsorption de protéines [2-6].

Quelques lavages supplémentaires avec de l'eau déionisée agitée par ultrasons permet de retirer efficacement les dernières traces restantes de Tween 20. Il est préférable de renouveler régulièrement l'eau DI (toutes les 5 à 10 minutes) afin d'éviter que le Tween 20 solubilisé ne se redépose sur l'échantillon. Une observation rapide au microscope optique entre chaque lavage permet de suivre l'évolution du nettoyage de la surface.

c) Observations en AFM

Si les échantillons présentent un aspect similaire en microscopie optique, des différences très nettes sont visibles en AFM entre les deux types d'échantillons. Les images AFM des deux types de surface sont présentées à la figure 4.4 pour la biotine-NH₂ et à la figure 4.5 pour la biotine-COCHO.

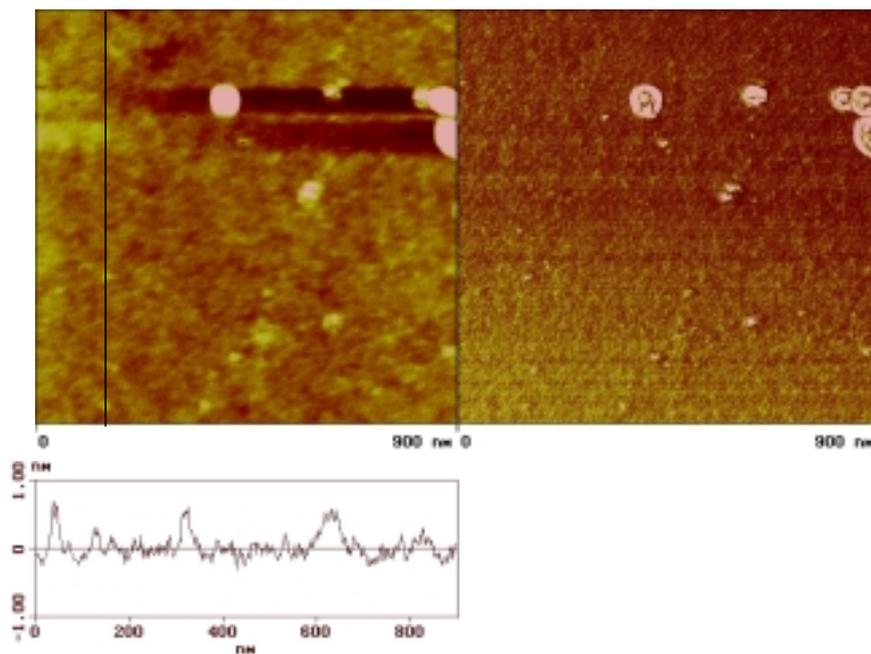


Figure 4.4: Images AFM $900 \times 900 \text{ nm}^2$ enregistrées simultanément en mode hauteur (à gauche) et en mode phase (à droite) d'une surface de semicarbazide recouverte de biotine- NH_2 . Les échelles sont respectivement de 3 nm et de 5° . L'échelle sur une section typique de l'image en hauteur est de 2 nm. Cette section est prise hors des paquets d'APTMS.

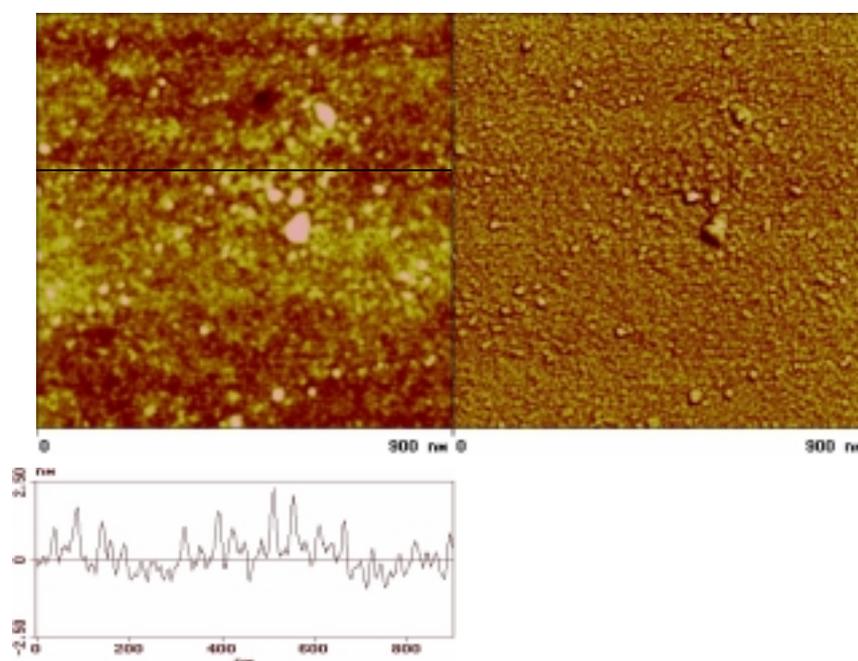


Figure 4.5: Images AFM $900 \times 900 \text{ nm}^2$ enregistrées simultanément en mode hauteur (à gauche) et en mode phase (à droite) d'une surface de semicarbazide recouverte de biotine-COCHO. Les échelles sont respectivement de 4 nm et de 20° . L'échelle sur une section typique de l'image en hauteur est de 5 nm.

Biotine-NH₂

Sur la figure 4.4, la surface est peu modifiée par rapport à l'étape précédente de la synthèse du semicarbazide (Figure 4.2). Les paquets présents dans le film sont toujours visibles, et en densité comparable à celle obtenue après la silanisation amine. L'adsorption de la biotine-NH₂ apparaît peu importante. Cependant, d'après l'observation en fluorescence sur la figure 4.1, cette adsorption est faible mais non-nulle. La présence de la biotine est confirmée par des mesures de rugosité, qui montrent que celle-ci a légèrement augmenté après le dépôt de la biotine-NH₂ (Tableau 4.3). Il est donc probable que, malgré les lavages, une faible proportion de biotine-NH₂ demeure physisorbée sur l'échantillon dans les sites d'adsorption non-spécifique présents dans le film de semicarbazide.

Biotine-COCHO

En revanche, l'aspect de la surface est sensiblement différent après le dépôt de la biotine-COCHO (Figure 4.5). L'apparence est beaucoup plus rugueuse, et les paquets d'APTMS sont en général cachés dans la rugosité apportée par la biotine. La rugosité RMS, qui se situe maintenant autour de 4,2 Å, est 3,5 fois plus importante que celle du semicarbazide (Tableau 4.3). La fixation des sondes s'accompagne de la formation de petits agrégats disposés uniformément sur l'ensemble de la surface. Leur diamètre est compris entre 8 et 16 nm, et leur hauteur entre 1 et 4 nm (Figure 4.5). Puisque ces agrégats ne sont pas constatés après le dépôt de la biotine-NH₂, mais uniquement après l'incubation de la biotine-COCHO, nous avons identifié ces amas comme étant des molécules de biotine-COCHO agglomérées. La biotine-COCHO est donc déposée partiellement sous la forme de paquets, en plus des molécules individuelles immobilisées sur les semicarbazides. Ces amas viennent s'ajouter sur la surface aux paquets formés par la polymérisation d'APTMS.

Observation en HPLC d'une agrégation de la biotine-COCHO

Le phénomène d'agrégation de la biotine-COCHO a également été constaté en chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*). Après la synthèse des molécules de biotine fonctionnalisées par une terminaison -CO-CHO ou -NH₂, les produits bruts sont purifiés à l'aide d'une HPLC préparative. Puis la pureté des deux composés est contrôlée par HPLC analytique (Figures 4.6-a et c). Pour la biotine-NH₂ et pour la biotine-COCHO, un seul pic, correspondant à un seul type de molécule, est observé en chromatographie. Les produits sont ensuite lyophilisés et stockés sous forme de poudre au congélateur à -80°C.

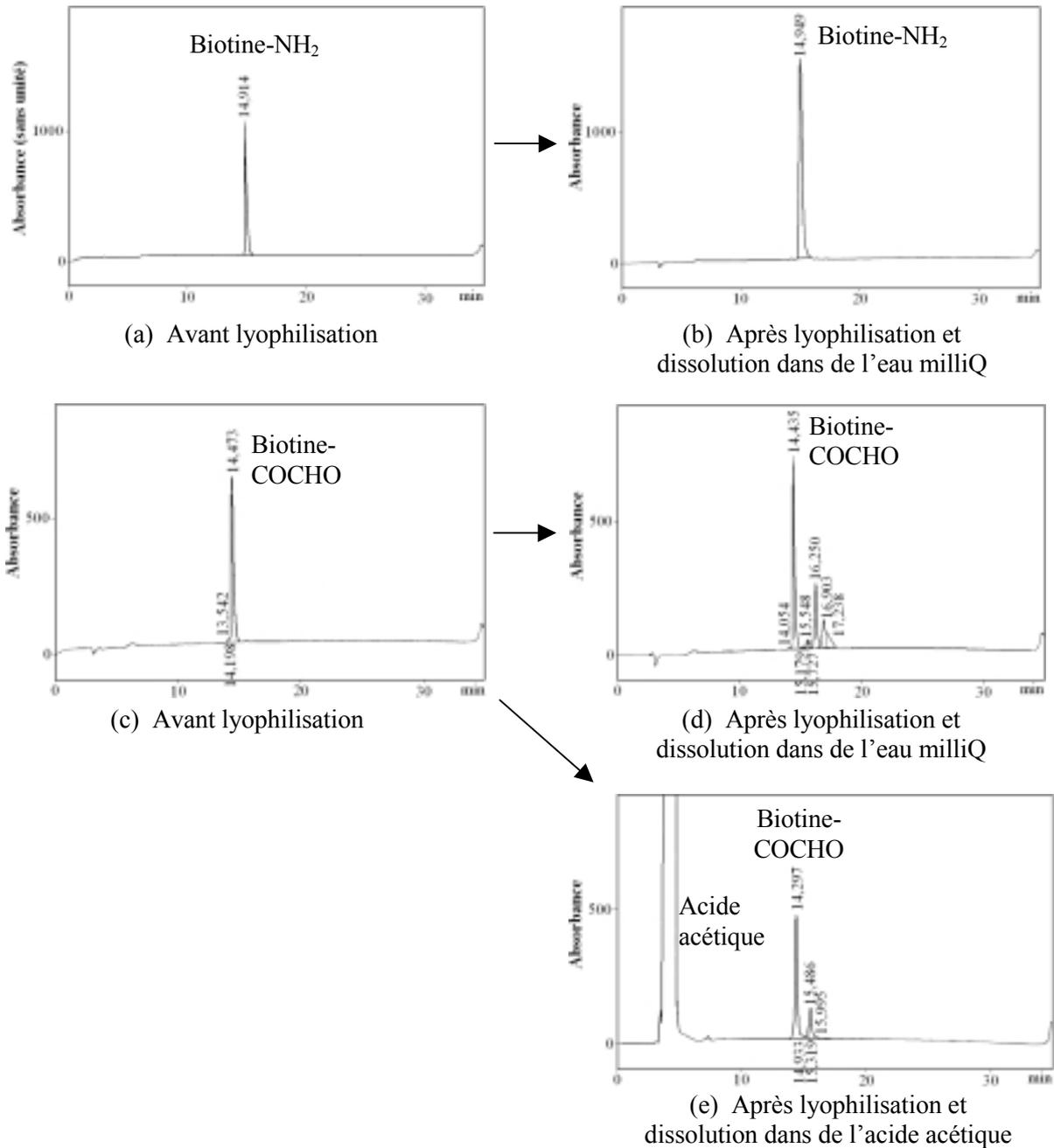


Figure 4.6: Séparation par HPLC des molécules de biotine. Conditions de chromatographie : RP-HPLC, colonne C18 Nucleosil (1 mL/min, 215 nm, gradient linéaire 0 – 100 % B, 0,05 % TFA). a et b) Spectres HPLC de la biotine-NH₂ avant lyophilisation et après dissolution dans de l'eau milliQ. c et d) Spectres HPLC de la biotine-COCHO avant lyophilisation et après dissolution dans de l'eau milliQ. e) Séparation HPLC de la biotine-COCHO après dissolution dans de l'acide acétique. Le grand pic, autour de 4 min, est dû à l'acide acétique.

Avant l'étape de dépôt de la biotine sur les échantillons, la biotine-NH₂ et la biotine-COCHO sont redissoutes séparément dans l'eau milliQ et contrôlées par HPLC (Figures 4.6-b et d). La biotine-NH₂ présente le même pic (temps de rétention $t_R = 14,9$ min) que celui constaté avant la lyophilisation (Figures 4.6-a et b). Par contre, la présence d'agrégats de biotine-COCHO est révélée par l'existence, sur la figure 4.6-d, de pics secondaires autour du

pic principal caractéristique de la biotine-COCHO avant lyophilisation ($t_R = 14,4$ min). Une confirmation que ces nouveaux pics sont bien dus à des agrégats de biotine-COCHO dans la solution, plutôt qu'à des contaminants introduits pendant les manipulations, est réalisée en dissolvant de la poudre de biotine-COCHO dans un milieu acide (acide acétique) pendant 12 heures. Les agrégats de biotine-COCHO ont alors tendance à se dissocier, comme le montre la disparition partielle des pics secondaires sur la figure 4.6-e par rapport à la figure 4.6-d.

Hypothèse d'une fixation covalente des agrégats de biotine-COCHO

Ainsi, l'existence des amas de biotine-COCHO observés en microscopie AFM sur la figure 4.5 est confirmée par la tendance de ces molécules à former des agrégats lors de la solubilisation. L'origine de l'agrégation n'est pas connue, d'autant plus que les molécules de biotine-NH₂, qui possèdent une structure très proche de celle de la biotine-COCHO et ne diffèrent qu'au niveau de la terminaison ($-\text{CO}-\text{CHO}$ ou $-\text{CO}-(\text{CHOH})_2-\text{CO}-\text{Val}-\text{NH}_2$), ne présentent pas ce phénomène (Figure 3.5 et partie 3.1.2-c).

Toutefois, lors du dépôt de la biotine-COCHO sur les échantillons, les agrégats de biotine-COCHO pourraient se fixer de manière covalente sur la surface, par l'intermédiaire de réactions chimiques entre des fonctions α -oxo aldéhydes situées sur le contour de ces amas et des terminaisons semicarbazides sur le substrat. Ainsi, les amas de biotine-COCHO seraient immobilisés sur la surface via des liaisons semicarbazones, ce qui leur permettrait de résister à la série de lavages après l'incubation (Figure 4.5).

Conclusion

Dans le cas de l'ancrage des sondes de biotine-COCHO sur les groupements semicarbazides, trois types de dépôt semblent mêlés : la plus grande part de la biotine-COCHO devrait être fixée de manière individuelle sur la surface via une liaison semicarbazone ; une autre part semble déposée sous forme de paquets immobilisés également de manière covalente grâce à des terminaisons $-\text{CO}-\text{CHO}$ disponibles sur le contour des agrégats ; et une troisième partie, en proportions plus faibles, est physisorbée via des interactions non-spécifiques. Le dépôt dans les mêmes conditions de la biotine-NH₂ et de la biotine-COCHO sur différents échantillons peut donc être distingué en AFM en observant la rugosité et la densité d'objets (densité d'agrégats de biotine-COCHO) sur la surface.

4.2.5 Incubation de la streptavidine

a) Protocole de dépôt de la streptavidine marqué à l'or colloïdal

Des colloïdes d'or de $10,0 \pm 0,7$ nm de diamètre sur lesquels sont greffées en moyenne 7,7 streptavidines, sont ensuite incubés avec les échantillons. La concentration de dépôt est celle sélectionnée à la partie 4.1, c'est-à-dire 10^{-3} mg/mL de streptavidine en solution. Par rapport au protocole indiqué au tableau 4.2, le Tween 20, qui était présent en faible concentration dans les premières solutions de rinçage au PBS, est retiré pour vérifier notre hypothèse sur l'origine des gouttes déposées sur la surface des échantillons. La méthode de lavage employée sur ces échantillons est constituée de 3 rinçages de 5 minutes chacun au tampon PBS (sans Tween 20), 2 rinçages de 5 min à l'eau milliQ et enfin un rinçage à l'éthanol absolu. Le séchage des substrats est réalisé dans un dessiccateur.

b) Observations en microscopie optique

Etat de la surface, agrégation des colloïdes d'or

En microscopie optique, les échantillons présentent ici encore un aspect comparable, indépendamment de l'immobilisation covalente ou non des sondes de biotine. La surface apparaît globalement propre, sans gouttes de Tween 20, comme attendu.

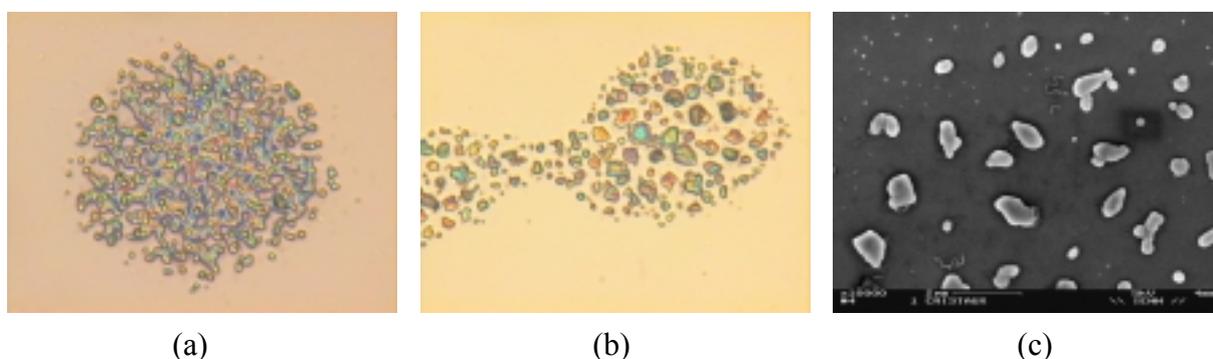


Figure 4.7: Dépôt groupé de colloïdes agrégés. a) Spot compact d'environ $30 \mu\text{m}$ de diamètre. b) Zoom sur une grande trace circulaire constituée de nombreux amas individuellement distincts. c) Image MEB prise dans le même cercle. La taille des amas est supérieure au diamètre des pores du filtre. Les colloïdes d'or individuels éventuellement présents sur la surface ne peuvent pas être distingués dans le fond de l'image, car leur diamètre, qui est de 10 nm, est en dessous de la résolution du MEB.

Cependant, en de nombreux endroits, de petits objets, d'apparence compacte et regroupés sur la surface, peuvent être observés (Figure 4.7). Ils sont presque toujours rassemblés en groupes denses, très rarement isolés sur la surface. Leur dépôt est soit totalement aléatoire sur le substrat (Figure 4.7-a), soit sous la forme de grands cercles (les

figures 4.7-b et c sont des zooms pris dans un tel cercle). On peut remarquer que, collectivement, ils donnent un aspect brillant, visible à l'œil nu, aux échantillons. Nous supposons que ce sont des dépôts dus à l'agglutination des colloïdes d'or en solution. Le phénomène d'agrégation des colloïdes dans la solution est d'ailleurs signalé par le fabricant, mais pour des températures de stockage inférieures à 0°C.

Mécanisme supposé d'agrégation des colloïdes d'or

Deux schémas peuvent être envisagés pour décrire la précipitation des nanoparticules. L'agglutination des colloïdes d'or pourrait être produite par un contact direct des billes dans la solution après une éventuelle désorption des protéines (agglutination bille-bille). Une autre explication possible s'appuie sur le fait que les quatre monomères de la streptavidine ne sont pas maintenus dans la molécule par des liaisons covalentes, mais uniquement par des interactions de Van der Waals entre une paire de dimères (partie 3.1.2-d) [7]. Nous proposons que, après la désorption de plusieurs dimères sur certaines billes, des molécules de streptavidine se recomposent en regroupant deux dimères portés par deux colloïdes différents (agglutination bille-dimère-dimère-bille).

L'hypothèse que les molécules de streptavidine puissent se détacher en partie ou entièrement des billes d'or est soutenue par des observations AFM réalisées sur d'autres échantillons. Ainsi, des colloïdes d'or ont été déposés directement sur un substrat de SiO₂ préalablement nettoyé par un mélange piranha. Outre les billes, qui possèdent sur ces images un diamètre compris entre 8,9 et 10,2 nm, d'autres objets plus petits, de 5,6 à 6,3 nm de diamètre, sont également visibles (images AFM non-présentées). Ces dimensions correspondent à celles d'une molécule de streptavidine (46 x 56 x 54 Å³, partie 3.1.2-d).

Il est important de noter que les dimensions des amas de colloïdes sont très grandes et peuvent atteindre jusqu'à 10 µm. Par exemple, sur la figure 4.7-c, les plus gros amas possèdent une taille de 1 µm environ. Or toutes les solutions ont été filtrées avant leur utilisation avec un filtre de 0,22 µm de diamètre de pore. Le diamètre des plus gros amas est donc supérieur à celui des pores du filtre. Par conséquent, les amas se forment soit sur la surface, soit dans le solvant pendant les quelques minutes qui suivent la filtration. Les techniques classiques de lavage se sont révélées inefficaces pour les retirer du substrat. Ils sont très résistants aux lavages, y compris ceux effectués dans des solutions agitées dans des bacs à ultrasons à la puissance maximale.

c) Observations en AFM

De nouvelles observations en AFM montrent à nouveau des différences au niveau local entre les deux types d'échantillon (Figures 4.8 et 4.9). La principale distinction tient dans la densité d'objets.

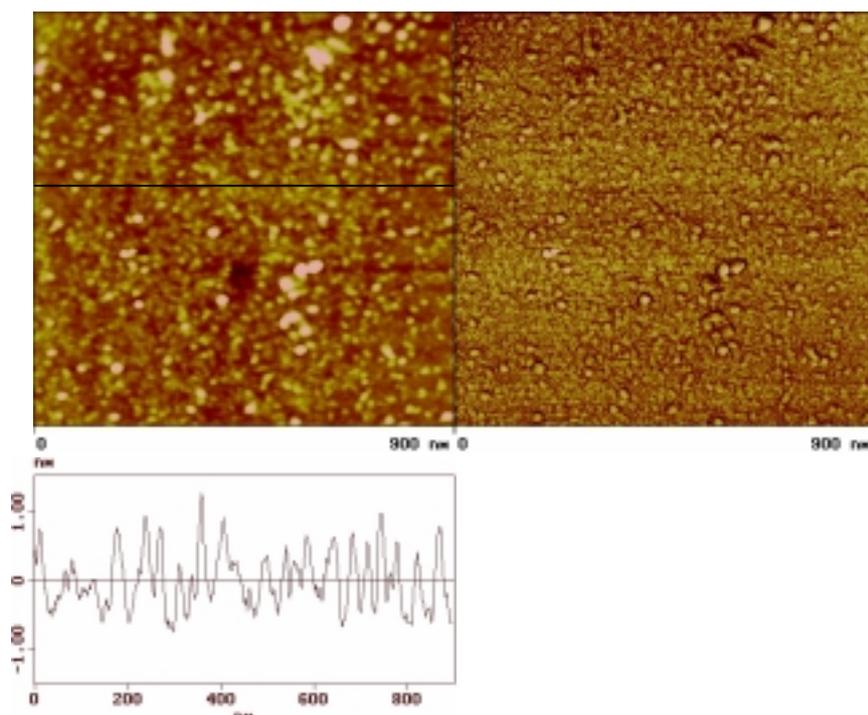


Figure 4.8: Images AFM $900 \times 900 \text{ nm}^2$ enregistrées simultanément en mode hauteur (à gauche) et en mode phase (à droite) de colloïdes d'or recouverts de streptavidines et déposés sur la surface « biotine-NH₂ ». Les échelles sont respectivement de 5 nm et de 10°. L'échelle sur une section typique de l'image en hauteur est de 3 nm.

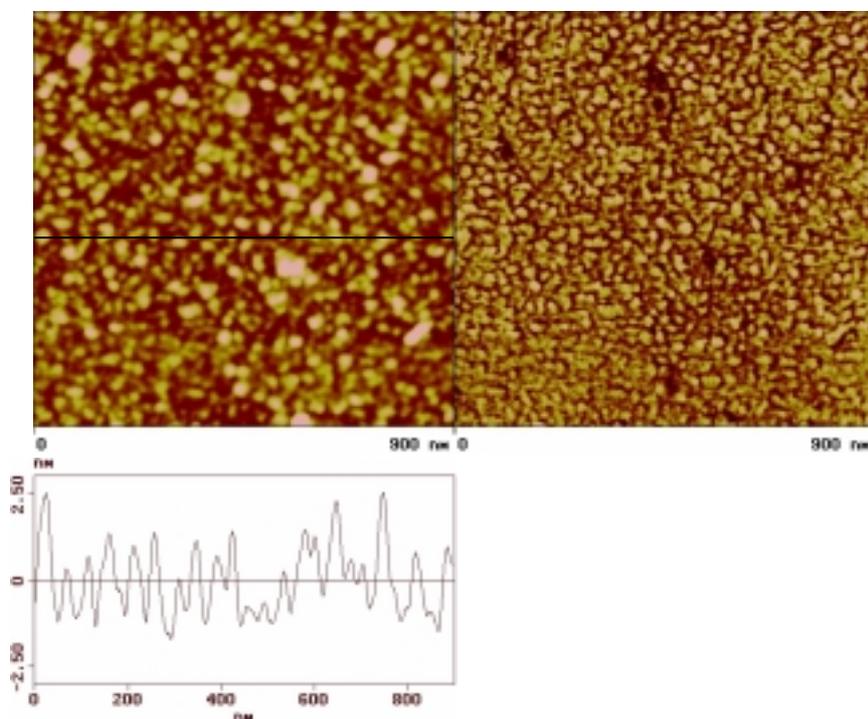


Figure 4.9: Images AFM $900 \times 900 \text{ nm}^2$ enregistrées simultanément en mode hauteur (à gauche) et en mode phase (à droite) de colloïdes d'or recouverts de streptavidines et déposés sur la surface « biotine-COCHO ». Les échelles sont respectivement de 5 nm et de 10°. L'échelle sur une section typique de l'image en hauteur est de 6 nm.

Streptavidine déposée sur un échantillon « biotine-NH₂ »

La figure 4.8 correspond au dépôt des colloïdes d'or sur un substrat « biotine-NH₂ », c'est-à-dire au film de semicarbazide sur lequel une faible concentration de biotine s'est adsorbée. Contrairement à l'image AFM de l'étape précédente où le substrat apparaissait très plat (Figure 4.2) et peu différent de l'image obtenue après la silanisation amine, un grand nombre d'objets est maintenant présent sur la surface et à l'origine d'une augmentation de la rugosité jusqu'à environ 5,4 Å (Tableau 4.3). Le diamètre de ces objets est compris entre 11 et 15 nm, tandis que les hauteurs mesurées par la pointe AFM sont comprises entre 1,5 et 4 nm, et sont donc inférieures aux 10 nm attendus (diamètre de la bille).

Les dimensions des objets imagés laissent à penser que ce ne sont pas directement les colloïdes d'or déposés sur la surface qui sont observés, mais plutôt les molécules de streptavidine situées sur la partie supérieure des billes (Figure 4.10). En effet, plutôt que de donner la forme des billes d'or, la pointe AFM semble sonder la partie supérieure des nanoparticules et produire une image des molécules de streptavidine situées « au-dessus » des billes. Les dimensions latérales des objets observés correspondraient alors à la taille de la streptavidine (~ 5 nm de diamètre ; partie 3.1.2-d) amplifiée par la pointe AFM en raison du diamètre de la pointe (voir au chapitre 2 la partie 2.3.3-b). Les variations en hauteur de la pointe, qui sont dans l'ordre de grandeur des dimensions de la streptavidine, seraient alors dues à un fond mouvant de streptavidines sur la partie supérieure des colloïdes.

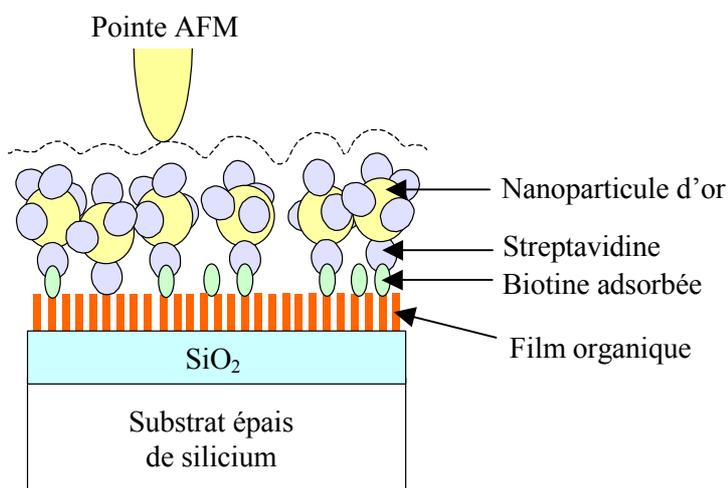


Figure 4.10: Représentation schématique d'une observation AFM des molécules de streptavidine recouvrant la partie supérieure des colloïdes d'or. Les colloïdes sont déposés sur la surface soit par physisorption, soit par l'intermédiaire d'une interaction entre une streptavidine située sur leur contour et une biotine adsorbée sur le film de semicarbazide.

Streptavidine déposée sur un échantillon « biotine-COCHO »

La densité des billes est bien supérieure dans le cas des substrats « biotine-COCHO », c'est-à-dire des échantillons sur lesquels les sondes de biotine ont été immobilisées de manière covalente (Figure 4.9). L'apport supplémentaire de colloïdes sur la surface par rapport à la figure 4.8 est dû à la fixation des billes par l'intermédiaire de la formation de complexes biotine:streptavidine, la biotine étant cette fois majoritairement ancrée sur le film organique via une liaison semicarbazone. Sur les images AFM, le diamètre correspondant aux molécules de streptavidine greffées sur les billes est compris entre 10,4 et 16 nm. Il y a aussi des objets plus gros, de 19 à 26 nm de diamètre, qui sont identifiés comme étant des regroupements de deux ou trois billes accolées. La rugosité sur la surface est multipliée par 2 par rapport à l'étape précédente de la fixation de la biotine-COCHO : de 4,2 à 8,8 Å (Tableau 4.3).

Discussion

Les deux types d'échantillons peuvent donc être distingués en considérant la densité de nanoparticules et la rugosité de la surface. La figure 4.8 représente les streptavidines marquées à l'or adsorbées sur le film de semicarbazide et les streptavidines liées à des biotines adsorbées. La différence de densité observée sur la figure 4.9 par rapport à la figure 4.8 représente la quantité de billes « chimisorbées » grâce à la réalisation de complexes streptavidine:biotine (biotine fixée de manière covalente). C'est ce dernier cas que nous cherchons à détecter. Cependant, remarquons que les billes d'or sur la figure 4.8 se déposent en relativement grande quantité sur le substrat. Ce fait indique que, pour les nanoélectrodes, la probabilité de physisorption de colloïdes d'or dans le gap sera non-négligeable [8].

Expériences de désorption de la streptavidine

Nous avons tenté de réduire la quantité de streptavidines physisorbées à l'aide de longs lavages à l'eau DI fortement agitée par ultrasons. Malgré cela, la densité de billes demeure à peu près identique sur les images AFM ; ces lavages n'ont pas prouvé leur efficacité à décrocher la streptavidine.

L'adsorption des billes d'or ne semble pas être causée par les billes en elles-mêmes, mais plutôt par les molécules de streptavidine greffées sur leur surface. En effet, comme l'ont remarqué certains auteurs [9], l'adsorption de la streptavidine tend à être irréversible. La streptavidine, qui est une « grosse » molécule, peut se fixer sur la surface en de multiples points d'adhésion, en formant de nombreuses interactions non-spécifiques avec le substrat.

Pérez-Luna et coauteurs mettent en évidence l'influence de l'organisation des molécules dans le film organique greffé sur le substrat, sur le taux de streptavidines physisorbées [9]. Ainsi, des monocouches auto-assemblées en un réseau très régulier et compact présentent un nombre relativement faible de sites d'adsorption potentiels, tandis que de nombreuses opportunités d'adsorption sont présentes sur un film moléculaire désordonné et de faible densité, tel que le film de semicarbazide.

Pour vérifier le caractère quasi-irréversible de l'adsorption de la streptavidine, des expériences de désorption de la streptavidine ont été réalisées. Des lames de verre sont recouvertes d'un film de semicarbazide et imprimées avec de la biotine-COCHO et de la biotine-NH₂ à des concentrations comprises entre 10⁻⁶ et 10⁻³ M (Tableaux 3.1 et 4.1). Puis, de la streptavidine marquée à la rhodamine est incubée à la concentration sélectionnée (10⁻³ mg/mL). Le niveau d'adsorption de la streptavidine sur les lames (sur les spots de biotine-NH₂, et entre les spots) est mesuré en fluorescence. Divers traitements chimiques sont alors effectués sur les échantillons pour tenter de décrocher la streptavidine ; le résultat obtenu par ces traitements est à nouveau observé en fluorescence.

Nous avons tout d'abord tenté de retirer la streptavidine à l'aide de molécules de biotine en solution. Les lames ont ainsi été mises en contact avec des solutions contenant de la biotine en excès à des concentrations variant de 10² à 10⁵ fois la quantité initiale de streptavidine déposée. Cependant, le niveau de fluorescence n'est pas modifié [1]. Ceci est conforme aux observations de Pérez-Luna, qui constate, par cette méthode, une désorption pour des molécules mutantes de la streptavidine, mais pas pour la structure naturelle [9].

Une expérience similaire a été effectuée avec des solutions contenant de la streptavidine, dans le but de retirer la streptavidine adsorbée en se basant sur une compétition entre les protéines fixées et les protéines dans la solution. Nous avons supposé que les streptavidines de la solution prennent la place, dans les sites d'adsorption, des molécules de streptavidine adsorbées. Cependant, cette fois encore, aucun changement n'est observé en fluorescence.

Par conséquent, la streptavidine adsorbée ne peut pas être retirée de la surface avec un excès de biotine, une compétition avec des streptavidines en solution ou en utilisant des lavages vigoureux avec des ultrasons.

Conclusion

D'une manière générale, les images AFM sont relativement difficiles à exploiter. En effet, la topographie de la surface au niveau local est complexe en raison de l'accumulation

d'un grand nombre d'objets au fur et à mesure de l'avancée dans la réalisation de l'interaction biotine/streptavidine. Tout d'abord, les paquets d'APTMS, qui se forment pendant la silanisation et qui se déposent aléatoirement sur le substrat, demeurent pour toutes les étapes suivantes. Des structures à grande échelle peuvent apparaître : des gouttes de Tween 20, ou des agrégats probablement constitués par l'agglomération de colloïdes d'or (croissance des agrégats sur la surface ou dans le solvant immédiatement après la filtration stérilisante). De plus, une partie de la biotine-COCHO, stockée sous la forme de poudre, tend à former des agrégats après la dissolution, et ceux-ci sont supposés pouvoir se fixer de manière covalente sur les terminaisons semicarbazides. Puis, à l'étape suivante, les nanoparticules d'or physisorbées ne peuvent pas être décrochées, en raison du caractère irréversible de l'adsorption non-spécifique de la streptavidine. Toutefois, une différence est visible en AFM entre les dépôts de la biotine-NH₂ et de la biotine-COCHO (visualisation des agrégats de biotine-COCHO). Une différence est également constatée après l'incubation de la streptavidine marquée à l'or colloïdal. Les distinctions concernent la densité des objets et la rugosité moyenne du substrat.

4.3 Caractérisation électrique de l'ancrage de la biotine

4.3.1 Passivation et fonctionnalisation de la surface

Le protocole de discrimination des propriétés de surface élaboré au chapitre 3 a été appliqué aux échantillons sur lesquels les nanoélectrodes ont été dessinées par lithographie électronique (partie 3.2). Les deux premiers niveaux de masquage, indiqués sur la figure 3.9, permettent de fabriquer les nanoélectrodes (masquage e-beam), puis les plots et les pistes électriques de connexion (masquage optique).

Un troisième niveau de masque, aligné sur les structures déjà construites, est utilisé pour définir la zone où les sondes devront être déposées (Figure 4.11). Celui-ci consiste en des ouvertures carrées de 100 x 100 μm^2 centrées sur les nanoélectrodes. Ces dimensions correspondent aux plus grands motifs employés pendant l'étude d'assemblage des deux films organiques (Figure 3.17) car la mouillabilité de la surface, constatée par le greffage des sondes, est réalisée de façon certaine pour de telles fenêtres d'ouvertures (partie 3.3). Le reste de la surface doit être passivé avec la monocouche d'OTS.

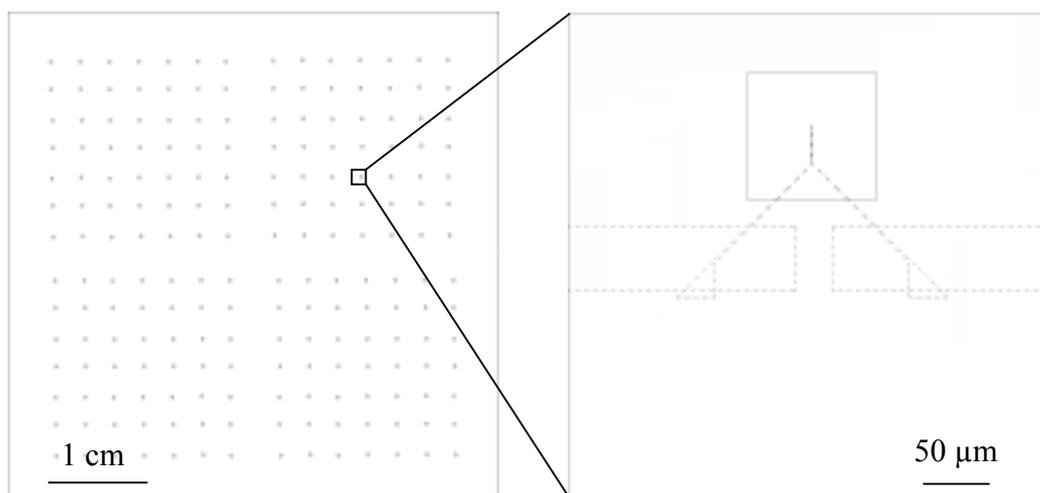


Figure 4.11: Troisième niveau de masquage, destiné à créer les ouvertures où seront ancrées les sondes de biotine. Ce masque optique est utilisé après ceux de la figure 3.9 (en pointillés).

La figure 4.12 montre ainsi deux observations au microscope optique effectuées lors de la réalisation du procédé de séparation des propriétés de surface. Sur ces images, la surface a été silanisée avec les molécules d'OTS, puis recouverte de PS et de résine S1818. Le masque est ensuite aligné au-dessus des nanoélectrodes, et la révélation de la résine insolée découvre le PS dans les ouvertures (Figure 4.12-a). Celui-ci est alors gravé par l'intermédiaire d'une attaque RIE, afin de rendre le substrat de SiO_2 apparent (Figure 4.12-b). Après le retrait du PS, rien ne permet de distinguer en microscopie optique la zone d'oxyde de silicium créée dans la monocouche d'OTS. Il faut noter qu'aucune modification des propriétés électriques des électrodes n'a été relevée à cette étape. La gravure plasma ne dégrade donc pas les structures métalliques sur la surface pour des durées d'attaque de quelques minutes.

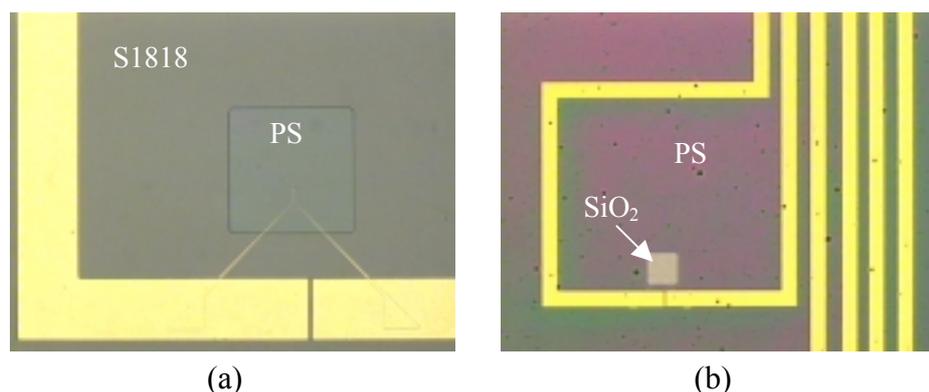


Figure 4.12: Application du procédé de dépôt des films d'OTS et d'APTMS. a) Une ouverture a été réalisée au-dessus des nanoélectrodes, grâce à la révélation de la résine S1818 exposée à travers le masque de la figure 4.11. Le PS situé sous la résine est découvert dans l'ouverture. Cette photographie correspond à l'étape d de la figure 3.21. b) Après une gravure plasma du PS découvert, le substrat de SiO_2 devient apparent. La gravure s'arrête dans la couche de PS, toute la résine étant détruite pendant cette opération. Les taches noires sur la surface sont intégrées dans la couche de PS. Cette photographie correspond à l'étape e de la figure 3.21.

En revanche, l'existence de ces ouvertures est confirmée au début du protocole de silanisation amine. Celui-ci débute avec un rinçage des échantillons avec du méthanol absolu (Tableau 3.5). Lorsque les échantillons sont retirés de la solution de méthanol, le solvant se retire spontanément de la monocouche d'OTS hydrophobe, tandis que des microgouttes visibles à l'œil nu restent confinées au-dessus des ouvertures de SiO₂. Le film d'APTMS est ensuite réalisé, puis aussitôt la synthèse des groupements semicarbazides. Ici encore, aucun trait distinctif ne permet de repérer au microscope optique la frontière entre le film de semicarbazide dans les fenêtres d'ouverture et le film monomoléculaire d'OTS.

4.3.2 Incubation de la biotine

a) Protocole de dépôt de la biotine

Avant l'étape d'accrochage des sondes de biotine sur les groupes semicarbazide, les échantillons sont séparés en deux groupes, afin de respecter la méthode de contrôle présentée dans la partie 3.1.2-c. Des molécules de biotine-COCHO seront ainsi greffées sur une partie des échantillons (ancrage covalent de la biotine), l'autre partie sera mise en contact avec des molécules de biotine-NH₂ (échantillons témoins). Pour cela, une goutte d'une solution tampon acétate de sodium/acide acétique pH 5,5 contenant la biotine-COCHO ou la biotine-NH₂ à la concentration de 10⁻⁴ M (concentration sélectionnée à la partie 4.1) est écrasée sur la surface sous une lamelle de verre et laissée au repos pendant une nuit à 37°C. Le dépôt et les lavages respectent le protocole décrit dans le tableau 4.1, seule la concentration de biotine est adaptée. Bien qu'il forme des gouttes sur la surface, le Tween 20 est conservé dans les tampons Tris/acide acétique et PBS lors des lavages pour renforcer la désorption de la biotine non-fixée. De plus, nous supposons que la passivation du substrat par la monocouche d'OTS pourrait limiter la formation de gouttes de Tween 20 sur les échantillons. Des rinçages au Tris/acide acétique, au PBS, à l'eau DI (sans agitation) et à l'éthanol (Tableau 4.1) sont finalement appliqués aux échantillons.

b) Observations en microscopie optique

Etat de la surface

Les observations effectuées au microscope optique montrent que la séparation a effectivement fonctionné quant au dépôt des gouttes de Tween 20 sur la surface (Figure 4.13-a). Les échantillons présentent tous un aspect comparable à grande échelle. Comme dans la partie 4.2, quelques traces de biotine, ou plus rarement des gouttes de Tween 20 de quelques microns à quelques dizaines de microns de diamètre, sont parfois adsorbées sur les structures

en or (Figure 4.13-a). D'une manière générale, le film d'OTS a empêché l'adhésion de gouttes de Tween 20, et la surface apparaît globalement propre. Par contre, les ouvertures de semicarbazide peuvent maintenant être distinguées sur la surface en raison de la présence de microgouttes de Tween 20. Leur densité est très variable d'une fenêtre à l'autre. Dans près de la moitié des cas, seul le contour des ouvertures peut être distingué, avec un dépôt très léger de gouttes de Tween 20 uniquement sur la frontière entre les deux films organiques. L'autre moitié des ouvertures présente une adsorption de Tween 20 sur l'ensemble de la fenêtre (Figures 4.13-a et b).

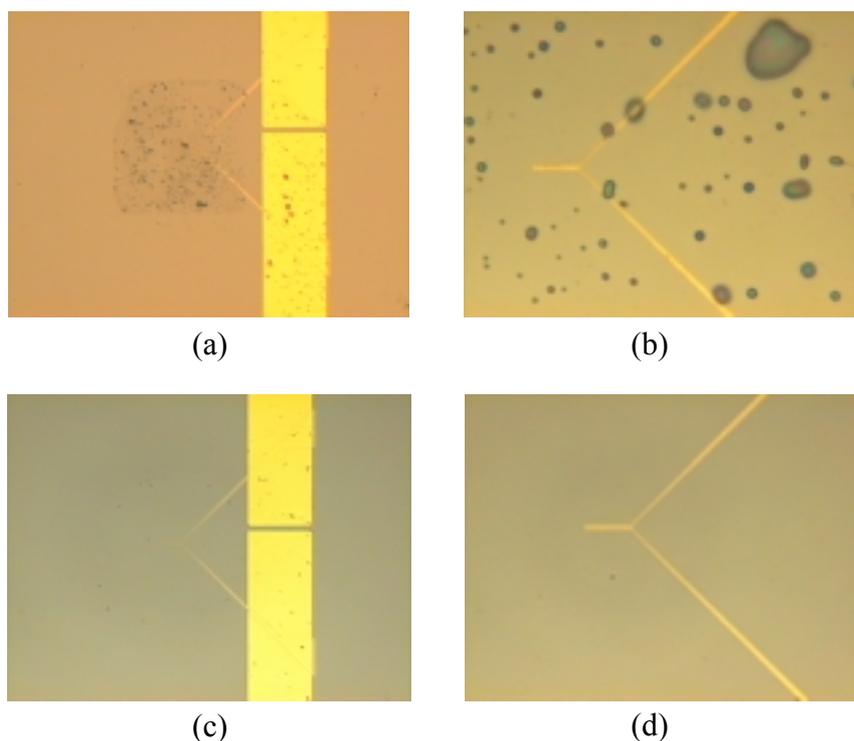


Figure 4.13: Retrait des gouttes de Tween 20 adsorbées dans l'ouverture de semicarbazide. a) Observation après le dépôt de la biotine et la série de lavages indiqués dans le tableau 4.1. b) Zoom sur des nanoélectrodes et des gouttes de Tween 20 dans une ouverture. c) Mêmes nanoélectrodes que a), après 5 lavages de 10 min chacun dans de l'eau déionisée agitée par ultrasons. d) Zoom sur des nanoélectrodes après les lavages à l'eau DI.

Lavages supplémentaires de la surface

Nous avons vu dans la partie 4.2 que les gouttes de Tween 20 pouvaient être retirées de la surface en appliquant quelques lavages à l'eau DI dans un bac à ultrasons. L'agitation avec les ultrasons semble casser la goutte et solubiliser le tensioactif. L'eau est renouvelée toutes les 10 minutes pour emporter les molécules de surfactant et éviter qu'elles ne se redéposent à nouveau. Une observation au microscope optique de la progression du retrait des gouttes de Tween 20 est réalisée après chaque lavage. Ainsi les gouttes se déplacent pendant

chaque lavage à l'eau DI, car aucune d'entre elles n'apparaît au même endroit entre deux observations. Après 5 lavages de 10 minutes, la surface est estimée suffisamment propre. Seul un dépôt très léger de gouttes de Tween 20 demeure sur la limite entre le film d'OTS et la couche fonctionnalisée semicarbazide (Figures 4.13-c et d). Les traces de biotine physisorbées sur les pistes d'or ont également été retirées en grande majorité (Figure 4.13-c).

c) Observations en AFM

Passivation par le film d'OTS

En microscopie AFM, la séparation entre les deux films organiques est bien visible pour les deux types d'échantillons (biotine-NH₂ et biotine-COCHO), avec une densité de traces très supérieure sur le film de semicarbazide (Figure 4.14). La monocouche d'OTS apparaît très plate à grande échelle en comparaison de la densité d'objets dans les ouvertures de semicarbazide (Figure 4.14-a). La différence entre les deux films est également transposée dans les mesures de rugosité, avec une rugosité sur le film d'OTS de 2 à 3 fois inférieure à celle sur le film de semicarbazide ⁸ (Tableau 4.4). Ces observations confirment la possibilité d'employer un film monomoléculaire d'OTS pour minimiser l'adsorption de la biotine (partie 3.3.6-f).

Agrégats sur le film de semicarbazide (cas du dépôt de biotine-NH₂)

Le nombre d'amas déposés sur le film de semicarbazide après le dépôt de biotine-NH₂ est estimé entre 80 et 120 paquets/μm² (Figures 4.14-c et d, et autres images non-présentées). Leur diamètre apparent est de 30 à 140 nm, et leur hauteur est comprise entre 10 et 45 nm.

Par comparaison, d'après les observations précédentes sur les figures 4.2 et 4.4, la quantité d'agrégats déposés sur le film de semicarbazide était comprise entre 3 et 30 paquets par micron carré. Ceux-ci provenaient d'une polymérisation en solution des molécules d'APTMS, suivie d'une adsorption aléatoire des paquets formés. Un tel phénomène est probablement à l'origine des amas sur la figure 4.14, car ces objets sont répartis aléatoirement sur la surface, y compris sur les électrodes (Figure 4.14-d). Il n'est pas surprenant que la densité des paquets d'APTMS agrégés soit ici supérieure à celle constatée dans la partie 4.2 car l'étape de silanisation amine est relativement difficile à contrôler. Ainsi, l'épaisseur du film d'APTMS peut varier du simple au triple, de 10 à 30 Å, avec les mêmes conditions de dépôt (voir au chapitre 2 la partie 2.2.2-b) [10]. De même, l'agrégation des molécules d'APTMS en solution produit des amas dont les tailles varient du simple au double par rapport à celles décrites dans la partie 4.2.

⁸ Note : les rugosités constatées dans cette partie et à la suivante sont très supérieures à celles du tableau 4.3 car, d'une manière générale, la hauteur des amas sur la surface varie ici sur une gamme plus importante.

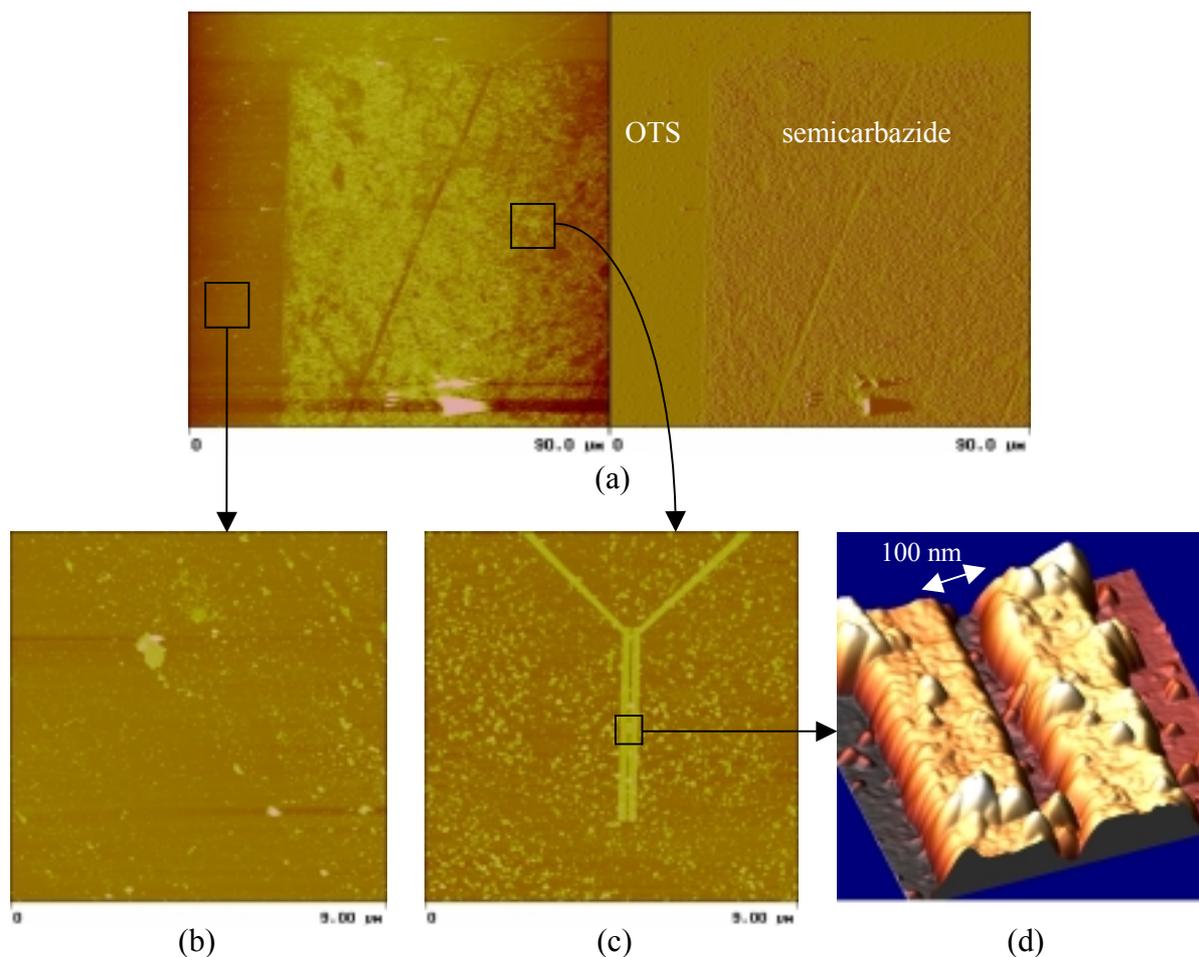


Figure 4.14: Observation AFM des mêmes nanoélectrodes que celles présentées à la figure 4.13-d, après le dépôt de biotine-NH₂ sur les échantillons. a) Image 90 x 90 μm² en hauteur (à gauche) et en amplitude (à droite) ; échelles de 300 nm et 1,5 V respectivement. La séparation entre la surface fonctionnalisée semicarbazide et la monocouche d'OTS apparaît très nettement. b) Image 9 x 9 μm² en hauteur ; échelle 100 nm. Quelques traces sur la monocouche d'OTS. c) Image 9 x 9 μm² en hauteur ; échelle 250 nm. Zoom sur les nanoélectrodes. Des agrégats sont adsorbés sur le film de semicarbazide et sur les électrodes. d) Image 650 x 650 nm² en hauteur ; échelle 60 nm. Zoom sur le gap inter-électrodes.

Type de dépôt	biotine-NH ₂	biotine-COCHO
Rugosité RMS sur semicarbazide (en nm)	3,4 ± 0,3	5,0 ± 0,4
Rugosité RMS sur OTS (en nm)	1,6 ± 0,4	1,8 ± 0,3

Tableau 4.4: Rugosités mesurées après le dépôt de biotine-NH₂ et de biotine-COCHO.

Agrégats sur le film d'OTS (cas du dépôt de biotine-NH₂)

Le diamètre des agrégats sur les OTS est compris entre 60 et 130 nm, et leur hauteur entre 7 et 15 nm (Figure 4.14-b et autres images non-présentées). Ces dimensions sont proches de celles des agrégats présents sur le film de semicarbazide, ce qui tend à montrer que ces amas sont également des agrégats d'APTMS issus de la polymérisation des molécules dans le bain de silanisation. La présence d'agrégats d'APTMS sur le film d'OTS est très probable, puisque le dépôt des paquets d'APTMS est aléatoire. En revanche, la densité des amas sur le film d'OTS, autour de 40 paquets/μm², est 2 à 3 fois moindre que sur le film de semicarbazide. Cette différence tend à confirmer le rôle de passivation obtenu avec la monocouche d'OTS.

Agrégats sur le film de semicarbazide (cas du dépôt de biotine-COCHO)

Sur la figure 4.15, une goutte de biotine-COCHO a été déposée sur les nanoélectrodes. Des amas moléculaires sont également visibles dans les ouvertures de semicarbazide, et en plus grande densité que dans le cas du dépôt de la biotine-NH₂ (Figures 4.14-c et 4.15-a). La densité est ici comprise entre 150 et 200 paquets/μm². Leur taille est de 25 à 140 nm de diamètre, et de 7 à 37 nm de hauteur. Les dimensions des paquets sont donc comparables à celles obtenues sur les échantillons « biotine-NH₂ ». Il est probable que ces agrégats soient, pour cet échantillon également, des paquets d'APTMS puisque tous les échantillons ont été placés simultanément dans le même bain de silanisation et que le dépôt des agrégats d'APTMS sur les échantillons devrait être relativement homogène.

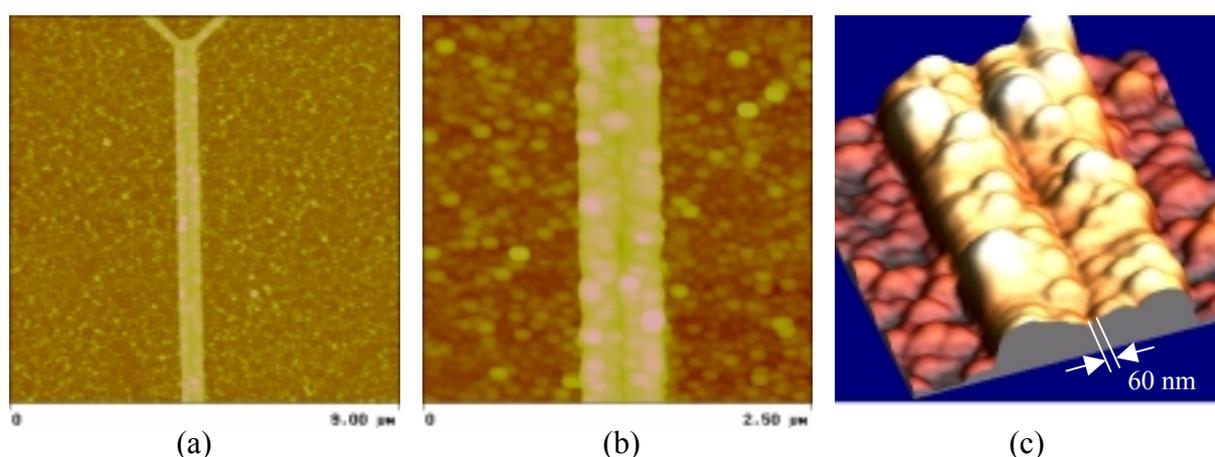


Figure 4.15: Observation AFM de nanoélectrodes séparées de 60 nm, après le dépôt de biotine-COCHO. a) Image 9 x 9 μm² en hauteur ; échelle 200 nm. b) Image 2,5 x 2,5 μm² en hauteur ; échelle 160 nm. c) Image 1 x 1 μm² en hauteur ; échelle 78 nm. Les dimensions de l'image 3D ne sont pas exactement celles de l'image 4.12-d par souci de qualité d'image (visualisation des pixels).

Cependant, la proportion des plus gros amas (diamètre > 75 nm) est plus grande pour le dépôt de la biotine-COCHO, par exemple sur la figure 4.15-c par rapport à la figure 4.14-d. Ces agglomérats sont responsables de l'accroissement de densité observée. Comme lors des expériences dans la partie 4.2, des molécules de biotine-COCHO demeurant sous la forme d'agrégats après la dissolution de la poudre, ont probablement été immobilisés de manière covalente sur la surface fonctionnalisée semicarbazide. De plus, par rapport au dépôt de la biotine-NH₂, les agrégats de biotine-COCHO apportent sur le film de semicarbazide une rugosité supplémentaire d'environ 1,6 nm (Tableau 4.4).

Agrégats sur les structures en or (cas du dépôt de biotine-COCHO)

Les nanoélectrodes sur les figures 4.14-d et 4.15-c présentent un aspect plus rugueux sur leur partie supérieure que les électrodes observées après leur fabrication (Figure 3.10). Cette apparence est générée par une accumulation d'agrégats moléculaires sur leur surface. Le schéma de fixation des agrégats de biotine-COCHO sur l'or des électrodes devrait être identique à celui réalisé sur le film de semicarbazide. En effet, pendant l'étape de greffage des APTMS, des agrégats d'APTMS sont également adsorbés sur les structures en or (observation sur d'autres images AFM ; partie 4.2.2). Bien que les molécules d'APTMS ne soient que physisorbées sur l'or, elles devraient également subir la transformation en semicarbazide. Puis, lors de l'incubation de la biotine-COCHO, des molécules individuelles ou des paquets de biotine-COCHO devraient réagir et se fixer de manière covalente sur ces groupes semicarbazides adsorbés sur l'or. Par conséquent, le nombre d'agrégats sur l'or des électrodes est plus important dans le cas de la biotine-COCHO (paquets d'APTMS et paquets de biotine-COCHO ; figure 4.15-c) que dans celui de la biotine-NH₂ (paquets d'APTMS uniquement ; figure 4.14-d).

4.3.3 Détection électrique

a) Protocole de mesure

Les intensités sont ensuite mesurées pour chaque paire d'électrodes, pour des tensions variant en continu avec un pas minimal de 10 mV. Pour notre étude, nous avons choisi de nous placer autant que possible dans le régime ohmique et d'appliquer pour cela des tensions comprises entre -0,1 V et +0,1 V pour toutes les électrodes. En outre, l'application d'une tension relativement faible permet d'éviter l'électromigration de clusters d'or dans le film organique. Pendant les mesures, les échantillons sont placés dans un cryostat, sous un vide de 0,2 mbar environ à température ambiante. Les mesures sont réalisées en boucle (-0,1 V →

+0,1 V → -0,1 V → ...), avec un temps de pause d'une dizaine de secondes entre chaque série.

Les électrodes pour lesquelles les propriétés électriques demeurent absolument inchangées par rapport aux mesures obtenues « à vide » après leur fabrication, sont considérées comme étant en circuit ouvert et écartées à cette étape (voir au chapitre 2 la partie 2.3.4). D'autres électrodes ont été détruites pendant les manipulations ou pendant les premières mesures électriques. Comme indiqué dans la partie 3.2, le rendement de production des nanoélectrodes est faible, autour de 17 %. Les résultats présentés dans ce chapitre ont ainsi été établis sur 16 paires d'électrodes.

b) Mesures électriques

Biotine-COCHO

Après le dépôt des sondes de biotine entre les nanoélectrodes, les assemblages moléculaires réalisés sont décrits par de nouvelles caractéristiques courant-tension. Des courbes typiques sont données à la figure 4.16.

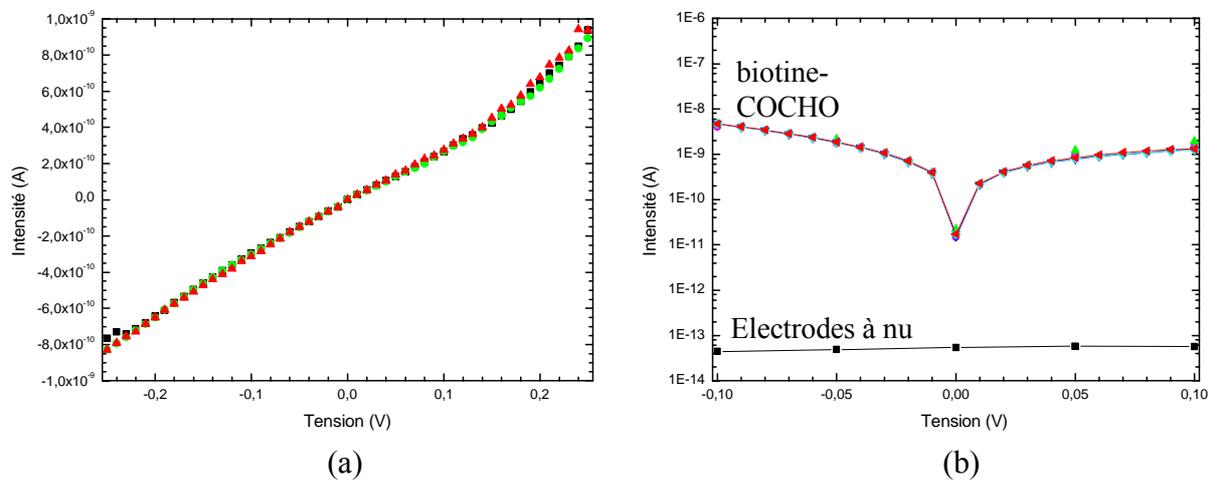


Figure 4.16: Caractéristiques courant-tension après le dépôt de la biotine-COCHO. a) Une courbe typique, présentant un régime ohmique dans la gamme [-0,15 V ; 0,15 V]. La longueur des électrodes et la taille du gap sont de 7 μm et 70 nm respectivement. b) Sur une autre paire d'électrodes (Longueur des électrodes = 10 μm , gap = 100 nm), représentation de la valeur absolue du courant en fonction de la tension appliquée, entre -0,1 V et 0,1 V ⁽⁹⁾.

⁹ Note : Nous pouvons remarquer que l'intensité mesurée à 0 V est non-nulle. Ceci vient du fait qu'il n'est pas possible de régler parfaitement le générateur de tension : à une tension donnée, la tension réellement appliquée par l'appareil est légèrement décalée par rapport à la polarisation affichée. Ainsi, à 0 V, la tension appliquée n'est pas exactement nulle, mais de quelques millivolts.

Sur la figure 4.16-a, une courbe I-V, réalisée sur une plage de tension de $[-0,25 \text{ V} ; +0,25 \text{ V}]$, présente un comportement linéaire pour des tensions appliquées inférieures à $0,15 \text{ V}$, c'est-à-dire dans la gamme de tension que nous avons choisi d'étudier ($|V| < 0,1 \text{ V}$).

Les mesures I-V montrent deux niveaux de courant, qui correspondent, pour le premier, au niveau du bruit obtenu pour les électrodes après leur fabrication (« électrodes à nu »), et pour le deuxième au courant mesuré après le greffage du film d'APTMS, sa fonctionnalisation en semicarbazide et le dépôt de la biotine-COCHO.

Biotine-NH₂

D'après les observations en fluorescence de la partie 4.1, l'adsorption de la biotine-NH₂ est très inférieure à la quantité de biotine-COCHO immobilisée de manière covalente. Toutefois, deux niveaux d'intensité sont également obtenus après le dépôt de la biotine-NH₂ sur les terminaisons semicarbazides. Un exemple d'une telle caractéristique I-V est présenté à la figure 4.17. Quelques mesures effectuées après la transformation des groupements de surface amine en terminaisons semicarbazides sont également présentées (pas de 50 mV).

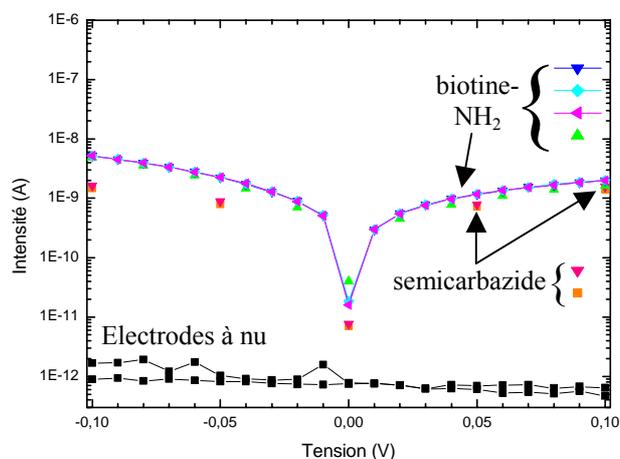


Figure 4.17: Valeur absolue du courant en fonction de la tension appliquée, après la fabrication des électrodes, la synthèse des terminaisons semicarbazides et le dépôt de la biotine-NH₂. Longueur des électrodes = $5 \mu\text{m}$, gap = 100 nm .

Stabilité des mesures

Sur les figures 4.16 et 4.17, plusieurs courbes superposées représentent le niveau du courant dans le film après le dépôt de la biotine. Nous pouvons voir que les caractéristiques I-V sont très reproductibles, sans effet d'hystérésis. Le temps de pompage dans la chambre n'affecte pas la stabilité des mesures, car un pompage de 15 minutes à 2 heures ne montre pas

d'évolution sensible de la conductivité. Notons que lorsque le pompage est arrêté et que la pression dans la chambre est ramenée à la pression atmosphérique, puis que le pompage est réamorcé, le niveau de courant est très proche de sa valeur initiale.

Sur l'ensemble des courbes enregistrées, les intensités mesurées pour une tension appliquée de 0,1 V présentent une dispersion moyenne de 8 %. L'écart est même inférieur à 4 % pour la moitié des électrodes. En conséquence, nous ne présenterons pas de barres d'erreur sur les valeurs des intensités moyennes présentées dans ce chapitre, car les barres d'erreur ne seraient pas véritablement perceptibles sur une présentation des intensités en échelle semi-log telles que celles des figures 4.16-b et 4.17.

Influence de la géométrie des électrodes

Les nanoélectrodes possédant les gaps les plus petits ne sont plus opérationnelles à cette étape ; seules demeurent celles dont la distance inter-électrodes est supérieure ou égale à 70 nm, conformément à la répartition des électrodes donnée au paragraphe 3.2 (Figure 3.12 et tableau 3.3). En revanche, ni la longueur des électrodes (de 5 à 30 μm) ni la taille du gap (de 70 à 100 nm) ne semblent avoir d'influence sur la distribution des intensités mesurées (Figure 4.18).

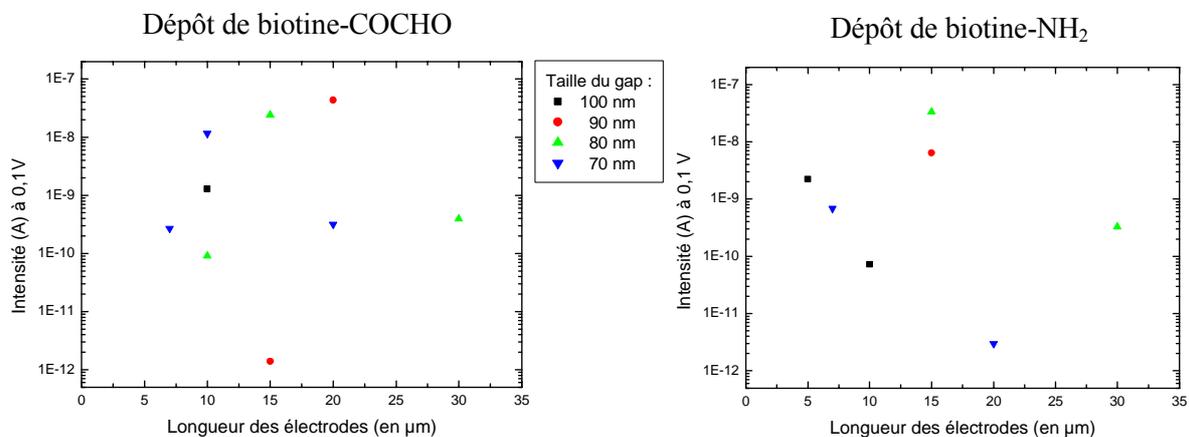


Figure 4.18: Courants mesurés après le dépôt de la biotine-COCHO et de la biotine-NH₂ pour une tension appliquée de 0,1 V, en fonction de la longueur des électrodes. Les dimensions des gaps inter-électrodes sont comprises entre 70 et 100 nm.

Dispersion des intensités mesurées

Les dépôts de la biotine-COCHO et de la biotine-NH₂ sont caractérisés par deux niveaux de courant bien distincts et d'aspect analogue (Figures 4.16-b et 4.17). Bien que la

biotine-NH₂ soit physisorbée sur le substrat en proportion très inférieure, les ordres de grandeur des courants sont comparables à ceux observés avec la biotine-COCHO (Figure 4.18). Dans les deux cas, les intensités mesurées à 0,1 V sont étalées sur près de 5 décades, de 10⁻¹² à 5 x 10⁻⁸ A (Figure 4.18).

Influence du film de semicarbazide

Des caractéristiques I-V ont été réalisées pour quelques électrodes après l'étape de synthèse des fonctions semicarbazides. L'étape précédente (greffage des APTMS sur le substrat de SiO₂) n'a pas fait l'objet d'une telle étude car les terminaisons amine tendent à réagir avec des contaminants dans l'air en un temps relativement court [11], incompatible avec la durée nécessaire pour réaliser ces expériences.

La figure 4.17 présente ainsi les intensités mesurées à travers le film de semicarbazide pour quelques tensions (pas de 50 mV). Le niveau de courant observé est intermédiaire à celui mesuré pour les électrodes après leur fabrication et celui obtenu après le dépôt de la biotine-NH₂. Le film de semicarbazide participe donc au mécanisme du transport du courant entre les deux nanoélectrodes. Le courant mesuré à -0,1 V et +0,1 V augmente en moyenne d'un facteur 3,9 ± 1,7 après le dépôt de la biotine-NH₂ et d'un facteur 18,8 ± 8,1 après le dépôt de la biotine-COCHO, par rapport aux intensités mesurées à travers le film de semicarbazide (augmentations moyennes calculées à partir de 4 mesures dans chacun des 2 cas).

Ordres de grandeur des conductances et des conductivités

Dans le régime ohmique, la conductivité dans le film organique est déduite de la densité de courant, suivant la formule :

$$\sigma = g \cdot \left(\frac{\partial J}{\partial V} \right)_{|V| < 0,1V} = \frac{g}{L \cdot e} \cdot \left(\frac{\partial I}{\partial V} \right)_{|V| < 0,1V} \quad (4-2)$$

où σ représente la conductivité, g est la distance inter-électrodes, L la longueur des électrodes, e l'épaisseur du film organique, J la densité de courant et I l'intensité mesurée lorsqu'une tension V est appliquée. La conductance du système, donnée par le rapport $\left(\frac{\partial I}{\partial V} \right)$, est obtenue en pratique à partir des dérivées des caractéristiques I-V enregistrées. Les valeurs des conductances mesurées dans le régime ohmique sont données dans le tableau 4.5. Comme attendu, la répartition des conductances en fonction de la longueur des électrodes est identique à celles données sur la figure 4.18.

Longueur des électrodes Gap des électrodes	5 μm	7 μm	10 μm	15 μm	20 μm	25 μm	30 μm
100 nm	(1,7 ± 0,4) x 10 ⁻⁸		(7,3 ± 0,9) x 10 ⁻⁹ (6,6 ± 2,1) x 10 ⁻¹⁰				
90 nm				(1,3 ± 0,3) x 10 ⁻¹¹ (3,8 ± 0,4) x 10 ⁻⁸	(3,1 ± 0,1) x 10 ⁻⁷		
80 nm			(7,5 ± 0,8) x 10 ⁻¹⁰	(2,0 ± 0,1) x 10 ⁻⁷ (2,9 ± 0,4) x 10 ⁻⁷			(2,7 ± 0,2) x 10 ⁻⁹ (8,0 ± 0,6) x 10 ⁻¹⁰
70 nm		(2,5 ± 0,1) x 10 ⁻⁹ (2,4 ± 0,1) x 10 ⁻⁹	(1,1 ± 0,1) x 10 ⁻⁷		(2,3 ± 0,4) x 10 ⁻⁹ (1,8 ± 0,1) x 10 ⁻¹¹		

Tableau 4.5: Conductances $\left(\frac{\partial I}{\partial V}\right)$ (en S) mesurées dans le régime linéaire après le dépôt de la biotine-COCHO (en rouge) et de la biotine-NH₂ (en bleu).

Les films organiques montrent des conductivités comprises entre 10⁻⁷ et 6 x 10⁻³ S.cm⁻¹. L'étalement sur 5 décades est vérifié à la fois pour le dépôt de la biotine-COCHO et pour celui de la biotine-NH₂ (Figure 4.19).

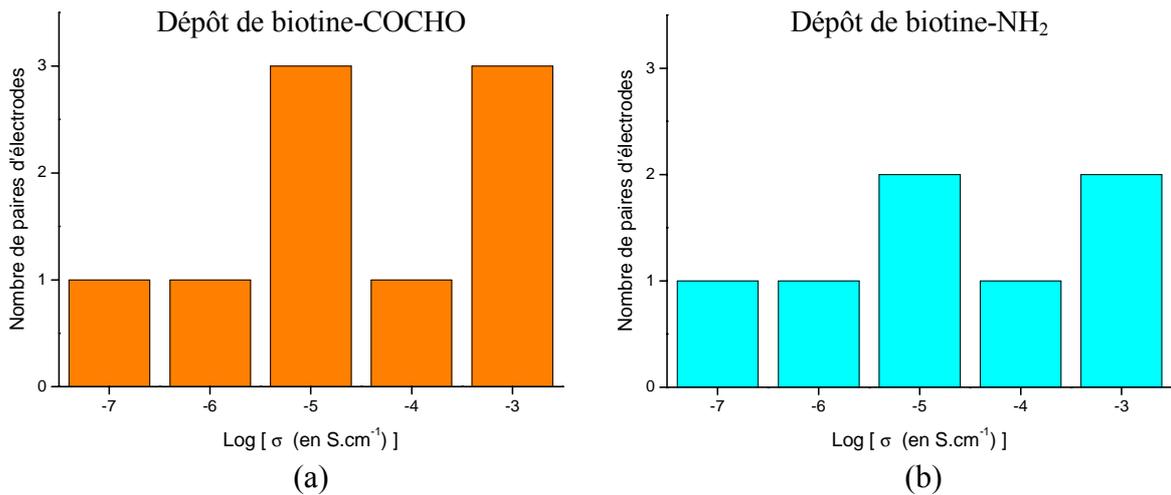


Figure 4.19: Histogrammes des ordres de grandeur des conductivités mesurées dans le régime ohmique, a) après le dépôt de la biotine-COCHO, et b) après le dépôt de la biotine-NH₂.

c) Interprétation

La figure 4.18 montre que la résistance totale du système varie très fortement d'une paire d'électrodes à une autre. Afin d'expliquer une telle dispersion, nous allons discuter l'influence des 2 facteurs qui nous semblent prédominants : la qualité du contact métal/molécules et la conductivité de l'assemblage moléculaire dans l'espace inter-électrodes.

Modélisation du système

Les mesures de conductivité sont caractérisées par les deux résistances R_{contact} et R'_{contact} aux interfaces entre le métal et la couche moléculaire, et la résistance R_{film} de la couche moléculaire. Pour une paire d'électrodes donnée, la résistance totale du système électrode/assemblage moléculaire/électrode est donc égale à $R_{\text{contact}} + R_{\text{film}} + R'_{\text{contact}}$. Il est peu probable que les deux résistances de contact soient strictement égales, car les interfaces ne sont pas forcément similaires. En effet, à chaque étape de l'assemblage moléculaire, un certain degré de désordre est ajouté, qui peut être à l'origine de variations locales de la densité des molécules à l'interface avec les électrodes. Pour les mêmes raisons, la résistance du film organique ne devrait pas être exactement identique dans toutes les ouvertures de semicarbazide de l'échantillon.

Calcul de l'aire de contact

L'aire de la surface de contact entre une électrode et les molécules est donnée par la longueur de l'électrode multipliée par l'épaisseur du film organique. D'après nos estimations dans la partie 3.2, la première couche, de 10 à 30 Å d'épaisseur, est constituée par la polymérisation des APTMS ; puis les liaisons semicarbazones et l'immobilisation de molécules individuelles de biotine ajoutent près de 3,7 Å et quelques dizaines d'angströms (jusqu'à 70 Å) respectivement. Donc l'épaisseur des assemblages moléculaires est estimée à 60 ± 30 Å pour le dépôt de la biotine-COCHO, et à 24 ± 10 Å pour le dépôt de la biotine-NH₂ (pas de fixation de la biotine). Le calcul des épaisseurs des films organiques comporte une incertitude importante, d'environ 50 %. En outre, des variations locales des épaisseurs peuvent être attendues, d'autant plus que les agrégats d'APTMS et de biotine-COCHO déposés sur la surface ne sont pas pris en compte.

Par conséquent, la surface de contact entre les électrodes et les molécules est comprise entre 0,007 et 0,3 μm^2 selon la longueur des électrodes. Ces surfaces sont très faibles, ce qui explique l'importance cruciale de la zone de contact entre le métal et le film organique. Le facteur entre les aires minimale et maximale théoriques est d'environ 40, et donc inférieur à

l'étalement sur quelques décades des intensités mesurées (Figure 4.18). Toutefois, la qualité de l'interface molécules/électrode ne devrait pas être homogène sur toute la longueur des électrodes, et il est possible que la qualité des contacts aux deux interfaces joue un rôle important, au même titre que l'aire considérée.

Conséquence de l'aire de contact sur la densité de courant et la conductivité

L'exploitation des caractéristiques courant-tension obtenues, pour en déduire les valeurs de la densité de courant et de la conductivité à travers le système, se révèle difficile à réaliser. En effet, la densité de courant (courant divisé par l'aire de la surface de contact) est habituellement calculée à partir de plots de contact de quelques millimètres carrés afin de considérer une surface significative. Or, dans notre cas, la surface n'est pas véritablement représentative, car l'aire de contact est inférieure à $0,3 \mu\text{m}^2$. Les surfaces possèdent donc une influence très forte sur les mesures. Ainsi, les densités de courant mesurées à 0,1 V apparaissent extrêmement élevées, avec des ordres de grandeur compris entre 10^{-3} et 10^1 A.cm^{-2} selon les électrodes.

Puisque la conductivité est calculée en dérivant la densité de courant par rapport à la tension, ici encore le manque de représentativité de la surface influe fortement sur les valeurs en donnant des ordres de grandeur très élevés (Figure 4.19). Notons toutefois que les conductances mesurées (Tableau 4.5) sont dans les ordres de grandeur de celles obtenues à travers des monocouches organiques conductrices [12].

d) Nature du transport

Dans cette partie, nous allons discuter des mécanismes pouvant être à l'origine des courants mesurés. Quelques propositions seront énoncées pour tenter d'expliquer les procédés à l'œuvre lors du transfert des charges électriques entre les électrodes.

Conductivité électrique de l'eau

Bien que l'échantillon soit séché et placé dans une chambre sous vide pour les mesures électriques, une partie de l'eau demeure physisorbée sur la surface. Une conduction de type ionique à travers la fine pellicule d'eau adsorbée peut être à l'origine d'un transport des charges électriques entre les deux électrodes.

La conductivité des ions H_3O^+ et OH^- dans l'eau est donnée par la formule :

$$\sigma = \lambda_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot [\text{H}_3\text{O}^+] + \lambda_{\text{OH}^-} \cdot [\text{OH}^-] \quad (4-3)$$

où $\lambda_{\text{H}_3\text{O}^+}$ et λ_{OH^-} désignent les conductivités ioniques des ions H_3O^+ et OH^- . Les valeurs de $\lambda_{\text{H}_3\text{O}^+}$ et de λ_{OH^-} sont de $3,4965 \times 10^{-2}$ et $1,98 \times 10^{-2} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1}$ respectivement [13]. Puisque les lavages des échantillons sont effectués à un pH proche du pH neutre (Tableau 4.1), les concentrations ioniques dans la couche d'eau adsorbée sur le substrat sont très faibles ($\sim 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$). Ainsi, à pH = 7, la conductivité de l'eau est de $5,5 \times 10^{-8} \text{ S.cm}^{-1}$.

Ce type d'explication convient pour les intensités mesurées par les électrodes « à nu » (après leur fabrication). Ainsi, toutes les conductances mesurées sont comprises entre $6 \times 10^{-14} \text{ S}$ (valeur limite de l'appareil de mesure) et $4 \times 10^{-10} \text{ S}$ (valeurs obtenues à partir des figures 4.23 et 5.4, avec $V = 0,1 \text{ V}$). L'épaisseur d'eau moyenne est alors de l'ordre de 10 \AA .

Sur des films de semicarbazide, les angles de contact mesurés avec des gouttes de formamide ($22 \pm 2^\circ$) et d'éthylèneglycol ($19 \pm 3^\circ$) ont montré que cette surface est caractérisée par une bonne mouillabilité par les liquides polaires (partie 3.1.2-a). L'angle formé par une goutte d'eau déposée sur le film décroît au cours du temps et n'est toujours pas stabilisé après 40 secondes. Le film de semicarbazide est donc une surface très hydrophile et qui devient de plus en plus polaire au cours du temps au contact d'une solution aqueuse.

Compte tenu de l'aire de contact estimée précédemment (entre $0,007$ et $0,3 \text{ \mu m}^2$; partie 4.3.3-c – « Calcul de l'aire de contact ») et de la distance inter-électrodes comprise entre 70 et 100 nm , les résistances théoriques attendues pour un courant à travers la couche d'eau sont comprises entre $4,2 \times 10^{10}$ et $2,6 \times 10^{12} \text{ \Omega}$, soit des conductances comprises entre 4×10^{-13} et $2 \times 10^{-11} \text{ S}$.

Cependant, ces valeurs sont inférieures à celles mesurées à travers le film de semicarbazide (entre 3×10^{-11} et $2 \times 10^{-8} \text{ S}$; intervalle réalisé à partir de 8 valeurs), après le dépôt de la biotine-NH₂ (entre $1,8 \times 10^{-11}$ et $2,9 \times 10^{-7} \text{ S}$; Tableau 4.5) et après le dépôt de la biotine-COCHO (entre $1,3 \times 10^{-11}$ et $3,1 \times 10^{-7} \text{ S}$; Tableau 4.5). La conductivité électrique de l'eau est donc insuffisante pour expliquer les courants obtenus à travers l'assemblage moléculaire, d'autant plus que notre hypothèse de calcul ne tient pas compte de l'espace pris par les molécules constituant le film organique (calcul réalisé à partir d'un « barreau » parallélépipédique d'eau). Par conséquent, d'autres mécanismes de transport de charges doivent être associés à ce type de courant ¹⁰.

¹⁰ Note : Dans l'hypothèse où l'aire de la section de la couche d'eau serait plus importante que celle estimée pour nos calculs (épaisseur de la couche d'eau plus grande que l'épaisseur de l'assemblage moléculaire; couche d'eau « au-dessus » du film organique), l'épaisseur d'eau associée aux conductances mesurées serait comprise entre 35 \AA et ... $1,2 \text{ mm}$! (variation des conductances sur 4 ordres de grandeur).

Un transport électronique par effet tunnel ?

Dans un film organique, le déplacement de proche en proche des électrons est habituellement décrit par une succession de sauts réalisés par effet tunnel entre des groupements chimiques donneur et accepteur d'électron situés à l'intérieur d'une même molécule ou dans différentes molécules du film (*Variable Range Hopping* ; voir au chapitre 1 la partie 1.7.2). Dans notre cas, aucune des molécules employées ne présente, à proprement parler, de sites d'oxydo-réduction clairement définis.

Toutefois, nous pouvons noter que l'assemblage moléculaire est caractérisé par la présence d'un grand nombre de liaisons π , dues à des doubles liaisons de type $-C=O$ et $-C=N-$. Contrairement aux liaisons σ , les liaisons π sont globalement favorables au déplacement électronique, car les orbitales π sont relativement délocalisées en-dehors de l'axe principal de la molécule. Le transport d'électrons par l'intermédiaire d'interactions formées entre les liaisons π de molécules voisines (conduction par percolation) a déjà été décrit dans des films de Langmuir-Blodgett comportant des cycles aromatiques, donc possédant de nombreux électrons π naturellement délocalisés en-dehors du plan de la molécule [14, 15].

Ainsi, chaque terminaison semicarbazide ($-NH-C(=O)-NH-NH_2$) arrangée sur le substrat dispose d'une double liaison, tandis que les liaisons semicarbazones ($-NH-C(=O)-NH-N=CH-C(=O)-NH-$) comportent trois doubles liaisons (Figure 3.3). De plus, les molécules de biotine-COCHO et de biotine- NH_2 déposées sur le film organique possèdent de nombreuses doubles liaisons, situées sur le peptide reliant la biotine aux fonctions $-CO-CHO$ ou $-NH_2$ (liaisons peptidiques entre acides aminés), et sur la biotine elle-même (Figure 3.5). Enfin, un des acides aminés, la tyrosine, contient un groupe aromatique (un groupement phénol) dans sa chaîne latérale (Figure 3.5).

Cette hypothèse suppose un large recouvrement des orbitales π sur la surface, et donc une compacité élevée des molécules dans le film, pour aboutir à une bonne conductivité dans le plan de l'assemblage moléculaire. En effet, le transfert tunnel est limité à des distances inférieures à environ 1 nm (partie 1.7.2). Or, le film moléculaire formé est très désordonné et non-compact. Par conséquent, une conduction électronique par hopping nous semble peu probable.

Influence des sels

Nous avons vu que le mouvement des ions H_3O^+ et OH^- à travers la couche d'eau est à la base d'une conduction de type ionique (conductivité de l'eau). Cependant, une conduction ionique supplémentaire devrait être portée par les sels en provenance des tampons

d'incubation et de lavage (Tableaux 4.1 et 4.2). En effet, une partie des ions de ces solutions a très probablement été piégée dans l'assemblage moléculaire.

Les sels utilisés dans les tampons acétate de sodium/acide acétique et PBS sont Na^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} et H_2PO_4^- (Tableaux 4.1 et 4.2). Par conséquent, la conductivité ionique due aux ions présents dans le film de semicarbazide, est définie par :

$$\sigma = \lambda_{\text{Na}^+} \cdot [\text{Na}^+] + \lambda_{\text{Cl}^-} \cdot [\text{Cl}^-] + \lambda_{\text{HPO}_4^{2-}} \cdot [\text{HPO}_4^{2-}] + \lambda_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} \cdot [\text{H}_2\text{PO}_4^-] \quad (4-4)$$

avec λ_{Na^+} , λ_{Cl^-} , $\lambda_{\text{HPO}_4^{2-}}$ et $\lambda_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}$ les conductivités ioniques des ions Na^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} et H_2PO_4^- respectivement. Leurs valeurs sont données par [13] :

$$\lambda_{\text{Na}^+} = 5,008 \times 10^{-3} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1}$$

$$\lambda_{\text{Cl}^-} = 7,631 \times 10^{-3} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1}$$

$$\lambda_{\text{HPO}_4^{2-}} = 2 \cdot \lambda_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} = 6,6 \times 10^{-3} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1}$$

Une difficulté pour évaluer les ordres de grandeur de la conduction ionique par les sels est d'estimer le nombre d'ions sur la surface. Le tampon PBS employé lors des lavages est un mélange de (Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4) à 10 mM et de NaCl à 0,15 M (Tableau 4.1). Cette composition semble indiquer que les concentrations des ions intégrés dans l'assemblage moléculaire sont très grandes.

Cependant, les concentrations sur la surface sont très probablement inférieures aux concentrations initiales dans les solutions. En effet, plusieurs rinçages sont ensuite effectués avec de l'eau milliQ et de l'éthanol absolu, qui devraient emporter une partie des sels. Dans le paragraphe 4.4.3, des observations en spectroscopie Auger montrent que la présence du sodium, du chlore et du potassium n'est pas détectée sur la monocouche d'OTS et sur les pistes électriques après le dépôt de la streptavidine (observations non-réalisées sur le film de semicarbazide). Il est donc probable que ces ions soient massivement retirés du substrat par les nombreux rinçages effectués en fin de protocole.

De plus, une grande part des ions HPO_4^{2-} et H_2PO_4^- sont immobilisés sur la surface en tant que contre-ions de la biotine- NH_2 et de la biotine-COCHO, et donc non-disponibles pour le transport du courant. Ainsi, sur le peptide reliant la biotine à la fonction terminale, la chaîne latérale de la lysine possède une charge positive à pH neutre ($-\text{NH}_2$ transformé en $-\text{NH}_3^+$ sur la figure 3.5). Cette charge est neutralisée par un dihydrogénophosphate H_2PO_4^- provenant de la solution de PBS employée pendant les lavages (Tableau 4.1). Remarquons que les augmentations de courant observées entre l'étape de synthèse du film de semicarbazide et le dépôt de la biotine (partie 4.3.3-b – « Influence du film de semicarbazide »), tendent à

confirmer l'hypothèse d'un courant ionique, car, selon ce schéma de principe, la biotine devrait apporter sur la surface un nombre important d'ions et de molécules d'eau (sphère d'hydratation), et ceci en corrélation avec le nombre de molécules de biotine déposées.

Nous pouvons supposer, à titre d'exemple, que le courant ionique est établi par les ions H_2PO_4^- apportés par les molécules de biotine. D'après une mesure réalisée avec des ODN de 18 acides nucléiques marqués avec un phosphore radioactif, la densité de molécules fixées de manière covalente sur le film de semicarbazide est de l'ordre de 10^5 molécules/ μm^2 (partie 3.1.2-a) [1]. Si l'on considère une densité équivalente de H_2PO_4^- sur la surface (un contre-ion apporté par chaque molécule de biotine) et avec les épaisseurs des assemblages moléculaires estimées à la partie 4.3.3-c, la concentration de H_2PO_4^- dans le film est comprise entre 10^{-2} et 10^{-1} mol.L⁻¹. Si tous les ions H_2PO_4^- se mettaient en mouvement lorsque le champ électrique est appliqué, la conductivité du courant ionique généré serait de 5×10^{-4} - 5×10^{-3} S.cm⁻¹ environ, soit des conductances théoriques comprises entre 3×10^{-9} et 2×10^{-6} S. Ces valeurs sont comprises dans la gamme de conductivités et de conductances mesurées (Figure 4.19 et tableau 4.5).

Notons toutefois que l'ion H_2PO_4^- ne peut pas être véritablement à la base d'un tel courant, car il est immobilisé en tant que contre-ion de la biotine. Un courant ionique serait *a priori* plutôt porté par les sels Na^+ et Cl^- restant après les lavages des échantillons, en supposant que les concentrations de ces ions sont comparables à celle de l'ion H_2PO_4^- sur la surface (concentration en sels Na^+ et Cl^- proche de leur concentration initiale dans le tampon PBS).

Modification du pH

Un troisième mécanisme de conduction ionique pourrait être fondé sur le fait que les ions dihydrogénophosphates H_2PO_4^- , immobilisés contre des molécules de biotine, peuvent perdre un proton H^+ et devenir un ion monohydrogénophosphate HPO_4^{2-} . En effet, un mouvement de protons pourrait être créé entre les électrodes lors d'une libération d'ions H^+ par des ions phosphates ($\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$). Les H^+ libérés sont alors dirigés par le champ électrique vers la cathode et participent au courant.

Cependant, la réaction inverse doit aussi être réalisée pour conserver la neutralité électrique devant la lysine ($\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^-$). Le proton pourrait être capturé dans la couche d'eau entourant la biotine (sphère d'hydratation). Un tel courant ionique serait donc basé sur la libération et la capture successive d'un proton par les ions H_2PO_4^- , et sur le transfert de proche en proche des ions H^+ orientés par le champ électrique (H^+ extrait d'une molécule d'eau).

L'introduction de nouveaux ions H^+ dans la fine pellicule d'eau revient à augmenter la conductivité électrique de l'eau. Nous avons estimé précédemment la concentration en ions $H_2PO_4^-$ à $10^{-2} - 10^{-1}$ M. Cependant, nous ignorons la quantité de H^+ qui pourraient être libérés par ce phénomène, et donc la variation de la conductivité qui en résulterait. Celle-ci peut être importante, car la conductivité de l'eau est très sensible aux variations du pH (variations du même ordre de grandeur). Par exemple, d'après la formule (4-3), une modification du pH de 7 à 5 fait varier la conductivité ionique dans l'eau de $5,5 \times 10^{-8}$ à $3,5 \times 10^{-6}$ S.cm⁻¹.

e) Conclusion, sélection d'un critère de détection

Les résultats précédents ont montré le fort degré de dispersion des intensités mesurées pour l'ensemble des électrodes d'un même échantillon. Plusieurs mécanismes de conduction sont proposés pour expliquer les ordres de grandeur obtenus. Le transport d'ions (H^+ , OH^- et sels Na^+ et Cl^-) à travers la couche d'eau intégrée dans le film de semicarbazide semble être le courant prédominant. Une conduction par transfert tunnel d'électrons entre les liaisons π disposées sur la surface est estimée peu probable, en raison du faible couplage entre les différentes orbitales π dans l'assemblage moléculaire fortement désordonné.

A l'étape suivante, les molécules de streptavidine devraient apporter sur la surface un nombre supplémentaire d'ions et de molécules d'eau provenant de leur sphère d'hydratation. Toutefois, l'augmentation de la concentration en ions sur la surface pourrait se révéler insuffisante pour produire une augmentation véritablement distincte de la conductivité. Pour cette raison, les molécules de streptavidine utilisées pour étudier la faisabilité de la détection électrique d'une reconnaissance biomoléculaire, seront marquées avec un colloïde d'or. Les nanoparticules d'or devraient permettre d'amplifier la conductivité du système et de dépasser la conductivité ionique mesurée après le dépôt de la biotine.

D'une manière générale, la densité des molécules à l'échelle locale, et le type de contact établi entre les molécules et les nanoélectrodes, sont des paramètres importants qui diffèrent d'une électrode à une autre. Par conséquent, dans le cadre du dispositif de détection que nous cherchons à développer, nous devons raisonner de manière indépendante pour chaque paire d'électrodes. De plus, puisque les concepts de densité de courant et de conductivité sont peu représentatifs pour notre système, les comparaisons pour une électrode donnée sont effectuées directement avec les valeurs des intensités mesurées à chaque étape de l'interaction biomoléculaire.

Dans la partie 4.4, les courants enregistrés après le dépôt de la streptavidine marquée à l'or colloïdal pour une tension appliquée de 0,1 V seront donc comparés directement avec les intensités mesurées dans cette partie.

4.4 Caractérisation électrique de la streptavidine marquée à l'or colloïdal

4.4.1 Incubation de la streptavidine

a) Protocole de dépôt de la streptavidine

L'étape suivante consiste à déposer des molécules de streptavidine marquées avec un colloïde d'or, et à étudier une augmentation éventuelle de la conductivité. Une nanoparticule d'or, d'un diamètre de $10,0 \pm 0,7$ nm, porte en moyenne 7,7 molécules de streptavidine. Une goutte de streptavidine marquée à l'or, à 10^{-3} mg/mL dans un tampon PBS à 0,01 M et pH = 7,2 contenant 0,1 % de Tween 20, est déposée sur les échantillons et incubée entre une lame et une lamelle pendant 2 h à 37°C en chambre humide (protocole adapté du tableau 4.2). Puis les échantillons sont lavés 4 fois avec un tampon PBS contenant 0,05 % de Tween 20, avec de l'eau milliQ et avec un mélange éthanol:eau = 95:5. L'ajout de Tween 20 dans le PBS est conseillé par le fournisseur, afin de minimiser les protéines adsorbées sur la surface. Les échantillons sont ensuite séchés dans un dessiccateur et observés en microscopie optique.

b) Observations en microscopie optique

Comme dans la partie 4.3, les gouttes de Tween 20 sont concentrées sur le film de semicarbazide et parfois sur les structures en or ; aucune goutte n'est adsorbée sur la monocouche d'OTS. Des amas en forme de bâtonnets, créés par agglomération de nanoparticules d'or, sont regroupés de manière aléatoire sur la surface (voir la partie 4.2.5-b). Ils sont en général rassemblés sur le film d'OTS et très éloignés des électrodes, et ne devraient donc pas produire de perturbations électriques. Un lavage de 5 min à l'eau déionisée agitée par des ultrasons permet de retirer les gouttes de Tween 20, mais cette méthode est inefficace pour détacher les agglomérats de billes d'or (partie 4.2).

c) Observations en AFM

Passivation par le film d'OTS

L'analyse des images obtenues en microscopie à force atomique peut se révéler relativement difficile en raison de la complexité du système et du nombre d'objets de nature différente déposés sur la surface (partie 4.2). Toutefois, la frontière entre les films de semicarbazide et d'OTS est visible en AFM (Figure 4.20-c), bien qu'elle soit moins marquée qu'à l'étape du dépôt de la biotine (Figure 4.14-a). Ceci indique que la passivation de la surface par la monocouche d'OTS est plus efficace pour minimiser l'adsorption de la biotine

que celle de la streptavidine (partie 3.3.6-f). Par contre, la distinction entre les deux films organiques apparaît nettement avec des mesures de rugosité (Tableau 4.6). Par rapport aux mesures effectuées après le dépôt de la biotine (Tableau 4.4), une augmentation de la rugosité est constatée sur les deux types de surface et pour les deux types d'échantillons (Tableau 4.6).

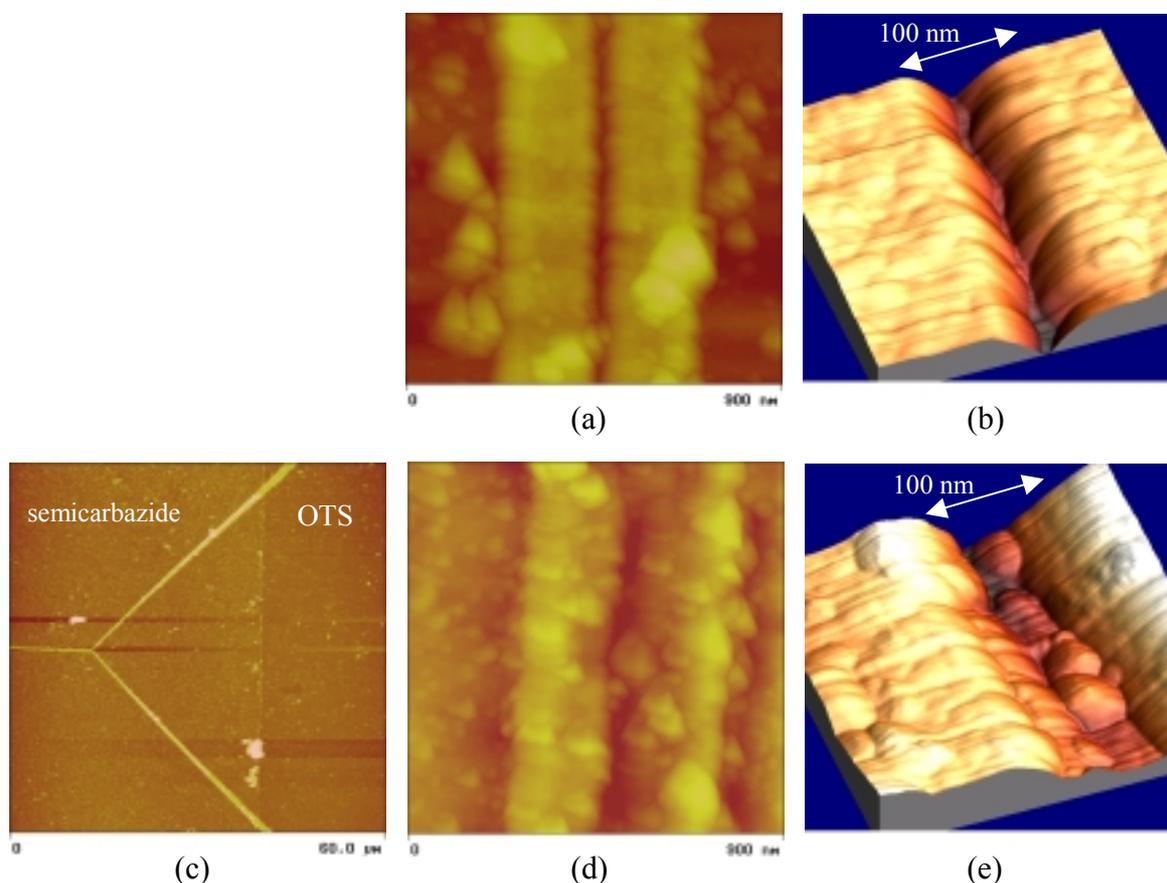


Figure 4.20: Observations AFM (en mode hauteur) des électrodes après le dépôt de la streptavidine marquée à l'or. a et b) Echantillon « biotine-NH₂ ». c, d et e) Echantillon « biotine-COCHO ». c) Image 60 x 60 μm² ; échelle 150 nm. La séparation entre les deux films organiques est visible en AFM. a et d) Images 900 x 900 nm² ; échelle 150 nm. b et e) Images 235 x 235 nm² ; échelle 60 nm.

Type de dépôt	streptavidine-colloïde sur biotine-NH ₂	Streptavidine-colloïde sur biotine-COCHO
Rugosité RMS sur semicarbazide (en nm)	4,3 ± 0,4	6,6 ± 0,6
Rugosité RMS sur OTS (en nm)	1,7 ± 0,7	2,0 ± 0,6

Tableau 4.6: Rugosités mesurées après le dépôt de la streptavidine marquée avec un colloïde d'or sur les deux types de surface.

Agrégats sur le film de semicarbazide

Nous avons vu, dans les parties 4.2 et 4.3, que la densité d'agrégats présents dans les ouvertures de semicarbazide dépend de la terminaison ajoutée à la biotine puisque, en plus des amas d'APTMS formés dans le bain de silanisation, peuvent également s'ajouter des agrégats de biotine-COCHO. Cette différence de population est toujours perceptible pour les gros agglomérats après le dépôt de la streptavidine (Figures 4.20-a et d). Leur diamètre est compris entre 35 et 60 nm, et leur hauteur entre 10 et 40 nm. Ces dimensions sont un peu inférieures à celles mesurées lors du dépôt de la biotine-COCHO (partie 4.3.2-c), suggérant ainsi que les agrégats de biotine-COCHO ont été partiellement dissous pendant l'incubation de la streptavidine et sous l'action des différents lavages.

Nanoparticules d'or

D'une manière générale, les billes d'or sont plus petites que ces amas, et donc plus difficiles à distinguer. Les nanoparticules d'or sont déposées en densité plus élevée sur les échantillons « biotine-COCHO », en raison de la quantité de billes fixées sur les sondes de biotine par l'intermédiaire de complexes biotine:streptavidine (Figure 4.21). Le dépôt des agrégats et des billes d'or est relativement uniforme sur l'ensemble du film de semicarbazide (Figure 4.20-c). La partie supérieure des électrodes, ainsi que le gap inter-électrodes, sont également recouverts d'agrégats et de colloïdes, et ceci en plus forte proportion pour l'échantillon « biotine-COCHO » (Figures 4.20-a, b, d et e).

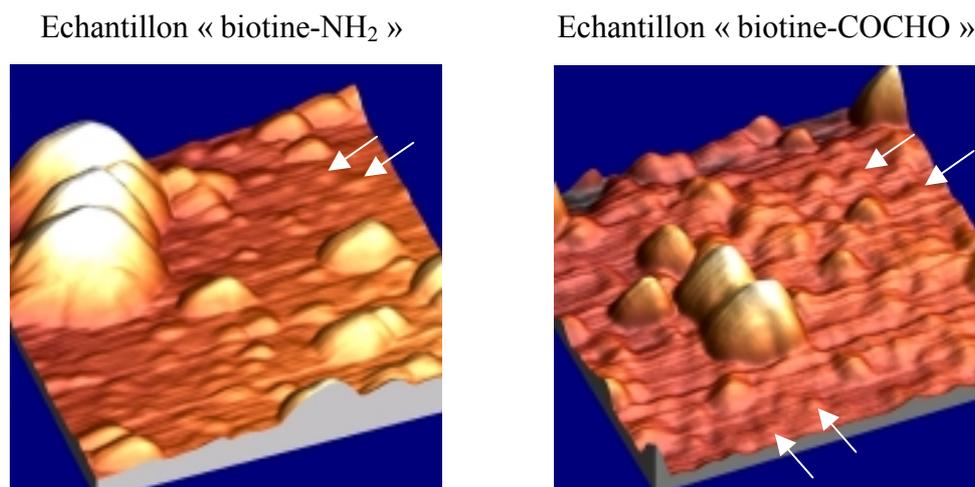


Figure 4.21: Images AFM en mode hauteur dans les ouvertures de semicarbazide après le dépôt de la streptavidine marquée à l'or colloïdal. Images $350 \times 350 \text{ nm}^2$ en hauteur ; échelle 44 nm. Quelques exemples de billes d'or sont indiqués par des flèches blanches. Les plus gros agrégats sont des paquets d'APTMS ou de biotine-COCHO.

4.4.2 Détection électrique

a) Mesures électriques

Résultats

De nouvelles caractéristiques courant-tension sont réalisées afin d'observer l'évolution de la conductivité de l'assemblage moléculaire après le dépôt de la streptavidine marquée à l'or colloïdal. La figure 4.22 montre les mesures obtenues avec les électrodes présentées sur les figures 4.16-b (biotine-COCHO) et 4.17 (biotine-NH₂).

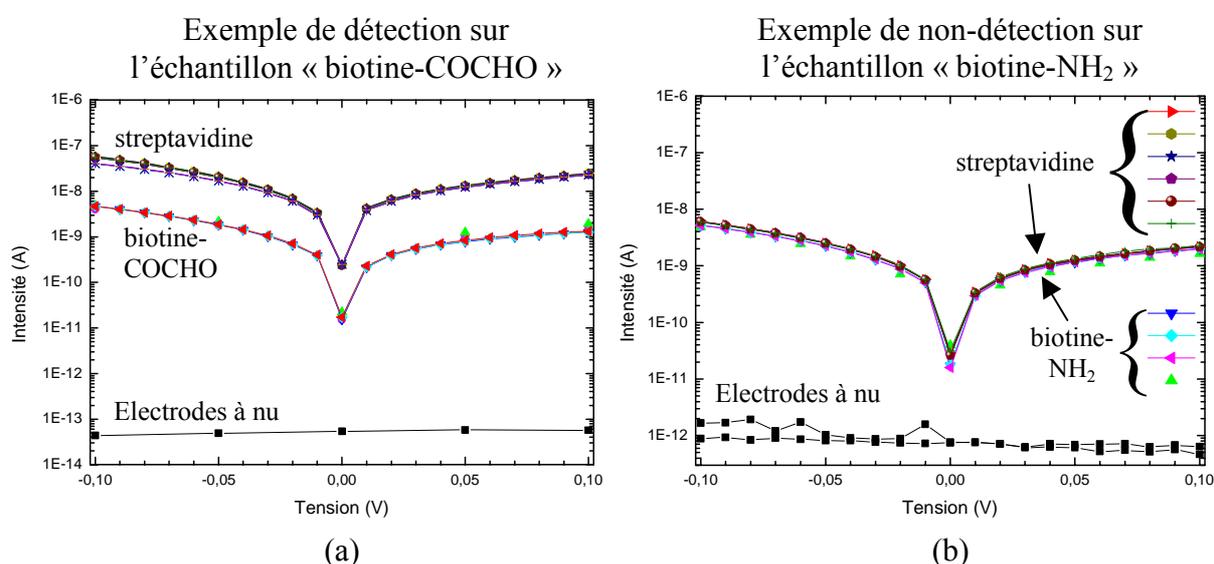


Figure 4.22: Valeur absolue du courant en fonction de la tension appliquée, après le dépôt de la streptavidine marquée à l'or colloïdal. a) Exemple de détection sur l'échantillon « biotine-COCHO ». Longueur des électrodes = 10 μm ; gap = 100 nm. b) Exemple d'une absence de détection sur l'échantillon « biotine-NH₂ ». Longueur des électrodes = 5 μm , gap = 100 nm. Ces deux graphiques correspondent aux figures 4.16-b et 4.17 respectivement.

Comme lors de l'étape de dépôt de la biotine, les mesures électriques sont stables et reproductibles. Par exemple, sur la figure 4.22-b, six caractéristiques I-V ont été enregistrées successivement après le dépôt de la streptavidine.

Par rapport à l'étape précédente (partie 4.3.3), trois paires d'électrodes ont claqué entre les deux étapes. Les différents niveaux de courant obtenus pour une tension appliquée de 0,1 V sont résumés sur la figure 4.23.

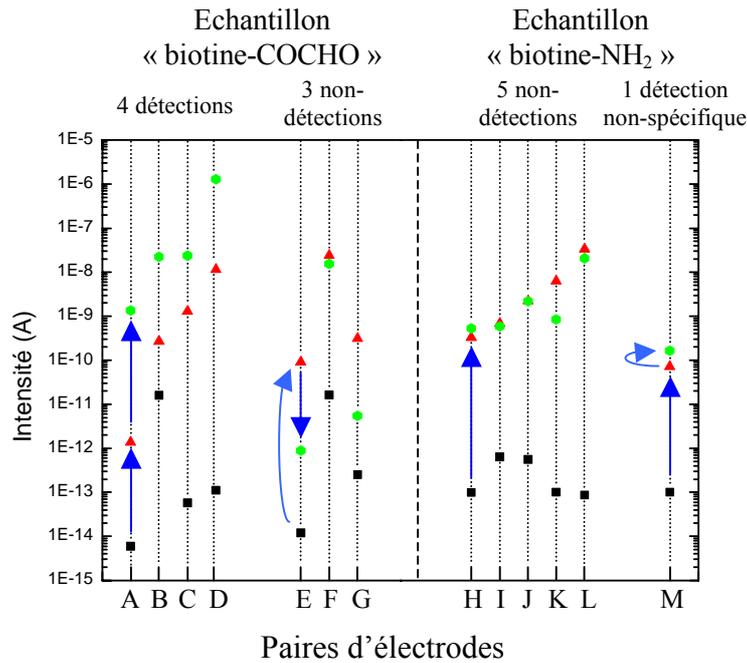


Figure 4.23: Répartition des niveaux de courant à 0,1 V pour les deux types d'échantillons après la fabrication des électrodes (■) et après les dépôts de la biotine (▲) et de la streptavidine (●).

Biotine-COCHO

Lorsque les sondes de biotine-COCHO ont été précédemment immobilisées entre les nanoélectrodes, un troisième niveau de courant apparaît très nettement après le dépôt de la streptavidine pour près de la moitié des paires d'électrodes (4 cas sur 7) (Figure 4.23). Pour ces électrodes, les intensités mesurées après le dépôt de la streptavidine s'étalent sur 3 décades, de 10^{-9} à $1,3 \times 10^{-6}$ A. Pour les 4 détections réalisées, les rapports $I_{\text{streptavidine}}/I_{\text{biotine-COCHO}}$ à 0,1 V sont compris entre 18 et 980, avec une valeur moyenne de près de 300. Sur la figure 4.22-a, le courant mesuré à 0,1 V augmente ainsi d'un facteur 18 entre les deux étapes.

En revanche, une absence de détection est également constatée pour 3 paires d'électrodes (Figure 4.23). Ces cas correspondent à une décroissance du courant de 1,5 à 100 fois (rapport $I_{\text{biotine-COCHO}}/I_{\text{streptavidine}}$). L'augmentation anormale de la résistance du système n'est pas bien comprise et pourrait être causée par une pollution de l'assemblage moléculaire entre les deux séries de mesure.

Biotine-NH₂

Sur la figure 4.22-b, les courbes I-V observées après le dépôt de la streptavidine sont comparables à celles obtenues après l'adsorption non-spécifique de la biotine-NH₂ sur le film

de semicarbazide. Ce type d'électrodes correspond à une absence de détection. Cinq paires d'électrodes sur les six obtenues montrent un tel résultat, dont deux paires d'électrodes présentant une baisse du niveau de courant après le dépôt de la streptavidine (Figure 4.23). Les intensités mesurées sur l'échantillon « biotine-NH₂ » à 0,1 V demeurent dans le même ordre de grandeur qu'à l'étape précédente, avec un étalement sur 2 décades de 5×10^{-10} à $2,1 \times 10^{-8}$ A. Les 5 cas de « non-détection » présentent un rapport $I_{\text{streptavidine}}/I_{\text{biotine-NH}_2}$ à 0,1V compris entre 0,85 et 1,6.

Une détection non-spécifique est également observée, avec une augmentation de l'intensité à 0,1 V d'un facteur 2,3 par rapport à celle mesurée après le dépôt de la biotine-NH₂. D'une manière générale, les augmentations de courant obtenues sur les paires d'électrodes de l'échantillon « biotine-COCHO » sont très supérieures à celle observée sur l'échantillon « biotine-NH₂ ».

b) Discussion

Séparation des deux échantillons

Bien que les résultats présentés dans ce chapitre correspondent à un nombre relativement limité de paires d'électrodes, une distinction entre les deux types d'échantillons peut être observée après le dépôt de la streptavidine. Les complexes streptavidine:biotine réalisés entre des molécules de streptavidine marquées avec une nanoparticule d'or et des sondes de biotine fixées de manière covalente sur le film organique, peuvent donc être détectés par des mesures de conductivité électrique. La détection de l'interaction biotine/streptavidine est moins fréquente lorsque les molécules de biotine n'ont pas été précédemment ancrées de manière covalente entre les nanoélectrodes (expérience de contrôle avec la biotine-NH₂). De plus, le facteur d'augmentation des niveaux de courant est plus important pour les sondes de biotine fixées de manière covalente (plus grand nombre de streptavidines entre les nanoélectrodes). Une séparation statistique des deux assemblages moléculaires est donc effective.

Influence des billes d'or

La forte augmentation de la conductivité observée sur l'échantillon « biotine-COCHO » après le couplage de la streptavidine avec les sondes de biotine, semble indiquer qu'une conduction par l'intermédiaire des nanoparticules d'or est devenue le mécanisme dominant du transport du courant. Toutefois, le type de conduction mis en jeu n'est pas connu, et est relativement complexe à modéliser. En effet, l'assemblage moléculaire devrait

être fortement désordonné. De plus, les ions H^+ , OH^- , Na^+ et Cl^- pourraient être présents sur la surface en concentrations très importantes et être à la base de courants ioniques très élevés. Enfin, d'après les images AFM des figures 4.20 et 4.21, la densité des billes d'or déposées sur le film de semicarbazide est insuffisante pour former un plan continu de colloïdes d'or sur la surface. Il semble donc improbable qu'un chemin électrique continu de nanoparticules d'or (par percolation de billes d'or) soit créé entre les deux électrodes.

En première approche, nous proposons de considérer que le dépôt des colloïdes d'or sur la surface permet d'abaisser localement la résistance de l'assemblage moléculaire. La présence des nanoparticules d'or sur la surface reviendrait à remplacer une partie du matériau organique entre les électrodes par de l'or. Ainsi, la fixation d'une bille d'or sur la surface consisterait à créer un « court-circuit local » favorable au transfert du courant.

Remarquons que les colloïdes d'or et les molécules de streptavidine déposés sur l'échantillon « biotine- NH_2 » ne modifient pas sensiblement les intensités mesurées (Figure 4.23). Ainsi, la conduction de type ionique dans la fine pellicule d'eau n'a pas subi d'évolution, malgré le dépôt des protéines et des billes d'or sur la surface. Une saturation du courant ionique, résultant d'une variation insuffisante de la concentration des ions, pourrait être à l'origine de ces observations.

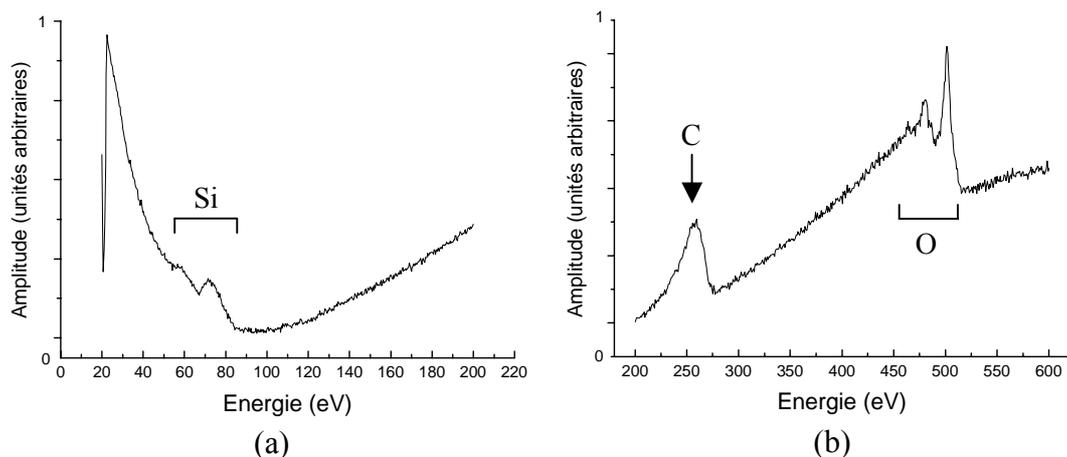
4.4.3 Spectroscopie Auger

Après les mesures électriques, les atomes présents sur la surface ont finalement été identifiés en spectroscopie Auger. Cette technique d'analyse est basée sur le bombardement d'électrons incidents sur un échantillon placé dans une chambre en ultravide (10^{-10} Torr), et donne lieu à des pics caractéristiques de chaque type d'atome présent dans le matériau. L'énergie cinétique des électrons Auger est connue pour chaque atome, seul l'hydrogène ne produit pas de pic. Le matériau étudié doit être conducteur pour que les différences de charges électriques créées s'équilibrent rapidement. Dans notre cas, l'épaisseur du substrat de SiO_2 étant relativement faible (7 nm), les électrons incidents peuvent atteindre la couche de silicium. Les électrons Auger proviennent donc du montage moléculaire assemblé sur la surface, ainsi que des atomes de la couche de SiO_2 .

a) Mesures sur le film d'OTS

Les mesures effectuées sur le film d'OTS montrent deux pics larges, l'un pour le silicium et le deuxième pour l'oxygène, qui résultent du substrat de SiO_2 (Figures 4.24-a et b). La grande amplitude du pic du carbone indique que cet atome est présent en forte proportion. Le carbone provient des molécules d'OTS auto-assemblées sur la surface. Aucun autre atome n'est détecté sur la monocouche d'OTS.

Analyse du film d'OTS



Analyse des pistes électriques et du film d'OTS

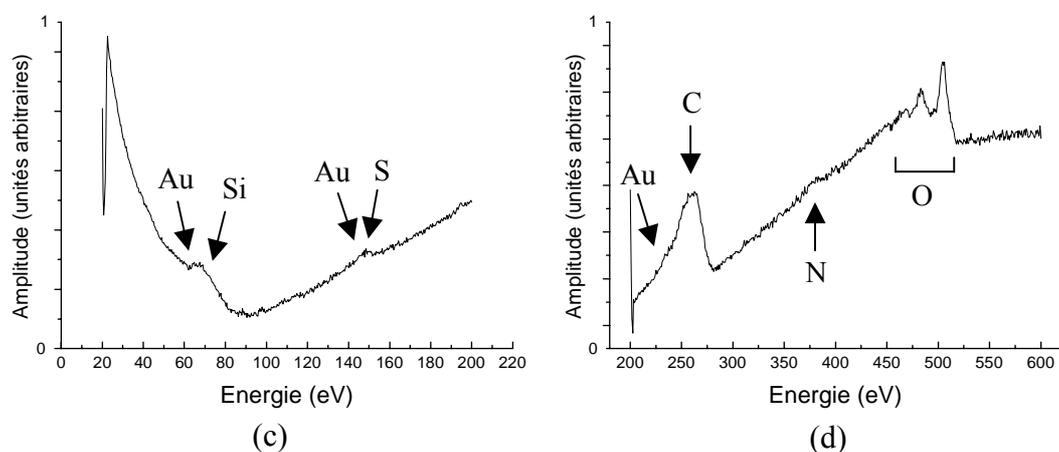


Figure 4.24: Mesures de spectroscopie Auger sur l'échantillon « biotine-NH₂ » après le dépôt de la streptavidine marquée avec un colloïde d'or. a et b) Mesures de 20 à 200 eV et de 200 à 600 eV respectivement, sur le film d'OTS. c et d) Mesures de 20 à 200 eV et de 200 à 600 eV respectivement, sur des pistes électriques parallèles (Figure 4.12-b). La zone d'analyse inclut le film d'OTS entre les pistes électriques.

b) Mesures sur les pistes électriques

Le faisceau électronique a ensuite été positionné sur plusieurs pistes électriques parallèles de l'échantillon « biotine-NH₂ », par exemple sur les pistes alignées visibles sur la figure 4.12-b. Il est à noter que, en raison de la largeur du faisceau incident ($\sim 500 \mu\text{m}$), le film d'OTS entre les pistes électriques est également inclus dans les mesures. Les trois pics peu intenses de l'or à 69 eV, 150 eV et 239 eV, tendent à être cachés par ceux, plus importants, du silicium, du soufre et du carbone, à 76 eV, 152 eV et 270 eV respectivement (Figures 4.24-c et d). De l'azote peut également être remarqué à 379 eV, tandis que le pic large de l'oxygène autour de 510 eV est dû au substrat de SiO₂. Aucun autre atome n'est détecté sur la surface.

Les amas d'APTMS polymérisés en solution et déposés sur l'or, les terminaisons semicarbazides formées sur le contour de ces amas, et les molécules de biotine contiennent des atomes d'azote (Figures 3.2 et 3.5). Le carbone provient de ces mêmes molécules, ainsi que de la monocouche d'OTS entre les pistes électriques. Sur la figure 4.24-c, l'amplitude du pic du soufre, dû exclusivement à la biotine (Figure 3.5), est relativement faible. Ceci indique que l'adsorption de la biotine-NH₂ sur les structures en or est peu importante. Le pic du soufre apparaît un peu plus prononcé dans le cas de la biotine-COCHO (autres graphiques non-présentés), car des molécules individuelles, ainsi que des agrégats de biotine-COCHO polymérisée, devraient être fixés par des liaisons semicarbazones sur les molécules d'APTMS adsorbées sur l'or. Les atomes identifiés sur le film d'OTS et sur les pistes électriques sont donc conformes aux observations AFM réalisées précédemment (parties 4.2, 4.3 et 4.4).

c) Cas du phosphore, du chlore et du sodium

Nous pouvons remarquer que les sels des tampons acétate de sodium/acide acétique et PBS utilisés pendant l'incubation et les lavages de la biotine et de la streptavidine (Tableaux 4.1 et 4.2) ne sont pas détectés sur le film d'OTS et sur les pistes électriques. Ainsi, les pics correspondant au phosphore, au chlore ou au sodium, à 120 eV, 181 eV et 990 eV respectivement, ne sont pas apparents sur les graphiques (Figure 4.24 ; pour le sodium, autre graphique non-présenté). L'absence de détection de ces atomes peut résulter soit d'une absence réelle de ces atomes sur la monocouche d'OTS et sur les pistes d'or, soit de leur présence en trop faible densité pour qu'ils soient repérés en spectroscopie Auger. En revanche, les sels devraient être présents dans les ouvertures de semicarbazide, puisqu'ils sont retenus dans l'assemblage moléculaire en tant que contre-ions autour des molécules biologiques. Toutefois, les mesures sur le film de semicarbazide n'ont pas pu être réalisées, compte tenu de la difficulté à positionner le faisceau électronique sur une fenêtre d'ouverture (le film de semicarbazide n'est pas repérable dans le spectroscope).

4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié la possibilité de réaliser des interactions spécifiques entre des sondes de biotine immobilisées sur un support solide, et des molécules de streptavidine marquées avec de la tétraméthylrhodamine ou à l'or colloïdal. La faisabilité de la détection électrique de l'interaction modèle biotine/streptavidine, réalisée entre des électrodes parallèles sur plusieurs microns et séparées par une distance inférieure à 100 nm, a été démontrée.

La chimie de greffage a tout d'abord été étudiée et s'est révélée difficile à contrôler à l'échelle des molécules, en particulier la polymérisation du film d'APTMS sur la surface et dans le bain de silanisation. Des agrégats de biotine-COCHO semblent également apparaître après la lyophilisation des molécules. Notons également la présence de gouttes de Tween 20, et d'amas formés probablement par une agglomération des colloïdes d'or en solution. En outre, le confinement dans le voisinage des nanoélectrodes de la biotine et dans une moindre mesure de la streptavidine, est réalisé de manière satisfaisante grâce à une passivation du substrat de SiO₂ par une monocouche hydrophobe d'OTS.

Dans un premier temps, les caractéristiques courant-tension montrent des niveaux de courant comparables après le dépôt de la biotine-COCHO et celui de la biotine-NH₂. Le courant mesuré est supposé être la résultante de plusieurs types de courants ioniques dans la fine couche d'eau adsorbée sur le substrat. Une conduction par les ions H₃O⁺ et OH⁻ en provenance de la couche d'eau, ainsi que par les sels Na⁺ et Cl⁻ piégés dans l'assemblage moléculaire pendant l'incubation et les lavages des échantillons, a été proposée. Une libération de protons H⁺ par les ions phosphates immobilisés contre les peptides de la biotine-COCHO et de la biotine-NH₂, pourrait également être à l'origine d'une modification du pH dans la pellicule d'eau.

D'une manière générale, nous avons observé une très forte dispersion sur les valeurs des intensités. Par conséquent, puisque la résistance totale du système varie pour chaque paire d'électrodes, les évolutions des niveaux de courant obtenus à chaque étape de la réalisation de l'interaction biomoléculaire, doivent être examinés individuellement. Le critère sélectionné pour la détection de la reconnaissance biomoléculaire est la variation des intensités mesurées pour une tension appliquée de 0,1 V.

Après le dépôt de la streptavidine marquée avec une nanoparticule d'or de 10 nm de diamètre, nous avons observé une augmentation des niveaux de courant plus fréquente pour les électrodes entre lesquelles les sondes de biotine ont été immobilisées de manière covalente (biotine-COCHO), que dans le cas où les molécules de biotine ont été juste adsorbées sur le film de semicarbazide (biotine-NH₂). De plus, l'ampleur des augmentations des intensités à

0,1 V est plus importante dans le premier cas. La séparation des échantillons est donc effective après le dépôt de la streptavidine marquée à l'or colloïdal. Le mécanisme de conduction entre les nanoélectrodes nous semble relativement complexe et a été décrit, de manière simple, par un abaissement de la résistance au niveau local dans l'assemblage moléculaire par l'intermédiaire des nanoparticules d'or.

Bien que les mesures électriques réalisées sur l'échantillon témoin aient abouti à une proportion très faible de détections non-spécifiques, un risque demeure que la densité de nanoparticules d'or adsorbées dans l'espace inter-électrodes soit à l'origine, pour un certain nombre d'expériences de contrôle, de détections non-spécifiques entre les nanoélectrodes. Ainsi, nous nous efforcerons dans le prochain chapitre de réduire la quantité de billes d'or physisorbées sur la couche moléculaire. Puisque la streptavidine peut former de nombreuses interactions non-spécifiques et quasiment irréversibles avec le film organique, les sites potentiels d'adsorption présents sur le film seront tout d'abord saturés après le dépôt des molécules de biotine-COCHO avec une protéine autre que la streptavidine ; puis un compétiteur d'adsorption en très fort excès sera ajouté dans la solution d'incubation de la streptavidine. Cette stratégie, directement issue des méthodes de préparation des tests immunologiques, repose sur l'occupation préalable des sites d'adsorption par une protéine avant le dépôt de la streptavidine, et sur l'adsorption majoritaire du compétiteur sur la surface pendant l'incubation de la streptavidine.

Enfin, nous cherchons à appliquer notre technique de détection à une interaction de type antigène/anticorps. En effet, un système de reconnaissance par des anticorps est plus adapté pour réaliser un grand nombre de contrôles, car les anticorps sont disponibles en grande quantité et en très grande variété. Au chapitre 5, nous utiliserons les sondes de biotine pour cibler un anticorps anti-biotine marqué à l'or colloïdal.

Bibliographie

- [1] C. Olivier, D. Hot, L. Huot, N. Ollivier, O. El-Madhi, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, H. Gras-Masse, Y. Lemoine et O. Melnyk, à paraître dans *Bioconjugate Chem.* (2003).
 α -oxo semicarbazone peptide or oligodeoxynucleotide microarrays
- [2] K.L. Prime et G.M. Whitesides, *Science*, **252**, 1164 (1991).
Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces
- [3] K. Bergström, K. Holmberg, A. Safran, A.S. Hoffman, M.J. Edgell, A. Kozłowski, B.A. Hovanes et J.M. Harris, *J. Biomed. Mat. Res.*, **26**, 779 (1992).
Reduction of fibrinogen adsorption on PEG-coated polystyrene surfaces
- [4] K. Bergström, E. Osterberg, K. Holmberg, A.S. Hoffman, T.P. Schuman, A. Kozłowski et J.H. Harris, *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, **6**, 123 (1994).
Effects of branching and molecular weight of surface-bound poly(ethylene oxide) on protein rejection
- [5] N.L. Burns, J.M. Van Alstine et J.M. Harris, *Langmuir*, **11**, 2768 (1995).
Poly(ethylene glycol) grafted to quartz: analysis in terms of a site-dissociation model of electroosmotic fluid flow
- [6] C. Bamdad, *Biophys. J.*, **75**, 1997 (1998).
A DNA self-assembled monolayer for the specific attachment of unmodified double- or single-stranded DNA
- [7] P.C. Weber, D.H. Ohlendorf, J.J. Wendoloski et F.R. Salemme, *Science*, **243**, 85 (1989).
Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin
- [8] A. Csáki, R. Möller, W. Straube, J.M. Köhler et W. Fritzsche, *Nucleic Acids Res.*, **29**, e81 (2001).
DNA monolayer on gold substrates characterized by nanoparticle labelling and scanning force microscopy
- [9] V.H. Pérez-Luna, M.J. O'Brien, K.A. Opperman, P.D. Hampton, G.P. López, L.A. Klumb et P.S. Stayton, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6469 (1999).
Molecular recognition between genetically engineered streptavidin and surface-bound biotin
- [10] T. Heim, *Thèse*, Université de Lille 1 (2002).
Transport électronique dans l'ADN
- [11] D.F. Siqueira Petri, G. Wenz, P. Schunk et T. Schimmel, *Langmuir*, **15**, 4520 (1999).
An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO₂ and the vapor deposition of gold layers
- [12] S. Lenfant, *Thèse*, Université de Lille 1 (2001).
Monocouches organiques auto-assemblées pour la réalisation de diodes moléculaires
- [13] D.R. Lide (Ed.), *Handbook of Chemistry and Physics*, 74^{ème} édition, **CRC Press** (1993-1994).
- [14] G.G. Roberts, T.M. Mc Ginnity, W.A. Barlow et P.S. Vincett, *Thin Solid Films*, **68**, 223 (1980).
AC and DC conduction in lightly substituted anthracene Langmuir films
- [15] P. Hesto, L. Aguilhon, G. Tremblay, J.-P. Bourgoin et A. Barraud, *Synth. Met.*, **71**, 1971 (1995).
Thin film organic channel field effect transistor

Chapitre 5. Etude de l'interaction antigène / anticorps

Dans ce chapitre, nous cherchons à appliquer la technique de détection électrique développée précédemment, à une reconnaissance de type antigène/anticorps. La molécule immobilisée entre les nanoélectrodes est à nouveau la biotine (jouant le rôle d'antigène), ciblée par un anticorps anti-biotine marqué à l'or colloïdal.

5.1 Stratégie de dépôt

Nous avons vu au chapitre 4 que l'adsorption élevée des molécules de streptavidine sur la surface peut potentiellement être à l'origine de détections non-spécifiques. Pour remédier à ce problème d'adsorption non-spécifique de protéines sur un substrat, une solution classique consiste à saturer au préalable les sites d'adsorption présents sur la surface. Après l'incubation de la biotine-COCHO, une solution contenant une protéine n'ayant pas d'affinité ni avec la sonde ni avec l'anticorps utilisé dans l'expérience est mise en contact avec l'échantillon. La saturation est souvent réalisée avec du lait écrémé (lait en poudre), ce produit biologique étant très bon marché. L'objectif est que les protéines du lait occupent par avance tous les sites d'adsorption disponibles sur la surface, c'est-à-dire tous les sites d'adsorption non-occupés par la biotine-COCHO, et qu'ainsi l'anticorps déposé à l'étape suivante ne puisse interagir qu'avec les molécules de biotine. L'adsorption non-spécifique de l'anticorps devrait donc être minimisée.

Ces sites d'adsorption ne sont pas bien connus, mais existent forcément. Ce sont par exemple un défaut local dans le film polymérisé d'APTMS dans lequel un anticorps pourrait « se loger », ou une adsorption contre les charges portées par les chaînes latérales des aminoacides de la chaîne peptidique reliant la biotine au groupement greffant. D'une manière générale, des interactions de nature ionique ou hydrophobe peuvent être réalisées entre les molécules et la surface.

Un *compétiteur d'adsorption non-spécifique* en fort excès, par exemple à nouveau du lait en poudre, est ensuite utilisé pendant l'incubation de l'anticorps. Du fait de la grande différence de concentration entre le compétiteur et l'anticorps, s'il reste encore des sites d'adsorption sur le support, ce sera essentiellement la protéine inintéressante (le compétiteur) qui s'adsorbera en majorité. Par contre, seule la molécule à détecter (l'anticorps) peut interagir avec les sondes de biotine. Par conséquent, la reconnaissance biomoléculaire doit favoriser la convergence et la concentration entre les électrodes de l'anticorps marqué avec une nanoparticule d'or, puisque les sites d'adsorption présents sur la surface seront recouverts essentiellement de lait en poudre.

Ainsi, les nanoparticules d'or arrangées dans le gap inter-électrodes devraient résulter, de façon quasi-exclusive, de la réalisation d'interactions entre des anticorps et des sondes de biotine. Cette solution est tout d'abord mise en œuvre sur des lames de verre avec des anticorps marqués avec de la rhodamine, puis une caractérisation électrique de l'interaction biotine/anticorps anti-biotine sera effectuée.

5.2 Réalisation de l'interaction sur lames de verre

5.2.1 Objectif et description des expériences

La possibilité de réaliser une reconnaissance spécifique entre les sondes de biotine et les anticorps anti-biotine est établie en fluorescence sur des lames de verre. Afin d'étudier l'influence du lait écrémé en tant que compétiteur d'adsorption, l'incubation des anticorps est réalisée en présence de lait pour la moitié des échantillons. Enfin, un couple de concentrations sera sélectionné pour les dépôts ultérieurs de la biotine-COCHO et de l'anticorps entre les nanoélectrodes.

Nous prenons soin d'utiliser des solutions absolument neuves et filtrées avant chaque expérience avec des filtres stériles de 0,22 μm de diamètre de pore (filtration stérilisante avec les meilleurs filtres dont nous disposons). Des lames de verre sont tout d'abord préparées et fonctionnalisées avec la terminaison semicarbazide selon le protocole donné dans le tableau 3.1, puis imprimées avec une série de tampons acétate de sodium/acide acétique à 0,1 M et pH 5,5 contenant de la biotine à des concentrations variant de 10^{-6} à 10^{-3} M (Tableau 4.1). Les spots sont dupliqués deux fois de suite à la même concentration avec de la biotine-COCHO, de la biotine-NH₂ et avec une solution tampon ne contenant pas de biotine (expérience de contrôle). La disposition des spots sur les lames est indiquée sur la figure 5.1-a. L'incubation de la biotine dure une nuit à 37°C en chambre humide. Puis les lames sont rincées 3 fois avec une solution de PBS à pH 7,2 contenant 0,1 % de Tween 20, propulsée vigoureusement à la pissette pour renforcer le retrait de la biotine adsorbée.

L'anticorps anti-biotine marqué à la rhodamine est un anticorps monoclonal de chèvre, fourni par la société Jackson Immunoresearch Laboratories. La solution pour l'ensemble des lames est un tampon PBS à 0,01 M et pH 7,2 contenant 0,1 % de Tween 20 (Tableau 5.1). Pour la moitié des lames, le tampon de dilution de l'anticorps contient 5 % en masse de lait (5 g de lait en poudre dilués dans 100 mL de solution). Une goutte de 100 μL de la solution est incubée sous une lame pendant 2 h à 37°C en chambre humide. La concentration d'anticorps varie de 10^{-4} à 10^{-1} mg/mL d'une lame à une autre. Enfin les échantillons sont rincés à la pissette deux fois avec du PBS, deux fois avec de l'eau déionisée et une fois avec de l'éthanol absolu (Tableau 5.1), avant d'être observés en fluorescence.

Etape	Opérations réalisées
Incubation de l'anticorps	10 ⁻⁴ à 10 ⁻¹ mg/mL anticorps marqué avec rhodamine dans 0,01 M PBS pH = 7,2 contenant 0,1 % de Tween 20 et 5 % en masse de lait, 2 h 37°C chambre humide.
Lavages	2 rinçages PBS pH = 7,2 à la pissette, 2 rinçages eau milliQ à la pissette, 1 rinçage éthanol absolu à la pissette, séchage dans dessiccateur.

Tableau 5.1: Protocole de dépôt de l'anticorps avec le compétiteur d'adsorption.

Remarquons que certaines lames ont été incubées avec de la streptavidine marquée à la tétraméthylrhodamine, afin de vérifier que les intensités de fluorescence mesurées sont comparables à celles obtenues sur la figure 4.1 ; les produits chimiques utilisés sont alors considérés de bonne qualité.

5.2.2 Observations et choix du couple de concentrations

La différence de fluorescence entre les spots de biotine-COCHO et ceux de biotine-NH₂ résulte du nombre de sondes de biotine-COCHO immobilisées de manière covalente sur le film organique (Figure 5.1-b). Pour les échantillons sans compétition avec le lait, l'interaction biotine/anticorps anti-biotine est détectée pour tous les spots de biotine-COCHO, y compris ceux spottés à une concentration de 10⁻⁶ M.

Comme attendu, le lait écrémé utilisé comme compétiteur d'adsorption permet de réduire le bruit de fond des lames. Cette technique limite également la dispersion de la fluorescence constatée entre des spots de même nature (autres figures non-présentées : spots reproduits à intervalles réguliers sur les lames).

Cependant, les intensités de fluorescence obtenues avec le lait tendent à être inférieures à celles obtenues sans le lait. Par exemple, l'anticorps déposé à la plus faible concentration (10⁻⁴ mg/mL) n'est pas apparent en présence de lait. Le lait, en masquant une partie des sondes de biotine, pourrait empêcher la réalisation d'un grand nombre d'interactions biomoléculaires, ce qui se traduit par des spots systématiquement moins intenses en présence de lait.

Enfin, la faible fluorescence dans les spots de la solution tampon PBS montre l'absence de contamination entre les spots (phénomène de « carry over », dû à la présence éventuelle de résidus de biotine subsistant dans l'aiguille de dépôt après chaque impression).

Les concentrations de dépôt de la biotine-COCHO et de l'anticorps utilisées dans la prochaine partie ont été choisies en fonction du meilleur rapport signal/bruit. Ainsi, les concentrations sélectionnées pour les dépôts de la biotine-COCHO et de l'anticorps sont de 10^{-3} M et 10^{-2} mg/mL respectivement.

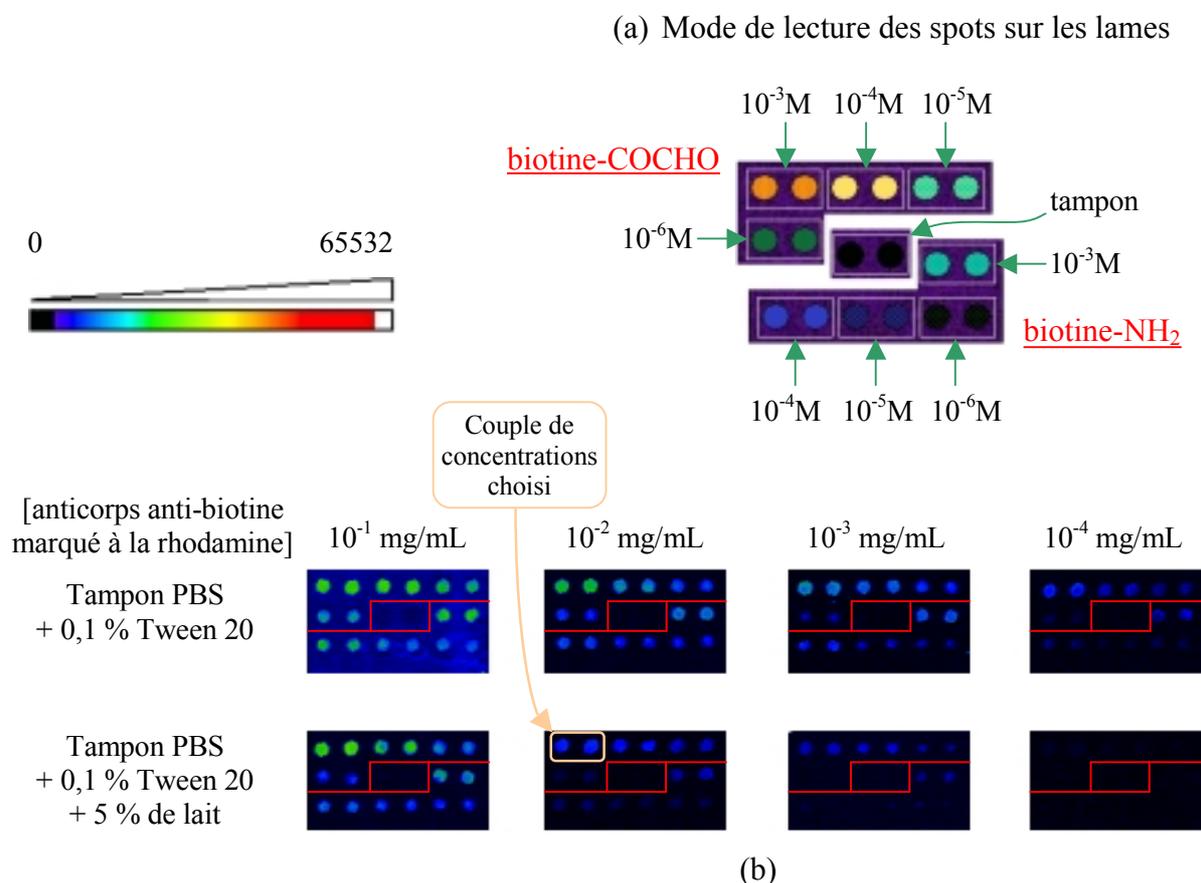


Figure 5.1: Observation en fluorescence de l'effet de la saturation et de la compétition avec du lait en poudre. a) Disposition des spots sur les lames. b) Incubation des lames avec l'anticorps anti-biotine rhodaminé. Le couple de concentrations choisi pour la partie 5.3 est mis en évidence.

5.3 Caractérisations électriques

5.3.2 Procédure de dépôt et observation en microscopie optique

a) Incubation de la biotine-COCHO

La procédure de préparation des échantillons demeure inchangée par rapport à celle élaborée au chapitre 3 : les substrats de SiO_2 sont nettoyés à l'aide d'un plasma O_2 pendant quelques secondes, puis plongés dans un bain de silanisation d'OTS (Tableau 3.5). Une ouverture est réalisée dans la monocouche d'OTS par une gravure plasma O_2 à travers un

masque de résine S1818. Puis les échantillons sont plongés dans une solution d'APTMS pendant 30 minutes, et le groupement amine est transformé en terminaison semicarbazide (Tableau 3.5). Une goutte de biotine-COCHO à 10^{-3} M (concentration sélectionnée) est ensuite écrasée sous lamelle sur les échantillons et incubée pendant une nuit à 37°C en chambre humide. Trois rinçages successifs sont alors réalisés à la pissette avec un tampon PBS à pH 7,2 contenant 0,1 % de Tween 20.

Les sites d'adsorption non-spécifique présents sur la surface sont ensuite saturés avec du lait en poudre (partie 5.1). Pour cela, les échantillons sont trempés, pendant 2 h à 37°C , dans un tampon PBS à 0,01 M et pH = 7,2 contenant 0,1 % de Tween 20 et 5 % en masse de lait. Les échantillons sont ensuite lavés 3 fois à la pissette avec une solution de PBS contenant 0,1 % de Tween 20, puis séchés dans un dessiccateur et observés en microscopie optique (Figure 5.2).

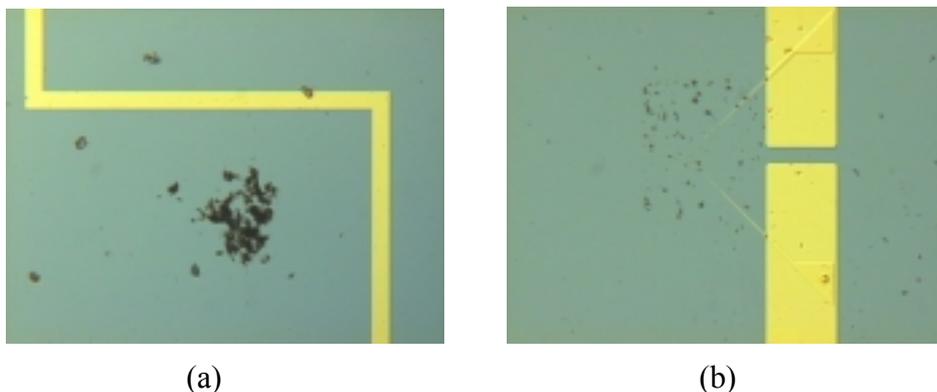


Figure 5.2: Observations au microscope optique après la saturation des sites d'adsorption avec du lait écrémé. a) Traces de lait adsorbées sur la monocouche d'OTS. b) Quelques traces de lait sont parfois présentes dans les ouvertures de semicarbazide.

D'une manière générale, le substrat apparaît propre à grande échelle, sans la présence de gouttes de Tween 20. Cependant, de grandes traces de lait se sont répandues aléatoirement sur la surface (Figure 5.2-a), et parfois dans les ouvertures de semicarbazide (Figure 5.2-b). La présence de ces traces peut s'expliquer par la quantité élevée (5 % en masse) du lait dans le tampon de saturation, car cette concentration est proche de la limite de dilution du lait en poudre dans la solution. La plus grande partie de ces marques part lors d'un premier lavage de 10 min dans de l'eau déionisée agitée par ultrasons, mais les quelques traces qui demeurent résistent ensuite aux lavages ultérieurs.

b) Incubation des anticorps

Les anticorps anti-biotine utilisés sont des anticorps monoclonaux de chèvre marqués avec un colloïde d'or de 25 ± 3 nm, produits par la société Aurion. Chaque nanoparticule d'or est recouverte de 115 à 180 anticorps. Les anticorps sont fournis dans un tampon PBS à 10 mM et à pH 7,6 contenant 1 % de BSA (Bovine Serum Albumin) et 0,1 % d'azoture de sodium (NaN_3), et stockés dans cette solution à 4°C.

La taille relativement grande des nanoparticules (25 nm) devrait favoriser la détection des interactions entre les molécules de biotine et les anticorps, car théoriquement 3 ou 4 colloïdes suffisent pour créer un chemin électrique entre les deux électrodes. De plus, ces dimensions sont accessibles en microscopie MEB, ce qui permet de caractériser individuellement les billes d'or sur la surface.

Les conditions de dépôt sont celles décrites au tableau 5.1. Les anticorps, déposés à la concentration de 10^{-2} mg/mL (concentration sélectionnée), sont incubés en présence de 5 % en masse de lait. Aucun changement par rapport à l'étape précédente n'est observé en microscopie optique sur la surface des échantillons. En particulier, contrairement aux observations au chapitre 4, aucune agrégation des colloïdes d'or n'est constatée. Les anticorps disposés sur le contour des nanoparticules ou la présence du lait dans la solution, pourrait empêcher leur agglutination.

5.3.2 Caractérisation électrique de l'interaction

a) Mesures électriques

Les échantillons synthétisés ont été caractérisés électriquement lors des trois étapes de réalisation de l'interaction : avant tout dépôt organique (« électrodes à nu »), après la fixation de la biotine-COCHO, et enfin après le dépôt de l'anticorps marqué à l'or colloïdal. Comme lors du chapitre précédent, un facteur limitant est la production des nanoélectrodes. Ainsi, les résultats obtenus dans ce chapitre portent sur 7 paires d'électrodes, qui se répartissent en 2 détections et 5 absences de détection. Des courbes typiques de chacune de ces deux catégories sont présentées sur la figure 5.3.

Les valeurs des intensités mesurées après l'immobilisation de la biotine-COCHO, pour une tension appliquée de 0,1 V, sont étalées sur 2 décades et demie : de 10^{-11} à $6,3 \times 10^{-9}$ A. Cet intervalle est compris dans celui obtenu au chapitre 4 (de 10^{-12} à 5×10^{-8} A ; Partie 4.3.2), ce qui indique que les protéines du lait adsorbées sur la surface ne modifient pas *a priori* la nature de la conduction des charges.

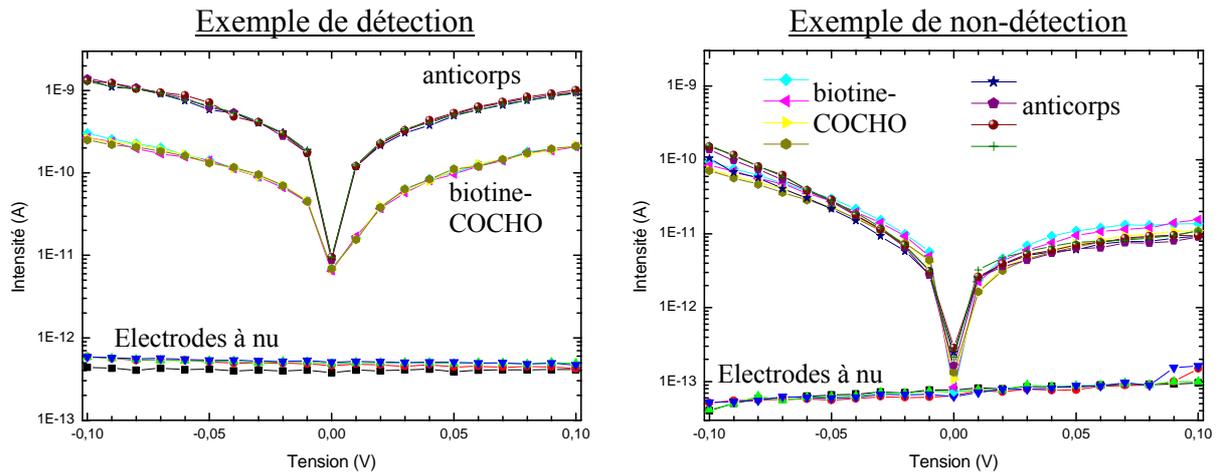


Figure 5.3: Exemples de caractéristiques courant-tension mesurées aux différentes étapes de la réalisation de l'interaction biotine/anticorps anti-biotine. Exemple de détection : longueur d'électrodes = 5 μm , gap = 80 nm ; Exemple de non-détection : longueur d'électrodes = 20 μm , gap = 70 nm.

Cependant, après l'incubation de l'anticorps en présence de lait écrémé, l'observation d'une augmentation de courant entre les niveaux « biotine-COCHO » et « anticorps » n'est constatée que pour 2 des 7 paires d'électrodes (Figure 5.4). Pour celles-ci, le rapport $I_{\text{anticorps}}/I_{\text{biotine-COCHO}}$ à 0,1 V est de 2,7 et 4,6, ce qui représente des augmentations bien plus faibles que celles obtenues avec l'interaction biotine/streptavidine (accroissement compris entre 1 et 3 décades ; Partie 4.3.2). Compte tenu du nombre très faible de détections, cette augmentation de courant doit être confirmée par de nouvelles expériences. Il faudra déterminer en particulier si l'augmentation constatée entre les deux étapes est bien significative et spécifique de l'interaction biotine/anticorps anti-biotine (expérience de contrôle avec un autre anticorps).

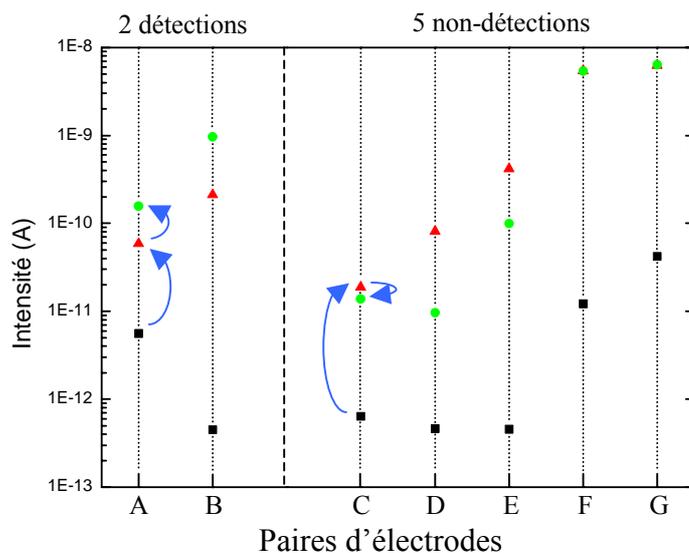


Figure 5.4: Répartition des niveaux de courant à 0,1 V après la fabrication des électrodes (■), après la fixation de la biotine-COCHO et la saturation des sites d'adsorption (▲) et après l'incubation de l'anticorps anti-biotine en présence du compétiteur d'adsorption (●).

Les intensités mesurées à 0,1 V pour les deux détections de l'anticorps anti-biotine sont de $(1,56 \pm 0,05) \times 10^{-10}$ A et $(9,6 \pm 0,3) \times 10^{-10}$ A, dans les deux cas inférieures à celles obtenues après le dépôt de la streptavidine ($I_{\text{streptavidine}} > 10^{-9}$ A à 0,1 V).

b) Diminution de la conductivité après l'incubation de l'anticorps

Les 5 interactions non-détectées se partagent en deux groupes : 2 paires d'électrodes pour lesquelles la conductivité est inchangée entre les deux étapes et 3 paires d'électrodes caractérisées par une décroissance du courant (Figure 5.4). Dans ce dernier cas, le courant à 0,1 V est de 1,4 à 8,4 fois inférieur à la valeur obtenue après la fixation de la biotine-COCHO (Rapport $I_{\text{biotine-COCHO}}/I_{\text{streptavidine}}$). Au chapitre 4, nous avons proposé que ce type de baisse est lié à une pollution de l'assemblage moléculaire entre les deux étapes. Dans le cas de l'interaction biotine/anticorps anti-biotine, l'augmentation de la résistance pourrait résulter d'une adsorption élevée, à l'échelle des molécules, du lait écrémé, ce qui pourrait perturber la continuité des chemins électriques entre les deux électrodes.

c) Origine du faible nombre de détections

Des observations au MEB effectuées après ces mesures électriques permettent d'expliquer le faible nombre de détections de l'interaction. Les images présentent de nombreuses traces de lait de dimensions supérieures à 50 nm dispersées sur la surface et sur les électrodes, et des nanoparticules d'or de 25 nm de diamètre sur les pistes électriques et dans les ouvertures de semicarbazide (Figure 5.5). Ces billes d'or sont immobilisées grâce à des interactions entre l'anticorps et la biotine, y compris sur les structures en or puisque des amas d'APTMS, polymérisés dans la solution de silanisation et fonctionnalisés ensuite sur leur contour en groupements semicarbazides, sont déposés de façon aléatoire sur l'échantillon.

Les nombreux cas de non-détection de l'interaction sont très probablement dus à la trop faible densité de billes d'or sur la surface. La densité de nanoparticules d'or dans les ouvertures de semicarbazide est de 40 ± 8 par micron carré (Figure 5.5 et autres figures non-présentées), ce qui implique une distance moyenne entre deux billes de l'ordre de 160 ± 15 nm. Les nanoparticules sont donc en nombre très insuffisant pour que la connexion entre les deux électrodes soit fréquemment réalisée.

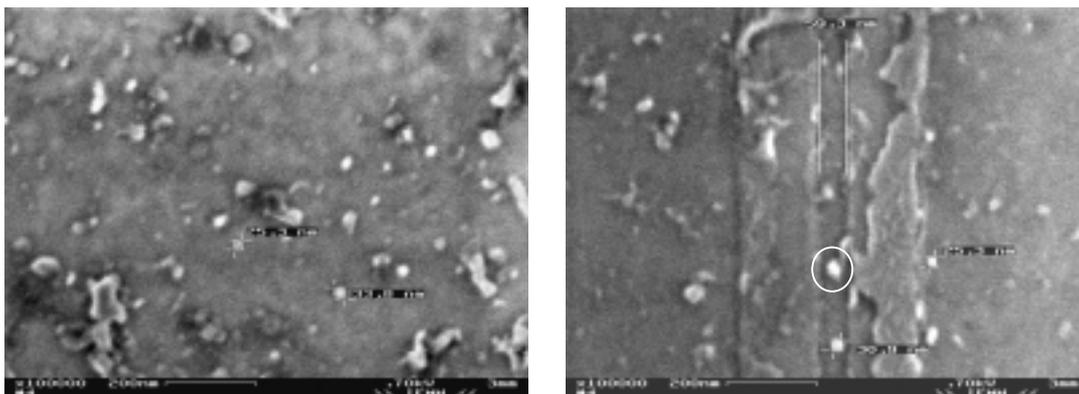


Figure 5.5: Observations MEB après la caractérisation électrique des échantillons. Des traces de lait sont déposées à différents endroits sur la surface et sur les nanoélectrodes. Les points blancs sont des nanoparticules d'or (25 nm de diamètre). Sur l'image de droite, le cercle met en évidence deux billes accolées dans un gap de 60 nm.

Cependant, des regroupements de deux à six billes accolées sont parfois constatés, tels que les 2 billes indiquées par un cercle sur l'image de droite de la figure 5.5. Les deux détections observées sont dues très probablement à de tels rassemblements dans le gap inter-électrodes.

La disparité dans les densités de nanoparticules obtenues aux chapitres 4 et 5 peut être reliée à la différence du niveau d'affinité entre la biotine et la streptavidine d'une part, et la biotine et l'anticorps anti-biotine d'autre part. En effet, l'interaction biotine:streptavidine est décrite par une constante d'association exceptionnellement élevée et très supérieure à celle entre l'antigène et l'anticorps. Par conséquent, pour des conditions comparables de dépôt, la densité de nanoparticules obtenue avec l'anticorps doit être inférieure à celle obtenue avec la streptavidine. Nous pouvons également noter que, lors de l'incubation des anticorps, les sondes de biotine sont partiellement masquées par les protéines du lait adsorbées sur la surface, ce qui n'était pas le cas lors du dépôt de la streptavidine.

d) Etude du taux de couverture

Une étude de la densité de billes d'or a été réalisée sur des substrats de SiO₂ recouverts de molécules de biotine-COCHO déposées à la concentration de 10⁻³ M. Le solvant initial des anticorps a été employé pur pendant une incubation de 2 h à 37°C, ainsi que dilué 10 ou 100 fois dans un tampon PBS contenant 0,05 % de Tween 20 et 5 % en masse de lait. Les rinçages sont identiques à ceux décrits dans le tableau 5.1. Puis des observations au MEB permettent de caractériser le nombre de nanoparticules déposées sur la surface.

Il faut noter qu'une couverture complète de la surface par les billes d'or ne peut pas être obtenue sur ces échantillons, car l'aire totale que peuvent théoriquement recouvrir les billes est inférieure à la surface des échantillons. La densité maximale théorique, calculée en supposant un film 2D compact de colloïdes, est d'environ 1600 nanoparticules/ μm^2 (calcul à partir d'un réseau carré). La figure 5.6-a présente les densités obtenues aux trois concentrations étudiées. Les deux premiers points se rapportent aux dilutions par 100 et par 10, le troisième point à la solution pure.

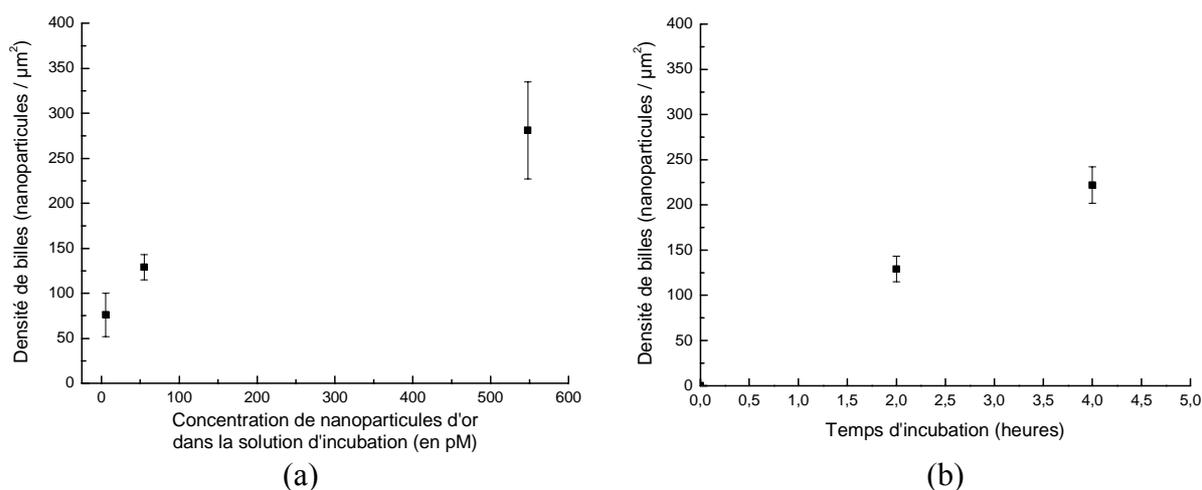


Figure 5.6: Densité de billes d'or sur la surface, en fonction a) de la concentration de nanoparticules d'or dans la solution d'incubation, b) du temps d'incubation de l'anticorps pour une solution diluée 10 fois.

Nous cherchons, pour caractériser l'interaction biotine/anticorps, à obtenir la densité de nanoparticules d'or la plus élevée possible, afin de favoriser la détection électrique entre les électrodes. Cependant, d'après la figure 5.6-a, la plus haute densité obtenue, observée avec la solution pure, est de 281 ± 54 nanoparticules/ μm^2 , soit une distance moyenne entre deux billes de 60 ± 6 nm. Par conséquent, les densités de billes obtenues sont insuffisantes avec les conditions de dépôt utilisées.

Remarquons que la solution d'employer des produits purs pendant l'incubation de l'anticorps ne peut pas être réalisée à grande échelle dans un système de détection en série, car d'une manière générale les protéines marquées à l'or colloïdal sont des produits très onéreux. Une méthode pour pallier à cette difficulté est de prolonger la durée de l'incubation avec l'anticorps, comme le montre la figure 5.6-b. Pour une durée de 4 heures, la densité de billes sur la surface présente un comportement linéaire en fonction du temps.

e) Importance de la passivation

Ces observations confirment la nécessité de passiver la surface autour des nanoélectrodes, plutôt que de greffer un film organique fonctionnalisé semicarbazide sur l'ensemble de l'échantillon (partie 3.1.3). En effet, la surface doit forcément excéder 1 cm^2 pour que l'échantillon puisse comporter un grand nombre de nanoélectrodes. Or, le recouvrement complet d'une telle aire par les nanoparticules d'or ne peut pas être réalisé (nombre insuffisant de colloïdes dans la solution d'incubation par rapport à l'aire des échantillons). Il est donc nécessaire de discriminer la surface des échantillons en faveur de la zone autour des nanoélectrodes, afin que les billes d'or y soient spontanément confinées et s'y assemblent en densité élevée.

Toutefois, une limite de cette technique de passivation est représentée par la diffusion des biomolécules dans le tampon d'incubation. En effet, nous pouvons imaginer que les molécules en solution suivent des trajectoires aléatoires et ne parviennent pas toutes, pendant l'incubation, jusqu'aux ouvertures de semicarbazide (ouvertures de taille relativement petite). Une méthode complémentaire pour concentrer les molécules entre les électrodes pourrait être d'attirer les molécules vers le gap par l'intermédiaire d'un champ électrique appliqué entre les nanoélectrodes (attraction des molécules par piégeage électrostatique)¹¹.

5.4 Conclusion et perspectives

Dans un premier temps, la réalisation de l'interaction spécifique entre les sondes de biotine et l'anticorps anti-biotine a été démontrée en fluorescence sur des lames de verre avec des anticorps marqués avec de la tétraméthylrhodamine. Une baisse de l'adsorption non-spécifique de l'anticorps est réalisée en ajoutant dans la solution d'incubation du lait écrémé utilisé comme compétiteur d'adsorption. Une saturation de la surface des échantillons peut également être effectuée après la fixation des sondes de biotine.

Puis, nous nous sommes intéressés à la détection électrique de l'interaction. Nous avons constaté que la densité de billes d'or observée entre les nanoélectrodes est insuffisante. Toutefois, la détection de l'interaction, réalisée pour 2 paires d'électrodes sur 7, est encourageante. Le déficit de billes d'or sur le substrat est probablement dû à une affinité moindre entre la biotine et l'anticorps par rapport à celle entre la biotine et la streptavidine, se traduisant en une interaction moins rapide, ainsi qu'à la présence des protéines du lait adsorbées sur la surface et qui masquent partiellement les sondes de biotine. Un paramètre

¹¹ A. Bezryadin, C. Dekker et G. Schmid, *Appl. Phys. Lett.*, **71**, 1273 (1997).
Electrostatic trapping of single conducting nanoparticles between nanoelectrodes

important pour augmenter le nombre de nanoparticules déposées sur la surface est le temps d'incubation des anticorps dans le tampon. Une étude plus approfondie doit encore être réalisée pour déterminer l'influence de la durée d'incubation et celle des concentrations de dépôt de la biotine-COCHO et de l'anticorps, sur le taux de couverture de la surface par les nanoparticules d'or.

D'autres expériences de contrôle doivent également être effectuées afin de vérifier que les billes d'or sont bien déposées sur le substrat par l'intermédiaire d'interactions spécifiques entre des molécules de biotine et des anticorps anti-biotine. Pour cela, un anticorps anti-humain ¹² marqué à l'or colloïdal doit être déposé parallèlement sur un échantillon témoin. Puisqu'il n'existe aucune spécificité entre les anticorps anti-humain et les molécules de biotine immobilisées entre les nanoélectrodes, les anticorps devraient être retirés par les lavages effectués après l'incubation. Des expériences récentes réalisées sur des lames de verre avec des anticorps anti-humain marqués avec de la rhodamine ont montré que l'adsorption non-spécifique des anticorps anti-humain est peu importante, comparable au bruit de fond, en présence du lait utilisé comme compétiteur d'adsorption.

Enfin, des études préliminaires ont été effectuées récemment, en vue de remplacer le lait écrémé par un autre compétiteur. En effet, le lait en poudre tend à recouvrir, sous la forme de molécules individuelles ou de traces de lait de relativement grandes dimensions, une grande partie des sondes de biotine. Ceci se traduit par une diminution du nombre d'interactions biotine/anticorps anti-biotine réalisées. D'autres compétiteurs, la BSA (Bovine Serum Albumin) et la caséine (protéine contenue dans le lait), ont récemment été testés avec l'anticorps anti-biotine marqués à la rhodamine. La BSA semble ainsi bien appropriée dans la fonction de compétiteur d'adsorption car, contrairement à ce qui a été observé avec le lait, les intensités de fluorescence des spots de biotine-COCHO sont sensiblement identiques en absence ou en présence de BSA, ce qui indique que l'accès des anticorps aux sondes de biotine est plus aisé, tandis qu'une diminution du bruit de fond, correspondant à une réduction de l'adsorption non-spécifique des anticorps, est constatée. Cette observation doit être confirmée par des caractérisations locales de la surface en microscopies MEB et AFM.

¹² Anticorps de chèvre anti-IgG-A-M humain, c'est-à-dire anticorps de chèvre ciblant les anticorps humains de type IgG, IgA et IgM.

Chapitre 6. Fabrication de nanoélectrodes par voie chimique

L'obtention de structures de dimensions nanométriques telles que des nanoélectrodes est encore aujourd'hui un challenge technologique. Leur fabrication est difficile et implique souvent quelques techniques astucieuses. Nous avons cherché à dépasser le principal obstacle à la fabrication de biopuces à grande échelle et pour un coût raisonnable : l'utilisation d'une étape de lithographie électronique. Dans ce chapitre, nous décrirons de nouveaux procédés d'élaboration de nanoélectrodes basés essentiellement sur des attaques chimiques. Ainsi, les procédés développés s'appuient sur des techniques plus conventionnelles, et sont caractérisés par un coût moindre et un rendement plus élevé que celui obtenu avec la lithographie e-beam. Les électrodes produites sont fréquemment séparées d'une distance inférieure à une centaine de nanomètres pour deux des trois procédés. Leur extrémité pointue devrait permettre de concentrer l'analyse des interactions biomoléculaires sur un très petit nombre de molécules biologiques.

6.1 Différentes techniques de fabrication de nanoélectrodes

La technique usuelle de fabrication, employée dans cette thèse aux chapitres précédents, est la lithographie électronique (*e-beam lithography*). En effet, celle-ci permet de concevoir de façon reproductible des électrodes séparées de quelques dizaines de nanomètres et longues de plusieurs microns. L'élaboration d'électrodes parallèles sur 5 à 30 μm devait favoriser les probabilités de connexion électrique par les molécules biologiques ou les colloïdes d'or déposés dans un gap compris entre 40 et 100 nm. Seule une lithographie à très haute résolution peut concevoir des électrodes possédant un tel rapport gap/longueur d'électrode, avec un taux raisonnable de court-circuits et d'électrodes défectueuses à la fabrication (~ 50 % et 33 % respectivement dans notre cas ; voir au chapitre 3 la partie 3.2).

Des électrodes co-planaires, mais cette fois-ci orientées en vis-à-vis, possédant des gaps parfois inférieurs à 10 nm ont été présentées dans la littérature. La première possibilité consiste à pousser la technique de fabrication par lithographie électronique jusqu'à ses limites technologiques. Dans le procédé e-beam, la surface de l'échantillon est classiquement découpée en pixels d'une largeur minimale de quelques nanomètres par le programme informatique qui pilote le faisceau électronique. En utilisant la définition la plus fine du faisceau, l'ionisation de la résine PMMA protégeant la surface de l'échantillon est arrêtée pendant quelques pixels. Après le développement de la résine, la métallisation produit des gaps jusqu'à près de 5 nm [1, 2].

Des procédés technologiques ont été développés pour compléter cette approche. La méthode consiste à réaliser tout d'abord des électrodes rapprochées au masqueur électronique, puis à réduire le gap en élargissant les électrodes. Ainsi, des distances inter-électrodes atteignant 8 nm ont été obtenues en gravant le substrat de SiO₂ sous la résine avant la métallisation, à l'aide d'une sous-gravure chimique au HF [2, 3]. Une autre technique est de construire des nanopointes par assemblage de carbone amorphe sous le faisceau d'un microscope électronique à balayage (MEB) [4]. Les nanoélectrodes séparées de 8 nm conçues par cette voie ont permis d'étudier les propriétés électriques de brins courts d'ADN poly(dG)-poly(dC) [5]. En outre, la réduction du gap par électrochimie (dépôt de clusters métalliques ou gravure du métal entre les électrodes) se révèle être une méthode particulièrement simple et relativement contrôlable [6, 7].

Une alternative pour produire aisément des nanoélectrodes est de briser des fils métalliques de manière contrôlée. Ainsi, des nanofils d'or définis par lithographie électronique sont cassés en appliquant une force mécanique sous l'échantillon [8]. En réduisant ensuite la force appliquée, les deux extrémités du fil se rapprochent peu à peu jusqu'à ce que le gap corresponde à la longueur de la molécule étudiée [9]. La rupture dans des nanofils métalliques peut aussi être réalisée par électromigration des atomes en faisant passer des courants élevés dans les nanofils, ce qui produit des séparations inter-électrodes de l'ordre de quelques atomes (~ 1 nm) [10].

Cependant, certains de ces procédés de fabrication sont très difficiles à contrôler et ne permettent pas de produire les électrodes en grand nombre, ce qui oblige alors l'opérateur à construire les nanoélectrodes une à une. Ces techniques sont donc plutôt adaptées pour produire quelques électrodes, ou bien quelques échantillons.

En revanche, la « nanoimpression » est une technique non-conventionnelle et de faible coût qui permet la réplique de nanostructures en grand nombre [11]. Elle est fondée sur la gravure de motifs nanométriques dans une résine recouvrant une surface, par l'intermédiaire d'un moule préparé par lithographie électronique et qui est réutilisable plusieurs fois. Des nanoélectrodes en forme de peignes présentant des rapports d'aspect élevés peuvent par exemple être obtenues [12].

6.2 De nouvelles techniques pour produire des nanoélectrodes

6.2.1 La problématique

L'inconvénient majeur dans toutes les techniques proposées jusqu'à présent est la mise en œuvre d'une étape lente et très coûteuse de lithographie électronique. Cette technique, qui

implique un appareillage relativement peu répandu, est difficile à intégrer dans un procédé automatisé de production à grande échelle et à bas coût.

Nous présenterons ici des méthodes de fabrication simples, permettant de produire des nanoélectrodes en série et à peu de coût. L'objectif est de les intégrer par la suite dans des dispositifs d'analyse de reconnaissance biomoléculaire. Les nanoélectrodes ainsi créées devraient permettre d'accroître la sensibilité de la méthode de détection employée, en étudiant un nombre plus faible de molécules biologiques. Ces travaux ont été effectués lors d'un séjour d'un an au LIMMS (Laboratory for Integrated MicroMechatronic Systems) dans le laboratoire du Professeur Fujita, à l'Université de Tokyo.

Trois techniques de fabrication ont été développées et seront présentées tour à tour dans ce chapitre. Elles mettent à profit des gravures anisotropes du silicium monocristallin. Le matériau de départ est un substrat SOI (*Silicon On Insulator*), constitué d'une couche superficielle de silicium monocristallin reposant sur une couche isolante de SiO_2 (cette dernière est appelée *BOX*, pour *Buried Oxide*). Les substrats SOI, de fabrication industrielle, résultent du procédé SMART-CUT : deux substrats de silicium, dont l'un est oxydé et l'autre a subi une implantation de protons, sont soudés ; un choc thermique permet de cliver au niveau de la couche implantée, ce qui donne la structure SOI. Lors de la fabrication, les nanostructures en silicium sont produites sur la couche isolante. La possibilité de métalliser les nanoélectrodes en formant un siliciure de platine permet d'augmenter leur conductivité électrique.

6.2.2 Principe de la gravure chimique

La gravure chimique anisotrope du SOI, à la base de la formation des nanoélectrodes, est réalisée avec de l'hydroxyde de tétraméthyl ammonium (TMAH), de formule chimique $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$. Les vitesses de gravure du silicium par du TMAH 15% sont présentées à la figure 6.1. Pour une température comprise entre 60°C et 90°C , la vitesse de gravure du plan cristallin $\{111\}$ est comprise entre 2,5 % et 4 % de celle du plan $\{100\}$ ¹³. Le plan $\{100\}$ est donc gravé entre 25 et 40 fois plus vite que la face cristalline $\{111\}$. En revanche, l'oxyde de silicium SiO_2 et le nitrure de silicium Si_3N_4 sont attaqués à des vitesses plus lentes encore : inférieures à $2 \text{ \AA}/\text{min}$ [13].

¹³ Note : (abc) désigne un plan particulier, {abc} une famille de plans. De même, [abc] indique une direction particulière et <abc> une famille de directions.

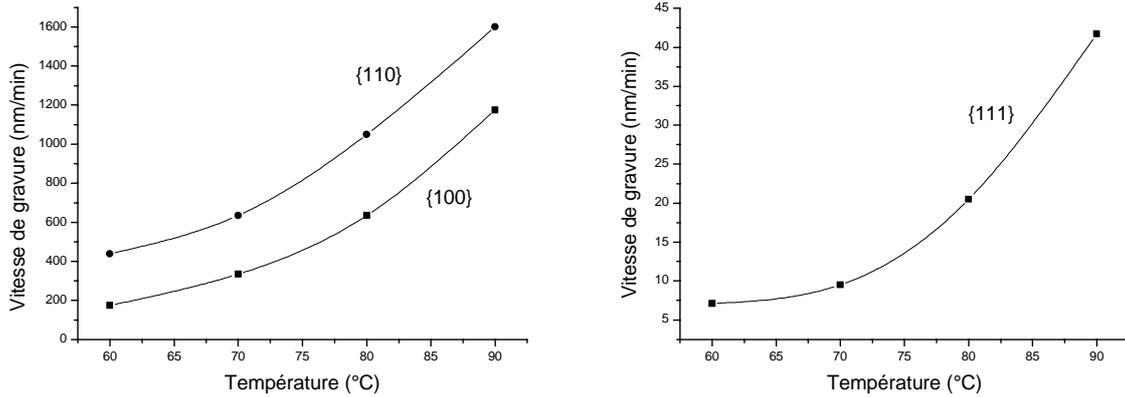


Figure 6.1: Vitesses de gravure du silicium monocristallin par du TMAH 15% (d'après [13]).

Le procédé mis en œuvre utilise l'anisotropie de gravure du silicium par le TMAH pour former des nanoélectrodes. Les structures sont fabriquées le long de la direction $\langle 110 \rangle$. Un substrat (100) est gravé avec du TMAH, ce qui a pour effet de révéler le plan cristallin {111} selon un angle de $54,74^\circ$ avec la surface (100) (Figure 6.2).

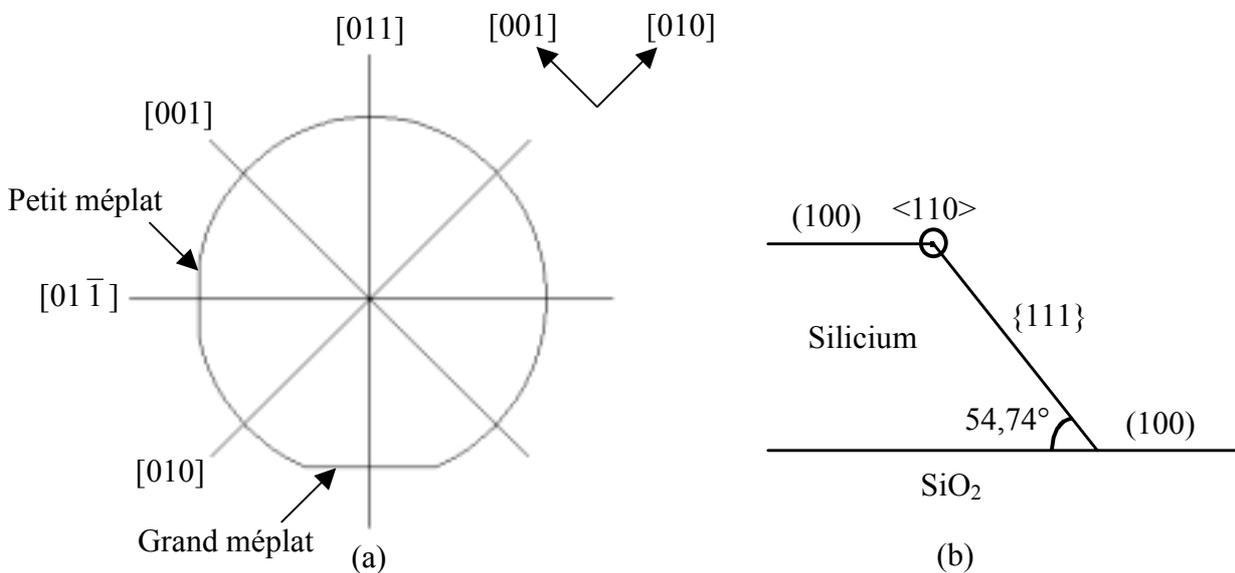


Figure 6.2: Principe de la gravure du Silicium (100) au TMAH. a) Directions cristallines d'une plaquette de silicium (100). Le dopage, indiqué par l'orientation relative des deux méplats, est ici de type p. b) Résultat d'une gravure au TMAH d'un substrat SOI (100). La gravure dans la direction $\langle 110 \rangle$ crée un plan {111} qui forme un angle de $54,74^\circ$ avec le plan (100).

6.3 Nanofils produits à angle droit

6.3.1 Réalisation de nanofils de silicium

a) Principe

Dans cette partie, nous allons présenter le mode de production de nanofils de silicium à l'aide de deux gravures anisotropes au TMAH [14, 15]. Le procédé de fabrication est exposé dans le tableau 6.1 et illustré à la figure 6.3. Les nanofils sont orientés dans la direction $\langle 110 \rangle$ et constitués de deux faces $\{111\}$ par rapport au substrat SOI (100) initial. Puisque les fils fabriqués sont définis de façon précise par la gravure anisotrope le long d'une orientation cristalline particulière, leurs dimensions sont relativement uniformes et contrôlables. Ces nanofils de silicium seront à la base des nanoélectrodes décrites par la suite.

b) Procédé technologique

Après avoir détruit l'oxyde natif recouvrant un substrat SOI (100) par une solution de HF dilué, un film mince de nitrure de silicium est déposé sur le SOI par un dépôt chimique en phase vapeur à basse pression (*Low Pressure Chemical Vapor Deposition, LPCVD*). L'emploi d'un masque de Si_3N_4 pour dessiner les contours des structures est rendu nécessaire par des considérations chimiques. En effet, l'utilisation d'une résine photosensible est impossible car elle serait également détruite par la gravure chimique au TMAH. Le comportement très résistant du Si_3N_4 à cette solution permet de ne déposer qu'une couche de quelques dizaines de nanomètres. De plus, pendant tout le processus de fabrication des nanofils, le film de Si_3N_4 évite la réoxydation du silicium recouvert, et nous dispense donc d'une étape de destruction d'oxyde natif au HF (Remarque 9 du tableau 6.1).

L'ouverture dans le nitrure de silicium d'une fenêtre rectangulaire avec des bords alignés le long de la direction $\langle 110 \rangle$ du silicium monocristallin, est réalisée par l'intermédiaire d'une résine photosensible (Figure 6.3-a). Puis la première gravure anisotrope du silicium découvert est effectuée, ce qui crée un plan cristallin $\{111\}$ dans la direction $\langle 110 \rangle$ au bord du masque de nitrure de silicium (Figure 6.3-b). Ce plan $\{111\}$ sera le premier côté du nanofil.

Grâce à la faible épaisseur du masque de Si_3N_4 , il est possible de voir le plan $\{111\}$ nouvellement créé par transparence à travers la couche de nitrure de silicium, ce qui permet de caractériser la fin de la première gravure au TMAH. Pour cela, l'échantillon est retiré de la solution, rincé à l'eau DI et séché à l'azote sec. Une observation de l'échantillon au

microscope optique nous indique alors si la gravure doit être prolongée ou non. Si c'est le cas, l'échantillon est plongé à nouveau dans la solution de TMAH.

Ensuite, afin de fixer le plan $\{111\}$, l'échantillon est introduit dans un four d'oxydation, ce qui a pour effet d'oxyder localement le silicium (Figure 6.3-c). Par ce processus, appelé LOCOS (pour *LOCAl Oxidation of Silicon*), seul le silicium nu est oxydé, ce qui remplace le silicium apparent dans le plan $\{111\}$ par une couche de SiO_2 . Enfin, après avoir retiré le masque de Si_3N_4 par une gravure chimique au H_3PO_4 (Figure 6.3-d), une seconde gravure anisotrope au TMAH est réalisée (Figure 6.3-e). A l'image du masque de Si_3N_4 pendant la première gravure, la fine couche de silicium oxydé joue ici le rôle de bordure pendant la seconde gravure. Un second plan cristallin $\{111\}$ est créé, ce qui achève l'élaboration des nanofils de silicium. Ces nanofils disposent donc d'une face de silicium oxydé, d'une autre de silicium, et d'un cœur en silicium.

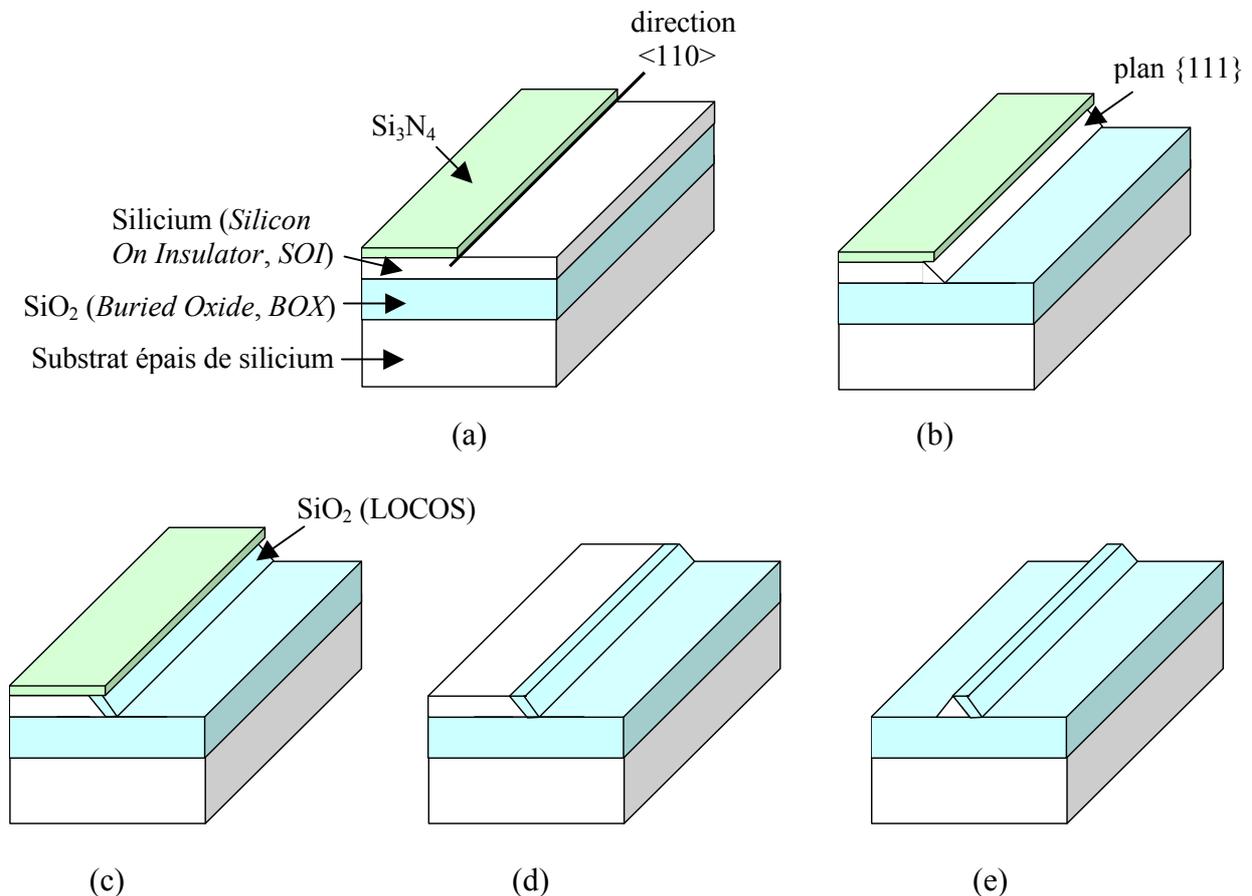


Figure 6.3: Etapes de fabrication des nanofils de silicium. a) Une ouverture dans un masque de nitrure de silicium déposé sur un substrat SOI est réalisée le long de la direction $\langle 110 \rangle$. b) Une première gravure anisotrope au TMAH révèle le plan cristallin $\{111\}$, formant un angle de $54,74^\circ$ avec la surface (100) . c) Le silicium mis à nu est oxydé localement (procédé LOCOS). d) Le film de nitrure de silicium est retiré pour découvrir le silicium sous-jacent. e) Le nanofil est créé par une seconde étape de gravure au TMAH.

Etape	Opérations réalisées
Clivage de la plaquette	Clivage d'une plaquette de SOI (100) le long des directions $\langle 110 \rangle$. Les bords de l'échantillon serviront par la suite de repères pour orienter le masque optique sur la direction $\langle 110 \rangle$ (Figure 6.3-a).
Nettoyage du substrat	Mélange $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:1:6$ 75-85°C 10 min, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Destruction de l'oxyde natif	$\text{HF}:\text{H}_2\text{O} = 1:100$ 2 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Dépôt du masque de nitrure de silicium (Si_3N_4)	<i>Dépôt LPCVD</i> Si_3N_4 25 nm $\text{NH}_3:\text{SiH}_4 = 150:40$ sccm 800°C 0,5 Torr 9 min.
Ouverture d'une fenêtre dans le masque de Si_3N_4 (Figure 6.3-a)	<i>Résinages</i> promoteur ¹ et résine positive 1400-17 ² 600 nm, recuit sur plaque 90°C 10 min. <i>Insolation UV</i> à travers un masque optique de motifs orientés sur la direction $\langle 110 \rangle$. <i>Révélation</i> des motifs CH2168 ³ : $\text{H}_2\text{O} = 1:2$ 90 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec. <i>Gravure plasma</i> du Si_3N_4 66 Å/min : $\text{CF}_4 = 50$ sccm 37,5mTorr 20 W 4 min. <i>Destruction résine (lift-off)</i> acétone + ultrasons 1 min, rinçage IPA ⁴ , séchage azote sec. <i>Nettoyage piranha</i> ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$ 10 min) ⁵ , rinçage eau DI, séchage azote sec.
Première gravure anisotrope du SOI (Figure 6.3-b)	$\text{HF}:\text{H}_2\text{O} = 5:95$ 20 sec ⁶ , rinçage eau DI, séchage azote sec. <i>Gravure TMAH</i> ⁷ 60-80°C, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Oxydation locale du silicium (LOCOS) (Figure 6.3-c)	<i>Oxydation sèche</i> 1000°C $\text{O}_2 = 2,0$ L/min 1 h.
Destruction du masque Si_3N_4 (Figure 6.3-d)	H_3PO_4 160-180°C 120 Å/min ⁸ , rinçage eau DI ⁸ , séchage azote sec.
Seconde gravure anisotrope du SOI (Figure 6.3-e)	($\text{HF}:\text{H}_2\text{O} = 5:95$ 20 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec) ⁹ <i>Gravure TMAH</i> 60-80°C, rinçage eau DI, séchage azote sec.

¹ Promoteur : promoteur d'adhérence qui joue le rôle d'interface entre le substrat et la résine.

² Résine 1400-17 : résine photosensible fournie par la société Shipley.

³ CH2168 : développeur associé à la résine 1400-17.

⁴ IPA : alcool isopropylique.

⁵ Un nettoyage piranha est réalisé après le lift-off afin de détruire les éventuelles traces de résine sur le SOI. Note : la réaction d'un mélange piranha sur des composés organiques peut être violente ; cette opération est très exothermique et doit être réalisée avec précaution (projections possibles).

⁶ Le nettoyage du substrat au piranha a créé une faible couche d'oxyde sur le SOI, que l'on détruit au HF.

⁷ TMAH : hydroxyde de tétraméthyl ammonium (15%).

⁸ Note : l'échantillon subit deux variations brusques de température lors de cette étape, l'une de 20°C à ~ 180°C quand il entre dans la solution de H_3PO_4 , la seconde de 180°C à 20°C quand il en sort et qu'il est plongé dans le béccher de rinçage d'eau DI. L'opérateur devra prendre garde aux projections d'acide engendrées par ces chocs thermiques.

⁹ Etape facultative.

Tableau 6.1: Etapes de fabrication des nanofils de silicium.

c) Critère de fin de gravure

Le risque que les nanofils de silicium soient « sur-gravés » lors de la seconde gravure anisotrope si on laisse celle-ci se réaliser pendant un temps trop long, est relativement faible. D'une part, la gravure TMAH est lente pour la face {111} du silicium monocristallin (Figure 6.1). D'autre part, l'opérateur peut observer en temps réel et à l'œil nu le déroulement de la gravure. En effet, la couleur de la couche superficielle de silicium est corrélée à son épaisseur. La couleur de l'échantillon est due à la superposition des interférences obtenues par réflexion et par transmission de la lumière blanche à travers les deux films minces que sont le substrat SOI et la couche de SiO₂. Toutes les longueurs d'onde de la lumière blanche générant des interférences sur l'échantillon, celles-ci se superposent pour donner la couleur du SOI. Or, au cours de la gravure, l'épaisseur du SOI change. Le résultat de la superposition des interférences est modifié, ce qui crée un défilement de couleurs en fin de gravure, pour aboutir, après le bleu, le violet et le jaune, au noir lorsqu'il n'y a plus de silicium. Cette couleur indique la fin de la gravure.

Cependant, il faut noter que la couleur noire n'apparaît pas d'une manière simultanée sur l'ensemble de la surface de l'échantillon. Habituellement, la couche de silicium est gravée entièrement en un point de l'échantillon, et la couleur noire « avance » sur la surface au fur et à mesure que l'on prolonge le temps de gravure. Il faut quelques secondes pour qu'un échantillon soit gravé dans son intégralité. Ce phénomène de « retard » est dû au fait que l'épaisseur initiale du SOI n'est pas idéalement uniforme et au fait que la vitesse de gravure de la face (100) dépend de la température, et est donc éventuellement sensible à de petites variations locales de la température dans la solution.

d) Aspect des nanofils

Section des nanofils

Le résultat de la gravure est un fil de silicium très étroit et de section quasi-triangulaire selon deux plans cristallins {111}, dont les dimensions sont directement reliées à l'épaisseur du substrat SOI. La hauteur du nanofil est définie par l'épaisseur initiale du SOI, tandis que sa largeur est donnée par (Figure 6.4) :

$$L = \frac{2.e}{\tan(54,74^\circ)} + d(\text{SiO}_2) = e \cdot \sqrt{2} + d(\text{SiO}_2) \quad (6-1)$$

où L est la largeur du fil, e est l'épaisseur initiale du SOI et d(SiO₂) désigne l'épaisseur du silicium oxydé pendant l'étape de LOCOS.

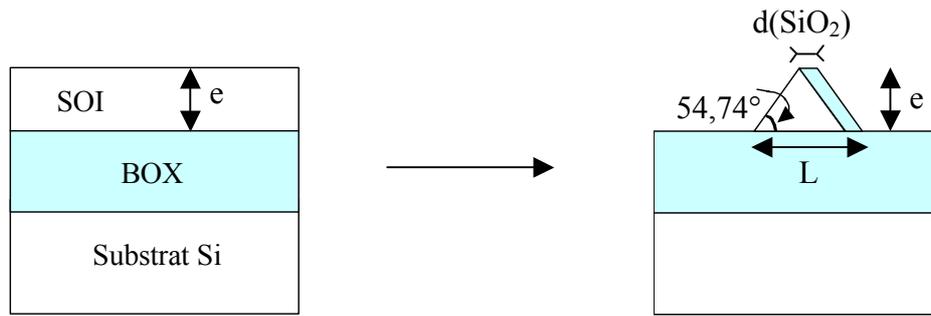


Figure 6.4: Schémas corrélant l'épaisseur initiale du substrat SOI aux dimensions finales du nanofil de silicium.

Epaisseur d'oxyde

Il est possible de connaître l'épaisseur exacte du SiO_2 formé pendant l'oxydation locale du silicium en mesurant à l'aide d'un microscope électronique à balayage la largeur du plateau supérieur des nanofils. L'observation au MEB de cette couche nous indique une épaisseur de 13 ± 2 nm (voir la partie 6.3.2-e).

Cette épaisseur ne signifie pas que les atomes d'oxygène ont diffusé dans le silicium sur une épaisseur de 13 nm car il faut tenir compte du gonflement du matériau pendant l'oxydation. En effet, la formation des liaisons Si-O modifie la maille cristalline et augmente d'un rapport 2,25 le volume initial du silicium [16, 17]. Selon le schéma classique [16], dans un four d'oxydation, le SiO_2 se forme rapidement dans les toutes premières couches atomiques. Les agents oxydants (H_2O pour une oxydation humide, O_2 pour une oxydation sèche) diffusent au travers de la couche de SiO_2 déjà formée. Lorsqu'ils atteignent l'interface SiO_2/Si , ils réagissent avec le silicium. La pénétration des atomes d'oxygène plus en avant dans le matériau est donc de plus en plus lente et difficile avec le temps. Au-delà d'une certaine profondeur, il faut des durées d'oxydation de plusieurs heures pour que la couche d'oxyde progresse de quelques nanomètres.

Résultat

Pour les substrats SOI de 86,3 nm qui seront utilisés dans la prochaine partie, on estime donc, d'après la formule (6-1), que la largeur théorique des fils est de 135 nm environ (122 nm de silicium + 13 nm de silicium oxydé). La largeur des nanofils observée au MEB est de 85 à 135 nm (partie 6.3.2-e). Quant à la longueur des nanofils, elle peut être de plusieurs microns, en rapport avec la taille de l'ouverture dans le masque de nitrure de silicium (Figure 6.5) [15].

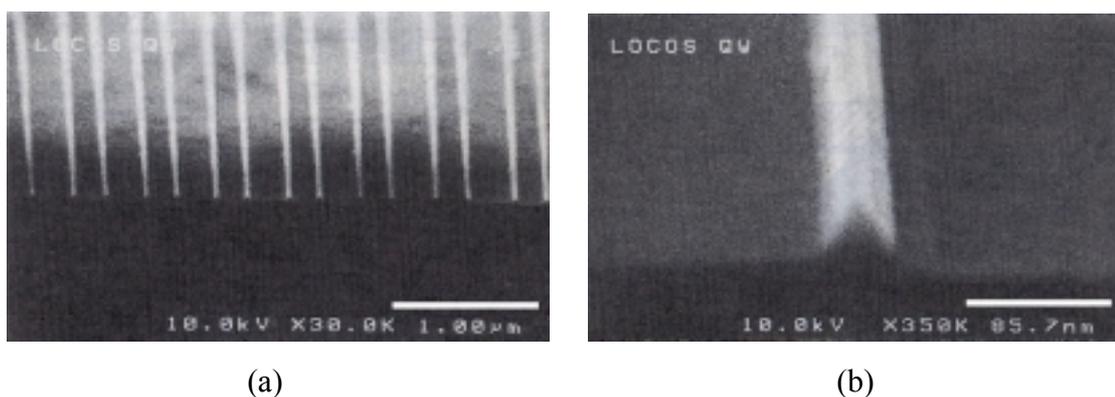


Figure 6.5: Images par microscopie électronique à balayage de nanofils de silicium réalisés sur un substrat isolant [15]. L'épaisseur initiale de SOI était de 40 nm. a) Nanofils parallèles et très rapprochés les uns des autres. b) Mise en évidence de la section triangulaire d'un nanofil de silicium.

6.3.2 Application à la réalisation de nanoélectrodes

a) Principe

La fabrication simultanée de deux nanofils de silicium le long de deux directions $\langle 110 \rangle$ perpendiculaires ($[0\ 1\ \bar{1}]$ et $[011]$), est à la base de la réalisation des nanoélectrodes. Au point de rencontre des nanofils, un gap se forme pendant la seconde gravure anisotrope, en raison de la constitution des deux nanofils selon des plans contradictoires.

D'autre part, les chemins d'accès électriques et les plots de contact, permettant de relier électriquement les nanoélectrodes à l'appareillage de mesure, sont réalisés en même temps que les nanoélectrodes par la gravure humide au TMAH. Pour cela, les extrémités des nanofils situées du côté opposé au gap sont protégées de la seconde gravure par un masque de nitrure de silicium.

b) Niveaux de masquage

Le procédé utilise deux niveaux de masquage effectués par photolithographie (Figure 6.6). Le premier niveau représente une ouverture dans le masque de nitrure de silicium (Figures 6.6-a et b). Le motif possède un angle droit dont les côtés sont orientés selon les directions $[0\ 1\ \bar{1}]$ et $[011]$ et qui sont à l'origine des deux nanofils (Figure 6.6-b). Le gap est formé au point exact où les deux nanofils se rencontrent, c'est-à-dire à l'angle droit.

Le second masque définit les pistes d'accès électrique et les plots de contact (Figures 6.6-c et d). Les motifs représentés délimitent les zones du SOI qui resteront protégées lors de

la seconde gravure anisotrope. Le contact électrique entre les nanoélectrodes et les pistes d'accès est assuré grâce à la large bande rectiligne qui se prolonge d'un plot à l'autre (Figure 6.6-d). En effet, la partie centrale de cette bande n'est pas retranscrite sur l'échantillon, puisque le silicium sous-jacent a déjà été retiré lors de la première gravure anisotrope. La connexion nanoélectrode-piste électrique est donc effectuée de part et d'autre du premier motif. Enfin, un motif d'encadrement est réalisé autour des pistes et des plots électriques, destiné à être éventuellement connecté à la terre s'il se révèle pendant la caractérisation électrique qu'un plan de masse à proximité du dispositif soit nécessaire.

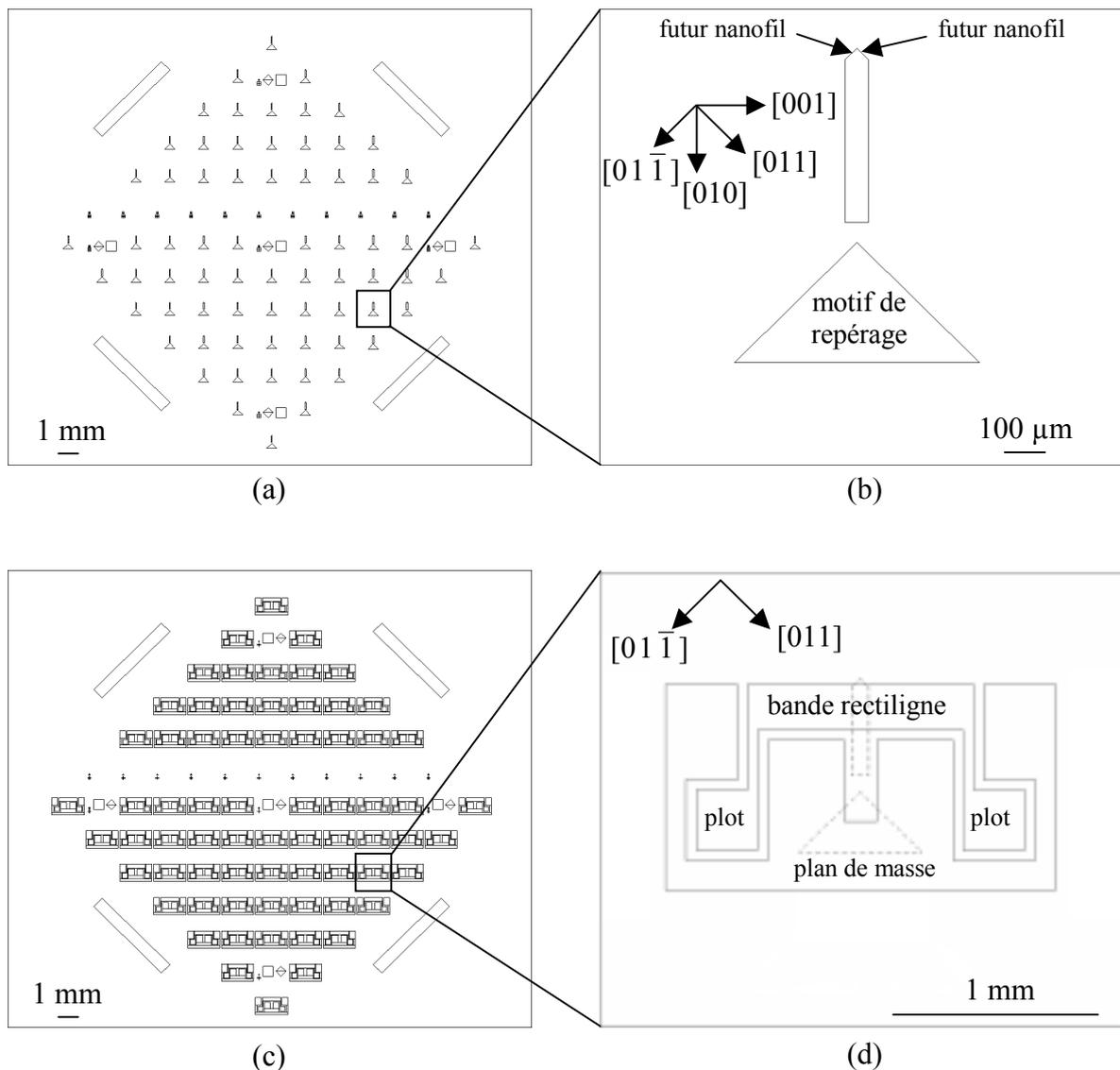


Figure 6.6: Niveaux de masque pour l'élaboration de nanoélectrodes à partir du procédé des nanofils. a) 1^{er} niveau de masque et b) détail d'un motif du 1^{er} niveau. c) 2^{ème} niveau de masque et d) détail d'un motif du 2^{ème} niveau.

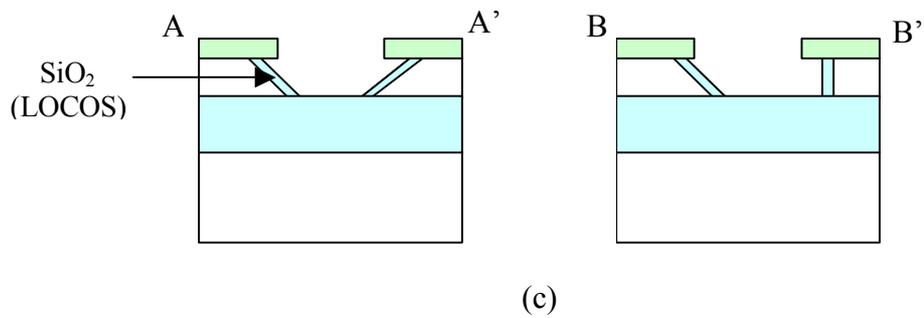
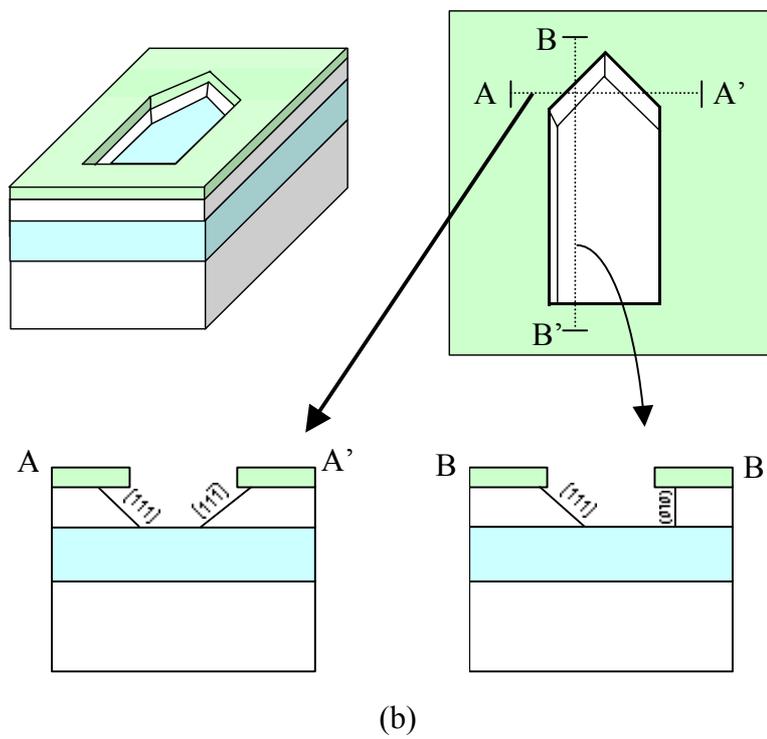
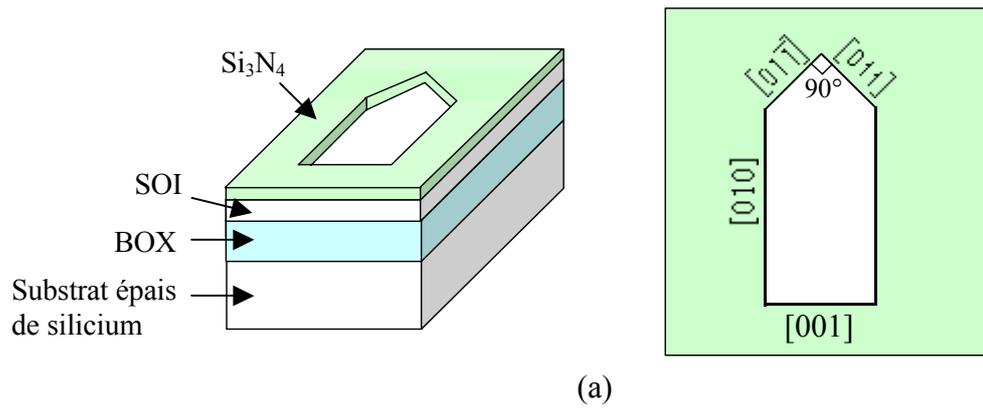
c) Procédé technologique

Les échantillons utilisés sont des substrats SOI préparés par la technique SMART-CUT. Le silicium est de type p (dopé à 10^{15} cm^{-3}), orienté (100) et de résistivité 20-30 $\Omega \cdot \text{cm}$. L'épaisseur du SOI, mesurée à l'ellipsomètre en trois points de l'échantillon, est de $86,3 \pm 2,6$ nm et celle de la couche d'oxyde enterrée de $200,3 \pm 0,7$ nm. L'épaisseur du support de silicium est de 525 μm . La taille des échantillons, après un clivage le long des directions $\langle 110 \rangle$, est de $3 \times 3 \text{ cm}^2$.

Le processus de fabrication est présenté dans le détail dans le tableau 6.2 et illustré par la figure 6.7. Tout d'abord, un masque fin de nitrure de silicium est déposé par LPCVD sur le substrat SOI. L'épaisseur de Si_3N_4 mesurée par ellipsométrie est de $24,8 \pm 0,1$ nm avec les conditions de dépôt utilisées. Le premier niveau de masquage est dessiné dans le film de Si_3N_4 par l'intermédiaire d'une photolithographie et d'une gravure plasma au tétrafluorométhane (CF_4). Les deux côtés perpendiculaires à l'origine des nanofils sont orientés selon les directions orthogonales $[01\bar{1}]$ et $[011]$ (Figure 6.7-a).

Une gravure humide anisotrope de la couche superficielle de Si est réalisée en utilisant du TMAH à 75°C (Figure 6.7-b). Seul le silicium apparent à l'intérieur du motif est gravé. Deux types de plans sont mis en évidence : les plans (111) et $(11\bar{1})$ apparaissent le long des directions $[01\bar{1}]$ et $[011]$ respectivement selon un angle de $54,74^\circ$ avec la surface, tandis que les directions $[001]$ et $[010]$ forment des murs verticaux (010) et (001) respectivement. La couleur du Si_3N_4 sous-gravé apparaît orange (Figure 6.8). La sous-gravure des plans (010) et (001) est plus marquée que les plans (111) et $(11\bar{1})$ car, d'après les vitesses de gravure données sur la figure 6.1, les plans $\{100\}$ sont gravés plus rapidement que les plans $\{111\}$.

Pour plus de sûreté, la gravure du silicium peut être prolongée quelques minutes supplémentaires, car la position des nanofils n'est pas un paramètre crucial à cette étape. En effet, les plans révélés sont ensuite fixés dans leur position lors de l'étape suivante d'oxydation. Cependant, il est nécessaire de s'assurer que le point de rencontre des deux plans (111) et $(11\bar{1})$ s'est formé correctement. On peut le vérifier au microscope optique en observant, par transparence à travers la couche mince de nitrure de silicium, l'angle de 90° formé entre les directions $[01\bar{1}]$ et $[011]$ (Figure 6.8).



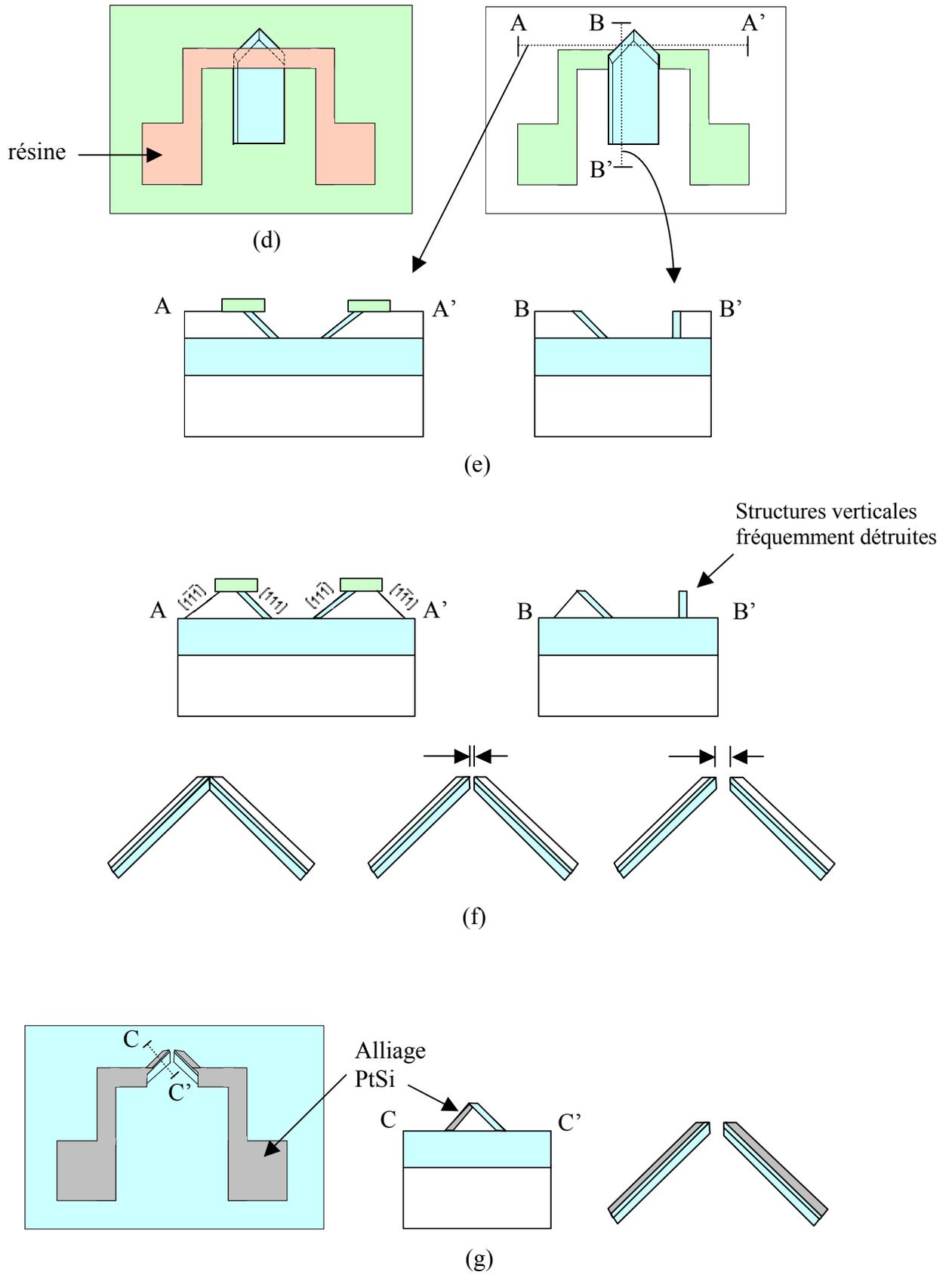


Figure 6.7: Etapes de fabrication de deux nanoélectrodes orientées à 90° à partir du procédé de formation des nanofils.

Etape	Opérations réalisées
Clivage de la plaquette	Clivage d'une plaquette de SOI (100) le long des directions $\langle 110 \rangle$. Les bords de l'échantillon serviront de repères pour orienter le premier masque optique sur la direction $\langle 110 \rangle$.
Nettoyage du substrat	Mélange $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:1:6$ 75-85°C 10 min, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Destruction de l'oxyde natif	$\text{HF}:\text{H}_2\text{O} = 1:100$ 2 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Dépôt du masque de nitrure de silicium (Si_3N_4)	Dépôt LPCVD Si_3N_4 25 nm $\text{NH}_3:\text{SiH}_4 = 150:40$ sccm 800°C 0,5 Torr 9 min.
Premier masquage (Figure 6.7-a)	<p>Résinages promoteur et résine photosensible positive 1400-17 600 nm, recuit sur plaque 90°C 10 min.</p> <p>Insolation UV masque niveau 1.</p> <p>Révélation $\text{CH}_2168:\text{H}_2\text{O} = 1:2$ 90 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec.</p> <p>Gravure plasma du Si_3N_4 66 Å/min : $\text{CF}_4 = 50$ sccm 37,5 mTorr 20 W 4 min.</p> <p>Destruction résine (lift-off) acétone + ultrasons 1 min, rinçage IPA, séchage azote sec.</p> <p>Nettoyage piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$ 10 min), rinçage eau DI, séchage azote sec.</p>
Première gravure anisotrope du SOI (Figures 6.7-b et 6.8)	<p>Destruction oxyde natif $\text{HF}:\text{H}_2\text{O} = 5:95$ 20 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec.</p> <p>Gravure TMAH 75°C, rinçage eau DI, séchage azote sec.</p>
Oxydation locale du silicium (LOCOS) (Figure 6.7-c)	Oxydation sèche 1000°C $\text{O}_2 = 2,0$ L/min 1 h.
Second masquage (Figure 6.7-d et e)	<p>Résinages promoteur et résine 1400-17 600 nm, recuit sur plaque 90°C 10 min.</p> <p>Insolation UV masque niveau 2.</p> <p>Révélation $\text{CH}_2168:\text{H}_2\text{O} = 1:2$ 90 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec.</p> <p>(Figures 6.7-d et 6.9)</p> <p>Gravure plasma du Si_3N_4 66 Å/min : $\text{CF}_4 = 50$ sccm 37,5 mTorr 20 W 4 min.</p> <p>Destruction résine (lift-off) acétone + ultrasons 1 min, rinçage IPA, séchage azote sec.</p> <p>Nettoyage piranha 10 min, rinçage eau DI, séchage azote sec.</p> <p>(Figure 6.7-e)</p>
Seconde gravure anisotrope du SOI (Figure 6.7-f)	<p>Destruction oxyde natif $\text{HF}:\text{H}_2\text{O} = 5:95$ 20 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec.</p> <p>Gravure TMAH 65°C, rinçage eau DI, séchage azote sec.</p>
Destruction du masque Si_3N_4	H_3PO_4 160-180°C 120 Å/min, rinçage eau DI, séchage azote sec. (Figure 6.10)
Formation du siliciure de platine (Figure 6.7-g)	<p>Pulvérisation cathodique Pt 500 W 3 min : 15 nm.</p> <p>Recuit thermique 500°C 1h sous flux de N_2.</p> <p>Décollage Pt $\text{HCl}:\text{HNO}_3 = 1:3$ 50°C.</p>

Tableau 6.2: Processus de fabrication de nanoélectrodes en siliciure de platine.

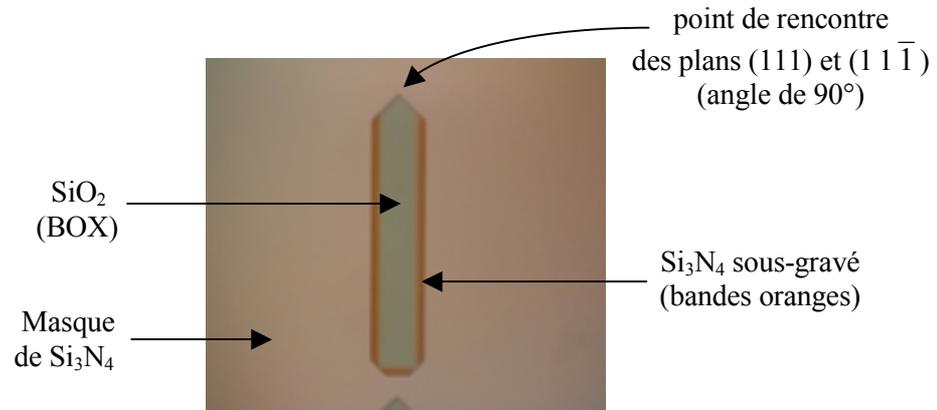


Figure 6.8: Résultat de la première gravure anisotrope à travers un motif présentant deux côtés orientés selon les directions $\langle 110 \rangle$ du silicium monocristallin. Cette étape correspond à la figure 6.7-b. Les bandes oranges sur les côtés du motif sont dues à la sous-gravure du nitrure de silicium. L'observation du point de rencontre des deux plans $\{111\}$ est utilisée comme critère de décision de l'arrêt de la gravure anisotrope au TMAH. Lorsqu'il est formé convenablement, le point de rencontre entre les directions $\langle 110 \rangle$ est un angle de 90° .

Les plans du silicium sont ensuite immobilisés par une oxydation sèche (Figure 6.7-c). Le second masquage, destiné à construire les pistes d'accès et les plots électriques, est alors réalisé (Figures 6.7-d et 6.9). Sur ces figures, la bande de résine semble relier les deux plots électriques. En vérité, cette zone n'est pas retranscrite sur la surface pendant la seconde gravure anisotrope, puisqu'elle traverse la surface du SiO_2 découvert. En revanche, la connexion des (futurs) nanoélectrodes aux (futurs) pistes électriques est effectuée de façon certaine aux extrémités de la piste électrique dans le prolongement de l'électrode (Figure 6.9).

Le film de Si_3N_4 non-protégé est alors retiré par gravure sèche, suivi de la destruction de la résine (Figure 6.7-e). La seconde gravure anisotrope au TMAH est ensuite réalisée (Figure 6.7-f). Outre les pistes et les plots électriques, les nanoélectrodes sont formées pendant cette étape. Les électrodes résultent de la difficulté à produire l'angle de $289,5^\circ$ entre les deux plans $(1\bar{1}\bar{1})$ et $(1\bar{1}1)$ créés lors de cette gravure. Au point de rencontre des deux nanofils, la continuité n'est pas assurée, ce qui tend à créer un gap (Figure 6.7-f).

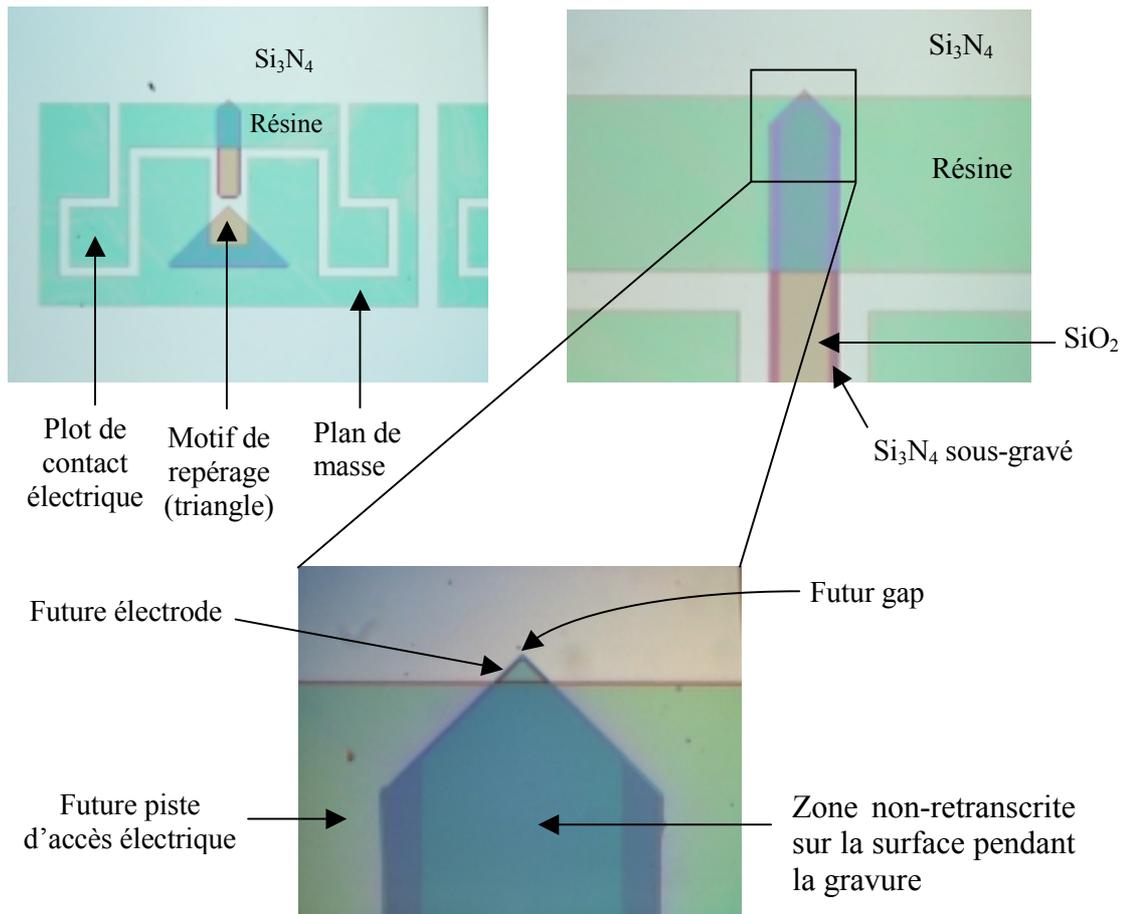


Figure 6.9: Résinage de la surface, en vue de former les pistes d'accès et les plots électriques grâce à une gravure plasma du Si_3N_4 . La bande de résine traversant le premier motif n'est pas retranscrite sur la surface lors de la gravure plasma. Cette étape correspond à la figure 6.7-d.

Puisque le gap inter-électrodes est progressivement élargi à mesure que la gravure se poursuit (Figure 6.7-f), une température de gravure faible (65°C) est choisie, afin que l'attaque du silicium par le TMAH soit lente et donc que le gap résultant du conflit de formation des deux plans $\{111\}$, soit le plus petit possible.

Les structures SiO_2 verticales provenant des plans (010) et (001) sont fragiles et se révèlent souvent détruites au cours de la seconde gravure au TMAH. Si ce n'est pas le cas, des structures verticales de SiO_2 sont construites (Figure 6.7-f). Celles-ci ne peuvent pas être à l'origine de court-circuits entre les deux pistes électriques puisqu'elles ne sont formées que d'oxyde de silicium résultant de l'étape de LOCOS.

La figure 6.10 montre le résultat de la seconde gravure anisotrope après la destruction du masque de nitrure de silicium au H_3PO_4 . En particulier, un gap, ici de quelques centaines de nanomètres, peut être observé aux extrémités des deux nanofils.

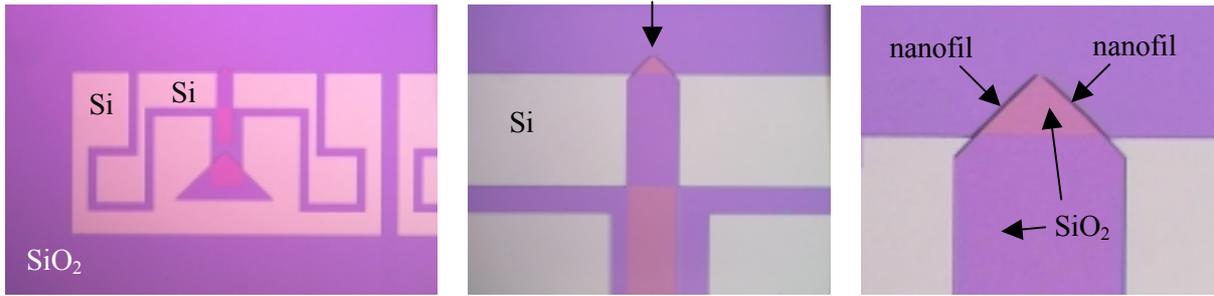


Figure 6.10: Observation par microscopie optique des électrodes formées pendant la seconde gravure anisotrope au TMAH. Les nanofils présentent une discontinuité à l'origine du gap inter-électrodes. Sur ces photographies, le masque de Si_3N_4 a été retiré, découvrant le silicium qui a été protégé de la gravure pour construire les chemins d'accès électriques.

Remarquons que la différence de couleur observée sur la figure 6.10 à l'intérieur du premier motif provient du fait qu'une partie du SiO_2 a été exposée à la gravure plasma au CF_4 tandis que la bande de résine entre les deux pistes électriques en protégeait une autre partie. Le tétrafluorométhane grave l'oxyde de silicium mais à une vitesse moindre que celle du Si_3N_4 avec les paramètres utilisés ici [18, 19]. La zone de SiO_2 exposée, qui apparaît rose sur la figure 6.10, a donc été partiellement gravée pendant cette étape et/ou peut éventuellement avoir subi un dépôt des composants volatiles créés dans le plasma.

Une mesure simple à l'ohmmètre permet de contrôler à ce stade que la couche de nitrure de silicium a été détruite entièrement par le H_3PO_4 pour laisser apparent le silicium des plots de contact (Figure 6.10). En effet, le Si_3N_4 est un matériau fortement isolant et doit correspondre à une résistance mesurée infinie. Avec les pointes d'un banc de mesure déposées sur une structure en marge de l'échantillon et écartées d'environ 1 cm, nous obtenons une résistance de 5-10 M Ω . Ce résultat est conforme avec l'ordre de grandeur attendu pour la résistance du silicium non-dopé : $R_{\text{Si}} = \rho \frac{L}{S} \sim 1 \text{ M}\Omega$, avec une résistivité de 20-30 $\Omega\cdot\text{cm}$ et une section de 86,3 nm (épaisseur de Si) x 1 cm (estimation).

d) Métallisation

Les nanofils à l'origine des électrodes sont constitués d'une face oxydée (SiO_2) et d'une face de silicium, tandis que les plots de contact, formés de silicium faiblement dopé (type p, 10^{15} cm^{-3}), sont à ce stade de mauvais conducteurs électriques. Afin d'accroître la conductivité des nanoélectrodes et des structures de contact, le silicium est ensuite métallisé pour réaliser un siliciure. Pour cela, un film mince de platine est déposé par pulvérisation cathodique sur l'ensemble de la surface, suivi d'un recuit d'une heure à 500°C sous flux d'azote. La formation du siliciure de platine est réalisée en deux étapes pendant le recuit thermique (Chapitre 2 partie 2.1.4). Tout d'abord, le platine en surface diffuse rapidement dans le silicium et forme la phase transitoire du siliciure de platine Pt_2Si . Puis, une fois que

tout le platine superficiel est consommé, le silicium sous-jacent diffuse vers la couche de Pt₂Si pour former la phase finale PtSi. Le résultat est une augmentation de l'épaisseur de la couche PtSi d'un rapport 2 à 2,3 par rapport à celle du platine déposé [20]. Le platine restant sur la surface de SiO₂ est ensuite retiré grâce au mélange HCl:HNO₃ (eau régale) à 60°C (Figure 6.7-g). Le substrat de SiO₂ et la couche oxydée sur un des côtés des nanoélectrodes ne sont pas modifiés car le platine ne peut pas diffuser à travers l'oxyde de silicium [20]. Le résultat théorique de la métallisation des nanoélectrodes est un fil de section triangulaire dont un des côtés est constitué de SiO₂, l'autre côté de PtSi et le cœur du fil est formé de Si (Figure 6.7-g). Le transport de charges à travers les électrodes devrait donc être réalisé via le côté métallisé.

Des tests de conductivité effectués à l'ohmmètre après le décollage du platine montrent que le siliciure s'est formé correctement : la résistance mesurée entre deux pointes déposées sur les pistes électriques et séparées de 1 mm est typiquement comprise entre 30 Ω et 130 Ω. Par conséquent, nous supposons que la résistivité des nanoélectrodes est également abaissée d'un facteur 10⁴, de 20-30 Ω.cm (résistivité initiale du silicium) à une résistivité de 2 à 10 mΩ.cm. De la même manière, on peut vérifier qu'il ne reste plus de trace de platine sur la surface de SiO₂, car la résistance obtenue entre des pointes de mesure séparées d'une distance de 500 μm environ, est supérieure à 30 MΩ (valeur limite du multimètre), ce qui correspond à une résistivité supérieure à 1 x 10⁵ Ω.cm. Enfin, une résistance infinie (> 10¹⁴ Ω) est observée de part et d'autre des nanoélectrodes avec le dispositif de mesure de la figure 2.22 (Chapitre 2), ce qui confirme l'existence d'un gap entre les nanopointes.

e) Observations et discussion

La figure 6.11 montre un résultat typique de la seconde gravure anisotrope. Le prolongement des fils, visible par transparence sous la couche de nitrure de silicium, marque l'interface entre les nanofils et les pistes électriques protégées par la couche de Si₃N₄. Nous pouvons voir sur l'image de droite que la section des fils est bien triangulaire et qu'un gap a été créé au point de rencontre.

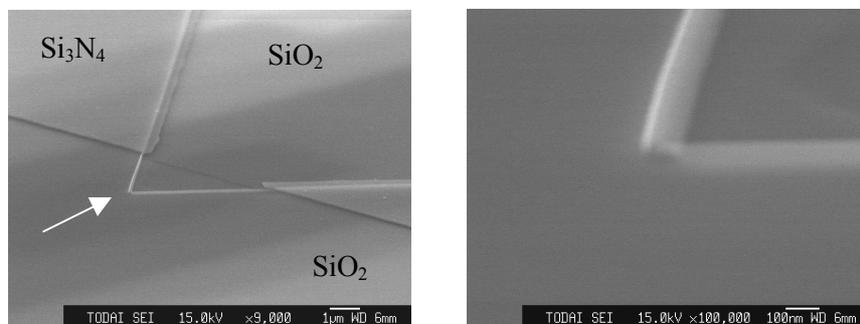


Figure 6.11: Images par microscopie électronique à balayage de nanoélectrodes formées par gravure anisotrope du silicium. La couche de nitrure de silicium (Si₃N₄) qui protège les pistes de connexion électrique sera ensuite retirée.

Influence du temps de gravure

Comme il l'a été indiqué dans la partie 6.3.1-c, la fin de la gravure du SOI n'est pas réalisée simultanément sur l'ensemble de l'échantillon. Lorsque tout le silicium a été retiré et que la couche superficielle devient le SiO₂, la surface devient noire. Toutefois, il existe habituellement un différentiel de gravure sur la surface de l'échantillon, que nous avons supposé être dû, d'une part à l'existence d'une variation de l'épaisseur initiale du substrat SOI, et d'autre part à l'influence de petites variations locales de température dans la solution de gravure. Cette combinaison est probablement à l'origine du retard de 1 à 3 secondes constaté pendant la gravure en certains points de la surface. En effet, la variation de l'épaisseur du SOI mesurée à l'ellipsomètre sur trois points est de 5,2 nm ; or, si l'on considère une vitesse de gravure de 175 à 250 nm/min pour une température comprise entre 60 et 65°C (Figure 6.1), le temps de gravure supplémentaire est de 1,5 seconde environ, c'est-à-dire dans la gamme de celui observé en pratique.

En conséquence, bien que l'échantillon soit retiré de la solution de TMAH et plongé dans le béccher de rinçage à l'eau DI aussitôt que la surface est entièrement gravée, la nécessité pour l'opérateur de prolonger la gravure un instant entraîne une certaine dispersion de la taille des gaps obtenus. En effet, comme cela est illustré sur la figure 6.7-f, le gap formé est fonction du temps de gravure. On s'attend donc à ce que les quelques secondes de retard ajoutées en fin de gravure soient répercutées sur les gaps formés les premiers.

Un moyen pour diminuer la dispersion des gaps obtenus est d'exécuter la seconde gravure anisotrope sur des échantillons plus petits. Ainsi, la gravure sur des échantillons de 1 x 1 cm² est extrêmement homogène et les gaps obtenus sont très reproductibles. La figure 6.12 présente des nanoélectrodes dont le gap est compris entre 20 et 30 nm. Ces nanoélectrodes proviennent toutes du même échantillon.

Si l'échantillon est retiré de la solution de TMAH très rapidement en fin de gravure, un contact ponctuel entre les nanofils peut être obtenu (Figure 6.13). Là encore, toutes les nanoélectrodes présentent le même profil sur des surfaces de 1 x 1 cm². Un gap peut être créé à partir de ces contacts ponctuels en prolongeant un instant la gravure anisotrope au TMAH.

Nous pouvons voir sur ces images MEB (Figure 6.13) que la section des nanofils est bien triangulaire, comme attendu. Les plans {111} et le plateau supérieur de SiO₂ sont bien visibles. En mesurant sur ces images la largeur du plateau de SiO₂, nous estimons l'épaisseur de la couche de silicium oxydé à 13 ± 2 nm. La largeur des nanofils est comprise entre 85 et 135 nm, proche de la largeur théorique de 135 nm (partie 6.3.1-d).

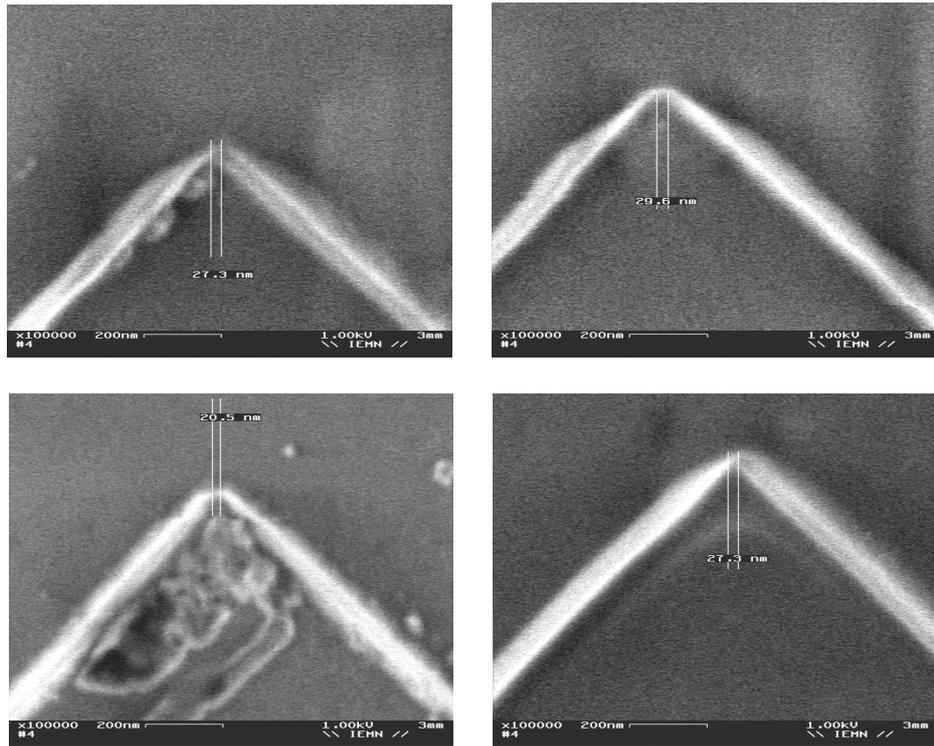


Figure 6.12: Images MEB de gaps nanométriques formés par une gravure anisotrope au TMAH. Ces nanoélectrodes proviennent d'un même échantillon $1 \times 1 \text{ cm}^2$. Les gaps sont de 27 nm, 30 nm, 20 nm et 27 nm. Sur les images en haut à gauche et en bas à gauche, quelques traces de pollution organique ont été apportées après la gravure.

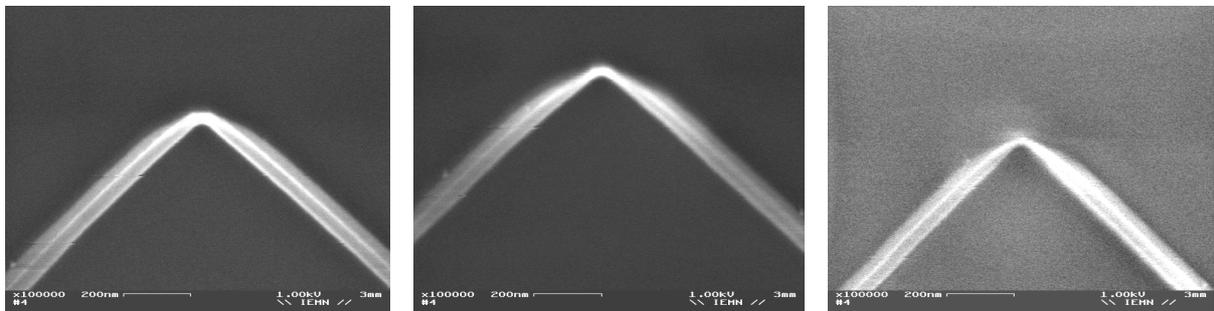


Figure 6.13: Images MEB de contacts ponctuels entre les nanofils. Ces nanoélectrodes proviennent d'un même échantillon $1 \times 1 \text{ cm}^2$.

Mécanisme supposé de formation du gap

Le mécanisme exact de la formation du gap pendant la gravure n'est pas connu. Cependant, nous pouvons voir que l'extrémité des nanofils s'affine vers le gap (côté extérieur constitué de Si) (Figures 6.12, 6.13 et 6.14). L'apex des nanofils est très pointu. Nous faisons l'hypothèse qu'au point de rencontre, la gravure conjuguée selon les deux directions orthogonales $[01\bar{1}]$ et $[011]$ aboutit à la création d'un plan particulier qui donne son aspect

affiné aux extrémités des électrodes. L'observation au MEB de fils de silicium à partir de SOI plus épais (épaisseur initiale de $1,5 \mu\text{m}$) semble indiquer que ce plan de gravure à l'interface des deux fils soit le plan $(1\bar{1}0)$.

Destruction des structures isolées de SiO_2

Au niveau du gap, le plan $\{111\}$ oxydé est fréquemment détruit pendant la gravure (observation sur d'autres images MEB non-présentées). De même, les structures verticales de silicium oxydé résultant des plans (010) et (001) immobilisés sur la surface par l'étape de LOCOS (Figure 6.7-f) sont souvent détruites durant la seconde gravure anisotrope au TMAH, peut-être sous la pression des mouvements de fluide dans la solution de gravure. Dans le cas contraire, des structures isolées et très fines de SiO_2 se dressent sur la surface.

Déplacements verticaux des nanofils

De plus, nous avons pu observer à plusieurs reprises que les nanofils de silicium peuvent parfois se détacher spontanément du substrat, demeurer quelques instants suspendus au-dessus de la surface de SiO_2 , puis se reposer. Sur la figure 6.14, le nanofil de gauche apparaît plus brillant, ce qui signifie qu'il est actuellement redressé au-dessus de la surface. Nous estimons d'après les couleurs des images MEB que la hauteur à laquelle s'élève le nanofil est supérieure à $1 \mu\text{m}$. Les nanofils ne sont donc pas figés sur la surface de SiO_2 . En raison de contraintes internes, ils peuvent à l'occasion se détacher du substrat et rester suspendus à une hauteur relativement élevée. Ces déplacements se réalisent sans aucune intervention de l'observateur mais sont peut-être dus au chargement des nanofils par le faisceau du microscope électronique à balayage.

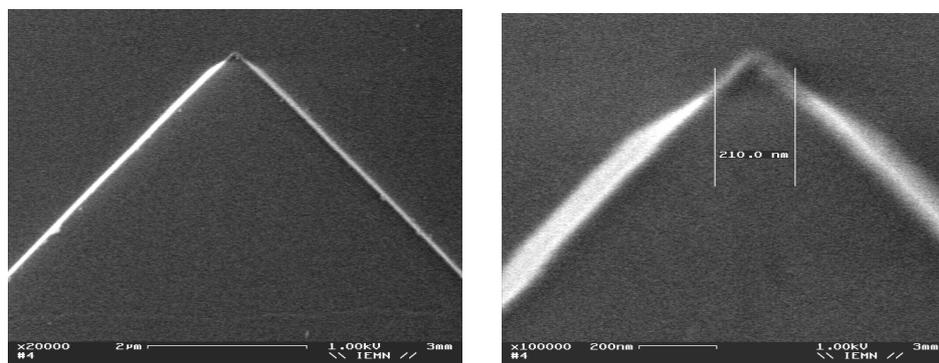


Figure 6.14: Le nanofil de gauche s'est élevé spontanément au-dessus de la surface. Ces nanoélectrodes sont issues du même échantillon que celles présentées à la figure 6.12. Le gap s'est élargi un instant de 20-30 nm à 210 nm (vue du dessus). Le nanofil est estimé être à plus d'un micron au-dessus de la surface.

En nous inspirant de ce phénomène, nous avons réalisé sur un échantillon des électrodes suspendues issues d'un substrat SOI de 1,5 μm d'épaisseur. Les couches de silicium épais et de SiO_2 ont été gravées successivement par une attaque ICP-RIE en face arrière¹⁴ et une gravure humide au BOE 7:1¹⁵. Ces techniques, qui consistent à sous-graver le substrat sur lequel reposent les structures à libérer, ont déjà été appliquées avec succès dans la littérature pour réaliser des nanostructures suspendues [21-24], en particulier des nanofils [25-28]. En fin de gravure, les pointes de silicium sont suspendues dans le vide (Figure 6.15). Cependant, comme le montre l'observation au MEB de la figure 6.15-c, les fils de silicium ne sont pas strictement orientés en vis-à-vis. Un nanofil (celui du bas) apparaît plus clair sur l'image. Il est situé « plus haut » que l'autre, en raison de contraintes différentes dans chaque fil. Une application potentielle des nanoélectrodes suspendues pourrait être d'approcher et de déposer les nanoélectrodes sur un substrat que l'on désire étudier, afin d'y effectuer des mesures locales de conductivité électrique.

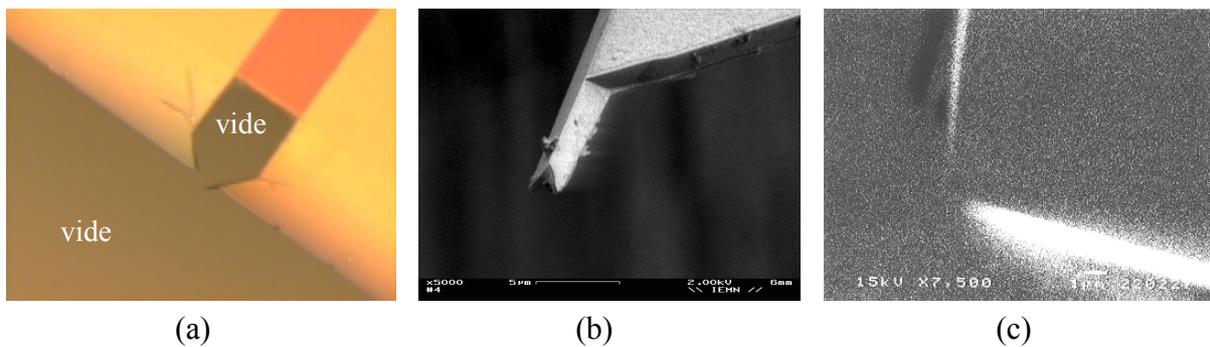


Figure 6.15: Réalisation de nanofils suspendus. a) Après la sous-gravure du substrat de SiO_2 , les électrodes sont suspendues dans le vide. b) Observation d'une électrode cassée pendant le procédé. La section triangulaire a été conservée. c) Observation de deux fils de silicium suspendus. L'électrode du bas est dressée au-dessus de l'autre pointe.

6.3.3 Modification du procédé de formation du gap : utilisation de la gravure sèche

La reproductibilité des gaps est très grande pour des surfaces de 1 x 1 cm^2 . Cependant, les gaps obtenus pendant la seconde gravure anisotrope au TMAH dépendent de la vitesse à laquelle l'opérateur retire l'échantillon de la solution. En effet, selon le cas, le résultat s'étend de la formation de contacts ponctuels sur toute la surface (Figure 6.13) jusqu'à la formation de gaps de 500 nm.

¹⁴ Gravure profonde ICP-RIE : gravure ionique réactive par plasma inductif (*Inductively Coupled Plasma Reactive Ion Etching*) fondée sur une série de cycles de 20 secondes He, C_4F_8 , SF_6 , Ar, O_2 .

¹⁵ Buffered Oxide Etch 7:1 : NH_4F = 34,8 %, HF = 6,4 %, H_2O = 58,8 %. Le BOE 7:1 grave une couche de SiO_2 à 700 $\text{\AA}/\text{min}$.

Différentes méthodes sont envisageables pour contrôler avec une grande précision l'étape ultime de fabrication du gap. Ainsi, la gravure anisotrope au TMAH pourrait être arrêtée avant la fin et le gap créé avec une autre solution. Des solutions à base de mélanges $\text{HNO}_3:\text{HF}$ ou d'éthylène diamine-pyrocatechol (EDP) peuvent avoir des vitesses de gravure très lentes [19]. On peut également imaginer d'utiliser une solution de TMAH plus concentrée car la vitesse de gravure du silicium est inversement proportionnelle à la concentration en TMAH de la solution [13].

Nous avons tenté de remplacer l'étape de gravure au TMAH par une gravure sèche du silicium. Cette étude est fondée sur l'hypothèse qu'*a priori* les gravures sèches sont plus contrôlables que les gravures humides. Nous avons cherché à savoir si une gravure plasma au SF_6 pouvait être à l'origine de la formation d'un gap nanométrique au niveau des extrémités des nanofils.

Lors d'une gravure ionique réactive (*Reactive Ion Etching, RIE*), deux mécanismes contribuent simultanément à la gravure (voir au chapitre 2 la partie 2.1.2-b) : d'une part une gravure verticale, qualifiée de *gravure physique*, qui résulte de l'impact des ions du plasma contre l'échantillon, et d'autre part une gravure plus faible et multi-directionnelle, dite *gravure chimique*, qui résulte d'une réaction chimique des ions avec le substrat. Habituellement, la gravure physique (verticale) est très majoritaire sur la gravure chimique (isotrope) car les paramètres d'attaque choisis par l'opérateur tendent à privilégier l'accélération des particules sur la réalisation optimale de la réaction chimique. En substituant la seconde gravure au TMAH par une gravure plasma au SF_6 , nous espérons pouvoir à la fois graver le SOI du fait de la gravure physique, et attaquer les nanofils par la gravure chimique (Figure 6.16). Nous avons imaginé que le point de rencontre des nanofils pourrait être rompu par la gravure chimique et produire le gap nanométrique recherché.

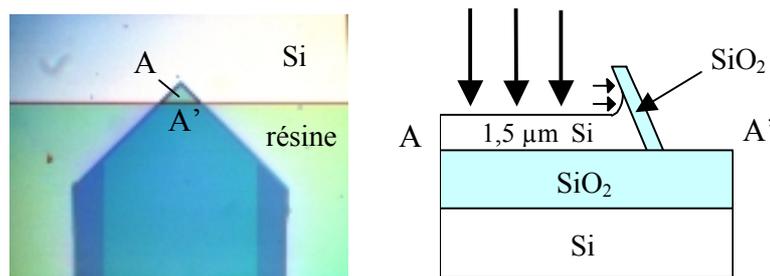


Figure 6.16: Principe de l'attaque du silicium par une gravure plasma au SF_6 .

Les tests ont été effectués sur plusieurs substrats SOI de $1,5 \mu\text{m}$ d'épaisseur. La formation des premiers plans (111) et $(1\bar{1}\bar{1})$ et leur oxydation ont été réalisées comme précédemment, seule la seconde étape de gravure est modifiée. Les conditions de gravure ont été choisies pour favoriser la gravure chimique par rapport à une gravure trop verticale. Pour cela, la densité du gaz SF_6 est maintenue élevée dans la chambre. Avec une pression élevée, le

libre parcours moyen des molécules du gaz est court et leur énergie cinétique est faible. Le comportement anisotrope de la gravure est minimisé au profit de la gravure chimique [19].

Après une étude systématique de la qualité de la gravure en fonction des paramètres de contrôle, la pression sélectionnée est de 150 mTorr et le débit de 5 sccm. Une puissance relativement faible, de 30 W, est appliquée pour diminuer l'importance de la gravure ionique. La vitesse de gravure du silicium avec ces conditions est de 640 Å/min. Nous observons qu'aucun gap n'est créé après 23 minutes de gravure, ce qui correspond à la gravure verticale totale des substrats SOI. Un temps de « sur-gravure » est alors ajouté (Tableau 6.3). Dans une première partie, des ondulations apparaissent le long des fils du côté silicium (Figure 6.17-a). Après une sur-gravure d'environ une heure, ces ondulations se sont élargies et ont détruit une section du fil. Le gap est cependant de dimension micrométrique (Figure 6.17-b).

Temps ajouté (min)	0	10	40	45	70
Résultat de la « sur-gravure »	La gravure verticale du substrat SOI est terminée ; aucun gap n'est formé.	Pas de gap formé	Pas de gap formé ; les fils apparaissent ondulés du côté Si (Figure 6.17-a)	Même résultat	Les ondulations ont rompu un des fils et créé un gap de 8 µm (Figure 6.17-b)

Tableau 6.3: Sur-gravure du silicium en vue de créer un gap entre les fils.

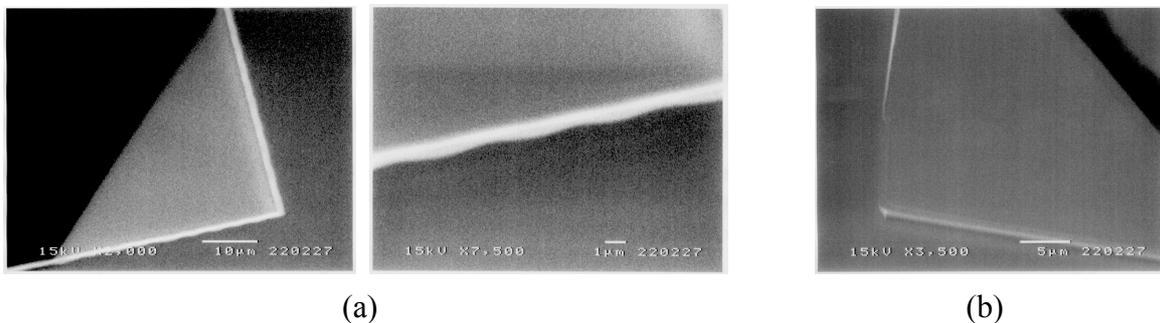


Figure 6.17: Gravure plasma SF_6 prolongée des fils de silicium. a) Observation au microscope électronique à balayage après 40 minutes de « sur-gravure ». Des ondulations apparaissent le long des fils du côté silicium. b) Après 30 minutes supplémentaires, un gap de 8 µm est formé par rupture d'un des deux fils.

La rupture des fils de silicium est donc possible par gravure sèche mais n'est pas produite spontanément au point de rencontre des deux fils. Une longue gravure RIE au SF_6 sous des conditions favorisant la gravure chimique forme donc des « ondulations » le long des fils du côté Silicium ; lorsque la gravure est encore prolongée, les « creux » sont amplifiés jusqu'à détruire une partie du fil. Il semble difficile de créer des gaps de dimension nanométrique par cette voie. De même, des tests de gravure ICP-RIE ont démontré la résistance des fils à une gravure intensive et la difficulté à former des gaps bien contrôlés par cette méthode.

6.4 Electrodes à doubles contacts ponctuels

6.4.1 Principe et niveaux de masquage

Nous décrirons dans cette partie une autre technique de fabrication d'électrodes possédant chacune deux contacts ponctuels avec deux électrodes différentes. Elle a été originellement développée pour la conception de transistors à un électron [29] et nous avons tenté de l'adapter pour réaliser des électrodes séparées par des gaps nanométriques (Tableau 6.4).

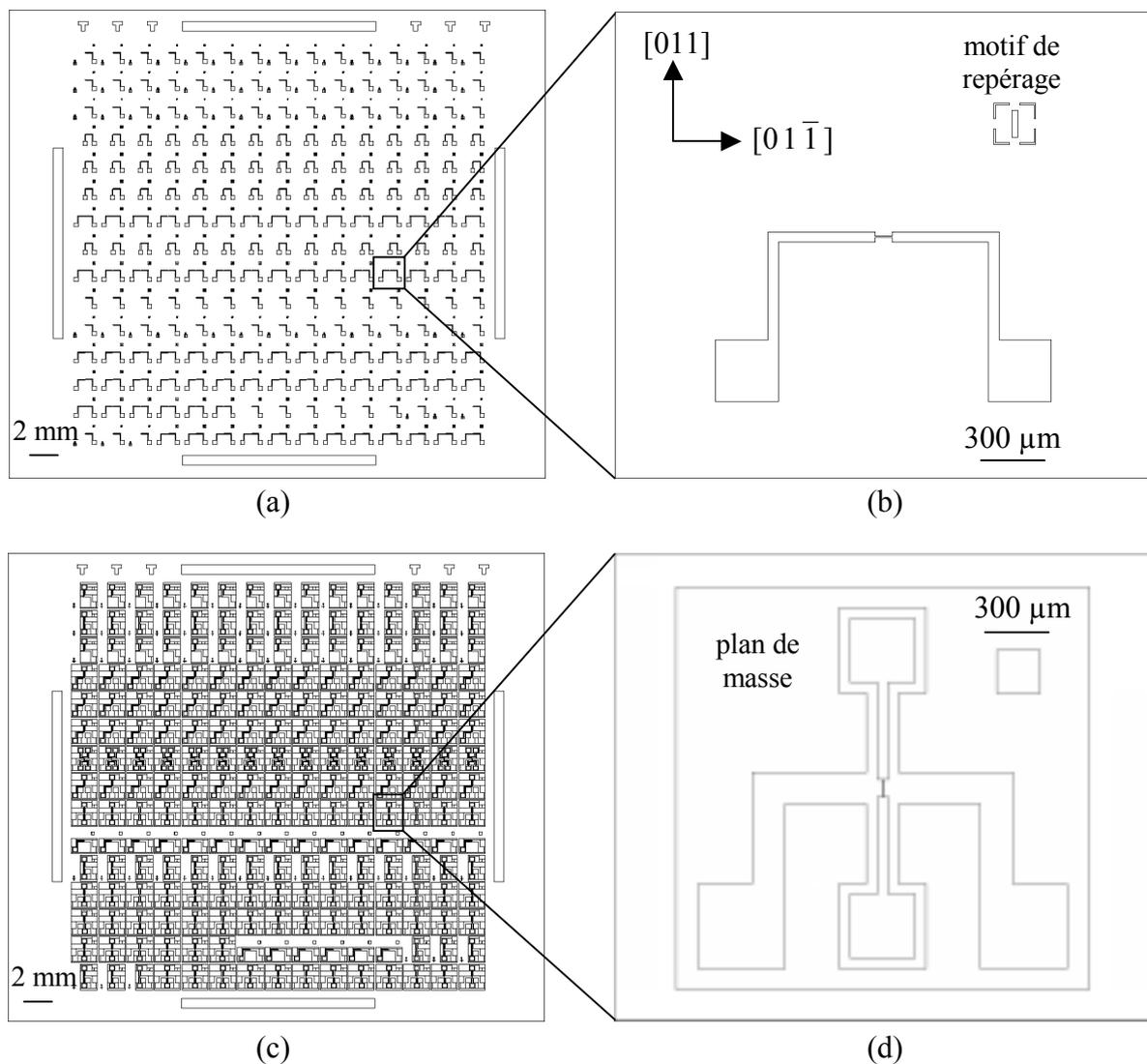


Figure 6.18: Niveaux de masquage pour l'élaboration d'électrodes à contact ponctuel. a) 1^{er} niveau de masque et b) détail d'un motif du 1^{er} niveau. c) 2^{ème} niveau de masque et d) détail d'un motif du 2^{ème} niveau.

Ce procédé est fondé sur le dépôt par LPCVD de deux masques de nature différente sur un substrat SOI (Figure 6.18). Le premier masque est une couche mince de nitrure de silicium, et le second une couche un peu plus épaisse de SiO₂. Les deux masques sont dessinés sous forme de deux bandes orientées sur deux directions orthogonales [011] et [01 $\bar{1}$]. Leur fonction est de protéger le silicium sous-jacent pendant la première gravure anisotrope du SOI. Les électrodes sont réalisées à cette étape. Le point important est que les deux masques se recouvrent partiellement, et que la zone commune aux deux masques soit protégée pendant les premières étapes technologiques. Lorsque les électrodes sont élaborées, la partie commune est l'objet de la seconde gravure anisotrope. Les contacts ponctuels entre les électrodes sont formés sur les bords de l'intersection entre les deux masques.

6.4.2 Procédé technologique

Le matériau de départ est un substrat SOI d'épaisseur $85,7 \pm 2,7$ nm reposant sur une couche enterrée d'oxyde de silicium de 200 nm d'épaisseur. Le silicium est orienté (100), faiblement dopé (dopage p à 10^{15} cm⁻³) et de résistivité 20-30 Ω .cm. Tout d'abord, un film de 28 nm de Si₃N₄ est déposé par LPCVD sur le SOI. Un premier masquage par photolithographie et gravure sèche redessine le masque de Si₃N₄ sous la forme d'une bande large orientée sur la direction [01 $\bar{1}$] du silicium. Puis un film de SiO₂ de 40 nm d'épaisseur est déposé par LPCVD. L'épaisseur du film de SiO₂ est un peu plus grande que celle du film de Si₃N₄ afin de s'assurer de la continuité de la couche de SiO₂ de part et d'autre du recouvrement. Le second niveau de masque est une bande rectangulaire de SiO₂ orientée à 90° par rapport à la première bande du Si₃N₄ (Figure 6.19-a).

Les plans {111} du silicium, révélés dans les directions <110> par une gravure anisotrope au TMAH, forment les électrodes. Seul le silicium apparent est gravé, la sous-gravure des masques de nitrure et d'oxyde de silicium étant considérée faible en regard à la largeur des électrodes (Figure 6.19-b).

Les masques sont alors enlevés successivement afin de découvrir les électrodes. L'objectif est maintenant de fixer les électrodes dans leur position par une oxydation locale du silicium. Cependant, la zone de recouvrement des deux masques doit être protégée de l'oxydation puisqu'elle fait l'objet de la seconde gravure anisotrope. Pour cela, le film de Si₃N₄ est retiré le premier à l'aide d'une gravure plasma (Figure 6.19-c), puis celui de SiO₂ par une gravure humide (Figure 6.19-d). La gravure plasma étant anisotrope dirigée essentiellement dans la direction verticale, un motif de Si₃N₄ demeure à l'intersection des 2 précédents masques. Ce masque permet de protéger de l'oxydation une partie du SOI (Figure 6.19-e).

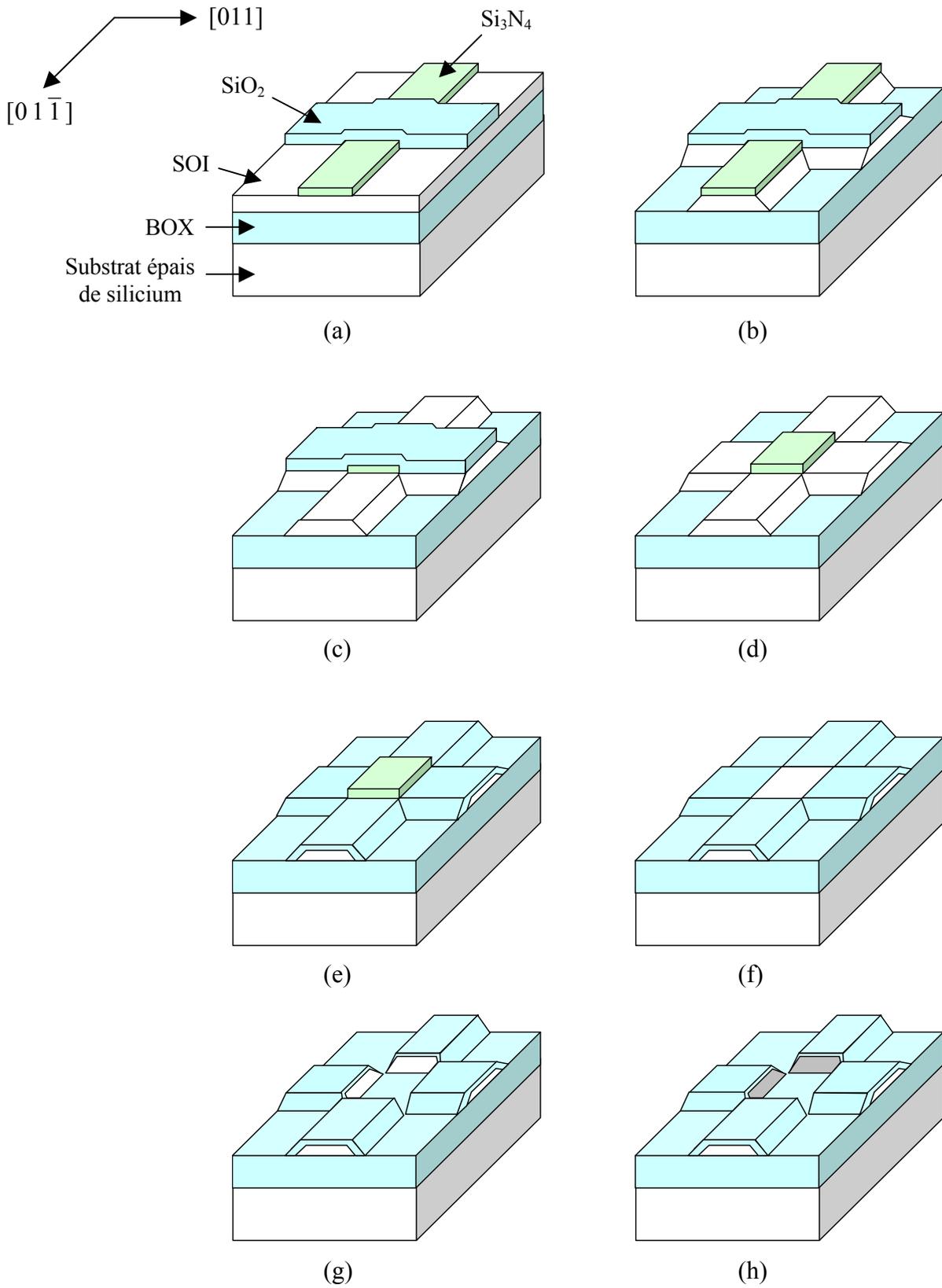


Figure 6.19: Etapes de fabrication de quatre électrodes possédant chacune deux contacts ponctuels.

Etape	Opérations réalisées
Clivage de la plaquette	Clivage d'une plaquette de SOI (100) le long des directions $\langle 110 \rangle$. Les bords de l'échantillon serviront de repères pour orienter les masques optiques sur la direction $\langle 110 \rangle$.
Nettoyage du substrat	Mélange $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:1:6$ 75-85°C 10 min, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Destruction de l'oxyde natif	$\text{HF}:\text{H}_2\text{O} = 1:100$ 2 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Dépôt de nitrure de silicium (Si_3N_4)	<i>Dépôt LPCVD</i> Si_3N_4 25 nm $\text{NH}_3:\text{SiH}_4 = 150:40$ sccm 800°C 0,5 Torr 9 min.
Premier masquage	<i>Résinages</i> promoteur et résine photosensible positive 1400-17 600 nm, recuit sur plaque 90°C 10 min. <i>Insolation UV</i> masque niveau 1. <i>Révélation</i> $\text{CH}_2168:\text{H}_2\text{O} = 1:2$ 90 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec. <i>Gravure plasma</i> du Si_3N_4 66 Å/min : $\text{CF}_4 = 50$ sccm 37,5 mTorr 20 W 4 min. <i>Destruction résine (lift-off)</i> acétone + ultrasons 1 min, rinçage IPA, séchage azote sec. <i>Nettoyage piranha</i> ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$ 10 min), rinçage eau DI, séchage azote sec.
Dépôt d'oxyde de silicium (SiO_2)	<i>Dépôt LPCVD</i> SiO_2 40 nm $\text{SiH}_4:\text{O}_2 = 80:100$ sccm 600°C 0,3 Torr 52 min.
Second masquage (Figure 6.19-a)	<i>Résinages</i> promoteur et résine 1400-17 600 nm, recuit sur plaque 90°C 10 min. <i>Insolation UV</i> masque niveau 2. <i>Révélation</i> $\text{CH}_2168:\text{H}_2\text{O} = 1:2$ 90 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec. <i>Gravure humide</i> du SiO_2 720 Å/min : BHF ¹ 35 sec. <i>Destruction résine (lift-off)</i> acétone + ultrasons 1 min, rinçage IPA, séchage azote sec.
Première gravure anisotrope du SOI (Figure 6.19-b)	<i>Gravure TMAH</i> 75°C, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Retrait des masques (Figures 6.19-c et d)	<i>Gravure plasma</i> du Si_3N_4 66 Å/min : $\text{CF}_4 = 50$ sccm 37,5 mTorr 20 W 4 min. <i>Gravure humide</i> du SiO_2 720 Å/min : BHF 35 sec.
Oxydation locale du silicium (LOCOS) (Figure 6.19-e)	<i>Oxydation sèche</i> 1000°C $\text{O}_2 = 2,0$ L/min 1 h.
Destruction du masque de Si_3N_4 (Figure 6.19-f)	H_3PO_4 160-180°C 120 Å/min, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Seconde gravure anisotrope du SOI (Figure 6.19-g)	<i>Gravure TMAH</i> 60°C, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Formation du siliciure de platine (Figure 6.19-h)	<i>Pulvérisation cathodique</i> Pt 500 W 3 min : 15 nm. <i>Recuit thermique</i> 500°C 1h sous flux de N_2 . <i>Décollage Pt</i> $\text{HCl}:\text{HNO}_3 = 1:3$ 50°C.

¹ BHF : Buffered HF, constitué de 40 mL HF 48%, 80 g NH_4F et 180 mL eau DI.

Tableau 6.4: Processus de fabrication d'électrodes en siliciure de platine possédant chacune 2 contacts ponctuels avec 2 électrodes différentes.

Le masque de Si_3N_4 est ensuite détruit (Figure 6.19-f) et le silicium devenu apparent subit la seconde gravure humide au TMAH (Figure 6.19-g). Les gaps sont formés à cette étape lorsque le contact ponctuel entre les électrodes est détruit par une gravure TMAH prolongée. Les plans $\{111\}$ nouvellement construits sont alors métallisés grâce à la formation d'un siliciure de platine (Figure 6.19-h).

6.4.3 Observations et discussion

a) Difficulté d'alignement du deuxième masque optique

Plusieurs types de motifs ont été réalisés (Figure 6.18). Si tous reposent sur le recouvrement d'une partie de la couche de nitrure de silicium par une bande de SiO_2 , plusieurs géométries sont possibles (Figures 6.20 et 6.21). Suivant le motif de départ, le résultat est l'élaboration de 2 ou 4 électrodes possédant chacune 1 ou 2 contacts ponctuels. Des difficultés pratiques d'alignement du second masque optique sur le premier peuvent apparaître pour les motifs compliqués ou trop petits. Le motif le plus simple, un croisement de deux bandes larges de Si_3N_4 et de SiO_2 , est le plus facile à produire.

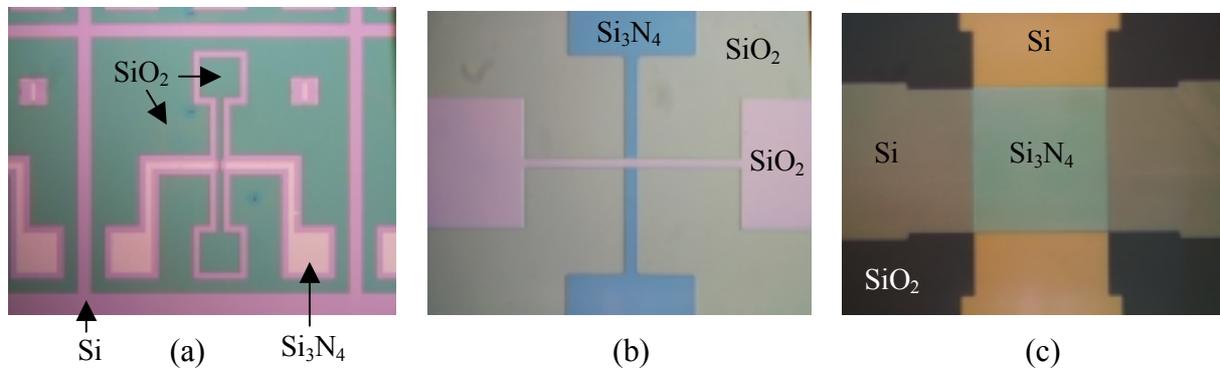


Figure 6.20: Observation des électrodes à différentes étapes technologiques. a) Vue générale des motifs après la définition des masques de Si_3N_4 et de SiO_2 (Figure 6.19-a). Un plan de masse entourant les électrodes a été ajouté. Le silicium apparent est gravé à l'étape suivante par la solution de TMAH. b) Détail du croisement entre les deux masques. Le SiO_2 recouvre le Si_3N_4 . Après la gravure TMAH du SOI, le substrat est devenu la couche de SiO_2 (Figure 6.19-b). c) Les masques de Si_3N_4 et de SiO_2 ont été détruits. Un film de Si_3N_4 demeure à l'intersection des électrodes pour protéger cette partie de l'oxydation du silicium (Figure 6.19-d).

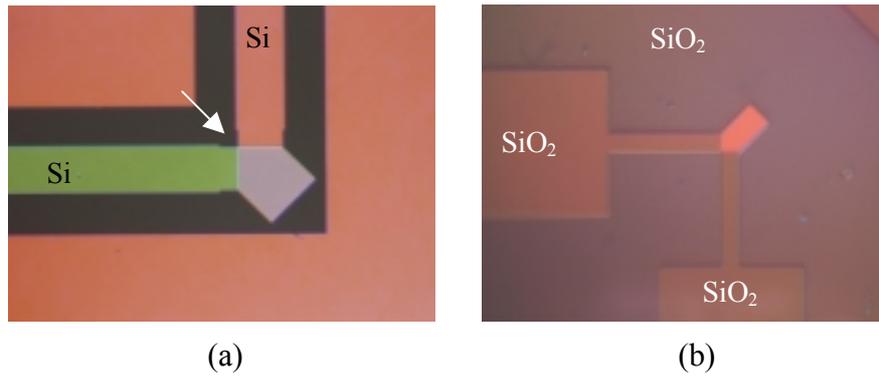


Figure 6.21: Autre motif de recouvrement des deux films. Le résultat de cette intersection est la formation de deux électrodes avec un seul contact ponctuel (flèche). Les autres côtés du motif recouvert sont orientés selon des directions $\langle 100 \rangle$ et ne forment que des « murs » verticaux isolants. a) Après la destruction des masques de SiO_2 et de Si_3N_4 , l'intersection reste protégée de l'oxydation (Figure 6.19-d). b) Observation en cours de gravure de l'évolution de l'attaque du silicium (Figure 6.19-g).

b) Formation de contacts ponctuels

Une critique importante de ce procédé de fabrication est le taux de succès relativement faible de formation des gaps. En effet, cette technique crée plus volontiers des contacts ponctuels entre les électrodes que de véritables séparations. Pour expliquer ce fait, nous faisons l'hypothèse qu'un critère important est l'angle sous lequel les électrodes sont formées pendant la seconde gravure avec le TMAH. Avec la technique précédente décrite dans la partie 6.3.2, la seconde gravure anisotrope génère les deux plans $(1 \bar{1} \bar{1})$ et $(1 \bar{1} 1)$ qui forment entre eux un angle obtus de $289,5^\circ$. L'existence d'un angle aussi grand est supposé être à l'origine d'un mauvais ajustement de la formation de ces plans à leur point de rencontre, et donc de la création du gap entre les nanofils. Avec le procédé décrit ici, l'angle entre les plans $\{111\}$ lors de la seconde gravure au TMAH est de $70,5^\circ$ et n'est peut-être pas suffisant pour produire aisément une rupture dans la zone de rencontre de deux plans $\{111\}$.

c) Nécessité d'un repère visuel pendant la gravure

Une autre difficulté réside dans l'évaluation du temps de la seconde gravure anisotrope au TMAH. La taille réduite de l'intersection ne permet pas à l'opérateur d'observer l'évolution de la gravure en temps réel (observation du défilement des couleurs en fin de gravure), ce qui l'oblige à réaliser plusieurs aller-retours entre la solution de gravure et la caractérisation des échantillons au microscope optique. L'appréciation de la fin de gravure est donc très approximative et est parfois remise en cause lors d'une observation postérieure du profil des structures au MEB ou à l'AFM. Cet inconvénient pourrait être levé en ajoutant un

motif de grande taille sur l'échantillon qui servirait de repère visuel pendant la seconde gravure anisotrope.

d) Coupure des électrodes

De plus, on peut très souvent voir une coupure totale ou partielle des électrodes après la première gravure anisotrope au TMAH (Figure 6.22). Cette coupure commence au point de rencontre de deux plans $\{111\}$ sur les bords de deux électrodes et tend à s'étendre à travers une des électrodes et à rompre sa continuité électrique. Ce problème concerne principalement les électrodes qui étaient précédemment recouvertes de la bande de SiO_2 . La formation de la ligne de fracture dans ces électrodes est probablement une conséquence de la relaxation du masque de SiO_2 lorsqu'il passe au-dessus du masque de Si_3N_4 . Bien que l'épaisseur de la couche de SiO_2 soit plus d'une fois et demie celle du Si_3N_4 , il existe un relâchement de la couverture de l'électrode sur la ligne de rencontre des deux masques. Lorsque, au début de la première gravure au TMAH (Figure 6.19-b), un plan (111) ou $(1\bar{1}\bar{1})$ commence à être créé au bord d'une électrode recouverte de Si_3N_4 , la formation de ce plan ne s'arrête pas au point de contact entre les deux électrodes mais peut parfois se prolonger dans l'électrode recouverte de la couche de SiO_2 , du fait d'une faiblesse du masque de SiO_2 en ce point (Figure 6.22). L'ouverture créée dans l'électrode est ensuite élargie au fur et à mesure de la gravure au TMAH, ce qui peut aboutir à sa coupure complète. Nous avons observé que la coupure des électrodes est moins fréquente lorsque les motifs de recouvrement sont de grande taille, c'est-à-dire quand les électrodes sont assez larges ($\sim 10 \mu\text{m}$).

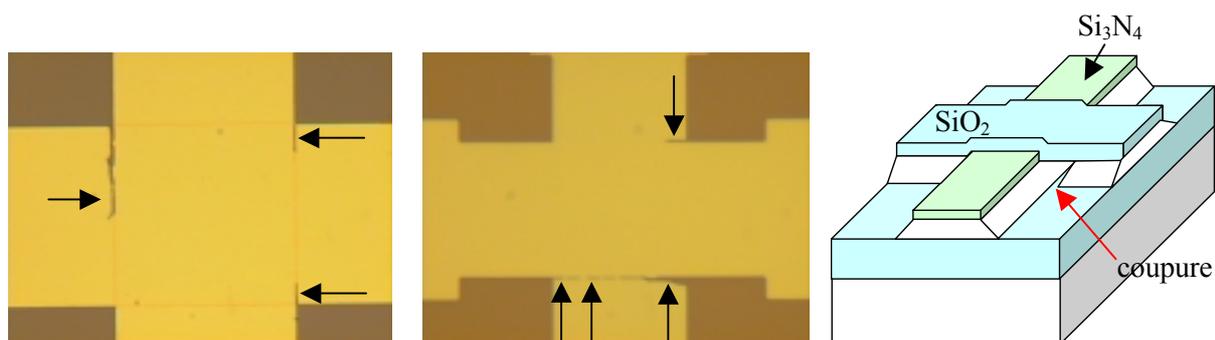


Figure 6.22: Coupures des électrodes pendant la première gravure anisotrope au TMAH.

e) Métallisation

Enfin, la métallisation insatisfaisante des électrodes constitue un autre point négatif. En effet, la formation du siliciure de platine ne concerne que les extrémités des électrodes (Figure 6.19-h), c'est-à-dire les plans $\{111\}$ du silicium formés pendant la seconde gravure.

Les pistes électriques sont toujours construites en silicium, les électrodes ne bénéficiant pas de la formation de l'alliage puisqu'elles sont recouvertes d'une couche de SiO_2 et que le platine ne peut pas diffuser à travers une couche d'oxyde de silicium [20]. Une solution pourrait être de détruire la couche de silicium oxydé résultant du LOCOS avant la métallisation des électrodes, grâce à une gravure au HF ou au BHF. Cependant, il est à noter que le substrat de SiO_2 serait également attaqué, avec un risque de sous-gravure des régions où doivent se former les gaps.

6.5 Nanopointes en vis-à-vis

6.5.1 Principe

Tout comme les deux procédés de fabrication décrits dans les parties précédentes, la technique présentée ici repose sur la formation des plans $\{111\}$ d'un substrat SOI lors d'une gravure anisotrope au TMAH [30, 31]. Cependant, cette fois-ci, les motifs principaux ne sont pas orientés selon les directions $\langle 110 \rangle$, mais suivant les directions $\langle 100 \rangle$. La gravure anisotrope est mise en œuvre entre deux motifs rectilignes. Ceux-ci sont à l'origine des pistes d'accès électriques, et l'espace qui sépare les deux pistes délimite un « couloir » dans lequel les plans $\{111\}$ sont créés. Les plans $\{111\}$ produisent des nanoélectrodes possédant des extrémités très pointues. L'apex de ces pointes repose sur le substrat de SiO_2 .

Le concept à la base de la formation des nanopointes était déjà visible au bas de la figure 6.8. Dans les coins inférieurs de l'ouverture réalisée dans le masque de nitrure de silicium, la gravure TMAH ne forme pas des angles droits mais des plans $(1\bar{1}1)$ et $(1\bar{1}\bar{1})$ situés entre les plans verticaux (010) et (001) . L'idée est d'exploiter ces plans $\{111\}$ intermédiaires pour qu'ils forment les nanopointes : grâce à une réduction de la largeur du motif d'ouverture, les deux plans $(1\bar{1}1)$ et $(1\bar{1}\bar{1})$ peuvent se rejoindre en un point. Lorsque la gravure TMAH est prolongée un instant, un gap est formé entre les deux plans.

6.5.2 Procédé technologique

Un avantage de cette technique est qu'elle utilise des substrats SOI plus épais, et donc plus communs, que ceux employés dans les deux premiers procédés. Quelle que soit l'épaisseur initiale du SOI, l'extrémité des nanopointes repose sur le substrat de SiO_2 après la gravure. L'épaisseur initiale du SOI est ici de $2,2\ \mu\text{m}$, celles de l'oxyde enterré et du substrat épais de silicium de $1,1\ \mu\text{m}$ et de $525\ \mu\text{m}$ respectivement. Le procédé, qui met en jeu deux niveaux de masques optiques (Figure 6.23), est détaillé dans le tableau 6.5 et illustré à la figure 6.24.

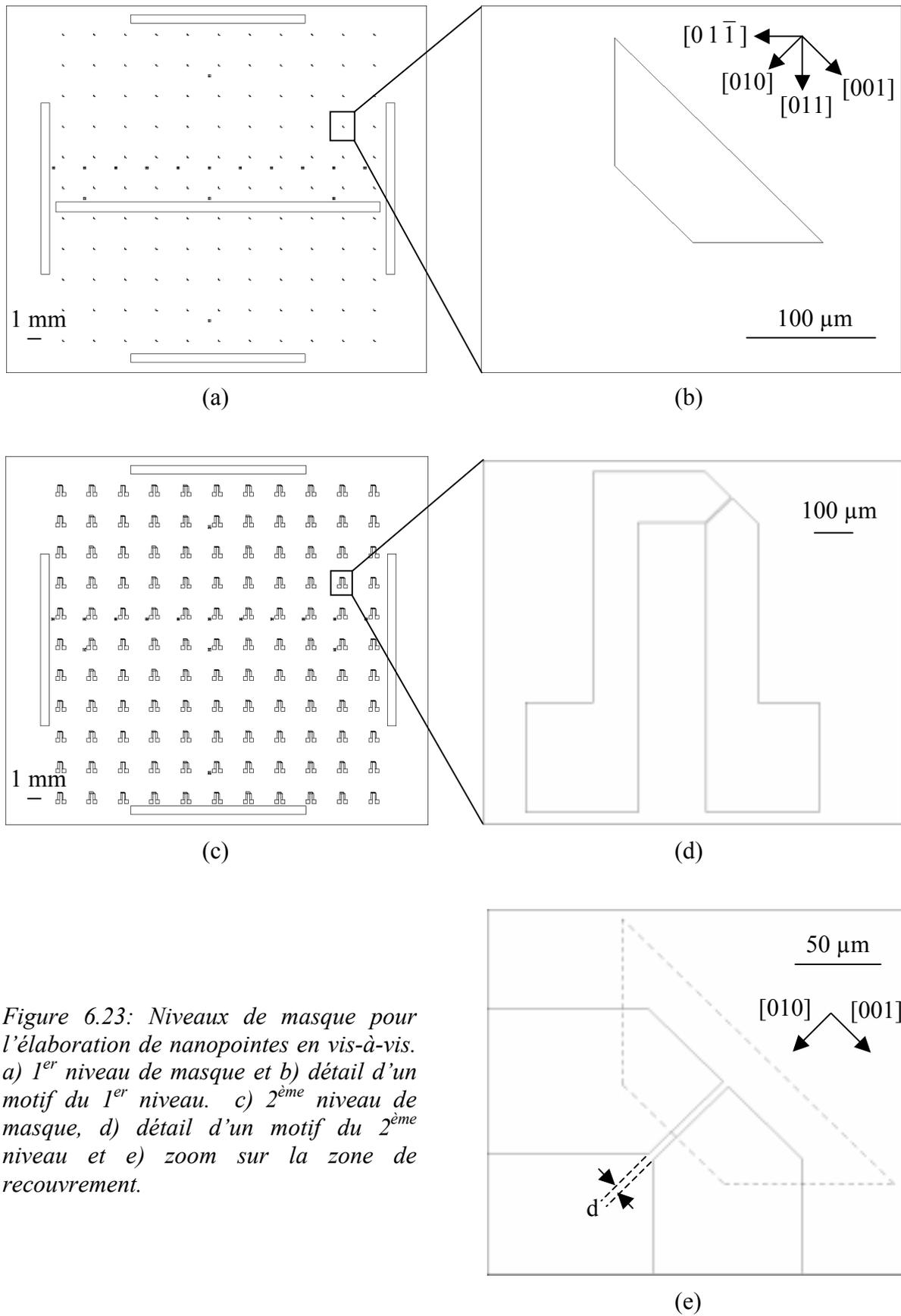


Figure 6.23: Niveaux de masque pour l'élaboration de nanopointes en vis-à-vis. a) 1^{er} niveau de masque et b) détail d'un motif du 1^{er} niveau. c) 2^{ème} niveau de masque, d) détail d'un motif du 2^{ème} niveau et e) zoom sur la zone de recouvrement.

Un film de 25 nm de Si_3N_4 est déposé par LPCVD sur l'échantillon SOI de type p (dopage 10^{15} cm^{-3} , résistivité 20-30 $\Omega\cdot\text{cm}$). Puis un premier niveau de masquage (Figures 6.23-a et b), suivi d'une gravure plasma au CF_4 , produit une ouverture trapézoïdale dans le masque de Si_3N_4 . La base du trapèze est orientée selon la direction $[001]$. Le silicium apparent est alors exposé à une gravure plasma au SF_6 . Le profil de gravure du silicium est quasi-vertical. Les murs de SOI sur les bords du masque de nitrure de silicium sont ensuite recouverts d'une couche de SiO_2 à l'aide d'une oxydation locale du silicium (Figure 6.24-a).

Le second niveau de masquage et une gravure plasma au CF_4 redessinent le film de Si_3N_4 sous la forme de plots et de pistes d'accès électrique (Figures 6.23-c, d, e et 6.24-b). La gravure anisotrope du silicium par une solution de TMAH conduit à la formation de ces plots et des pistes électriques, mais aussi à la fabrication des plans (111) et $(1\bar{1}\bar{1})$ entre les deux pistes électriques en bordure du premier motif (Figure 6.24-c). En effet, les extrémités des pistes électriques sont dessinées sous forme de « flèches ». Ces extrémités créent un « couloir » rectangulaire entre les pistes dont les côtés sont orientés selon les directions $[010]$ et $[001]$. Ce couloir étroit est analogue à la partie inférieure du motif représenté à la figure 6.8 (procédé nanofils). Cependant, la distance d entre les pistes électriques est ici beaucoup plus faible, afin que les deux plans (111) et $(1\bar{1}\bar{1})$ formés dans les coins du « couloir » lors de la gravure anisotrope au TMAH puissent se rejoindre jusqu'à réaliser un contact ponctuel, puis un gap (Figure 6.24-c). Enfin, la formation d'un siliciure de platine permet d'augmenter la conductivité des électrodes.

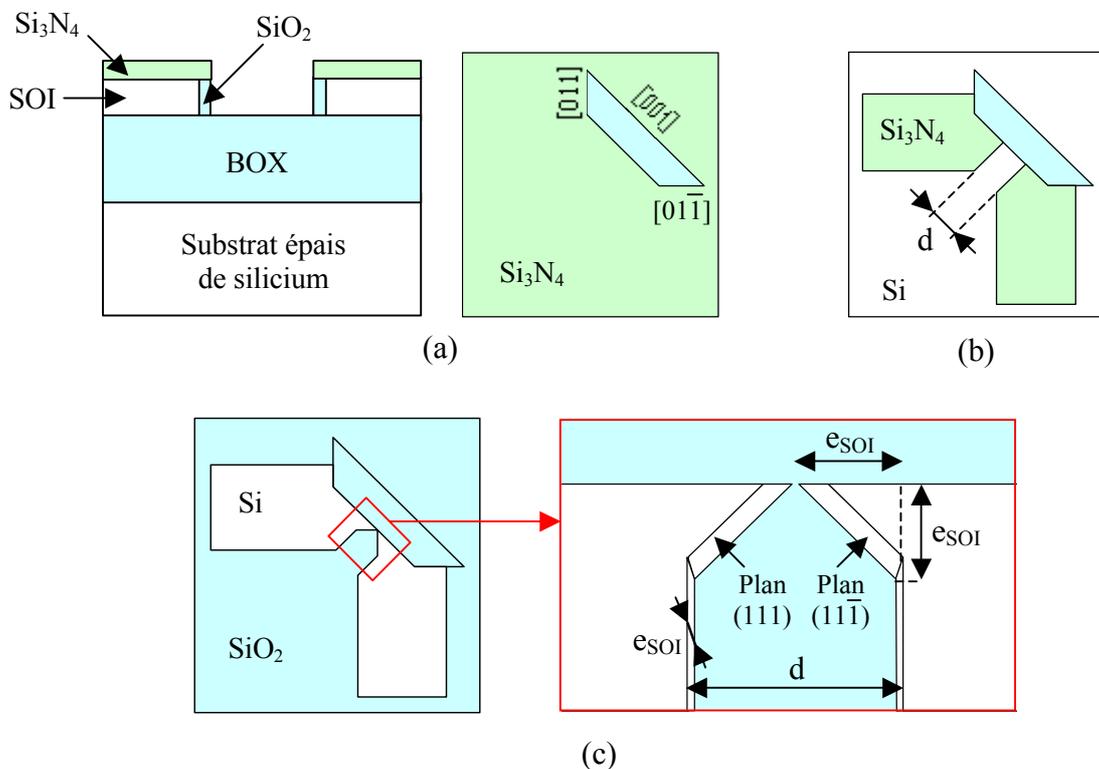


Figure 6.24: Etapes de fabrication de nanopointes en vis-à-vis.

Etape	Opérations réalisées
Clivage de la plaquette	Clivage d'une plaquette de SOI (100) le long des directions <110>. Les bords de l'échantillon serviront de repères pour orienter les masques optiques à 45° par rapport à la direction <110>.
Nettoyage du substrat	Mélange NH ₄ OH:H ₂ O ₂ :H ₂ O = 1:1:6 75-85°C 10 min, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Destruction de l'oxyde natif	HF:H ₂ O = 1:100 2 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Dépôt de nitrure de silicium (Si ₃ N ₄)	<i>Dépôt LPCVD Si₃N₄</i> 25 nm NH ₃ :SiH ₄ = 150:40 sccm 800°C 0,5 Torr 9 min.
Premier masquage	<i>Résinages</i> promoteur et résine photosensible positive 1400-17 600 nm, recuit sur plaque 90°C 10 min. <i>Insolation UV</i> masque niveau 1. <i>Révélation</i> CH2168:H ₂ O = 1:2 90 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec. <i>Gravure plasma</i> du Si ₃ N ₄ 66 Å/min : CF ₄ = 50 sccm 37,5 mTorr 20 W 4 min.
Première gravure anisotrope du SOI	<i>Gravure plasma</i> du Si 230 nm/min : SF ₆ = 20 sccm 150 mTorr 50 W 10 min. <i>Destruction résine (lift-off)</i> acétone + ultrasons 1 min, rinçage IPA, séchage azote sec. <i>Nettoyage piranha</i> (H ₂ SO ₄ :H ₂ O ₂ = 3:1 10 min), rinçage eau DI, séchage azote sec. HF:H ₂ O = 1:100 20 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Oxydation locale du silicium (LOCOS) (Figure 6.24-a)	<i>Oxydation sèche</i> 1000°C O ₂ = 2,0 L/min 1 h.
Second masquage (Figure 6.24-b)	<i>Résinages</i> promoteur et résine 1400-17 600 nm, recuit sur plaque 90°C 10 min. <i>Insolation UV</i> masque niveau 2. <i>Révélation</i> CH2168:H ₂ O = 1:2 90 sec, rinçage eau DI, séchage azote sec. <i>Gravure plasma</i> du Si ₃ N ₄ 66 Å/min : CF ₄ = 50 sccm 37,5 mTorr 20 W 4 min. <i>Destruction résine (lift-off)</i> acétone + ultrasons 1 min, rinçage IPA, séchage azote sec.
Seconde gravure anisotrope du SOI	<i>Gravure TMAH</i> 65°C, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Destruction du masque de Si ₃ N ₄ (Figure 6.24-c)	H ₃ PO ₄ 160-180°C 120 Å/min, rinçage eau DI, séchage azote sec.
Formation du siliciure de platine	<i>Pulvérisation cathodique</i> Pt 500 W 3 min : 15 nm. <i>Recuit thermique</i> 500°C 1h sous flux de N ₂ . <i>Décollage Pt</i> HCl:HNO ₃ = 1:3 50°C.

Tableau 6.5: Processus de fabrication de nanopointes en vis-à-vis.

6.5.3 Aspect des électrodes

L'étude des dimensions des nanopointes indique qu'à la fin de la gravure au TMAH, la longueur des nanopointes est égale à l'épaisseur initiale du SOI (Figure 6.24-c). La gravure anisotrope au TMAH produit des électrodes dont la surface est un triangle rectangle de côté e_{SOI} . Le plan $\{111\}$ réalisé est basé sur l'hypothénuse du triangle de longueur $\sqrt{2} \times e_{\text{SOI}}$ et forme un angle de $54,74^\circ$ avec le substrat de SiO_2 . Les autres plans du silicium dans le « couloir » sont des murs verticaux (010) et (001).

Afin de créer le gap entre les nanopointes dès la fin de la gravure, la distance d entre les pistes électriques est choisie égale à 2 fois l'épaisseur du substrat SOI (Figure 6.24-c), soit $2 \times 2,2 \mu\text{m} = 4,4 \mu\text{m}$. Une telle séparation entre des motifs est possible avec un simple masque optique. Donc ici encore, le procédé de fabrication présenté n'utilise pas d'étape de lithographie à haute résolution. Toutefois, en pratique, il est préférable de prendre une distance d légèrement inférieure à $2 \cdot e_{\text{SOI}}$, pour tenir compte du temps de réaction de l'opérateur en fin de gravure. Sur le deuxième niveau de masque (Figure 6.23-c, d et e), la séparation d est comprise entre $3,8$ et $4,4 \mu\text{m}$.

6.5.4 Observations et discussion

a) Rendement

L'étape cruciale de ce procédé est à nouveau la gravure anisotrope au TMAH. La dimension du gap inter-électrodes, qui dépend du temps de gravure, reste le point le plus difficile à contrôler. Comme dans le cas du procédé de fabrication des nanofils de silicium (partie 6.3.2), la difficulté consiste à retirer l'échantillon suffisamment vite de la solution de gravure.

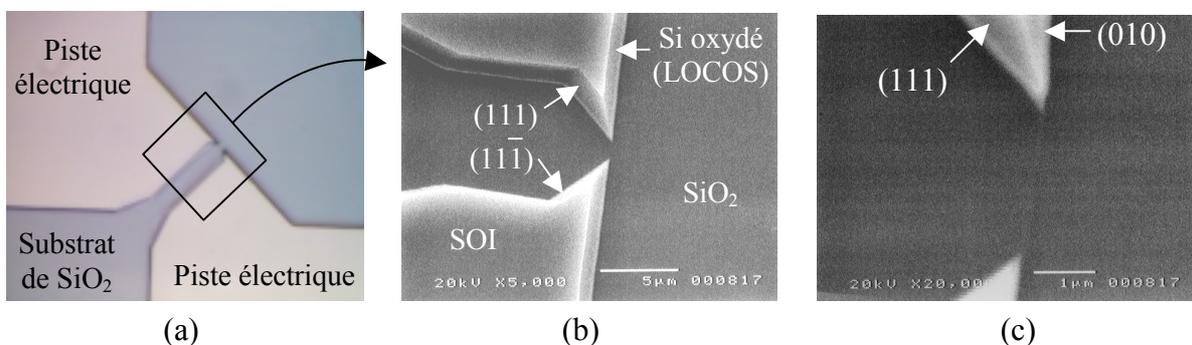


Figure 6.25: Observation des électrodes formées lors de la gravure au TMAH. a) Vue générale des électrodes. b) Les électrodes sont formées par le plan (111) ou $(\bar{1}\bar{1}\bar{1})$ du silicium d'une part, et le mur (100) de silicium oxydé d'autre part. c) Les extrémités des électrodes sont très pointues. Le gap est ici de $2,1 \mu\text{m}$.

La formation des électrodes est en revanche réalisée avec un taux de succès proche des 100 %. Les plans (111) et $(1\bar{1}\bar{1})$ apparaissent très nettement lors de la gravure. La figure 6.25 montre un exemple d'électrodes obtenues. Le mur de SiO_2 a été détruit entre les deux électrodes pendant la gravure au TMAH.

b) Rayon de courbure

Comme on peut le voir sur la figure 6.25-c, les apex obtenus sont très pointus et symétriques. Cette technique de fabrication est bien adaptée pour l'étude des propriétés électriques d'un nombre très réduit de molécules biologiques. En effet, le gap inter-électrodes est localisé dans la zone entre les apex des électrodes. La figure 6.26 présente quelques gaps obtenus par cette méthode.

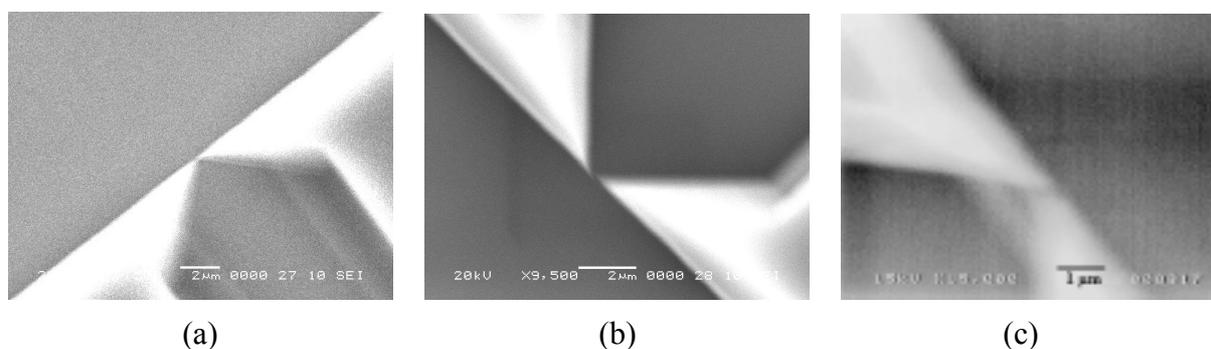


Figure 6.26: Quelques gaps inter-électrodes formés pendant la seconde gravure anisotrope du substrat SOI. Les gaps mesurés sont de a) 40 nm, b) 115 nm et c) 180 nm.

Il est possible d'affiner encore les pointes grâce à une oxydation du silicium, suivie d'une destruction de l'oxyde de silicium créé par une solution de HF. Plusieurs cycles d'oxydation et de destruction du SiO_2 formé par BHF ont été réalisés, accompagnés d'une observation systématique des électrodes au microscope électronique à balayage. Cette méthode permet de réduire les dimensions latérales de nanostructures de manière lente et contrôlée [32-34]. Les extrémités des électrodes étant des pointes de quelques dizaines de nanomètres de rayon, leurs propriétés d'oxydation sont différentes de celles des surfaces planes [35]. Du fait des contraintes liées à l'introduction des atomes d'oxygène dans le réseau atomique, la formation du SiO_2 évolue de manière différente à l'apex et le long des trois plans qui constituent les électrodes. Les oxydations sèches ont été effectuées à 1000°C sous un flux de O_2 de 2,0 L/min, et les oxydations humides à 950°C sous un flux de O_2 de 1,0 L/min bullant dans une bouteille remplie d'eau DI posée sur une plaque chauffante. Les pointes des figures 6.26-a et b résultent ainsi d'une oxydation sèche d'une heure et 30 minutes

respectivement, les pointes de la figure 6.26-c d'une oxydation humide de 30 minutes. Le rayon de courbure des pointes obtenues, mesuré à l'aide d'un microscope électronique à transmission (*Transmission Electron Microscope, TEM*), est compris entre 4 et 10 nm [31].

c) Mécanisme supposé de formation du gap

Un fil triangulaire relie parfois les extrémités des deux électrodes (Figure 6.27). Des mesures de conductivité réalisées au multimètre indiquent que ces fils sont constitués de silicium. Un des côtés est constitué de la couche de silicium oxydé pendant l'étape de LOCOS. L'autre est le plan (110) du silicium créé le long de la direction [001] (Figure 6.27).

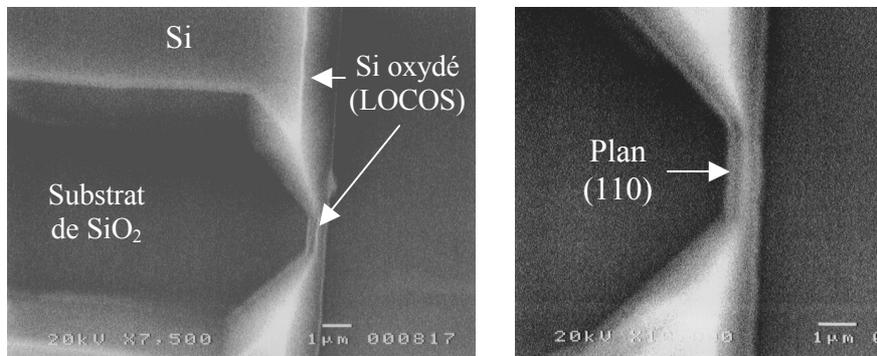


Figure 6.27: Un fil de silicium est formé entre les extrémités des deux électrodes à la fin de la gravure anisotrope au TMAH.

La forme des fils et leur mode de fabrication rappelle la technique d'élaboration des nanofils exposée dans la partie 6.3.1. Cependant, le plan attendu ici après la gravure le long de la direction [001] était le plan (010). Nous supposons que la formation de ces plans commence par celle du plan (110) ; la vitesse de gravure du plan (110) par la solution de TMAH étant très rapide (Figure 6.1), les fils sont ensuite rapidement détruits pour aboutir au plan prévu.

Sur un même échantillon, nous obtenons des électrodes reliées par un fil de silicium et des électrodes séparées de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. Cette dispersion provient du fait que la distance d entre les deux motifs du second niveau de masquage, est variable (Figure 6.23-e). On peut donc observer toutes les étapes du mécanisme de formation des pointes sur le même échantillon, la gravure de chaque motif étant arrêtée à un niveau différent du processus lorsqu'on retire l'échantillon de la solution de TMAH.

6.6 Conclusion et perspectives

Nous nous sommes efforcés dans ce chapitre de développer des techniques de fabrication d'électrodes séparées de quelques dizaines de nanomètres en utilisant uniquement les moyens technologiques conventionnels des salles blanches de microélectronique, c'est-à-dire sans intervention d'une étape de lithographie électronique. L'objectif est de produire des biopuces à bas coût, de manière automatique et à grande échelle. Les électrodes obtenues peuvent être employées pour mesurer localement les propriétés électriques d'un petit nombre de molécules biologiques greffées sur une surface.

Trois procédés de fabrication différents ont été présentés, tous basés sur la gravure anisotrope d'un substrat SOI par une solution de TMAH. La métallisation des électrodes en vue d'améliorer leur conductivité est possible grâce à la formation en surface d'un siliciure de platine. Une autre voie pour métalliser les nanoélectrodes pourrait être d'introduire des impuretés dopantes dans le silicium par implantation ionique.

La première technique (décrite dans la partie 6.3.2), qui consiste à élaborer deux nanofils de silicium orientés selon des directions orthogonales, est celle qui jusqu'à présent a donné les meilleurs résultats en terme de gaps nanométriques. Des séparations inférieures à 100 nm ont été couramment obtenues. La reproductibilité des nanostructures est très élevée pour des surfaces d'environ 1 cm².

Dans le cas des électrodes conçues par un recouvrement de deux masques de nature différente (partie 6.4), la formation de gaps nanométriques à partir des contacts ponctuels n'est pas aisée. Ce procédé possède un taux de réussite relativement faible, en raison de la coupure fréquente d'un grand nombre d'électrodes pendant la première gravure au TMAH. Pour éviter ce problème, une solution pourrait être de remplacer la première gravure du substrat SOI au TMAH par une gravure plasma au SF₆. Le nombre d'électrodes obtenues devrait être plus élevé, car la gravure des électrodes sous les masques peut être minimisée en mettant en avant une gravure essentiellement verticale.

La troisième technique permet de créer des pointes de silicium entre deux motifs parallèles orientés sur une direction $\langle 100 \rangle$ du substrat SOI (partie 6.5). La formation de plans $\{111\}$ selon les directions $\langle 110 \rangle$ est réalisée dans presque tous les cas. Le rendement associé à ce procédé est très élevé. Les pointes fabriquées en vis-à-vis pourraient permettre d'effectuer des mesures électriques très localisées sur la surface. De plus, les apex des électrodes peuvent être affinés en oxydant le silicium. Enfin, un intérêt supplémentaire de ce procédé par rapport aux deux précédents réside dans son emploi d'un matériau plus commun ; en effet, l'épaisseur initiale du substrat SOI est ici de dimension micrométrique, tandis que les

deux techniques précédentes utilisent des substrats SOI d'épaisseur inférieure à 100 nm, donc plus coûteux.

La formation des gaps inter-électrodes est l'étape la plus difficile à contrôler, car ceux-ci sont réalisés pendant une gravure humide. Bien que la gravure du SOI par une solution de TMAH soit plutôt lente par rapport à l'ensemble des gravures humides disponibles, les dimensions des gaps obtenus dépendent essentiellement du temps supplémentaire laissé par l'opérateur en fin de gravure. Une tentative a été effectuée de remplacer la seconde gravure au TMAH lors de la réalisation des nanofils de silicium, par une attaque du substrat SOI au plasma SF₆ (partie 6.3.3). Le profil des électrodes obtenues s'est révélé insatisfaisant par ce moyen jusqu'à présent.

Par manque de temps, les nanoélectrodes produites par ces procédés n'ont pas encore été utilisées dans une détection électronique d'une interaction biomoléculaire. Un point important à vérifier est la possibilité d'assembler le film initial d'APTMS sur la surface de SiO₂. En effet, le substrat a été temporairement recouvert d'une couche de platine, et nous avons vu que le métal est retiré efficacement, après le recuit, par une attaque à l'eau régale. Cependant, il est possible que, au niveau local, des impuretés de platine demeurent sur la surface de SiO₂ et gênent l'accès à une partie des silanols du substrat. Ceci devra être étudié par des observations en microscopie à force atomique de la surface des échantillons. La densité des fonctions semicarbazides peut être estimée en immobilisant des sondes marquées avec la tétraméthylrhodamine, et en comparant les intensités de fluorescence obtenues sur de telles surfaces par rapport à celles mesurées sur des films de semicarbazide greffés sur des substrats de SiO₂ fraîchement nettoyés.

Bibliographie

- [1] E. Di Fabrizio, L. Grella, M. Gentili, M. Baciocchi, L. Mastrogiacomo et P. Morales, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **36**, L70 (1997).
Fabrication of 5 nm resolution electrodes for molecular devices by means of electron beam lithography
- [2] V. Rousset, C. Joachim, S. Itoua, B. Rousset et N. Fabre, *J. Phys. III France*, **5**, 1983 (1995).
Fabrication of buried co-planar metal-insulator-metal nanojunctions with a gap lower than 10 nm
- [3] S. Itoua, C. Joachim, B. Rousset et N. Fabre, *Nanotechnology*, **5**, 19 (1994).
Fabrication and AFM characterization of a co-planar tunnel junction with a less than 30 nm interelectrode gap
- [4] A. Bezryadin et C. Dekker, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **15**, 793 (1997).
Nanofabrication of electrodes with sub-5 nm spacing for transport experiments on single molecules and metal clusters
- [5] D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries et C. Dekker, *Nature*, **403**, 635 (2000).
Direct measurement of electrical transport through DNA molecules
- [6] C.Z. Li, H.X. He et N.J. Tao, *Appl. Phys. Lett.*, **77**, 3995 (2000).
Quantized tunneling current in the metallic nanogaps formed by electrodeposition and etching
- [7] A.F. Morpurgo, C.M. Marcus et D.B. Robinson, *Appl. Phys. Lett.*, **74**, 2084 (1999).
Controlled fabrication of metallic electrodes with atomic separation
- [8] C. Zhou, C.J. Muller, M.R. Deshpande, J.W. Sleight et M.A. Reed, *Appl. Phys. Lett.*, **67**, 1160 (1995).
Microfabrication of a mechanically controllable break junction in silicon
- [9] M.A. Reed, C. Zhou, C.J. Muller, T.P. Burgin et J.M. Tour, *Science*, **278**, 252 (1997).
Conductance of a molecular junction
- [10] H. Park, A.K.L. Lim, A.P. Alivisatos, J. Park et P.L. McEuen, *Appl. Phys. Lett.*, **75**, 301 (1999).
Fabrication of metallic electrodes with nanometer separation by electromigration
- [11] S.Y. Chou, P.R. Krauss et P.J. Renstrom, *Appl. Phys. Lett.*, **67**, 3114 (1995).
Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers
- [12] L. Montelius, B. Heidari, M. Graczyk, I. Maximov, E.-L. Sarwe et T.G.I. Ling, *Microelectron. Eng.*, **53**, 521 (2000).
Nanoimprint- and UV-lithography: mix&match process for fabrication of interdigitated nanobiosensors
- [13] O. Tabata, R. Asahi, H. Funabashi, K. Shimaoka et S. Sugiyama, *Sens. Actuators A*, **34**, 51 (1992).
Anisotropic etching of silicon in TMAH solutions
- [14] G. Hashiguchi et H. Mimura, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **33**, L1649 (1994).
Fabrication of silicon quantum wires using separation by implanted oxygen wafer
- [15] T. Hiramoto, H. Ishikuro, K. Saito, T. Fujii, T. Saraya, G. Hashiguchi et T. Ikoma, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **35**, 6664 (1996).
Fabrication of Si nanostructures for single electron device applications by anisotropic etching
- [16] B.E. Deal et S.S. Grove, *J. Appl. Phys.*, **36**, 3770 (1965).
General relationship for the thermal oxidation of Si
- [17] A. Tixier, *Thèse*, Université de Lille 1 (1998).
Etude et caractérisation de structures d'isolement de type LOCOS pour une technologie CMOS 0,35 µm
- [18] K.R. Williams et R.S. Muller, *J. Microelectromech. Syst.*, **5**, 1057 (1996).
Etch rates for micromachining processing
- [19] M. Köhler, *Etching in microsystem technology*, **Wiley-VCH** (1999).
- [20] G. Larrieu et E. Dubois, à paraître (2003).
- [21] A.N. Cleland et M.L. Roukes, *Appl. Phys. Lett.*, **69**, 2653 (1996).
Fabrication of high frequency nanometer scale mechanical resonators from bulk Si crystals
- [22] A.N. Cleland et M.L. Roukes, *Nature*, **392**, 160 (1998).
A nanometre-scale mechanical electrometer

- [23] D.W. Carr, L. Sekaric et H.G. Craighead, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **16**, 3821 (1998).
Measurement of nanomechanical resonant structures in single-crystal silicon
- [24] S. Evoy, D.W. Carr, L. Sekaric, A. Olkhovets, J.M. Parpia et H.G. Craighead, *J. Appl. Phys.*, **86**, 6072 (1999).
Nanofabrication and electrostatic operation of single-crystal silicon paddle oscillators
- [25] H. Fujii, S. Kanemaru, T. Matsukawa, H. Hiroshima, H. Yokoyama et J. Itoh, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **37**, 7182 (1998).
Fabrication of a nanometer-scale Si-wire by micromachining of a Silicon-On-Insulator substrate
- [26] D.W. Carr, S. Evoy, L. Sekaric, H.G. Craighead et J.M. Parpia, *Appl. Phys. Lett.*, **75**, 920 (1999).
Measurement of mechanical resonance and losses in nanometer scale silicon wires
- [27] H. Toshiyoshi, M. Goto, M. Mita, H. Fujita, D. Kobayashi, G. Hashiguchi, J. Endo et Y. Wada, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **38**, 7185 (1999).
Fabrication of micromechanical tunneling probes and actuators on a silicon chip
- [28] K. Kakushima, M. Mita, D. Kobayashi, G. Hashiguchi, J. Endo, Y. Wada et H. Fujita, *Technical Digest of MEMS 2001 - 14th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, Piscataway, USA, 2001, p. 294.
Micromachined tools for nano technology - twin nano-probes and nano-scale gap control by integrated microactuators
- [29] H. Ishikuro et T. Hiramoto, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **38**, 396 (1999).
Fabrication of nano-scale point contact metal-oxide-semiconductor field-effect-transistors using micrometer-scale design rule
- [30] G. Hashiguchi, K. Kakushima, J. Endo, Y. Wada, H. Mimura, K. Yokoo et H. Fujita, *Proceedings of the 14th IEEE International Vacuum Microelectronics Conference*, Piscataway, USA, 2001, p.237.
Emission characteristics and in-situ TEM observation of Si lateral field emitters
- [31] K. Kakushima, G. Hashiguchi et H. Fujita, *21st International Display Research Conference and 8th International Display Workshops*, 16-19 octobre 2001, Nagoya, Japon.
Fabrication of twin field-emission tips by Si nano machining for TEM observation
- [32] H.I. Liu, D.K. Biegelsen, F.A. Ponce, N.M. Johnson et R.F.W. Pease, *Appl. Phys. Lett.*, **64**, 1383 (1994).
Self-limiting oxidation for fabricating sub-5 nm silicon nanowires
- [33] M. Nagase, A. Fujiwara, K. Yamazaki, Y. Takahashi, K. Murase et K. Kurihara, *Microelectron. Eng.*, **41/42**, 527 (1998).
Si nanostructures formed by pattern-dependent oxidation
- [34] C. Single, F. Zhou, H. Heidemeyer, F.E. Prins, D.P. Kern et E. Plies, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **16**, 3938 (1998).
Oxidation properties of silicon dots on silicon oxide investigated using energy filtering transmission electron microscopy
- [35] D.-B. Kao, J.P. McVittie, W.D. Nix et K.C. Saraswat, *IEEE Trans. Electron Devices*, **ED-35**, 25 (1988).
Two-dimensional thermal oxidation of silicon – II. Modeling stress effects in wet oxides

Conclusion générale de la thèse

Nous avons étudié dans cette thèse la possibilité de détecter la reconnaissance spécifique entre la biotine et la streptavidine d'une part, et la biotine et l'anticorps anti-biotine d'autre part, par le biais de caractéristiques courant-tension réalisées entre des électrodes séparées d'une distance inférieure à 100 nm. La streptavidine et l'anticorps anti-biotine ont été marqués avec un colloïde d'or de dimension nanométrique dans le but d'amplifier la conductivité mesurée à travers l'assemblage moléculaire. La voie principale de fabrication des nanoélectrodes a consisté à dessiner des électrodes parallèles sur des distances comprises entre 5 et 30 μm , à l'aide d'un masqueur électronique. La nécessité de confiner les molécules biologiques dans le voisinage des nanoélectrodes nous a amené à développer une méthode de passivation et de fonctionnalisation sélective du substrat, par l'intermédiaire de deux films moléculaires, l'octadécyltrichlorosilane (OTS) et le 3-aminopropyltriméthoxysilane (APTMS).

Les APTMS font ensuite l'objet d'une synthèse *in situ* pour transformer les terminaisons amine en groupements semicarbazides, tandis que les sondes de biotine à ancrer entre les nanoélectrodes sont fonctionnalisées avec une terminaison α -oxo aldéhyde. Des expériences de contrôle de la chimiosélectivité de la fixation des molécules de biotine sont réalisées en remplaçant la terminaison $-\text{CO}-\text{CHO}$ par un groupement chimique ne réagissant pas avec les fonctions semicarbazides (groupe terminal $-\text{CO}-(\text{CHOH})_2-\text{CO}-\text{Val}-\text{NH}_2$). Les interactions biomoléculaires étudiées ont tout d'abord été caractérisées en fluorescence afin d'établir les conditions d'incubation adéquates. Puis, l'interaction biotine/streptavidine a fait l'objet d'une étude en microscopies optique et à force atomique pour observer l'état local de la surface à chaque étape de la réalisation de l'interaction biomoléculaire. Plusieurs phénomènes ont été observés : la polymérisation des APTMS forme des agrégats dans le bain de silanisation, qui sont ensuite intégrés dans le film moléculaire greffé sur la surface. De nouveaux agrégats sont déposés lors de l'incubation de la biotine-COCHO, provenant probablement du solvant à l'issue de la dissolution de la poudre sous laquelle est stockée la biotine. Des gouttes de Tween 20, et des agrégats probablement formés par une agglutination des colloïdes d'or dans la solution, sont également présents sur le substrat. D'une manière générale, une différence dans la densité de colloïdes d'or et dans la rugosité moyenne de la surface sont constatées après le dépôt de la streptavidine marquée à l'or colloïdal.

Puis, l'interaction modèle biotine/streptavidine nous a permis de démontrer la faisabilité de la détection entre les nanoélectrodes. Un étalement sur près de 5 décades des intensités mesurées pour une tension appliquée de 0,1 V a été observé après le dépôt de la

biotine (fixation covalente de la biotine-COCHO et adsorption non-spécifique de la biotine-NH₂). Le mécanisme supposé du courant est une conduction de type ionique portée par les ions H₃O⁺ et OH⁻ et les sels Na⁺ et Cl⁻, à travers la fine pellicule d'eau intégrée dans l'assemblage moléculaire. Après l'incubation de la streptavidine marquée à l'or colloïdal, une augmentation plus fréquente des niveaux de courant, et sur une plus grande ampleur, est observée sur les molécules de biotine-COCHO immobilisées de manière covalente entre les électrodes, par rapport aux paires d'électrodes qui avaient mises en contact avec la solution de biotine-NH₂. L'adaptation de ces résultats à l'interaction spécifique entre la biotine et l'anticorps anti-biotine marquée à l'or colloïdal nous a montré que la densité de nanoparticules d'or dans le gap inter-électrodes semble être un paramètre important pour la détection de la reconnaissance biomoléculaire. Dans ce dernier cas, une réduction des niveaux d'adsorption non-spécifique des anticorps anti-biotine sur le film de semicarbazide a été réalisée à l'aide d'une saturation des sites d'adsorption par du lait écrémé après la fixation covalente de la biotine-COCHO et d'une compétition d'adsorption pendant l'incubation de l'anticorps.

Enfin, nous nous sommes appliqués à développer de nouvelles voies pour produire des nanoélectrodes à moindre coût et à plus grande échelle. Deux procédés permettant de fabriquer des électrodes séparées de quelques dizaines de nanomètres ont été présentés. La technique de fabrication repose sur la gravure anisotrope d'un substrat SOI (Silicon On Insulator), et permet de produire avec un bon rendement des nanostructures de dimensions comparables sur des surfaces d'environ 1 cm². Après leur métallisation par la formation d'un siliciure de platine, ces nanoélectrodes pourraient permettre d'étudier la réalisation d'un nombre très faible d'interactions biomoléculaires.

De nombreux travaux restent encore à réaliser. Un meilleur contrôle de l'ancrage de la biotine-COCHO pourrait être obtenu en retirant les agrégats présents lors de la polymérisation du film de 3-aminopropyltriméthoxysilane et pendant l'incubation de la biotine-COCHO. Pour cela, la silanisation d'un film de nature monomoléculaire terminé par un groupement amine pourrait nous permettre d'éviter la croissance des agrégats dans la solution. Des travaux en cours sont réalisés pour modifier la structure du peptide reliant la biotine à la fonction terminale -CO-CHO ou -NH₂, afin d'obtenir une meilleure dissolution de la biotine après son stockage sous forme de poudre. De plus, nous envisageons de remplacer l'utilisation du lait écrémé en tant que saturant des sites d'adsorption non-spécifique et compétiteur d'adsorption, par la Bovine Serum Albumin (BSA). Des travaux préliminaires en fluorescence ont montré que cette protéine ne tendait pas à masquer les sondes de biotine-COCHO fixées sur la surface. Nous devons également étudier la possibilité de détecter un faible nombre d'interactions biotine/streptavidine avec les nanoélectrodes produites par voie chimique et métallisées par un siliciure de platine. En particulier, la possibilité d'assembler le film

d'ancrage sur la surface d'oxyde de silicium après un contact avec une couche de platine doit faire l'objet de prochains travaux. Si la croissance du film d'APTMS s'avère insuffisante sur un tel substrat, d'autres techniques de métallisation seront mises en oeuvre (implantation, dopage de type n des substrats SOI initiaux).

Nous envisageons également de rechercher de meilleures conditions d'incubation des anticorps anti-biotine (concentration initiale de nanoparticules d'or, durée d'incubation) pour atteindre une densité supérieure de colloïdes sur la surface (études MEB et AFM). De plus, des expériences de contrôle de la spécificité des interactions entre les sondes de biotine et l'anticorps anti-biotine doivent être réalisées, en déposant, sur des échantillons témoins, d'autres anticorps marqués avec une nanoparticule d'or de même dimension. Un grand nombre d'électrodes doit être produit pour effectuer plusieurs séries de tests de détection de différentes interactions biomoléculaires. Nous souhaitons vérifier en particulier si le marquage des récepteurs biologiques avec une nanoparticule d'or est absolument nécessaire, ou si une variation caractéristique de la conductivité peut également être observée sans marquage des anticorps. Enfin, en cas de succès de la détection de l'interaction biotine/anticorps anti-biotine, ce dispositif sera appliqué à d'autres anticorps d'intérêt biomédical, en vue de développer un test de sérodiagnostic. Dans ce contexte, selon le schéma de travail des chapitres 4 et 5, les interactions étudiées devront être caractérisées en fluorescence et en microscopie AFM sur des plaquettes de silicium oxydé, puis caractérisées électriquement. L'ensemble de ces travaux a donné lieu au dépôt d'un brevet.

Détection électronique d'une interaction biomoléculaire entre des électrodes nanostructurées

L'objectif de cette thèse est de réaliser un nouveau type de biocapteur consacré à la détection d'une interaction biomoléculaire par l'intermédiaire d'un signal électrique. Le principe du dispositif est d'ancrer de manière covalente des sondes moléculaires sur un support solide entre des électrodes très rapprochées et de caractériser les molécules par un niveau de courant de référence ; puis l'évolution de la conductivité est observée lorsqu'une interaction spécifique est réalisée avec la molécule complémentaire marquée à l'or colloïdal.

Dans un premier temps, nous nous sommes appliqués à fabriquer des électrodes possédant des séparations typiquement inférieures à 100 nm. Une première méthode consiste à définir les électrodes directement sur un substrat isolant via une lithographie électronique. Des procédés de fabrication reposant sur des gravures chimiques anisotropes de substrats SOI ont également été développés et ont permis d'élaborer des nanostructures de silicium de type nanofils ou nanopointes orientées en vis-à-vis.

Une discrimination de la surface est ensuite effectuée en greffant successivement deux films organiques sur la couche isolante. L'échantillon est tout d'abord recouvert d'un film moléculaire afin de minimiser l'adsorption non-spécifique des molécules biologiques sur le substrat. Puis, un groupement de surface semicarbazide est préparé, via une synthèse *in situ*, dans le voisinage immédiat des nanoélectrodes. La biotine, molécule modèle impliquée dans une interaction biotine/streptavidine ou de type antigène/anticorps, est alors fixée de manière covalente entre les nanoélectrodes et établit le premier niveau des mesures électriques. Le greffage du film d'accrochage et la fixation des molécules-sondes sont étudiés par plusieurs techniques d'observation, et la nécessité de saturer les sites d'adsorption non-spécifique après l'incubation de la biotine est mise en évidence.

L'incubation de la streptavidine entraîne une modification de la conductivité d'un à trois ordres de grandeur. Les variations de courant sont moins marquantes dans le cas de la reconnaissance biotine/anticorps anti-biotine. Des mesures de contrôle ont été effectuées en parallèle sur un échantillon témoin pour lequel l'immobilisation des sondes a été bloquée.

Mots-clés : biocapteur, nanobiotechnologie, molécule biologique, interaction biotine/streptavidine, interaction antigène/anticorps, détection électrique, microfabrication, nanoélectrode.

Electronic detection of a biomolecular interaction between nanostructured electrodes

The goal of this thesis is the realization of a new kind of biosensor dedicated to the detection of a biomolecular interaction based on electrical signals. The principle of the device lays on the covalent fixation of molecular probes between very close electrodes built on a solid substrate, and the characterization of the molecules by a first electrical level ; then the evolution of conductivity is observed when a specific interaction is realized with the complementary molecule labelled with gold nanoparticles.

In a first step, we were concerned about the fabrication of electrodes with gaps typically less than 100 nm. A first method consists in directly designing electrodes over an insulating substrate thanks to an e-beam lithography. Fabrication processes relying on anisotropic chemical etchings of SOI wafers have been developed too, in order to elaborate silicon nanowires or opposite-oriented silicon nanotips.

Then, a surface discrimination has been realized by grafting successively two organic films on the insulating substrate. The sample is first overlaid with a thin molecular film in order to minimize non-specific adsorption of biological molecules on the substrate. A semicarbazide function is prepared, via an *in situ* synthesis, in the close neighbourhood of nanoelectrodes. Then biotin, a demonstrative molecule used in a biotin/streptavidin or in an antigen/antibody interaction, is covalently fixed between the nanoelectrodes and establishes the first level of electrical measurements. Grafting of the anchoring film and immobilization of molecular probes are studied by several observation techniques, and the need to saturate non-specific adsorption sites after the incubation of biotin is shown.

A conductivity change from one to three orders of magnitude is observed after incubation of streptavidin. Current variations are less apparent in the case of the biotin/anti-biotin antibody recognition. Electrical measurements have been achieved in parallel on a control sample for which immobilization of the probes has been blocked.

Keywords : biosensor, nanobiotechnology, biological molecule, biotin/streptavidin interaction, antigen/antibody interaction, electrical detection, microfabrication, nanoelectrode.
